



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



Vanessa Migliorini Urban

Efeito de tratamentos pós-polimerização
sobre o peso molecular, o grau de
conversão, a temperatura de transição
 vítrea e a liberação in vitro de
monômero residual, plastificante e
produtos de degradação de resinas
acrílicas para reembasamento imediato

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de
Araraquara - Universidade Estadual Paulista “Júlio
de Mesquita Filho”, para a obtenção do título de
Doutor em Reabilitação Oral (Área de
Concentração: Prótese).

Orientadora: Prof^a Dr^a Ana Lucia Machado
Co-orientadora: Prof^a Dr^a Quezia Bezerra Cass

Araraquara
2007

Urban, Vanessa Migliorini

Efeito de tratamentos pós-polimerização sobre o peso molecular, o grau de conversão, a temperatura de transição vítrea e a liberação in vitro de monômero residual, plastificante e produtos de degradação de resinas acrílicas para reembasamento imediato / Vanessa Migliorini Urban.– Araraquara: [s.n.], 2007
228 f. ; 30 cm.

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

Orientador: Profa. Dra. Ana Lucia Machado

Co-orientadora: Profa. Dra. Quezia Bezerra Cass

1. Acrilatos 2. Cromatografia líquida 3. Plastificantes 4. Saliva artificial 5. Cromatografia em gel 6. Análise espectral Raman I.
Título

VANESSA MIGLIORINI URBAN

Efeito de tratamentos pós-polimerização sobre o peso molecular, o grau de conversão, a temperatura de transição vítrea e a liberação in vitro de monômero residual, plastificante e produtos de degradação de resinas acrílicas para reembasamento imediato

COMISSÃO JULGADORA

Presidente e Orientador: Profa. Dra. Ana Lucia Machado

2º Examinador: Prof. Dr. Carlos Eduardo Vergani

3º Examinador: Prof. Dr. Carlos Alberto dos Santos Cruz

4º Examinador: Prof. Dr. Marcelo Ferraz Mesquita

5º Examinador: Profa. Dra. Regina Vincenzi Oliveira

Araraquara, 11 de janeiro de 2007.

Dados Curriculares

- Nascimento:** 18 de setembro de 1978 – Franca/SP.
- Filiação:** Sérgio Paulo Migliorini Urban e Maria Angélica M. Urban.
- 1996/1999:** Curso de Graduação - Faculdade de Odontologia de Araraquara/UNESP.
- 2000:** Estágio de atualização – Disciplina de Clínica Integrada – Departamento de Odontologia Social - Faculdade de Odontologia de Araraquara/UNESP.
- 2001/2003:** Pós-Graduação em Reabilitação Oral - Área de Concentração em Prótese – Curso de Mestrado - Faculdade de Odontologia de Araraquara/UNESP.
- 2003/2007:** Pós-Graduação em Reabilitação Oral - Área de Concentração em Prótese – Curso de Doutorado - Faculdade de Odontologia de Araraquara/UNESP.

Dedicatória

A **Deus**, pela vida e por todas as oportunidades de crescimento moral e espiritual.

“Procurai, pois, primeiramente o reino de Deus e a sua justiça, e todas essas coisas vos serão dadas por acréscimo. Por isso, não estejais inquietos pelo dia de amanhã, porque o dia de amanhã, cuidará de si mesmo. A cada dia basta o seu cuidado”.

São Mateus, cap. VI, v.33 e 34.

Aos meus pais **Angélica** e **Sérgio**, por terem proporcionado o suporte necessário para eu pudesse vencer todas as etapas da minha vida. Pelo amor incondicional, pela dedicação e pela vida.

*“Sois meu refúgio e minha fortaleza.
No conceber por amor,
No receber por amor,
No renunciar por amor,
No amor incondicional aos filhos e à família”.*

Às minhas irmãs **Tamara** e **Amanda**, à minha avó **Lourdes** e ao meu sobrinho **Pedro Henrique**, por todo amor, carinho e compreensão que sempre dedicaram a mim.

“A glória da amizade não é a mão estendida, nem o sorriso carinhoso, nem mesmo a delícia da companhia. É a inspiração espiritual que vem quando você descobre que alguém acredita e confia em você.”

Ralph Emerson.

...dedico este trabalho.

Agradecimentos especiais

À Profa. Dra. *Ana Lúcia Machado*, pela amizade, confiança, pela contribuição em minha formação profissional, pelo exemplo de dedicação e competência, pelo carinho, respeito, por todas as oportunidades concedidas durante o período de Pós-Graduação. No início, eram expectativas; no decorrer, amizade, esforço e dedicação; no final, lembranças, gratidão e muitas, muitas saudades. Que esses laços fortalecidos de amizade se estendam por nossas vidas...

À Profa. Dra. *Quezia Bezerra Cass*, pela confiança, disponibilidade, pelo respeito, pela dedicação, esmero e satisfação em ensinar, pela valiosa contribuição científica na execução deste trabalho, pela amizade e por ter acreditado em mim sempre.

"Todos anseiam por amizade, mas poucos se esforçam por conseguí-la. A amizade precisa de tempo. Tempo para se estabelecer e tempo para se manter."

Norman Shidle

Agradecimentos especiais

Ao meu amado **César**, por todo amor, pelo incentivo, pela compreensão, pelo respeito, carinho, companheirismo, estímulo, por ter sido sempre paciente comigo e por compartilhar meus sonhos e possibilitar que tornem realidade. Minha vida é muito mais feliz e completa ao seu lado e como é difícil e triste ficar longe de você... Te amo muito!

"As paixões são como as ventanias que enfunam as velas dos navios: algumas vezes os submergem, mas sem elas não podem navegar."

Voltaire

"Se um dia tiver que escolher entre o mundo e o amor... Lembre-se: se escolher o mundo ficará sem o amor, mas se escolher o amor, com ele conquistará o mundo."

Albert Einstein

Agradecimentos especiais

À querida amiga e irmãzinha **Karin**, pela amizade, pelo carinho, pela preocupação, por compartilhar todos os momentos bons e ruins da Pós-Graduação; chorando nas minhas dificuldades e alegrando-se com minhas conquistas, sempre me incentivando e apoiando em todas as decisões de minha vida, quer seja profissional ou pessoal. Você é minha terceira irmãzinha. Te adoro muito!

Às queridas amigas **Angela, Mariana, Nara, Regina** e **Rosângela**, por todo companheirismo, amizade, exemplo de dedicação e perseverança, pelos saudosos momentos que compartilhamos, pelo incentivo e carinho durante todo nosso convívio. Adoro muito vocês!

"Que é um amigo? É uma única alma que vive em dois corpos."

Aristóteles

"Quando a voz de um amigo se cala, nosso coração continua a ouvir o seu coração, porque na amizade, todos os desejos, ideais e esperanças, nascem e são partilhados sem palavras, numa alegria silenciosa. Quando nos separamos de um amigo, não devemos nos desesperar, pois o que nós amamos nele pode tornar-se mais claro na sua ausência, porque a amizade é o amadurecimento e que o melhor de nós seja para o nosso amigo."

...meus sinceros agradecimentos.

Agradecimentos

À Profa. Dra. **Rosemary Adriana Chiérici Marcantonio**, diretora desta Instituição.

Aos professores da Disciplina de Prótese Parcial Removível, Prof. Dr. **Carlos Eduardo Vergani**, Profa. Dra. **Eunice Teresinha Giampaolo** e Profa. Dra. **Ana Cláudia Pavarina**, pela confiança, amizade, convívio e apoio amigo demonstrados durante todo o período de Pós-Graduação.

Ao Conselho de Pós-Graduação em Reabilitação Oral, especialmente ao Prof. Dr. **Gelson Luís Adabo**, pela responsabilidade, seriedade e dedicação no desempenho de suas funções e particularmente pela flexibilidade e confiança na finalização e defesa deste trabalho.

Aos docentes do Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese desta Faculdade, em especial ao Prof. Dr. **Carlos Cruz**, Prof. Dr. **João Neudenir Arioli Filho** e Prof. Dr. **Marco Antonio Compagnoni**, pela disponibilidade e ensinamentos que contribuíram fundamentalmente para a minha formação e crescimento profissional.

A todos os meus amigos do Curso de Doutorado, especialmente **Fabiana, Janaina, Fabiano, Raphael** e **Sabrina**, pela convivência amiga, carinho e apoio durante todas as fases deste trabalho.

Aos amigos da Pós-Graduação, especialmente **Ewerton, Daniela, Juliê, José Maurício, Zeca, Andréa, João Gustavo, Livia, Paula, Roberta, Carol, Débora** e **Hercules**, pelo incentivo, amizade, companheirismo e por todos os momentos que passamos juntos.

Aos amigos do CLAE (UFSCar), **Bibi, Mariana, Roberta, Lúcia, Carmen, Fernando, Fernando 24, Milena, Kênia, Juliana, Túlio, Marcela, Bia, Alexandre, Patrícia e Flávio**, pela amizade, companheirismo, carinho, apoio e por todos os momentos agradáveis e divertidos que dividimos.

Aos amigos do Departamento de Química (UFSCar), **Joel, Moacir, Presley, Tetê, Adeilton e Daniela**, pela amizade e apoio durante todos os momentos.

Aos Profs. do Departamento de Química (UFSCar), Prof. Dr. **Antônio Gilberto Ferreira**, pela disponibilidade e profissionalismo e Prof. Dr. **Edson Roberto Leite**, por ter cedido espaço em seu laboratório de pesquisa para que alguns destes trabalhos pudessem ser desenvolvidos.

Ao Prof. do Departamento de Engenharia de Materiais (UFSCar), Prof. Dr. **Sebastião Vicente Canevarolo**, pela disponibilidade, profissionalismo, paciência e satisfação em ensinar.

Às amigas **Érica, Marinês e Letícia**, pela amizade, oportunidade de crescimento na orientação científica e auxílio no desenvolvimento deste trabalho.

Aos amigos **Karla e Giovani**, pela amizade, apoio, companheirismo e, apesar da distância, sempre estão presentes em minha vida, torcendo por mim e acreditando na minha capacidade.

À amiga **Renata** (Profa. de inglês), aos amigos do Centro Espírita Redenção, especialmente **Reginaldo, Ana Adélia, Pirola, Valéria, Sirlene e Juliana** e aos amigos do Centro Espírita Obreiros do Bem, especialmente **Rose**, pelo incentivo, amizade, carinho e dedicação.

Aos funcionários do Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese, da Pós-Graduação, da Biblioteca, da Portaria e do Departamento de Materiais, pela amizade, solicitude e disponibilidade em ajudar.

Ao Prof. Dr. **Romeu Magnani**, pela disponibilidade e realização da análise estatística deste trabalho.

À *Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)*, pela concessão da bolsa de Doutorado processo nº 03/04097-7, pela concessão da bolsa de Iniciação Científica processo nº 02/06919-1 e pela concessão do Auxílio à Pesquisa processo nº 02/01405-0, que tornaram possível a realização deste trabalho.

A todos que, embora não tenham sido citados, contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

"A saudade é a maior prova de que o passado valeu a pena."

...meus sinceros agradecimentos.

*“Só sabemos com exatidão quando sabemos
pouco; à medida que vamos adquirindo
conhecimentos, instala-se a dúvida”.*

Johann Wolfgang von Goethe

Sumário

Lista de abreviaturas e símbolos.....	15
1 Introdução.....	17
2 Proposição.....	24
3 Capítulos.....	26
3.1 Capítulo 1.....	26
3.2 Capítulo 2.....	57
3.3 Capítulo 3.....	81
3.4 Capítulo 4.....	103
4 Discussão.....	124
5 Conclusão.....	145
6 Referências.....	147
7 Apêndice.....	158
7.1 Apêndice 1.....	158
7.2 Apêndice 2.....	160
7.3 Apêndice 3.....	166
7.4 Apêndice 4.....	171
7.5 Apêndice 5.....	206
7.6 Apêndice 6.....	213
8 Resumo.....	223
9 Abstract.....	226

Esta tese de Doutorado foi redigida no formato alternativo e dividida em capítulos correspondentes a artigos de periódicos para publicação.

Capítulo 1. Degree of conversion and molecular weight of reline resins and denture base resin submitted to post-polymerization treatments

Vanessa M. Urban, Ana L. Machado, Carlos E. Vergani, Érica G. Jorge, Luís P. S. dos Santos, Edson R. Leite, Sebastião V. Canevarolo.

Artigo formatado para publicação no periódico **Materials Research**.

Capítulo 2. Glass transition temperature of denture base and hard chairside reline resins after post-polymerization treatments

Vanessa M. Urban, Ana L. Machado, Marinês O. Alves, Adeilton P. Maciel, Carlos E. Vergani, Edson R. Leite.

Artigo submetido à publicação no periódico **Materials Characterization**.

Capítulo 3. Leaching of residual monomers and plasticizer from hard chair-side reline resins in artificial saliva: effect of water bath post-polymerization treatment

Vanessa M. Urban, Ana L. Machado, Carlos E. Vergani, Eunice T. Giampaolo, Ana C. Pavarina, Quezia B. Cass.

Artigo formatado para publicação no periódico **Dental Materials**.

Capítulo 4. Short-term leachability of degradation products from hard chair-side reline resins in artificial saliva: effect of water bath post-polymerization treatment

Vanessa Migliorini Urban, Ana Lucia Machado, Carlos Eduardo Vergani, Eunice Teresinha Giampaolo, Ana Cláudia Pavarina, Quezia Bezerra Cass.

Artigo formatado para publicação no periódico **Analytical and Bioanalytical Chemistry**.

Lista de abreviaturas e símbolos

(L)	Líquido (monômero) das resinas acrílicas
(P)	Pó (pré-polímero) das resinas acrílicas
1,6-HDMA	1,6-hexanediol dimetacrilato
ACN	Acetonitrila
BA	Ácido benzóico
BMA	Butil metacrilato
C	Grupo controle
CBDF	Função distribuição de ramificação de cadeias poliméricas
Cf	Concentração final de uma solução
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
D	Duraliner II
DBNP	Dibutil-n-ftalato
DC	Grau de conversão
DSC	Calorimetria exploratória diferencial
EDC	Substâncias químicas endocrino-disruptoras
EGDMA	Etilenoglicol dimetacrilato
FTIR-Raman ou FT-Raman	Espectroscopia Raman com transformada de Fourier
GPC	Cromatografia de permeação a gel
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
IBMA	Isobutil metacrilato
K	Kooliner
L	Lucitone 550
LL	Lucitone 550 polimerizada pelo ciclo longo proposto pelo fabricante
LOAEL	Dose mínima necessária para observação de efeitos adversos
LS	Lucitone 550 polimerizada pelo ciclo curto proposto pelo fabricante

MA	Ácido metacrílico
MAOP	β -metacriloil oxietil propionato
MeOH	Metanol
MMA	Metil metacrilato
$\overline{M}_n$	Número do peso molecular médio
MOS	Margem de segurança
$\overline{M}_p$	Pico do peso molecular médio
MSDS	Dados de segurança dos materiais
MTT	Ensaio utilizado para avaliação de citotoxicidade por análise da integridade mitocondrial
MW	Tratamento pós-polimerização por energia de microondas
$\overline{M}_w$	Peso do peso molecular médio
MWD	Distribuição do peso molecular ou polidispersividade
$\overline{M}_w/\overline{M}_n$	Distribuição do peso molecular ou polidispersividade
N	New Truliner
PEMA	Polietil metacrilato
PMMA	Polimetil metacrilato
T	Tokuso Rebase Fast
T_g	Temperatura de transição vítrea
U	Ufi Gel hard
UV	Ultravioleta
Vp	Volume pipetado de uma determinada solução
Vf	Volume final de uma solução
WB	Tratamento pós-polimerização por imersão em água aquecida

1 Introdução

Nas reabilitações de pacientes total ou parcialmente desdentados, por meio de próteses removíveis, a manutenção da adaptação entre a parte interna das bases e os tecidos de suporte pode ser considerada como um dos aspectos críticos do tratamento, tendo em vista que o rebordo residual apresenta constantes alterações morfológicas, devidas ao processo de reabsorção que é crônico, progressivo, irreversível e de origem multifatorial⁹⁴. Em função dessa reabsorção, a adaptação das bases das próteses aos tecidos subjacentes deve ser periodicamente corrigida para a manutenção das condições de retenção e estabilidade obtidas inicialmente⁴¹. A readaptação das bases pode ser realizada no próprio consultório por meio do reembasamento imediato que, pela facilidade e rapidez de execução, constitui um método alternativo ao reembasamento do tipo mediato⁴¹. Esse procedimento proporciona aos profissionais soluções efetivas nos casos em que há necessidade de se realizar correções nas bases das próteses e restabelecer sua adaptação ao rebordo residual, bem como prolongar o tempo de utilização quando a confecção de novas próteses não está indicada, devido às condições do paciente ou dos tecidos de suporte⁴¹.

O reembasamento imediato é realizado utilizando-se resinas acrílicas autopolimerizáveis, especialmente formuladas para essa finalidade. Esses materiais são fornecidos na forma de um pó composto de polietil metacrilato (PEMA) e de um líquido que pode ser à base de butil metacrilato (BMA), isobutil metacrilato (IBMA) ou 1,6-hexanediol dimetacrilato (1,6-HDMA)⁷, apresentando, portanto, composições diferentes das resinas acrílicas autopolimerizáveis convencionais, à base de metil metacrilato (MMA). Tem sido demonstrado que essas diferenças na composição podem influenciar, significativamente, as propriedades físicas e mecânicas dos materiais reembasadores^{9,32,80,89,103}.

A caracterização físico-estrutural das resinas para reembasamento imediato por meio da análise de algumas características como peso molecular, grau de conversão e temperatura de transição vítrea (T_g) é um outro fator importante a ser considerado, uma vez que, associados à composição, esses aspectos também podem interferir diretamente nas propriedades desses materiais poliméricos. Da mesma forma, a identificação e a quantificação de substâncias residuais liberadas para a cavidade bucal, com o propósito de se determinar o potencial alérgico ou de sensibilização desses materiais reembasadores, constituem aspectos relevantes a serem analisados.

O processo de polimerização das resinas acrílicas ocorre simultaneamente a partir dos radicais livres que foram formados. Assim, o número de moléculas de monômero, com baixo peso molecular, que reage para formar as macromoléculas de polímero, com alto peso molecular, pode variar dependendo da capacidade das cadeias para o crescimento a partir dos radicais livres⁷⁸. Como resultado, o polímero final obtido não se apresenta como um material no qual todas as moléculas possuem o mesmo peso, mas sim possui uma distribuição de macromoléculas com diferentes pesos moleculares⁷⁸.

A distribuição do peso molecular e o comprimento das cadeias moleculares influenciam as propriedades do polímero. À medida que o peso molecular de um polímero aumenta, a resistência à tração, o módulo de elasticidade e a dureza também aumentam, enquanto o escoamento (“*creep*”) diminui⁵¹. Entretanto, a influência do peso molecular sobre a resistência dos polímeros ocorre até que um determinado comprimento médio da cadeia seja atingido²⁸. Tem sido relatado que a resistência à tração, ao impacto e à fadiga, o alongamento, o módulo de elasticidade e a T_g de resinas acrílicas para base de prótese^{15,17} podem ser reduzidos quando o peso molecular médio for inferior ao valor limite aproximado de 10^5 , apresentado por Martin et al.⁷⁰ em 1972. Acima desse valor, o polímero se apresenta com cadeias típicas longas e adequadas propriedades físicas e mecânicas^{8,35,39,58}.

Outros estudos têm demonstrado, ainda, que o tamanho e a distribuição das partículas e o peso molecular do pó de resinas acrílicas utilizadas

na confecção de bases de próteses e de materiais reembasadores resilientes podem influenciar a velocidade de dissolução e o molhamento pelo monômero^{74,87}, bem como os tempos de formação de massa e manipulação⁷⁶. O peso molecular do pó é diretamente relacionado à viscosidade^{76,87}, a qual representa a capacidade de escoamento dos materiais poliméricos, propriedade que poderia influenciar na adaptação obtida entre as bases das próteses e os tecidos orais, durante o reembasamento. Além disso, baixa viscosidade no início da polimerização resulta na formação de cadeias com baixo peso molecular e, conseqüentemente, em menores valores de resistência⁸⁷.

Além do peso molecular, a T_g também tem sido reconhecida como um dos importantes parâmetros dos materiais poliméricos devido à sua influência significativa sobre as propriedades mecânicas do material^{45,76}. A T_g é definida como a temperatura na qual o polímero apresenta a transição do comportamento vítreo para borrachóide, sendo também denominada de temperatura de amolecimento⁷⁸. Na definição de Jacobsen, Darr⁴⁶, a T_g indica que as cadeias moleculares do polímero obtiveram, geralmente a partir de fontes térmicas, energia suficiente para superar as barreiras que previnem a rotação das ligações intermoleculares. O material passa, então, da condição “congelada” vítrea, com mobilidade muito limitada entre as cadeias, para um sistema no qual as ligações polares apresentam-se enfraquecidas e se rompem, permitindo que as cadeias moleculares se movimentem mais livremente dentro da massa polimérica^{36,45}. Esse aumento da mobilidade tem efeito significativo sobre os polímeros e, durante a transição vítrea, alterações acentuadas em propriedades como módulo de elasticidade e índice de refração são observadas⁴⁵, tendo sido relatado que a resistência e o módulo de elasticidade diminuem quando a temperatura se aproxima da T_g , enquanto que a expansão térmica aumenta⁷⁸.

O peso molecular e a T_g estão relacionados entre si e ao processo de polimerização²⁹, que ocorre por meio da conversão de moléculas de monômero em macromoléculas do polímero. Tendo em vista que essa conversão não é totalmente completa, as resinas, após a polimerização, geralmente apresentam determinada quantidade de monômero residual^{6,62,66,98,102}. Ferracane, Greener²⁸

evidenciaram uma correlação entre a T_g de resinas compostas e o grau de conversão desses materiais, tendo sido observados valores mais baixos nas amostras que apresentaram menor grau de conversão. Resultados semelhantes foram obtidos em estudos realizados com resinas acrílicas, evidenciando que T_g mais baixas refletem níveis mais altos de monômero residual^{13,47}. A presença de monômero residual na resina polimerizada apresenta efeito plastificante, diminuindo a T_g para uma temperatura mais baixa que aquela considerada como a temperatura de transição característica do material⁴⁵.

Além do efeito negativo sobre as propriedades das resinas acrílicas, o monômero residual também pode ser liberado para o meio^{11,60,67,68,92,96,100,101} afetando a biocompatibilidade desses materiais. Estudos têm demonstrado que esse monômero é citotóxico in vitro^{20,90}, além de ter sido apontado como uma das possíveis causas de alterações como inflamação, eritema, dor, ulceração, erosão, prurido e edema labial na mucosa oral dos pacientes portadores de próteses^{18,33,42,83}. Esses sinais e sintomas podem estar relacionados à irritação química local, causada pelo monômero residual, ou a uma reação de hipersensibilidade alérgica, principalmente em indivíduos com história prévia de sensibilização^{14,55,62}. Além disso, reação alérgica diagnosticada como urticária crônica foi relatada como sendo o primeiro caso de envolvimento sistêmico desenvolvido a partir de materiais acrílicos⁶⁵.

Tem sido relatado, ainda, que ftalatos e ésteres de ácidos carboxílicos aromáticos são utilizados como plastificantes em materiais *soft* para reembasamento de bases de próteses e em condicionadores de tecidos⁷³. Alguns destes plastificantes também estão presentes, em menores quantidades, na composição de materiais para base de prótese^{69,92} e para reembasamento imediato^{7,8}. A liberação destes ftalatos para a cavidade bucal também deveria ser avaliada devido à possibilidade de indução de efeitos biológicos indesejáveis^{38,40,50}. Chatterjee, Dutta²¹ relataram que grupos ambientais e de saúde têm aumentado o interesse no estudo de ftalatos, os quais podem causar desordens hormonais, toxicidade reprodutiva, tumores hepatocelulares e desordens genitais devido à sua capacidade de se ligar aos receptores estrogênicos e devido à ação

tóxica em baixas dosagens durante determinados períodos de desenvolvimento fetal. Entretanto, os mecanismos pelos quais os ésteres ftálicos afetam a saúde humana ainda são pouco conhecidos. Apesar da concentração do plastificante dibutil-*n*-ftalato (DBNP) no líquido do material New Truliner ser baixa (8%)^{7,8} em relação aos materiais *soft* e condicionadores de tecido, também foi considerado oportuno avaliar a sua liberação em saliva artificial, uma vez que este composto tem sido relacionado a efeitos biológicos tóxicos. Além disso, não foram encontrados estudos de liberação deste plastificante a partir de materiais para reembasamento rígidos.

Tem sido observado, ainda, que além do monômero residual e do plastificante, outros produtos também podem ser liberados^{56,57,67-69,84,85,92,95-97}, uma vez que esses materiais estão sujeitos a influências químicas e mecânicas, as quais podem resultar em sua degradação e conseqüente liberação de substâncias^{27,69}. Essa liberação pode incluir tanto compostos aditivos como não aditivos. Os plastificantes, os inibidores, os catalisadores da reação e as partículas de carga são considerados compostos aditivos enquanto as frações de baixo peso molecular, os produtos de degradação e os contaminantes, introduzidos durante o processamento dos materiais, são considerados substâncias não aditivas⁶⁹. Entre os produtos da reação radicalar de polimerização, aditivos e produtos de degradação, formados a partir de hidrólise, decomposição ou oxidação, que podem ser liberados de resinas acrílicas à base de polimetil metacrilato (PMMA), podem ser citados o MMA, o ácido metacrílico (MA), o ácido benzóico (BA), o fenil benzoato, o fenil salicilato, o bifenil e o formaldeído^{1,22,56,57,67-69,84,92,95-97}.

De maneira similar ao que ocorre com o monômero residual e os plastificantes, essas substâncias também têm sido apontadas como agentes irritantes, as quais, através de sua liberação para o meio bucal, poderiam desencadear alterações na mucosa que mantém contato com as bases das próteses^{2,12,18,31,33,65,83}. Resultados de estudos que avaliaram a citotoxicidade de resinas acrílicas evidenciaram que os componentes extraídos a partir desses materiais apresentam efeitos tóxicos em diferentes níveis e tempos, os quais se prolongam por vários dias após a polimerização^{63,88}. As substâncias que eluem de

resinas acrílicas podem inibir o crescimento celular e alterar vários processos metabólicos. Resinas para base de prótese autopolimerizáveis, termopolimerizáveis ou ativadas por luz têm demonstrado diferentes graus de citotoxicidade *in vitro* e respostas alérgicas *in vivo*⁸⁸. Em um estudo prévio²⁰, também foi verificado que alguns dos materiais utilizados para o reembasamento do tipo imediato apresentaram-se citotóxicos.

O conteúdo de monômero residual varia dependendo do processo de polimerização utilizado^{44,49,99,102}, sendo maior nas resinas polimerizadas por meio de ativação química^{62,102}. Assim, as resinas utilizadas no reembasamento do tipo imediato, por serem autopolimerizáveis, podem apresentar níveis mais altos de monômero residual, os quais, dependendo de sua magnitude, poderiam influir na *Tg*, no peso molecular e, conseqüentemente, nas propriedades finais obtidas. Além disso, a liberação de monômero residual, de plastificante e de produtos de degradação está relacionada ao conteúdo inicial de compostos orgânicos residuais^{96,101} e à solubilidade desses compostos³⁴ e, deste modo, as resinas autopolimerizáveis para reembasamento imediato poderiam liberar quantidades maiores de substâncias residuais. Em função desses aspectos, e considerando-se os possíveis efeitos adversos dos compostos residuais, a utilização de métodos que promovam a redução dos níveis desses compostos poderia contribuir para melhorar tanto as propriedades físicas e mecânicas como a biocompatibilidade desses materiais reembasadores. Entretanto, os níveis de redução e a quantidade de compostos remanescentes que ainda poderiam ser liberados para o meio só podem ser evidenciados por meio de avaliações químicas analíticas. A redução da quantidade de monômero residual pode ser obtida por meio de liberação por difusão^{60,101}, reação adicional de polimerização^{6,17,60,61}, evaporação¹⁰, oxidação^{11,57,84,95} ou hidrólise^{11,57}. Estudos têm demonstrado que esses mecanismos podem ser induzidos através de tratamentos realizados após a polimerização, como a imersão em água aquecida ou irradiação com energia de microondas, reduzindo, significativamente a quantidade de monômero residual presente em resinas acrílicas termopolimerizáveis e autopolimerizáveis

convencionais^{17,60,96,105} assim como naquelas indicadas para o reembasamento imediato⁹⁹.

Enquanto vários estudos têm sido realizados com resinas compostas, resinas para base de prótese e materiais reembasadores macios, para avaliar o grau de conversão^{14,25,82,86}, peso molecular^{39,43,75}, T_g ^{28,46,48,79} e a liberação de monômero residual e outras substâncias^{3,62,73,92,98}, poucas informações relativas aos materiais reembasadores rígidos estão disponíveis^{7,53}, indicando que outros estudos ainda precisam ser desenvolvidos. A necessidade desses estudos torna-se ainda mais evidente pelo desenvolvimento contínuo de novos materiais reembasadores com diferentes formulações⁷. Esse aspecto é particularmente importante pela influência da composição sobre a reação de polimerização e, conseqüentemente, sobre o grau de conversão e nível de monômero residual, peso molecular e T_g . Além disso, conforme salientado por Tsuchiya et al.⁹⁷, a possibilidade de alterações bucais de etiologia desconhecida, como a estomatite protética e a síndrome da ardência bucal, estarem associadas à liberação de compostos a partir das próteses, torna imprescindível sua identificação e quantificação. Sheridan et al.⁹⁰ também ressaltam a necessidade de pesquisas futuras para identificar os componentes dos eluatos das resinas, os quais são responsáveis pelos efeitos citotóxicos observados em seu estudo. De acordo com Leuscher⁶⁴, para avaliar toxicologicamente os biomateriais, tem sido recomendado identificar e quantificar seus compostos liberados.

2 Proposição

Os objetivos deste estudo in vitro foram:

1. Analisar o peso molecular por cromatografia de permeação em gel (GPC) do pré-polímero (pó) de três resinas acrílicas autopolimerizáveis utilizadas para o reembasamento imediato (Kooliner - K, Ufi Gel hard - U e Tokuso Rebase Fast - T) e de uma resina acrílica termopolimerizável convencional (Lucitone 550 - L) e o peso molecular de corpos-de-prova da resina autopolimerizável Kooliner após ter sido submetida aos procedimentos de polimerização recomendados pelo fabricante (controle) e a tratamentos pós-polimerização (irradiação por energia de microondas - MW e imersão em água aquecida - WB). Analisar o grau de conversão por espectroscopia Raman com transformada de Fourier (FTIR-Raman) das resinas Kooliner, Ufi Gel hard, Tokuso Rebase Fast e Lucitone 550, após a polimerização recomendada pelos respectivos fabricantes e os tratamentos pós-polimerização por irradiação por microondas e imersão em água aquecida;
2. Analisar a T_g por calorimetria exploratória diferencial (DSC) das resinas autopolimerizáveis Duraliner II - D, Kooliner, New Truliner - N, Tokuso Rebase Fast e Ufi Gel hard e da resina termopolimerizável Lucitone 550, após a polimerização recomendada pelos respectivos fabricantes e os tratamentos pós-polimerização por irradiação por microondas e imersão em água aquecida;

3. Desenvolver, validar e aplicar um método analítico por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para a quantificação de monômero residual (isobutil metacrilato - IBMA e 1,6-hexanediol dimetacrilato - 1,6-HDMA) e de plastificante (dibutil-*n*-ftalato - DBNP) liberados em saliva artificial a partir dos materiais Kooliner, New Truliner, Ufi Gel hard e Tokuso Rebase Fast, após a polimerização recomendada pelos respectivos fabricantes e o tratamento pós-polimerização por imersão em água aquecida;
4. Desenvolver, validar e aplicar um método analítico por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para a quantificação dos produtos de degradação, ácido metacrílico (MA) e ácido benzóico (BA), liberados em saliva artificial a partir dos materiais Kooliner, New Truliner, Ufi Gel hard e Tokuso Rebase Fast, após a polimerização recomendada pelos respectivos fabricantes e o tratamento pós-polimerização por imersão em água aquecida.

3 Capítulos

3.1 Capítulo 1

Degree of conversion and molecular weight of one denture base and three reline resins submitted to post-polymerization treatments*

Vanessa M. Urban,¹ Ana L. Machado,¹ Carlos E. Vergani,¹ Érica G. Jorge,¹ Luís P. S. dos Santos,² Edson R. Leite,² Sebastião V. Canevarolo.³

¹ Department of Dental Materials and Prosthodontics, Araraquara Dental School, Sao Paulo State University, Rua Humaitá, 1680, Centro, Araraquara, SP, Brazil. CEP: 14801-903.

² Interdisciplinary Laboratory of Eletrochemistry and Ceramics, Department of Chemistry, Sao Carlos Federal University, Rodovia Washington Luís (SP – 310), Km 235, São Carlos, SP, Brazil. CEP: 13565-905.

³ Department of Material Engineering, Sao Carlos Federal University, Rodovia Washington Luís (SP – 310), Km 235, São Carlos, SP, Brazil. CEP: 13565-905.

Correspondence to:

Dr. Ana Lucia Machado

Department of Dental Materials and Prosthodontics - Araraquara Dental School
R. Humaitá, nº 1680, Araraquara, SP, Brazil, CEP: 14801-903.

Phone: 55-16-3301 6410 - fax: 55-16-3301 6406 - e-mail: cucci@foar.unesp.br

Contract grant sponsor: FAPESP; contract grant number: 02/01405-0.

* Formatado para publicação no periódico **Materials Research**.

Degree of conversion and molecular weight of one denture base and three reline resins submitted to post-polymerization treatments

Abstract

The effect of post-polymerization treatments (MW-microwave irradiation and WB-water-bath) on the degree of conversion (DC) of three reline resins (Ufi Gel hard-U, Kooliner-K, and Tokuso Rebase Fast-T) and one denture base resin (Lucitone 550-L), submitted to two polymerization cycles (LS-short and LL-long) was evaluated by using FT-Raman spectroscopy (n=5). The molecular weight ($\overline{M}_w$) of the powder of all materials and of K polymerized specimens (control; MW; and WB; n=3) was analyzed using GPC. DC data were analyzed using Kruskal-Wallis test ($\alpha=.05$). For control specimens, there were no significant differences between U (68%) and LL (77%) and among LL, K (81%), and T (84%). LS (92%) had the highest DC ($P<.05$). Only material K exhibited an increased DC after WB ($P<.05$). All powders had $\overline{M}_w$ from 4.0×10^5 to 6.5×10^5 and narrow $\overline{M}_w$ distributions (2.1 to 3.6). Polymerization and post-polymerization produced K specimens with $\overline{M}_w$ similar to that of K powder.

Keywords: reline resin, degree of conversion, molecular weight, post-polymerization treatment.

Introduction

Due to the alveolar bone resorption, which is an inevitable consequence of tooth loss, removable prostheses require periodic relining to reestablish tissue support for the denture base. Two techniques for relining dentures can be applied, the direct and the indirect.¹ The relining of denture bases directly in the oral cavity using autopolymerizing hard reline acrylic resins is faster than the laboratory-processed reline system. Because of the simplicity of the method and the good fit obtained,² the direct relining technique has been used to

improve the retention and stability of removable prostheses,² thus providing a more equal distribution of the load over the residual ridge.

During the polymerization reaction of the acrylic resins, the conversion of monomers to polymers is incomplete and some unreacted monomers are left in the polymerized materials.³ Polymerization time and temperature affect the residual monomer content, which is usually higher in autopolymerizing than in heat-polymerizing acrylic resins.^{4,5} The residual monomer content is a major factor influencing the properties of the polymers.^{6,7} The higher the degree of conversion of double bonds, the greater the mechanical strength of the resins.^{6,7} In addition, the unreacted monomer may leach from the polymerized material and irritate the soft tissue.⁸

It has been observed that the amount of residual monomer of acrylic resins can be reduced by post-polymerization treatments such as immersion in hot water⁹⁻¹¹ or microwave irradiation.¹¹⁻¹³ These treatments have also resulted in improved mechanical properties^{13,14} and biocompatibility of the polymerized materials.¹⁰ While a number of studies have evaluated the degree of conversion of dental composites,^{7,15,16} little information is available regarding denture base acrylic resins.^{3,17} Moreover, no information could be identified by the authors concerning the degree of conversion of autopolymerizing hard reline resins.

Molecular weight is another important aspect that can influence the performance of a polymer.¹⁸⁻²⁰ The polymerization of acrylic resins represents a conversion of low molecular weight molecules (monomers) into high molecular weight macromolecules (polymers). Some properties such as fatigue resistance,^{18,21} fracture toughness,²¹ tensile strength, modulus of elasticity, hardness,²² impact strength, and glass transition temperature may be affected¹⁸ when the average molecular weight of narrow molecular weight distribution acrylic is below a limiting value of approximately 10^5 .²⁰ The molecular weight of the prepolymer powder and the particle size distribution are also important factors influencing the doughing time of acrylic resins.^{23,24} Some studies have investigated the molecular weight of original powder and polymerized denture

base acrylic resins.^{19,23} However, there is limited information regarding the molecular weight of hard chair-side reline resins.²⁵

The aim of this study is to measure the degree of conversion (DC) of three hard chairside reline resins and one heat-polymerizing denture base acrylic resin, processed using two polymerization cycles. The effect of two post-polymerization treatments on the DC of these materials was also investigated. In addition, the molecular weight of the prepolymer powder of all materials and the molecular weight of a reline resin without crosslinking agent after polymerization and after being submitted to the post-polymerization treatments were analyzed.

Material and Methods

The identification codes, brand names, batch numbers, manufacturers, powder/liquid ratios, compositions, and polymerization conditions of the materials used in the present study are listed in Table 1.

TABLE 1 HERE

FT-Raman spectroscopy

The DC of the materials under investigation was determined by FT-Raman spectroscopy.

Specimens (n=15) of the heat-polymerizing resin Lucitone 550 (L), with dimensions of 10 x 4 x 4 mm, were produced by using stainless steel master dies, which were duplicated in silicone rubber to facilitate the removal of the processed specimens from the flask. These silicone molds were then invested in conventional metal dental flasks in Type IV dental stone to create working molds from which the specimens were made. The polymer powder and monomer were mixed following the manufacturer's directions (Table 1) and left covered until the dough stage was reached. The dough formed was packed into the molds, the flasks were closed and left under pressure for 30 minutes. The specimens were then polymerized using one of the two processing cycles recommended by the manufacturer (Table 1). After polymerization, the flasks were allowed to cool for

30 min in air, followed by 15 min in running water before deflasking. The specimens were then stored in distilled water at $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ for 48 h.²⁶

For the hard chair-side reline resins, specimens (n=15) were fabricated using a stainless steel mold with a breakaway compartment (10 x 4 x 4 mm). The mold was placed on the center of a glass plate, the materials were mixed following the manufacturers' instructions (Table 1) and inserted into the metal mould. A second glass plate was placed over the material, and pressure was applied until polymerization was complete (Table 1).

Specimens of all materials were then divided into three groups of five specimens each. Control group specimens were left untreated (C). MW group specimens were submitted to post-polymerization treatment by placing them in an adjustable microwave oven and irradiating with the following power/time combinations: 550 W/3 min – L (short cycle - LS and long cycle - LL); 550 W/5 min – Kooliner (K); 500 W/5 min – Tokuso Rebase Fast (T); and 550 W/4 min – Ufi Gel hard (U). These power/time settings were determined in a preliminary study, which evaluated the effect of nine different power/time combinations on the flexural strength of these materials.¹⁴ The power/time setting, which produced the highest flexural strength value for each material, was used in this study. For WB group, the heat-polymerized specimens (LS and LL) were submitted to a post-polymerization treatment by immersion in water bath at $55\pm 1^{\circ}\text{C}$ for 60 min following the recommendation for denture base resins reported by Tsuchiya et al.¹⁰ Reline resin specimens were immersed in water at 55°C for 10 min, following a reline material (Duraliner II, Reliance Dental Mfg. Co., Worth, Ill., USA) manufacturer's recommendation to reduce the monomer taste. In addition, the results from a previous study suggested that further polymerization could be achieved by using these MW and WB post-polymerization treatments.¹¹

FT-Raman spectra of all specimens were recorded at ambient pressure and temperatures using a Bruker RFS 100/S instrument (Bruker Optics Inc, Billerica, MA, USA) equipped with a broad-range quartz beamsplitter, defocusing optics, and an InGaAs detector. Spectra were obtained with 100 scans at a resolution of 4 cm^{-1} within a wavelength from 1.000 to 4.000 cm^{-1} in the

transmission mode, under a nitrogen gas purge, using 300 mW of Nd:YAG laser power.

The DC (%) of monomer-to-polymer was calculated by comparison of the absorbance ratio using a standard baseline technique²⁷ of the C=C peak from the methacrylate group at 1640 cm⁻¹ to that of the unchanging C=O peak from the ester group at 1720 cm⁻¹, which was used as a reference peak, before (monomer) and after polymerization (group C), and after the two post-polymerization treatments (groups MW and WB). By taking the ratio between the two absorbances, the fraction of unreacted double bonds could be calculated from the formula:

$$DC\% = \left(1 - \frac{[\text{Abs (C=C)} / \text{Abs (C=O)}] \text{ polymerized specimen}}{[\text{Abs (C=C)} / \text{Abs (C=O)}] \text{ monomer}} \right) \times 100\%$$

The DC values were then analyzed by Kruskal-Wallis test at 95% level of confidence.

Gel permeation chromatography (GPC)

GPC was used to determine the weight average molecular weight ($\overline{M}_w$), which represents the ratio of the overall weight of the molecules to the weight of the individual molecule, number average molecular weight ($\overline{M}_n$), which is the ratio of the whole molecules present in the mixture to the number of molecules, and polydispersity ($\overline{M}_w / \overline{M}_n$) which expresses molecular weight distribution, of the original powder of all materials. GPC analysis was also used to evaluate the effect of microwave irradiation and water bath post-polymerization treatments on $\overline{M}_w$, $\overline{M}_n$ and polydispersity of polymerized specimens of K reline resin, the only material that does not contain crosslinking agent in its composition (Table 1). During the polymerization reaction, the presence of a crosslinking agent in the liquid monomer leads to the formation of an insoluble crosslinked network (gel),³ which impairs the dissolution of samples in

tetrahydrofuran.^{19,23} Since this dissolution is a pre-requisite for analyzing molecular weight by means of gel permeation chromatography, in the present investigation no attempt was made to examine the molecular weight of the polymerized materials Lucitone 550, Tokuso Rebase Fast and Ufi Gel hard materials, which contain crosslinking agents.

K specimens (10 x 10 x 1 mm) were fabricated following the manufacturer's instructions and then divided into three groups (n=3). Control group specimens (C) were left untreated. For the MW and WB groups, the specimens were submitted to post-polymerization treatments by microwave irradiation or immersion in hot water, under the same conditions as described for the analysis of degree of conversion of material K.

Polymeric samples (original powder of all materials and specimens of the reline resin K) were left for 24 hours to dissolve in HPLC-grade tetrahydrofuran at concentrations of 0.1% w/v. Polystyrene standard samples (n=12) of known molecular weight were also dissolved in tetrahydrofuran. Both samples (polymeric and standard) were filtered through a 0.45 μm filter and injected into the GPC system (Waters model 410, Mildford, Mass., USA). Three size-exclusion columns (HR-3, HR-4, and HR-5E, Waters, Mildford, Mass., USA) were used and the column temperature was kept at 40°C. The mobile phase used was tetrahydrofuran at a flow rate of 1 mL/min. The injection volume was 100 μL and a refractometer was used as detector.

Polystyrene standard samples were used to generate a calibration curve of $\log \overline{M}_w$ vs. elution volume. Since the volume of eluant is proportional to the $\log$ of the molecular weight, a molecular weight distribution was then derived.¹⁸ Polymeric samples were chromatographed under conditions identical to those used for the molecular-weight standard determinations.

Results

The mean DC (%) and standard deviations for all materials and groups evaluated are given in Table 2.

TABLE 2 HERE

For group C, the highest ($P < .05$) DC mean value was observed for LS specimens. The relined resins T and K, and the denture base resin processed using the long cycle (LL) did not differ statistically from each other ($P > .05$). In addition, there was no significant difference ($P > .05$) between LL and the relined resin U. When materials were submitted to microwave irradiation (group MW), no significant differences ($P > .05$) were found in the DC mean values of LS, T and K specimens. After water bath post-polymerization treatment (group WB), no significant difference was observed when LS and K materials were compared, and the DC mean value of K specimens was not significantly different from that of T specimens ($P > .05$). After both post-polymerization treatments, the DC mean values of LL and U materials were comparable and significantly lower than the other materials evaluated ($P < .05$). Statistical analysis also revealed that only material K exhibited a significant increase ($P < .05$) in the DC mean value after water bath post-polymerization treatment. Figure 1 shows Raman spectra between 1600 cm^{-1} and 1800 cm^{-1} of representative specimens of Kooliner, with the C=C, and C=O vibrations upper labeled.

FIGURE 1 HERE

The results of the weight average molecular weight ($\overline{M}_w$), number average molecular weight ($\overline{M}_n$), and polydispersity ($\overline{M}_w/\overline{M}_n$) of the original powder of all materials are presented in Table 3. The peak molecular weights were found to be between 4.0×10^5 and 6.5×10^5 . All materials investigated in this study demonstrated a distribution of $\overline{M}_w/\overline{M}_n$ less than 4 (from 2.1 to 3.6). Table 4 shows $\overline{M}_w$, $\overline{M}_n$, and $\overline{M}_w/\overline{M}_n$ mean values of the polymerized K specimens. It can be seen that, both conditions, polymerization and post-polymerization treatments, did not affect molecular weight values.

TABLE 3 HERE

TABLE 4 HERE

The molecular weight distribution curves (MWD) for the original powder of all materials are presented in Figure 2 (2A – the entire MWD curves; 2B – enlargement of the MWD curve in the region of molecular weight lower than 10^5 ; 2C – enlargement of the MWD curve in the region of molecular weight higher than 10^6). The calculated weight fraction of chains with molecular weight values lower than 10^5 for the original powder of L, K, U, and T were 18%, 10%, 6.0%, and 10%, respectively. The calculated weight fraction of chains with molecular weight values higher than 10^6 for the original powder of L, K, U, and T were 7.0%, 7.0%, 19%, and 14%, respectively. Figure 3 shows the Chain Branching Distribution Function (CBDF),²⁸ which quantified the differences between the molecular weight distribution curves of denture base (L) and reline resin (K, U, and T) powders. The CBDF curves were calculated using Excel software running a macro. The macro calculates the shift between a point in the reference curve and its correspondent in the other curve.²⁹

FIGURE 2 HERE

FIGURE 3 HERE

The molecular weight distribution curves for K powder, K after polymerization (C), and K after post-polymerization treatments (MW and WB) are showed in Figure 4. The calculated weight fraction of chains with molecular weight values lower than 10^5 for K control, K after MW, and K after WB were 10%, 9.0%, and 13%, respectively. The calculated weight fraction of chains with molecular weight values higher than 10^6 for K control, K after MW, and K after WB were 10%, 8.0%, and 10%, respectively. Figure 5 shows the Chain Branching Distribution Function (CBDF),²⁸ which quantified the differences between the molecular weight distribution curves of K powder, K after MW, and K after WB compared with K control.

FIGURE 4 HERE

FIGURE 5 HERE

Discussion

FT-Raman scattering used in the present investigation is an alternative method that has been widely used to determine the degree of conversion of polymeric materials by measuring the carbon double bonds (C=C) converted into carbon single bonds (C-C).^{15,16} The low-power near-infrared laser in the FT-Raman spectrometer makes it possible to analyze colored samples, which can heat in the laser beam, without the loss of sensitivity due to fluorescence of organics.³⁰ This technique can be applied to normal denture materials with pigments in contrast to the direct infrared method, which can be used only for transparent polymeric materials.³¹ Other advantages of FT-Raman scattering include: (1) rapid analysis with a minimum of sample preparation, because the incident radiation can be focused on the sample and the scattered radiation collected with suitable collection optics; (2) the sensitivity of Raman scattering to the highly symmetrical C=C vibration of the acrylate resins used in the dentistry.¹⁶

It has been stated that there is an inverse relationship between the degree of conversion and the residual monomer content, thus the higher the former the lower the latter.^{4-6,32} In a previous study,¹¹ high performance liquid chromatography (HPLC) was conducted to determine the residual monomer content of materials Lucitone 550, Tokuso Rebase Fast, Ufi Gel hard, and Kooliner, under the same conditions used in the present investigation to evaluate their degree of conversion (Table 2). The results from both studies revealed that this inverse relationship was observed for materials Lucitone 550, Ufi Gel hard and Tokuso Rebase Fast. In addition, when these materials were compared, the results followed a similar pattern in both studies. Therefore, the Lucitone 550 specimens polymerized using the short cycle, which included a terminal 30 minutes at 100°C, showed significantly higher degree of conversion (Table 2) and

lower residual monomer levels¹¹ than those processed with the long cycle, in all groups evaluated. These results can be attributed to the polymerization temperature used in the long cycle, which is lower than the glass transition temperature (T_g) of the matrix phase of the resin Lucitone 550 (97.0 to 100°C).³³ As a result, the conversion was limited due to lower molecular chain motions and immobilization of monomer in the glassy polymer.³

For the reline resins Ufi Gel hard and Tokuso Rebase Fast, the results from the present investigation also agree well with those previously reported.¹¹ Ufi Gel hard exhibited higher residual monomer content¹¹ and lower degree of conversion compared with Tokuso Rebase Fast. In addition, in both studies, the values obtained for Ufi Gel hard and Tokuso Rebase Fast reline resins were comparable with those of the denture base resin Lucitone 550, processed using the long and the short cycle, respectively (Table 2).¹¹ These findings differ from results of conventional methyl methacrylate-based resins. For these resins, the residual monomer is usually higher in the autopolymerized than in the heat-polymerized materials,^{5,6} due to the lower degree of conversion achieved by the use of a chemical activator than that generated by heat-activation. One factor that may have accounted for the favorable results observed for materials Ufi Gel hard and Tokuso Rebase Fast is their composition. These reline resins contain the cross-linking agent 1,6-hexanediol dimethacrylate,³⁴ whereas Lucitone 550 denture base resin contain the cross-linking agent ethylene glycol dimethacrylate (Table 1). The increased distance between the methacrylate groups of the cross-linking agent 1,6-hexanediol dimethacrylate probably enhanced the reactivity of the second double bond, thus favoring the monomer to polymer conversion.³³ Therefore, despite the fact that the polymerization of Ufi Gel hard and Tokuso Rebase Fast was chemically activated, their degree of conversion and residual monomer level were similar to those of the heat-polymerizing denture base resin Lucitone 550.

Differently from the other materials, a comparison of the results from this study with those of the previous investigation¹¹ demonstrated that an indirect relationship between degree of conversion and residual monomer content

was not observed for Kooliner reline resin. Table 2 shows that the degree of conversion of Kooliner material did not differ from that of Tokuso Rebase Fast, and was significantly higher than that of Ufi Gel hard, in all groups evaluated. In contrast, the residual monomer level of Kooliner was found to be significantly higher than those of reline resins Ufi Gel hard and Tokuso Rebase Fast.¹¹ The difference in results between the two studies could be related to the materials composition as well as the analytical methods used in each investigation. Ufi Gel hard and Tokuso Rebase Fast contain dimethacrylate monomer, whereas Kooliner liquid contains the monofunctional monomer isobutyl methacrylate (Table 1). As the polymerization progresses, the network formation decreases the mobility of monomers resulting in unreacted double bonds. Part of these unreacted methacrylate groups remain as monomers that can leach out from the polymerized material. Part of the dimethacrylate monomers react only to one of the double bond, resulting in pendant molecules, which remain bound within the polymer network, and are not free to elute.³⁵ While Raman spectroscopy used to determine the degree of conversion measures all the unreacted double bonds in the polymer, including pendant groups and extractable species, the HPLC analysis is performed by extraction of the free monomer from the polymerized material.¹¹ Other investigators also have stated that only a fraction of the unreacted carbon-carbon double bonds in the polymer matrix are present on residual monomer.^{32,35} This may help explain why the residual monomer levels of Ufi Gel hard and Tokuso Rebase Fast were lower than that of Kooliner, even though they all had quite similar degree of conversion. Another possible explanation for the differences between this and the previous study could be the fact that the residual monomer was extracted from the whole polymer matrix of each specimen in HPLC analysis. However, Raman spectroscopy is essentially a surface measuring technique, thus spectra reveal the absorption in the actual region representative of the top five microns of the specimens.³³ To validate this hypothesis, however, Raman spectroscopic analysis at different depths of reline resin specimens should be made.

When the effect of post-polymerization treatments on the degree of conversion of the materials evaluated is considered, it was found that only material Kooliner exhibited a significant increase in the degree of conversion after water bath post-polymerization treatment compared to control (Table 2 and Figure 1). The reduction in the intensity of the aliphatic (C=C) peak at 1640 cm^{-1} in relation to the carbonyl (C=O) peak at 1720 cm^{-1} is observed when comparing the spectrum of monomer (liquid) to the control group (C), and the control to the water-bath post polymerization group (WB). These results are also different from those of a previous study,¹¹ in which both post-polymerization treatments promoted a significant reduction in the residual monomer content of materials Kooliner, Ufi Gel hard and Tokuso Rebase Fast. The denture base resin Lucitone 550 polymerized using the short cycle also showed a significant decrease in the residual monomer after being immersed in hot water. The differences between the two studies may be partially explained by the effects of the post-polymerization treatments on the polymer matrix. During these treatments, mechanisms such as diffusion into water,^{4,9} hydrolysis,³⁶ further polymerization at active sites,^{9,13} and monomer volatilization³⁷ may reduce significantly the free unreacted monomer, but do not necessarily have an effect on pendant double bonds, which may remain unaltered in the polymer matrix. Therefore, the mechanisms involved in the post-polymerization treatments were more effectively detected when using the HPLC method than by using Raman spectroscopy.

The original powders of all materials were evaluated using gel permeation chromatography (GPC) to determine the weight average molecular weight ($\overline{M}_w$), number average molecular weight ($\overline{M}_n$), and polydispersivity ($\overline{M}_w/\overline{M}_n$). GPC analysis was chosen because it is a reliable method of molecular weight determination, enabling molecular weight distributions to be established quickly and accurately,³⁸ and has been used by several investigators.^{18,19,23,39}

It has been shown that the existence of chains with molecular weights of less than 10^5 may have a plasticizer effect, thus weakening the polymer.⁴⁰ According to Ruyter & Svendsen,³⁵ the strength of a polymer increases

with increasing molecular weight. However, the strength becomes fairly constant at molecular weights above 6.0×10^5 for polymethyl methacrylate. Figure 2 (A and B) shows that, in comparison to the reline resins, the Lucitone 550 powder contained significantly higher amount of polymer chains having molecular weight lower than 10^5 . Large amounts of polymer chains with molecular weight higher than 10^6 was also found for materials Ufi Gel hard and Tokuso Rebase Fast. Figure 3 corroborates this finding, showing that the difference between denture base powder and reline resin powders is more pronounced below 10^5 . Among the reline resins tested, the Ufi Gel hard exhibited higher concentration of chains with molecular weight greater than 10^5 , when compared with Lucitone 550. This is demonstrated in Figure 3, where the CBDF curve of material Ufi Gel hard is at a greater distance from the zero line. These results indicated that the polymeric beads of the reline resins are polymerized by the suspension method at a higher degree of polymerization than the denture base material. Despite of this, the $\overline{M}_w$ of all original powders, including the Lucitone 550 material, was greater than 10^5 (Table 3), at which chain entanglement occurs,²⁹ and was in the range where the properties are largely independent of molecular weight.²⁰ Hence, it is likely that the molecular weights of the powders will have little effect on the mechanical properties of the polymerized materials.

In addition to the strength, the flow property of a methacrylate-based resin can be regulated by the molecular weight of polymer powders,²⁴ mainly by the increase in the fraction of molecules with molecular weight higher than 10^6 , as observed for materials Ufi Gel hard and Tokuso Rebase Fast. Table 1 shows that the hard chair-side reline resins manufacturers have also added monomers with molecular weight higher than that of methyl methacrylate (100.12), such as isobutyl methacrylate (142.20), and 1,6-hexanediol dimethacrylate (254.33). For reline materials composed of high molecular weight monomers and prepolymers, the working time of the bulk polymerization decreases due to the increase in the material's viscosity. A clinical evaluation of some hard chair-side reline resins demonstrated that the working and setting times were significantly shorter for Tokuso Rebase Fast than for Kooliner.² In addition,

Kooliner was considered unsatisfactory in 47% of cases because of the high flow, which make border moulding particularly difficult.² Thus, it is likely that the flow characteristics of Ufi Gel hard and Tokuso Rebase Fast mixtures may play a role in producing satisfactory functional impression of the denture-bearing area. However, other studies should evaluate the influence of flow on the impression accuracy and the resulting fit of the relined denture.

It is known that the molecular weight distribution is more important than the attainment of a high average molecular weight, provided that the amount of polymer chains with a molecular weight of less than 10^5 is reduced to a minimum.⁴⁰ The chains have the same length and weight when the ratio $\overline{M}_w/\overline{M}_n$ is equal to 1.0. However, this is an ideal situation, which is not possible in practice. Polydispersity up to 5.0 would indicate a narrow distribution and between 5.0 and 20 a medium distribution.²³ In this work, all materials investigated have shown a narrow molecular weight distribution with polydispersity indices between 2.1 and 3.6 (Table 3). The value for Lucitone 550 resin is in general agreement with those obtained with a conventional cross-linked denture base resin for water-bath polymerization.¹³ Moreover, the values obtained for Tokuso Rebase Fast and Kooliner are similar to those obtained by Arima et al. (1.8 and 1.7, respectively).²⁵

The results for Kooliner polymerized specimens are not in agreement with Huggett et al.,¹⁹ who demonstrated that the polymerized material generally displayed higher molecular weight values than the original powder component. Tables 3 and 4 present the $\overline{M}_w$ values of Kooliner powder and Kooliner after polymerization, respectively. The weight average of Kooliner polymerized was slightly higher than that of Kooliner powder, but the difference is not significant because it is within the systematic error of the method. This observation is also evidenced by the superimposition of all molecular weight distribution curves (Figure 4), and their calculated shift, in terms of the CBDF function, being almost zero (Figure 5). Thus, the molecular weight distribution achieved in bulk polymerization of Kooliner material was shown to be similar to

that obtained by the manufacturer during the polymerization of the polymeric powder.

Higher temperatures usually favor faster monomer conversion, since propagation constants and diffusion coefficients increase with temperature. A temperature increase can also affect polymer quality, for example, by affecting the molecular weight distribution or even degrading the polymer chains.¹² However, the molecular weight of Kooliner reline resin was not affected by the heating produced by the post-polymerization treatments (Table 4, Figures 4 and 5).

Conclusion

Within the parameters of the study design and materials tested, the following conclusions can be draw:

1. The degree of conversion of material Ufi Gel hard was similar to that of Lucitone 550 polymerized using the long cycle, and lower than those of the other materials.
2. In all groups evaluated, the short polymerization cycle produced Lucitone 550 specimens with a significant higher degree of conversion than the long cycle.
3. Water-bath post-polymerization treatment increased the degree of conversion for Kooliner material. The degree of conversion of the other materials was not influenced by both microwave and water-bath post-polymerization treatments.
4. Polymer powder of all materials have weight average molecular weights exceeding 10^5 and narrow molecular weight distributions.
5. After polymerization and post-polymerization, the weight average molecular weight values obtained for Kooliner material were similar to that of the original Kooliner powder.

Acknowledgements

This study was supported by Sao Paulo State Foundation (FAPESP Grant 02/01405-0). The authors would like to thank Dr. Rosa Lucia Simencio and CCDM (Centro de Caracterização e Desenvolvimento de Materiais UFSCar/UNESP) for carrying out the gel permeation chromatography determinations.

References

1. Dahl JE, Frangou-Polyzois MJ, Polyzois GL. In vitro biocompatibility of denture relining materials. *Gerodontology*. 2006; 23 (1):17-22.
2. Haywood J, Basker RM, Watson CJ, Wood DJ. A comparison of three hard chairside denture reline materials. Part I. Clinical evaluation. *European Journal of Prosthodontics and Restorative Dentistry*. 2003; 11 (4):157-163.
3. Ruyter IE, Oysaed H. Conversion in denture base polymers. *Journal of Biomedical Materials Research*. 1982; 16 (5):741-754.
4. Vallittu PK, Miettinen V, Alakuijala P. Residual monomer content and its release into water from denture base materials. *Dental Materials*. 1995; 11 (6):338-342.
5. Vallittu PK, Ruyter IE, Buykuilmaz S. Effect of polymerization temperature and time on the residual monomer content of denture base polymers. *European Journal of Oral Science*. 1998; 106 (1):588-593.
6. Lee SY, Lai YL, Hsu TS. Influence of polymerization conditions on monomer elution and microhardness of autopolymerized polymethyl methacrylate resin. *European Journal of Oral Science*. 2002; 110 (2):179-183.
7. Sideridou I, Tserki V, Papanastasiou G. Effect of chemical structure on degree of conversion in light-cured dimethacrylate-based dental resins. *Biomaterials*. 2002; 23 (8):1819-1829.
8. Barclay SC, Forsyth A, Felix DH, Watson IB. Case report--hypersensitivity to denture materials. *British Dental Journal*. 1999; 187 (7):350-352.
9. Lamb DJ, Ellis B, Priestley D. The effects of process variables on levels of residual monomer in autopolymerizing dental acrylic resin. *Journal of Dentistry*. 1983; 11 (1):80-88.
10. Tsuchiya H, Hoshino Y, Tajima K, Takagi N. Leaching and cytotoxicity of formaldehyde and methyl methacrylate from acrylic resin denture base materials. *Journal of Prosthetic Dentistry*. 1994; 71 (6):618-624.
11. Urban VM, Machado AL, Oliveira RV, Vergani CE, Pavarina AC, Cass QB. Residual monomer of reline acrylic resins. Effect of water-bath and microwave post-polymerization treatments. *Dental Materials*. 2006. *In Press*.

12. Araújo PHH, Sayer C, Poço JGR, Giudici R. Techniques for reducing residual monomer content in polymers: a review. *Polymer Engineering and Science*. 2002; 42 (7):1442-1468.
13. Blagojevic V, Murphy VM. Microwave polymerization of denture base materials. A comparative study. *Journal of Oral Rehabilitation*. 1999; 26 (10):804-808.
14. Vergani CE, Seo RS, Pavarina AC, dos Santos Nunes Reis JM. Flexural strength of autopolymerizing denture reline resins with microwave postpolymerization treatment. *Journal of Prosthetic Dentistry*. 2005; 93 (6):577-583.
15. Emami N, Söderholm KJM, Berglung LA. Effect of light power density variations on bulk curing properties of dental composites. *Journal of Dentistry*. 2003; 31 (3):189-196.
16. Shin WS, Li XF, Schwartz B, Wunder SL, Baran GR. Determination of the degree of cure of dental resins using Raman and FT-Raman spectroscopy. *Dental Materials*. 1993; 9 (5):317-324.
17. Bartoloni JA, Murchison DF, Wofford DT, Sarkar NK. Degree of conversion of denture base materials for varied polymerization techniques. *Journal of Oral Rehabilitation*. 2000; 27 (6):488-493.
18. Beech DR. Molecular weight distribution of denture base acrylic. *Journal of Dentistry*. 1975; 3 (1):19-24.
19. Huggett R, Bates JF, Packham DE. The effect of the curing cycle upon the molecular weight and properties of denture base materials. *Dental Materials*. 1987; 3 (3):107-112.
20. Martin RJ, Johnson JF, Cooper AR. Mechanical properties of polymers: the influence of molecular weight and molecular weight distribution. *Journal of Macromolecular Science - Reviews in Macromolecular Chemistry and Physics*. 1972; C8 (9):57-199.
21. Graham J, Pruitt L, Ries M, Gundiah N. Fracture and fatigue properties of acrylic bone cement. *Journal of Arthroplasty*. 2000; 15 (8):1028-1035.

22. Kusy RP, Katz MJ. Effect of molecular weight on the fracture surface energy of poly(methyl methacrylate) in cleavage. *Journal of Materials Science*. 1976; 11 (7):1475-1486.
23. Harrison A, Magara JB, Huggett R. The effect of variation in powder particle size on the doughing and manipulation times and some mechanical properties of acrylic resin. *European Journal of Prosthodontics and Restorative Dentistry*. 1995; 3 (6):263-268.
24. Mutlu G, Huggett R, Harrison A. Factors that affect the rheologic properties of acrylic resin denture base materials. *Journal of Prosthetic Dentistry*. 1994; 71 (2):186-191.
25. Arima T, Murata H, Hamada T. Analysis of composition and structure of hard autopolymerizing relined resins. *Journal of Oral Rehabilitation*. 1996; 23 (5):346-352.
26. International Organization for Standardization. Specification 1567: denture base polymers. 2nd ed. Switzerland: ISO, 1998.
27. Rueggeberg FA. Determination of resin cure using infrared analysis without an internal standard. *Dental Materials*. 1994; 10 (4):282-286.
28. Pinheiro LA, Chinelatto MA, Canevarolo SV. The role of chain scission and chain branching in high density polyethylene during thermo-mechanical degradation. *Polymer Degradation and Stability*. 2004; 86 (3):445-453.
29. Canevarolo SV. Chain scission distribution function for polypropylene degradation during multiple extrusions. *Polymer Degradation and Stability*. 2000; 70 (1):71-76.
30. Rehman I, Harper EJ, Bonfield W. In situ analysis of the degree of polymerization of bone cement by using FT-Raman spectroscopy. *Biomaterials*. 1996; 17 (16):1615-1619.
31. Austin AT, Basker RM. The level of residual monomer in acrylic denture base materials with particular reference to a modified method of analysis. *British Dental Journal*. 1980; 149 (10):281-286.
32. Ferracane JL. Elution of leachable components from composites. *Journal of Oral Rehabilitation*. 1994; 21 (4):441-452.

33. Ruyter IE, Svendsen SA. Flexural properties of denture base polymers. *Journal of Prosthetic Dentistry*. 1980; 43 (1):95-104.
34. Arima T, Murata H, Hamada T. Properties of highly cross-linked autopolymerizing reline acrylic resin. *Journal of Prosthetic Dentistry*. 1995; 73 (1):55-59.
35. Tuusa SMR, Puska MA, Lassila LVJ, Vallittu PK. Residual monomers released from glass-fibre-reinforced composite photopolymerised in contact with bone and blood. *Journal of Materials Science Materials in Medicine*. 2005; 16 (1):15-20.
36. Koda T, Tsuchiya H, Yamauchi M, Ohtani S, Takagi N, Kawano J. Leachability of denture base acrylic resins in artificial saliva. *Dental Materials*. 1990; 6 (1):13-16.
37. Bagis YH, Rueggeberg FA. The effect of post-cure heating on residual, unreacted monomer in a commercial resin composite. *Dental Materials*. 2000; 16 (4):244-247.
38. Evans JM. Gel permeation chromatography: a guide to data interpretation. *Polymer Engineering and Science*. 1973; 13 (6):401-408.
39. Jones DW, Hall GC, Sutow EJ, Langman MF, Robertson KN. Chemical and molecular weight analyses of prosthodontic soft polymers. *Journal of Dental Research*. 1991; 70 (5):874-879.
40. Anderson JN. *Applied dental materials*. Blackwell Scientific Publications: Oxford, USA, 1976.

Table 1. Materials evaluated in this study

<i>Code</i>	<i>Brand name</i>	<i>Batch number</i>	<i>Manufacturer</i>	<i>Powder (P)/ Liquid (L) ratio (g/mL)</i>	<i>Composition</i>		<i>Polymerization condition</i>
					<i>Powder</i>	<i>Liquid</i>	
K	Kooliner	080700A (P) 062900A (L)	Coe Laboratories, Inc., York, Chicago, Ill., USA	1.4/1.0	PEMA	IBMA	12 min at room temperature
T	Tokuso Rebase Fast	437 (P) 094 (L)	Tokuyama Dental Corp., Tokyo, Japan	2.05/1.0	PEMA	MAOP and 1,6-HDMA	6 min at room temperature
U	Ufi Gel hard	330936 (P) 321892 (L)	Voco GmbH, Cuxhaven, Germany	1.76/1.0	PEMA	1,6-HDMA	7 min at room temperature
LS	Lucitone 550 (short cycle)	65173 (P) 64979 (L)	Dentsply International Inc., York, Pa., USA	2.1/1.0	PMMA	MMA and EGDMA	90 min at 73°C and then boiling water for 30 min
LL	Lucitone 550 (long cycle)	65173 (P) 64979 (L)	Dentsply International Inc., York, Pa., USA	2.1/1.0	PMMA	MMA and EGDMA	9 h at 73°C

PEMA, poly (ethyl methacrylate); IBMA, isobutyl methacrylate; MAOP, β -methacryloyl oxyethyl propionate; 1,6-HDMA, 1,6-hexanediol dimethacrylate; PMMA, poly (methyl methacrylate); MMA, methyl methacrylate; EGDMA, ethylene glycol dimethacrylate.

Table 2. Degree of conversion (%) expressed as mean values with standard deviations and results of statistical analysis

Material	Group		
	C	MW	WB
LS	92 ± 2.0 Aa	89 ± 4.0 Aa	92 ± 1.0 Aa
T	84 ± 1.0 Ba	89 ± 2.0 Aa	87 ± 1.0 Ba
K	81 ± 5.0 Ba	86 ± 6.0 Aab	88 ± 3.0 ABb
LL	77 ± 7.0 BCa	77 ± 7.0 Ba	73 ± 7.0 Ca
U	68 ± 6.0 Ca	74 ± 1.0 Ba	71 ± 6.0 Ca

Horizontally, means with identical small letters are not significantly different ($P>.05$)

Vertically, means with identical capital letters are not significantly different ($P>.05$)

Table 3. Number average molecular weight ($\overline{M}_n$), weight average molecular weight ($\overline{M}_w$), and polydispersivity ($\overline{M}_w/\overline{M}_n$) of the original powder samples for all materials evaluated

Material	$\overline{M}_w$	$\overline{M}_n$	$\overline{M}_w/\overline{M}_n$
L	4.0×10^5	1.1×10^5	3.6
T	5.2×10^5	2.2×10^5	2.3
U	6.5×10^5	2.9×10^5	2.2
K	4.3×10^5	2.1×10^5	2.1

Table 4. Number average molecular weight ($\overline{M}_n$), weight average molecular weight ($\overline{M}_w$), and polydispersity ($\overline{M}_w/\overline{M}_n$) of K specimens after polymerization (C), and after the two post-polymerization treatments (MW and WB)

Group	$\overline{M}_w$	$\overline{M}_n$	$\overline{M}_w/\overline{M}_n$
C	4.7×10^5	2.1×10^5	2.2
MW	4.7×10^5	2.1×10^5	2.3
WB	4.8×10^5	2.2×10^5	2.1

Captions for figures

Figure 1. Raman spectra of material K: (liquid) monomer, (C) after polymerization, (MW) after microwave irradiation with 500 W for 5 minutes, and (WB) after immersion in water at 55°C for 10 minutes.

Figure 2. Molecular weight distribution curves for the original powder of all materials (A – the entire MWD curves; B - $\overline{M}_w/\overline{M}_n$ for $\overline{M}_w$ lower than 10^5 ; C - $\overline{M}_w/\overline{M}_n$ for $\overline{M}_w$ higher than 10^6).

Figure 3. Chain Branching Distribution Function from the comparison of the reference curve (L-powder) with the other curves (K, U, and T-powders).

Figure 4. Molecular weight distribution curves for K powder, K control, K after post-polymerization treatments (MW and WB).

Figure 5. Chain Branching Distribution Function from the comparison of the reference curve (K-control) with the other curves (K powder, K after MW, and K after WB).

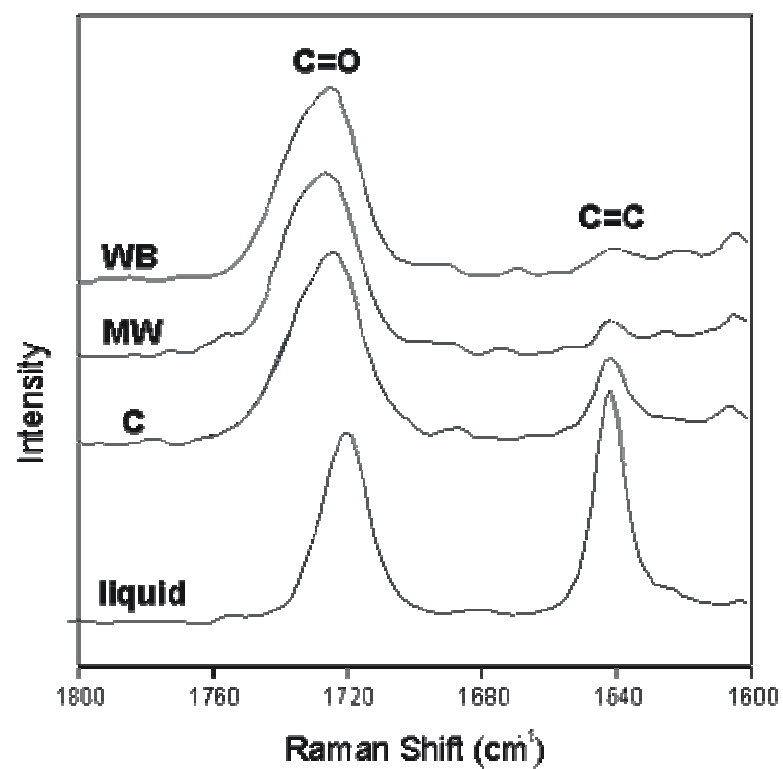


Figure 1

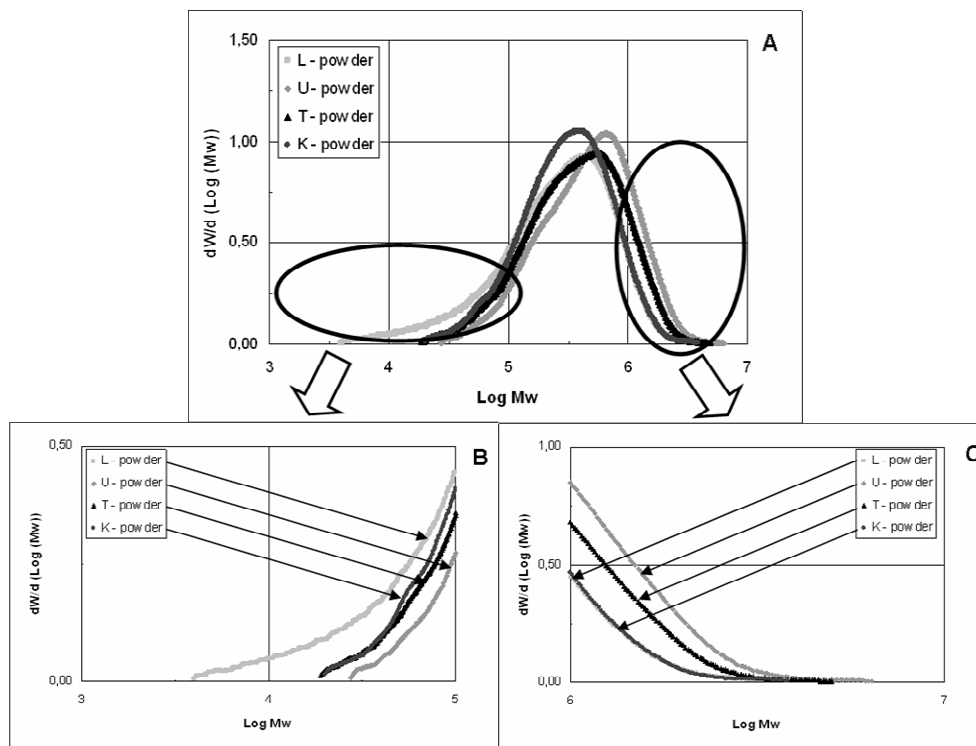


Figure 2

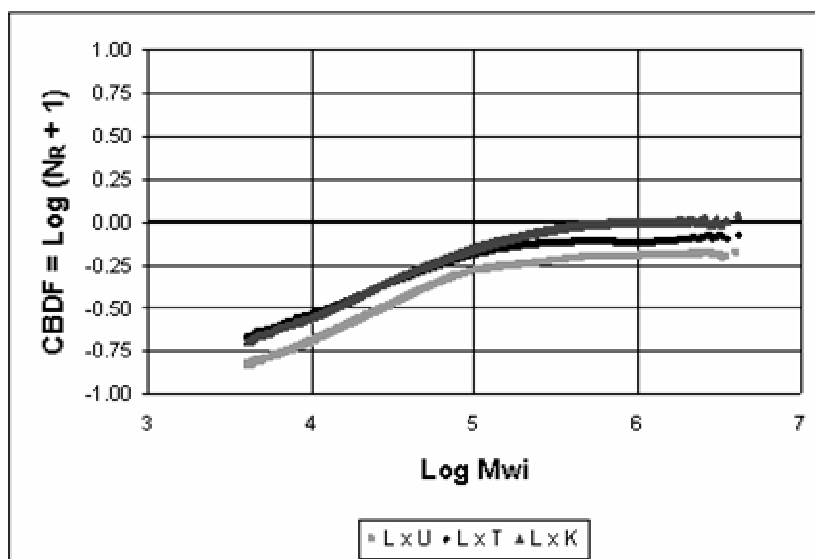


Figure 3

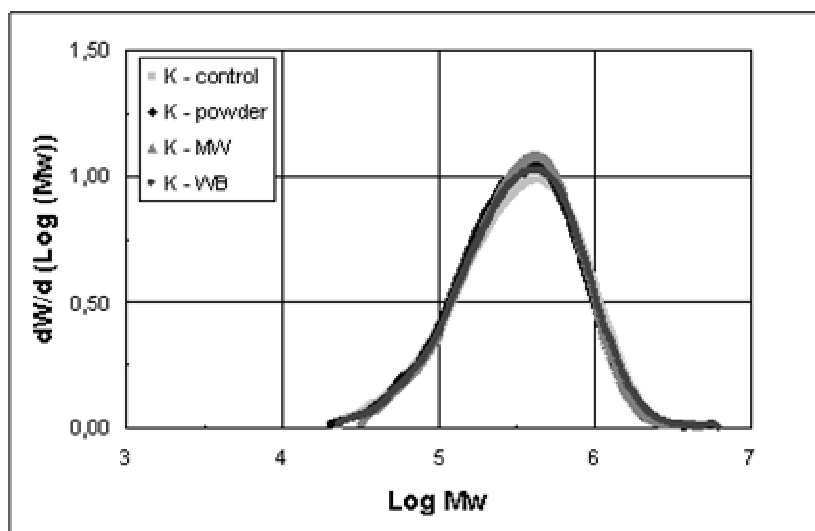


Figure 4

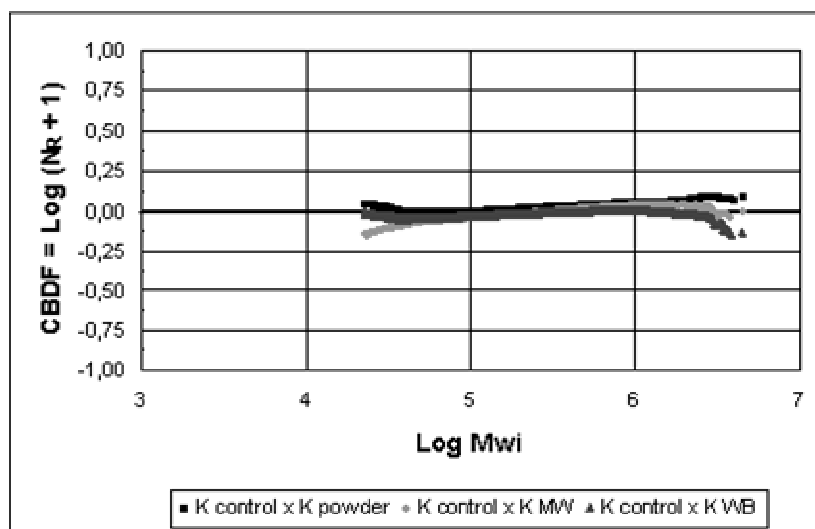


Figure 5

3.2 Capítulo 2

Glass transition temperature of denture base and hard chairside reline resins after post-polymerization treatments[#]

Vanessa M. Urban,^a Ana L. Machado,^{a*} Marinês O. Alves,^a Adeilton P. Maciel,^b Carlos E. Vergani,^a Edson R. Leite^b

^a Department of Dental Materials and Prosthodontics, Sao Paulo State University (UNESP), Araraquara Dental School, Rua Humaitá, 1680, Centro, 14801-903, Araraquara, SP, Brazil.

^b Interdisciplinary Laboratory of Eletrochemistry and Ceramics, Department of Chemistry, Sao Carlos Federal University (UFSCar), Rodovia Washington Luís (SP-310), km 235, 13565-905, São Carlos, SP, Brazil.

Corresponding author:

* Dr. Ana Lucia Machado

Department of Dental Materials and Prosthodontics - Araraquara Dental School – Sao Paulo State University (UNESP). R. Humaitá, n° 1680, Araraquara, SP, Brazil, CEP: 14801-903. Phone: 55-16-3301 6410 - fax: 55-16-3301 6406 - e-mail: almcucci@yahoo.com.br

[#] Submetido à publicação no periódico **Materials Characterization**.

Elsevier Editorial System - Microsoft Internet Explorer

Arquivo Editar Exibir Favoritos Ferramentas Ajuda

Endereço <http://ees.elsevier.com/materialschar/default.asp> Links

 **MATERIALS CHARACTERIZATION**

Contact us  Help ? 

home | main menu | submit paper | guide for authors | register | change details | log out

Username: alimoucci
Role: Author EES Version: 4.0

Submissions Being Processed for Author Ana Lucia Machado, DDS, MSc, PhD

Page: 1 of 1 (1 total submissions) Display 10 results per page.

Action ▲▼	Manuscript Number ▲▼	Title ▲▼	Initial Date Submitted ▲▼	Status Date ▲▼	Current Status ▲▼
View Submission Send E-mail	MTL-3847	Glass transition temperature of denture base and hard chairside reline resins after post-polymerization treatments	Aug 13, 2006	Sep 05, 2006	With Editor

Page: 1 of 1 (1 total submissions) Display 10 results per page.

<< Author Main Menu

Abstract: This study evaluated the effect of post-polymerization treatments on the glass transition temperature of 5 hard chairside reline resins (Duraliner II, Kooliner, New Truliner, Ufi Gel hard and Tokuso Rebase Fast) and one heat-polymerized resin (Lucitone 550). Specimens (10x10x1mm) were made following the manufacturers' instructions and divided into three groups (n=5). Control group specimens were left untreated. Microwave irradiation group specimens were irradiated with pre-determined power/time combinations and water-bath group specimens were immersed in hot water at 55°C for 10 (reline resins) or 60 minutes (heat-polymerized resin) after the polymerization time recommended by the manufacturers. Glass transition (°C) was performed by Differential Scanning Calorimetry. Data were analyzed using ANOVA/Tukey's test ($\alpha=0.05$). Post-polymerization treatments were able to improve the glass transition of Kooliner. Glass transition of Lucitone 550 was influenced by the polymerization cycle, with the short cycle that included a terminal boil period resulting in highest value.

Introduction

Continuing bone resorption leads to a poor fit and a lack of support of the denture base. Some autopolymerizing acrylic resins have been developed specifically as hard chairside reline resins for relining dentures directly in the mouth, thus improving the adaptation of the denture bases to the supporting tissues [1].

During the polymerization reaction, the conversion of monomers into polymers is never complete, leading to the presence of unreacted residual monomers in the polymeric material [2]. Studies have shown that there is more residual monomer in the autopolymerized than in the heat-polymerized materials [3,4]. In addition, the amount of residual monomer in heat-polymerized denture base polymers is directly dependent on polymerization temperature and time [3,5-7]. The residual monomer has a potential impact on both the properties [8,9] and the biocompatibility of the acrylic resins [2,10]. Among the properties that can be affected by the presence of residual monomers in acrylic resin is its glass transition temperature (T_g) [11].

T_g is recognized as one of the most important descriptors for polymer's state. This is the temperature at which the thermoplastic polymer undergoes a transition from glassy to rubber-like behavior. Below the glass transition, the polymer chains do not have enough energy to surmount the barriers that preventing bond rotation. At the T_g , the heat capacity of the samples increases, since molecular chains are able to move rather freely within the polymeric mass [12].

The properties of a polymer are influenced by the increase in the temperature, so that the determination of its intrinsic critical transition is a very important aspect. It has been shown that during this transition, dramatic variation of physical and mechanical properties is observed, such as modulus, elasticity and dimensional stability [13-15]. T_g is significantly affected by the degree of conversion, thus a high conversion may yield an increased T_g [11,16]. Several techniques have been suggested for reducing residual monomer or improving degree of conversion in the final polymer product, among them post-polymerization treatments, such as water bath and microwave irradiation [2,17,18].

The purpose of this study was to evaluate the effect of water-bath and microwave post-polymerization treatments on the T_g of five hard chairside reline resins, and one heat-polymerized denture base resin processed using two polymerization cycles. The first working hypothesis to be tested was that the post-polymerization treatments could lead to an increase in the T_g of the materials evaluated. The second hypothesis was that the T_g of the heat-polymerized denture base acrylic resin would be affected by the polymerization cycle.

Materials and Methods

The identification codes, brand names, batch numbers, manufacturers, powder/liquid ratios, compositions, and polymerization conditions of the materials used in the present study are listed in Table 1.

Specimens (n=15) of the heat-polymerizing resin Lucitone 550 (L), with dimensions of 10 x 10 x 1 mm, were produced by using stainless steel master

dies, which were duplicated in silicone rubber (Optosil, Heraeus Kulzer, Dormagen, Germany) to facilitate the removal of the processed specimens from the flask. These silicone molds were then invested in conventional metal dental flasks in Type IV dental stone (Vel-Mix, Kerr, Romulus, Mich, USA) to make working molds from which the specimens were made. The polymer powder and monomer were mixed following the manufacturer's directions (Table 1) and left covered until the dough stage was reached. The dough formed was packed into the molds, the flasks were closed and left under pressure of 1250 kgf for 30 minutes. The specimens were then polymerized using one of the two processing cycles recommended by the manufacturer (Table 1). After polymerization, the flasks were allowed to cool for 30 minutes in air, followed by 15 minutes in running water before deflasking. The specimens were then stored in distilled water at 37°C for 48 h [19].

For the hard chair-side reline resins, specimens (n=15) were fabricated using a stainless steel mold with a breakaway compartment (10 x 10 x 1 mm). The mold was placed on the center of a glass plate, the materials were mixed following the manufacturers' instructions (Table 1) and inserted into the metal mould. A second glass plate was placed over the material, and pressure was applied during the polymerization time recommended by the manufacturers (Table 1).

Specimens of all materials were then divided into three groups of five specimens each. Control group (C) specimens were left untreated. The microwave irradiation (MW) group specimens were submitted to post-polymerization treatment by placing them in an adjustable microwave oven (Sensor Crisp 38, Brastemp, Manaus, AM, Brazil) and irradiating with the following power/time combinations: 550 W/3 minutes – Lucitone 550 (short cycle - LS and long cycle - LL); 650 W/4 minutes – Duraliner II (D); 550 W/5 minutes – Kooliner (K); 500 W/5 minutes – Tokuso Rebase Fast (T); 550 W/3 minutes – New Truliner (N); and 550 W/4 minutes – Ufi Gel hard (U). These power/time settings were determined in a preliminary study, which evaluated the effect of nine different power/time combinations on the flexural strength of these materials

[20]. The power/time setting, which produced the highest flexural strength value for each material, was used in this study. For WB group, the heat-polymerized specimens (LS and LL) were submitted to a post-polymerization treatment by immersion in water bath at 55°C for 60 minutes. This procedure has been found to significantly reduce the amount of residual monomer leached from denture base resins [17]. Reline resin specimens were immersed in water at 55°C for 10 minutes, following the material D manufacturer's recommendation to reduce the monomer taste. The short immersion period for the reline resins is due to the fact that the patients should be wearing the relined denture bases soon after polymerization. The hard chairside reline resin specimens were submitted to the post-polymerization treatments within 30 minutes after polymerization, whereas the denture base material Lucitone 550 specimens were treated after being immersed in water at 37°C for 48 h [19]. After post-polymerization treatments, the specimens were then bench cooled to room temperature before measuring the glass transition temperature.

The glass transition temperatures of the acrylic resins were measured using differential scanning calorimetry technique (DSC), which is defined as *differential*, because the behavior of the reference material or crucible is compared with that of the sample and its crucible [12,14]. During differential scanning calorimetry measurement, a polymer sample is placed into one crucible and the other crucible serves as reference [21]. In practice, the heat is supplied to the sample contained in the crucible, and similarly, to the reference in its crucible. The heat flow differential between crucibles is recorded by the computer and corresponds to the polymeric specimen [21].

Samples of approximately 5 mg were lidded in an aluminum crucible. Sample and reference crucibles were then transferred to the sample holder in the equipment DSC 204 (Netzsch, Selb, Bayern, Germany), fitted with a cooler system using liquid nitrogen and the analysis was carried out during subsequent heating within the temperature range 0-200°C with a heating rate of 20°C/minute. At least three individual measurements were made to ensure reproducibility. All measurements were conducted under a dried nitrogen

atmosphere at a flow rate of 30 mL/minute and cooled by liquid nitrogen. The heat flux through the crucibles was plotted against the sample temperature, and T_g was taken to be the midpoint of the specific heat capacity [22]. The recorded onset and endpoint temperatures were calculated by the Netzsch Proteus® software (Figures 1 to 4).

Two separate 2-way analysis of variance (ANOVA) were performed: 1) for the denture base acrylic resin, with polymerization cycle and group as factors; 2) for the hard chairside reline resins, with material and group as factors. Post-hoc testing was accomplished with the Tukey test. The level of significance was set at $\alpha=0.05$.

Results

The mean values for T_g (°C) and standard deviations for all materials and groups evaluated are given in Tables 2 and 3. The mean values were found to range from 46.5 to 79.6°C for the reline resins and from 79.1 to 112°C for the denture base acrylic resin.

The results revealed that the post-polymerization treatments did not promote a significant increase in the T_g for materials T, U, D, N, LS, and LL compared with controls. For material K, both post-polymerization treatments significantly improved the T_g ($P < 0.05$), with the effect being more pronounced with microwave irradiation.

When control specimens were compared, no significant difference between T and U specimens was observed. The lowest T_g mean values were recorded for materials K, D and N ($P < 0.05$). There was a significant difference in T_g due to the two polymerization cycles for the heat-polymerized denture base resin investigated ($P < 0.05$). When the short polymerization cycle (LS) with terminal boil was used, significantly higher T_g mean value was obtained ($P < 0.05$) compared to the specimens polymerized using the long cycle (LL).

Discussion

Several methods have been used to determine the T_g of polymeric materials, such as thermogravimetric analysis [23], thermomechanical analysis [14,15,24,25], dynamic mechanical thermal analysis [14,21,26], and differential scanning calorimetry [14,21-23,27]. Huggett et al [14] measured the glass transition temperature of a range of acrylic resins used for prosthetic applications using differential scanning calorimetry, thermomechanical analysis and dynamic mechanical thermal analysis and observed that the measuring techniques yielded very similar results. Differential scanning calorimetry is a convenient and reliable method and has been widely used to determine T_g values of denture base materials [14,21-23,27]. Therefore, in the present study differential scanning calorimetry was chosen to investigate the T_g of the materials evaluated.

It was found that the first hypothesis was only partially accepted because the water-bath and microwave irradiation post-polymerization treatments did not significantly increase the T_g mean values of the materials evaluated, with the exception of the reline resin Kooliner (Tables 2 and 3 and Figures 1 to 3). During post-polymerization treatments, the heating of the samples causes an increased mobility of the residual monomer, which was stationary in the polymer network, increasing their degree of conversion [25]. As a result, the T_g increases and the thermal expansion coefficient decreases [25]. In general, as the cross linking degree increases the effects of a given thermal treatment become less pronounced, due to the decrease of the configurational heat capacity and to the constraints imposed by the cross links to segmental motion [22]. Therefore, the increase in the T_g for Kooliner reline resin after post-polymerization treatments could be attributed to the fact that the liquid of this material does not contain cross-linking agents [28]. Another possible explanation could be the efficiency of the original conversion. It has been shown that the magnitude of the post-polymerization will depend on this efficiency [26], so that a poorly converted material will probably undergo more post-polymerization. The high residual monomer content of material Kooliner previously evaluated under the conditions of the present study supports this hypothesis [7]. Although both post-

polymerization treatments increased the T_g of Kooliner material compared to control, the effect of microwave irradiation was more pronounced than the water-bath post-polymerization. During microwave irradiation, the monomer molecules are positively moved by a high frequency electromagnetic field and their movements cause the internal heat [29]. Therefore, it is likely that a higher level of heat was generated within the resin by microwaving than immersing in water-bath, thus enhancing the residual monomer molecules mobility. However, it should be emphasized that the rise in temperature of the materials evaluated during the post-polymerization treatments was not measured in the present study, and should be further investigated.

The low transitions demonstrated by the New Truliner and Kooliner control group specimens could be attributed to the composition of the liquids, which do not contain crosslinking agents. Cross-linked polymers are hard, inflexible, have a much higher T_g , and more heat resistance [11]. As the crosslink density increases, the apparent activation energy associated to the glass transition increases. Alves et al [22] evaluated polymethyl methacrylate networks with different crosslinking degrees and found that the raise of crosslinker content from 0.5 to 9 wt% increased the calorimetric glass temperature approximately 12°C. Another explanation for the low T_g of material New Truliner is the plasticizer dibutyl-*n*-phthalate contained in the liquid (8.0%) [28]. The addition of plasticizers to polymers provides enough additional free volume to the system, reducing the entanglements and intermolecular forces that result in a lowering of T_g and elastic modulus [11]. Despite the presence of the cross-linking agent ethylene glycol dimethacrylate in the liquid, material Duraliner II displayed low T_g values. One factor that may have affected the T_g of the material Duraliner II is its lowest powder to liquid ratio. It has been shown that the amount of residual monomer in the polymerized resin is dependent on the amount of the monomer in the mixture ratio [30]. With lower powder/liquid ratios the peroxide/amine ratio will be lowered and hence the rate of decomposition of the peroxide increased. Consequently, the net effect will be a decrease in the concentration of longer-lived

radicals and an increase in the residual monomer concentration [31], thus reducing the T_g [11].

The results demonstrated that the T_g values of the reline resins Tokuso Rebase Fast and Ufi Gel hard were higher than the other reline resins and comparable to those of the Lucitone 550 specimens polymerized by the long cycle. There are several factors that might have contributed to these findings, among them powder/liquid ratio (Table 1), chemical composition, cross-linking chain length, and number of polar groups (Figure 5). The two reline resins Ufi Gel hard and Tokuso Rebase Fast contain the cross-linking agent 1,6-hexanediol dimethacrylate. The longer the cross-link chain length, the greater the distance between the two methacrylate groups. According to Ruyter and Svendsen [27], with a long distance between the methacrylate groups a more complete polymerization is expected because of the high reactivity of the second methacrylate group. Consequently, a high degree of conversion can be achieved, resulting in an increase in the glass transition temperature [16]. As can be seen in Figure 5, the cross-linking agent 1,6-hexanediol dimethacrylate has two carbonyl groups. The liquid of Tokuso Rebase Fast contains the monomer β -methacryloyl oxyethyl propionate [28], which also has two carbonyl groups. The presence of polar groups like carbonyl in polymeric macromolecules tends to draw the polymer chains together, increasing the secondary bonds [32]. Because T_g is the temperature in which polymer segments have enough energy to rearrange or rotate themselves, the higher the attractive secondary bonds, the lower the ability of the chain to crossover the energetic barrier, and thus higher is the T_g [33]. These aspects may help explain the higher T_g values recorded in the present study for materials Ufi Gel hard and Tokuso Rebase Fast.

The secondary hypothesis was accepted because the two polymerization cycles evaluated resulted in statistically significant differences in T_g mean values of the material Lucitone 550, with the specimens processed using the short cycle exhibiting the highest value. It has been demonstrated that polymerization cycles with a terminal boil significantly reduced the level of residual monomer in acrylic resin denture base materials [5]. The presence of

residual monomer in a heat-activated acrylic resin polymerized without a terminal boil resulting in increased plasticization of the polymer chains has also been reported as the most likely cause of an apparent transition at a somewhat lower temperature in addition to the characteristic higher transition [14]. In a previous study [7], the short cycle used in the present investigation, which included a terminal 30 minutes at 100°C, resulted in a lower level of residual monomer. This may have accounted for the increased T_g of the LS specimens [18,24].

During clinical use, the temperature of a dental prosthesis may vary considerably because of the intake of hot and cold food and drinks, and the use of warm or hot water in cleaning the prosthesis [15]. In addition, more recently microwave irradiation has been suggested as an infection control method [34] as well as for the treatment of denture-related stomatitis [35]. Increasing the temperature, the material will take closer to its glass transition temperature, which can result in rapid and irreversible deformation [13,24]. For that reason, it is important that the prosthesis never approaches this transition [15] and further studies should be conducted to evaluate the influence of T_g on the dimensional stability of relined denture bases.

Conclusions

Within the parameters of the study design and materials tested, the following conclusions can be drawn:

1. The T_g of Lucitone 550, Tokuso Rebase Fast, Ufi Gel hard, Duraliner II and New Truliner materials remained unaffected after the post-polymerization treatments.
2. Both post-polymerization treatments promoted a significant increase in the T_g of the reline resin Kooliner, with the effect being more pronounced for microwave irradiation. These treatments could be used to improve the longevity of the denture bases relined with this material.
3. Tokuso Rebase Fast and Ufi Gel hard reline resins exhibited comparable T_g values, which were significantly higher than those of New Truliner, Duraliner II

and Kooliner materials, and, therefore, can be expected to perform better under clinical conditions.

4. The polymerization cycle significantly influenced the T_g of Lucitone 550 denture base acrylic resin, with the long cycle that did not include a period at 100°C resulting in lower T_g than the short polymerization cycle with the terminal boil.

Acknowledgements

This study was supported by Sao Paulo State Foundation (FAPESP Grants 02/01405-0 and 02/06919-1). The authors would like to thank the manufacturers for the donation of the materials used in this investigation.

References

- [1] Haywood J, Basker RM, Watson CJ, Wood DJ. A comparison of three hard chairside denture reline materials. Part I. Clinical Evaluation. *Eur J Prosthodont Restor Dent* 2003;11:157-63.
- [2] Araújo PHH, Sayer C, Poço JGR, Giudici R. Techniques for reducing residual monomer content in polymers: a review. *Polym Eng Sci* 2002;42:1442-68.
- [3] Vallittu PK, Ruyter IE, Buykuilmaz, S. Effect of polymerization temperature and time on the residual monomer content of denture base polymers. *Eur J Oral Sci* 1998;106:588-93.
- [4] Lee S, Lai Y, Hsu T. Influence of polymerization conditions on monomer elution and microhardness of autopolymerized polymethyl methacrylate resin. *Eur J Oral Sci* 2002;110:179-83.
- [5] Huggett R, Brooks SC, Bates JF. The effect of different curing cycles on levels of residual monomer in acrylic resin denture base materials. *Quintessence Dent Technol* 1984;8:365-71.
- [6] Jerolimov V, Krhen J, Besic J. The role of residual monomer in PMMA powder and methods of polymerization in the finding of residual monomer in poly(methylmethacrylate) denture base. *Acta Stomatol Croat* 1991;25:17-23.
- [7] Urban VM, Machado AL, Oliveira RV, Vergani CE, Pavarina AC, Cass QB. Residual monomer of reline acrylic resins. Effect of water-bath and microwave post-polymerization treatments. *Dent Mater*; in press.
- [8] Dogan A, Bek B, Çevik NN, Usanmaz A. The effect of preparation conditions of acrylic denture base materials on the level of residual monomer, mechanical properties and water absorption. *J Dent* 1995;23:313-8.
- [9] Azzarri MJ, Cortizo MS, Alessandrini JL. Effect of the curing conditions on the properties of an acrylic denture base resin microwave-polymerised. *J Dent* 2003;31:463-8.
- [10] Barclay SC, Forsyth A, Felix DH, Watson IB. Case report—hypersensitivity to denture materials. *Br Dent J* 1999;187:350-2.
- [11] McCabe JF, Wilson HJ. Polymers in dentistry. *J Oral Rehabil* 1974;1:335-51.
- [12] Haines PJ. Thermal methods of analysis. Principles, applications and

problems. London: Blackie Academic & Professional; 1995.

[13] McCabe JF, Wilson HJ. The use of differential scanning calorimetry for the evaluation of dental materials. Part II. Denture base materials. *J Oral Rehabil* 1980;7:235-43.

[14] Huggett R, Brooks SC, Campbell AM, Satguranathan R, Bell GA. Evaluation of analytical techniques for measurement of denture-base acrylic resin glass transition temperature. *Dent Mater* 1990;6:17-9.

[15] Jagger RG, Okdeh A. Thermoforming poly methylmetacrylate. *J Prosthet Dent* 1995;74:542-5.

[16] Ferracane JL, Greener EH. The effect of resin formulation on the degree of conversion and mechanical properties of dental restorative resins. *J Biomed Mater Res* 1986;20:121-31.

[17] Tsuchiya H, Hoshino Y, Tajima K, Takagi N. Leaching and cytotoxicity of formaldehyde and methyl methacrylate from acrylic resin denture base materials. *J Prosthet Dent* 1994;71:618-24.

[18] Blagojevic V, Murphy VM. Microwave polymerization of denture base materials. A comparative study. *J Oral Rehabil* 1999;26:804-8.

[19] International Organization for Standardization. Specification 1567: denture base polymers. 3rd ed. Switzerland: ISO, 1998.

[20] Vergani CE, Seo RS, Pavarina AC, Reis JMSN. Flexural strength of auto-polymerizing denture relined resins with microwave post-polymerization treatment. *J Prosthet Dent* 2005;93:577-83.

[21] Phoenix RD, Mansueto MA, Ackerman NA, Jones RE. Evaluation of mechanical and thermal properties of commonly used denture base resins. *J Prosthodont* 2004;13:17-27.

[22] Alves NM, Ribelles JLG, Mano JF. Enthalpy relaxation studies in polymethyl methacrylate networks with different crosslinking degrees. *Polymer* 2005;46:491-504.

[23] Miyazaki K, Horibe T. Polymerization of multifunctional methacrylates and acrylates. *J Biomed Mater Res* 1998;22:1011-22.

[24] Jerolimov V, Jagger RG, Milward PJ. Effect of the curing cycle on acrylic

denture base glass transition temperatures. *J Dent* 1991;19:245-8.

[25] Sideridou I, Achilias DS, Kyrikou E. Thermal expansion characteristics of light-cured dental resins and resin composites. *Biomater* 2004;25:3087-97.

[26] Jacobsen PH, Darr AH. Static and dynamic moduli of composite restorative materials. *J Oral Rehabil* 1997;24:265-73.

[27] Ruyter IE, Svendsen SA. Flexural properties of denture base polymers. *J Prosthet Dent* 1980;43:95-104.

[28] Arima T, Murata H, Hamada T. Analysis of composition and structure of hard autopolymerizing reline resins. *J Oral Rehabil* 1996;23:346-52.

[29] De Clerck JP. Microwave polymerization of acrylic resins used in dental prostheses. *J Prosthetic Dent* 1987;57:650-9.

[30] Kedjarune U, Charoenworarluk N, Koontongkaew, S. Release of methyl methacrylate from heat-cured and autopolymerized resins: cytotoxicity testing related to residual monomer. *Aust Dent J* 1999;44:25-30.

[31] Lamb DJ, Ellis B, Priestley D. The effects of process variables on levels of residual monomer in autopolymerizing dental acrylic resin. *J Dent* 1983;11:80-8.

[32] Billmeyer FW. Textbook of polymer science. New York: John Wiley & sons; 1984.

[33] Soldera A, Metatla N. Glass transition phenomena observed in stereoregular PMMAs using molecular modeling. *Compos Part A-Appl S* 2005;36:521-30.

[34] Neppelenbroek KH, Pavarina AC, Spolidorio DM, Vergani CE, Mima EG, Machado AL. Effectiveness of microwave sterilization on three hard chairside reline resins. *Int J Prosthodont* 2003;16:616-20.

[35] Banting DW, Hill SA. Microwave disinfection of dentures for the treatment of oral candidiasis. *Spec Care Dentist* 2001;21:4-8.

Figure captions

Fig. 1. DSC graph of material K – control group (C)

Fig. 2. DSC graph of material K – microwave irradiation (MW)

Fig. 3. DSC graph of material K – water bath (WB)

Fig. 4. DSC graph of LL specimen – control group (C)

Fig. 5. Chemical formulae of the reline resin liquid constituent (1,6-HDMA - 1,6-hexanediol dimethacrylate; IBMA, isobutyl methacrylate; MAOP, β -methacryloyl oxyethyl propionate; EGDMA, ethylene glycol dimethacrylate; BMA, butyl methacrylate)

Table 1. Materials evaluated in this study

<i>Code</i>	<i>Brand name</i>	<i>Batch number</i>	<i>Manufacturer</i>	<i>Powder (P)/ Liquid (L) ratio (g/mL)</i>	<i>Composition</i>		<i>Polymerization condition</i>
					<i>Powder</i>	<i>Liquid</i>	
D	Duraliner II	031501 (P)	Reliance Dental	1.0/1.0	PEMA	BMA and	12 minutes
		012201 (L)	Mfg. Co., Worth, Ill., USA			EGDMA	at room temperature
K	Kooliner	080700A (P)	Coe Laboratories,	1.4/1.0	PEMA	IBMA	10 minutes
		062900A (L)	Inc., York, Chicago, Ill., USA				at room temperature
N	New	0207-332 (P)	Bosworth	1.34/1.0	PEMA	IBMA and DBP	10-15 minutes
	Truliner	0304-194-X (L)	Company, Skokie, Ill., USA				at room temperature
T	Tokuso	437 (P)	Tokuyama Dental	2.056/1.0	PEMA	MAOP and 1,6-HDMA	8 minutes
	Rebase Fast	094 (L)	Corp., Tokyo, Japan				at room temperature
U	Ufi Gel hard	330936 (P)	Voco GmbH,	1.77/1.0	PEMA	1,6-HDMA	7 minutes
		321892 (L)	Cuxhaven, Germany				at room temperature
LS	Lucitone 550 (short cycle)	65173 (P)	Dentsply	2.1/1.0	PMMA	MMA and EGDMA	90 minutes at
		64979 (L)	International Inc., York, Pa., USA				73°C and then boiling water for 30 minutes
LL	Lucitone 550 (long cycle)	65173 (P)	Dentsply	2.1/1.0	PMMA	MMA and EGDMA	9 h at 73°C
		64979 (L)	International Inc., York, Pa., USA				

PEMA, poly (ethyl methacrylate); PMMA, poly (methyl methacrylate); BMA, butyl methacrylate; EGDMA, ethylene glycol dimethacrylate; IBMA, isobutyl methacrylate; DBP, dibutyl-*n*-phthalate; MAOP, β -methacryloyl oxyethyl propionate; 1,6-HDMA, 1,6-hexanediol dimethacrylate; MMA, methyl methacrylate.

Table 2. T_g (°C) of the reline resins expressed as mean values with standard deviations and results of statistical analysis

Materials	Groups		
	C	MW	WB
T	79.6 (2.13) ^{Aa}	77.3 (1.93) ^{Aa}	77.4 (4.05) ^{Aa}
U	73.6 (1.08) ^{Aa}	73.4 (0.720) ^{Aa}	76.8 (4.92) ^{Aa}
K	49.8 (2.19) ^{Ba}	74.1 (1.47) ^{Ab}	59.8 (5.50) ^{Bc}
D	48.6 (4.24) ^{Ba}	46.8 (0.980) ^{Ba}	52.2 (4.99) ^{Ca}
N	47.9 (0.800) ^{Ba}	46.5 (0.340) ^{Ba}	47.2 (0.510) ^{Ca}

Horizontally, means with identical superscript small letters were not significantly different ($P > 0.05$).

Vertically, means with identical superscript capital letters were not significantly different ($P > 0.05$).

C= control; MW= microwave post-polymerization treatment; WB= water-bath post-polymerization treatment.

Table 3. T_g (°C) of Lucitone 550 denture base resin expressed as mean values with standard deviations and results of statistical analysis

Polymerization cycles	Groups		
	C	MW	WB
Short	103 (2.21) ^{Aa}	107 (8.60) ^{Aa}	112 (5.45) ^{Aa}
Long	86.3 (13.7) ^{Ba}	79.1 (10.8) ^{Ba}	79.2 (9.52) ^{Ba}

Horizontally, means with identical superscript small letters were not significantly different ($P > 0.05$).

Vertically, means with identical superscript capital letters were not significantly different ($P > 0.05$).

C= control; MW= microwave post-polymerization treatment; WB= water-bath post-polymerization treatment.

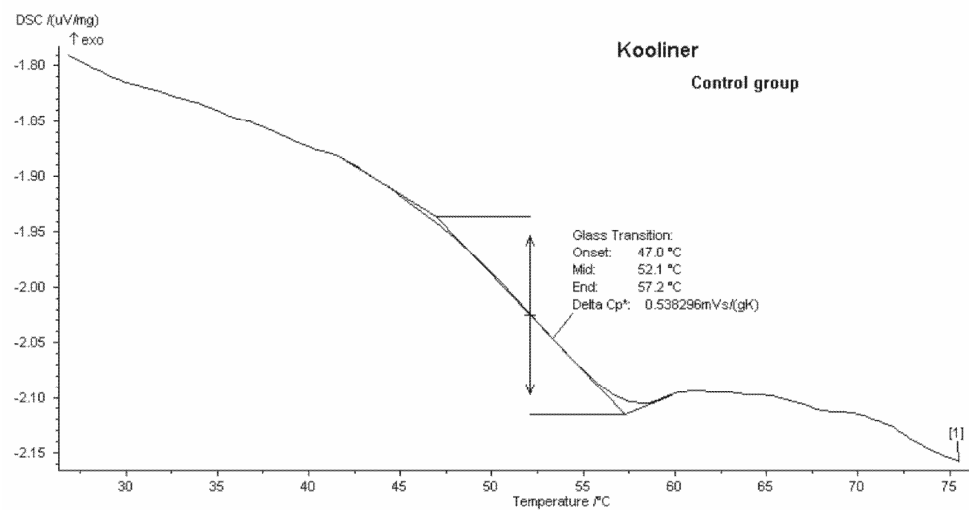


FIGURE 1

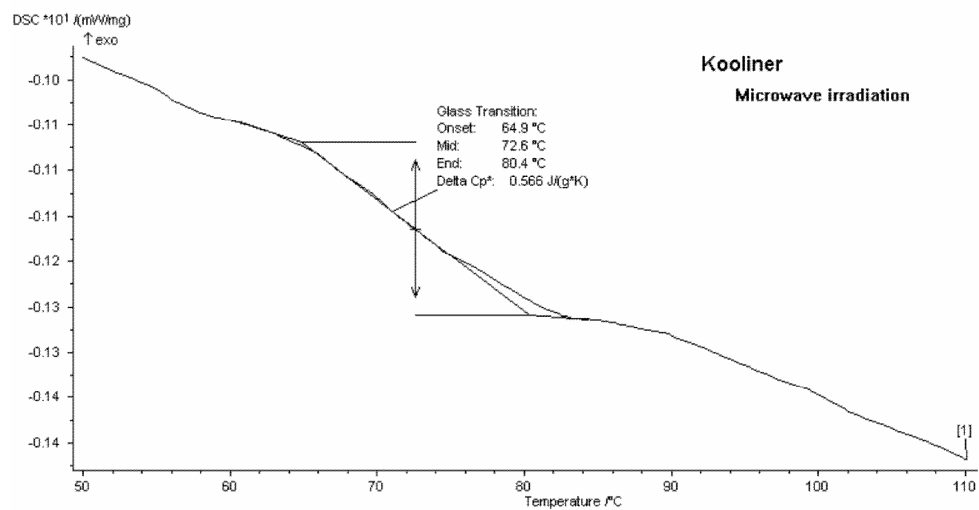


FIGURE 2

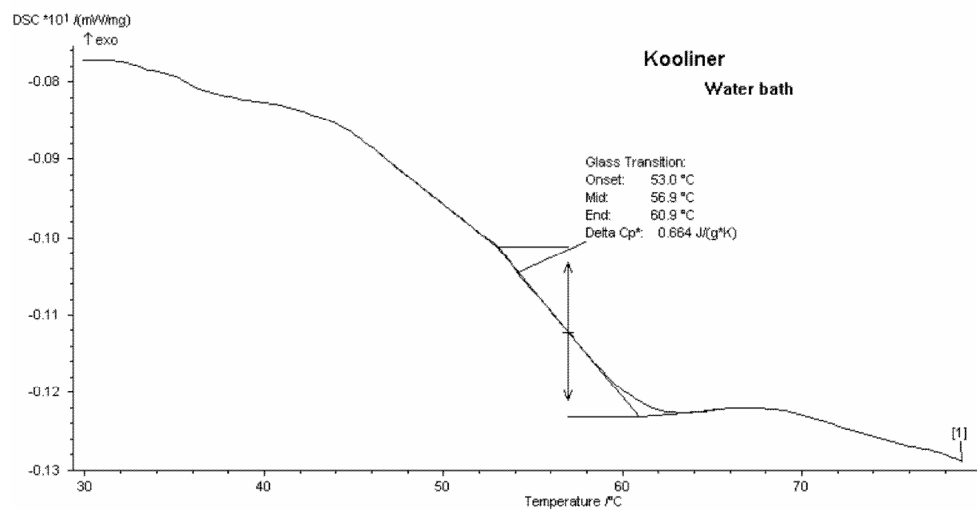


FIGURE 3

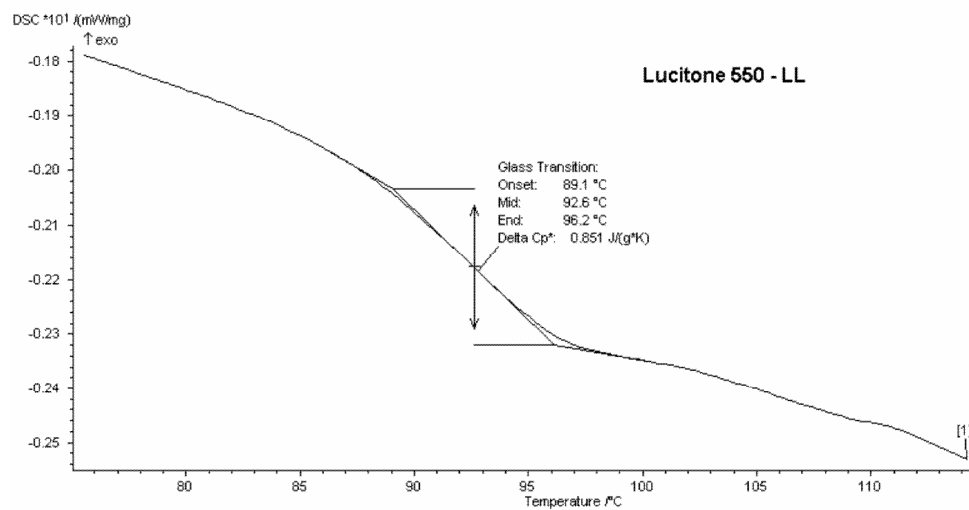


FIGURE 4

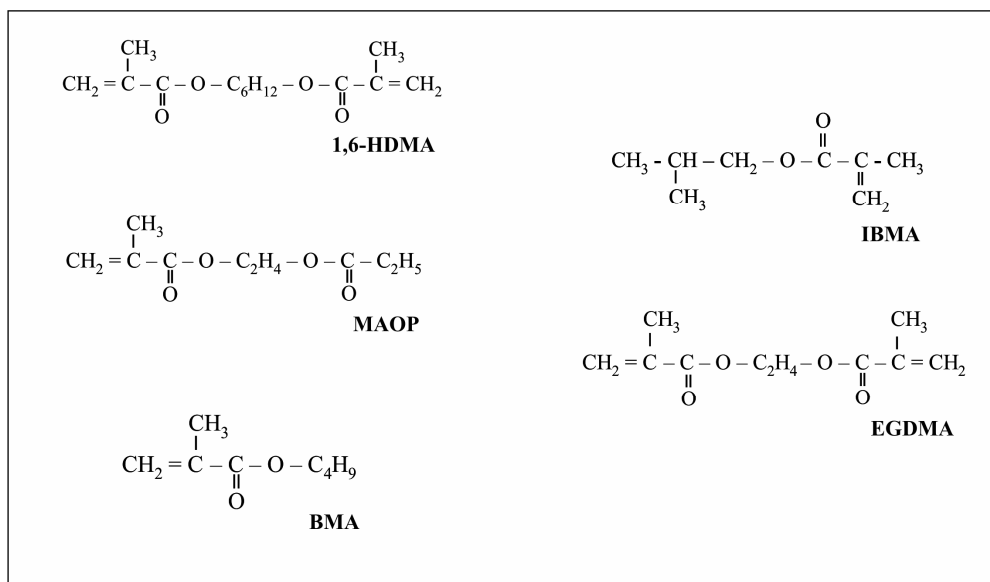


FIGURE 5

3.3 Capítulo 3

Leaching of residual monomers and plasticizer from hard chair-side reline resins in artificial saliva: effect of water bath post-polymerization treatment*

Vanessa M. Urban 1, Ana L. Machado 1, Carlos E. Vergani 1, Eunice T. Giampaolo 1, Ana C. Pavarina 1, Quezia B. Cass 2.

1 Department of Dental Materials and Prosthodontics, São Paulo State University, Araraquara, São Paulo, Brazil.

2 Department of Chemistry, São Carlos Federal University, São Carlos, São Paulo, Brazil.

Leachability in hard chair-side reline resins

Corresponding author:

Dr. Ana Lúcia Machado

Department of Dental Materials and Prosthodontics - Araraquara Dental School
R. Humaitá, n° 1680, Araraquara, SP, Brazil, CEP: 14801-903

phone: 55-16-3301 6410 - fax: 55-16-3301 6406 - e-mail: [**cucci@foar.unesp.br**](mailto:cucci@foar.unesp.br)

* Formatado para publicação no periódico **Dental Materials**.

Abstract

Objetives: The effect of a water-bath post-polymerization treatment (WB) on the leaching of residual compounds from hard chair-side reline resins (Kooliner-K, New Truliner-N, Ufi Gel hard-U and Tokuso Rebase Fast-T) was evaluated. *Methods:* Specimens of each material (n=12) were made and immersed in water at 55°C for 10 min or as a control left untreated. Specimens were then placed in artificial saliva at 37±1°C, and after 1, 3, 5, 24-h, 3, 7, 14 and 30-day intervals, aliquots were removed and analyzed by a HPLC method. The compounds analyzed were isobutyl methacrylate-IBMA (K and N), dibutyl-n-phthalate-DBNP (N) and 1,6-hexanediol dimethacrylate-1,6-HDMA (U and T). *Results:* The results (µg/mL), submitted to Wilcoxon or Mann-Whitney tests ($\alpha=0.05$), revealed that the largest amounts of IBMA were leached out from the control specimens of K (88.6 µg/mL) and N (61.4 µg/mL) within the first hour. No change in the quantities of 1,6-HDMA released from materials U (5.22 µg/mL) and T (1.45 µg/mL) control specimens was observed with immersion time up to 24 hours ($p>0.050$). The amount of monomers released from all materials decreased with increasing immersion time ($p<0.05$). For N control specimens, DBNP release increased ($p=0.028$) from 1 hour (0.450 µg/mL) to 3 hours of immersion (0.550 µg/mL), and decreased ($p=0.028$) with increasing immersion time up to 24 hours (0.320 µg/mL). WB produced a significant decrease in the amount of residual compounds eluted from the reline resins within the first hour of immersion. With the exception of material U, WB decreased the duration of release of the residual compounds evaluated. *Significance:* Immersion of dentures relined with the materials evaluated, especially reline resins K and N, in water at 55°C for 10 min can be used to reduce the amounts and duration of release of residual compounds.

Keywords

Hard chair-side reline resins, residual monomer, plasticizer, leaching, HPLC, post-polymerization treatment, artificial saliva.

Introduction

Continuing bone resorption leads to a poor fit and a lack of support of the denture base. Therefore removable prostheses may require periodic relining to reestablish tissue support for the denture base. Some autopolymerizing acrylic resins have been developed specifically as hard chair-side reline resins for relining dentures directly in the mouth, thus improving the retention and stability of removable prostheses [1], and providing a more uniform load distribution to the residual ridge. Moreover, in immediate denture treatment, these materials can be used as a temporary measure to compensate for discrepancy in the fit of the denture to the healing supporting tissues [2].

Free radical polymerization reaction does not result in complete conversion of all carbon-carbon double bonds and, therefore, acrylic resins are known to contain and release unpolymerized monomers [3,4]. These acrylic monomers are reported to be cytotoxic in vitro [5,6]. Reactions of the oral mucosa to acrylic materials, such as “burning mouth sensation” [7], redness, swelling and pain in the oral mucosa [8], ulceration [9] and labial edema [10] have been described. Moreover, a clinical case of allergic reaction complaining chronic urticaria was reported as the first case of isolated systemic involvement developed by acrylic materials [11].

Phthalates and other esters of aromatic carboxylic acids have been used as plasticizers in soft [12] and hard denture lining materials [13] to increase flexibility, extensibility, and to enhance working properties. However, these plasticizers are potentially toxic compounds [3], and may possess undesirable biological effects, particularly as xenoestrogens [12], inducing hormonal tumors, genital disorders and a low-dose toxic action during certain periods of fetal development [14] owing to a capacity to bind oestrogen receptors [15]. Although the leaching of residual monomers and plasticizers from denture base acrylic resins [3,4] and soft-lining or tissue-conditioning materials has been evaluated [12], no study could be identified by the authors concerning the release of residual monomers and plasticizers from hard chair-side reline resins.

Post-polymerization treatments such as water-bath [4,16,17] and microwave irradiation [17] have been proposed for reducing residual monomer content of polymerized acrylic resins. This reduction may, in theory, contribute to decrease the leachability of residual compounds from the polymerized materials and, consequently, minimize their harmful effects on tissues.

The aim of this work was to use a validated high performance liquid chromatographic (HPLC) method to quantify the leaching of residual monomers and plasticizer from hard chairside reline resins in artificial saliva. The effect of a post-polymerization treatment on the leaching process was also evaluated. The hypotheses tested were that the time and also the amount of residual compounds released from the hard chair-side reline resins would be different, and that these parameters would be reduced by a post-polymerization treatment.

Material and Methods

The materials used in this work, batch number, together with the manufacturers, composition, mixing proportions of monomer to polymer and polymerization conditions are listed in Table 1. These materials are examples of cross-linked and non-cross-linked autopolymerizing hard chairside reline resins and were selected because of their differences in composition.

Disk-shaped specimens from each hard chair-side reline resin ($n = 12$), with dimensions of 50 mm in diameter and 2 mm in thickness, were made by using a stainless steel mold. The materials were mixed and polymerized in accordance with the manufacturer's recommendations (Table 1). The mix was packed into the metal mold and a polyester sheet and a glass plate were positioned on top of the mold. The set was maintained under compression in a hydraulic bench press at room temperature ($23 \pm 2^\circ\text{C}$) during the polymerization time recommended by the manufacturers (Table 1). All samples were carefully grounded with 360-grit silicon carbide paper to remove lateral irregularities and excess material. Specimens of all materials were then divided into two groups, of six specimens each. Group C specimens were left untreated (control). Specimens of group WB were submitted to post-polymerization treatment by immersing in water-bath at 55°C for 10 min. In a previous study, this treatment was found to significantly reduce the residual monomer content of reline resins [17].

Each specimen was placed in separate closed plastic flasks containing 20 mL of artificial saliva [18] and stored in dark conditions at $37 \pm 1^\circ\text{C}$. Aliquots of 200 μL were taken from each immersion solution at the periods of 1, 3, 5 and 24 h and also at 3, 7, 14 and 30 days. For the periods up to 24 h, the liquid in the container was replaced with a fresh 20 mL portion of artificial saliva after each aliquot was taken. After 24-h interval, the artificial saliva was replaced daily for a period of 30 days. For the replacements, each specimen was washed in deionized water, dried with absorbent paper and, then, immersed into the fresh artificial saliva. The aliquots were analyzed by HPLC immediately after sampling.

The following residual compounds, released from the reline resins, were quantified: isobutyl methacrylate – IBMA (K and N), 1,6-hexanediol

dimethacrylate - 1,6-HDMA (U and T), and plasticizer dibutyl-*n*-phthalate – DBNP (N). The fact that MAOP could not be detected by HPLC [13], only 1,6-HDMA monomer was quantified for material T. After optimizing the analytical conditions, calibration curves were carried out using calibration solutions in artificial saliva in the following concentrations of each standard compound (IBMA = 0.700 to 100 µg/mL, 1,6-HDMA = 1.00 to 8.00 µg/mL, DBNP = 0.300 to 2.40 µg/mL). The method was fully validated, and the concentrations of leached compounds in each specimen were determined.

HPLC analyses were made on a system (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan) equipped with a system controller (CBM-10A), a liquid chromatograph pump (LC-10AD), a UV-Vis detector (SPD-10A) and an auto-injector (SIL-10AF). Chromatographic conditions consisted of a LC-18 column (5 µm particle size, 100 Å pore size, 0.46 cm I.D. x 15 cm length) using methanol/tetrahydrofuran/water 73.85:3.15:23 (v/v), at a flow rate of 0.8 mL/min, and detection at 230 nm. A sample (20 µL) of immersion solution was injected into the HPLC system. Data acquisition was done on a Class LC10 software (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan).

The quantities of released IBMA, 1,6-HDMA and DBNP were calculated on the basis of calibration graphs by taking the area under the chromatographic bands and expressed in µg/mL. Differences within each material with increasing immersion time were tested for significance using Wilcoxon's signed rank sum test. Mann-Whitney two-sample test was used to investigate the differences between materials within the same experimental conditions at each time interval. To test the hypothesis that the post-polymerization treatment could affect the leaching of residual compounds from the evaluated materials, Mann-Whitney test was also applied. All tests were performed at a confidence level of 95%.

Results

Representative HPLC chromatograms of standards and hard chair-side relined resins are given in Figure 1. Figure 2 shows the relationship between immersion time and the median values of residual monomers and plasticizer released from the materials in the experimental conditions investigated.

For materials K and N, the largest amounts of IBMA were leached out from the control specimens within 1 hour, with median concentrations of 88.6 $\mu\text{g/mL}$ and 61.4 $\mu\text{g/mL}$, respectively. The leaching concentrations significantly decreased with increase in the immersion time ($p < 0.050$). For both materials, after 3 hours of immersion in artificial saliva, the IBMA concentrations were reduced to approximately a half of the median values obtained at 1 hour of immersion. For material K, concentration of 0.910 $\mu\text{g/mL}$ was quantified even after 14 days of immersion in artificial saliva, whereas for material N, quantifiable concentrations were obtained only up to 7 days (1.07 $\mu\text{g/mL}$). The water-bath post-polymerization treatment produced a significant decrease in the amount of IBMA leached from materials K (6.17 $\mu\text{g/mL}$) and N (1.05 $\mu\text{g/mL}$) within the first hour of immersion in artificial saliva as compared to controls ($p = 0.004$). This reduction was also observed for the other periods of immersion. For materials N and K treated specimens, IBMA could not be detected in artificial saliva after 3 days and 24 hours of immersion, respectively, indicating that the water-bath post-polymerization treatment also significantly reduced the time during which the monomer was released from the relined resins.

The amount of 1,6-HDMA that leached from materials U (5.22 $\mu\text{g/mL}$) and T (1.45 $\mu\text{g/mL}$) control specimens did not change significantly ($p > 0.050$) with immersion time up to 24 hours. For material U, the median concentration decreased to 3.01 $\mu\text{g/mL}$ on the third day and to 1.13 $\mu\text{g/mL}$ on the seventh day of immersion ($p = 0.028$). The concentrations released from the relined resin T were small and close to the quantification limit of the analytical method, and after a significant decrease on the third day ($p = 0.028$) it was possible only to detect but not to quantify the 1,6-HDMA monomer ($< 1.00 \mu\text{g/mL}$). Figure 2 also demonstrates that the concentration of 1,6-HDMA monomer released from the

specimens submitted to the water-bath post-polymerization treatment during the first hour of immersion in artificial saliva (U - 3.76 $\mu\text{g/mL}$; T - 1.06 $\mu\text{g/mL}$) were significantly lower than that of the control specimens ($p=0.025$). For the other immersion periods, no significant differences were found between control and treated specimens. Water-bath post-polymerization treatment did not alter the time of release of 1,6-HDMA for material U (7 days). For material T, quantifiable amounts of 1,6-HDMA was detected leaching out from control specimens up to 3 days, whereas no monomer was released from treated specimens after 24 hours.

Lower amounts of IBMA ($p<0.050$) were released from material N than from material K after 1 h and 14 days of immersion in artificial saliva (control specimens) and after 1, 3, and 24 hours of immersion (treated specimens). For the other periods, there were no significant differences between the amounts leached from materials K and N ($p>0.050$). Material T released the lowest level of 1,6-HDMA ($p<0.050$) from both control and treated specimens for immersion periods up to 7 days.

The levels of DBNP that leached from N control specimens significantly increased ($p=0.028$) from 1 hour (0.450 $\mu\text{g/mL}$) to 3 hours of immersion in artificial saliva (0.550 $\mu\text{g/mL}$), and then significantly decreased ($p=0.028$) with increasing immersion time up to 24 hours (0.320 $\mu\text{g/mL}$). After water-bath post-polymerization treatment, the quantities of DBNP released in artificial saliva during 1 hour and 3 hours decreased to values close to the detection limit of the method ($p=0.004$). In addition, DBNP could not be detected after 24 hours of immersion.

Discussion

The results obtained demonstrate that the time and the concentrations of the compounds released from the hard chair-side reline resins were different and that they were reduced by the water-bath post-polymerization treatment. Hence, both hypotheses tested were accepted.

A time-associated effect on the leaching out mechanism was found in the present work, as the residual monomers released from all materials decreased significantly with time. These findings are in agreement with those previously reported [3,19]. For Kooliner and New Truliner control specimens, the loss of IBMA was rapid during the initial periods of immersion in artificial saliva, and most of the residual monomer was released within 5 hours. No significant changes were observed in the concentrations of the residual compounds leached in the immersion periods up to 24 hours for materials Ufi Gel hard and Tokuso Rebase Fast. The amount of 1,6-HDMA released from these reline resins were reduced significantly after this time interval, and the elution appears to be completed within few days [20]. These findings may be explained not only by the diffusion of the monomers out of the resins [16] into the artificial saliva, but also by their chemical degradation [21]. The remaining monomeric methyl methacrylate in the polymerized material may be degraded in aqueous solutions through oxidation by dissolved oxygen [22], and also by hydrolytic reactions [21] resulting in degradation by-products, such as formaldehyde and methacrylic acid [20,22]. Some of these degradation products have been found to be cytotoxic at much lower concentrations than residual monomer [4]. The possibility of biological effects elicited by the products of degradation reactions may pose significant concern and, therefore, it is important to identify them and their ability to be leached from the reline acrylic resins [21].

The results from the present work also demonstrated that Kooliner and New Truliner materials released relatively high quantities of IBMA compared with the small amounts of 1,6-HDMA released from Ufi Gel hard and Tokuso Rebase Fast resins. These findings could be related to the extent of the polymerization reaction. The IBMA, the monomer used in the Kooliner and New

Truliner resins is a monofunctional monomer, whereas the 1,6-HDMA the monomer of the resins Ufi Gel hard and Tokuso Rebase Fast is a dimethacrylate. The presence of a bifunctional monomer might improve the polymerization process, by providing more reactive groups for free radical polymerization. In addition, the cross linking agent 1,6-HDMA shows a large distance between the two methacrylate groups (Figure 2b), which could increase the reactivity of the second methacrylate group [23]. Hence, it is likely that the degree of conversion of materials Ufi Gel hard and Tokuso Rebase Fast was higher than that of Kooliner and New Truliner resins, and, therefore, fewer residual monomer was available to be leached out [19]. The results of a previous work [17] support this hypothesis, because the two reline resins Ufi Gel hard and Tokuso Rebase Fast demonstrated significantly lower residual monomer content than the other materials evaluated, including Kooliner.

The differences between the concentrations of monomers released from the materials into artificial saliva could also be attributed to the structure of the polymer networks. Elution occurs via diffusion of molecules through the resin matrix [3]. Materials Kooliner and New Truliner do not contain cross-linking agents, whereas the reline resins Ufi Gel hard and Tokuso Rebase Fast contain high percentage of the cross-linking agent 1,6-HDMA. Therefore, it could be that the resulting network of Kooliner and New Truliner may be of such configuration that the diffusion of residual monomer molecules through these materials is facilitated. Conversely, for the resins Ufi Gel hard and Tokuso Rebase Fast, the unreacted monomers were probably trapped into the highly cross-linked polymer structures and their release into artificial saliva was restricted [19]. Arima et al. [24] has shown a strong correlation between increasing the concentration of cross-linking agents and the reduced solubility of polyethyl methacrylate polymers. The solubility of polymers is related to the outward release of leachable constituents such as residual monomers, plasticizers, and initiators [24]. Another factor that may have accounted for the results of the present work is the relatively small size and low molecular weight [19,25] of IBMA monomer compared to 1,6-HDMA (Figure 2a and 2b). It has been reported that small monomers have enhanced

mobility within the polymer matrix and will be eluted in higher quantities than the large monomers [19]. Concurrently, lower-molecular-weight monomers are more susceptible to leach from the polymer matrix than compounds with high molecular weight [25].

Despite their similar compositions and powder-to-liquid ratios (Table 1), material Kooliner released more IBMA than New Truliner reline resin. One possible explanation could be that Kooliner has a more porous structure than New Truliner, thus facilitating IBMA release [26]. However, other studies are necessary to confirm this assumption.

The amount of 1,6-HDMA released from Ufi Gel hard was higher than the amount released from Tokuso Rebase Fast material. This difference may also be attributed to the porosity in the structure of Ufi Gel hard. This material undergoes rapid polymerization reaction and solidifies very quickly. During specimen preparation, difficulty of mixing the powder and liquid may have contributed to the incorporation of voids, thus facilitating the release of 1,6-HDMA from Ufi Gel hard. In addition, two other factors may explain these results. First, as previously described, the residual monomer content was higher in Ufi Gel hard than in Tokuso Rebase Fast material [17]. Second, because the chemical that could be leached out are in the liquid component of the materials, the higher liquid-to-powder ratio recommended for material Ufi Gel hard might have influenced the results.

The mechanism of the action of monomers is membrane-mediated and relatively non-specific [27]. The hemolytic activity and cytotoxicity of a compound has been related to its lipophilicity [28]. According to Fujisawa et al. [28], a compound showing large alkyl chain may have higher lipophilicity (a higher retention time in reversed-phase elution mode by HPLC) and also demonstrated higher cytotoxicity. In a previous study, a significant inhibitory response of the cell proliferation produced by compounds leached from Ufi Gel hard was observed [6]. Another study demonstrated that all reline resin liquids evaluated had cytotoxic effects on primary gingival fibroblasts and periodontal ligament cells in dose-dependent manners, and Tokuso Rebase liquid appeared to

be the most cytotoxic [5]. Approximately 50% of the cellular viability was affected when 0.2% of Kooliner liquid or 0.05% of Tokuso Rebase liquid was used [5]. Therefore, even though the quantity of 1,6-HDMA released from Ufi Gel hard and Tokuso Rebase Fast was lower than that of IBMA released from Kooliner and New Truliner, the potential biological effects of the former could be more pronounced than the latter. However, cytotoxicity assays are necessary to determine if the residual monomers in the concentrations found in this work induce cytotoxic responses.

The results also showed that, in contrast to the relatively large amounts of the IBMA monomer, the plasticizer DBNP was released from New Truliner in smaller amounts. Although not directly comparable, due to differences in methodology, these results are in general agreement with qualitative and quantitative determination of non-phthalic and phthalic residual compounds released from heat-cured acrylic resins [3]. It has been found that denture soft lining materials, tissue conditioners and temporary restorative resins release considerable high levels of plasticizers upon immersion in water or saliva [12,25,29,30]. This is to be expected, because the plasticizer content is particularly high in these prosthodontic materials [12,25,29,30]. Conversely, the amount of added plasticizer in the New Truliner reline resin is only 8% [13]. Hence, the low-level leaching of DBNP from New Truliner was most likely associated with its low content of plasticizer in the liquid composition. The polymer structure may explain the differences observed. The flexible soft polymer-gel materials are generally based upon poly (ethyl methacrylate) or an ethyl methacrylate co-polymer that is softened in the presence of a mixture of alcohol and ester plasticizer, producing polymer-chain entanglement and gel formation [29]. For New Truliner reline resin, during the mixing of the prepolymerized powder particles with the liquid, the monomers penetrate into the powder particles, and the particles are partly dissolved [31]. After the chemically induced polymerization, a multiphase polymer is formed, and the resulting polymerizable resin matrix may have decreased the diffusion of plasticizer molecules from this material.

The mechanisms by which phthalate esters affect human health are poorly understood and it is not clear if they are endocrine disruptor chemicals (EDC) [30]. Dialkyl phthalates have been reported as potential xenoestrogens, which may compete with the natural estrogen by binding to the estrogen receptor [15]. As a result, hormonal tumors, genital disorders and a low-dose toxic action during certain periods of fetal development have been reported [14]. Wine et al. [32] described the lowest observed adverse effect level (LOAEL) for DBNP at 52 mg/kg. A minimal margin of safety (MOS) of 1/80 of the above LOAEL (i.e. 0.65 mg/kg) was proposed by Hansen et al. [33]. If this MOS is well endorsed, then clinicians should avoid using phthalate ester-containing materials, especially when treating women during their childbearing years [12]. The amount of DBNP released from New Truliner is well below the reported LOAEL (0.450 µg/mL).

The water-bath post-polymerization treatment produced a significant reduction not only in the time needed for the complete discharge of residual compounds from the relined resins in artificial saliva but also in the amount released. It has been demonstrated that the release of residual compounds is a temperature-dependent process, since the diffusion is enhanced by the increase in temperature [26]. Therefore, the heat from the water-bath post polymerization treatment might have contributed to the diffusion into water of residual compounds from the relined resin [4,16]. Alternatively, the reductions observed were the result of further polymerization of residual monomers [16]. At higher temperatures, the propagation constants and diffusion coefficients increase, thus favoring a faster conversion of the remaining monomers [34]. Degradation of methacrylates over time, by oxidation reactions or by attack of functional groups by hydrolysis [21,22], might also explain the reduction of residual monomers.

It is important to emphasize that the *in vivo* conditions may differ significantly from those of this *in vitro* study. Despite this limitation, the results indicated that the water-bath treatment was effective in reducing the level of released compounds from the relined resins evaluated, particularly from the Kooliner and New Truliner materials. Given that it is desirable that the leaching of residual components from acrylic materials to the mouth should be minimized or

not occur at all, the immersion of the relined dentures in hot water at 55°C for 10 minutes to decrease leaching concentrations of residual compounds is suggested.

Conclusion

Within the limitations of this in vitro study, it can be concluded that water-bath post-polymerization treatment proved to be an effective method for reducing residual monomer and plasticizer loss from hard chair-side reline resins, thereby improving their biocompatibility. Thus, it is recommended that this procedure be adopted before the insertion of the relined dentures.

Acknowledgements

This study was supported by FAPESP (grant – 03/04097-7). The authors would like to thank Voco GmbH (Cuxhaven, Germany) for the donation of Ufi Gel hard material evaluated in this study.

References

1. Haywood J, Basker RM, Watson CJ and Wood DJ. A comparison of three hard chairside denture reline materials. Part I. Clinical evaluation. *Eur J Prosthodont Restor Dent*, 2003; 11:157-163.
2. Murphy WM, Huggett R, Handley RW and Brooks SC. Rigid cold curing resins for direct use in the oral cavity. *Br Dent J*, 1986; 160:391-394.
3. Sofou A, Tsoupi I, Emmanouil J and Karayannis M. HPLC determination of residual monomers released from heat-cured acrylic resins. *Anal Bioanal Chem*, 2005; 381:1336-1346.
4. Tsuchiya H, Hoshino Y, Tajima K and Takagi N. Leaching and cytotoxicity of formaldehyde and methyl methacrylate from acrylic resin denture base materials. *J Prosthet Dent*, 1994; 71:618-624.
5. Lai YL, Chen YT, Lee SY, Shieh TM and Hung SL. Cytotoxic effects of dental resin liquids on primary gingival fibroblasts and periodontal ligament cells *in vitro*. *J Oral Rehabil*, 2004; 31:1165-1172.
6. Campanha NH, Pavarina AC, Giampaolo ET, Vergani CE, Machado AL and Carlos IZ. Cytotoxicity of hard chair-side reline resins: effect of microwave irradiation and water-bath post-polymerization treatments. *Int J Prosthodont*, 2006; 19:195-201.
7. Gonçalves TS, Morganti MA, Campos LC, Rizzatto SM and Menezes LM. Allergy to auto-polymerized acrylic resin in an orthodontic patient. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*, 2006; 129:431-435.
8. Hensten-Pettersen A and Jacobsen N. Perceived side effects of biomaterials in prosthetic dentistry. *J Prosthet Dent*, 1991; 65:138-144.
9. Bohnenkamp DM. Traumatic stomatitis following an intraoral denture reline: a clinical report. *J Prosthet Dent*, 1996; 76:113-114.
10. Ruiz-Genao DP, Moreno de Vega MJ, Sanchez Perez J and Garcia-Diez A. Labial edema due to an acrylic dental prosthesis. *Contact Dermatitis*, 2003; 48:273-274.
11. Lunder T and Rogl-Butina M. Chronic urticaria from an acrylic dental prosthesis. *Contact Dermatitis*, 2000; 43:232-233.

12. Munksgaard EC. Plasticizers in denture soft-lining materials: leaching and biodegradation. *Eur J Oral Sci*, 2005; 113:166-169.
13. Arima T, Murata H and Hamata T. Analysis of composition and structure of hard autopolymerizing reline resins. *J Oral Rehabil*, 1996; 23:346-352.
14. Chatterjee S and Dutta TK. Metabolism of butyl benzyl phthalate by *Gordonia* sp. strain MTCC 4818. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003; 309:36-43.
15. Nakai M, Tabira Y, Asai D, Yakabe Y, Shimyozu T, Noguchi M, Takatsuki M and Shimohigashi Y. Binding characteristics of dialkyl phthalates for the estrogen receptor. *Biochem Biophys Res Commun*, 1999; 254:311-314.
16. Lamb DJ, Ellis B and Priestley D. The effects of process variables on levels of residual monomer in autopolymerizing dental acrylic resin. *J Dent*, 1983; 11:80-88.
17. Urban VM, Machado AL, Oliveira RV, Vergani CE, Pavarina AC and Cass QB. Residual monomer of reline acrylic resins Effect of water-bath and microwave post-polymerization treatments. *Dent Mater*, 2006. In Press.
18. Katz S, Park KK, Stookey GK and Schemehorn BR. Development and initial testing of a model for *in vitro* formation of pit and fissure caries. *Caries Res*, 1986; 20:424-428.
19. Ferracane JL. Elution of leachable components from composites. *J Oral Rehabil*, 1994; 21:441-452.
20. Koda T, Tsuchiya H, Yamauchi M, Ohtani S, Takagi N and Kawano J. Leachability of denture-base acrylic resins in artificial saliva. *Dent Mater*, 1990; 6:13-16.
21. Ferracane JL. Hygroscopic and hydrolytic effect in dental polymer networks. *Dent Mater*, 2006; 22:211-222.
22. Ruyter IE. Release of formaldehyde from denture base polymers. *Acta Odontol Scand*, 1980; 38:17-27.
23. Ruyter IE and Svendsen SA. Flexural properties of denture base polymers. *J Prosthet Dent*, 1980; 43:95-104.
24. Arima T, Murata H, Hamada T. The effects of cross-linking agents on the water sorption and solubility characteristics of denture base resin. *J Oral Rehabil*

1996;23:476-480.

25. Jones DW, Sutow EJ, Hall GC, Tobin WM and Graham BS. Dental soft polymers: plasticizer composition and leachability. *Dent Mater*, 1988; 4:1-7.
26. Vallittu PK, Miettinen V and Alakuijala P. Residual monomer content and its release into water from denture base materials. *Dent Mater*, 1995; 11:338-342.
27. Dillingham EO, Lawrence WH, Autian J and Schmalz G. Acrylate and methacrylate esters: relationship of hemolytic activity and *in vivo* toxicity. *J Biomed Mater Res*, 1983; 17:945-957.
28. Fujisawa S, Imai Y, Kojima K and Masuhara E. Studies on hemolytic activity of bisphenol A diglycidyl methacrylate (BIS-GMA). *J Dent Res*, 1978; 57:98-102.
29. Graham BS, Jones DW and Sutow EJ. An *in vivo* and *in vitro* study of the loss of plasticizer from soft polymer gel materials. *J Dent Res*, 1991; 70:870-873.
30. Kawahara T, Nomura Y, Tanaka N, Teshima W, Okasaki M and Shintani H. Leachability of plasticizer and residual monomer from commercial temporary restorative resins. *J Dent*, 2004; 32:277-283.
31. Vallittu PK, Ruyter IE, Buykuilmaz S. Effect of polymerization temperature and time on the residual monomer content of denture base polymers. *Eur J Oral Sci*, 1998; 588-593.
32. Wine RN, Li LH, Barnes LH, Gulati DK and Chapin RE. Reproductive toxicity of di-n-butylphthalate in a continuous breeding protocol in Sprague-Dawley rats. *Environ Health Perspect*, 1997; 105:102-107.
33. Hansen BG, Munn SJ, Allanou R, Berthault F, de Bruijn J, Luotamo M, Musset C, Pakalin S, Pellegrini G, Sheer S and Vegro S, eds. European Union Risk Assessment Report. Dibutyl phthalate, CAS n° 84-74-2. EINECS n° 201-557-4. Luxembourg: Office For Official Publications Of The European Communitites, 2003 [with addendum 2004].
34. Araújo PHH, Sayer C, Poço JGR and Giudici R. Techniques for reducing residual monomer content in polymers: a review. *Polym Engineer Sci*, 2002; 42:1442-1468.

Table 1. Materials evaluated in this study

Product	Batch number	Manufacturer	Powder (P)/ Liquid (L) ratio	Composition		Curing cycle
				Powder	Liquid	
K	0208282 (P) 0206251 (L)	Coe Laboratories, Inc., York, Chicago, IL, USA	1.4 g/1 mL	PEMA	IBMA	10 min at room temperature
N	0212-703 (P) 0401-050 (L)	Bosworth Company, Skokie, IL, USA	1.34 g/1 mL	PEMA	IBMA and DBNP	10-15 min at room temperature
U	531727 (P) 531172 (L)	Voco GmbH, Cuxhaven, Germany	1.77 g/1 mL	PEMA	1,6-HDMA	7 min at room temperature
T	4641 (P) 176B1 (L)	Tokuyama Dental Corp., Tokyo, Japan	2.056 g/1 mL	PEMA	MAOP and 1,6-HDMA	8 min at room temperature

PEMA, poly (ethyl methacrylate); *IBMA*, isobutyl methacrylate; *DBNP*, dibutyl-*n*-phthalate; *1,6-HDMA*, 1,6-hexanediol dimethacrylate; *MAOP*, β -methacryloyl oxyethyl propionate.

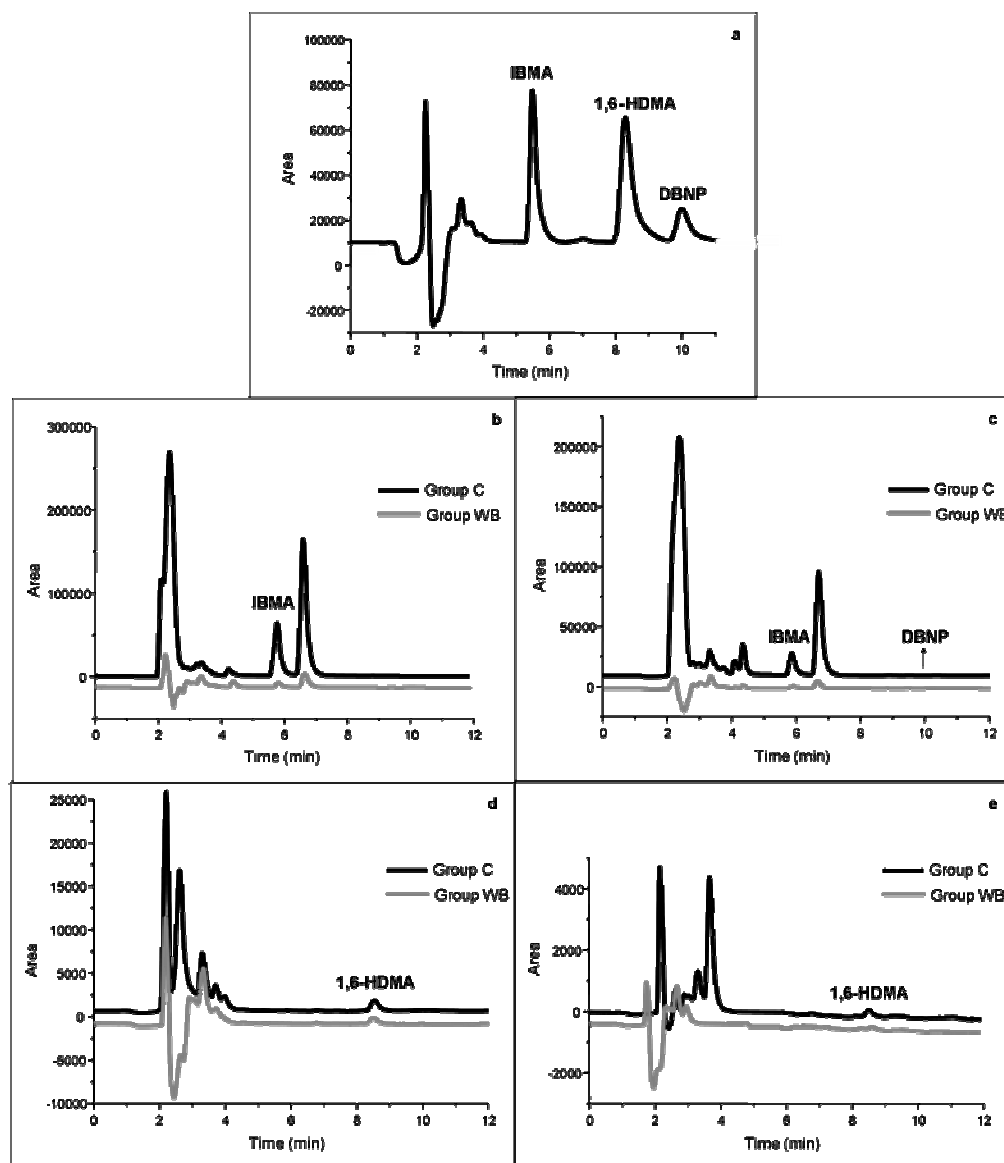


Figure 1

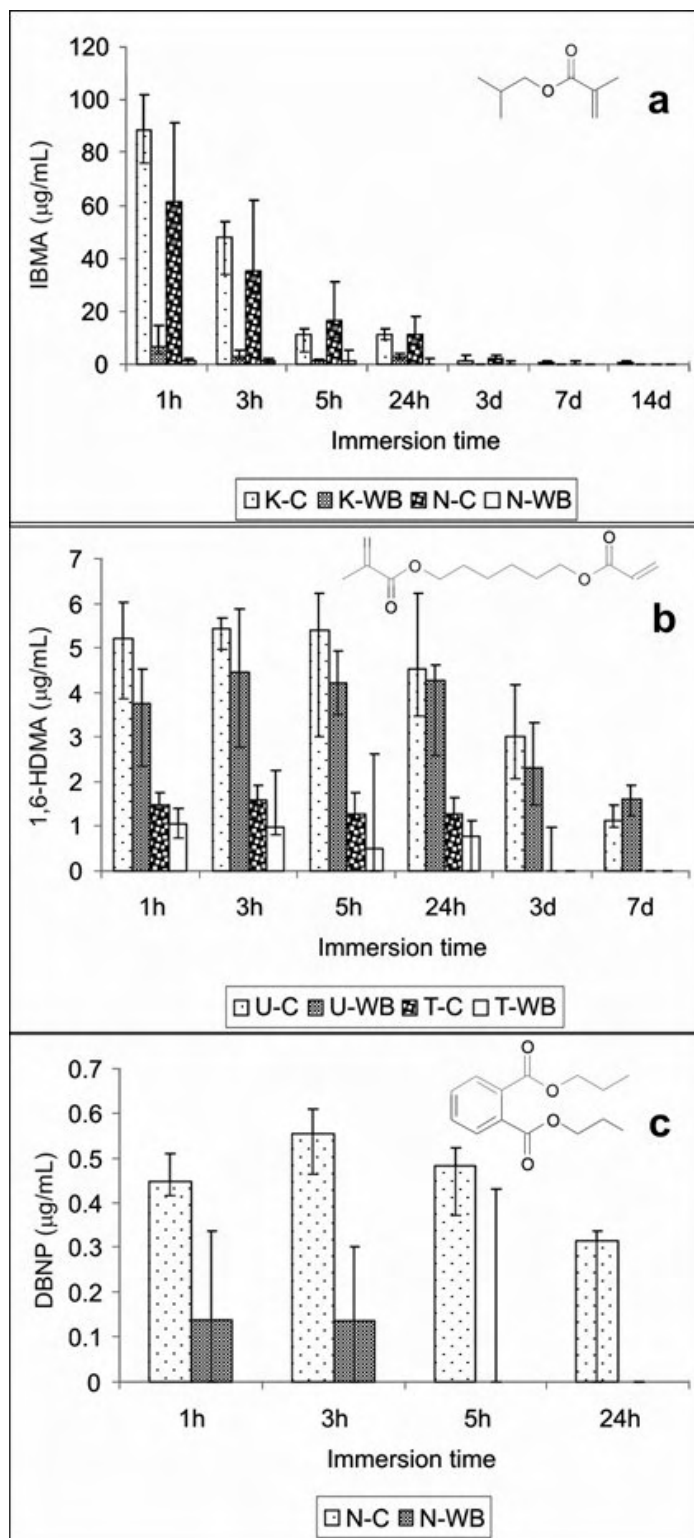


Figure 2

Captions to tables and figures

Table 1. Materials evaluated in this study.

Figure 1. HPLC chromatograms obtained from a standard solution (a) and from the hard chair-side reline resins (b – K, c – N, d – U, and e – T) immersed in artificial saliva for one hour. Group C = control; Group WB = water-bath post-polymerization treatment.

Figure 2. The amount ($\mu\text{g/mL}$) of residual compounds (IBMA – a, 1,6-HDMA – b, and DBNP – c) released from the hard chair-side reline resins evaluated (K, N, U, and T) at various times after immersion in artificial saliva. Median values (bars) and minimum to maximum values (vertical lines) are given.

3.4 Capítulo 4

Short-term leachability of degradation products from hard chair-side reline resins in artificial saliva: effect of water-bath post-polymerization treatment*

Vanessa Migliorini Urban 1, Ana Lucia Machado 1, Carlos Eduardo Vergani 1, Eunice Teresinha Giampaolo 1, Ana Cláudia Pavarina 1, Quezia Bezerra Cass 2.

1 Department of Dental Materials and Prosthodontics, São Paulo State University, Araraquara, São Paulo, Brazil.

2 Department of Chemistry, São Carlos Federal University, São Carlos, São Paulo, Brazil.

Corresponding author:

Dr. Ana Lucia Machado

Department of Dental Materials and Prosthodontics - Araraquara Dental School

R. Humaitá, nº 1680, Araraquara, SP, Brazil, CEP: 14801-903

phone: 55-16-3301 6410 - fax: 55-16-3301 6406 - e-mail: [**cucci@foar.unesp.br**](mailto:cucci@foar.unesp.br)

* Formatado para publicação no periódico **Analytical and Bioanalytical Chemistry**.

Abstract The elution of degradation products from acrylic resins has a potential impact on their biocompatibility. The effect of water-bath post-polymerization treatment on the leaching of degradation products (methacrylic acid-MA and benzoic acid-BA) from the hard chairside reline resins Kooliner (K), New Truliner (N), Ufi Gel hard (U), and Tokuso Rebase Fast (T) in artificial saliva was evaluated. Specimens of each material (n=12) were made and divided into 2 groups: C (control) – specimens were left untreated; WB (water-bath) – specimens were immersed in water at $55\pm 1^{\circ}\text{C}$ for 10 minutes. Specimens were placed in artificial saliva at $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ and, after 1, 3, 5, 24-h, 3, 7, 14, and 30-day intervals, aliquots were removed and analyzed using HPLC. The results ($\mu\text{g/mL}$) were submitted to Wilcoxon, Mann-Whitney or Kruskal-Wallis tests ($\alpha=0.05$). At the first hour of immersion, the mean concentration of MA released from material U control specimens ($16.6 \mu\text{g/mL}$) was significantly higher ($p<0.010$) than those of the other reline resins, and decreased significantly ($p=0.028$) after 3h of immersion ($2.51 \mu\text{g/mL}$). The mean concentration of MA released from K control specimens (4.80) was significantly higher ($p=0.037$) than the other materials in 24-h immersion time. Only for material U, WB specimens released lower ($p<0.050$) amounts of MA (1h – 1.42 ; 3h – 1.13) than control specimens. For all control specimens, mean concentrations of BA (K – 19.2 ; N – 24.1 ; U – 17.5 ; T – 6.56) progressively decreased with increasing immersion time ($p<0.050$). In the first interval, WB specimens of all materials released significantly lower amounts of BA (K – 1.67 ; N – 3.05 ; U – 3.42 ; T – 1.30) than the controls ($p<0.050$). The highest concentration of MA was leached from material U control specimens. For all materials, the leaching of BA decreased during the monitoring period. Water-bath post-polymerization treatment caused a significant reduction in elution of BA.

Keywords Reline resins · Methacrylic acid · Benzoic acid · Leachability · HPLC · Post-polymerization treatment

Introduction

Removable dentures may need to be relined at suitable intervals because of changes in the denture-bearing area, usually due to alveolar bone resorption and/or changes of the mucosal tissues. Autopolymerizing reline resins can be used directly in the mouth for temporary or permanent improvement of the denture fit [1], thus enhancing the retention and stability of removable prostheses [2]. They are also useful as temporary relining materials for immediate dentures in order to assure proper fit of the denture bases to the final contours of the healed tissue [3]. The composition of the hard chair-side reline resins not only differs significantly from that of the polymethyl methacrylate (PMMA) acrylic resins, but also varies considerably among products. The conventional PMMA powder has been replaced by polyethyl methacrylate (PEMA). A variety of monomers, such as isobutyl methacrylate (IBMA), butyl methacrylate (BMA), or 1,6-hexanediol dimethacrylate (1,6-HDMA) have been used instead of methyl methacrylate (MMA) [4]. Moreover, some of the current available autopolymerizing reline resins are highly cross-linked [4].

It is known that chemically-induced polymerization reaction does not result in complete conversion of the initial methacrylate groups (i.e. carbon-carbon double bonds) [5], and certain amounts of unreacted monomers remain in the polymer [6]. In addition, during clinical use, polymeric materials may undergo degradation due to mechanical, chemical and thermal stresses [7,8]. Degradation can be caused by different mechanisms, including oxidation, decomposition and hydrolysis [7, 9-15], and may result in the formation of several by-products. The elution of components from polymers has been shown to be dependent upon the degree of double bond conversion, the size and chemical characteristics of the leachable species, and the degree of cross-linking in the polymerized material [16,17].

Components eluted from acrylic resins into saliva may diffuse to the oral mucosa adjacent to the dentures. Some of these organic components, among them methacrylic acid (MA) and benzoic acid (BA) [10,15] are potent sensitive/irritant agents, and may induce irritant and/or delayed allergic reactions

[18-24]. Therefore, to evaluate biomaterials toxicologically, it has been recommended to identify and quantify the leaching compounds [25]. In vitro and in vivo studies have been conducted to determine the release of leachable components from denture base acrylic resins [7,9-13,15,26]. However, to the author's knowledge, the leachability of degradation products from hard chair-side reline resins has not been reported in the literature. In addition, it is desirable that the amount of residual compounds be reduced to a minimum. Water-bath [8,13,27,28] and microwave irradiation [28-30] have shown effectiveness in reducing residual monomer content of polymerized acrylic resins. It can be hypothesized that a more complete polymerization reaction could diminish the leaching of residual compounds.

The aim of this work was to use a validated high performance liquid chromatographic (HPLC) method to quantify the leaching of MA and BA from hard chairside reline resins in artificial saliva. It was also evaluated the effect of a post-polymerization treatment on the leaching process.

Material and Methods

The materials used in this work, batch number, together with the manufacturers, composition, mixing proportions of monomer to polymer and polymerization conditions are listed in Table 1. These materials comprise cross-linked and non-cross-linked autopolymerizing hard chairside reline resins and were selected because they contain different types of monomer.

Specimen preparation

Specimen disks, 50 mm in diameter and 2 mm in thickness, were prepared for each hard chair-side reline resin ($n = 12$) using a stainless steel mold. The materials were mixed in accordance with the manufacturer's instructions (Table 1) and inserted into the metal mold. A polyester sheet and a glass plate were then positioned on top of the mold in order to prevent the formation of an air-inhibited surface layer. The materials were polymerized under compression in a hydraulic press at room temperature for the polymerization time recommended

by the manufacturers (Table 1). After polymerization, lateral irregularities and excess material were carefully removed using 360-grit silicon carbide paper.

Specimens of all materials were then divided into two groups ($n=6$) as follows: Group C (control), in which the specimens were left untreated; Group WB, in which the specimens were submitted to post-polymerization treatment by immersing in water-bath at $55\pm 1^\circ\text{C}$ for 10 min. This treatment was performed following the recommendations of one of the manufacturers of autopolymerizing reline resins to reduce the monomer taste. Moreover, in a previous work, this treatment was found to significantly reduce the residual monomer content of hard chair-side reline resins [28].

HPLC analysis

Each specimen was individually placed in 20 mL of artificial saliva [31] in closed plastic containers at $37\pm 1^\circ\text{C}$, protected from light during 30 days. To determine the amount of MA and BA released from the hard chair-side reline resins, aliquots (200 μL) from each immersion solution were analyzed at 1, 3, 5, and 24 h and 3, 7, 14, and 30 days after specimen preparation. For the periods up to 24 h, the liquid in the container was replaced with a fresh 20 mL portion of artificial saliva after each aliquot was taken. After 24-h interval, the artificial saliva was replaced daily for a period of 30 days. For the replacements, each specimen was washed in deionized water, dried with absorbent paper and immersed into the fresh artificial saliva. The aliquots were subjected to HPLC immediately after sampling.

After optimizing analytical conditions, the method was developed, validated and used in the leaching experiments. A sample (20 μL) of immersion solution was injected into the HPLC system (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan) equipped with a system controller (CBM-10A), a liquid chromatograph pump (LC-10AD), a UV-Vis detector (SPD-10A) and an auto-injector (SIL-10F). A LC-18 column (5 μm particle size, 100 Å pore size, 0.46 cm I.D. x 15 cm length) was used to achieve chromatographic separation. The mobile phase (acetonitrile:water 20/80 with pH 3.0, adjusted by the addition of glacial acetic

acid) eluted at a flow rate of 0.8 mL/min under isocratic mode for 20 min. The elution then changed to gradient mode ranging from 20 to 100% (v/v) during 3 min, and returned to 20% during 5 min. Afterwards, the mobile phase eluted under isocratic mode for additional 5 min. Absorbance readings were performed at 230 nm. The band area of released compounds on the HPLC trace was determined by software (Class LC10, Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan).

The concentration of the acids was determined based on calibration curves, which were prepared using standard solutions containing known amounts of the acids in artificial saliva. Various concentrations of each compound (MA = 1.00 to 128 $\mu\text{g/mL}$, BA = 0.500 to 64.0 $\mu\text{g/mL}$) were injected into the chromatograph and the band areas were recorded and measured to construct the calibration graphs. Thereafter, the sample solution from each specimen containing unknown concentrations of the substances of interest was injected and the band area was determined.

Statistical analysis

The amount of released MA and BA was calculated on the basis of calibration graphs by taking the area under the HPLC bands and expressed in $\mu\text{g/mL}$. Differences within each material with increasing time were tested for significance using Wilcoxon's signed rank sum test. To evaluate if the post-polymerization treatment might affect the leaching of degradation products from the evaluated materials at each immersion period, Mann-Whitney two-sample test was used. Kruskal-Wallis test was used to investigate the differences between materials within the same experimental condition at each time interval. All tests were performed at a confidence level of 95%.

Results

Figure 1 illustrates typical chromatograms of standards (a) and reline resins (K – b, N – c, U – d, and T – e). The mean values of MA and BA released with time from each material (K – a, N – b, U – c, and T – d) in the two groups evaluated (C and WB) are shown in Figures 2 and 3.

At the first hour of immersion, the mean concentration of MA released from material U control specimens (16.6 $\mu\text{g/mL}$) was significantly higher ($p<0.010$) than those of the other reline resins, and decreased significantly ($p=0.028$) after 3h of immersion (2.51 $\mu\text{g/mL}$). The mean concentration of MA leached from K control specimens (4.80 $\mu\text{g/mL}$) was significantly higher ($p=0.037$) than the other materials at the 24-h immersion time. For the other time intervals, no significant differences were observed among the control groups of the four reline resins.

Only for the material U, the amounts of MA released from the treated specimens (group WB) were significantly lower than the control specimens after 1 h (1.42 $\mu\text{g/mL}$) and 3 h (1.13 $\mu\text{g/mL}$) of immersion in artificial saliva. Figure 2 demonstrates that MA concentrations of 1.32 to 2.50 $\mu\text{g/mL}$ remained even after 30 days of immersion in artificial saliva. It can also be seen from Figure 2 that substantial variation existed between the minimum and maximum concentrations of MA leached from all reline resins under both control and experimental conditions.

For all control specimens, mean concentrations of BA (K – 19.2 $\mu\text{g/mL}$; N – 24.1 $\mu\text{g/mL}$; U – 17.5 $\mu\text{g/mL}$; T – 6.56 $\mu\text{g/mL}$) decreased significantly ($p<0.050$) within the first 5 hours of immersion (K – 4.01 $\mu\text{g/mL}$; N – 4.10 $\mu\text{g/mL}$; U – 5.25 $\mu\text{g/mL}$; T – 1.80 $\mu\text{g/mL}$). Afterwards, concentrations of BA leached from all control specimens increased ($p<0.050$) at the 1-day immersion (K – 15.8 $\mu\text{g/mL}$; N – 35.0 $\mu\text{g/mL}$; U – 17.5 $\mu\text{g/mL}$; T – 12.7 $\mu\text{g/mL}$) and then gradually decreased during the monitoring period. At the 1-, 3- and 24-h time periods, significant statistical differences were found among controls of all materials evaluated ($p<0.050$), with more BA being released from N and K materials than from U and T reline resins.

In the first interval, WB specimens of all materials released significantly lower amounts of BA (K – 1.67 $\mu\text{g/mL}$; N – 3.05 $\mu\text{g/mL}$; U – 3.42 $\mu\text{g/mL}$; T – 1.30 $\mu\text{g/mL}$) than the controls ($p<0.050$). Significant reductions ($p<0.05$) were also noted after 3 h of immersion for materials K, N and U, and after 24 h of immersion for materials N, U e T. There were significant ($p=0.016$)

differences among treated materials in the first hour of immersion, with U and N materials showing higher BA leaching than K and T materials.

Discussion

It is known that polymers may be degraded to some extent due to oxidation, attack of functional groups, and chain scission [32], and this may set free components or chemically altered reaction products [33]. Studies have shown that in addition to residual monomer several degradation products, such as methacrylic acid [10,15,34], benzoic acid [10,34], formaldehyde [9,11-13], phenyl salicylate [7,35], phenyl benzoate, biphenyl [7,26,35], and 2-hydroxy-4-methoxy-benzophenone [35], are capable of being leached from acrylic resins. In this study, the degradation products methacrylic acid and benzoic acid were detected leaching out of all reline resins, and were quantified using HPLC.

Differences in the amount of methacrylic acid released from the hard chair-side reline resins could be noted in the first hour and the first day of immersion in artificial saliva. Methacrylic acid is probably formed via hydrolysis [10,32,36] or esterification of methacrylate groups (Figure 4). Although the results of a previous study [28] have demonstrated that Ufi Gel hard material had lower residual monomer content than the other hard chairside reline resins evaluated, this material released significantly higher amounts of methacrylic acid than the others at the first hour of immersion. Stereochemistry of 1,6-hexanediol dimethacrylate can provide some explanation for this result. This molecule has two methacrylate groups, so two methacrylic acid molecules can be formed by its hydrolysis (Figure 4). However, although the liquid composition of Tokuso Rebase Fast also comprises 1,6-hexanediol dimethacrylate monomer, this reline resin released less methacrylic acid in comparison with the other materials, including Ufi Gel hard. Even though Ufi Gel hard has crosslinking agent in its composition, it is possible that a more porous structure may have been created during dough formation, facilitating the diffusion of methacrylic acid through the matrix [37]. However, other studies are needed to confirm these assumptions. The higher leachability of methacrylic acid from Kooliner resin after one day of

immersion could be related to high residual monomer content. The results of a previous study [28], in which Kooliner resin demonstrated significantly higher residual monomer content than the other materials evaluated, support this hypothesis.

Previous studies have shown that residual monomer values decrease with increasing time [15,27,38]. If one of the mechanisms involved with the reduction of residual methacrylate monomer is its hydrolysis to methacrylic acid, an increase in the amount of methacrylic acid with increasing time may be expected [10]. However, for methacrylic acid leachability, a time-associated effect was not found. In fact, the amount released from U control specimens decreased from 1 h to 3 h of immersion in artificial saliva, and for the other relined resins no significant differences were detected among all immersion periods. A large variation between minimum and maximum concentrations of methacrylic acid releasing from all materials was also observed. One possible explanation for these results could be the fact that methacrylic acid is unstable and may polymerize [39]. In addition, methacrylic acid is classified as readily biodegradable, and undergoes oxidation to CO_2 and H_2O and a smaller part escapes as methylmalonate, succinate, and possibly as β -hydroxy-isobutyrate [40] or is promptly converted to pyruvic acid. Hence, the changes in the concentration of methacrylic acid observed in the present work may be due to polymerization and degradation mechanisms of this unstable compound.

The water-bath post-polymerization treatment did not reduce the leachability of methacrylic acid, with the exception of material Ufi Gel hard on the first and third hour of immersion. As discussed before, it is difficult to predict the concentration of methacrylic acid. Nevertheless, the results demonstrated that amounts were measured even after 30 days of immersion in artificial saliva, indicating that the leachability of methacrylic acid from treated specimens consists of a slow mechanism.

For all materials, the results showed that the amounts of benzoic acid decreased during the first five hours. The leaching increased in 1-day immersion and then gradually decreased within the monitoring period. According

to the Material Safety Data Sheet (MSDS) provided by the manufacturer (Mallinckrodt Chemicals J.T. Baker, Phillipsburg, NJ, USA), this compound is expected to readily biodegrade, showing a half-life between 1 to 10 days when released into water or an aqueous solution, such as the artificial saliva used in the present work. This fact associated with diffusion from the reline resins to artificial saliva may help explain the decrease in the amount of this degradation product with time.

It was observed that New Truliner and Kooliner resins showed higher leachability of benzoic acid than did Ufi Gel hard and Tokuso Rebase Fast materials within the initial time of immersion. Benzoic acid is ascribable to the decomposition product of benzoyl peroxide added as an initiator [10,41]. Despite the higher powder-to-liquid ratio and consequently the higher benzoyl peroxide/terciary amine ratio in Ufi Gel hard and Tokuso Rebase Fast resins, these materials leached less benzoic acid than Kooliner and New Truliner materials. These results are reasonably consistent with the chemical formulation of the reline resins (Table 1). Ufi Gel hard and Tokuso Rebase Fast resins present 1,6-hexanediol dimethacrylate, whereas Kooliner and New Truliner materials present isobutyl methacrylate in their liquid composition. The use of dimethacrylates like 1,6-hexanediol dimethacrylate can enhance the polymerization reaction by increasing the reactivity of the second methacrylate group [42] and then less residual compounds can be found. In addition, the results demonstrated that Tokuso Rebase Fast released the lowest amount of benzoic acid regardless of the experimental condition. This material also contains β -methacryloyl oxyethyl propionate [43] in its composition. Probably after the initiation period, the presence of this bifunctional monomer together with 1,6-hexanediol dimethacrylate could result in a more complete polymerization. This result corroborates with the findings obtained in a previous study, where Tokuso Rebase Fast material also showed the lowest amount of residual monomer compared to the other reline resins evaluated [28]. Therefore, it seems that the monomer reactivity plays a more important role in enhancing the polymerization and/or the consumption of benzoyl peroxide than the powder/liquid ratio.

Differently from the methacrylic acid, the water-bath post-polymerization treatment caused a significant reduction in elution of benzoic acid. Particularly for benzoic acid, the extraction rate is directly dependent upon temperature: the higher the temperature, the higher the rate of extraction [15]. In addition, the MSDS states that benzoic acid decomposes to toxic vapors and gas including phenol, benzene, and carbon monoxide when this compound is heated. Thus, the decrease in benzoic acid leachability could be related to the heating of acrylic resins during the post-polymerization treatment, which may have enhanced the diffusion and accelerated the biodegradation of this by-product.

Similar to the potential cytotoxic effect of residual monomer, other substances eluting from acrylic resins may inhibit cell growth and disrupt various metabolic processes [44]. Results from a previous study [1] showed that Ufi Gel hard resin may have enhanced the mitochondrial activity of L929 fibroblasts. This stimulation of cell activity may reflect a compensatory response of cell enzyme activity to resin-associated toxicity [45]. In addition, Campanha et al. [1] observed an increased cytotoxicity of some reline resins even after the water-bath post-polymerization treatment [1]. Another previous study [28] showed that Ufi Gel hard material presents low residual monomer content compared to other reline resins. This previous study [28] also demonstrated that the water-bath post-polymerization treatment significantly reduced the residual monomer content of reline acrylic resins. Campanha et al. [1] also speculated that the cytotoxicity may be related to the leaching of other compounds, such as additives, by-products from the free radical polymerization reaction, degradation products, impurities or products formed from the decomposition of benzoyl peroxide [7]. Thus, another cytotoxicity assays are required to determine if the concentrations found in the present investigation for methacrylic and benzoic acids may induce cytotoxic responses.

Conclusion

1. Methacrylic and benzoic acids were detected leaching out of all reline resins;
2. The highest concentration of methacrylic acid was leached from control

specimens of Ufi Gel hard;

3. For all control specimens, the leachability of benzoic acid progressively decreased with increasing immersion time;
4. Regardless of the experimental condition, Tokuso Rebase Fast released significantly less benzoic acid than the other materials;
5. The water-bath post-polymerization treatment did not reduce the amounts of methacrylic acid released from the relines resins, but caused a significant reduction in elution of benzoic acid.

Acknowledgements

This study was supported by FAPESP (grant – 03/04097-7). The authors would like to thank Voco GmbH (Cuxhaven, Germany) for the donation of Ufi Gel hard material evaluated in this study.

References

1. Campanha NH, Pavarina AC, Giampaolo ET, Vergani CE, Machado AL, Carlos IZ (2006) *Int J Prosthodont In Press*
2. Haywood J, Basker RM, Watson CJ, Wood DJ (2003) *Eur J Prosthodont Restor Dent* 11:157-163
3. Murphy WM, Huggett R, Handley RW, Brooks SC (1986) *Br Dent J* 160:391-394
4. Arima T, Murata H, Hamada T (1995) *J Prosthet Dent* 73:55-59
5. Tuusa SM, Puska MA, Lassila LV, Vallittu PK (2005) *J Mater Sci Mater Med* 16:15-20
6. Lung CY, Darvell BW (2005) *Dent Mater* 21:1119-1128
7. Lygre H, Solheim E, Gjerdet NR (1995) *Acta Odontol Scand* 53:75-80
8. Lee SY, Lai YL, Hsu TS (2002) *Eur J Oral Sci* 110:179-183
9. Ruyter IE (1980) *Acta Odontol Scand* 38:17-27
10. Koda T, Tsuchiya H, Yamauchi M, Ohtani S, Takagi N, Kawano J (1990) *Dent Mater* 6:13-16
11. Tsuchiya H, Yamada K, Akagiri M, Tajima K, Miyazaki T, Takagi N, Itoh U, Sato M (1993) *Dent Mater J* 12:253-258
12. Tsuchiya H, Hoshino Y, Kato H, Takagi N (1993) *J Dent* 21:240-243
13. Tsuchiya H, Hoshino Y, Tajima K, Takagi N (1994) *J Prosthet Dent* 71:618-624
14. Ruyter IE (1995) *Adv Dent Res* 9:344-347
15. Sofou A, Tsoupi I, Emmanouil J, Karayannis M (2005) *Anal Bioanal Chem* 381:1336-1346
16. Ferracane JL (1994) *J Oral Rehabil* 21:441-452
17. Örtengren U, Wellendorf H, Karlsson S, Ruyter IE (2001) *J Oral Rehabil* 28:1106-1115
18. Ali A, Reynolds AJ, Walker DM (1986) *Br Dent J* 161:444-447
19. Bohnenkamp DM (1996) *J Prosthet Dent* 76:113-114
20. Barclay SC, Forsyth A, Felix DH, Watson IB (1999) *Br Dent J* 187:350-352
21. Lunder T, Rogl-Butina M (2000) *Contact Dermatitis* 43:232-233

22. Ruiz-Genao DP, Moreno de Vega MJ, Sanchez Perez J, Garcia-Diez A (2003) *Contact Dermatitis* 48:273-274
23. Gawkrödger DJ (2005) *Br J Dermatol* 153:479-485
24. Gonçalves TS, Morganti MA, Campos LC, Rizzatto SM, Menezes LM (2006) *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 129:431-435
25. Leusncher J (1992) *Clin Mater* 10:51-57
26. Lygre H, Solheim E, Gjerdet NR, Berg E (1993) *Acta Odontol Scand* 51:45-51
27. Lamb DJ, Ellis B, Priestley D (1983) *J Dent* 11:80-88
28. Urban VM, Machado AL, Oliveira RV, Vergani CE, Pavarina AC, Cass QB (2006) *Dent Mater In Press*
29. Yunus N, Harrison A, Huggett R (1994) *J Oral Rehabil* 21:641-648
30. Blagojevic V, Murphy VM (1999) *J Oral Rehabil* 26:804-808
31. Katz S, Park KK, Stookey GK, Schemehorn BR (1986) *Caries Res* 20:424-428
32. Ferracane JL (2006) *Dent Mater* 22:211-222
33. Rose EC, Bumann J, Jonas IE, Kappert HF (2000) *J Orofac Orthop* 61:246-257
34. Koda T, Tsuchiya H, Yamauchi M, Hoshino Y, Takagi N, Kawano J (1989) *J Dent* 17:84-89
35. Lygre H, Klepp KN, Solheim E, Gjerdet NR (1994) *Acta Odontol Scand* 52:150-156
36. Corkill JA, Lloyd EJ, Hoyle P, Crout DHG, Ling RSM, James ML et al (1976) *Clin Chim Acta* 68:141-146
37. Vallittu PK, Miettinen V, Alakuijala P (1995) *Dent Mater* 11:338-342
38. Baker S, Brooks SC, Walker DM (1988) *J Dent Res* 67:1295-1299
39. Morawetz H, Rubin ID (2003) *J Polym Sci* 165:687-692
40. Bratt H, Hattway DE (1977) *Brit J Cancer* 36:114-119
41. Al Doori D, Huggett R, Bates JF, Brooks SC (1988) *Dent Mater* 4:25-32
42. Ruyter IE, Svendsen SA (1980) *J Prosthet Dent* 43:95-104
43. Arima T, Murata H, Hamada T (1996) *J Oral Rehabil* 23:346-352

44. Schuster GS, Lefebvre CA, Dirksen TR, Knoernschild KL, Caughman GB (1995) Int J Prosthodont 8:580-586
45. Lefebvre CA, Knoernschild KL, Schuster GS (1994) J Prosthet Dent 72:644-650

Table 1. Materials evaluated in this study

Product	Batch number	Manufacturer	Powder (P)/ Liquid (L) ratio	Composition		Curing cycle
				Powder	Liquid	
K	0208282 (P) 0206251 (L)	Coe Laboratories, Inc., York, Chicago, IL, USA	1.4 g/1 mL	PEMA	IBMA	10 min at room temperature
N	0212-703 (P) 0401-050 (L)	Bosworth Company, Skokie, IL, USA	1.34 g/1 mL	PEMA	IBMA and DBNP	10-15 min at room temperature
U	531727 (P) 531172 (L)	Voco GmbH, Cuxhaven, Germany	1.77 g/1 mL	PEMA	1,6-HDMA	7 min at room temperature
T	4641 (P) 176B1 (L)	Tokuyama Dental Corp., Tokyo, Japan	2.056 g/1 mL	PEMA	MAOP and 1,6-HDMA	8 min at room temperature

PEMA, poly (ethyl methacrylate); IBMA, isobutyl methacrylate; DBNP, dibutyl-*n*-phthalate; 1,6HDMA, 1,6-hexanediol dimethacrylate; MAOP, β -methacryloyl oxyethyl propionate.

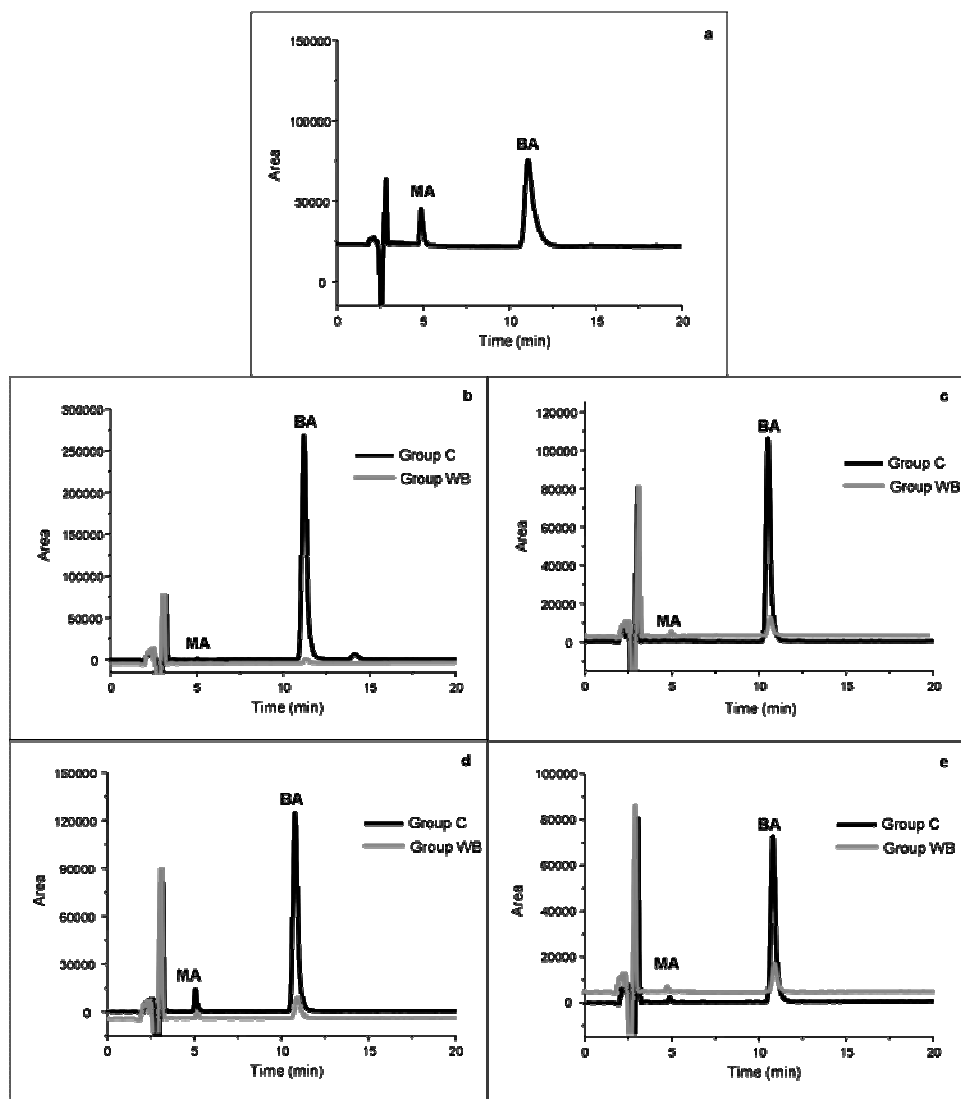


Figure 1

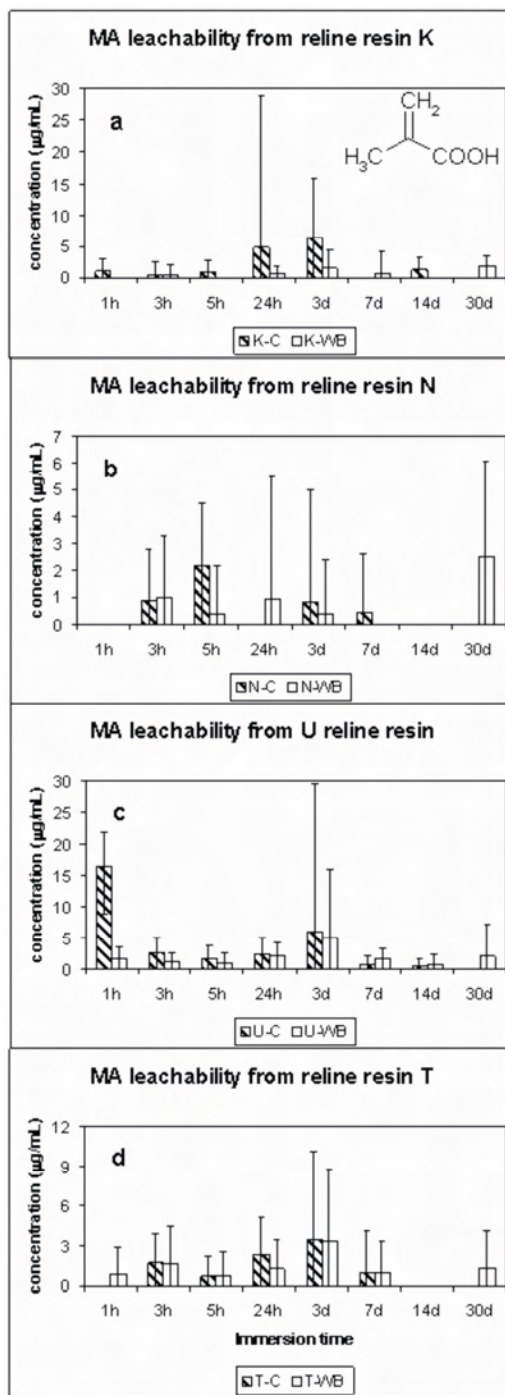
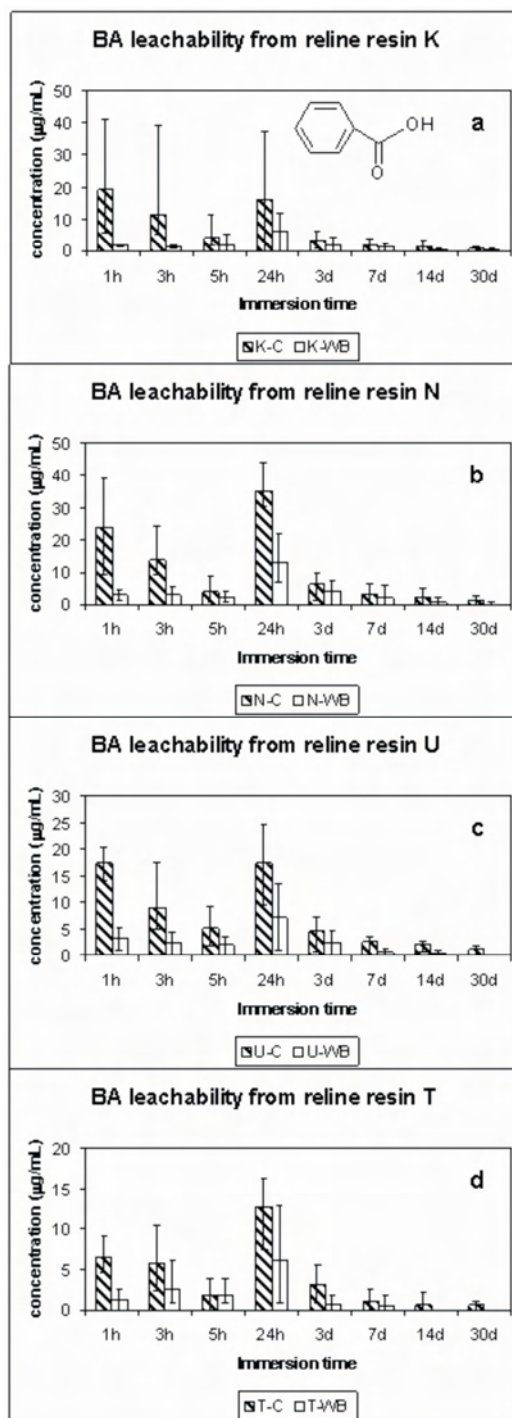


Figure 2



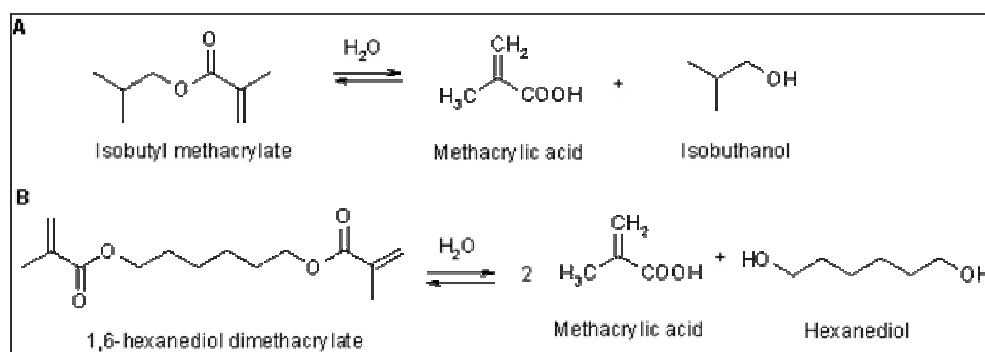


Figure 4

Captions to the figures

Fig. 1. HPLC chromatograms obtained from a standard solution (a) and from the hard chair-side reline resins (b – K, c – N, d – U, and e – T) immersed in artificial saliva for one hour. Group C = control; Group WB = water-bath post-polymerization treatment.

Fig. 2. Methacrylic acid ($\mu\text{g/mL}$) released from the hard chair-side reline resins evaluated (K - a, N - b, U - c, and T - d) at various times after immersion in artificial saliva. Mean values (bars) and minimum to maximum values (vertical lines) are given.

Fig. 3. Benzoic acid ($\mu\text{g/mL}$) released from the hard chair-side reline resins evaluated (K - a, N - b, U - c, and T - d) at various times after immersion in artificial saliva. Mean values (bars) and minimum to maximum values (vertical lines) are given.

Fig. 4. Mechanism for methacrylic acid production by esterification of IBMA (a) and 1,6-HDMA (b).

4 Discussão

Durante a análise e interpretação dos resultados obtidos no presente estudo, os possíveis fatores envolvidos foram discutidos, de acordo com a metodologia utilizada. Esses fatores, divididos em tópicos, serão apresentados a seguir.

Inicialmente serão discutidos os resultados dos grupos controles (sem tratamento) dos materiais avaliados.

4.1 Fatores relacionados aos resultados de T_g e grau de conversão

4.1.1 Ciclo de polimerização

Os resultados do presente estudo demonstraram uma relação favorável da utilização de ciclos curtos de polimerização que incluem uma temperatura final em ebulição com o aumento do grau de conversão (Tabela 2 – Capítulo 1 e Apêndice 2) e da T_g (Tabela 3 – Capítulo 2 e Apêndice 3) da resina termopolimerizável Lucitone 550 utilizada para confecção de base de prótese. Esses resultados foram atribuídos à temperatura de polimerização utilizada no ciclo longo, que é inferior à T_g da matriz polimérica da resina Lucitone 550 (97,0 a 100°C)⁸⁷. Como resultado, a conversão das amostras polimerizadas a partir do ciclo longo foi limitada devido à baixa movimentação das cadeias moleculares e à imobilização do monômero no polímero vítreo⁸⁶.

Tem sido demonstrado que os ciclos de polimerização por banho de água com um período terminal em ebulição reduzem significativamente o nível de monômero residual em resinas acrílicas para base de prótese^{44,99}. A presença de monômero residual, resultando em aumento na plasticidade das cadeias, em resinas acrílicas ativadas termicamente e polimerizadas sem esse período terminal em ebulição também tem sido relatada como a causa mais provável de uma transição aparente em uma temperatura mais baixa que aquela característica do

material⁴⁵. Esse fato deve ter contribuído para a T_g mais alta das amostras do material Lucitone 550 processadas utilizando o ciclo curto de polimerização^{17,48}.

4.1.2 Proporção pó/líquido

Foi observada a influência da proporção pó/líquido dos materiais acrílicos nos valores de transição vítrea. O baixo valor de T_g do material Duraliner II (Tabela 2 – Capítulo 2 e Apêndice 3) foi relacionado com sua baixa proporção pó/líquido. Tem sido demonstrado que o conteúdo de monômero residual na resina polimerizada é dependente da quantidade de monômero na proporção da mistura⁵⁵. Com baixas proporções pó/líquido, a proporção entre peróxido e amina será diminuída e, dessa forma, a velocidade de decomposição do peróxido aumentará. Conseqüentemente, o efeito final será uma diminuição na concentração de radicais livres e um aumento na concentração de monômero residual⁶¹, reduzindo, assim, a T_g ⁷⁰.

4.1.3 Composição

Polímeros que apresentam ligações cruzadas são rígidos, inflexíveis, apresentam T_g mais altas e maior resistência à degradação térmica⁷⁰. À medida que as ligações cruzadas aumentam, a energia aparente de ativação associada com a transição vítrea aumenta. Alves et al.⁴ avaliaram polímeros de polimetil metacrilato com diferentes graus de ligações cruzadas e verificaram que um aumento no conteúdo de agente de ligação cruzada de 0,50 a 9,0% aumentou a temperatura de transição vítrea em, aproximadamente, 12°C. Desse modo, as baixas temperaturas de transição vítrea apresentadas pelas amostras do grupo controle dos materiais New Truliner e Kooliner (Tabela 2 – Capítulo 2 e Apêndice 3) foram atribuídas à composição dos líquidos dessas resinas, os quais não contêm agentes de ligação cruzada.

A baixa T_g do material New Truliner também foi atribuída à presença do plastificante dibutil-*n*-ftalato no seu líquido (8,0%)⁸. A adição de plastificantes aos polímeros proporciona volume livre adicional ao sistema,

reduzindo os entrelaçamentos e as forças intermoleculares que resulta em uma diminuição da T_g e do módulo de elasticidade⁷⁰.

Os resultados deste estudo demonstraram uma relação entre a presença de moléculas bifuncionais com longas distâncias entre os dois grupos metacrilatos e os valores de grau de conversão e T_g . Quanto mais longa a cadeia de uma molécula, maior a distância entre os dois grupos metacrilatos. De acordo com Ruyter, Svendsen⁸⁷, com uma longa distância entre esses grupos uma polimerização mais completa é esperada devido à maior reatividade do segundo grupo metacrilato.

As resinas para reembasamento Ufi Gel hard e Tokuso Rebase Fast contêm o monômero bifuncional 1,6-hexanediol dimetacrilato⁷, enquanto a resina para base de prótese Lucitone 550 contém o agente de ligação cruzada etileno glicol dimetacrilato (Tabela 1 – Capítulo 1). A maior distância entre os grupos metacrilatos do 1,6-hexanediol dimetacrilato provavelmente aumentou a reatividade da segunda dupla ligação, favorecendo, dessa forma, a conversão do monômero em polímero⁸⁷. Os resultados de grau de conversão (Tabela 2 – Capítulo 1 e Apêndice 2) e de T_g (Tabela 2 – Capítulo 2 e Apêndice 3) apresentados pelas resinas para reembasamento Ufi Gel hard e Tokuso Rebase Fast foram comparáveis àqueles apresentados pela resina para base de prótese Lucitone 550, principalmente quando foi utilizado o ciclo longo de polimerização (Tabela 2 – Capítulo 1 e Apêndice 2 e Tabela 3 – Capítulo 2 e Apêndice 3).

Como pode ser visto na Figura 5 (Capítulo 2), o agente de ligação cruzada 1,6-hexanediol dimetacrilato tem dois grupos carbonílicos (éster). O líquido do Tokuso Rebase Fast contém o monômero β -metacrilatoil oxietil propionato⁸, o qual também apresenta dois grupos carbonílicos. A presença de grupos polares, como os carbonílicos, em macromoléculas poliméricas aumenta suas ligações secundárias, mantendo as cadeias poliméricas mais próximas¹⁶. Tendo em vista que a T_g é a temperatura na qual os segmentos poliméricos apresentam energia suficiente para um rearranjo ou rotação, quanto mais fortes as ligações secundárias, menor a capacidade das cadeias de superarem a barreira energética e, assim, mais alta é a T_g ⁹³. Esses aspectos também explicam os valores

mais altos de T_g registrados no presente estudo para os materiais Ufi Gel hard e Tokuso Rebase Fast.

4.2 Fatores relacionados aos resultados de liberação de monômero residual e plastificante

4.2.1 Proporção pó/líquido

Tendo em vista que o monômero residual passível de ser liberado encontra-se no líquido dos materiais, uma menor proporção pó/líquido pode resultar em uma maior liberação de monômero residual. Este fato pode explicar parcialmente os maiores valores de liberação de 1,6-hexanediol dimetacrilato pela resina Ufi Gel hard (Figura 2b – Capítulo 3 e Apêndice 5), a qual apresenta uma menor proporção pó/líquido em relação à resina Tokuso Rebase Fast. Tem sido relatado que a velocidade de decomposição do peróxido de benzoíla aumenta com proporções peróxido/amina menores⁶¹. Como resultado, o conteúdo de monômero residual aumenta no material polimerizado.

4.2.2 Composição

Foi observado neste estudo que os materiais Kooliner e New Truliner liberaram quantidades relativamente altas de isobutil metacrilato em comparação com o 1,6-hexanediol dimetacrilato liberado a partir das resinas Ufi Gel hard e Tokuso Rebase Fast (Figura 2a e 2b – Capítulo 3 e Apêndice 5). O isobutil metacrilato presente no líquido dos materiais Kooliner e New Truliner é um monômero monofuncional, enquanto o 1,6-hexanediol dimetacrilato contido no líquido das resinas Ufi Gel hard e Tokuso Rebase Fast é um dimetacrilato. A presença de monômeros bifuncionais pode melhorar o processo de polimerização comparado com os sistemas baseados em monômeros monofuncionais, por também proporcionarem um número maior de grupos reativos para a reação de polimerização. Os resultados de um estudo prévio⁹⁹ proporcionam suporte a essa hipótese, tendo em vista que as duas resinas Ufi Gel hard e Tokuso Rebase Fast

apresentaram conteúdo de monômero residual significativamente menor que as demais resinas para reembasamento imediato avaliadas, incluindo a Kooliner.

4.2.3 Matriz polimérica

As diferenças entre as concentrações de monômeros liberados dos materiais em saliva artificial foram relacionadas às estruturas poliméricas dessas resinas. A eluição ocorre por meio da difusão das moléculas através da matriz resinosa. Os materiais Kooliner e New Truliner não contêm agentes de ligação cruzada, enquanto as resinas para reembasamento Ufi Gel hard e Tokuso Rebase Fast contêm alta percentagem do agente de ligação cruzada 1,6-hexanediol dimetacrilato. Assim, as estruturas poliméricas resultantes do Kooliner e do New Truliner podem apresentar configuração tal que a difusão das moléculas de monômero residual através desses materiais seja facilitada. De maneira oposta, para as resinas Ufi Gel hard e Tokuso Rebase Fast os monômeros que não reagiram provavelmente ficaram retidos nas estruturas poliméricas mais densas, com alta taxa de ligação cruzada, e sua liberação em saliva foi restrita²⁶. Arima et al.⁸ demonstraram uma forte correlação entre um aumento na concentração de agentes de ligação cruzada e uma solubilidade reduzida dos polímeros à base de polietil metacrilatos. A solubilidade dos polímeros é relacionada com a liberação de constituintes que podem ser extraídos, tais como monômeros residuais, plastificantes e iniciadores da reação⁸.

Apesar da similaridade nas composições e proporções pó/líquido (Tabela 1 – Capítulo 3), o material Kooliner liberou mais isobutil metacrilato que a resina para reembasamento New Truliner. Uma possível explicação foi relacionada a uma estrutura mais porosa da resina Kooliner que a da resina New Truliner favorecendo, dessa forma, a eluição do isobutil metacrilato¹⁰¹. Entretanto, outros estudos são necessários para se confirmar essa hipótese.

Os valores mais baixos de dibutil-*n*-ftalato liberados a partir da resina para reembasamento imediato New Truliner em comparação a outros materiais protéticos, tais como resinas resilientes para reembasamento de próteses, os condicionadores de tecidos e as resinas para restaurações temporárias é a

diferença na estrutura polimérica⁵⁴. Os materiais resilientes são geralmente constituídos por polietil metacrilato ou por um co-polímero de etil metacrilato que é plastificado na presença de uma mistura de álcool e plastificante (éster), produzindo um entrelaçamento de cadeias poliméricas e a formação de um gel³⁴. Para a resina de reembasamento New Truliner, uma estrutura mais complexa é formada durante a reação de polimerização quimicamente induzida e a matriz resinosa resultante pode ter diminuído a difusão das moléculas de plastificante a partir desse material.

4.2.4 Quantidade de compostos residuais

As quantidades de 1,6-hexanediol dimetacrilato e de dibutil-*n*-ftalato liberadas pelas resinas acrílicas para reembasamento também foram relacionadas com seu conteúdo inicial. Os resultados demonstraram que a quantidade de 1,6-hexanediol dimetacrilato liberada a partir do Ufi Gel hard foi maior que aquela liberada pelo material Tokuso Rebase Fast (Figura 2b – Capítulo 3 e Apêndice 5). Esse resultado foi relacionado ao maior conteúdo de monômero residual demonstrado pela resina Ufi Gel hard em estudo prévio⁹⁹.

Em contraste com as quantidades relativamente grandes de monômero isobutil metacrilato, o plastificante dibutil-*n*-ftalato foi liberado do material New Truliner em pequenas quantidades. Embora não possam ser diretamente comparados, devido às diferenças na metodologia, esses resultados são concordantes com a determinação qualitativa e quantitativa de compostos ftálicos e não-ftálicos liberados de resinas termopolimerizáveis⁹². Tem sido observado que os materiais resilientes para reembasamento de próteses, os condicionadores de tecidos e as resinas para restaurações temporárias liberam níveis consideravelmente altos de plastificantes após imersão em água ou saliva^{34,52,54,73}. Esse comportamento é esperado, tendo em vista que o conteúdo de plastificante é particularmente alto nesses materiais protéticos^{34,52,54,73}. Por outro lado, a quantidade de plastificante adicionada à resina para reembasamento New Truliner é de somente 8%⁷. Dessa forma, o baixo nível de liberação de dibutil-*n*-

ftalato a partir do New Truliner foi associado ao baixo conteúdo de plastificante presente no líquido desse material.

4.2.5 Tamanho da molécula

A maior liberação de isobutil metacrilato a partir dos materiais Kooliner e New Truliner em relação à liberação de 1,6-hexanediol dimetacrilato pelos materiais Ufi Gel hard e Tokuso Rebase Fast foi relacionada ao menor tamanho e baixo peso molecular^{26,52} do monômero isobutil metacrilato (Figura 2a – Capítulo 3). Monômeros de pequeno tamanho apresentam maior mobilidade dentro da matriz polimérica e podem ser liberados em maior quantidade que os monômeros com tamanhos maiores. Da mesma forma, monômeros com baixo peso molecular são mais susceptíveis à eluição a partir da matriz polimérica que os compostos com alto peso molecular⁵². Ao contrário, o maior tamanho e peso molecular mais alto do 1,6-hexanediol dimetacrilato (Figura 2c – Capítulo 3) podem ter diminuído sua difusão através da estrutura polimérica dos materiais Ufi Gel hard e Tokuso Rebase Fast^{26,52}.

4.2.6 Tempo de imersão

Da mesma forma que em investigações prévias^{26,92}, o efeito do tempo no mecanismo de eluição foi observado no presente estudo, considerando-se que as concentrações de monômeros residuais liberadas de todos os materiais diminuíram significativamente com o tempo. Para os corpos-de-prova do grupo controle dos materiais Kooliner e New Truliner, a liberação de isobutil metacrilato foi rápida durante os períodos iniciais de imersão em saliva artificial¹⁰¹ e a maior parte do monômero passível de ser extraído foi liberado em 5 horas. Embora diferenças significativas não tenham sido observadas entre os períodos de imersão de até 24 horas para os materiais Ufi Gel hard e Tokuso Rebase Fast, a quantidade de 1,6-hexanediol dimetacrilato liberada a partir dessas resinas reembasadoras reduziu significativamente após esse tempo de imersão e a eluição pareceu ter sido completada em poucos dias⁵⁷.

A redução dos monômeros residuais foi relacionada não somente a difusão⁶¹ a partir da matriz polimérica para a saliva artificial, como também ao mecanismo de degradação química²⁷. O metil metacrilato remanescente no material polimerizado pode ser degradado quando em soluções aquosas por meio de oxidação causada pelo oxigênio⁸⁴ e por reações hidrolíticas²⁷, resultando na formação de produtos de degradação, como o formaldeído e o ácido metacrílico^{57,84}. Alguns desses produtos de degradação têm sido identificados como citotóxicos em concentrações bem menores que às observadas para o monômero residual⁹⁶. A possibilidade de efeitos biológicos, desencadeados por produtos de degradação, constitui fator preocupante e, dessa forma, torna-se importante identificar esses produtos assim como a capacidade de serem liberados a partir de resinas para reembasamento imediato²⁷.

4.3 Fatores relacionados aos resultados de liberação de produtos de degradação

Sabe-se que todos os polímeros podem se degradar através de oxidação, ataque dos grupos funcionais e cisão de cadeias²⁷ e essa degradação pode causar o aparecimento de componentes livres ou produtos de reação quimicamente alterados⁸¹. Estudos têm demonstrado que além do monômero residual e do plastificante, diversos produtos de degradação podem ser identificados e quantificados a partir da liberação de resinas acrílicas, tais como ácido metacrílico^{56,57,92}, ácido benzóico^{56,57}, formaldeído^{84,95-97}, fenil salicilato^{67,69}, fenil benzoato, bifênil⁶⁷⁻⁶⁹ e 2-hidroxi-4-metoxi-benzofenona⁶⁷. No presente estudo, os produtos de degradação, ácidos metacrílico e benzóico, foram liberados de todas as resinas para reembasamento e foram quantificados utilizando CLAE.

4.3.1 Tempo de imersão

Estudos prévios demonstraram que os valores de monômero residual diminuem com o aumento do tempo^{11,61,92}. Se um dos mecanismos envolvidos na redução dos metacrilatos residuais é sua hidrólise em ácido metacrílico, um aumento na quantidade de ácido metacrílico com o aumento do tempo poderia ser esperado⁵⁷. Entretanto, para a liberação de ácido metacrílico, o

efeito associado ao tempo de imersão não foi observado. Na realidade, a concentração liberada a partir das amostras do grupo controle do material Ufi Gel hard diminuiu significativamente na terceira hora de imersão em saliva artificial e, para os outros materiais reembasadores, não foram observadas diferenças significantes em todos os períodos de imersão (Apêndice 6). Uma grande variação entre a concentração mínima e máxima de ácido metacrílico liberada a partir de todos os materiais também foi observada (Apêndice 6). Uma possível explicação para esses resultados pode ser o fato de que o ácido metacrílico é instável e pode polimerizar⁷². Além disso, o ácido metacrílico é classificado como um composto altamente biodegradável. Este produto de degradação pode ser oxidado a CO₂ e H₂O e uma pequena parte degrada-se em metilmelonato, succinato e, possivelmente, β-hidroxi-isobutirato¹⁹ ou é rapidamente convertido a ácido pirúvico. Dessa forma, as alterações nas concentrações de ácido metacrílico observadas no presente estudo podem ser devidas aos mecanismos de polimerização e degradação deste composto instável.

Para todos os materiais, os resultados demonstraram uma rápida liberação de ácido benzóico durante as primeiras cinco horas de imersão. A liberação deste composto aumentou no primeiro dia de imersão e então diminuiu gradualmente durante o período de monitoramento (Apêndice 6). De acordo com os Dados de Segurança do Material (MSDS) fornecidos pelo fabricante do ácido benzóico (Mallinckrodt Chemicals J.T. Baker, Phillipsburg, NJ, EUA), é esperado que este composto biodegrade-se rapidamente, demonstrando uma meia vida entre 1 a 10 dias quando liberado em água ou em uma solução aquosa como a saliva artificial utilizada no presente estudo. Este fato associado com a difusão a partir das resinas para reembasamento para saliva artificial pode explicar a diminuição da quantidade deste produto de degradação com o tempo.

4.3.2 Composição

Diferenças na quantidade de ácido metacrílico liberado a partir das resinas para reembasamento imediato foram observadas na primeira hora e no primeiro dia de imersão em saliva artificial. O ácido metacrílico é provavelmente

formado por hidrólise^{22,27,57} ou esterificação dos grupos metacrilatos (Figura 5 – Capítulo 4). Apesar dos resultados de um estudo prévio⁹⁹ terem demonstrado que o material Ufi Gel hard apresenta um conteúdo de monômero residual mais baixo que as demais resinas acrílicas para reembasamento imediato avaliadas, no presente estudo este material liberou quantidades significativamente maiores de ácido metacrílico que os outros materiais na primeira hora de imersão (Apêndice 6). A estereoquímica do monômero 1,6-hexanediol dimetacrilato pode explicar este resultado. Esta molécula apresenta dois grupos metacrilatos, dessa forma, duas moléculas de ácido metacrílico podem ser formadas por hidrólise (Figura 5 – Capítulo 4).

Apesar da composição do líquido do material Tokuso Rebase Fast também apresentar o monômero bifuncional 1,6-hexanediol dimetacrilato, este material liberou menos ácido metacrílico em comparação com os outros materiais, incluindo o Ufi Gel hard (Apêndice 6). Duas razões poderiam explicar este resultado. Primeiramente, este resultado pode ser devido a uma maior densidade de ligação cruzada da matriz polimérica do material Tokuso Rebase Fast, que poderia dificultar a liberação de compostos residuais^{26,54}; além disso, uma estrutura mais porosa do Ufi Gel hard poderia ter facilitado a difusão do ácido metacrílico¹⁰¹. Entretanto, outros estudos são necessários para confirmar essas hipóteses.

Foi observado que as resinas New Truliner e Kooliner apresentaram uma maior liberação de ácido benzóico que os materiais Ufi Gel hard e Tokuso Rebase Fast durante o período inicial de imersão (Apêndice 6). O ácido benzóico é um produto de decomposição do peróxido de benzoíla utilizado como iniciador da reação de polimerização^{1,57}. Apesar da alta proporção pó/líquido e, conseqüentemente, da alta proporção peróxido de benzoíla/amina terciária das resinas Ufi Gel hard e Tokuso Rebase Fast, estes materiais liberaram uma menor quantidade de ácido benzóico que os materiais Kooliner e New Truliner. Estes resultados foram relacionados com a formulação química das resinas para reembasamento (Tabela 1 – Capítulo 4). As resinas Ufi Gel hard e Tokuso Rebase Fast apresentam o monômero 1,6-hexanediol dimetacrilato,

enquanto os materiais Kooliner e New Truliner apresentam o monômero isobutil metacrilato na composição de seu líquido. A utilização de dimetacrilatos como o 1,6-hexanediol dimetacrilato pode melhorar a reação de polimerização pelo aumento da reatividade do segundo grupo metacrilato⁸⁷ e, assim, menor quantidade de compostos residuais pode ser encontrada. Além disso, os resultados demonstraram que o material Tokuso Rebase Fast liberou a menor quantidade de ácido benzóico, independentemente da condição experimental. Este material também contém o monômero β -metacrilóil oxietil propionato⁸ em sua composição. Provavelmente após o período de iniciação, a presença deste monômero bifuncional juntamente com o monômero 1,6-hexanediol dimetacrilato pode ter resultado em uma polimerização mais completa. Este resultado está em acordo com aqueles obtidos em um estudo prévio, no qual o material Tokuso Rebase Fast também apresentou o menor conteúdo de monômero residual em relação às outras resinas para reembasamento avaliadas⁹⁹. Deste modo, é provável que a reatividade do monômero desempenhe um papel mais importante na otimização da reação de polimerização e/ou no consumo de peróxido de benzoíla que a proporção pó/líquido do material.

4.3.3 Quantidade de compostos residuais

A maior liberação de ácido metacrílico a partir da resina Kooliner no primeiro dia de imersão (Apêndice 6) pode ser relacionada ao seu maior conteúdo de monômero residual. Os resultados de um estudo prévio⁹⁹ suportam esta hipótese, uma vez que a resina Kooliner demonstrou conteúdo de monômero residual significativamente maior que os outros materiais avaliados.

4.4 Fatores relacionados aos resultados de peso molecular

4.4.1 Quantidade de cadeias poliméricas com pesos moleculares inferiores a 10^5

Tem sido demonstrado que a presença de cadeias com pesos moleculares inferiores a 10^5 pode apresentar um efeito plastificante e, assim,

enfraquecer o polímero⁵. De acordo com Ruyter, Svendsen⁸⁷, a resistência do polímero aumenta à medida que o peso molecular também aumenta. Entretanto, para as resinas com composição à base de metil metacrilato a resistência torna-se praticamente constante em pesos moleculares superiores a $6,0 \times 10^5$. A Figura 2 (A e B – Capítulo 1) mostra que, em comparação com as resinas para reembasamento imediato, o pó da resina Lucitone 550 contém quantidade significativamente maior de cadeias poliméricas com pesos moleculares inferiores a 10^5 . A Figura 3 (Capítulo 1) comprova esse resultado, demonstrando que a diferença entre o pó da resina para base de prótese e o das resinas para reembasamento imediato é mais pronunciada em pesos moleculares inferiores a 10^5 . Entre as resinas para reembasamento testadas, a Ufi Gel hard apresentou maior concentração de cadeias com peso molecular maior que 10^5 , quando comparada com a resina Lucitone 550. Isso é demonstrado na Figura 3 (Capítulo 1), onde a curva CBDF do material Ufi Gel hard está posicionada mais distante da linha do zero. Esses resultados indicam que as pérolas do pré-polímero das resinas para reembasamento imediato polimerizadas por suspensão atingem um grau de polimerização maior que as pérolas da resina para base de prótese. Apesar disso, os valores de $\overline{M}_w$ de todos os pós originais, incluindo o do material Lucitone 550, foram maiores que o limite de 10^5 (Tabela 3 – Capítulo 1), no qual o entrelaçamento das cadeias ocorre⁵¹, e apresentaram-se numa faixa de variação na qual as propriedades dos polímeros apresentam-se independentes do peso molecular⁷¹. Dessa forma, é provável que o peso molecular dos pós terá pouca influência nas propriedades mecânicas dos materiais polimerizados.

4.4.2 Quantidade de cadeias poliméricas com pesos moleculares superiores a 10^6

Grandes quantidades de cadeias poliméricas com peso molecular superior a 10^6 também foram observadas para os materiais Ufi Gel hard e Tokuso Rebase Fast. Além da resistência, a propriedade de escoamento das resinas à base de metil metacrilato pode ser regulada pelo peso molecular do pré-polímero (pó)⁷⁶, principalmente pelo aumento da fração de moléculas com pesos

moleculares superiores a 10^6 , como foi observado para os materiais Ufi Gel hard e Tokuso Rebase Fast. A Tabela 1 (Capítulo 1) mostra que os fabricantes das resinas para reembasamento imediato também têm adicionado monômeros com pesos moleculares superiores ao do metil metacrilato (100,12), tais como isobutil metacrilato (142,20) e 1,6-hexanediol dimetacrilato (254,33). Para as resinas para reembasamento compostas por pré-polímeros e monômeros de alto peso molecular, o tempo de trabalho é diminuído devido ao aumento na viscosidade do material. Uma avaliação clínica de algumas resinas autopolimerizáveis para reembasamento imediato demonstrou que os tempos de trabalho e de polimerização foram significativamente menores para o Tokuso Rebase Fast do que para o Kooliner⁴¹. Além disso, o Kooliner foi considerado insatisfatório em 47% dos casos devido ao seu alto escoamento, que tornou a moldagem de borda particularmente difícil⁴¹. Assim, é provável que as características das misturas do Ufi Gel hard e do Tokuso Rebase Fast possam contribuir para a obtenção de moldagens funcionais satisfatórias dos tecidos de suporte durante o reembasamento. Entretanto, outros estudos deveriam avaliar a influência do escoamento dos materiais na precisão dessa moldagem e na adaptação resultante da base da prótese reembasada.

4.4.3 Distribuição do peso molecular

Sabe-se que a distribuição do peso molecular é mais importante do que a obtenção de um alto valor de peso do peso molecular médio, desde que a quantidade de cadeias poliméricas com pesos moleculares inferiores a 10^5 seja reduzida a um mínimo⁵. As cadeias apresentam o mesmo comprimento e peso quando a proporção $\overline{M}_w/\overline{M}_n$ é igual a 1,0. Entretanto, essa é uma situação ideal, a qual não é possível na prática (Apêndice 1). Valores de polidispersividade de até 5,0 são considerados indicativos de distribuição estreita e entre 5,0 e 20 de distribuição média³⁹. Neste estudo, todos os materiais avaliados apresentaram distribuição de peso molecular estreita e índices de polidispersividade entre 2,1 e 3,6 (Tabela 3 – Capítulo 1). O valor da resina Lucitone 550 apresentou-se em acordo com aquele obtido com uma resina convencional, com agente de ligação

cruzada, polimerizada termicamente em banho de água¹⁷. Além disso, os valores obtidos para os materiais Tokuso Rebase Fast e Kooliner foram similares aos obtidos por Arima et al. (1,8 e 1,7, respectivamente)⁸.

4.4.4 Polimerização

Os resultados deste estudo demonstraram que as amostras polimerizadas do material Kooliner não apresentam valores de peso molecular mais altos que o componente original do seu pó. Estes resultados não estão de acordo com os resultados de Huggett et al.⁴³, que demonstraram que os materiais polimerizados geralmente apresentam valores de peso molecular mais altos que os dos componentes originais dos pós. As Tabelas 3 e 4 (Capítulo 1) apresentam os valores de $\overline{M}_w$ do pó e das amostras polimerizadas do Kooliner, respectivamente. O peso do peso molecular médio do Kooliner polimerizado foi numericamente maior que o de seu pó, porém a diferença não é significativa porque se situa dentro do erro sistemático do método. Essa observação também é evidenciada pela superposição de todas as curvas de distribuição de peso molecular (Figura 4 – Capítulo 1), e pelo desvio calculado em termos da função CBDF ser praticamente zero (Figura 5 – Capítulo 1). Assim, a distribuição do peso molecular atingida durante a polimerização do material Kooliner demonstrou ser similar àquela obtida pelo fabricante durante a polimerização do pó pré-polimérico.

A seguir serão discutidos os resultados dos grupos submetidos aos tratamentos pós-polimerização.

4.5 Efeito sobre as propriedades de grau de conversão, peso molecular e Tg

Quanto ao efeito dos tratamentos pós-polimerização no grau de conversão dos materiais avaliados, foi verificado que somente o material Kooliner apresentou aumento significativo no grau de conversão após o tratamento pós-polimerização por imersão em água aquecida (Tabela 2 e Figura 1 – Capítulo 1 e

Apêndice 2). A redução na intensidade da banda alifática (C=C) na região de 1640 cm^{-1} em relação à carbonílica (C=O) na região de 1720 cm^{-1} é observada quando se compara o espectro do monômero (líquido) com o grupo controle (C), e o controle com o grupo submetido ao tratamento pós-polimerização por imersão em água aquecida (WB). Entretanto, não foi observada nenhuma alteração no peso molecular da resina para reembasamento imediato Kooliner após ter sido submetida aos tratamentos pós-polimerização (Tabela 4, Figuras 4 e 5 – Capítulo 1).

Durante os tratamentos pós-polimerização, o aquecimento das amostras proporciona um aumento na mobilidade das moléculas de monômero residual, as quais se encontram estacionárias na massa polimérica, aumentando seu grau de conversão⁹¹. Como resultado, a T_g aumenta e o coeficiente de expansão térmica diminui⁹¹. Em geral, à medida que as ligações cruzadas aumentam, os efeitos de um determinado tratamento térmico se tornam menos pronunciados, devido à diminuição da capacidade térmica configuracional e às limitações impostas pelas ligações cruzadas à movimentação das cadeias poliméricas⁴. Dessa forma, o aumento na T_g observado para a resina para reembasamento Kooliner após os tratamentos pós-polimerização (Apêndice 3) poderia ser atribuído ao fato de que o líquido deste material não contém agente de ligação cruzada⁸. Uma outra possível explicação poderia ser a eficiência da conversão inicial. Tem sido demonstrado que a magnitude da pós-polimerização irá depender dessa eficiência⁴⁶, de tal forma que um material com conversão inicial baixa provavelmente irá apresentar uma reação de polimerização complementar mais acentuada. Em estudo anteriormente realizado, o alto nível de monômero residual observado para o material Kooliner, quando avaliado nas mesmas condições utilizadas na presente investigação, proporciona suporte a essa hipótese⁹⁹.

Embora os dois tratamentos avaliados tenham aumentado a T_g do material Kooliner, o efeito da irradiação por microondas foi mais acentuado que o do tratamento por imersão em água aquecida (Apêndice 3). Durante essa irradiação, as moléculas de monômero são movimentadas por um campo

eletromagnético de alta frequência e esses movimentos resultam em aquecimento interno²³. Assim, podemos supor que o nível de calor gerado dentro da resina pela irradiação com microondas foi mais alto que aquele proporcionado pela imersão em água aquecida, aumentando, dessa forma, a mobilidade das moléculas de monômero residual. Entretanto, deve ser enfatizado que o aumento da temperatura dos materiais avaliados durante os tratamentos pós-polimerização não foi mensurado no presente estudo e ainda necessita ser investigado.

4.6 Efeito sobre a liberação de compostos residuais

O tratamento pós-polimerização por imersão em água aquecida produziu uma redução significativa no tempo necessário para a completa eluição e na quantidade de compostos liberados a partir das resinas reembasadoras para a saliva artificial (Apêndice 5). Tem sido demonstrado que a liberação de compostos residuais é um processo que depende da temperatura e, dessa forma, aumentando-se a temperatura aumenta-se a difusão¹⁰¹. Assim, o calor presente no tratamento pós-polimerização deve ter facilitado a difusão do monômero residual das resinas para a saliva artificial^{61,96}. Um mecanismo alternativo envolve reação de polimerização continuada do monômero residual nos locais ativos ainda presentes após a polimerização inicial⁶¹. Em temperaturas mais altas, a constante de propagação e o coeficiente de difusão aumentam favorecendo, desse modo, uma conversão mais rápida do monômero remanescente⁶. Como relatado anteriormente, a redução dos monômeros residuais também pode ter sido causada pela degradação dos metacrilatos através de oxidação ou hidrólise^{27,84}.

O tratamento pós-polimerização por imersão em água aquecida não reduziu significativamente a liberação de ácido metacrílico, com exceção do material Ufi Gel hard na primeira e na terceira horas de imersão (Apêndice 6). Como discutido anteriormente, é difícil prever a liberação do ácido metacrílico. Entretanto, os resultados demonstraram que concentrações de ácido metacrílico foram mensuradas após 30 dias de imersão em saliva artificial, indicando que a liberação de ácido metacrílico a partir das amostras tratadas consiste em um mecanismo lento (Apêndice 6).

Diferentemente do ácido metacrílico, o tratamento pós-polimerização por imersão em água aquecida causou uma redução significativa na liberação de ácido benzóico (Apêndice 6). Particularmente para o ácido benzóico, a velocidade de extração foi diretamente dependente da temperatura: quanto maior a temperatura, maior a velocidade de extração⁹². Além disso, os Dados de Segurança do Material (MSDS) menciona que o ácido benzóico se decompõe em vapores tóxicos e gases, tais como fenol, benzeno e monóxido de carbono quando aquecido. Deste modo, a diminuição da liberação de ácido benzóico pode ser relacionada com o aquecimento das resinas acrílicas durante o tratamento pós-polimerização, o qual, possivelmente, aumentou a difusão e acelerou a biodegradação deste composto.

Para finalizar a discussão, serão apresentados alguns aspectos considerados importantes sobre o método utilizado para a análise de grau de conversão e a citotoxicidade dos compostos residuais avaliados. Essas considerações discutem as limitações do estudo e apontam os estudos futuros que ainda são necessários.

4.7 Considerações sobre a análise de grau de conversão por FT-Raman

Diferentemente dos outros materiais, a comparação dos resultados do presente estudo com aqueles da investigação prévia⁹⁹ demonstraram que para a resina para reembasamento Kooliner a relação inversa entre grau de conversão e conteúdo de monômero residual não foi observada. A Tabela 2 (Capítulo 1) mostra que o grau de conversão do material Kooliner não diferiu daquele observado para o material Tokuso Rebase Fast e foi significativamente maior que o do material Ufi Gel hard, em todos os grupos avaliados. Em contraste, foi verificado previamente que o conteúdo de monômero residual do material Kooliner foi significativamente maior que aqueles das resinas para reembasamento Ufi Gel hard e Tokuso Rebase Fast⁹⁹.

A diferença nos resultados entre os dois estudos poderia ser relacionada tanto à composição dos materiais como aos métodos analíticos utilizados em cada estudo. As resinas Ufi Gel hard e Tokuso Rebase Fast contêm um monômero dimetacrilato, enquanto o líquido do Kooliner contém o monômero monofuncional isobutil metacrilato (Tabela 1 – Capítulo 1). À medida que a reação de polimerização ocorre, a estruturação da matriz polimérica diminui a mobilidade dos monômeros resultando em duplas ligações que não reagiram. Parte dessas ligações permanece como monômeros que podem ser liberados a partir da resina polimerizada. Outra parte dos monômeros dimetacrilatos reage somente em uma das duplas ligações, resultando em grupos pendentes, os quais permanecem unidos à estrutura polimérica e não estarão disponíveis para liberação⁹⁸. Enquanto a espectroscopia Raman detecta todas as duplas ligações que não reagiram no polímero, incluindo os grupos pendentes e aqueles passíveis de serem extraídos, a análise em CLAE (Apêndice 4) é realizada por meio da extração do monômero livre a partir do material polimerizado⁹⁹. Outros pesquisadores também já relataram que somente uma fração das duplas ligações que não reagiram pode ser extraída da matriz polimérica na forma de monômero residual^{26,98}. Esses fatos ajudam a explicar porque os níveis de monômero residual do Ufi Gel hard e do Tokuso Rebase Fast foram mais baixos que o do Kooliner, ainda que todos tenham apresentado graus de conversão bastante similares.

Outra possível explicação para as diferenças entre este estudo e aquele previamente realizado⁹⁹ poderia ser o fato de que em CLAE (Apêndice 4), o monômero residual é extraído de toda a matriz polimérica do corpo-de-prova. Entretanto, a espectroscopia Raman é essencialmente uma técnica analítica superficial, uma vez que o espectro revela a absorção na região representativa dos 5 μm superiores do corpo-de-prova⁸⁷. Para validar essa hipótese, no entanto, análises com espectroscopia Raman deveriam ser realizadas em diferentes níveis de profundidade nos corpos-de-prova das resinas para reembasamento.

Os resultados do efeito dos tratamentos pós-polimerização sobre o grau de conversão também diferem do estudo prévio⁹⁹, no qual os dois tratamentos pós-polimerização proporcionaram redução significativa no conteúdo

de monômero residual dos materiais Kooliner, Ufi Gel hard e Tokuso Rebase Fast. A resina para base de prótese Lucitone 550 polimerizada utilizando-se o ciclo curto de polimerização também mostrou diminuição significativa no monômero residual após ter sido imersa em água aquecida. As diferenças entre os dois estudos podem ser parcialmente explicadas pelos efeitos que os tratamentos pós-polimerização apresentam sobre a matriz polimérica. Durante esses tratamentos, mecanismos como difusão em água^{61,101}, hidrólise⁵⁷, reação de polimerização continuada^{17,61} e volatilização do monômero¹⁰ podem reduzir significativamente o monômero livre que não reagiu, mas não necessariamente têm efeito sobre as ligações pendentes, que podem permanecer inalteradas na matriz polimérica. Assim, parece correto supor que os mecanismos envolvidos nos tratamentos pós-polimerização foram detectados mais efetivamente quando se utilizou CLAE do que quando se utilizou a espectroscopia Raman.

4.8 Considerações sobre a citotoxicidade dos compostos residuais avaliados

O mecanismo de ação dos monômeros nas células é relativamente não específico e provavelmente mediado pela membrana celular²⁴. A atividade hemolítica e a citotoxicidade de um composto têm sido relacionadas com sua lipofilicidade³⁰. De acordo com Fujisawa et al.³⁰, um composto que apresenta uma cadeia alquílica grande pode ter alta lipofilicidade (um tempo de retenção maior nos cromatogramas de CLAE) e também demonstrar alta citotoxicidade. Em estudo prévio, uma resposta inibitória significativa na proliferação celular produzida por eluatos do material Ufi Gel hard foi observada²⁰. Um outro estudo demonstrou que os líquidos de todos os materiais reembasadores avaliados tiveram efeito citotóxico sobre fibroblastos gengivais e células do ligamento periodontal de maneira dependente da dose, e o líquido do material Tokuso Rebase pareceu ser o mais citotóxico⁵⁹. Aproximadamente 50% da viabilidade celular foi afetada quando 0,2% de líquido do Kooliner ou 0,05% de líquido do Tokuso Rebase foi utilizado⁵⁹. Assim, ainda que a quantidade de 1,6-hexanediol dimetacrilato liberada dos materiais Ufi Gel hard e Tokuso Rebase Fast tenha sido menor que a de isobutil metacrilato liberada das resinas Kooliner e New Truliner,

o potencial de efeitos biológicos do primeiro monômero poderia ser mais acentuado que o do último. Entretanto, testes de citotoxicidade são necessários para se determinar se os monômeros residuais nas concentrações observadas na presente investigação induzem respostas citotóxicas.

Os mecanismos pelos quais os ésteres ftalatos afetam a saúde humana são pouco conhecidos e não está claro se eles podem ser considerados disruptores endócrinos químicos (EDC)⁵⁴. Os ftalatos dialquílicos têm sido apontados como xenoestrógenos, os quais podem competir com o estrógeno natural por meio de ligação com seu receptor⁷⁷. Como resultado, tumores hormonais, desordens genitais e ação tóxica em baixas dosagens durante certos períodos de desenvolvimento fetal têm sido relatados²¹. Wine et al.¹⁰⁴ descreveram o nível mais baixo causador de efeito adverso (LOAEL) para o dibutil-*n*-ftalato como sendo de 52 mg/kg. Uma margem mínima de segurança (MOS) de 1/80 do nível LOAEL acima descrito (i.e. 0.65 mg/kg) foi proposta por Hansen et al.³⁷. Se esse valor MOS estiver correto, então os profissionais devem evitar utilizar materiais que contêm ésteres ftalatos, especialmente quando estiverem tratando mulheres em idade fértil⁷³. No presente estudo, a quantidade de dibutil-*n*-ftalato liberada do material New Truliner foi bem inferior ao nível LOAEL (0,450 µg/mL).

Da mesma forma que o monômero residual apresenta um potencial citotóxico, outras substâncias que são liberadas a partir das resinas acrílicas podem inibir o crescimento celular e quebrar vários processos metabólicos⁸⁸. Resultados de um estudo prévio²⁰ demonstraram que a resina Ufi Gel hard aumentou a atividade mitocondrial. Esta estimulação da atividade celular pode refletir uma resposta compensatória da atividade enzimática celular à toxicidade associada à resina⁶³. Além disso, Campanha et al.²⁰ observaram um aumento de citotoxicidade de algumas resinas para reembasamento mesmo após terem sido submetidas ao tratamento pós-polimerização por imersão em água aquecida²⁰. Outro estudo prévio⁹⁹ também demonstrou que o tratamento pós-polimerização por imersão em água aquecida reduziu significativamente o conteúdo de monômero residual das resinas acrílicas para reembasamento imediato. Campanha

et al.²⁰ também especularam que a citotoxicidade observada pode ser relacionada à liberação de outros componentes, tais como aditivos, subprodutos da reação de polimerização radicalar, produtos de degradação, impurezas e produtos formados a partir da decomposição do peróxido de benzoíla⁶⁹. Assim, outros ensaios de citotoxicidade são necessários para determinar se as concentrações encontradas no presente estudo para os ácidos metacrílico e benzóico podem induzir respostas citotóxicas.

5 Conclusão

1. Em todos os grupos avaliados, as amostras de Lucitone 550 polimerizadas utilizando o ciclo curto de polimerização apresentaram valores mais altos de grau de conversão que aquelas polimerizadas utilizando o ciclo longo de polimerização;
2. O grau de conversão do material Ufi Gel hard foi semelhante ao da resina Lucitone 550, polimerizada pelo ciclo longo de polimerização, e foi menor que o grau de conversão dos outros materiais avaliados;
3. O tratamento térmico por imersão em água aquecida aumentou o grau de conversão do material Kooliner;
4. As partículas pré-polimerizadas de todos os materiais demonstraram pesos moleculares médios superiores a 10^5 e distribuições estreitas de peso molecular;
5. As partículas pré-polimerizadas do material Kooliner e as amostras deste material após polimerização e após serem submetidas aos tratamentos pós-polimerização demonstraram valores semelhantes de peso molecular;
6. As resinas Tokuso Rebase Fast e Ufi Gel hard demonstraram valores comparáveis de transição vítrea, os quais foram significativamente superiores aos demonstrados pelos materiais New Truliner, Duraliner II e Kooliner;
7. O ciclo de polimerização influenciou significativamente a T_g da resina para base de prótese Lucitone 550, uma vez que o ciclo longo de polimerização resultou em valores de transição mais baixos que o ciclo curto de polimerização com o período final em ebulição;
8. Ambos os tratamentos pós-polimerização promoveram um aumento significativo na T_g da resina Kooliner, sendo que o tratamento por irradiação por energia de microondas proporcionou o maior aumento nos valores de transição;

9. A resina para reembasamento Kooliner apresentou maior liberação de IBMA que a resina New Truliner e a resina Ufi Gel hard demonstrou maior liberação de 1,6-HDMA que a resina Tokuso Rebase Fast;
10. O tratamento pós-polimerização por imersão em água aquecida reduziu significativamente a liberação de IBMA a partir dos materiais Kooliner e New Truliner e a liberação de DBNP a partir da resina New Truliner;
11. O tratamento por imersão em água aquecida pode ser utilizado para reduzir tanto a concentração como o tempo de liberação de compostos residuais a partir das resinas acrílicas para reembasamento imediato avaliadas neste estudo;
12. A liberação dos produtos de degradação MA e BA em saliva artificial foi detectada a partir de todos os materiais reembasadores;
13. A concentração mais alta de MA foi liberada a partir das amostras do grupo controle do material Ufi Gel hard;
14. Para as amostras de todos os materiais no grupo controle, a liberação de BA diminuiu durante todo o período de avaliação;
15. Independentemente da condição experimental, o material Tokuso Rebase Fast liberou menos BA que os outros materiais reembasadores;
16. O tratamento por imersão em água aquecida não reduziu a concentração de MA liberada a partir dos materiais reembasadores, mas proporcionou uma redução significativa na liberação de BA.

6 Referências*

1. Al Doori D, Huggett R, Bates JF, Brooks SC. A comparison of denture base acrylic resins polymerised by microwave irradiation and by conventional water bath curing systems. *Dent Mater*. 1988; 4: 25-32.
2. Ali A, Reynolds AJ, Walker DM. The burning mouth sensation related to the wearing of acrylic dentures: an investigation. *Br Dent J*. 1986; 161: 444-7.
3. Aloul RK, Shen C. The influence of plasticizer loss on the viscoelasticity of temporary soft liners. *J Prosthodont*. 2002; 11: 254-62.
4. Alves NM, Ribelles JLG, Mano JF. Enthalpy relaxation studies in polymethyl methacrylate networks with different crosslinking degrees. *Polymer*. 2005; 46: 491-504.
5. Anderson JN. *Applied dental materials*. Oxford: Blackwell Scientific Publications; 1976.
6. Araújo PHH, Sayer C, Poço JGR, Giudici R. Techniques for reducing residual monomer content in polymers: a review. *Polym Eng Sci*. 2002; 42: 1442-68.
7. Arima T, Murata H, Hamada T. Properties of highly cross-linked autopolymerizing reline acrylic resin. *J Prosthet Dent*. 1995; 73: 55-9.
8. Arima T, Murata H, Hamada T. Analysis of composition and structure of hard autopolymerizing reline resins. *J Oral Rehabil*. 1996; 23: 346-52.

* De acordo com estilo Vancouver.

Disponível no site: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

9. Azevedo A, Machado, AL, Giampaolo, ET, Pavarina, AC, Vergani, CE. The effect of water immersion on the shear bond strength between chair-side reline and denture base acrylic resins. J Prosthodont. 2006. *Manuscript ID JOPR-05-099. Awaiting proof.*
10. Bagis YH, Rueggeberg FA. The effect of post-cure heating on residual, unreacted monomer in a commercial resin composite. Dent Mater. 2000; 16: 244-7.
11. Baker S, Brooks SC, Walker DM. The release of residual monomeric methylmethacrylate from acrylic appliances in the human mouth: an assay for monomer in saliva. J Dent Res. 1988; 67: 1295-9.
12. Barclay SC, Forsyth A, Felix DH, Watson IB. Case report – hypersensitivity to denture materials. Br Dent J. 1999; 187: 350-2.
13. Barsby MJ, Braden M. Visco-elastic properties of pour (fluid) denture base resins. J Dent Res. 1981; 60: 146-8.
14. Bartoloni JA, Murchison DF, Wofford DT, Sarkar NK. Degree of conversion of denture base materials for varied polymerization techniques. J Oral Rehabil. 2000; 27: 488-93.
15. Beech DR. Molecular weight distribution of denture base acrylic. J Dent. 1975; 3: 19-24.
16. Billmeyer FW. Textbook of polymer science. New York: John Wiley & Sons; 1984.
17. Blagojevic V, Murphy VM. Microwave polymerization of denture base materials. A comparative study. J Oral Rehabil. 1999; 26: 804-8.
18. Bohnenkamp DM. Traumatic stomatitis following an intraoral denture reline: a clinical report. J Prosthet Dent. 1996; 76: 113-4.
19. Bratt H, Hattway DE. Fate of methyl methacrylate in rats. Br J Cancer. 1977; 36: 114-9.
20. Campanha NH, Pavarina AC, Giampaolo ET, Vergani CE, Machado AL, Carlos IZ. Cytotoxicity of hard chairside reline resins: effect of microwave irradiation and water bath postpolymerization treatments. Int J Prosthodont. 2006; 19: 195-201.

21. Chatterjee S, Dutta TK. Metabolism of butyl benzyl phthalate by *Gordonia* sp. strain MTCC 4818. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003; 12: 36-43.
22. Corkill JA, Lloyd EJ, Hoyle P, Crout DHG, Ling RSM, James ML et al. Toxicology of methyl methacrylate: the rate of disappearance of methyl methacrylate in human blood *in vitro*. *Clin Chim Acta*. 1976; 68: 141-6.
23. De Clerck JP. Microwave polymerization of acrylic resins used in dental prostheses. *J Prosthet Dent*. 1987; 57: 650-9.
24. Dillingham EO, Lawrence WH, Autian J, Schmalz G. Acrylate and methacrylate esters: relationship of hemolytic activity and *in vivo* toxicity. *J Biomed Mater Res*. 1983; 17: 945-57.
25. Emami N, Söderholm KJM, Berglung LA. Effect of light power density variations on bulk curing properties of dental composites. *J Dent*. 2003; 31: 189-96.
26. Ferracane JL. Elution of leachable components from composites. *J Oral Rehabil*. 1994; 21: 441-52.
27. Ferracane JL. Hygroscopic and hydrolytic effect in dental polymer networks. *Dent Mater*. 2006; 22: 211-22.
28. Ferracane JL, Greener EH. The effect of resin formulation on the degree of conversion and mechanical properties of dental restorative resins. *J Biomed Mater Res*. 1986; 20: 121-31.
29. Fox TG, Loshaek S. Influence of molecular weight and degree of crosslinking on the specific volume and glass temperature of polymers. *J Polymer Sci*. 1955; 15: 371-90.
30. Fujisawa S, Imai Y, Kojima K, Masuhara E. Studies on hemolytic activity of bisphenol A diglycidyl methacrylate (BIS-GMA). *J Dent Res*. 1978; 57: 98-102.
31. Gawkrödger DJ. Investigation of reactions to dental materials. *Br J Dermatol*. 2005; 153: 479-85.

32. Gonçalves AR, Machado AL, Giampaolo ET, Pavarina AC, Vergani CE. Linear dimensional changes of denture base and hard chair-side reline resins after disinfection. *J Appl Polym Sci*. 2006; 102: 1821-6.
33. Gonçalves TS, Morganti MA, Campos LC, Rizzatto SM, Menezes LM. Allergy to auto-polymerized acrylic resin in an orthodontic patient. *Am J Orthod Dentofacial. Orthop*. 2006; 129: 431-5.
34. Graham BS, Jones DW, Sutow EJ. An *in vivo* and *in vitro* study of the loss of plasticizer from soft polymer gel materials. *J Dent Res*. 1991; 70: 870-3.
35. Graham J, Pruitt L, Ries M, Gundiah N. Fracture and fatigue properties of acrylic bone cement. *J Arthroplasty*. 2000; 15: 1028-35.
36. Haines PJ. Differential thermal analysis and differential scanning calorimetry. In: Haines PJ. *Thermal methods of analysis. Principles, applications and problems*. London: Blackie Academic & Professional; 1995. p. 65-93.
37. Hansen BG, Munn SJ, Allanou R, Berthault F, de Bruijn J, Luotamo M et al. European Union Risk Assessment Report. Dibutyl phthalate, CAS n° 84-74-2. EINECS n° 201-557-4. Luxembourg: Office For Official Publications Of The European Communities; 2003 [with addendum 2004].
38. Harris CA, Henttu P, Parker MG, Sumpter JP. The estrogenic activity of phthalate esters *in vitro*. *Environ Health Perspect*. 1997; 105: 802-11.
39. Harrison A, Magara JB, Huggett R. The effect of variation in powder particle size on the doughing and manipulation times and some mechanical properties of acrylic resin. *Eur J Prosthodont Restor Dent*. 1995; 3: 263-8.
40. Hashimoto Y, Kawaguchi M, Miyazaki K, Nakamura M. Estrogenic activity of tissue conditioners *in vitro*. *Dent Mater*. 2003; 19: 341-6.
41. Haywood J, Basker RM, Watson CJ, Wood DJ. A comparison of three hard chairside denture reline materials. Part I. Clinical evaluation. *Eur J Prosthodont Restor Dent*. 2003; 11: 157-63.

42. Hensten-Pettersen A, Jacobsen N. Perceived side effects of biomaterials in prosthetic dentistry. *J Prosthet Dent.* 1991; 65: 138-44.
43. Huggett R, Bates JF, Packham DE. The effect of the curing cycle upon the molecular weight and properties of denture base materials. *Dent Mater.* 1987; 3: 107-12.
44. Huggett R, Brooks SC, Bates JF. The effect of different curing cycles on levels of residual monomer in acrylic resin denture base materials. *Quintessence Dent Technol.* 1984; 8: 365-71.
45. Huggett R, Brooks SC, Campbell AM, Satguranathan R, Bell GA. Evaluation of analytical techniques for measurement of denture-base acrylic resin glass transition temperature. *Dent Mater.* 1990; 6: 17-9.
46. Jacobsen PH, Darr AH. Static and dynamic moduli of composite restorative materials. *J Oral Rehabil.* 1997; 24: 265-73.
47. Jagger RG, Okdeh A. Thermoforming polymethyl methacrylate. *J Prosthet Dent.* 1995; 74: 542-5.
48. Jerolimov V, Jagger RG, Milward PJ. Effect of the curing cycle on acrylic denture base glass transition temperatures. *J Dent.* 1991; 19: 245-8.
49. Jerolimov V, Krhen J, Besic J. The role of residual monomer in PMMA powder and methods of polymerization in the finding of residual monomer in poly(methylmethacrylate) denture base. *Acta Stomatol Croat.* 1991; 25: 17-23.
50. Jobling S, Reynolds T, White R, Parker MG, Sumpter JP. A variety of environmentally persistent chemicals, including some phthalate plasticizers, are weakly estrogenic. *Environ Health Perspect.* 1995; 103: 582-7.
51. Jones DW, Hall GC, Sutow EJ, Langman MF, Robertson KN. Chemical and molecular weight analyses of prosthodontic soft polymers. *J Dent Res.* 1991; 70: 874-9.

52. Jones DW, Sutow EJ, Hall GC, Tobin WM, Graham BS. Dental soft polymers: plasticizer composition and leachability. *Dent Mater.* 1988; 4: 1-7.
53. Kalachandra S, Turner DT. Water sorption of plasticized denture acrylic lining materials. *Dent Mater.* 1989; 5: 161-4.
54. Kawahara T, Nomura Y, Tanaka N, Teshima W, Okasaki M, Shintani H. Leachability of plasticizer and residual monomer from commercial temporary restorative resins. *J Dent.* 2004; 32: 277-83.
55. Kedjarune U, Charoenworakul N, Koontongkaew S. Release of methyl methacrylate from heat-cured and autopolymerized resins: cytotoxicity testing related to residual monomer. *Aust Dent J.* 1999; 44: 25-30.
56. Koda T, Tsuchiya H, Yamauchi M, Hoshino Y, Takagi N, Kawano J. High-performance liquid chromatographic estimation of eluates from denture base polymers. *J Dent.* 1989; 17: 84-9.
57. Koda T, Tsuchiya H, Yamauchi M, Ohtani S, Takagi N, Kawano J. Leachability of denture base acrylic resins in artificial saliva. *Dent Mater.* 1990; 6: 13-6.
58. Kusy RP, Katz MJ. Effect of molecular weight on the fracture surface energy of poly(methyl methacrylate) in cleavage. *J Mater Sci.* 1976; 11: 1475-86.
59. Lai YL, Chen YT, Lee SY, Shieh TM, Hung SL. Cytotoxic effects of dental resin liquids on primary gingival fibroblasts and periodontal ligament cells in vitro. *J Oral Rehabil.* 2004; 31: 1165-72.
60. Lamb DJ, Ellis B, Priestley D. Loss into water of residual monomer from autopolymerizing dental acrylic resin. *Biomaterials.* 1982; 3: 155-9.
61. Lamb DJ, Ellis B, Priestley D. The effects of process variables on levels of residual monomer in autopolymerizing dental acrylic resin. *J Dent.* 1983; 11: 80-8.

62. Lee S, Lai Y, Hsu T. Influence of polymerization conditions on monomer elution and microhardness of autopolymerized polymethyl methacrylate resin. *Eur J Oral Sci.* 2002; 110: 179-83.
63. Lefebvre CA, Knoernschild KL, Schuster GS. Cytotoxicity of eluates from light-polymerized denture base resins. *J Prosthet Dent.* 1994; 72: 644-50.
64. Leusncher J. Legal requirements for the preclinical toxicological evaluation of biomaterials. *Clin Mater.* 1992; 10: 51-7.
65. Lunder T, Rogl-Butina M. Chronic urticaria from an acrylic dental prosthesis. *Contact Dermatitis.* 2000; 43: 232-3.
66. Lung CY, Darvell BW. Minimization of the inevitable residual monomer in denture base acrylic. *Dent Mater.* 2005; 21: 1119-28.
67. Lygre H, Klepp KN, Solheim E, Gjerdet NR. Leaching of additives and degradation products from cold-cured orthodontic resins. *Acta Odontol Scand.* 1994; 52: 150-6.
68. Lygre H, Solheim E, Gjerdet NR, Berg E. Leaching of organic additives from dentures *in vivo*. *Acta Odontol Scand.* 1993; 51: 45-51.
69. Lygre H, Solheim E, Gjerdet NR. Leaching from denture base materials *in vitro*. *Acta Odontol Scand.* 1995; 53: 75-80.
70. McCabe JF, Wilson HJ. Polymers in dentistry. *J Oral Rehabil.* 1974; 1: 335-51.
71. Martin RJ, Johnson JF, Cooper AR. Mechanical properties of polymers: the influence of molecular weight and molecular weight distribution. *J Macromol Sci Rev Macromol Chem.* 1972; C8: 57-199.
72. Morawetz H, Rubin ID. Polymerization in the crystalline state. III. Methacrylic acid and butadiene-1-carboxylic acid. *J Polym Sci.* 2003; 57: 687-92.
73. Munksgaard EC. Plasticizers in denture soft-lining materials: leaching and biodegradation. *Eur J Oral Sci.* 2005; 113: 166-9.

74. Murata H, Iwanaga H, Shigeto N, Hamada T. Initial flow of tissue conditioners – influence of composition and structure on gelation. *J Oral Rehabil.* 1993; 20: 177-87.
75. Murata H, Hamada T, Taguchi N, Shigeto N, Nikawa H. Viscoelastic properties of tissue conditioners—influence of molecular weight of polymer powders and powder/liquid ratio and the clinical implications. *J Oral Rehabil.* 1998; 25: 621-9.
76. Mutlu G, Huggett R, Harrison A. Factors that affect the rheologic properties of acrylic resin denture base materials. *J Prosthet Dent.* 1994; 71: 186-91.
77. Nakai M, Tabira Y, Asai D, Yakabe Y, Shimyozu T, Noguchi M, Takatsuki M, Shimohigashi Y. Binding characteristics of dialkyl phthalates for the estrogen receptor. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999; 254: 311-4.
78. Phillips RW. Química das resinas sintéticas. In: Phillips RW. *Materiais dentários.* Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1998. p. 125-39.
79. Phoenix RD, Mansueto MA, Ackerman NA, Jones RE. Evaluation of mechanical and thermal properties of commonly used denture base resins. *J Prosthodont.* 2004; 13: 17-27.
80. Reis JM, Vergani CE, Pavarina AC, Giampaolo ET, Machado AL. Effect of relining, water storage and cyclic loading on the flexural strength of a denture base acrylic resin. *J Dent.* 2006; 34: 420-6.
81. Rose EC, Bumann J, Jonas IE, Kappert HF. Contribution to the biological assessment of orthodontic acrylic materials. *J Orofac Orthop.* 2000; 61: 246-57.
82. Rueggeberg FA. Determination of resin cure using infrared analysis without an internal standard. *Dent Mater.* 1994; 10: 282-6.
83. Ruiz-Genao DP, Moreno de Vega MJ, Sanchez Perez J, Garcia-Diez A. Labial edema due to an acrylic dental prosthesis. *Contact Dermatitis.* 2003; 48: 273-4.

84. Ruyter IE. Release of formaldehyde from denture base polymers. *Acta Odontol Scand.* 1980; 38: 17-27.
85. Ruyter IE. Physical and chemical aspects related to substances released from polymer materials in an aqueous environment. *Adv. Dent. Res.* 1995; 9: 344-7.
86. Ruyter IE, Øysaet H. Conversion in denture base polymers. *J Biomed Mater Res.* 1982; 16: 741-54.
87. Ruyter IE, Svendsen SA. Flexural properties of denture base polymers. *J Prosthet Dent.* 1980; 43: 95-104.
88. Schuster GS, Lefebvre CA, Dirksen TR, Knoernschild KL, Caughman GB. Relationships between denture base resin cytotoxicity and cell lipid metabolism. *Int J Prosthodont.* 1995; 8: 580-6.
89. Seo RS, Murata H, Hong G, Vergani CE, Hamada T. Influence of thermal and mechanical stresses on the strength of intact and relined denture bases. *J Prosthet Dent.* 2006; 96: 59-67.
90. Sheridan PJ, Koka S, Ewoldsen NO, Lefebvre CA, Lavin MT. Cytotoxicity of denture base resins. *Int J Prosthodont.* 1997; 10: 73-7.
91. Sideridou I, Achilias DS, Kyrikou E. Thermal expansion characteristics of light-cured dental resins and resin composites. *Biomater.* 2004; 25: 3087-97.
92. Sofou A, Tsoupi I, Emmanouil J, Karayannis M. HPLC determination of residual monomers released from heat-cured acrylic resins. *Anal Bioanal Chem.* 2005; 381: 1336-46.
93. Soldera A, Metatla N. Glass transition phenomena observed in stereoregular PMMAs using molecular modeling. *Compos Part A-Appl S.* 2005; 36: 521-30.
94. Tallgren A. The continuing reduction of the residual alveolar ridges in complete denture wearers: a mixed-longitudinal study covering 25 years (1972). *J Prosthet Dent.* 2003; 89: 427-35.

95. Tsuchiya H, Hoshino Y, Kato H, Takagi N. Flow injection analysis of formaldehyde leached from denture-base acrylic resins. *J Dent.* 1993; 21: 240-3.
96. Tsuchiya H, Hoshino Y, Tajima K, Takagi N. Leaching and cytotoxicity of formaldehyde and methyl metacrylate from acrylic resin denture base materials. *J Prosthet Dent.* 1994; 71: 618-24.
97. Tsuchiya H, Yamada K, Akagiri M, Tajima K, Miyazaki T, Takagi N, et al. Effect of an ultraviolet light-activated coating material on reduction of the leaching of methyl methacrylate and formaldehyde from denture acrylic resins. *Dent Mater J.* 1993; 12: 253-8.
98. Tuusa SMR, Puska MA, Lassila LVJ, Vallittu PK. Residual monomers released from glass-fibre-reinforced composite photopolymerised in contact with bone and blood. *J Mater Sci Mater Med.* 2005; 16: 15-20.
99. Urban VM, Machado AL, Oliveira RV, Vergani CE, Pavarina AC, Cass QB. Residual monomer of relined acrylic resins: effect of water-bath and microwave post-polymerization treatments. *Dent Mater.* [Internet]. 2006 [cited 2006 Apr 15]. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/journal/01095641>.
100. Vallittu PK. The effect of surface treatment of denture acrylic resin on the residual monomer content and its release into water. *Acta Odontol Scand.* 1996; 54: 188-92.
101. Vallittu PK, Miettinen V, Alakuijala P. Residual monomer content and its release into water from denture base materials. *Dent Mater.* 1995; 11: 338-42.
102. Vallittu PK, Ruyter IE, Buykilmaz S. Effect of polymerization temperature and time on the residual monomer content of denture base polymers. *Eur J Oral Sci.* 1998; 106: 588-93.
103. Vergani CE, Seo RS, Pavarina AC, dos Santos Nunes Reis JM. Flexural strength of autopolymerizing denture relined resins with microwave postpolymerization treatment. *J Prosthet Dent.* 2005; 93: 577-83.

- 104 Wine RN, Li LH, Barnes LH, Gulati DK, Chapin RE. Reproductive toxicity of di-n-butylphthalate in a continuous breeding protocol in Sprague-Dawley rats. *Environ Health Perspect.* 1997; 105: 102-7.
- 105 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.* 1994; 21: 641-8.

7 Apêndice

7.1 Apêndice 1

A curva de calibração em GPC (Apêndice 1 - Figura A1) representa o $\log$ do peso molecular médio ($\overline{M}_w$) em relação ao tempo de retenção dos padrões de poliestireno nas colunas cromatográficas (Apêndice 1 - Tabela A1). Tendo em vista que o volume de eluição é proporcional ao $\log \overline{M}_w$, a distribuição do peso molecular dos padrões de poliestireno pode ser obtida. A análise do peso molecular e da distribuição do peso molecular em amostras das resinas acrílicas é possível a partir da interpolação dos seus volumes de eluição na equação de reta obtida com a curva de calibração dos padrões de poliestireno.

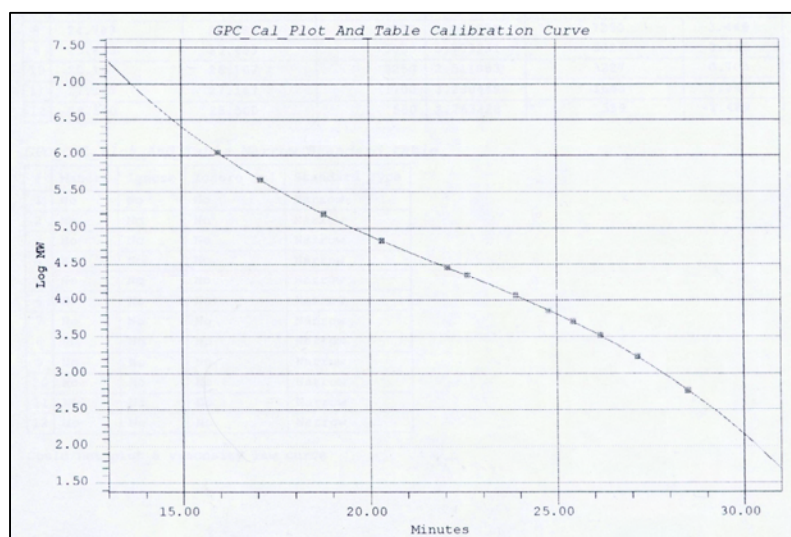


FIGURA A1 – Curva de calibração dos padrões de poliestireno.

Tabela A1 – Resultados obtidos a partir das análises dos padrões de poliestireno (#) em GPC

#	Tempo de retenção	Volume de eluição (mL)	Mw (Daltons)	Log Mw	Peso calculado (Daltons)	% residual
1	16,0	16,0	$0,107 \times 10^7$	6,03	$0,108 \times 10^7$	-1,16
2	17,1	17,1	$0,460 \times 10^6$	5,66	$0,452 \times 10^6$	1,84
3	19,0	19,0	$0,156 \times 10^6$	5,19	$0,156 \times 10^6$	0,265
4	20,3	20,3	$0,660 \times 10^5$	4,82	$0,670 \times 10^5$	-1,54
5	22,1	22,1	$0,285 \times 10^5$	4,45	$0,283 \times 10^5$	0,747
6	22,6	22,6	$0,220 \times 10^5$	4,34	$0,219 \times 10^5$	0,681
7	23,9	23,9	$0,116 \times 10^5$	4,06	$0,116 \times 10^5$	0,362
8	24,8	24,8	$0,700 \times 10^4$	3,85	$0,725 \times 10^4$	-3,45
9	25,4	25,4	$0,505 \times 10^4$	3,70	$0,503 \times 10^4$	0,455
10	26,2	26,2	$0,325 \times 10^4$	3,51	$0,323 \times 10^4$	0,703
11	27,2	27,2	$0,170 \times 10^4$	3,23	$0,166 \times 10^4$	2,74
12	28,5	28,5	$0,580 \times 10^3$	2,76	$0,589 \times 10^3$	-1,49

R = 0,999973

R² = 0,999945

7.2 Apêndice 2

Planejamento experimental para grau de conversão

Para a variável de análise (grau de conversão), dois fatores foram estabelecidos: **material**, em 5 níveis (LS, T, K, LL e U), e **tratamento**, em 3 níveis (C – controle; MW – irradiação por energia de microondas: 550 W/3 min para LS ou LL; 500 W/5 min para T; 550 W/5 min para K e 550 W/4 min para U; WB – imersão em banho de água aquecida a 55°C por 10 min para os materiais reembasadores e por 60 min para o material para base de prótese). O número de corpos-de-prova necessário para cada condição experimental avaliada neste estudo (n=5) foi calculado com base nos resultados obtidos em estudo piloto, resultando em um número total de dados da amostra de 75.

Resultados de grau de conversão

Os valores de grau de conversão obtidos por espectroscopia Raman com transformada de Fourier, para cada material em cada grupo experimental, foram tabulados e analisados (Apêndice 2 - Tabelas A2 a A6).

Tabela A2 – Valores de grau de conversão (%) do material L submetido ao ciclo curto de polimerização (LS) nos três grupos experimentais

Corpo-de-prova	Grupos		
	C	MW	WB
1	94,6	91,0	92,3
2	89,5	80,4	92,9
3	91,5	91,1	90,0
4	90,0	89,1	91,2
5	91,9	91,1	91,9
Média	91,5	88,5	91,7
Desvio padrão	2,01	4,62	1,09

Tabela A3 – Valores de grau de conversão (%) do material T nos três grupos experimentais

Corpo-de-prova	Grupos		
	C	MW	WB
1	83,3	88,2	85,8
2	84,0	90,0	87,9
3	84,8	86,8	88,9
4	82,2	86,0	84,3
5	85,4	92,7	86,2
Média	83,9	88,8	86,6
Desvio padrão	1,25	2,67	1,80

Tabela A4 – Valores de grau de conversão (%) do material K nos três grupos experimentais

Corpo-de-prova	Grupos		
	C	MW	WB
1	84,3	75,3	90,2
2	82,4	88,5	92,5
3	83,8	91,8	86,3
4	72,1	88,5	84,4
5	84,0	87,7	88,7
Média	81,3	86,4	88,4
Desvio padrão	5,18	6,39	3,18

Tabela A5 – Valores de grau de conversão (%) do material L submetido ao ciclo curto de polimerização (LL) nos três grupos experimentais

Corpo-de-prova	Grupos		
	C	MW	WB
1	64,3	78,9	78,2
2	84,6	82,8	75,9
3	79,4	63,3	68,4
4	78,1	79,9	62,1
5	78,1	79,5	80,9
Média	76,9	76,9	73,1
Desvio padrão	7,54	7,74	7,72

Tabela A6 – Valores de grau de conversão (%) do material U nos três grupos experimentais

Corpo-de-prova	Grupos		
	C	MW	WB
1	74,3	71,6	75,4
2	68,9	74,4	68,4
3	70,5	74,8	72,7
4	68,2	73,7	60,4
5	56,7	73,2	76,6
Média	67,7	73,5	70,7
Desvio padrão	6,60	1,25	6,56

Análise estatística de grau de conversão

Os valores de grau de conversão obtidos foram submetidos à análise estatística. Essa análise foi realizada para todos os materiais, comparando-se os três grupos experimentais avaliados (C, MW e WB).

Para atender a um dos requisitos para a aplicação da análise estatística pelo modelo de análise de variância, foram realizados, inicialmente, os testes de aderência à curva normal, cujos resultados indicaram que os dados amostrais de todos os materiais avaliados não se ajustaram à distribuição normal de probabilidades.

Dessa forma, os resultados foram analisados por meio do teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, que foi selecionado devido à sua indicação para comparação de mais de duas amostras com dados independentes. O nível de significância utilizado foi de 5% ($\alpha = 0,05$). Os resultados desse teste estão apresentados nas Tabelas A7 e A8 (Apêndice 2). A Tabela A7 (Apêndice 2) demonstra que houve diferença estatisticamente significativa em nível de 5%.

Tabela A7 – Teste de Kruskal-Wallis para o grau de conversão (%) dos materiais nos três grupos experimentais

Valor (H) de Kruskal-Wallis calculado:	78,3
Valor do X^2 para 20 graus de liberdade:	78,3
Probabilidade de H_0 para esse valor:	0,000%
Significante em nível de 5% ($\alpha = 0,050$)	

A Tabela A8 (Apêndice 2) apresenta todas as análises, em pares, entre os materiais e os grupos experimentais avaliados, relacionando se foram ou não estatisticamente significantes.

Tabela A8 – Comparação entre as médias dos postos médios dos materiais, nos três grupos experimentais

Amostras comparadas (duas a duas)	Diferenças entre médias	Valores críticos (α) 0,050	Significância
K (C) x K (MW)	17,6	16,9	1,00%
K (C) x K (WB)	24,6	16,9	0,100%
K (MW) x K (WB)	7,00	16,9	ns
T (C) x T (MW)	17,8	16,9	1,00%
T (C) x T (WB)	9,60	16,9	ns
T (MW) x T (WB)	8,20	16,9	ns
U (C) x U (MW)	6,60	16,9	ns
U (C) x U (WB)	4,40	16,9	ns
U (MW) x U (WB)	2,20	16,9	ns
LS (C) x LS (MW)	10,5	16,9	ns
LS (C) x LS (WB)	2,00	16,9	ns
LS (MW) x LS (WB)	12,5	16,9	ns
LL (C) x LL (MW)	0,000	16,9	ns
LL (C) x LL (WB)	6,60	16,9	ns
LL (MW) x LL (WB)	6,60	16,9	ns
K (C) x T (C)	7,00	16,9	ns
K (C) x U (C)	23,0	16,9	0,100%
K (C) x LS (C)	35,7	16,9	0,100%
K (C) x LL (C)	7,20	16,9	ns
K (MW) x T (MW)	7,20	16,9	ns
K (MW) x U (MW)	34,0	16,9	0,100%
K (MW) x LS (MW)	7,60	16,9	ns

K (MW) x LL (MW)	24,8	16,9	0,100%
K(WB) x T(WB)	8,00	16,9	ns
K(WB) x U (WB)	43,2	16,9	0,100%
K (WB) x LS (WB)	13,1	16,9	5,00%
K (WB) x LL (WB)	38,4	16,9	0,100%
T (C) x U (C)	30,0	16,9	0,100%
T (C) x LS (C)	28,7	16,9	0,100%
T (C) x LL (C)	14,2	16,9	5,00%
T (MW) x U (MW)	41,2	16,9	0,100%
T (MW) x LS (MW)	0,400	16,9	ns
T (MW) x LL (MW)	32,0	16,9	0,100%
T (WB) x U (WB)	35,2	16,9	0,100%
T (WB) x LS (WB)	21,1	16,9	1,00%
T (WB) x LL (WB)	30,4	16,9	0,100%
U (C) x LS (C)	58,7	16,9	0,100%
U (C) x LL (C)	15,8	16,9	5,00%
U (MW) x LS (MW)	41,6	16,9	0,100%
U (MW) x LL (MW)	9,20	16,9	ns
U (WB) x LS (WB)	56,3	16,9	0,100%
U (WB) x LL (WB)	4,80	16,9	ns
LS (C) x LL (C)	42,9	16,9	0,100%
LS (MW)x LL(MW)	32,4	16,9	0,100%
LS (WB) x LL (WB)	51,5	16,9	0,100%

A Figura A2 (Apêndice 2) apresenta os valores médios ($\pm$ desvio-padrão) de grau de conversão em percentagem.

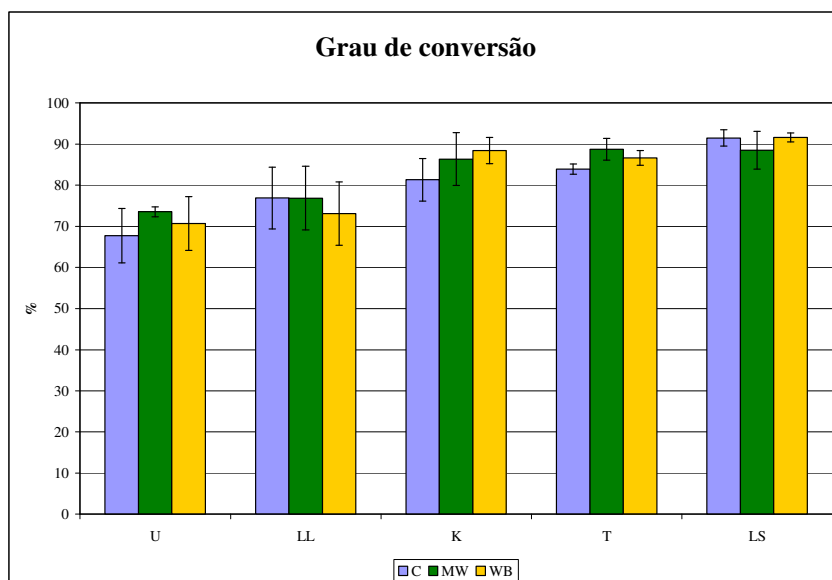


FIGURA A2 – Valores médios de grau de conversão (%) para cada material submetido aos grupos experimentais.

7.3 Apêndice 3

Planejamento experimental para T_g

Para a variável de análise (T_g), duas análises estatísticas foram realizadas: uma para a resina acrílica para base de prótese com dois fatores de variação: **ciclo de polimerização**, em 2 níveis (curto - LS e longo - LL), e **tratamento**, em 3 níveis (C – controle, MW – irradiação por energia de microondas: 550 W/3 min e WB – imersão em banho de água aquecida a 55°C por 60 min) e outra para os materiais reembasadores com dois fatores de variação: **material**, em 5 níveis (T, U, K, D e N), e **tratamento**, em 3 níveis (C – controle, MW – irradiação por energia de microondas: 500 W/5 min para T; 550 W/4 min para U; 550 W/5 min para K; 650 W/4 min para D e 550 W/3 min para N e WB – imersão em banho de água aquecida a 55°C por 10 min). O número de corpos-de-prova necessário para cada condição experimental avaliada neste estudo ($n=5$) foi calculado com base nos resultados obtidos em estudo piloto, resultando em um número total de dados da amostra de 105.

Resultados de T_g

Os valores de T_g obtidos por calorimetria exploratória diferencial, para cada material em cada grupo experimental, foram tabulados e analisados (Apêndice 3 - Tabelas A9 a A15).

Tabela A9 – Valores de T_g (°C) do material T nos três grupos experimentais

Corpo-de-prova	Grupos		
	C	MW	WB
1	80,3	76,2	70,9
2	77,5	79,6	79,6
3	77,9	75,0	80,1
4	79,4	79,0	80,5
5	82,8	76,8	76,1
Média	79,6	77,3	77,4
Desvio padrão	2,13	1,93	4,05

Tabela A10 – Valores de T_g (°C) do material U nos três grupos experimentais

Corpo-de-prova	Grupos		
	C	MW	WB
1	72,6	73,1	73,0
2	72,8	72,5	74,4
3	75,3	73,0	85,3
4	74,0	74,0	74,7
5	73,5	74,2	76,4
Média	73,6	73,4	76,8
Desvio padrão	1,08	0,72	4,92

Tabela A11 – Valores de T_g (°C) do material K nos três grupos experimentais

Corpo-de-prova	Grupos		
	C	MW	WB
1	50,6	75,9	61,1
2	51,1	72,5	58,1
3	50,8	74,3	55,6
4	50,6	72,7	55,4
5	45,9	75,0	68,7
Média	49,8	74,1	59,8
Desvio padrão	2,19	1,47	5,50

Tabela A12 – Valores de T_g (°C) do material D nos três grupos experimentais

Corpo-de-prova	Grupos		
	C	MW	WB
1	46,7	46,4	46,8
2	55,8	46,7	58,0
3	47,9	48,5	50,4
4	48,4	46,4	56,9
5	44,6	46,0	48,8
Média	48,6	46,8	52,2
Desvio padrão	4,24	0,98	4,99

Tabela A13 – Valores de T_g (°C) do material N nos três grupos experimentais

Corpo-de-prova	Grupos		
	C	MW	WB
1	48,5	46,7	47,6
2	49,1	46,7	47,8
3	47,2	46,3	46,7
4	47,6	46,8	46,7
5	47,3	46,0	47,1
Média	47,9	46,5	47,2
Desvio padrão	0,80	0,34	0,51

Tabela A14 – Valores de T_g (°C) do material L, submetido ao ciclo curto de polimerização, nos três grupos experimentais

Corpo-de-prova	Grupos		
	C	MW	WB
1	103	103	110
2	105	123	119
3	107	104	115
4	101	103	110
5	102	104	105
Média	103	107	112
Desvio padrão	2,21	8,60	5,45

Tabela A15 – Valores de T_g (°C) do material L, submetido ao ciclo longo de polimerização, nos três grupos experimentais

Corpo-de-prova	Grupos		
	C	MW	WB
1	104	66,4	88,6
2	89,0	89,1	90,2
3	65,8	91,6	70,3
4	90,8	74,6	75,6
5	84,4	73,8	71,4
Média	86,3	79,1	79,2
Desvio padrão	13,7	10,8	9,52

Análise estatística de T_g

Os valores de T_g obtidos foram submetidos à análise estatística. Essa análise foi realizada para todos os materiais, comparando-se os três grupos experimentais avaliados (C, MW e WB).

Duas análises de variância independentes com dois fatores de variação foram realizadas. O resumo da análise de variância para a resina acrílica para base de prótese (L) é apresentado na Tabela A16 (Apêndice 3), onde se pode observar o efeito significativo do fator **ciclo de polimerização** ($p < 0,050$).

Tabela A16 - Sumário da análise de variância de T_g para a resina acrílica para base de prótese (L)

Fonte de variação	Graus de liberdade	Média quadrática	F	P
tratamento	2	16,2	0,190	0,173
ciclo de polimerização	1	$4,97 \times 10^3$	59,2	0,000
tratamento*ciclo	2	166	1,98	0,158
resíduo	24	84,0		

Dessa forma, empregou-se o teste de Tukey em nível de 5% de significância.

O resumo da análise de variância para os materiais reembasadores é apresentado na Tabela A17 (Apêndice 3), onde se pode observar o efeito significativo do fator **material** ($p < 0,050$) e da interação **material*tratamento** ($p < 0,050$).

Tabela A17 - Sumário da análise de variância de T_g para os materiais reembasadores

Fonte de variação	Graus de liberdade	Média quadrática	F	P
material	6	22,7	239	$0,001 \times 10^{-2}$
tratamento	2	0,203	2,13	0,122
material*tratamento	12	0,596	6,28	$0,001 \times 10^{-2}$
resíduo	84	0,095		

Dessa forma, empregou-se o teste de Tukey em nível de 5% de significância.

A Figura A3 (Apêndice 3) apresenta os valores médios ($\pm$ desvio-padrão) de T_g em graus Celsius ($^{\circ}\text{C}$).

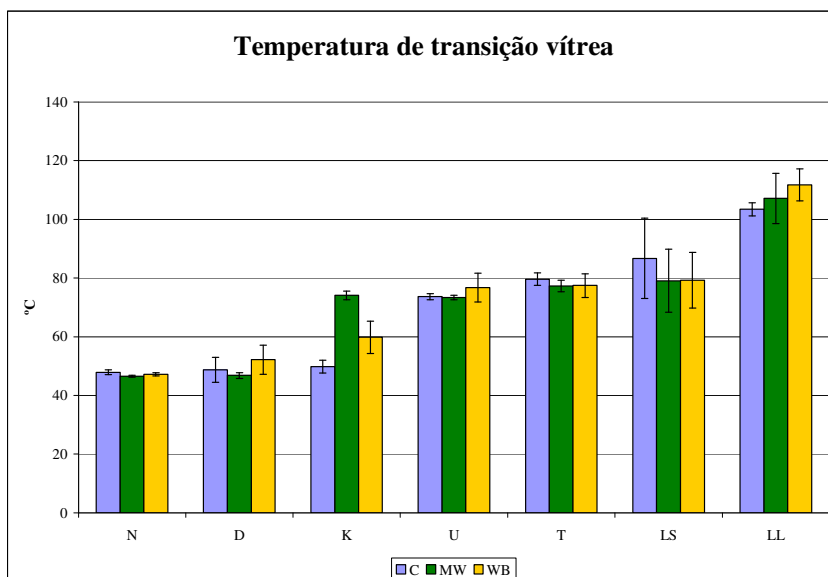


FIGURA A3 – Valores médios de T_g ($^{\circ}\text{C}$) para cada material submetido aos grupos experimentais.

7.4 Apêndice 4

Protocolos de preparo das soluções de trabalho dos métodos por CLAE para a análise dos monômeros e do plastificante

A Figura A4 (Apêndice 4) apresenta o protocolo de preparo das soluções estoques padrão e soluções de trabalho dos métodos por CLAE para a análise dos monômeros e do plastificante. *É importante observar que, para o monômero IBMA, foram preparadas soluções de trabalho em dois intervalos de concentração (1 e 2), visando a obtenção de linearidade nas respectivas curvas de calibração.*

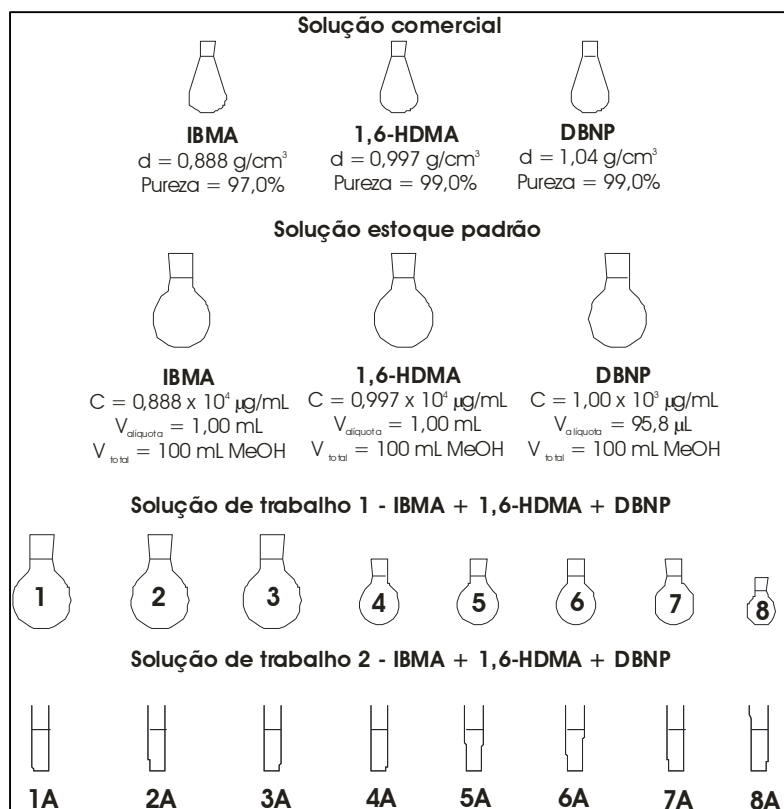


FIGURA A4 – Protocolo de preparo das soluções estoques padrão e de trabalho para a análise dos monômeros (IBMA – intervalo 1 de concentração e 1,6-HDMA) e do plastificante(DBNP).

O Quadro A1 (Apêndice 4) apresenta as concentrações finais (Cf) obtidas para as soluções de trabalho 1, volumes pipetados das soluções estoques padrão (Vp) e volumes finais (Vf) das soluções de trabalho 1 em MeOH.

Quadro A1 – Protocolo de preparo das soluções de trabalho 1 para os monômeros (IBMA – intervalo 1 de concentração e 1,6-HDMA) e plastificante (DBNP)

Solução trabalho 1	IBMA		1,6-HDMA		DBNP		Vf
	Cf (µg/mL)	Vp (µL)	Cf (µg/mL)	Vp (µL)	Cf (µg/mL)	Vp (µL)	MeOH (mL)
1	7,00	80,0	10,0	100	3,00	300	100
2	10,0	113	20,0	201	4,00	400	100
3	20,0	224	30,0	301	5,00	500	100
4	40,0	113	40,0	100	6,00	150	25,0
5	60,0	169	50,0	125	9,00	226	25,0
6	70,0	197	60,0	150	12,0	300	25,0
7	80,0	224	70,0	176	18,0	450	25,0
8	100	113	80,0	80,2	24,0	240	10,0

O Quadro A2 (Apêndice 4) apresenta as concentrações finais obtidas para as soluções de trabalho 2 e os volumes finais (Vf) das soluções de trabalho 2 em saliva artificial. A saliva artificial apresentou a seguinte composição: NaCl (0,4 g), KCl (0,4 g), $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0,795 g), $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0,78 g), $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ (0,005 g), uréia (1,0 g), água destilada (1.000 mL). *É importante observar que as soluções de trabalho 2 foram preparadas pipetando-se 100 µL da respectiva solução de trabalho 1 e adicionando-se 900 µL de saliva artificial. Dessa forma, a concentração da solução de trabalho 2 é 10 vezes inferior à concentração da respectiva solução de trabalho 1.*

Quadro A2 – Protocolo de preparo das soluções de trabalho 2 para os monômeros (IBMA – intervalo 1 de concentração e 1,6-HDMA) e plastificante (DBNP)

Solução trab. 2	1A ($\mu\text{g/mL}$)	2A ($\mu\text{g/mL}$)	3A ($\mu\text{g/mL}$)	4A ($\mu\text{g/mL}$)	5A ($\mu\text{g/mL}$)	6A ($\mu\text{g/mL}$)	7A ($\mu\text{g/mL}$)	8A ($\mu\text{g/mL}$)	Vf (saliva)
IBMA	0,700	1,00	2,00	4,00	6,00	7,00	8,00	10,0	1,00 mL
1,6-HDMA	1,00	2,00	3,00	4,00	5,00	6,00	7,00	8,00	1,00 mL
DBNP	0,300	0,400	0,500	0,600	0,900	1,20	1,80	2,40	1,00 mL

A Figura A5 (Apêndice 4) apresenta o protocolo de preparo da solução estoque padrão e soluções de trabalho dos métodos por CLAE para a análise do monômero IBMA (intervalo 2 de concentração).

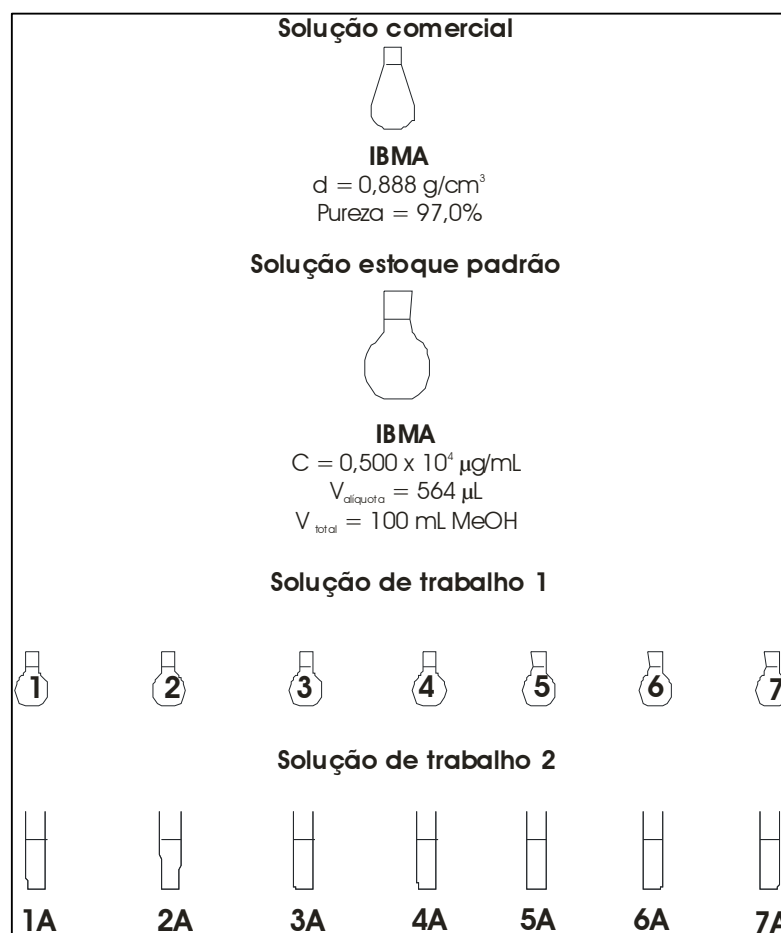


FIGURA A5 – Protocolo de preparo da solução estoque padrão e de trabalho para a análise do monômero IBMA (intervalo 2 de concentração).

O Quadro A3 (Apêndice 4) apresenta as concentrações finais (Cf) obtidas para as soluções de trabalho 1 do monômero IBMA (intervalo 2 de concentração), volumes pipetados da solução estoque padrão (Vp) e volumes finais (Vf) das soluções de trabalho 1 em MeOH.

Quadro A3 – Protocolo de preparo das soluções de trabalho 1 para o monômero IBMA (intervalo 2 de concentração)

Solução de trabalho 1	1	2	3	4	5	6	7	Vf (MeOH)
Vp (µL)	100	200	400	600	700	800	$1,00 \times 10^3$	5,00 mL
Cf (µg/mL)	100	200	400	600	700	800	$1,00 \times 10^3$	

O Quadro A4 (Apêndice 4) apresenta as concentrações finais (Cf) obtidas para as soluções de trabalho 2 do monômero IBMA (intervalo 2 de concentração), volumes pipetados das soluções de trabalho 1 (Vp) e volumes finais (Vf) das soluções de trabalho 2 em saliva artificial.

Quadro A4 – Protocolo de preparo das soluções de trabalho 2 para o monômero IBMA (intervalo 2 de concentração)

Solução de trabalho 2	1A	2A	3A	4A	5A	6A	7A	Vf (saliva)
Vp (µL)	100	100	100	100	100	100	100	1,00 mL
Cf (µg/mL)	10,0	20,0	40,0	60,0	70,0	80,0	100	

Protocolos de preparo das soluções de trabalho dos controles de qualidade dos métodos por CLAE para a análise dos monômeros e do plastificante

A Figura A6 (Apêndice 4) apresenta o protocolo de preparo das soluções estoques padrão e soluções de trabalho dos controles de qualidade dos métodos por CLAE para a análise dos monômeros e do plastificante. *Como relatado anteriormente, as soluções do monômero IBMA foram preparadas em dois intervalos de concentração (1 e 2).*

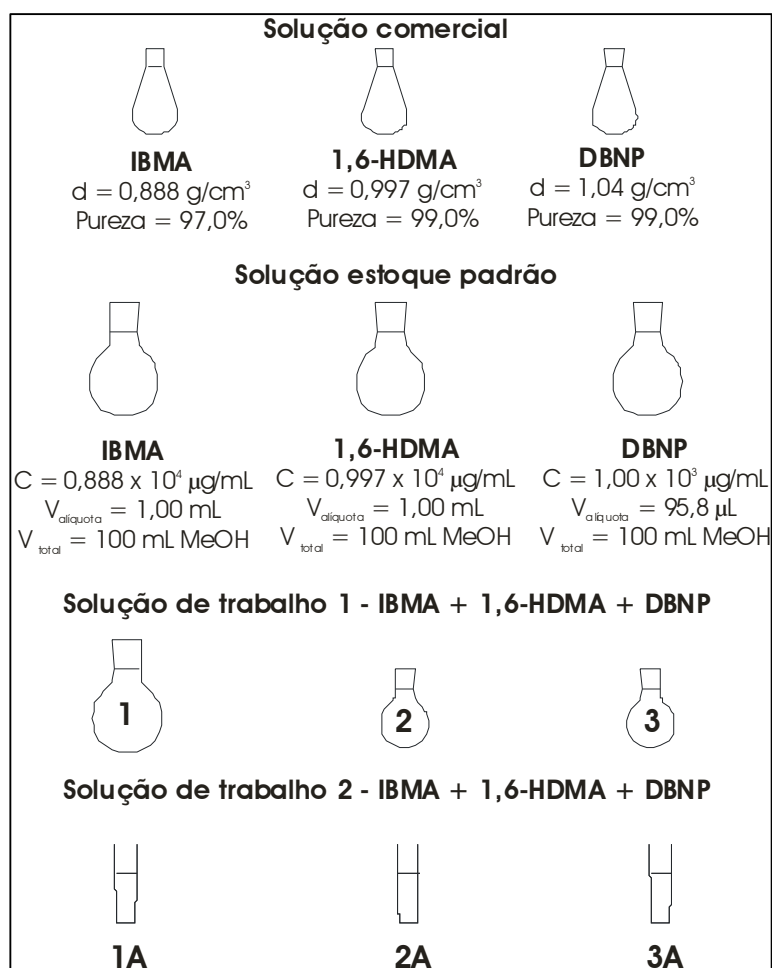


FIGURA A6 – Protocolo de preparo das soluções estoques padrão e de trabalho dos controles de qualidade para a análise dos monômeros (IBMA – intervalo 1 de concentração e 1,6-HDMA) e do plastificante (DBNP).

O Quadro A5 (Apêndice 4) apresenta as concentrações finais (Cf) obtidas para as soluções de trabalho 1 dos controles de qualidade, volumes pipetados das soluções estoques padrão (Vp) e volumes finais (Vf) das soluções de trabalho 1 dos controles de qualidade em MeOH.

Quadro A5 – Protocolo de preparo das soluções de trabalho 1 dos controles de qualidade para os monômeros (IBMA – intervalo 1 de concentração e 1,6-HDMA) e plastificante (DBNP)

Solução de trabalho 1	IBMA		1,6-HDMA		DBNP		Vf
	Cf ($\mu\text{g/mL}$)	Vp (μL)	Cf ($\mu\text{g/mL}$)	Vp (μL)	Cf ($\mu\text{g/mL}$)	Vp (μL)	MeOH (mL)
1	8,40	94,6	12,0	120	3,60	360	100
2	45,0	127	32,0	80,2	9,60	240	25,0
3	85,0	239	68,0	170	20,4	510	25,0

O Quadro A6 (Apêndice 4) apresenta as concentrações finais obtidas para as soluções de trabalho 2 dos controles de qualidade e os volumes finais (Vf) das soluções de trabalho 2 em saliva artificial. *Como relatado anteriormente, as soluções de trabalho 2 foram preparadas pipetando-se 100 μL da respectiva solução de trabalho 1 e adicionando-se 900 μL de saliva artificial.*

Quadro A6 – Protocolo de preparo das soluções de trabalho 2 dos controles de qualidade para os monômeros (IBMA – intervalo 1 de concentração e 1,6-HDMA) e plastificante (DBNP)

Solução de trabalho 2	1A ($\mu\text{g/mL}$)	2A ($\mu\text{g/mL}$)	3A ($\mu\text{g/mL}$)	Vf (saliva)
IBMA	0,840	4,50	8,50	1,00 mL
1,6-HDMA	1,20	3,20	6,80	1,00 mL
DBNP	0,360	0,960	2,04	1,00 mL

A Figura A7 (Apêndice 4) apresenta o protocolo de preparo da solução estoque padrão e soluções de trabalho dos controles de qualidade dos métodos por CLAE para a análise do monômero IBMA (intervalo 2).

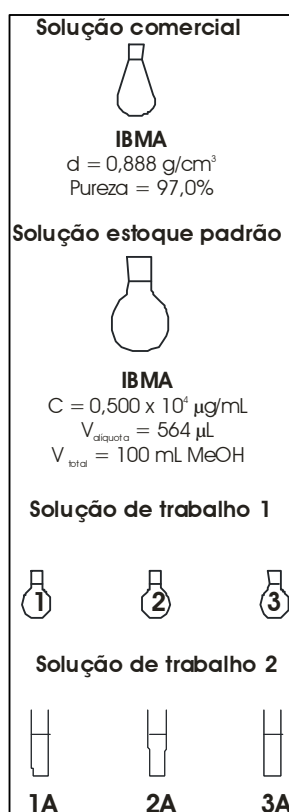


FIGURA A7 – Protocolo de preparo da solução estoque padrão e de trabalho dos controles de qualidade para a análise do monômero IBMA (intervalo 2).

O Quadro A7 (Apêndice 4) apresenta as concentrações finais (Cf) obtidas para as soluções de trabalho 1 dos controles de qualidade do monômero IBMA (intervalo 2 de concentração), volumes pipetados da solução estoque padrão (Vp) e volumes finais (Vf) das soluções de trabalho 1 dos controles de qualidade em MeOH.

Quadro A7 – Protocolo de preparo das soluções de trabalho 1 dos controles de qualidade para o monômero IBMA (intervalo 2 de concentração)

Soluções de trabalho 1	1	2	3	Vf (MeOH)
Vp (µL)	120	450	850	5,00 mL
Cf (µg/mL)	120	450	850	

O Quadro A8 (Apêndice 4) apresenta as concentrações finais (Cf) obtidas para as soluções de trabalho 2 dos controles de qualidade do monômero IBMA (intervalo 2 de concentração), volumes pipetados das soluções de trabalho 1 (Vp) e volumes finais (Vf) das soluções de trabalho 2 dos controles de qualidade em saliva artificial.

Quadro A8 – Protocolo de preparo das soluções de trabalho 2 dos controles de qualidade para o monômero IBMA (intervalo 2 de concentração)

Soluções de trabalho 1	1A	2A	3A	Vf (saliva)
Vp (µL)	100	100	100	1,00 mL
Cf (µg/mL)	12,0	45,0	85,0	

Protocolos de preparo das soluções de trabalho dos métodos por CLAE para a análise dos produtos de degradação

A Figura A8 (Apêndice 4) apresenta o protocolo de preparo das soluções estoques padrão e soluções de trabalho dos métodos por CLAE para a análise dos produtos de degradação.

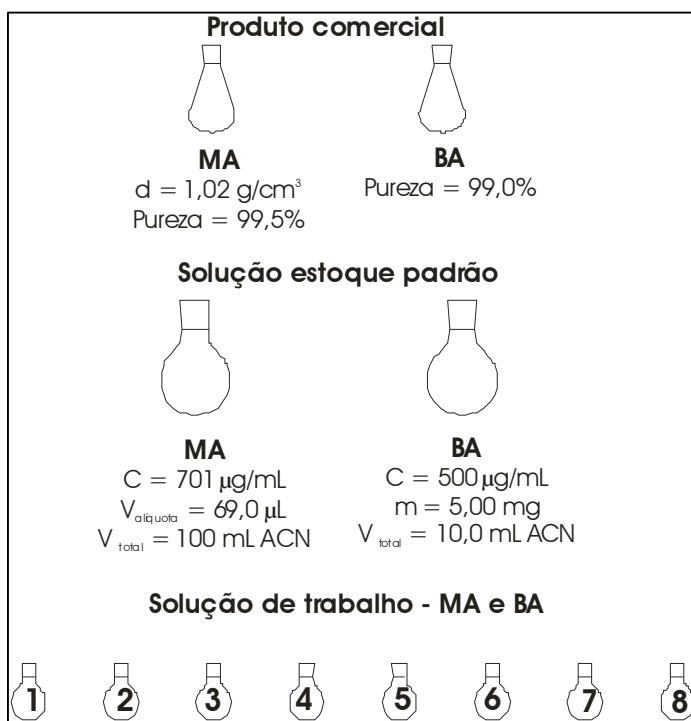


FIGURA A8 – Protocolo de preparo das soluções estoques padrão e de trabalho para a análise dos produtos de degradação (MA e BA).

O Quadro A9 (Apêndice 4) apresenta as concentrações finais (C_f) obtidas para as soluções de trabalho, volumes pipetados das soluções estoques padrão (V_p) e volumes finais (V_f) das soluções de trabalho em saliva artificial.

Quadro A9 – Protocolo de preparo das soluções de trabalho para os produtos de degradação (MA e BA)

Solução de trabalho	MA		BA		Vf
	Cf (µg/mL)	Vp (µL)	Cf (µg/mL)	Vp (µL)	saliva (mL)
1	1,00	14,0	0,500	10,0	10,0
2	2,00	28,0	1,00	20,0	10,0
3	4,00	57,0	2,00	40,0	10,0
4	8,00	114	4,00	80,0	10,0
5	16,0	228	8,00	160	10,0
6	32,0	458	16,0	320	10,0
7	64,0	910	32,0	640	10,0
8	128	$1,82 \times 10^3$	64,0	$1,28 \times 10^3$	10,0

Protocolos de preparo das soluções de trabalho dos controles de qualidade dos métodos por CLAE para a análise dos produtos de degradação

A Figura A9 (Apêndice 4) apresenta o protocolo de preparo das soluções estoques padrão e soluções de trabalho dos controles de qualidade dos métodos por CLAE para a análise dos produtos de degradação.

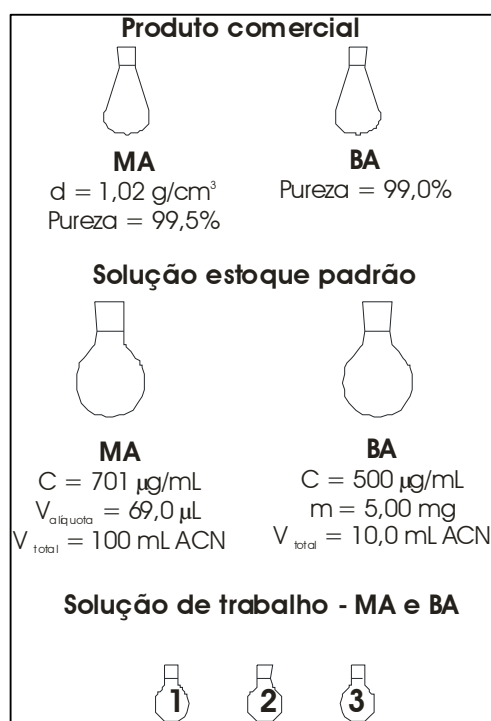


FIGURA A9 – Protocolo de preparo das soluções estoques padrão e de trabalho dos controles de qualidade para a análise dos produtos de degradação (MA e BA).

O Quadro A10 (Apêndice 4) apresenta as concentrações finais (Cf) obtidas para as soluções de trabalho dos controles de qualidade, volumes pipetados das soluções estoques padrão (Vp) e volumes finais (Vf) das soluções de trabalho em saliva artificial.

Quadro A10 – Protocolo de preparo das soluções de trabalho dos controles de qualidade para os produtos de degradação (MA e BA)

Solução de trabalho	MA		BA		Vf
	Cf (µg/mL)	Vp (µL)	Cf (µg/mL)	Vp (µL)	saliva (mL)
1	1,20	17,0	0,600	12,0	10,0
2	51,4	732	25,6	512	10,0
3	109	1,50 x 10 ³	54,4	1,10 x 10 ³	10,0

Resultados da validação dos métodos por CLAE para a análise dos monômeros e do plastificante

As figuras de mérito analítico utilizadas para a validação dos métodos desenvolvidos foram: linearidade, precisão e exatidão intra e interdias, limites de quantificação e detecção, ensaio cego, estabilidade e recuperação.

As Figuras A10, A11, A12 e A13 (Apêndice 4) apresentam as curvas de calibração obtidas para os compostos IBMA (intervalo 1 de concentração), 1,6-HDMA, DBNP e IBMA (intervalo 2 de concentração), respectivamente. Foi observado que as curvas de calibração apresentaram linearidade nas faixas de concentração de 0,700 a 10,0 µg/mL para o IBMA (intervalo 1 de concentração), de 1,00 a 8,00 µg/mL para o 1,6-HDMA, de 0,300 a 2,40 µg/mL para o DBNP e de 10,0 a 100 µg/mL para o IBMA (intervalo 2 de concentração).

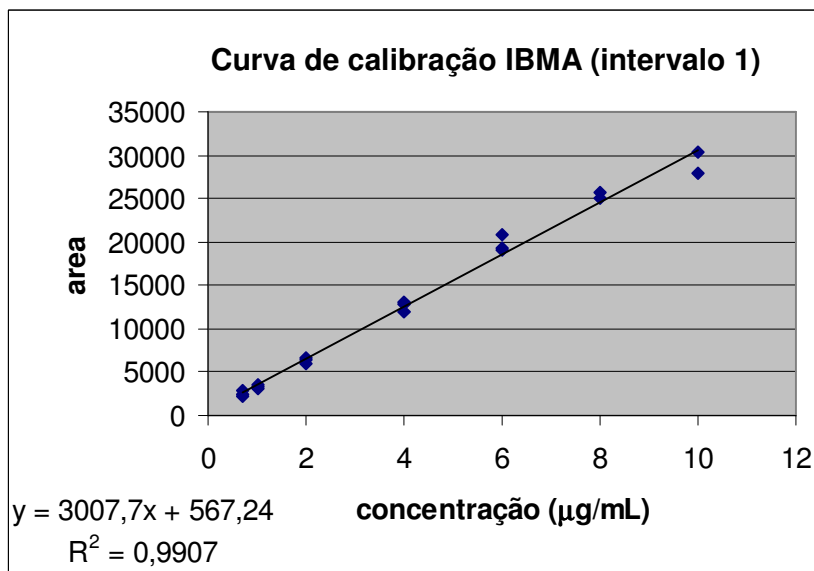


FIGURA A10 - Curva de calibração obtida para o IBMA (intervalo 1).

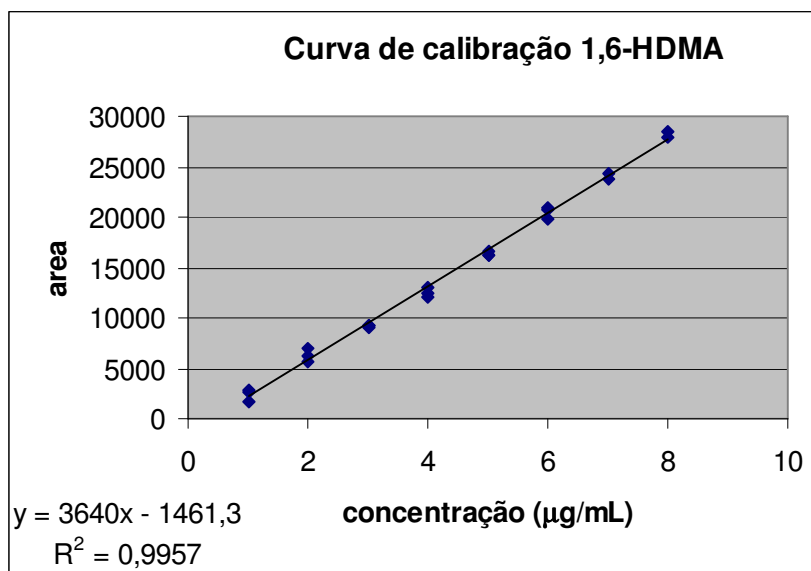


FIGURA A11 - Curva de calibração obtida para o 1,6-HDMA.

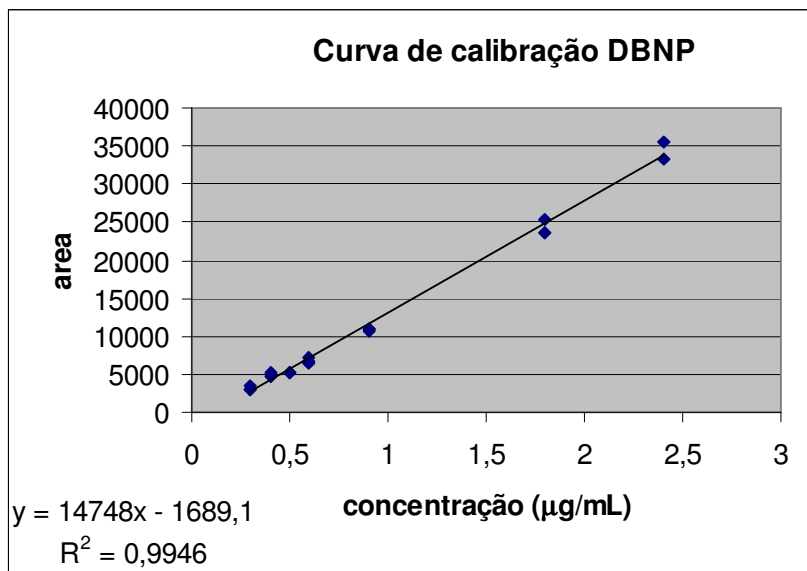


FIGURA A12 - Curva de calibração obtida para o DBNP.

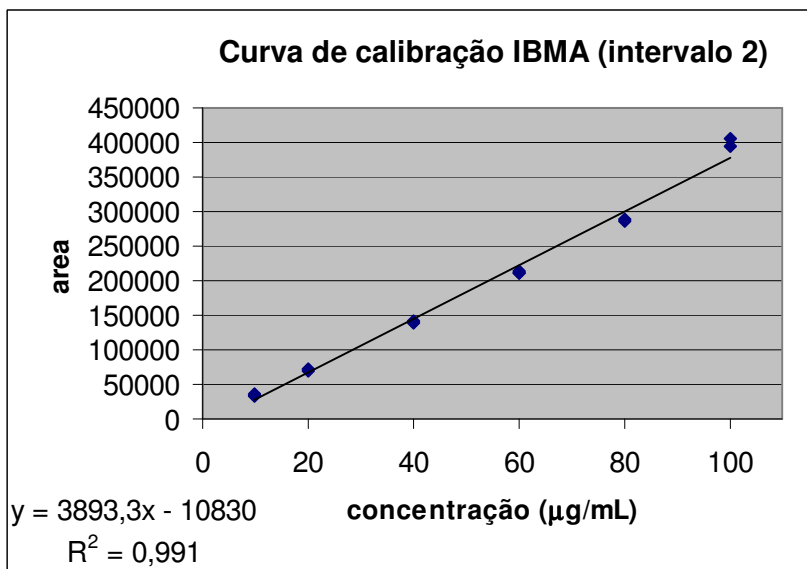


FIGURA A13 - Curva de calibração obtida para o IBMA (intervalo 2).

A precisão das análises foi expressa pelo coeficiente de variação (CV%) das replicatas (n=3) e a exatidão, expressa em porcentagem, foi determinada pelo uso do software *Microsoft Excel 2000*. Foi observado que, para todas as concentrações das curvas de calibração de todos os compostos, os valores de precisão e exatidão foram excelentes (Apêndice 4 - Tabelas A18, A19, A20 e A21 para IBMA – intervalo 1 de concentração, 1,6-HDMA, DBNP e IBMA – intervalo 2 de concentração, respectivamente), com valores dentro dos critérios de aceitação do método ($\leq 15\%$).

Tabela A18 – Precisão e exatidão obtidas a partir da análise das amostras do IBMA (intervalo 1 de concentração) preparadas (n=3) em saliva artificial

Concentração (µg/mL)	Precisão (CV%)	Exatidão (%)
0,700	15,5	90,2
1,00	7,92	92,2
2,00	5,33	96,8
4,00	4,03	100
6,00	4,98	106
8,00	1,77	103
10,0	5,76	95,1

Tabela A19 – Precisão e exatidão obtidas a partir da análise das amostras do 1,6-HDMA preparadas (n=3) em saliva artificial

Concentração (µg/mL)	Precisão (CV%)	Exatidão (%)
1,00	25,0	108
2,00	10,1	106
3,00	0,690	97,5
4,00	3,72	96,3
5,00	1,20	97,9
6,00	2,85	100
7,00	1,63	100
8,00	1,44	102

Tabela A20 – Precisão e exatidão obtidas a partir da análise das amostras do DBNP preparadas (n=3) em saliva artificial

Concentração (µg/mL)	Precisão (CV%)	Exatidão (%)
0,300	8,95	119
0,400	5,54	112
0,500	0,380	95,1
0,600	5,26	95,1
0,900	0,560	94,5
1,80	4,98	98,9
2,40	4,57	102

Tabela A21 – Precisão e exatidão obtidas a partir da análise das amostras do IBMA (intervalo 2 de concentração) preparadas (n=3) em saliva artificial

Concentração (µg/mL)	Precisão (CV%)	Exatidão (%)
10,0	4,47	117
20,0	4,42	105
40,0	0,610	97,4
60,0	1,18	95,1
80,0	0,550	95,7
100	2,16	105

Como controles de qualidade, foram escolhidos três valores de concentrações (baixa, média e alta), em relação às concentrações utilizadas para construir as curvas de calibração dos compostos. As concentrações de 0,840, 4,50 e 8,50 µg/mL foram selecionadas para o IBMA (intervalo 1 de concentração); de 12,0, 45,0 e 85,0 µg/mL para o IBMA (intervalo 2 de concentração); de 1,20, 3,20 e 6,80 µg/mL para o 1,6-HDMA e de 0,360, 0,960 e 2,04 µg/mL para o DBNP.

A precisão e exatidão intradia foram avaliadas por meio do preparo e das análises em replicata (n=5) dos três controles de qualidade em um mesmo dia e a precisão e exatidão interdias, por meio de análises realizadas em três dias não consecutivos (n=15). Os resultados de todas as análises foram excelentes, com valores dentro dos critérios de aceitação do método para todas as concentrações de todos os compostos (Apêndice 4 – Tabelas A22, A23, A24 e

A25 para o IBMA – intervalo 1 de concentração, 1,6-HDMA, DBNP e IBMA – intervalo 2 de concentração, respectivamente).

Tabela A22 – Precisão e exatidão obtidas a partir da análise dos controles de qualidade do IBMA (intervalo 1 de concentração) preparados (n=5) em saliva artificial

Controles (µg/mL)	Precisão (CV%)			Exatidão (%)		
	1º dia	2º dia	3º dia	1º dia	2º dia	3º dia
0,840	0,840	1,92	1,49	88,4	101	92,2
4,50	4,80	0,220	5,92	96,9	111	97,3
8,50	8,63	0,980	8,36	103	107	103

Tabela A23 – Precisão e exatidão obtidas a partir da análise dos controles de qualidade do 1,6-HDMA preparados (n=5) em saliva artificial

Controles (µg/mL)	Precisão (CV%)			Exatidão (%)		
	1º dia	2º dia	3º dia	1º dia	2º dia	3º dia
1,20	3,21	5,40	6,62	107	100	101
3,20	3,69	2,46	3,17	107	87,5	91,8
6,80	4,77	7,22	7,95	107	94,0	101

Tabela A24 – Precisão e exatidão obtidas a partir da análise dos controles de qualidade do DBNP preparados (n=5) em saliva artificial

Controles (µg/mL)	Precisão (CV%)			Exatidão (%)		
	1º dia	2º dia	3º dia	1º dia	2º dia	3º dia
0,360	3,31	3,28	2,38	110	89,7	92,9
0,960	3,18	5,78	1,30	105	94,8	92,5
2,04	6,52	2,50	3,86	104	92,8	101

Tabela A25 – Precisão e exatidão obtidas a partir da análise dos controles de qualidade do IBMA (intervalo 2 de concentração) preparados (n=5) em saliva artificial

Controles (µg/mL)	Precisão (CV %)			Exatidão (%)		
	1º dia	2º dia	3º dia	1º dia	2º dia	3º dia
12,0	4,81	1,36	2,51	96,1	104	105
45,0	2,68	2,08	1,74	92,0	97,0	100
85,0	2,63	2,72	2,53	98,7	104	108

Os limites de quantificação foram determinados como sendo 0,700, 1,00 e 0,300 µg/mL para o IBMA, 1,6-HDMA e DBNP, respectivamente (Tabelas A18, A19 e A20 - Apêndice 4), de modo que, para as replicatas (n=3) os valores de precisão e exatidão foram superiores a 15%.

Os limites de detecção foram determinados como sendo 0,500, 0,700 e 0,250 µg/mL para o IBMA, 1,6-HDMA e DBNP, respectivamente, sendo estas as concentrações em que se observou um sinal três vezes maior que o ruído do detector para as replicatas (n=3).

O ensaio cego foi realizado por um outro analista, o qual preparou e analisou duas concentrações de valores intermediários, dentro das faixas de concentrações das curvas de calibração, de cada um dos compostos analisados. As amostras foram analisadas (n=3) utilizando as condições cromatográficas de análise determinadas previamente. As concentrações foram de 7,00 e 70,0 µg/mL para o IBMA, de 3,50 e 5,50 µg/mL para o 1,6-HDMA e de 0,800 e 1,70 µg/mL para o DBNP. Os valores de precisão e de exatidão para este ensaio também estavam dentro do critério de aceitação do método (Tabela A26 – Apêndice 4).

Tabela A26 – Precisão e exatidão obtidas a partir da análise das amostras do ensaio cego preparadas (n=3) em saliva artificial

IBMA (µg/mL)	Precisão (CV%)	Exatidão (%)	1,6- HDMA (µg/mL)	Precisão (CV%)	Exatidão (%)	DBNP (µg/mL)	Precisão (CV%)	Exatidão (%)
7,00	1,05	113	3,50	4,05	95,0	0,800	2,28	105
70,0	3,89	89,2	5,50	6,67	100	1,70	6,58	109

A estabilidade das amostras, a qual demonstrou ser o fator preponderante para o presente método de análise, também foi avaliada. A estabilidade dos compostos IBMA, 1,6-HDMA e DBNP em saliva artificial foi avaliada através da comparação entre injeções de amostras recém-preparadas nas três diferentes concentrações controles e após o armazenamento em quatro períodos. Uma vez que não foi possível congelar as amostras, devido à rápida degradação dos compostos residuais, o parâmetro de estabilidade foi avaliado nos intervalos de tempo em que os corpos-de-prova foram armazenados em estufa, sem que houvesse a substituição da saliva artificial. Após cada período de coleta inferior a 24 h (1 h, 3 h e 5 h), a saliva artificial foi descartada e renovada e, após este período de armazenamento (24 h a 30 dias), a saliva artificial foi substituída diariamente. Dessa forma, os corpos-de-prova permaneceram imersos por 1 h (0 a 1 h), 2 h (1 a 3 h e 3 a 5 h), 19 h (5 a 24 h) e 24 h (a partir de 24 h) em saliva artificial não renovada. Assim, amostras controles foram analisadas recém-preparadas e após os períodos de 1, 2, 19 e 24 h.

As amostras foram consideradas estáveis quando a variação entre as concentrações iniciais e a concentração após cada um dos períodos foi superior a 85%. As Tabelas A27, A28, A29 e A30 (Apêndice 4) apresentam os resultados de estabilidade dos compostos IBMA (intervalo 1 de concentração), 1,6-HDMA, DBNP e IBMA (intervalo 2 de concentração), respectivamente.

Tabela A27 – Resultados de estabilidade (%) em relação às amostras iniciais do IBMA (intervalo 1 de concentração)

controle (µg/mL)	1 h	2 h	19 h	24 h
0,840	13,2	13,0	-*	-
4,50	52,6	43,8	-	-
8,50	33,7	32,6	-	-

* concentrações não-detectáveis.

Tabela A28 – Resultados de estabilidade (%) em relação às amostras iniciais do 1,6-HDMA

controle (µg/mL)	1 h	2 h	19 h	24 h
1,20	90,0	97,5	92,5	95,3
3,20	97,8	85,3	84,8	71,2
6,80	77,8	91,2	86,5	77,7

Tabela A29 – Resultados de estabilidade (%) em relação às amostras iniciais do DBNP

controle (µg/mL)	1 h	2 h	19 h	24 h
0,360	85,8	61,0	68,7	63,0
0,960	99,1	70,7	66,4	58,7
2,04	90,9	78,7	74,3	66,4

Tabela A30 – Resultados de estabilidade (%) em relação às amostras iniciais do IBMA (intervalo 2 de concentração)

controle (µg/mL)	1 h	2 h	19 h	24 h
12,0	60,0	33,7	-	-
45,0	37,7	31,4	0,210	-
85,0	21,5	46,0	0,480	-

A partir desses resultados foi possível comprovar a instabilidade dos compostos em estudo, principalmente, a instabilidade do monômero IBMA. O

plastificante DBNP demonstrou ser instável em solução aquosa a partir de 2 h de armazenamento e o monômero 1,6-HDMA demonstrou ser o composto mais estável.

A porcentagem de recuperação para os monômeros e o plastificante também foi avaliada. As concentrações controles foram preparadas (n=3) em metanol (solvente) e em saliva artificial (fluido) e analisadas imediatamente após o preparo. Este procedimento foi realizado com a finalidade de observar a resposta do detector de UV, relativa às áreas das bandas cromatográficas apresentadas por essas amostras, e estabelecer uma relação de proporcionalidade em termos percentuais (saliva/metanol). As Tabelas A31, A32, A33 e A34 (Apêndice 4) apresentam os resultados deste parâmetro para os compostos IBMA (intervalo 1 de concentração), 1,6-HDMA, DBNP e IBMA (intervalo 2 de concentração), respectivamente.

Tabela A31 – Recuperação (%) do composto IBMA (intervalo 1 de concentração)

controle (µg/mL)	replicatas (n=3)			média	desvio- padrão	CV %
	1	2	3			
0,840	45,8	47,1	51,2	48,0	2,79	5,81
4,50	50,0	51,7	49,1	50,3	1,31	2,61
8,50	44,4	52,2	51,4	49,3	4,27	8,66

Tabela A32 – Recuperação (%) do composto 1,6-HDMA

controle (µg/mL)	replicatas (n=3)			média	desvio- padrão	CV %
	1	2	3			
1,20	31,5	30,0	36,4	32,6	3,32	10,2
3,20	52,0	51,7	46,1	50,0	3,32	6,64
6,80	43,2	48,1	47,1	46,2	2,61	5,65

Tabela A33 – Recuperação (%) do composto DBNP

controle (µg/mL)	replicatas (n=3)			média	desvio- padrão	CV%
	1	2	3			
0,360	20,9	27,8	26,0	24,9	3,58	14,4
0,960	33,9	36,0	32,3	34,1	1,89	5,55
2,04	30,2	33,7	33,9	32,6	2,06	6,31

Tabela A34 – Recuperação (%) do composto IBMA (intervalo 2 de concentração)

controle (µg/mL)	replicata (n=3)			média	desvio- padrão	CV%
	1	2	3			
12,0	52,8	47,4	47,8	49,3	3,02	6,12
45,0	54,3	54,2	49,1	52,5	2,98	5,67
85,0	55,0	54,9	56,8	55,6	1,06	1,90

As amostras de todos os materiais do grupo controle (coletas de 1 h, 3 h, 5 h, 24 h e 3 dias) foram analisadas após o congelamento (a -20°C) por um período de 14 dias e comparadas com as mesmas amostras analisadas recém-preparadas (Figuras A14 a A18 – Apêndice 4). Os resultados demonstraram a instabilidade das amostras após período de congelamento.

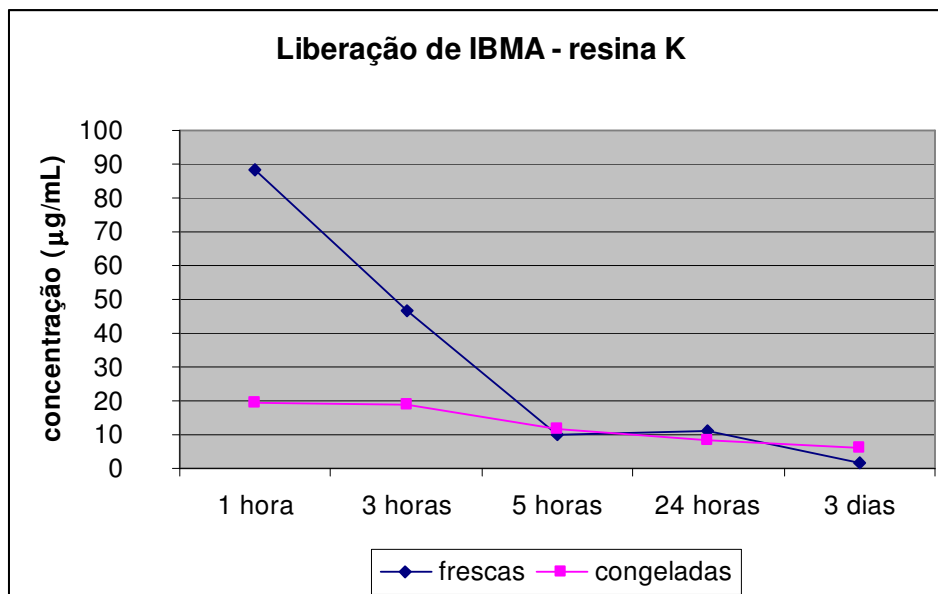


FIGURA A14 – Valores médios de liberação ($\mu\text{g/mL}$) de IBMA a partir da resina Kooliner (amostras frescas ou recém-preparadas e de amostras congeladas por 14 dias).

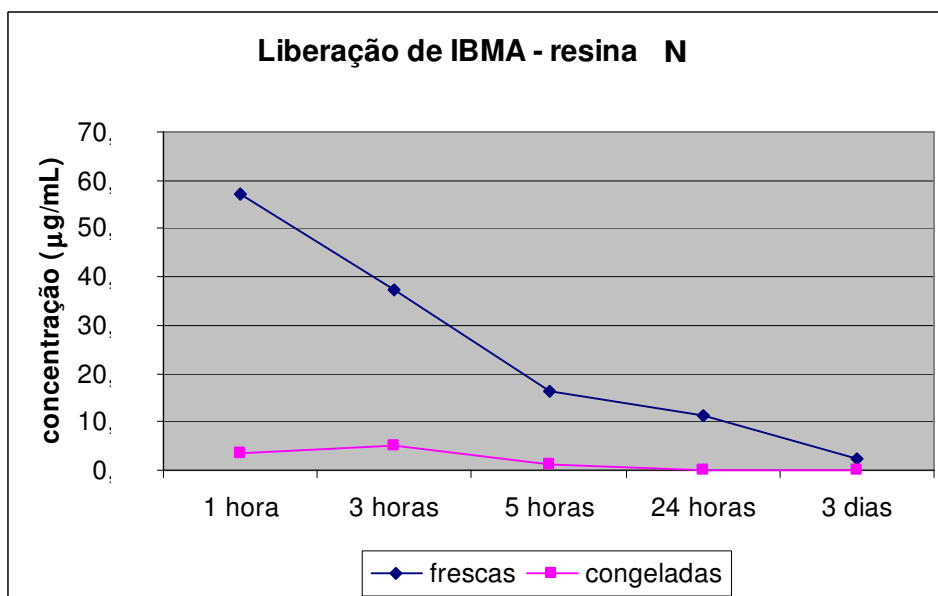


FIGURA A15 – Valores médios de liberação ($\mu\text{g/mL}$) de IBMA a partir da resina New Truliner (amostras frescas ou recém-preparadas e de amostras congeladas por 14 dias).

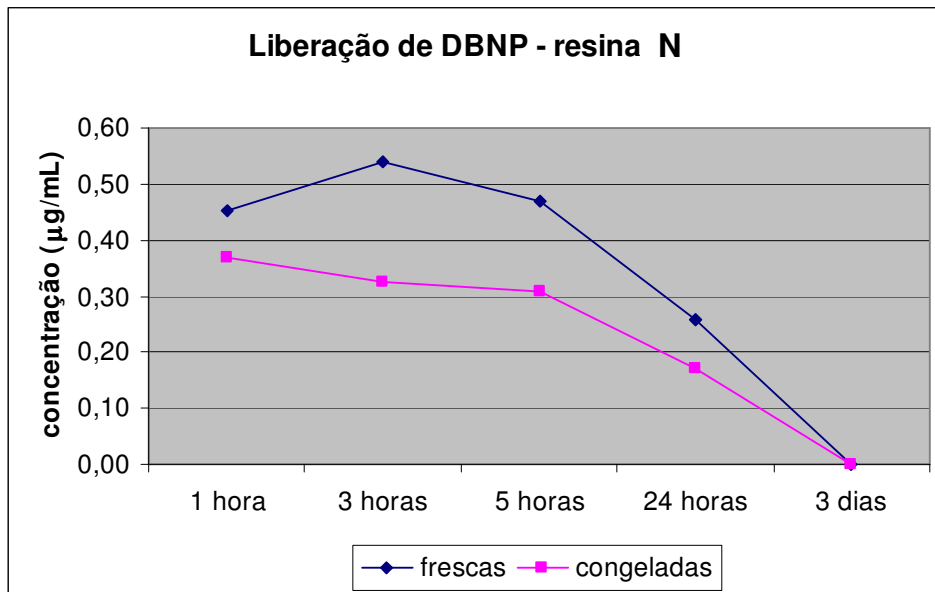


FIGURA A16 – Valores médios de liberação (µg/mL) de DBNP a partir da resina New Truliner (amostras frescas ou recém-preparadas e de amostras congeladas por 14 dias).

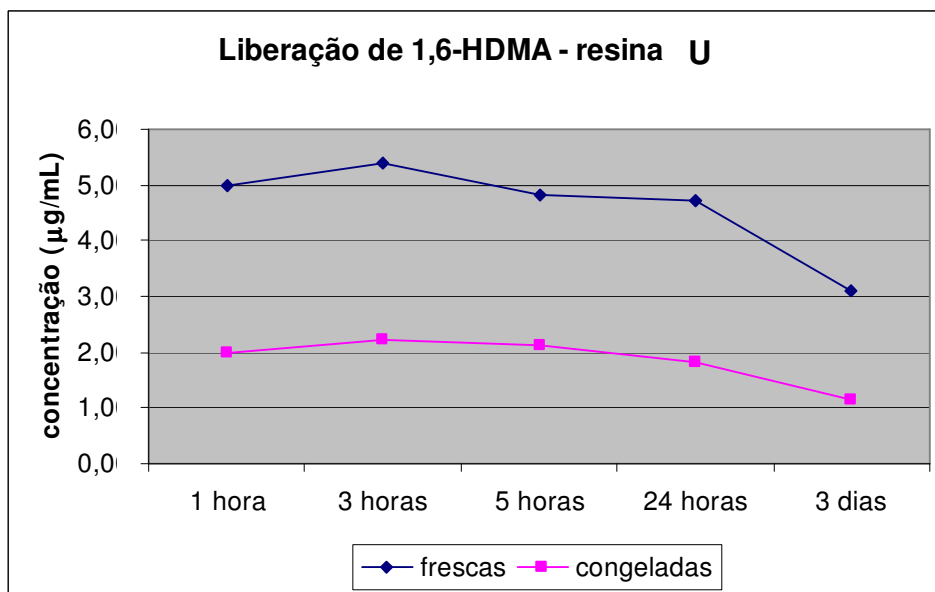


FIGURA A17 – Valores médios de liberação (µg/mL) de 1,6-HDMA a partir da resina Ufi Gel hard (amostras frescas ou recém-preparadas e de amostras congeladas por 14 dias).

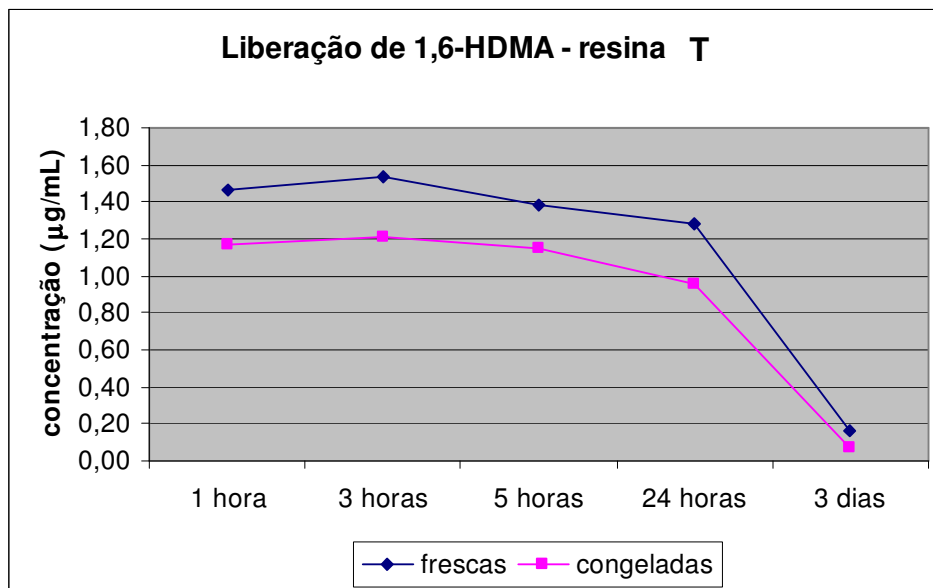


FIGURA A18 – Valores médios de liberação ($\mu\text{g/mL}$) de 1,6-HDMA a partir da resina Tokuso Rebase Fast (amostras frescas ou recém-preparadas e de amostras congeladas por 14 dias).

Resultados da validação dos métodos por CLAE para a análise dos produtos de degradação

As figuras de mérito analítico utilizadas para a validação dos métodos desenvolvidos foram: linearidade, precisão e exatidão intra e interdias, limites de quantificação e detecção, ensaio cego, estabilidade e recuperação.

As Figuras A19 e A20 (Apêndice 4) apresentam as curvas de calibração obtidas para os compostos MA e BA, respectivamente. Foi observado que as curvas de calibração apresentaram linearidade nas faixas de concentração de 1,00 a 128 $\mu\text{g/mL}$ para o MA e de 0,500 a 64,0 $\mu\text{g/mL}$ para o BA.

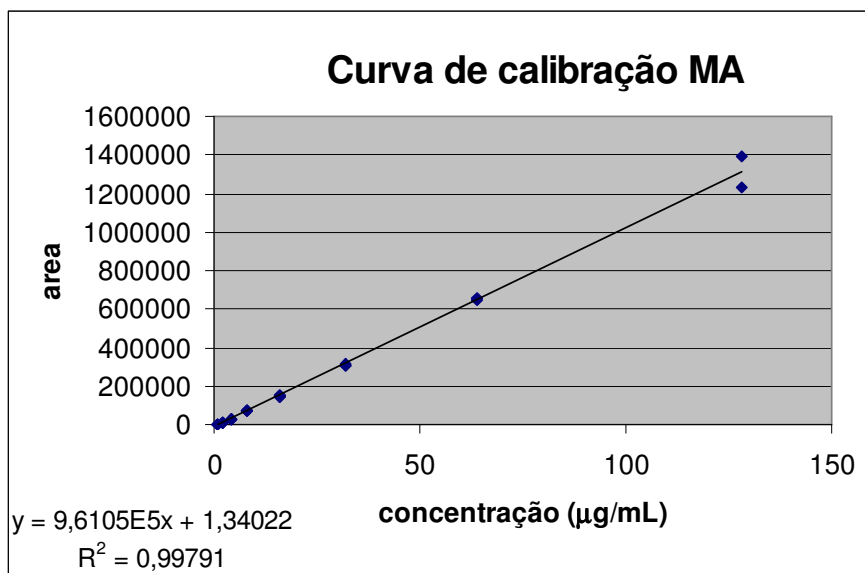


FIGURA A19 - Curva de calibração obtida para o MA.

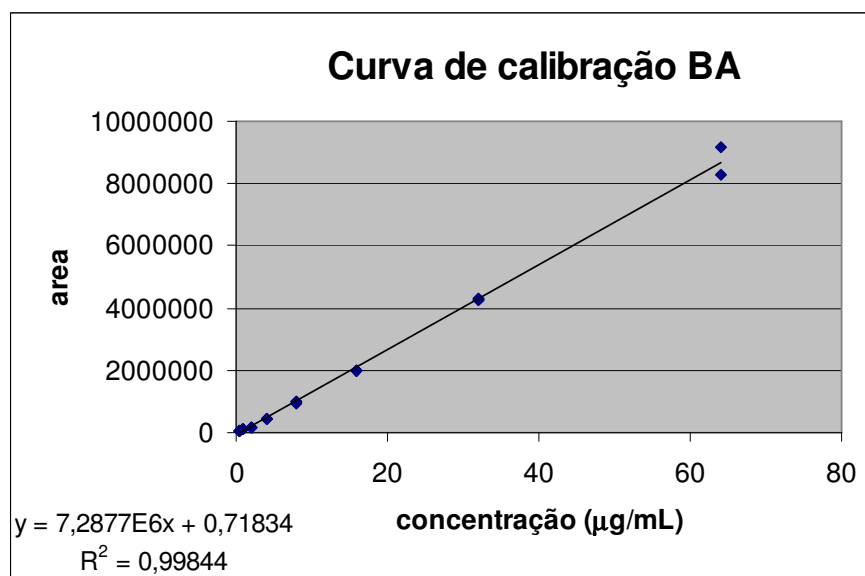


FIGURA A20 - Curva de calibração obtida para o BA.

A precisão das análises foi expressa pelo coeficiente de variação (CV%) das replicatas (n=3) e a exatidão, expressa em porcentagem, foi determinada pelo uso do software *Microsoft Excel 2000*. Foi observado que, para todas as concentrações das curvas de calibração de ambos compostos, os valores de precisão e exatidão foram excelentes (Apêndice 4 - Tabelas A35 e A36 para MA e BA, respectivamente), com valores dentro dos critérios de aceitação do método ($\leq 15\%$).

Tabela A35 – Precisão e exatidão obtidas a partir da análise das amostras do MA preparadas (n=3) em saliva artificial

Concentração (µg/mL)	Precisão (CV%)	Exatidão (%)
1,00	15,5	120
2,00	3,66	112
4,00	0,530	110
8,00	0,280	106
16,0	2,17	96,1
32,0	0,860	96,9
64,0	0,510	101
128	8,14	106

Tabela A36 – Precisão e exatidão obtidas a partir da análise das amostras do BA preparadas (n=3) em saliva artificial

Concentração (µg/mL)	Precisão (CV%)	Exatidão (%)
0,500	20,3	117
1,00	7,84	106
2,00	2,30	103
4,00	2,35	102
8,00	1,44	96,5
16,0	0,360	95,2
32,0	0,480	99,6
64,0	7,07	100

Como controles de qualidade, foram escolhidos três valores de concentrações (baixa, média e alta), em relação às concentrações utilizadas para

construir as curvas de calibração dos compostos. As concentrações de 1,20 µg/mL, 51,3 µg/mL e 109 µg/mL foram selecionadas para o MA e de 0,600 µg/mL, 25,6 µg/mL e 54,4 µg/mL para o BA.

A precisão e exatidão intradia foram avaliadas por meio do preparo e das análises em replicata (n=5) dos três controles de qualidade em um mesmo dia e a precisão e exatidão interdias, por meio de análises realizadas em três dias não consecutivos (n=15). Os resultados de todas as análises foram excelentes, com valores dentro dos critérios de aceitação do método para todas as concentrações de ambos compostos (Apêndice 4 – Tabelas A37 e A38 para o MA e BA, respectivamente).

Tabela A37 – Precisão e exatidão obtidas a partir da análise dos controles de qualidade do MA preparados (n=5) em saliva artificial

Controles (µg/mL)	Precisão (CV %)			Exatidão (%)		
	1º dia	2º dia	3º dia	1º dia	2º dia	3º dia
1,20	2,80	3,88	6,60	106	111	107
51,3	1,13	1,85	1,47	94,1	88,2	93,5
109	5,33	4,32	3,24	96,6	90,8	98,3

Tabela A38 – Precisão e exatidão obtidas a partir da análise dos controles de qualidade do BA preparados (n=5) em saliva artificial

Controles (µg/mL)	Precisão (CV %)			Exatidão (%)		
	1º dia	2º dia	3º dia	1º dia	2º dia	3º dia
0,600	9,94	7,50	5,38	108	107	107
25,6	1,43	1,75	3,72	91,8	91,0	91,1
54,4	5,27	3,45	3,23	95,2	95,8	93,2

Os limites de quantificação foram determinados como sendo 1,00 e 0,500 µg/mL para o MA e BA, respectivamente (Tabelas A35 e A36 – Apêndice

4), de modo que, para as replicatas (n=3) os valores de precisão e exatidão foram superiores a 15%.

Os limites de detecção foram determinados como sendo 0,750 e 0,100 µg/mL para o MA e BA, respectivamente, sendo estas as concentrações em que se observou um sinal três vezes maior que o ruído do detector para as replicatas (n=3).

O ensaio cego foi realizado por um outro analista, o qual preparou e analisou duas concentrações de valores intermediários, dentro das faixas de concentrações das curvas de calibração, de cada um dos compostos analisados. As amostras foram analisadas (n=3) utilizando as condições cromatográficas de análise determinadas previamente. As concentrações foram de 10,9 e 91,1 µg/mL para o MA e de 5,50 e 25,0 µg/mL para o BA. Os valores de precisão e de exatidão para este ensaio também estavam dentro do critério de aceitação do método (Tabela A39 – Apêndice 4).

Tabela A39 – Precisão e exatidão obtidas a partir da análise das amostras do ensaio cego preparadas (n=3) em saliva artificial

MA (µg/mL)	Precisão (CV %)	Exatidão (%)	BA (µg/mL)	Precisão (CV %)	Exatidão (%)
10,9	7,45	90,8	5,50	1,43	97,0
91,1	1,04	92,0	25,0	0,690	89,3

A estabilidade dos ácidos MA e BA em saliva artificial foi avaliada através da comparação entre injeções de amostras recém-preparadas nas três diferentes concentrações controles e após o armazenamento em quatro períodos (1, 2, 19 e 24 h).

As amostras foram consideradas estáveis quando a variação entre as concentrações iniciais e a concentração após cada um dos períodos foi superior a 85%. As Tabelas A40 e A41 (Apêndice 4) apresentam os resultados de estabilidade dos compostos MA e BA, respectivamente.

Tabela A40 – Resultados de estabilidade (%) em relação às amostras iniciais do MA

controle (µg/mL)	1 h	2 h	19 h	24 h
1,20	110	110	108	102
51,3	107	90,9	105	100
109	107	94,7	110	102

Tabela A41 – Resultados de estabilidade (%) em relação às amostras iniciais do BA

controle (µg/mL)	1 h	2 h	19 h	24 h
0,600	113	114	113	112
25,6	90,3	88,6	89,0	91,4
54,4	90,7	91,9	92,7	97,5

A partir desses resultados foi possível comprovar a estabilidade das soluções padrão dos ácidos em estudo, pois os valores obtidos estavam dentro da variação estabelecida pelo método de $\pm 15\%$ em relação às amostras recém-preparadas.

A porcentagem de recuperação para os ácidos também foi avaliada. As concentrações controles foram preparadas (n=3) em acetonitrila (solvente) e em saliva artificial (fluido) e analisadas imediatamente após o preparo. As Tabelas A42 e A43 (Apêndice 4) apresentam os resultados deste parâmetro para os compostos MA e BA, respectivamente.

Tabela A42 – Recuperação (%) do composto MA

controle (µg/mL)	replicatas (n=3)			média	desvio- padrão	CV %
	1	2	3			
1,20	82,5	87,4	85,0	85,0	2,47	2,91
51,3	88,4	87,8	88,0	88,1	0,310	0,360
109	85,6	83,9	82,1	83,9	1,75	2,09

Tabela A43 – Recuperação (%) do composto BA

controle ($\mu\text{g/mL}$)	replicatas (n=3)			média	desvio- padrão	CV%
	1	2	3			
0,600	89,6	87,0	89,1	88,6	1,37	1,55
25,6	91,4	92,1	92,0	91,8	0,370	0,400
54,4	86,5	84,3	88,7	86,5	2,20	2,54

As amostras de todos os materiais do grupo controle (coletas de 1 h, 3 h, 5 h, 24 h e 3 dias) foram analisadas após o congelamento (a -20°C) por um período de 14 dias e comparadas com as mesmas amostras analisadas recém-preparadas (Figuras A21 a A28 – Apêndice 4). Os resultados demonstraram a instabilidade de liberação do MA a partir das amostras de todos os materiais após período de congelamento.

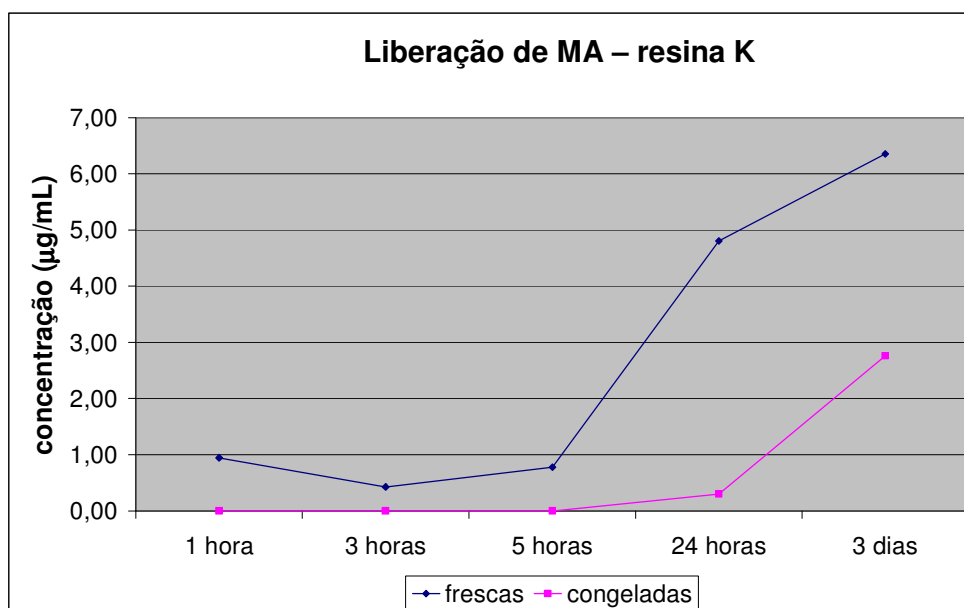


FIGURA A21 – Valores médios de liberação ($\mu\text{g/mL}$) de MA a partir da resina Kooliner (amostras frescas ou recém-preparadas e de amostras congeladas por 14 dias).

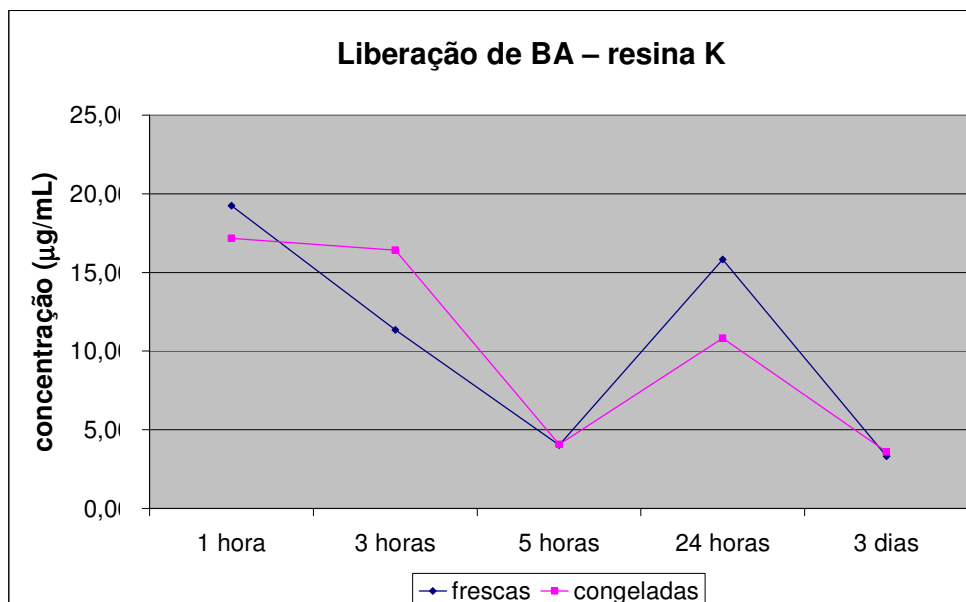


FIGURA A22 – Valores médios de liberação (µg/mL) de BA a partir da resina Kooliner (amostras frescas ou recém-preparadas e de amostras congeladas por 14 dias).

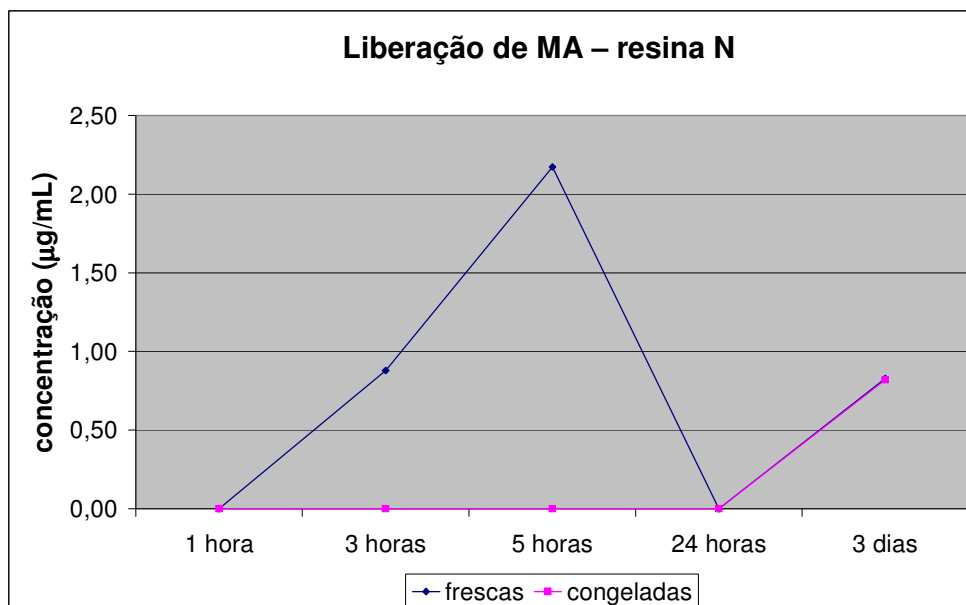


FIGURA A23 – Valores médios de liberação (µg/mL) de MA a partir da resina New Truliner (amostras frescas ou recém-preparadas e de amostras congeladas por 14 dias).

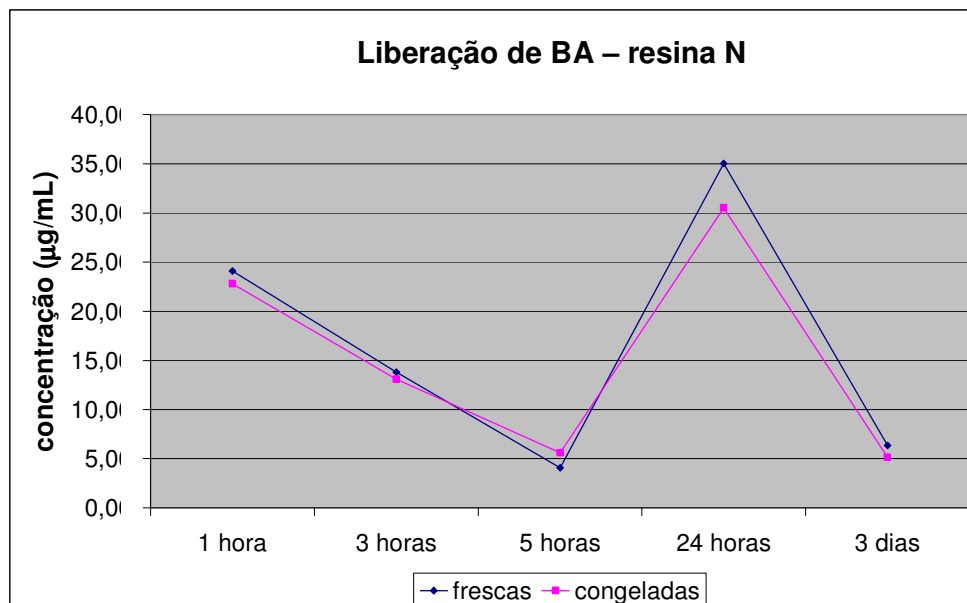


FIGURA A24 – Valores médios de liberação ($\mu\text{g/mL}$) de BA a partir da resina New Truliner (amostras frescas ou recém-preparadas e de amostras congeladas por 14 dias).

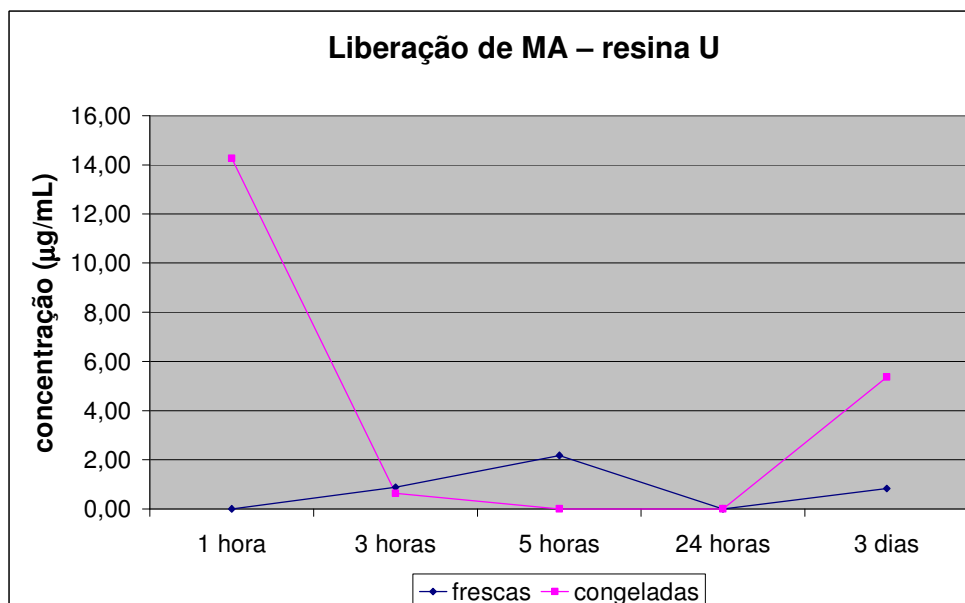


FIGURA A25 – Valores médios de liberação ($\mu\text{g/mL}$) de MA a partir da resina Ufi Gel hard (amostras frescas ou recém-preparadas e de amostras congeladas por 14 dias).

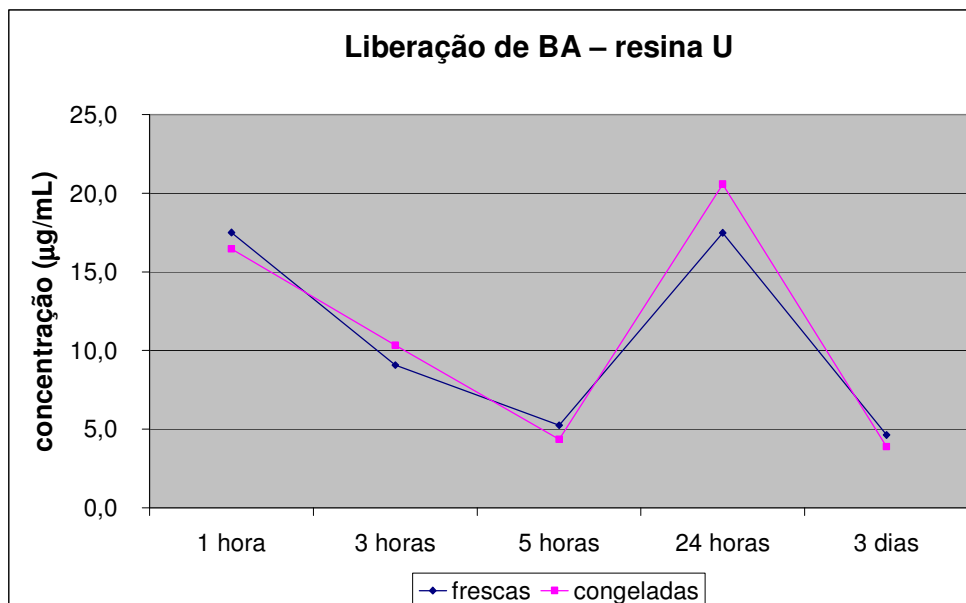


FIGURA A26 – Valores médios de liberação (µg/mL) de BA a partir da resina Ufi Gel hard (amostras frescas ou recém-preparadas e de amostras congeladas por 14 dias).

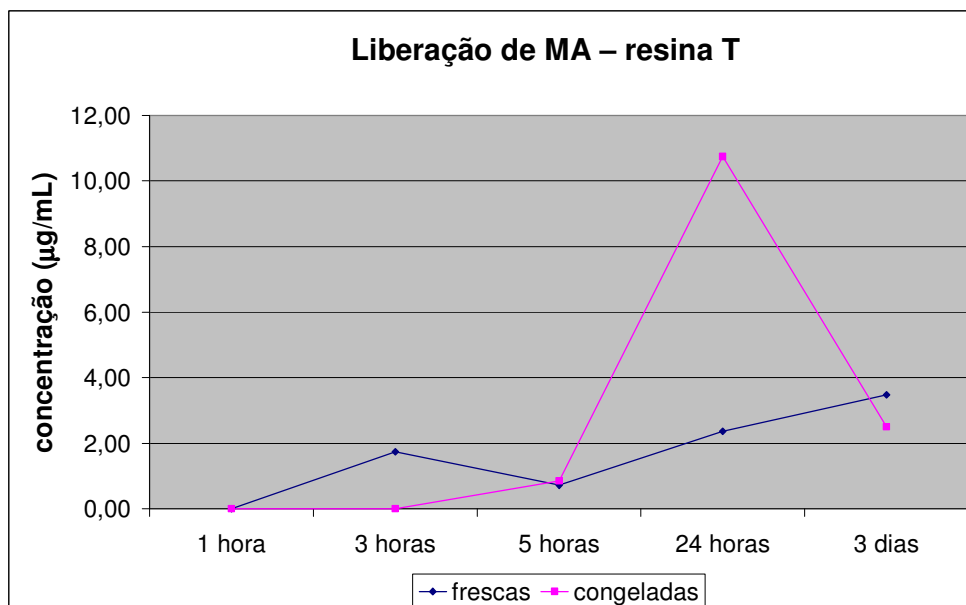


FIGURA A27 – Valores médios de liberação (µg/mL) de MA a partir da resina Tokuso Rebase Fast (amostras frescas ou recém-preparadas e de amostras congeladas por 14 dias).

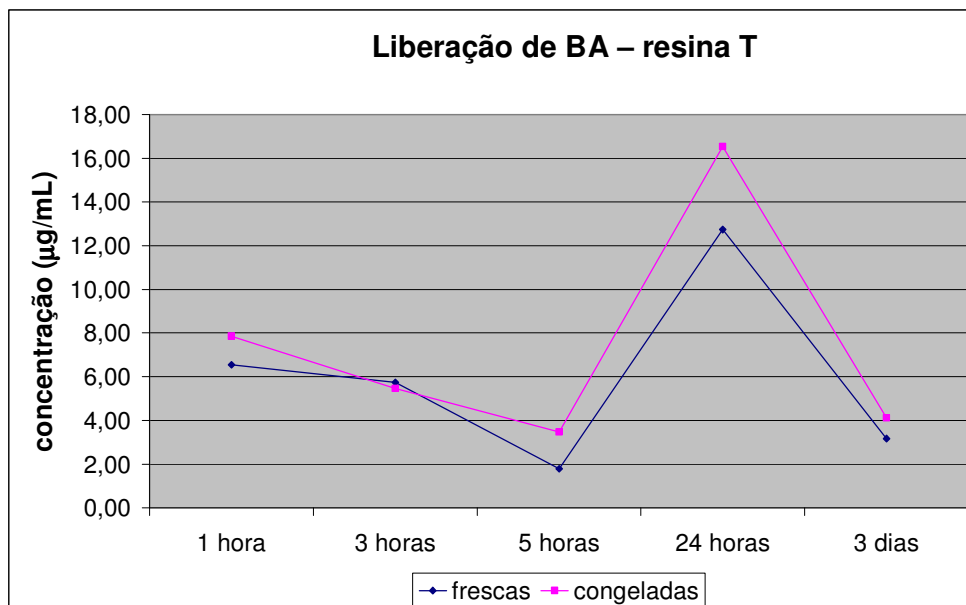


FIGURA A28 – Valores médios de liberação (µg/mL) de BA a partir da resina Tokuso Rebase Fast (amostras frescas ou recém-preparadas e de amostras congeladas por 14 dias).

7.5 Apêndice 5

Planejamento experimental para liberação in vitro dos monômeros e do plastificante

Para a análise de liberação in vitro dos monômeros e do plastificante, quatro fatores foram estabelecidos: **material**, em 4 níveis (K, N, U e T); **composto**, em 3 níveis (IBMA, 1,6-HDMA e DBNP); **tempo**, em 8 níveis (1 h, 3 h, 5 h, 24 h, 3 dias, 7 dias, 14 dias e 30 dias) e **tratamento**, em 2 níveis (C – controle e WB – imersão em banho de água aquecida a 55°C por 10 min). O número de corpos-de-prova necessário para cada condição experimental avaliada neste estudo (n=6) foi calculado com base nos resultados obtidos em estudo piloto, resultando em um número total de dados da amostra de 480.

Resultados de liberação in vitro dos monômeros e do plastificante

A concentração residual dos monômeros e do plastificante em saliva artificial foi determinada por CLAE. Os valores de liberação in vitro para cada material em cada grupo experimental estão apresentados nas Tabelas A44 a A48 (Apêndice 5).

Tabela A44 – Liberação de IBMA (µg/mL) a partir da resina K

Grupo	Amostra	Concentração (µg/mL)							
		n=6	1h	3h	5h	24h	3d	7d	14d
C	1	102	53,7	6,89	11,6	1,50	0,850	0,600	-*
	2	96,8	48,2	4,67	10,4	1,30	0,700	0,530	-
	3	77,7	47,5	9,32	13,3	0,920	1,02	0,680	-
	4	75,9	47,3	12,9	13,1	0,900	0,860	0,650	-
	5	88,8	50,9	13,3	9,85	3,79	0,900	0,910	-
	6	88,3	33,7	12,5	9,17	2,22	0,820	0,700	-
WB	1	7,58	5,52	1,90	3,77	-	-	-	-
	2	4,77	2,96	1,26	2,73	-	-	-	-
	3	9,24	2,75	1,49	3,92	-	-	-	-
	4	14,5	2,45	1,45	3,55	-	-	-	-
	5	4,19	1,48	1,01	1,99	-	-	-	-
	6	4,36	2,67	1,42	2,27	-	-	-	-

* concentrações não-detectáveis.

Tabela A45 – Liberação de IBMA (µg/mL) a partir da resina N

Grupo	Amostra	Concentração (µg/mL)							
		n=6	1h	3h	5h	24h	3d	7d	14d
C	1	62,1	46,2	25,0	14,0	2,27	1,07	-	-
	2	41,8	26,9	10,0	10,2	1,81	-	-	-
	3	60,7	28,5	16,3	14,7	2,96	-	-	-
	4	71,0	41,4	17,8	9,24	1,91	-	-	-
	5	67,7	53,6	13,1	11,6	2,29	-	-	-
	6	40,9	26,6	16,3	7,57	1,78	-	-	-
WB	1	0,700	0,910	0,830	2,22	0,950	-	-	-
	2	1,21	1,80	-	2,06	0,810	-	-	-
	3	1,39	0,860	0,500	-	-	-	-	-
	4	1,30	1,83	4,50	-	-	-	-	-
	5	0,900	0,700	1,07	-	-	-	-	-
	6	-	1,43	1,08	-	-	-	-	-

Tabela A46 – Liberação de DBNP (µg/mL) a partir da resina N

Grupo	Amostra n=6	Concentração (µg/mL)							
		1h	3h	5h	24h	3d	7d	14d	30d
C	1	0,420	0,610	0,520	0,340	-	-	-	-
	2	0,440	0,470	0,370	0,260	-	-	-	-
	3	0,480	0,540	0,480	0,320	-	-	-	-
	4	0,420	0,570	0,520	0,310	-	-	-	-
	5	0,450	0,480	0,440	-	-	-	-	-
	6	0,510	0,570	0,480	0,330	-	-	-	-
WB	1	0,340	0,300	-	-	-	-	-	-
	2	-	-	-	-	-	-	-	-
	3	0,280	0,270	-	-	-	-	-	-
	4	-	-	0,430	-	-	-	-	-
	5	-	-	-	-	-	-	-	-
	6	0,280	0,270	-	-	-	-	-	-

Tabela A47 – Liberação de 1,6-HDMA (µg/mL) a partir da resina U

Grupo	Amostra n=6	Concentração (µg/mL)							
		1h	3h	5h	24h	3d	7d	14d	30d
C	1	5,66	5,58	5,80	5,95	4,02	1,42	-	-
	2	6,02	5,30	6,24	6,23	4,18	1,49	-	-
	3	4,87	5,55	5,26	4,36	3,13	0,990	-	-
	4	5,56	5,66	5,50	4,65	2,89	1,12	-	-
	5	3,84	4,96	3,09	3,46	2,31	1,09	-	-
	6	3,97	5,27	3,02	3,65	2,08	1,13	-	-
WB	1	3,72	5,67	4,92	4,62	2,86	1,94	-	-
	2	3,79	5,87	4,20	4,38	3,32	1,91	-	-
	3	2,33	2,76	4,21	2,57	1,69	1,93	-	-
	4	2,36	2,79	3,51	2,61	1,46	1,27	-	-
	5	4,04	4,58	4,65	4,23	2,32	1,33	-	-
	6	4,52	4,32	3,97	4,33	2,28	1,21	-	-

Tabela A48 – Liberação de 1,6-HDMA ($\mu\text{g/mL}$) a partir da resina T

Grupo	Amostra	Concentração (µg/mL)							
		n=6	1h	3h	5h	24h	3d	7d	14d
C	1	1,53	1,68	1,65	1,53	-	-	-	-
	2	1,37	1,66	1,73	1,33	-	-	-	-
	3	1,77	1,91	1,22	1,65	0,970	-	-	-
	4	1,70	1,38	1,32	1,12	-	-	-	-
	5	1,24	1,47	1,23	1,16	-	-	-	-
	6	1,15	1,09	1,12	0,910	-	-	-	-
WB	1	1,39	1,18	2,62	1,14	-	-	-	-
	2	0,740	0,830	-	0,710	-	-	-	-
	3	1,19	2,25	-	0,940	-	-	-	-
	4	1,00	0,940	1,03	0,840	-	-	-	-
	5	0,820	0,810	-	-	-	-	-	-
	6	1,12	1,03	1,00	-	-	-	-	-

Análise estatística de liberação in vitro dos monômeros e do plastificante

A análise estatística foi realizada para os todos os materiais (K, N, U e T), comparando-se os dois grupos experimentais avaliados (C e WB) para cada um dos compostos liberados (IBMA, 1,6-HDMA e DBNP) durante os períodos de imersão em saliva artificial (1 h, 3 h, 5 h, 24 h, 3 dias, 7 dias, 14 dias e 30 dias).

Foram utilizados métodos não-paramétricos para a análise dos dados, uma vez que não foi possível comprovar a normalidade, nem mesmo aproximada, destes valores. O teste de Mann-Whitney foi utilizado para a comparação de amostras independentes e o de Wilcoxon para a comparação de dados pareados, ambos em nível de 5% de significância.

Nas Tabelas A49 a A51 (Apêndice 5) são apresentadas as estatísticas descritivas (mínimo, máximo, mediana e média) das concentrações de IBMA, 1,6-HDMA e DBNP, respectivamente, liberadas a partir dos materiais avaliados. São apresentados, ainda, os valores-p do teste de Wilcoxon para as comparações entre os períodos de avaliação e do teste de Mann-Whitney para as

comparações entre os grupos experimentais, em cada material, e entre os materiais, em cada período de avaliação.

Tabela A49 – Estatísticas descritivas [mínimo (mín), máximo (máx), mediana (med), média (m) e valores-p] das concentrações de IBMA liberadas a partir de amostras dos materiais K e N, submetidas (WB) ou não (C) a tratamento

Mat.	Grupo n=6	Estat.	Concentração (µg/mL)							
			1h	3h	5h	24h	3d	7d	14d	30d
K	C	mín	75,9	33,7	4,67	9,17	0,900	0,700	0,530	-
		máx	102	53,7	13,3	13,3	3,79	1,02	0,910	-
		med	88,6	47,9	10,9	11,0	1,40	0,850	0,670	-
		m	88,2	46,9	9,93	11,2	1,77	0,860	0,680	-
		Período*		0,028	0,028	0,249	0,028	0,075	0,046	0,028
	WB	mín	4,19	1,48	1,01	1,99	-	-	-	-
		máx	14,5	5,52	1,90	3,92	-	-	-	-
		med	6,17	2,71	1,43	3,14	-	-	-	-
		m	7,43	2,97	1,42	3,04	-	-	-	-
		Período*		0,028	0,028	0,028	0,028	1,00	1,00	1,00
	C x WB**		0,004	0,004	0,004	0,004	0,004	0,004	0,004	1,00
N	C	mín	40,9	26,6	10,0	7,57	1,78	-	-	-
		máx	71,0	53,6	25,0	14,7	2,96	1,07	-	-
		med	61,4	34,9	16,3	10,9	2,09	-	-	-
		m	57,4	37,2	16,4	11,2	2,17	0,180	-	-
		Período*		0,028	0,028	0,046	0,028	0,028	1,00	1,00
	WB	mín	-	0,700	-	-	-	-	-	-
		máx	1,39	1,83	4,50	2,22	0,950	-	-	-
		med	1,05	1,17	0,950	-	-	-	-	-
		m	0,920	1,25	1,33	0,710	0,290	-	-	-
		Período*		0,173	0,917	0,753	1,00	1,00	1,00	1,00
	C x WB**		0,004	0,004	0,004	0,004	0,004	0,631	1,00	1,00
	K x N** (C)		0,004	0,078	0,025	1,00	0,150	0,055	0,004	1,00
	K x N** (WB)		0,004	0,010	0,109	0,010	0,337	1,00	1,00	1,00

* p da comparação entre cada período de armazenamento e o anterior por Wilcoxon.

** p da comparação entre os grupos experimentais e os materiais por Mann-Whitney.

Tabela A50 – Estatísticas descritivas [mínimo (mín), máximo (máx), mediana (med), média (m) e valores-p] das concentrações de DBNP liberadas a partir de amostras do material N, submetidas (WB) ou não (C) a tratamento

Mat.	Grupo	Estat.	Concentração (µg/mL)							
			1h	3h	5h	24h	3d	7d	14d	30d
N	C	mín	0,420	0,470	0,370	-	-	-	-	-
		máx	0,510	0,610	0,520	0,340	-	-	-	-
		med	0,450	0,550	0,480	0,320	-	-	-	-
		m	0,450	0,540	0,470	0,260	-	-	-	-
		Período*		0,028	0,028	0,028	0,043	1,00	1,00	1,00
	WB	mín	-	-	-	-	-	-	-	-
		máx	0,340	0,300	0,430	-	-	-	-	-
		med	0,140	0,140	-	-	-	-	-	-
		m	0,150	0,140	0,070	-	-	-	-	-
		Período*		0,109	0,715	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
C x WB**		0,004	0,004	0,006	0,016	1,00	1,00	1,00	1,00	

* p da comparação entre cada período de armazenamento e o anterior por Wilcoxon.

** p da comparação entre os grupos experimentais por Mann-Whitney.

Tabela A51 – Estatísticas descritivas [mínimo (mín), máximo (máx), mediana (med), média (m) e valores-p] das concentrações de 1,6-HDMA liberadas a partir de amostras dos materiais U e T, submetidas (WB) ou não (C) a tratamento

Mat.	Trat.	Estat.	Concentração (µg/mL)							
			1h	3h	5h	24h	3d	7d	14d	30d
U	C	mín	3,84	4,96	3,02	3,46	2,08	0,990	-	-
		máx	6,02	5,66	6,24	6,23	4,18	1,49	-	-
		med	5,22	5,43	5,38	4,51	3,01	1,13	-	-
		m	4,99	5,39	4,82	4,72	3,10	1,21	-	-
		Período*		0,249	0,345	0,753	0,028	0,028	0,028	1,00
	WB	mín	2,33	2,76	3,51	2,57	1,46	1,21	-	-
		máx	4,52	5,87	4,92	4,62	3,32	1,94	-	-
		med	3,76	4,45	4,21	4,28	2,30	1,62	-	-
		m	3,46	4,33	4,24	3,79	2,32	1,60	-	-
		Período*		0,046	0,753	0,173	0,028	0,075	0,028	1,00
	C x WB**		0,025	0,337	0,337	0,200	0,150	0,055	1,00	1,00
T	C	mín	1,15	1,09	1,12	0,910	-	-	-	-
		máx	1,77	1,91	1,73	1,65	0,970	-	-	-
		med	1,45	1,57	1,28	1,25	-	-	-	-
		m	1,46	1,53	1,38	1,28	0,160	-	-	-
		Período*		0,463	0,345	0,345	0,028	1,00	1,00	1,00
	WB	mín	0,740	0,810	-	-	-	-	-	-
		máx	1,39	2,25	2,62	1,14	-	-	-	-
		med	1,06	0,980	0,500	0,780	-	-	-	-
		m	1,04	1,17	0,770	0,610	-	-	-	-
		Período*		0,753	0,463	0,500	0,068	1,00	1,00	1,00
	C x WB**		0,025	0,078	0,055	0,016	0,631	1,00	1,00	1,00
U x T** (C)		0,004	0,004	0,004	0,004	0,004	0,004	1,00	1,00	
U x T** (WB)		0,004	0,004	0,004	0,004	0,004	0,004	1,00	1,00	

* p da comparação entre cada período de armazenamento e o anterior por Wilcoxon.

** p da comparação entre os grupos experimentais e os materiais por Mann-Whitney.

7.6 Apêndice 6

Planejamento experimental para liberação in vitro dos ácidos de degradação

Para a análise de liberação in vitro dos ácidos de degradação, quatro fatores foram estabelecidos: **material**, em 4 níveis (K, N, U e T); **composto**, em 2 níveis (MA e BA); **tempo**, em 8 níveis (1 h, 3 h, 5 h, 24 h, 3 dias, 7 dias, 14 dias e 30 dias) e **tratamento**, em 2 níveis (C – controle e WB – imersão em banho de água aquecida a 55°C por 10 min). O número de corpos-de-prova necessário para cada condição experimental avaliada neste estudo (n=6) foi calculado com base nos resultados obtidos em estudo piloto, resultando em um número total de dados da amostra de 768.

Resultados de liberação in vitro dos ácidos de degradação

A concentração residual dos ácidos de degradação em saliva artificial foi determinada por CLAE. Os valores de liberação in vitro para cada material em cada grupo experimental estão apresentados nas Tabelas A52 a A59 (Apêndice 6).

Tabela A52 – Liberação de MA (µg/mL) a partir da resina K

Grupo	Amostra	Concentração (µg/mL)								
		n=6	1h	3h	5h	24h	3d	7d	14d	30d
C	1	2,91	-*	-	-	-	-	-	-	-
	2	-	-	2,67	28,8	-	-	2,69	-	-
	3	2,75	2,55	-	-	-	-	-	-	-
	4	-	-	-	-	7,52	-	2,50	-	-
	5	-	-	-	-	14,8	-	3,11	-	-
	6	-	-	2,01	-	15,8	-	-	-	-
WB	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	-	1,98	-	-	4,39	4,13	-	-	-
	3	-	-	-	-	-	-	-	-	3,26
	4	-	-	-	-	-	-	-	-	3,49
	5	-	-	-	1,88	4,26	-	-	-	2,37
	6	-	-	-	1,78	-	-	-	-	1,95

* concentrações não-detectáveis.

Tabela A53 – Liberação de BA (µg/mL) a partir da resina K

Grupo	Amostra	Concentração (µg/mL)							
		n=6	1h	3h	5h	24h	3d	7d	14d
C	1	41,2	6,42	2,68	37,4	5,95	3,40	2,80	1,45
	2	6,05	5,91	1,85	-	1,80	-	-	-
	3	39,3	39,2	11,2	30,7	5,22	3,54	2,87	1,40
	4	5,63	5,84	2,38	10,5	5,27	2,91	2,03	1,28
	5	10,5	5,73	3,05	7,15	0,840	-	-	0,770
	6	12,8	4,96	2,88	9,16	0,850	-	-	-
WB	1	1,79	1,74	5,26	9,03	4,47	2,48	1,02	-
	2	1,39	1,77	2,07	12,1	3,03	2,00	-	-
	3	1,58	1,94	1,18	7,11	2,70	1,81	0,810	-
	4	1,86	0,980	-	-	-	-	-	0,760
	5	1,59	0,900	-	1,09	-	-	-	0,820
	6	1,79	1,34	0,860	7,08	-	1,25	-	-

Tabela A54 – Liberação de MA (µg/mL) a partir da resina N

Grupo	Amostra n=6	Concentração (µg/mL)							
		1h	3h	5h	24h	3d	7d	14d	30d
C	1	-	2,52	3,33	-	-	-	-	-
	2	-	-	-	-	-	-	-	-
	3	-	-	-	-	-	-	-	-
	4	-	-	2,92	-	-	2,62	-	-
	5	-	-	2,28	-	-	-	-	-
	6	-	2,76	4,52	-	4,97	-	-	-
WB	1	-	-	-	-	-	-	-	6,06
	2	-	3,26	-	-	-	-	-	-
	3	-	-	-	-	-	-	-	4,56
	4	-	-	-	-	-	-	-	4,38
	5	-	-	-	5,52	-	-	-	-
	6	-	2,56	2,19	-	2,36	-	-	-

Tabela A55 – Liberação de BA (µg/mL) a partir da resina N

Grupo	Amostra n=6	Concentração (µg/mL)							
		1h	3h	5h	24h	3d	7d	14d	30d
C	1	35,5	24,3	8,41	39,7	10,0	6,45	5,06	2,67
	2	15,3	9,05	3,33	32,8	1,20	-	1,02	-
	3	39,4	11,0	5,26	44,2	8,10	6,62	4,74	2,31
	4	34,8	14,8	5,35	31,9	7,96	4,99	3,51	1,85
	5	9,24	11,5	1,04	31,1	4,63	0,880	-	0,890
	6	10,3	12,2	1,22	30,6	6,24	-	-	1,03
WB	1	2,21	5,55	2,41	9,50	5,12	6,00	2,23	-
	2	2,70	3,00	1,77	7,05	-	-	0,890	-
	3	3,90	2,85	4,09	21,9	4,76	-	-	-
	4	4,64	4,68	3,58	21,0	5,53	5,62	1,68	-
	5	1,17	-	0,860	8,28	7,50	0,990	-	0,800
	6	3,70	2,12	1,37	11,7	2,27	-	-	-

Tabela A56 – Liberação de MA ($\mu\text{g/mL}$) a partir da resina U

Grupo	Amostra	Concentração ($\mu\text{g/mL}$)							
	n=6	1h	3h	5h	24h	3d	7d	14d	30d
C	1	18,4	2,38	-	-	-	-	-	-
	2	8,64	2,57	2,12	5,03	5,45	2,08	1,73	-
	3	21,9	2,58	-	2,12	-	-	-	-
	4	17,5	4,95	2,02	2,89	-	-	-	-
	5	20,5	-	1,87	2,16	-	-	-	-
	6	12,5	2,58	3,59	1,47	29,7	2,11	-	-
WB	1	-	-	-	-	-	2,01	2,33	5,01
	2	2,31	2,43	2,45	2,72	-	-	-	-
	3	2,64	2,07	-	-	-	2,14	1,98	7,05
	4	-	-	-	4,32	16,0	2,38	-	-
	5	-	-	-	2,77	-	3,25	-	-
	6	3,58	2,27	2,23	1,71	12,7	-	-	-

Tabela A57 – Liberação de BA ($\mu\text{g/mL}$) a partir da resina U

Grupo	Amostra	Concentração ($\mu\text{g/mL}$)							
	n=6	1h	3h	5h	24h	3d	7d	14d	30d
C	1	19,9	8,00	4,37	18,9	3,43	3,11	2,06	1,49
	2	15,2	5,29	1,73	9,59	0,840	-	0,780	-
	3	20,4	9,47	9,13	16,2	5,28	2,99	2,41	1,42
	4	14,0	17,7	6,37	24,8	7,17	3,55	2,89	1,68
	5	17,2	9,11	4,78	16,9	5,66	3,15	2,23	1,71
	6	18,3	4,94	5,10	18,6	5,43	3,09	2,52	1,23
WB	1	3,60	3,18	3,33	5,71	2,75	1,22	1,07	-
	2	3,56	1,87	1,73	0,930	1,09	-	-	-
	3	5,42	3,39	3,66	13,7	2,98	0,850	0,870	-
	4	4,41	4,46	2,27	13,6	3,24	1,34	0,910	-
	5	1,03	-	-	1,36	4,89	-	-	-
	6	2,50	1,68	1,12	7,45	-	-	-	-

Tabela A58 – Liberação de MA ($\mu\text{g/mL}$) a partir da resina T

Grupo	Amostra n=6	Concentração ($\mu\text{g/mL}$)							
		1h	3h	5h	24h	3d	7d	14d	30d
C	1	-	3,26	2,21	2,38	10,1	-	-	-
	2	-	-	-	-	-	-	-	-
	3	-	3,20	-	-	-	-	-	-
	4	-	-	-	5,17	1,59	1,50	-	-
	5	-	-	-	4,99	4,72	4,20	-	-
	6	-	3,97	2,10	1,61	4,51	-	-	-
WB	1	-	-	-	-	-	2,76	-	3,85
	2	-	1,77	-	3,46	8,74	-	-	-
	3	-	-	-	-	-	3,30	-	4,08
	4	2,36	4,49	2,15	1,97	2,17	-	-	-
	5	2,92	3,50	2,63	-	3,91	-	-	-
	6	-	-	-	2,06	4,95	-	-	-

Tabela A59 – Liberação de BA ($\mu\text{g/mL}$) a partir da resina T

Grupo	Amostra n=6	Concentração ($\mu\text{g/mL}$)							
		1h	3h	5h	24h	3d	7d	14d	30d
C	1	4,60	3,25	1,20	13,3	0,880	-	-	-
	2	7,38	5,46	3,69	12,9	4,52	2,60	2,14	1,11
	3	5,46	10,4	3,79	11,8	4,89	2,53	1,82	0,910
	4	9,19	6,07	1,18	7,43	5,65	0,830	-	0,770
	5	6,87	6,93	-	16,3	2,26	-	-	0,780
	6	5,85	2,39	0,930	14,8	0,870	-	-	-
WB	1	1,01	1,25	1,08	2,32	0,810	-	-	-
	2	2,68	6,11	3,83	12,9	1,67	1,79	-	-
	3	2,12	5,44	3,75	12,0	1,80	1,72	-	-
	4	1,00	0,910	0,810	0,960	-	-	-	-
	5	-	0,800	0,770	1,32	-	-	-	-
	6	0,980	1,09	0,910	7,41	-	-	-	-

Análise estatística de liberação in vitro dos ácidos de degradação

A análise estatística foi realizada para os todos os materiais (K, N, U e T), comparando-se os dois grupos experimentais avaliados (C e WB) para cada um dos compostos liberados (MA e BA) durante os períodos de imersão em saliva artificial (1 h, 3 h, 5 h, 24 h, 3 dias, 7 dias, 14 dias e 30 dias).

Foram utilizados métodos não-paramétricos para a análise dos dados, uma vez que não foi possível comprovar a normalidade, nem mesmo aproximada, destes valores. O teste de Mann-Whitney foi utilizado para a comparação de duas amostras independentes, o de Wilcoxon para a comparação de duas amostras pareadas e o de Kruskal-Wallis para a comparação de mais de duas amostras independentes, ambos em nível de 5% de significância.

Nas Tabelas A60 e A61 (Apêndice 6) são apresentadas as estatísticas descritivas (mínimo, máximo, mediana e média) das concentrações ($\mu\text{g/mL}$) de MA e BA, respectivamente, liberadas a partir dos materiais avaliados. São apresentados, ainda, os valores-p do teste de Wilcoxon para as comparações entre os períodos de avaliação, do teste de Mann-Whitney para as comparações entre os grupos experimentais em cada material e do teste de Kruskal-Wallis para as comparações entre os materiais em cada período de avaliação.

Tabela A60 – Estatísticas descritivas [mínimo (mín), máximo (máx), mediana (med), média (m) e valores-p] das concentrações de MA liberadas a partir de amostras dos materiais K, N, U e T submetidas (WB) ou não (C) a tratamento

Mat.	Grupo n=6	Estat.	Concentração (µg/mL)							
			1h	3h	5h	24h	3d	7d	14d	30d
K	C	mín	-	-	-	-	-	-	-	-
		máx	2,91	2,55	2,67	28,8	15,8	-	3,11	-
		med	-	-	-	-	3,76	-	1,25	-
		m	0,940	0,430	0,780	4,80	6,35	-	1,38	-
		Período*		1,00	0,593	1,00	0,715	0,109	0,109	0,109
	WB	mín	-	-	-	-	-	-	-	-
		máx	-	1,98	-	1,88	4,39	4,13	-	3,49
		med	-	-	-	-	-	-	-	2,16
		m	-	0,330	-	0,610	1,44	0,690	-	1,85
		Período*		1,00	1,00	1,00	0,285	1,00	1,00	0,068
	C x WB**		0,337	0,936	0,337	0,749	0,337	0,631	0,150	0,055
N	C	mín	-	-	-	-	-	-	-	-
		máx	-	2,76	4,52	-	4,97	2,62	-	-
		med	-	-	2,60	-	-	-	-	-
		m	-	0,880	2,17	-	0,830	0,440	-	-
		Período*		1,00	0,068	0,068	1,00	1,00	1,00	1,00
	WB	mín	-	-	-	-	-	-	-	-
		máx	-	3,26	2,19	5,52	2,36	-	-	6,06
		med	-	-	-	-	-	-	-	2,19
		m	-	0,970	0,360	0,920	0,390	-	-	2,50
		Período*		1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,109
	C x WB**		1,00	0,873	0,078	0,631	0,936	0,631	1,00	0,150
U	C	mín	8,64	-	-	-	-	-	-	-
		máx	21,9	4,95	3,59	5,03	29,7	2,11	1,73	-
		med	17,9	2,57	1,95	2,14	-	-	-	-
		m	16,6	2,51	1,60	2,28	5,86	0,700	0,290	-
		Período*		0,028	0,249	0,225	0,686	1,00	1,00	1,00
	WB	mín	-	-	-	-	-	-	-	-
		máx	3,58	2,43	2,45	4,32	16,0	3,25	2,33	7,05
		med	1,16	1,04	-	2,21	-	2,08	-	-
		m	1,42	1,13	0,780	1,92	4,77	1,63	0,720	2,01
		Período*		0,285	0,285	0,273	0,465	0,686	0,273	1,00
	C x WB**		0,004	0,045	0,522	0,749	1,00	0,200	0,522	0,337
T	C	mín	-	-	-	-	-	-	-	-
		máx	-	3,97	2,21	5,17	10,1	4,20	-	-
		med	-	1,60	-	1,99	3,05	-	-	-
		m	-	1,74	0,720	2,36	3,48	0,950	-	-
		Período*		0,109	0,109	0,273	0,715	0,068	1,00	1,00
	WB	mín	-	-	-	-	-	-	-	-
		máx	2,92	4,49	2,63	3,46	8,74	3,30	-	4,08
		med	-	0,890	-	0,980	3,04	-	-	-

	m	0,880	1,63	0,800	1,25	3,30	1,01	-	1,32
Período*			0,109	0,109	0,715	0,068	0,249	1,00	1,00
C x WB**		0,337	0,936	0,873	0,423	1,00	1,00	1,00	0,337
Mat. C***		<0,001	0,127	0,257	0,037	0,461	0,480	0,059	1,00
Mat. WB***		0,093	0,528	0,425	0,387	0,392	0,165	0,10	0,850

* p da comparação entre cada período de armazenamento e o anterior no mesmo grupo experimental em cada material por Wilcoxon.

** p da comparação entre os grupos experimentais no mesmo material em cada período de armazenamento por Mann-Whitney.

*** p da comparação entre materiais no mesmo grupo experimental em cada período de armazenamento por Kruskal-Wallis.

Tabela A61 – Estatísticas descritivas [mínimo (mín), máximo (máx), mediana (med), média (m) e valores-p] das concentrações de BA liberadas a partir de amostras dos materiais K, N, U e T submetidas (WB) ou não (C) a tratamento

Mat.	Grupo n=6	Estat.	Concentração (µg/mL)							
			1h	3h	5h	24h	3d	7d	14d	30d
K	C	mín	5,63	4,96	1,85	-	0,840	-	-	-
		máx	41,2	39,2	11,2	37,4	5,95	3,54	2,87	1,45
		med	11,7	5,87	2,78	9,83	3,51	1,45	1,01	1,03
		m	19,2	11,3	4,01	15,8	3,32	1,64	1,28	0,820
		Período*		0,116	0,028	0,046	0,046	0,028	0,109	0,273
	WB	mín	1,39	0,900	-	-	-	-	-	-
		máx	1,86	1,94	5,26	12,1	4,47	2,48	1,02	0,820
		med	1,69	1,54	1,02	7,09	1,35	1,53	-	-
		m	1,67	1,44	1,56	6,06	1,70	1,26	0,300	0,260
		Período*		0,249	0,463	0,043	0,043	0,465	0,068	0,715
	C x WB**		0,004	0,004	0,055	0,173	0,150	0,631	0,337	0,150
N	C	mín	9,24	9,05	1,04	30,6	1,20	-	-	0,00
		máx	39,4	24,3	8,41	44,2	10,0	6,62	5,06	2,67
		med	25,0	11,8	4,29	32,3	7,10	2,93	2,26	1,44
		m	24,1	13,8	4,10	35,0	6,36	3,16	2,39	1,46
		Período*		0,116	0,028	0,028	0,028	0,028	0,138	0,173
	WB	mín	1,17	-	0,860	7,05	-	-	-	-
		máx	4,64	5,55	4,09	21,9	7,50	6,00	2,23	0,800
		med	3,20	2,92	2,09	10,6	4,94	0,500	0,450	-
		m	3,05	3,03	2,35	13,2	4,20	2,10	0,800	0,130
		Período*		0,753	0,463	0,028	0,028	0,225	0,144	0,144
	C x WB**		0,004	0,004	0,337	0,004	0,200	0,522	0,262	0,020
U	C	mín	14,0	4,94	1,73	9,59	0,840	-	0,780	-
		máx	20,4	17,7	9,13	24,8	7,17	3,55	2,89	1,71
		med	17,8	8,55	4,94	17,8	5,35	3,10	2,32	1,46
		m	17,5	9,08	5,25	17,5	4,63	2,65	2,15	1,25
		Período*		0,046	0,046	0,028	0,028	0,028	0,173	0,028
	WB	mín	1,03	-	-	0,930	-	-	-	-
		máx	5,42	4,46	3,66	13,7	4,89	1,34	1,07	-
		med	3,58	2,53	2,00	6,58	2,86	0,420	0,430	-
		m	3,42	2,43	2,02	7,11	2,49	0,570	0,480	-
		Período*		0,046	0,500	0,046	0,173	0,043	0,285	0,109
	C x WB**		0,004	0,004	0,025	0,010	0,055	0,031	0,016	0,016
T	C	mín	4,60	2,39	-	7,43	0,870	-	-	-
		máx	9,19	10,4	3,79	16,3	5,65	2,60	2,14	1,11
		med	6,36	5,77	1,19	13,1	3,39	0,410	-	0,770
		m	6,56	5,74	1,80	12,7	3,18	0,990	0,660	0,600
		Período*		0,463	0,028	0,028	0,028	0,028	0,109	0,465
	WB	mín	-	0,800	0,770	0,960	-	-	-	-
		máx	2,68	6,11	3,83	12,9	1,80	1,79	-	-
		med	1,01	1,17	1,00	4,86	0,410	-	-	-

	m	1,30	2,60	1,86	6,14	0,710	0,580	-	-
	Período*	0,046	0,028	0,028	0,028	0,593	1,00	1,00	
C x WB**		0,004	0,055	0,749	0,025	0,025	0,522	0,337	0,055
Mat. C***		0,013	0,041	0,090	0,008	0,132	0,243	0,150	0,131
Mat. WB***		0,016	0,456	0,641	0,293	0,065	0,535	0,205	0,262

* p da comparação entre cada período de armazenamento e o anterior no mesmo grupo experimental em cada material por Wilcoxon.

** p da comparação entre os grupos experimentais no mesmo material em cada período de armazenamento por Mann-Whitney.

*** p da comparação entre materiais no mesmo grupo experimental em cada período de armazenamento por Kruskal-Wallis.

8 Resumo

Urban VM. Efeito de tratamentos pós-polimerização sobre o peso molecular, o grau de conversão, a temperatura de transição vítrea e a liberação in vitro de monômero residual, plastificante e produtos de degradação de resinas acrílicas para reembasamento imediato [Tese de Doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2007.

Os objetivos deste estudo foram avaliar: 1. o efeito de tratamentos pós-polimerização (MW-irradiação por energia de microondas e WB-imersão em água aquecida) sobre o grau de conversão (DC) de resinas acrílicas para reembasamento imediato (Ufi Gel hard-U, Kooliner-K e Tokuso Rebase Fast-T) e de uma resina acrílica para base de prótese (Lucitone 550-L), submetida a dois ciclos de polimerização (LS-curto e LL-longo) por espectroscopia FT-Raman; 2. o peso molecular ($\overline{M}_w$) do pré-polímero dos materiais U, K, T e L e das amostras polimerizadas da resina K (controle; MW e WB) por GPC; 3. o efeito de MW e WB na temperatura de transição vítrea (T_g) das resinas para reembasamento imediato (Duraliner II-D, K, New Truliner-N, U e T) e da resina para base de prótese (LS e LL) por DSC; 4. o efeito de WB na liberação de compostos residuais (isobutil metacrilato-IBMA, 1,6-hexanediol dimetacrilato-1,6-HDMA e DBNP-dibutil-*n*-ftalato) a partir das resinas para reembasamento imediato K, N, U e T para saliva artificial por CLAE; 5. o efeito de WB na liberação de produtos de degradação (ácido metacrílico-MA e ácido benzóico-BA) a partir das resinas para reembasamento imediato K, N, U e T para saliva artificial por CLAE. Amostras do grupo controle não foram submetidas a nenhum tratamento. Os resultados de DC (%) foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis ($\alpha=0,05$). Os resultados de T_g (°C) foram analisados pela análise de variância (ANOVA), seguido pelo teste de Tukey ($\alpha=0,05$). Os resultados da liberação de monômero

residual e plastificante ($\mu\text{g/mL}$) foram submetidos aos testes de Wilcoxon ou de Mann-Whitney ($\alpha=0,05$). Os resultados da liberação de produtos de degradação ($\mu\text{g/mL}$) foram submetidos aos testes de Wilcoxon, Mann-Whitney ou Kruskal-Wallis ($\alpha=0,05$). Para as amostras do grupo controle, não houve diferenças significantes entre o DC das resinas U e LL e entre as resinas LL, K e T. As amostras da resina L polimerizadas pelo ciclo curto de polimerização apresentaram o maior valor de DC. Apenas o material K exibiu um aumento nos valores de DC após o tratamento WB. Todos os pré-polímeros apresentaram valores de $\overline{M}_w$ entre $4,0 \times 10^5$ e $6,5 \times 10^5$ e distribuições estreitas de $\overline{M}_w$ (2,1 a 3,6). As amostras de K polimerizadas ou submetidas aos tratamentos pós-polimerização apresentaram valores de $\overline{M}_w$ similares ao seu pré-polímero. Os tratamentos pós-polimerização proporcionaram o aumento da transição vítrea do material Kooliner. A transição vítrea da resina Lucitone 550 foi influenciada pelo ciclo de polimerização, uma vez que o ciclo curto que incluiu um período final em ebulição apresentou o valor mais alto de T_g . Foi observado que grandes concentrações de IBMA foram liberadas a partir das amostras controles dos materiais K e N na primeira hora de imersão em saliva artificial. Não foram observadas diferenças significantes nas concentrações de 1,6-HDMA liberadas a partir dos materiais U e T no primeiro dia de imersão em saliva artificial. As concentrações dos monômeros IBMA e 1,6-HDMA diminuíram significativamente com o aumento do tempo de imersão em saliva artificial. Para as amostras do grupo controle do material N, a liberação de DBNP aumentou na terceira hora de imersão e então reduziu significativamente no primeiro dia de imersão em saliva artificial. Comparado ao grupo controle, o tratamento WB proporcionou uma diminuição significativa na quantidade de compostos residuais (IBMA, 1,6-HDMA e DBNP) liberados a partir das resinas para reembasamento na primeira hora de imersão em saliva artificial. Com exceção do material U, o tratamento WB diminuiu o tempo de liberação dos compostos residuais (IBMA, 1,6-HDMA e DBNP) avaliados. Na primeira hora de imersão, a concentração média de MA liberada a partir das amostras controles do material U foi significativamente maior que a concentração dos outros materiais reembasadores e

diminuiu significativamente após 3 horas de imersão em saliva artificial. A concentração média de MA liberada a partir das amostras controles do material K foi significativamente maior que a concentração dos outros materiais reembasadores no primeiro dia de imersão em saliva artificial. Apenas para as amostras controles do material U, o tratamento WB proporcionou a diminuição da liberação de MA para a saliva artificial. Para todas as amostras do grupo controle de todos os materiais, as concentrações médias de BA diminuíram progressivamente com o aumento do tempo de imersão. No primeiro intervalo de imersão, as amostras submetidas ao tratamento WB liberaram significativamente menos BA que as amostras do grupo controle.

Palavras-chave: Acrílatos; cromatografia líquida; plastificantes; saliva artificial; cromatografia em gel; análise espectral Raman.

9 Abstract

Urban VM. Effect of post-polymerization treatments on molecular weight, degree of conversion, glass transition temperature, and in vitro leachability of residual monomer, plasticizer, and degradation products of hard chairside reline resins [Tese de Doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2007.

The aims of this study were to evaluate: 1. the effect of post-polymerization treatments (MW-microwave irradiation and WB-water-bath) on the degree of conversion (DC) of reline resins (Ufi Gel hard-U, Kooliner-K, and Tokuso Rebase Fast-T) and denture base resin (Lucitone 550-L), submitted to two polymerization cycles (LS-short and LL-long) by FT-Raman spectroscopy; 2. the molecular weight ($\overline{M}_w$) of the powder of U, K, T, and L materials and of K polymerized specimens (control; MW; and WB) by GPC; 3. the effect of MW and WB on the glass transition temperature (T_g) of the reline resins (Duraliner II-D, K, New Truliner-N, U and T) and the heat-polymerized resin (LS and LL) by DSC; 4. the effect of WB on the leaching of residual compounds (isobutyl methacrylate-IBMA, 1,6-hexanediol dimethacrylate-1,6-HDMA, and DBNP-dibutyl-*n*-phthalate) from the reline resins (K, N, U, and T) in artificial saliva by HPLC; 5. the effect of WB on the leaching of degradation products (methacrylic acid-MA and benzoic acid-BA) from the reline resins K, N, U, and T in artificial saliva by HPLC. Control group specimens were left untreated. DC (%) data were analyzed using Kruskal-Wallis test ($\alpha=.05$). T_g (°C) data were analyzed using ANOVA/Tukey's test ($\alpha=.05$). The results ($\mu\text{g/mL}$) of residual monomer and plasticizer leachability were submitted to Wilcoxon or Mann-Whitney tests ($\alpha=.05$). The results ($\mu\text{g/mL}$) of degradation products leachability were submitted to Wilcoxon, Mann-Whitney or Kruskal-Wallis tests ($\alpha=.05$). For DC control specimens, there were no significant differences between U and LL and among

LL, K, and T. LS specimens had the highest DC. Only material K exhibited an increased DC after WB. All powders had $\overline{M}_w$ from 4.0×10^5 to 6.5×10^5 and narrow $\overline{M}_w$ distributions (2.1 to 3.6). Polymerization and post-polymerization produced K specimens with $\overline{M}_w$ values similar to that of K powder. Post-polymerization treatments were able to improve the glass transition of Kooliner. Glass transition of Lucitone 550 was influenced by the polymerization cycle, with the short cycle that included a terminal boil period resulting in highest value. The largest amounts of IBMA were leached out from the control specimens of K and N within the first hour. No change in the quantities of 1,6-HDMA released from materials U and T control specimens was observed with immersion time up to 24 hours. The amount of IBMA and 1,6-HDMA monomers released from the materials significantly decreased with increasing immersion time. For N control specimens, DBNP release increased from 1 hour to 3 hours of immersion, and significantly decreased with increasing immersion time up to 24 hours. Compared to controls, WB produced a significant decrease in the amount of residual compounds (IBMA, 1,6-HDMA, and DBNP) eluted from the reline resins within the first hour of immersion in saliva. With the exception of material U, WB decreased the duration of release of the residual compounds evaluated (IBMA, 1,6-HDMA, and DBNP). At the first hour of immersion, the mean concentration of MA released from material U control specimens was significantly higher than those of the other reline resins, and decreased significantly after 3h of immersion. The mean concentration of MA released from K control specimens was significantly higher than the other materials in 24-h immersion time. Only for material U, WB specimens released lower amounts of MA than control specimens. For all control specimens, mean concentrations of BA progressively decreased with increasing immersion time. In the first interval, WB specimens of all materials released significantly lower amounts of BA than the controls.

Keywords: Acrylates; high performance liquid chromatography; plasticizers; artificial saliva; gel permeation chromatography; Raman spectroscopy.

Autorização para reprodução

Autorizo a reprodução deste trabalho.

Araraquara, 11 de janeiro de 2007.

Vanessa Migliorini Urban.