

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA - DOUTORADO
AREA DE CONCENTRAÇÃO: CLÍNICA INTEGRADA

ROSANA MARQUES SILVA FIGUERÔA

**EFEITO DE CICLOS DE POLIMERIZAÇÃO EM MICRO-ONDAS SOBRE
PROPRIEDADES FÍSICAS, QUÍMICA E BIOLÓGICA DE RESINAS ACRÍLICAS
PARA BASE DE PRÓTESE**

PONTA GROSSA

2016

ROSANA MARQUES SILVA FIGUERÔA

**EFEITO DE CICLOS DE POLIMERIZAÇÃO EM MICRO-ONDAS SOBRE
PROPRIEDADES FÍSICAS, QUÍMICA E BIOLÓGICA DE RESINAS ACRÍLICAS
PARA BASE DE PRÓTESE**

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em Odontologia na Universidade Estadual de Ponta Grossa, Área de concentração em Clínica Integrada. Linha de pesquisa em Propriedades físico-químicas e biológicas dos materiais.

Orientadora: Profa. Dra. Vanessa Migliorini Urban

PONTA GROSSA

2016

Ficha Catalográfica

Ficha Catalográfica
Elaborada pelo Setor de Tratamento da Informação BICEN/UEPG

F475 Figuerôa, Rosana Marques Silva
 Efeito de ciclos de polimerização em
 micro-ondas sobre propriedades físicas,
 química e biológica de resinas acrílicas
 para base de prótese/ Rosana Marques Silva
 Figuerôa. Ponta Grossa, 2016.
 172f.

 Tese (Doutorado em Odontologia - Área
 de Concentração: Clínica Integrada),
 Universidade Estadual de Ponta Grossa.

 Orientadora: Profª Drª Vanessa
 Migliorini Urban.

 1.Polimetil metacrilato. 2.Micro-ondas.
 3.Espectroscopia Raman. 4.Técnicas de
 cultura de células. 5.Porosidade. I.Urban,
 Vanessa Migliorini. II. Universidade
 Estadual de Ponta Grossa. Doutorado em
 Odontologia. III. T.

CDD: 617.6

ROSANA MARQUES SILVA FIGUERÔA

**EFEITO DE CICLOS DE POLIMERIZAÇÃO EM MICRO-ONDAS SOBRE
PROPRIEDADES FÍSICAS, QUÍMICA E BIOLÓGICA DE RESINAS ACRÍLICAS
PARA BASE DE PRÓTESE.**

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em Odontologia na Universidade Estadual de Ponta Grossa, Área de Concentração em Clínica Integrada. Linha de pesquisa em Propriedades físico-químicas e biológicas dos materiais.

Ponta Grossa, 12 de fevereiro de 2016.

Profa. Dra. Vanessa Migliorini Urban – Orientadora
Doutora em Reabilitação Oral – Área de Prótese
Universidade Estadual de Ponta Grossa

Profa. Dra. Karin Hermana Neppelenbroek
Doutora em Reabilitação Oral – Área de Prótese
Universidade de São Paulo – Faculdade de Odontologia de Bauru

Profa. Dra. Cláudia Helena Lovato da Silva
Doutora em Reabilitação Oral – Área de Prótese
Universidade de São Paulo – Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto

Prof. Dr. Patricio Runnacles
Doutor em Odontologia – Área de Dentística Restauradora
Universidade Estadual de Ponta Grossa

Profa. Dra. Nara Hellen Campanha Bombarda
Doutora em Reabilitação Oral – Área de Prótese
Universidade Estadual de Ponta Grossa

DADOS CURRICULARES

Rosana Marques Silva Figuerôa

NASCIMENTO	16/05/1986 Ceres - GO
FILIAÇÃO	Antônio da Silva Divina Marques Silva
2005 - 2009	Curso de Graduação em Odontologia na Universidade Estadual de Ponta Grossa - UEPG
2010 - 2012	Curso de Pós-Graduação em Odontologia na Universidade Estadual de Ponta Grossa - UEPG, Nível de Mestrado, Área de Concentração em Clínica Integrada, Linha de pesquisa em Propriedades físico-químicas e biológicas dos materiais
2012 - 2016	Curso de Pós-Graduação em Odontologia na Universidade Estadual de Ponta Grossa - UEPG, Nível de Doutorado, Área de Concentração em Clínica Integrada, Linha de pesquisa em Propriedades físico-químicas e biológicas dos materiais

Dedicatória

A **Deus**, pela vida.

A minha família: meus pais, Antônio da Silva e Divina Marques Silva, meus grandes apoiadores e exemplos de luta, que me ensinaram a vencer os desafios e a levantar a cada tropeço; que foram o começo de tudo e estiveram ao meu lado em todos os momentos. Ao meu irmão **Roberto Marques Silva**, pela amizade e por ser o responsável por eu estar na UEPG e ter conhecido esta cidade que me acolheu com tanto carinho. A minha cunhada **Anna Maria**, pelas longas conversas de apoio e amizade. Ao meu marido **Henrique Figuerôa**, pelo seu apoio incondicional, por seu amor, pela sua paciência nos momentos difíceis e por me incentivar a cada dificuldade, por acreditar em mim e no meu sucesso. **A minha segunda família (Rosicler, Edilson e Eduardo)**, que me acolheram e me apoiaram em todos os momentos. **E aos meus amigos**, que me ajudaram de maneira incalculável durante essa longa caminhada.

Agradecimentos

À minha orientadora Prof^a. Dr^a. Vanessa Migliorini Urban, pela sua amizade, pela sua imensa dedicação a este trabalho, por sua paciência, por sua confiança, por todos os ensinamentos e pelo seu exemplo de professora a ser seguido.

À Coordenadora do Programa de Pós-graduação em Odontologia Prof^a. Dr^a. Denise Stadler Wambier, pela confiança, amizade e oportunidades concedidas.

Ao Prof. Dr. Fábio André dos Santos, pela ajuda e atenção na realização dos experimentos de citotoxicidade.

Ao Prof. Dr. Cesar Augusto Galvão Arrais, pela sua contribuição com o seu conhecimento e orientação dos experimentos de grau de conversão e pelo auxílio nas análises estatísticas deste trabalho.

À Prof^a. Dr^a. Christiane Philippini Ferreira Borges, por nos ceder a utilização do espectrofotômetro do Departamento de Química para as análises de estabilidade de cor.

Ao Prof. Dr. Flávio Luis Beltrame, pela atenção e gentileza emprestando o dessecador do Departamento de Ciências Farmacêuticas para a realização dos experimentos de porosidade, sorção e solubilidade.

À Prof.^a Dr.^a Karin Hermana Neppelenbroek, pela amizade, auxílio e sugestões na realização deste trabalho.

Aos alunos de Iniciação científica: Bruna, Kamylla, Stéfanie, Raíssa, Alyne e Marco, pela amizade e pelo esforço na realização conjunta dos experimentos.

Aos meus colegas de Doutorado, que sempre estiveram ao meu lado, e com os quais sempre pude contar com a amizade durante estes quatro anos de curso.

À Letícia Campos, pela amizade e ajuda na realização dos experimentos de citotoxicidade.

À Morgana das Graças Procz dos Santos, pelo carinho, amizade, apoio administrativo, pela paciência e principalmente pelo seu otimismo e bom humor.

À Valéria Ferreira Reis, pela amizade e pelo apoio durante a utilização da clínica 26 na realização dos experimentos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo fornecimento da bolsa de estudo e **à Fundação Araucária de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Paraná**, pelo Auxílio à Pesquisa 230/2010 – 17.471 - Programa de Infraestrutura para Jovens Pesquisadores - PPP.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a conclusão desta pesquisa.

Figuerôa, R. M. S. **Efeito de ciclos de polimerização em micro-ondas sobre propriedades físicas, química e biológica de resinas acrílicas para base de prótese** [Tese] Doutorado em Odontologia. Ponta Grossa: Universidade Estadual de Ponta Grossa; 2016.

RESUMO

O objetivo deste estudo foi determinar um ciclo de polimerização em micro-ondas que resultasse em propriedades físico-químicas e biológicas satisfatórias para resinas acrílicas termopolimerizáveis para base de prótese processadas em banho de água (Vipi Cril-VC, VIPI®) ou por energia de micro-ondas (Vipi Wave-VW, VIPI®). Os ciclos de polimerização avaliados foram: 1) BA (banho de água) = (65°C por 90 min + 90 min em ebulição), ciclo recomendado para a resina VC; 2) M630/25 = 10 min a 270 W + 5 min a 0 W + 10 min a 360 W, ciclo recomendado para a resina VW; 3) M650/5 = 5 min a 650 W; 4) M550/3 = 3 min a 550 W. Foram avaliadas as seguintes propriedades: grau de conversão (n=6), citotoxicidade (n=9), porosidade (n=10), sorção de água e solubilidade (n=10) e rugosidade de superfície e estabilidade de cor (n=5) após imersão em líquidos potencialmente corantes e escovação simulada. Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância ANOVA-2 fatores seguida pelo teste de Bonferroni para grau de conversão e estabilidade de cor, ANOVA-2 fatores para porosidade e citotoxicidade, ANOVA-2 fatores seguida pelo teste de Tukey HSD para sorção de água e solubilidade e ANOVA-3 fatores seguida pelo teste de Bonferroni para rugosidade de superfície ($\alpha=0,05$). Não houve diferença significativa entre os grupos para os resultados de grau de conversão da resina VC. Para a resina VW, os valores mais baixos de grau de conversão foram obtidos nos ciclos M630/25 e M650/5 ($P<0,05$). Os valores médios de grau de conversão foram entre 66,9% e 85,9%. Não houve diferença entre os materiais e os grupos experimentais para os resultados de citotoxicidade e todas as condições resultaram em efeitos não citotóxicos. Foram observados valores médios de porosidade inferiores a 1,52%, sem diferença significativa entre os grupos para ambos os materiais. As resinas apresentaram valores de sorção de água e solubilidade sem diferença estatisticamente significativa entre elas. Os valores mais altos de sorção de água (2,43%) e de solubilidade (0,13%) foram obtidos nos grupos BA e M550/3, respectivamente ($P<0,05$). Com a imersão em café, os grupos M550/3 e BA da resina VC apresentaram os maiores e os menores valores de rugosidade de superfície, respectivamente ($P<0,05$). Também houve aumento da rugosidade do grupo M550/3 após imersão no vinho tinto ($P<0,05$). Para a resina VW, o grupo M650/5 demonstrou superfície mais rugosa após imersão em café ($P<0,05$). Não houve diferença de cor entre os ciclos para a resina VW e a resina VC apresentou mais alterações ($P<0,05$). Todos os valores médios de estabilidade de cor foram classificados como aceitáveis, exceto para a resina VW (grupo M630/25) que apresentou NBS=4,88 após imersão em vinho tinto. A resina Vipi Cril formulada para polimerização convencional pôde ser polimerizada em micro-ondas sem prejuízo às suas propriedades avaliadas. De acordo com os resultados obtidos, a melhor condição experimental foi a polimerização da resina Vipi Cril em micro-ondas a 650 W por 5 min.

Palavras-chave*: Polimetil metacrilato. Micro-ondas. Espectroscopia Raman. Técnicas de cultura de células. Porosidade. Solubilidade. Agentes corantes. Propriedades de superfície.

* Em acordo com os Descritores em Ciências da Saúde (DeCS) disponível no domínio <http://decs.bvs.br>

Figuerôa, R. M. S. **Effect of microwave polymerization cycles on physical, chemical and biological properties of denture base acrylic resins** [Tese] Doutorado em Odontologia. Ponta Grossa: Universidade Estadual de Ponta Grossa; 2016.

ABSTRACT

The aim of this study was to determine a microwave polymerization cycle that resulted in adequate physicomechanical and biological properties for the denture base acrylic resins polymerized in water bath (Vipi Cril-VC, VIPI®) or processed by microwave energy (Vipi Wave-VW, VIPI®). The evaluated polymerization cycles were: 1) WB (water bath) = (65°C during 90 min + boiling during 90 min), recommended cycle for the VC resin; 2) M630/25 = 10 min at 270 W + 5 min at 0 W + 10 min at 360 W, recommended cycle for VW resin; 3) M650/5 = 5 min at 650 W; 4) M550/3 = 3 min at 550 W. The following properties were evaluated: degree of conversion (n=6), cytotoxicity (n=9), porosity (n=10), water sorption and solubility (n=10), and surface roughness and color stability (n=5) after immersion in potential colorant beverages and simulated toothbrushing. Data were submitted to analysis of variance ANOVA-2 way followed by Bonferroni's test for degree of conversion and color stability, ANOVA-2 way for porosity and cytotoxicity, ANOVA-2 way followed by HSD Tukey's test for water sorption and solubility, and ANOVA-3 way followed by Bonferroni's test for surface roughness ($\alpha=0.05$). For VC resin, there was no significant difference among the groups for degree of conversion. For VW resin, the lowest degree of conversion values appeared in the M630/25 and M650/5 cycles ($P<0.05$). Degree of conversion values ranged from 66.9 to 85.9%. There was no difference between the materials and experimental groups for cytotoxicity and all conditions resulted in non-cytotoxic effects. Porosity mean values below 1.52% with no significant difference among groups for both materials were observed. Resins showed water sorption and solubility values without a significant difference. The highest water sorption (2.43%) and solubility (0.13%) values were obtained for WB and M550/3, respectively ($P<0.05$). After immersion in coffee, M550/3 and WB groups of VC resin showed the highest and the lowest roughness values, respectively ($P<0.05$). There was also an increase in roughness of M550/3 group after immersion in wine ($P<0.05$). For VW resin, M650/5 group presented rougher surface after immersion in coffee ($P<0.05$). There was no difference in color among cycles for VW resin and VC resin showed more changes ($P<0.05$). All medium values were classified as acceptable, exception for VW resin (M630/25 group) which presented NBS=4.88 after immersion in wine. Vipi Cril conventional resin can be polymerized in microwave without impairment to the evaluated properties. According to the obtained results, the better experimental condition was the microwave polymerization at 650 W for 5 min for Vipi Cril.

Keywords*: Polymethyl methacrylate. Microwave. Raman spectroscopy. Cell culture techniques. Porosity. Solubility. Coloring agents. Surface properties.

* Em acordo com os Descritores em Ciências da Saúde (DeCS) disponível no domínio <http://decs.bvs.br>

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1	- Matriz metálica circular (50 x 3 mm).....	22
FIGURA 2	- A – Matriz metálica; B – Molde de silicone; C - Inclusão do conjunto molde/matriz em mufla plástica para a análise de grau de conversão.....	23
FIGURA 3	- A e B - Dispositivo metálico utilizado para acabamento e polimento dos corpos de prova da análise de grau de conversão; C – Corpo de prova posicionado no dispositivo.....	24
FIGURA 4	- Polimento do corpo de prova da análise de grau de conversão utilizando o dispositivo metálico.....	24
FIGURA 5	- Corpo de prova da análise de grau de conversão após acabamento e polimento.....	25
FIGURA 6	- Visualização dos corpos de prova da análise de grau de conversão com objetiva de 20x.....	25
FIGURA 7	- Resina acrílica posicionada sobre a superfície do cristal ATR para as análises de cinética de polimerização.....	26
FIGURA 8	- A. Moldagem das matrizes metálicas para o teste de citotoxicidade; B. Moldes incluídos em mufla metálica.....	28
FIGURA 9	- Corpos de prova do teste de citotoxicidade.....	29
FIGURA 10	- Placa de 20 orifícios contendo corpos de prova imersos em meio de cultura para determinação do processo de esterilização para o teste de citotoxicidade.....	29
FIGURA 11	- Taxa de proliferação celular (3T3) pelo método MTT.....	31
FIGURA 12	- Aspecto dos fibroblastos (3T3) viáveis para utilização no teste de citotoxicidade.....	32
FIGURA 13	- Células armazenadas em frasco com filtro para passagem de CO ₂	33
FIGURA 14	- A - Azul de Tripán sendo inserido na câmara de Neubauer; B – Contagem das células em microscópio óptico com aumento de 20x.....	34
FIGURA 15	- Retirada do meio de cultura dos orifícios e colocação dos	35

	extratos dos corpos de prova.....	
FIGURA 16	- Adição do MTT aos orifícios (3 a 4 h de incubação).....	36
FIGURA 17	- Análise da atividade mitocondrial em espectrofotômetro a 570 nm.....	36
FIGURA 18	- Aspecto do corante Vermelho Neutro nos poços.....	37
FIGURA 19	- Matriz metálica retangular (50 x 4 x 2,0 ± 0,1 mm).....	38
FIGURA 20	- Matriz metálica circular (50 mm de diâmetro x 0,5 mm de profundidade).....	38
FIGURA 21	- Inclusão do conjunto molde/matriz em mufla plástica para a análise de porosidade.....	39
FIGURA 22	- Inclusão da matriz metálica circular em mufla plástica para as análises de sorção de água e solubilidade.....	39
FIGURA 23	- Pesagem do espécime seco e úmido em duas etapas: A – 1ª etapa: após armazenamento em dessecador; B – 2ª etapa: após imersão em água destilada a 37°C.....	40
FIGURA 24	- Pesagem adicional com o espécime totalmente imerso em água destilada.....	41
FIGURA 25	- A - Matriz metálica circular (20 mm de diâmetro x 3,0 ± 0,1 mm de espessura); B - Inclusão da matriz metálica circular em mufla metálica para as análises de rugosidade de superfície e estabilidade de cor.....	43
FIGURA 26	- Corpo de prova das análises de rugosidade de superfície e estabilidade de cor após polimento.....	44
FIGURA 27	- Análise de rugosidade de superfície.....	45
FIGURA 28	- Análise de cor em espectrofotômetro.....	45
FIGURA 29	- Fluxograma representando o delineamento do Experimento 4...	46
FIGURA 30	- Valores médios ± desvio padrão de rugosidade de superfície (Ra, µm) dos corpos de prova da resina VC na etapa de validação da escovação simulada.....	47
FIGURA 31	- Posicionamento dos <i>stubs</i> e corpos de prova na máquina de escovação.....	48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	. Resinas acrílicas termopolimerizáveis para base de prótese avaliadas.....	21
Tabela 2	. Ciclos de polimerização avaliados.....	21
Tabela 3	. Procedimentos de esterilização avaliados para o teste de citotoxicidade.....	30
Tabela 4	. Valores médios (desvio padrão) de ΔE L*a*b* dos corpos de prova da resina VC na etapa de validação da escovação simulada.....	47
Tabela 5	. Escores de alteração de cor segundo o sistema NBS.....	50

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	16
2	OBJETIVOS.....	20
2.1	OBJETIVO GERAL.....	20
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	20
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	21
3.1	MATERIAIS.....	21
3.2	MÉTODOS.....	22
3.2.1	EXPERIMENTO 1 - Grau de conversão e cinética de polimerização de resinas acrílicas para base de prótese polimerizadas em ciclos convencional em banho de água ou em micro-ondas.....	22
3.2.1.1	<i>Confecção dos corpos de prova para a análise de grau de conversão.....</i>	<i>22</i>
3.2.1.2	<i>Grau de conversão.....</i>	<i>25</i>
3.2.1.3	<i>Cinética de polimerização.....</i>	<i>26</i>
3.2.1.4	<i>Mensuração do grau de conversão e da cinética de polimerização</i>	<i>27</i>
3.2.1.5	<i>Análise estatística de grau de conversão.....</i>	<i>27</i>
3.2.2	EXPERIMENTO 2 - Citotoxicidade de resinas acrílicas para base de prótese polimerizadas convencionalmente ou por micro-ondas: Análise por MTT (metil tetrazólio) e Vermelho Neutro.....	27
3.2.2.1	<i>Confecção dos corpos de prova para o teste de citotoxicidade.....</i>	<i>27</i>
3.2.2.2	<i>Validação da etapa de esterilização dos corpos de prova.....</i>	<i>29</i>
3.2.2.3	<i>Taxa de proliferação de células 3T3.....</i>	<i>30</i>
3.2.2.4	<i>Obtenção dos extratos dos corpos de prova.....</i>	<i>31</i>
3.2.2.5	<i>Cultivo celular.....</i>	<i>32</i>
3.2.2.6	<i>Teste de citotoxicidade pelo método MTT.....</i>	<i>35</i>
3.2.2.7	<i>Teste de citotoxicidade pelo método Vermelho Neutro.....</i>	<i>36</i>
3.2.2.8	<i>Análise dos resultados de citotoxicidade.....</i>	<i>3</i>
3.2.3	EXPERIMENTO 3 – Porosidade, sorção de água e solubilidade de resinas acrílicas para base de prótese polimerizadas convencionalmente ou em micro-ondas.....	37
3.2.3.1	<i>Confecção dos corpos de prova para as análises de porosidade e</i>	<i>38</i>

	<i>sorção de água e solubilidade.....</i>	
3.2.3.2	<i>Porosidade.....</i>	40
3.2.3.3	<i>Sorção de água e solubilidade.....</i>	42
3.2.3.4	<i>Análise estatística de porosidade, sorção de água e solubilidade..</i>	42
3.2.4	EXPERIMENTO 4 – Efeito da imersão em líquidos potencialmente corantes sobre a rugosidade de superfície e a cor de resinas acrílicas polymerizadas convencionalmente ou em micro-ondas.....	43
3.2.4.1	<i>Confecção dos corpos de prova para as análises de rugosidade de superfície e de estabilidade de cor.....</i>	43
3.2.4.2	<i>Soluções corantes e condições de imersão.....</i>	44
3.2.4.3	<i>Delineamento do Experimento 4.....</i>	45
3.2.4.4	<i>Validação da etapa de escovação simulada.....</i>	46
3.2.4.5	<i>Escovação simulada.....</i>	47
3.2.4.6	<i>Rugosidade de superfície.....</i>	49
3.2.4.7	<i>Estabilidade de cor.....</i>	49
3.2.4.8	<i>Análise estatística de rugosidade de superfície e estabilidade de cor.....</i>	50
4	CAPÍTULOS.....	52
4.1	CAPÍTULO 1 – Artigo Degree of conversion of denture base acrylic resins polymerized in conventional water-bath or experimental microwave cycles submetido para publicação no periódico <i>Dental Materials</i>	53
4.2	CAPÍTULO 2 – Artigo Citotoxicidade de resinas acrílicas para base de prótese polymerizadas convencionalmente ou por micro-ondas: Análise por MTT e Vermelho Neutro , que será versado para a língua inglesa, revisado e submetido para publicação no periódico <i>Dental Materials</i>	78
4.3	CAPÍTULO 3 – Artigo Porosity, water sorption and solubility of denture base acrylic resins polymerized conventionally or in microwave submetido para publicação no periódico <i>Journal of Prosthodontics</i>	106
4.4	CAPÍTULO 4 – Artigo Effect of immersion in potentially staining drinks associated with simulate brush on roughness	128

	and color stability of denture base acrylic resins polymerized with different cycles , que será revisado e submetido para publicação no periódico <i>Journal of Prosthetic Dentistry</i>	
5	DISCUSSÃO	157
6	CONCLUSÕES	162
	REFERÊNCIAS	164

1 INTRODUÇÃO

A reabilitação de pacientes total ou parcialmente desdentados deve visar o restabelecimento das condições de saúde geral e bucal. Para isso, o profissional deve realizar, de maneira criteriosa, todas as fases do tratamento, desde o diagnóstico e o planejamento até a instalação da prótese. Especificamente nos casos em que o suporte, a retenção e a estabilidade são obtidos, também, a partir do rebordo residual, como ocorre nas próteses removíveis totais ou parciais de extremidades livres, atenção especial deve ser dada durante a confecção das bases.¹

Durante muitas décadas, o material mais utilizado para a confecção das bases de próteses removíveis tem sido o polimetil metacrilato, cuja polimerização ocorre por meio de uma série de reações químicas, nas quais os polímeros são formados a partir de um grande número de moléculas menores denominadas monômeros. Primeiramente, compostos iniciadores são ativados quimicamente ou pelo calor para a formação de radicais livres (R-).² Após a ativação da reação de polimerização, as moléculas iniciadoras tornam-se altamente reativas e, dessa forma, podem interagir com a dupla ligação de alceno do monômero (C=C), deixando o outro membro de seu par covalente livre (R-C-).¹

O processo de formação dos polímeros e crescimento das cadeias, a partir dos monômeros, continua em uma velocidade considerável. Teoricamente, essas reações deveriam prosseguir com o aumento do calor, até que todo monômero tivesse se convertido em polímero.^{1,2} Entretanto, a formação de polímeros diminui ao longo da reação de polimerização e, conseqüentemente, certa quantidade de monômero residual permanece no material polimerizado,¹ influenciada por fatores como o tempo, a temperatura³⁻⁷ e o método de polimerização utilizados. Estudos têm demonstrado que a presença desse monômero, devido à sua ação plastificante⁸ no interior da massa polimérica, pode influenciar negativamente as propriedades físicas^{9,10} e mecânicas⁴ dos materiais, aumentando o escoamento¹¹, podendo, ainda, alterar os valores de resistência flexural,¹² à tração,¹³ ao impacto,¹⁴ de módulo de elasticidade^{12,14} e de dureza,¹³ diminuir o limite de fadiga,¹⁵ influir na sorção de água e solubilidade^{13,16} e, conseqüentemente, nas alterações dimensionais das resinas acrílicas.¹⁷ A análise do grau de conversão de monômeros em polímeros, portanto, tem sido uma ferramenta para avaliação das propriedades mecânicas do material e de sua performance clínica.¹⁸ Enquanto existe grande quantidade de estudos

avaliando grau de conversão em resinas compostas, pouca informação está disponível sobre resinas acrílicas para base de próteses.¹⁹⁻²²

Além do efeito negativo sobre as propriedades das resinas acrílicas, o monômero residual e outros subprodutos da reação de polimerização podem ser liberados a partir das resinas de base²²⁻²⁵ e causar citotoxicidade in vitro,²⁶ portanto, é desejado que os materiais acrílicos tenham baixa solubilidade.¹⁶ Os compostos liberados também têm sido apontados como uma das possíveis causas de alterações na mucosa oral dos pacientes portadores de próteses, como inflamação, eritema generalizado, ulceração, erosão, prurido e sensação de queimação. Esses sintomas podem estar relacionados à irritação química local ou injúria química,²⁷⁻²⁹ causada pelo monômero residual ou por uma reação de hipersensibilidade alérgica, principalmente em indivíduos com história prévia de sensibilização.^{5,6,29}

As resinas acrílicas para base de prótese são fornecidas como um sistema de pó e líquido e ativadas termicamente utilizando temperaturas controladas em ciclos de polimerização convencional em banho de água (BA) durante períodos específicos de imersão. Com a finalidade de melhorar suas propriedades físicas e mecânicas, como também facilitar o procedimento laboratorial, esses materiais também têm sido polimerizados em micro-ondas e em sistemas de fotopolimerização ou de polimerização a vácuo em baixas temperaturas.³⁰ No método convencional em banho de água, o aquecimento da resina é lento, e ocorre passivamente porque o calor é gerado externamente e as moléculas de monômero se chocam em consequência desse aquecimento.³¹ Especificamente durante a polimerização em micro-ondas, uma vez irradiadas, as moléculas de monômero movem-se orientadas por um campo eletromagnético de alta frequência (2.450 MHz). Nessa movimentação, as moléculas alteram suas direções milhares de vezes por segundo.³¹ Consequentemente, numerosas colisões intermoleculares são provocadas, causando um rápido aquecimento interno no qual a energia é imediatamente absorvida pela resina, independente da condutividade térmica dos materiais envolvidos no processamento das próteses³² e ocorre de modo uniforme, eliminando o tempo necessário para transferir o calor do banho de água até a resina no interior da mufla metálica. Esse método alternativo de polimerização em micro-ondas apresenta, consequentemente, vantagens como grande redução no tempo de execução,^{31,33} além de facilidade e limpeza durante o processamento da resina acrílica.^{34,35} Ainda, têm sido relatadas vantagens como mínima alteração de cor na

resina de base e menor risco de fratura dos dentes artificiais durante a demuflagem.³⁶ Apesar disso, este método não tem sido comumente utilizado devido à difícil disponibilidade e maior custo do material formulado para polimerização em micro-ondas em relação ao convencional.

A seleção adequada do ciclo de polimerização em micro-ondas visa impedir um superaquecimento do monômero que poderia acarretar em degradação³⁷ e porosidade no material. Kimura et al. (1983)³⁶ utilizaram diversas combinações tempo/potência no forno de micro-ondas e observaram que era possível polimerizar o material em tempos reduzidos (500 W por 3 min), obtendo precisão e adaptação da base da prótese principalmente na área de selado palatino posterior.³⁸ Outros estudos^{33,39,40} demonstraram que resinas polimerizadas em forno de micro-ondas (400 W por 2 min e 30 s; 700 W por 4 min; 550 W por 3 min, respectivamente) apresentaram valores de resistência à flexão semelhantes aos das resinas polimerizadas convencionalmente por imersão em água aquecida. Entretanto, de acordo com Bafille et al. (1991),⁴¹ as resinas formuladas para serem utilizadas em forno de micro-ondas podem conter trietileno ou tetraetilenoglicol dimetacrilato em sua composição. Esses dimetacrilatos apresentam baixa pressão de vapor, permitindo que a polimerização seja realizada em temperaturas elevadas (entre 100°C e 150°C) sem risco de porosidades, o que não ocorre com o polimetil metacrilato que apresenta uma alta pressão de vapor.

A porosidade é uma das características não desejáveis para resinas acrílicas para base de próteses.³⁰ Porosidade severa pode enfraquecer a prótese⁴² e resultar em estresse interno elevado, acarretando uma maior vulnerabilidade à distorção.⁴³ Durante a utilização, as próteses estão sujeitas a sorção ou deposição superficial de fluidos⁴⁴ dependendo de suas características e das condições ambientais.⁴⁵ A água absorvida pelas resinas acrílicas pode resultar em alterações dimensionais após sua polimerização, prejudicando, por consequência, a estabilidade, o suporte e a retenção da prótese removível e o decorrente manchamento pode acarretar problemas estéticos.^{30,46,47} Apesar de a escovação ser um dos métodos mais utilizados pelos pacientes para higienização de suas próteses,⁴⁸ existe a possibilidade de aumento da rugosidade de superfície do material devido ao efeito abrasivo da ação mecânica das cerdas da escova e das partículas do dentífrício.⁴⁹ Dessa forma, irregularidades resultantes poderiam favorecer a penetração de

microrganismos como a *Candida albicans*,⁵⁰ retenção de biofilme e maior alteração de cor.

Devido às vantagens anteriormente relatadas para a polimerização de resinas acrílicas para base de prótese utilizando a energia de micro-ondas e visando sua maior utilização, foi julgado oportuno mensurar o grau de conversão e avaliar as propriedades de porosidade, sorção de água e solubilidade, estabilidade de cor e citotoxicidade de resinas acrílicas termopolimerizáveis formuladas para serem processadas convencionalmente em banho de água (Vipi Cril, VIPI®) ou por energia de micro-ondas (Vipi Wave, VIPI®) após serem submetidas tanto aos ciclos de polimerização recomendados pelo fabricante como a ciclos experimentais em micro-ondas.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo deste estudo foi determinar um ciclo de polimerização em micro-ondas que resultasse em propriedades físico-químicas e biológicas satisfatórias para resinas acrílicas, convencional e formulada para micro-ondas, para base de prótese removível.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

As propostas deste estudo foram:

- avaliar o grau de conversão das resinas acrílicas Vipi Cril e Vipi Wave submetidas à polimerização convencional e em micro-ondas, bem como, mensurar a cinética de polimerização desses materiais previamente à ativação térmica.
- avaliar quantitativamente a citotoxicidade das resinas acrílicas Vipi Cril e Vipi Wave submetidas à polimerização convencional e em micro-ondas.
- avaliar as propriedades de porosidade, sorção de água e solubilidade das resinas acrílicas Vipi Cril e Vipi Wave submetidas à polimerização convencional e em micro-ondas.
- avaliar o efeito da imersão em alimentos líquidos potencialmente corantes associado à escovação simulada sobre a rugosidade de superfície e a estabilidade de cor das resinas acrílicas Vipi Cril e Vipi Wave submetidas à polimerização convencional e em micro-ondas.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATERIAIS

As resinas acrílicas termopolimerizáveis para base de prótese selecionadas para este estudo estão apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1. Resinas acrílicas termopolimerizáveis para base de prótese avaliadas

Material (sigla)	Classificação	Composição		Proporção pó/líquido	Fabricante
		Pó	Líquido		
Vipi Cril® (VC)	Convencional	PMMA, peróxido de benzoíla, pigmentos	MMA, EGDMA, inibidor	2,15 g/mL	Vipi Ltda., Pirassununga, SP, Brasil
Vipi Wave® (VW)	Formulada para micro-ondas	PMMA, peróxido de benzoíla, pigmentos	MMA, EGDMA, inibidor	2,15 g/mL	Vipi Ltda., Pirassununga, SP, Brasil

Fonte: *Ficha de Segurança*. PMMA: polimetil metacrilato; MMA: metil metacrilato; EGDMA: etilenoglicol dimetacrilato

Os ciclos de polimerização avaliados estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Ciclos de polimerização avaliados

Grupos	Ciclo de polimerização		Referência
BA (banho de água – polimerização convencional)	• colocar a mufla em água fria; • aquecer a água até 65°C durante 30 min e manter por 1 h; • aquecer a água até a ebulição durante 30 min e manter por 1 h; • desligar e deixar esfriar		Ciclo recomendado pelo fabricante para a polimerização da resina VC
M630/25	270 W 0 W 360 W	10 min 5 min 10 min	Ciclo recomendado pelo fabricante para a polimerização da resina VW
M550/3	550 W	3 min	Ilbay et al. (1994) ⁴⁰
M650/5	650 W	5 min	Patil et al. (2009) ⁵¹

Fonte: A autora.

3.2 MÉTODOS

A fase experimental desta Tese foi dividida em quatro experimentos de acordo com as variáveis avaliadas: 1 – Grau de conversão e cinética de polimerização; 2 – Citotoxicidade; 3 – Porosidade, sorção de água e solubilidade; 4 – Rugosidade de superfície e estabilidade de cor.

3.2.1 EXPERIMENTO 1 – Grau de conversão e cinética de polimerização de resinas acrílicas para base de prótese polimerizadas em ciclos convencional em banho de água ou em micro-ondas

3.2.1.1 Confecção dos corpos de prova para a análise de grau de conversão

Com a finalidade de se obter corpos de prova (n=6) com as dimensões preconizadas na especificação ISO 1567⁵² para avaliação do conteúdo de monômero residual,^{1,22} foram utilizadas matrizes circulares em aço inoxidável com dimensões de 50 mm de diâmetro e 3 mm de espessura (Figura 1).

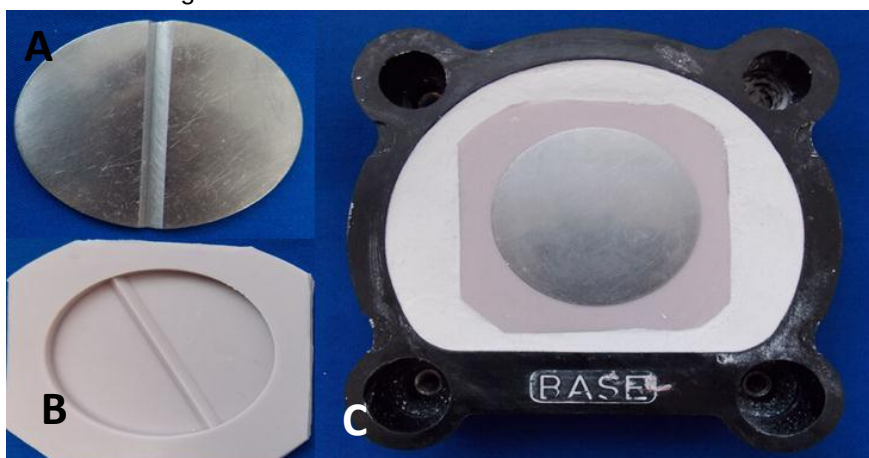
FIGURA 1 – Matriz metálica circular
(50 x 3 mm)



Fonte: A autora.

As matrizes metálicas foram moldadas utilizando silicone laboratorial (Zetalabor-Zhermack; Labordental, São Paulo, SP, Brasil) e o conjunto molde/matriz foi incluído em muflas metálicas (OGP, Bragança Paulista, SP, Brasil) ou plásticas (Vipi Ltda., Pirassununga, SP, Brasil), utilizando gesso pedra tipo III (Herodent; Vigodent Coltene SA Ind. e Com., Rio de Janeiro, RJ, Brasil) (Figura 2).

FIGURA 2 – A – Matriz metálica; B – Molde de silicone; C - Inclusão do conjunto molde/matriz em mufla plástica para a análise de grau de conversão

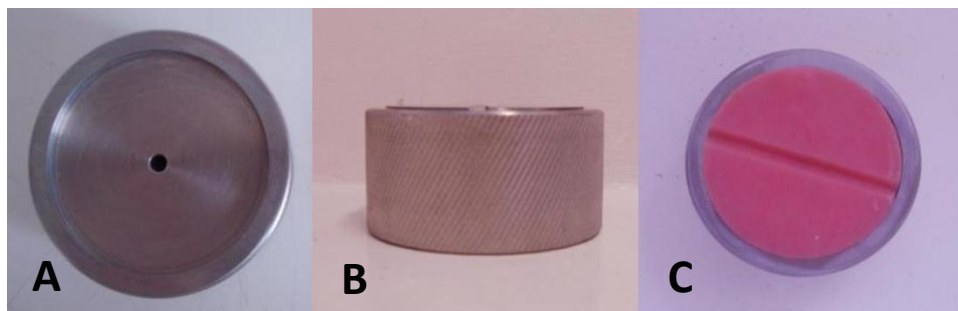


Fonte: A autora.

A mufla foi fechada e mantida, durante o tempo de presa do gesso, sob carga de 0,5 t em prensa hidráulica (VH Equipamentos Odontológicos, Araraquara, SP, Brasil). Após esse período, a mufla foi aberta, a matriz metálica foi removida e os materiais foram proporcionados e manipulados de acordo com as instruções do fabricante (Tabela 1) e inseridos na mufla. A mufla foi, então, fechada e mantida sob carga de 1,25 t em prensa hidráulica durante 30 min. Os corpos de prova foram, então, submetidos aos ciclos de polimerização, convencional em termopolimerizadora (SL-155/22; Solab, Piracicaba, SP, Brasil) ou em micro-ondas (MEF 41; Electrolux, Manaus, AM, Brasil), apresentados na Tabela 2.

Terminados os ciclos de polimerização, as muflas foram resfriadas em bancada por 30 min e, posteriormente, em água corrente durante 15 min.⁵² A seguir, os corpos de prova foram removidos dos moldes de silicone. Por meio da utilização de dispositivos metálicos, especialmente confeccionados para essa finalidade (Figura 3), foram removidos 0,5 mm de cada lado dos corpos de prova, até que a espessura de 2 mm fosse obtida.⁵²

FIGURA 3 – A e B – Dispositivo metálico utilizado para acabamento e polimento dos corpos de prova da análise de grau de conversão; C – Corpo de prova posicionado no dispositivo



Fonte: A autora.

O acabamento e polimento metalográfico (Aropol E-200; Aropol, Cotia, SP, Brasil) foi realizado com a utilização de lixas de carbeto de silício de granulações 240, 400, 600, 1200, 2000 (Norton Abrasivos, São Paulo, SP, Brasil) e com discos de feltro e pastas diamantadas de 6, 3 e 1 μm (3M do Brasil, Sumaré, SP, Brasil). Este procedimento foi realizado durante 30 s para cada lado do corpo de prova, sob constante irrigação (Figura 4), evitando-se, assim, o aquecimento por atrito.

FIGURA 4 – Polimento do corpo de prova da análise de grau de conversão utilizando o dispositivo metálico



Fonte: A autora.

Os corpos de prova (Figura 5) foram examinados visualmente e somente aqueles que apresentaram mínima porosidade (superfícies muito polidas e sem poros aparentes) foram utilizados.⁵² A seguir, foram armazenados em água destilada em estufa (Nova Instruments, Piracicaba, SP, Brasil) a 37°C durante 48 h.⁵²

FIGURA 5 – Corpo de prova da análise de grau de conversão após acabamento e polimento

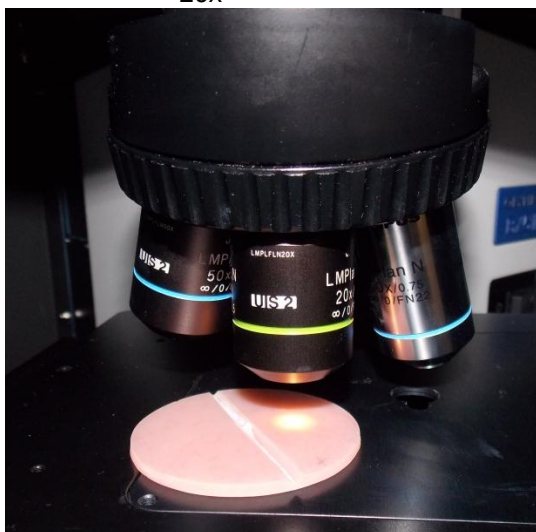


Fonte: A autora.

3.2.1.2 Grau de conversão

Estas análises foram feitas utilizando o espectrofotômetro FT-Raman (Bruker Senterra DU420A-OE-152; Bruker Optics GmbH, Ettlingen, Baden-Württemberg, Alemanha) com microscopia ótica acoplada. Os espectros foram registrados em temperatura ambiente. Uma objetiva de 20x com abertura óptica de 50/1000 (Olympus BX51M; Olympus UK, Londres, Inglaterra) foi usada para a visualização das amostras e determinação do local exato das varreduras (Figura 6).

FIGURA 6 – Visualização dos corpos de prova da análise de grau de conversão com objetiva de 20x



Fonte: A autora.

Os parâmetros experimentais utilizados para as análises foram: laser de neodímio:ítrio-alumínio-granada (Nd:YAG) a 532 nm e 20 mW como fonte de excitação; detector CCD resfriado termoeletronicamente; resolução espectral de 3 a 5 cm^{-1} ; intervalo de varredura de 2750-1520 cm^{-1} ; cinco co-adições e tempo de integração de 2 s. Para a determinação destas configurações do aparelho, testes pilotos foram anteriormente realizados. Foram feitas três mensurações, aleatoriamente distribuídas, e o valor médio representou cada espécime. O *software* Opus Spectroscopy (versão 6.5; Bruker Optics Inc., Billerica, MA, EUA) foi usado para processar os dados obtidos.

3.2.1.3 Cinética de polimerização

Os espectros foram registrados em temperatura ambiente a uma velocidade de 1 espectro/s com resolução de 4 cm^{-1} em uma faixa de comprimento de onda de 800 a 4000 cm^{-1} no modo de ATR, utilizando um espectrofotômetro FTIR (Tensor27; Bruker Optics GmbH, Ettlingen, Baden-Württemberg, Alemanha).

Foram realizadas leituras para descrever as cinéticas de polimerização dos materiais, previamente à ativação térmica pelos ciclos de polimerização (50 min). Para isso, os materiais foram manipulados e diretamente posicionados sobre a superfície do cristal ATR e as análises foram, então, realizadas (Figura 7).

FIGURA 7 - Resina acrílica posicionada sobre a superfície do cristal ATR para as análises de cinética de polimerização



Fonte: A autora.

3.2.1.4 Mensuração do grau de conversão e da cinética de polimerização

O grau de conversão e a cinética de polimerização (%) foram calculados utilizando a técnica padrão de linha de base⁵³ por meio da comparação entre as alturas dos picos de absorbância dos grupos funcionais presentes nos metacrilatos alceno (C=C) a 1640 cm⁻¹ e estér (C=O) a 1720 cm⁻¹, o qual foi utilizado como padrão interno,^{22,54} antes (imediatamente após a manipulação dos materiais) e no decorrer da polimerização (cinética) ou após a polimerização dos corpos de prova das resinas acrílicas. A partir da proporção entre esses valores de absorbância, as frações de duplas ligações que não reagiram foram calculadas a partir da Equação 1:

$$\text{GC\%} = 1 - [(\text{Abs C=C/Abs C=O})_{\text{após}}/(\text{Abs C=C/Abs C=O})_{\text{antes}}] \times 100$$

(1)

3.2.1.5 Análise estatística de grau de conversão

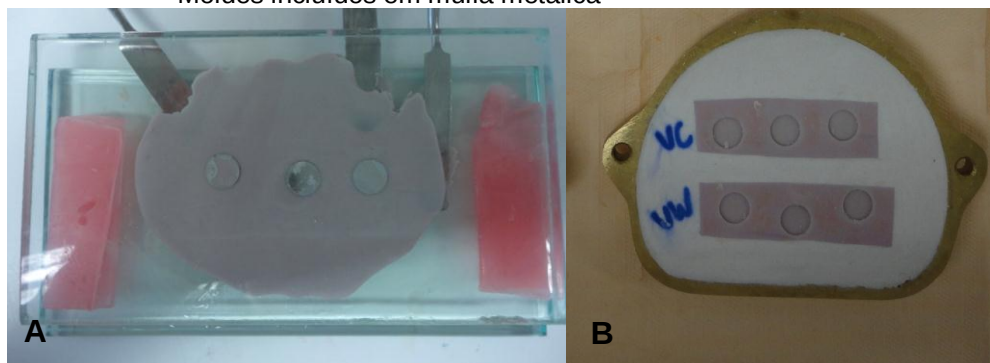
Os resultados de grau de conversão (%) foram submetidos à análise estatística utilizando a ANOVA 2 fatores (“material” e “ciclo de polimerização”) seguida pelo teste de Bonferroni ($\alpha=0,05$). Análises do poder da amostra foram realizadas para todos os dados obtidos utilizando o *software* (IBM SPSS 19; SPSS Inc., IBM Company, Armonk, NY, EUA).

3.2.2 EXPERIMENTO 2 – Citotoxicidade de resinas acrílicas para base de prótese polimerizadas convencionalmente ou por micro-ondas: Análise por MTT (metil tetrazólio) e Vermelho Neutro

3.2.2.1 Confeção dos corpos de prova para o teste de citotoxicidade

Os corpos de prova (n=9) dos materiais foram confeccionados, de maneira asséptica, a partir de moldes de matrizes metálicas na forma de discos com dimensões de 10 mm de diâmetro e 1 mm de espessura.⁵⁵ Os moldes foram obtidos utilizando silicone laboratorial entre duas placas de vidro (Figura 8A). O conjunto molde/matriz foi incluído em muflas, metálicas ou plásticas, utilizando gesso pedra tipo III (Figura 8B).

FIGURA 8 – A. Moldagem das matrizes metálicas para o teste de citotoxicidade; B. Moldes incluídos em mufla metálica

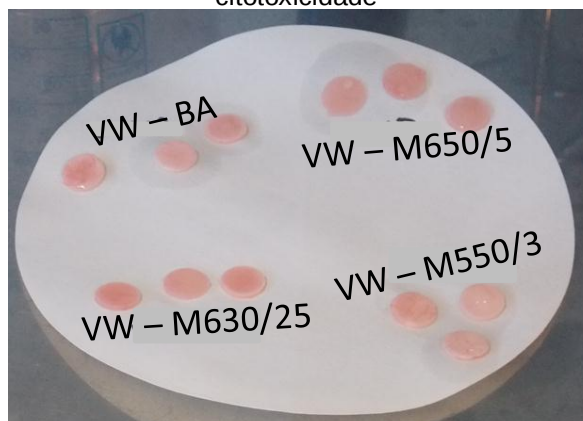


Fonte: A autora.

A mufla foi fechada e mantida, durante o tempo de presa do gesso, sob carga de 0,5 t em prensa hidráulica. Após esse período, foi aberta e a matriz metálica, removida. Os materiais foram proporcionados e manipulados de acordo com as instruções do fabricante. O pó foi proporcionado em balança de precisão (modelo AW220; Shimadzu do Brasil, São Paulo, SP, Brasil) em frascos dappens esterilizados individualmente para cada material e o volume de monômero foi dispensado com o auxílio de pipeta de precisão. Um único operador, atuou sobre um campo estéril, e confeccionou os corpos de prova utilizando instrumental esterilizado, roupas de proteção, luvas, óculos e máscaras descartáveis. Após a manipulação, os materiais foram inseridos nos moldes em silicone; a mufla foi fechada e mantida sob carga de 1,250 t em prensa hidráulica durante 30 min. Após esse período, os corpos de prova foram submetidos aos ciclos de polimerização, convencional ou em micro-ondas, apresentados na Tabela 2.

Em seguida, as muflas foram resfriadas em bancada por 30 min e em água corrente por 15 min.⁵² Os corpos de prova (Figura 9) foram, então, removidos dos moldes e submetidos a um procedimento de acabamento, apenas para remover eventuais excessos, utilizando lixa estéril. Foram armazenados em frascos âmbar estéreis com 10 mL de água destilada estéril em estufa a 37°C por 48 h.⁵⁵

FIGURA 9 – Corpos de prova do teste de citotoxicidade

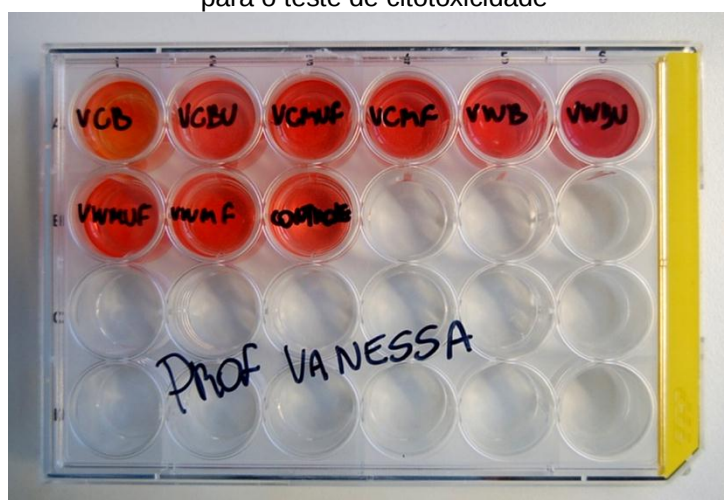


Fonte: A autora.

3.2.2.2 Validação da etapa de esterilização dos corpos de prova

Para a determinação do processo de esterilização que seria utilizado neste estudo, corpos de prova adicionais foram confeccionados, colocados em uma placa de 20 orifícios contendo 200 μ L de meio de cultura Eagle, suplementado com 1% de soro fetal bovino (SFB) e 80 μ g/mL de gentamicina e (Figura 10) mantidos em estufa para cultura de células (Forma Scientific, Marietta, OH, EUA) com 5% de CO_2 e ambiente com umidade controlada e temperatura de 37°C durante 2 dias. Um dos orifícios continha apenas meio de cultura para servir como controle. Foram testadas quatro possibilidades de esterilização (Tabela 3).

FIGURA 10 – Placa de 20 orifícios contendo corpos de prova imersos em meio de cultura para determinação do processo de esterilização para o teste de citotoxicidade



Fonte: A autora.

Tabela 3. Procedimentos de esterilização avaliados para o teste de citotoxicidade

Grupos	Processo de esterilização	Código
Banho de água (BA)	Nenhum	BA
	Banho de ultrassom por 20 min	BAU
	Exposição à luz ultravioleta (UV) por 20 min para cada face do corpo de prova	BAF
	Banho de ultrassom + luz UV	BAUF
Micro-ondas (M)	Nenhum	M
	Banho de ultrassom por 20 min	MU
	Exposição à luz ultravioleta (UV) por 20 min para cada face do corpo de prova	MF
	Banho de ultrassom + luz UV	MUF

Fonte: A autora.

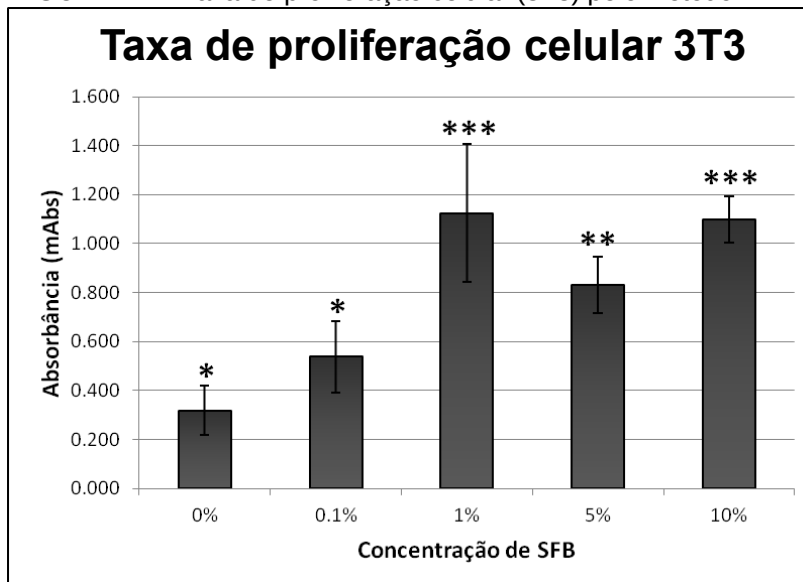
Em nenhum dos processos foi observada turvação do meio de cultura, sendo considerado que todos os processos de esterilização, inclusive não submeter a nenhum procedimento, resultavam em corpos de prova assépticos. Entretanto, para garantir a assepsia e não causar a eluição do monômero residual e outras substâncias potencialmente tóxicas dos corpos de prova durante o processo de imersão em banho de ultrassom, cada corpo de prova foi exposto à luz ultravioleta em câmara de fluxo laminar (Veco do Brasil, Indústria e Comércio de Equipamentos Ltda., Campinas, SP, Brasil) por 20 min para cada face visando a eliminação de possíveis microrganismos remanescentes.⁵⁶⁻⁵⁸

3.2.2.3 Taxa de proliferação de células 3T3

Anteriormente à realização dos testes de citotoxicidade, foi determinada a concentração de SFB que deveria ser adicionada ao meio de cultura Eagle através de uma curva de proliferação celular de fibroblastos de hamster (3T3-Universidade Federal do Paraná - UFPR), pois possuem reprodutibilidade, genética e estabilidade metabólica.^{59,60} Em uma placa de cultura de quarenta orifícios, foram semeadas $0,25 \times 10^3$ células/poço com meio de cultura Eagle, suplementado com 10% de SFB e 80 µg/mL de gentamicina e a placa foi incubada em estufa com 5% de CO₂ a 37°C. Após aproximadamente 16 h, o meio foi substituído por diferentes concentrações de SFB (0%, 0,1%, 1%, 5% e 10%) e a placa foi novamente incubada. Após 48 h, a viabilidade celular foi avaliada utilizando o método MTT (3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio brometo) (Molecular probes, Eugene, Oregon, EUA).

Os resultados da taxa de proliferação das células 3T3, pelo método MTT, podem ser observados na Figura 11.

FIGURA 11 – Taxa de proliferação celular (3T3) pelo método MTT



Fonte: A autora. Símbolos iguais denotam valores sem diferença estatisticamente significativa entre si ($P > 0,05$).

Os resultados da taxa de proliferação celular foram submetidos à ANOVA-1 fator (“concentração de SFB”) e teste de Tukey HSD ($\alpha=0,05$) utilizando o *software* IBM SPSS 19 (SPSS Inc., IBM Company, Armonk, NY, EUA).

Foi notado um aumento estatisticamente significativo ($P=0,000$) da proliferação celular com o aumento da concentração de SFB até 1%. A concentração de SFB de 5% resultou em uma redução da proliferação das células 3T3 em relação à concentração de 1% ($P=0,014$). Não houve diferença estatisticamente significativa ($P=0,998$) na proliferação celular utilizando as concentrações de SFB de 1 e 10%. Por isso, optou-se pela utilização da concentração de SFB a 1%.

3.2.2.4 Obtenção dos extratos dos corpos de prova

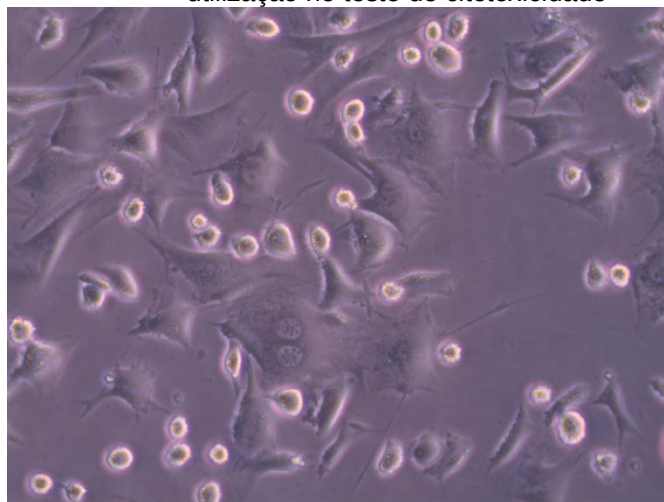
Após o procedimento de esterilização com luz ultravioleta, três corpos de prova de cada grupo experimental foram colocados em tubos de ensaio com 9 mL de meio de cultura Eagle, suplementado com 1% de SFB e 80 $\mu\text{g/mL}$ de gentamicina e incubados em estufa a 37°C por 24 h para obtenção do extrato das substâncias hidrossolúveis dessas amostras com o objetivo de analisar o efeito citotóxico das

substâncias liberadas a partir dos corpos de prova.^{23,56,61} Um tubo de ensaio contendo apenas 9 mL de meio de cultura foi armazenado sob as mesmas condições, servindo, assim, como grupo controle.^{57,58} A proporção de área de superfície dos corpos de prova e volume do meio de cultura estava dentro da faixa de 0,5 a 6,0 cm²/mL de acordo com o recomendado pela ISO 10993-5.⁵⁵ Uma vez que foram confeccionados 3 corpos de prova para cada grupo experimental, em triplicata, o n amostral de cada grupo foi composto por 9 corpos de prova (n=9).

3.2.2.5 Cultivo celular

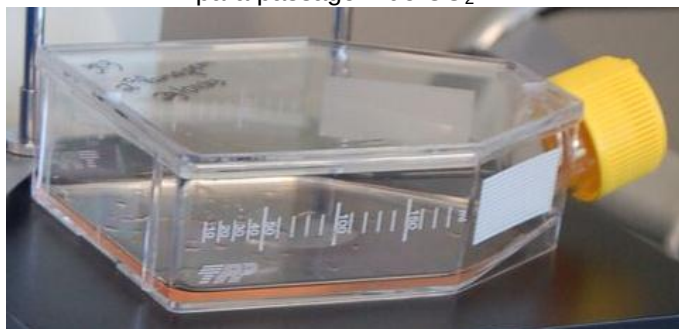
O possível efeito citotóxico das substâncias liberadas pelos materiais foi avaliado pelo método de cultura de células. Dessa forma, as células 3T3 foram propagadas em meio de cultura Eagle suplementado (Figura 12). O cultivo das células foi realizado em frascos (Costar; Corning Incorporated, Corning, NY, EUA) com tampa contendo um filtro que permitia a passagem de CO₂. Esses frascos foram incubados em estufa com 5% de CO₂ a 37°C.^{57,58} (Figura 13).

FIGURA 12 – Aspecto dos fibroblastos (3T3) viáveis para utilização no teste de citotoxicidade



Fonte: A autora.

FIGURA 13 – Células armazenadas em frasco com filtro para passagem de CO₂



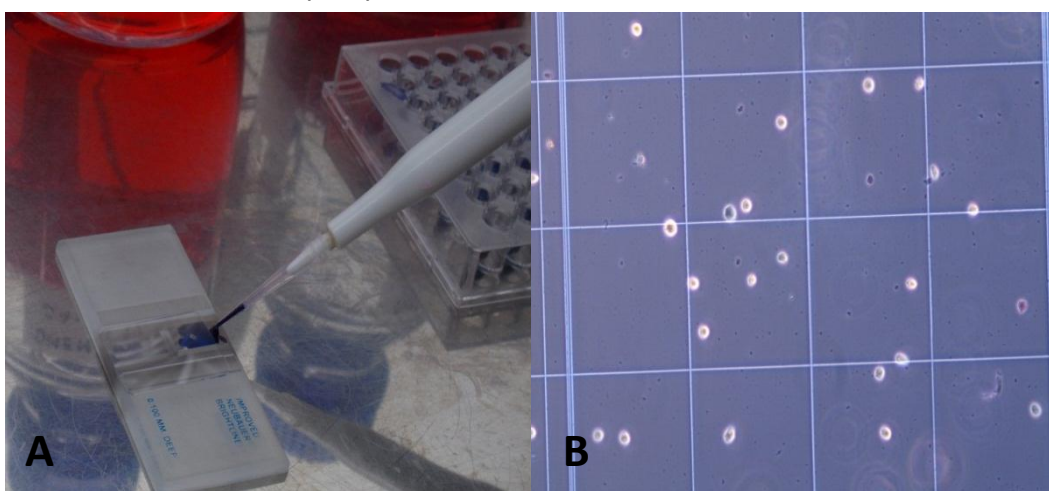
Fonte: A autora.

Para a manutenção da cultura, as células foram repicadas para novos frascos após períodos de 3 dias de incubação, até o momento de realização do teste de citotoxicidade. Para isso, o meio de cultura foi aspirado e 1 mL de tripsina com EDTA foi adicionado com a finalidade de desagregar as células da parede do fundo do frasco e obter uma suspensão. Dessa suspensão de células, cada 1 mL foi colocado em novo frasco, sendo acrescidos 9 mL de meio de cultura suplementado, com o auxílio de uma micropipeta mecânica (Labmate; HTL, Warsaw, Polônia). Cada frasco foi, então, tampado e levado à estufa com 5% de CO₂ para a formação de nova confluência de células.^{57,58} Todos os procedimentos foram realizados em área asséptica dentro da câmara de fluxo laminar previamente desinfetada com álcool 70°. Além disso, os materiais utilizados, com exceção das células, foram esterilizados previamente em luz ultravioleta durante 20 min dentro da câmara de fluxo laminar.^{57,58}

Para a realização do teste de citotoxicidade, uma suspensão de 3×10^3 células/mL de meio de cultura foi preparada. Para isso, as células foram descoladas do fundo da garrafa por meio da adição de tripsina com EDTA. Após 5 min em estufa com 5% de CO₂, 3 mL de meio de cultura Eagle suplementado foram adicionados na garrafa com as células já desprendidas. Essa suspensão foi transferida para um tubo de ensaio e colocada em centrífuga (Centribio; Equipar, Curitiba, PR, Brasil) por 10 min a 1.200 rpm, com o objetivo de precipitar as células no fundo do tubo. Em seguida, dentro da câmara de fluxo laminar, o sobrenadante foi desprezado e 1 mL de meio de cultura Eagle suplementado foi adicionado e as células, homogeneizadas. A partir daí, 10 µL de meio com as células foram retirados e adicionados 10 µL do corante azul de Tripán. Dessa solução, 10 µL foram removidos e introduzidos na câmara hemocitométrica tipo Neubauer (Boeco, Hamburg,

Alemanha) (Figura 14A), onde, então, as células viáveis foram contadas com a utilização de um microscópio óptico (modelo YS 100; Nikon, Tóquio, Japão) com aumento de 25x (Figura 14B). Em seguida, a suspensão foi ajustada a uma concentração de 3×10^3 células/mL de meio de cultura. Duzentos microlitros dessa suspensão foram colocados em cada compartimento de duas placas com 96 orifícios (uma para o teste MTT e uma para o teste Vermelho Neutro), as quais foram incubadas em estufa com 5% de CO₂ a 37°C por 24 h.

FIGURA 14 – A - Azul de Tripán sendo inserido na câmara de Neubauer; B - Contagem das células em microscópio óptico com aumento de 25x



Fonte: A autora.

Posteriormente, o meio de cultura foi desprezado e 200 µL dos extratos foram acrescentados em cada orifício da placa (Figura 15). Na sequência, as placas foram incubadas em estufa com 5% de CO₂ a 37°C por mais 24 h.

FIGURA 15 – Retirada do meio de cultura dos orifícios e colocação dos extratos dos corpos de prova



Fonte: A autora.

3.2.2.6 – Teste de citotoxicidade pelo método MTT

Neste método, o sal metiltetrazólio é incorporado à cultura de células. A enzima desidrogenase succínica das células viáveis quebra a estrutura do sal tetrazólio, produzindo cristais de formazan cor azul, determinando, dessa forma, valores relativos à intensidade da cor azul em espectrofotômetro específico com comprimento de onda determinado. Quanto maior a atividade mitocondrial, maior será a intensidade da luz azul e, assim, maior o número de células viáveis.^{57,58}

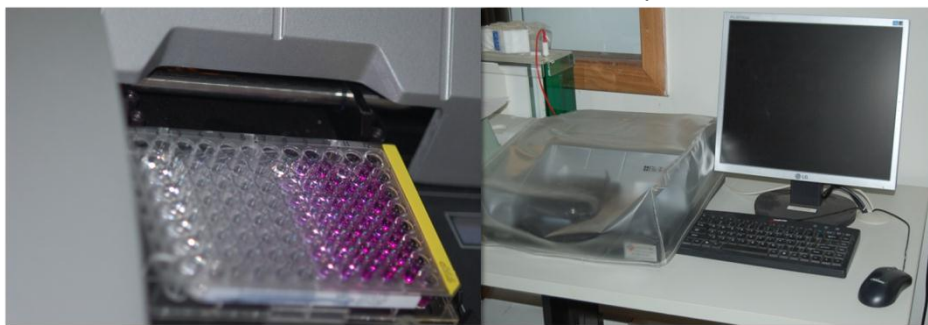
Para o teste MTT, os extratos foram removidos e 200 μ L de uma solução de meio de cultura e sal metiltetrazólio foram adicionados em cada orifício da placa de cultura (Figura 16), a qual foi incubada em estufa com 5% de CO₂ a 37°C por 3 a 4 h para a formação dos cristais de formazan. Para cada grupo experimental, foram destinados quatro compartimentos da placa (quadruplicata). Quatro orifícios receberam apenas 200 μ L de meio de cultura novo (controle). Em seguida, a solução de MTT foi retirada e 200 μ L de solução solubilizadora de MTT (propanol) foram adicionados a cada orifício da placa, a qual foi agitada levemente por 5 min, para solubilizar o sal. Logo após, cada solução foi transferida para novos orifícios para evitar interferências das células aderidas ao fundo dos poços na leitura pelo equipamento. Posteriormente, a análise da atividade mitocondrial foi feita em espectrofotômetro (Biotek EL 800; Biotek, Winooski, VT, EUA) com comprimento de onda de 570 nm (Figura 17). Todos os procedimentos foram repetidos três vezes.

FIGURA 16 – Adição do MTT aos orifícios (3 a 4 h de incubação)



Fonte: A autora.

FIGURA 17 – Análise da atividade mitocondrial em espectrofotômetro a 570 nm



Fonte: A autora.

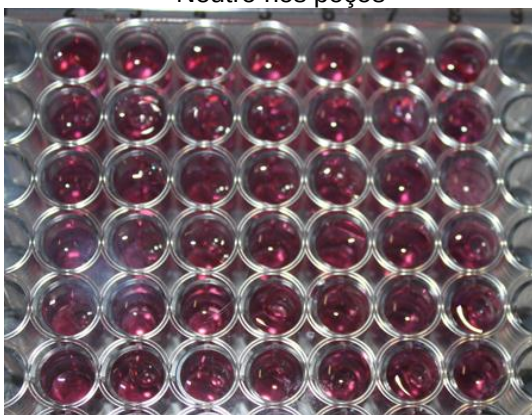
3.2.2.7 – Teste de citotoxicidade pelo método Vermelho Neutro

A viabilidade celular também pode ser evidenciada com auxílio de corantes vitais, como o Vermelho Neutro (Sigma, St. Louis, MO, EUA). Este reagente é solúvel em água e consegue atravessar a membrana celular, concentrando-se nos lisossomos e fixando-se por meio de ligações eletrostáticas hidrofóbicas em sítios aniônicos na matriz lisossomal. Muitas substâncias, dentre elas o monomômero residual, danificam as membranas, resultando no decréscimo de captura e ligação do Vermelho Neutro. Portanto, é possível distinguir entre células vivas e danificadas ou mortas pela medida de intensidade de cor da cultura celular.⁶²

Para a incorporação do Vermelho Neutro, os extratos foram removidos e os poços, lavados com PBS. A solução de Vermelho Neutro (40 µg/mL) foi previamente centrifugada a 3.200 rpm por 10 min. Em seguida, duzentos microlitros desta solução foram adicionados em cada poço (Figura 18). As placas foram incubadas

por 3 h para permitir a incorporação do corante nas células vivas. O meio foi removido e as placas, lavadas com uma mistura de CaCl_2 1% e formaldeído 0,5% (eficiente em remover o corante externo). Duzentos microlitros de solução de ácido acético/etanol (1%/50%) foram adicionados. Após 10 min à temperatura ambiente e agitação durante poucos segundos no agitador de placas, a análise da atividade lisossomal foi feita em espectrofotômetro a 540 nm. Todos os procedimentos foram repetidos três vezes.

FIGURA 18 – Aspecto do corante Vermelho Neutro nos poços



Fonte: A autora.

3.2.2.8 Análise dos resultados de citotoxicidade

A citotoxicidade foi determinada de acordo com a inibição encontrada em relação ao grupo controle e os grupos foram classificados em: não citotóxico (inibição menor que 25%); discretamente citotóxico (inibição entre 25% e 50%); moderadamente citotóxico (inibição entre 50% e 75%) e intensamente citotóxico (inibição maior que 75%).⁵⁵

Os resultados de viabilidade celular foram submetidos à ANOVA-2 fatores ($\alpha=0,05$; “material” e “ciclo de polimerização”) para cada teste, MTT ou Vermelho neutro, utilizando o *software* SAS 8.0 for Windows (SAS Institute Inc., Cary, EUA).

3.2.3 EXPERIMENTO 3 – Porosidade, sorção de água e solubilidade de resinas acrílicas para base de prótese polimerizadas convencionalmente ou em micro-ondas

3.2.3.1 Confeção dos corpos de prova para as análises de porosidade e sorção de água e solubilidade

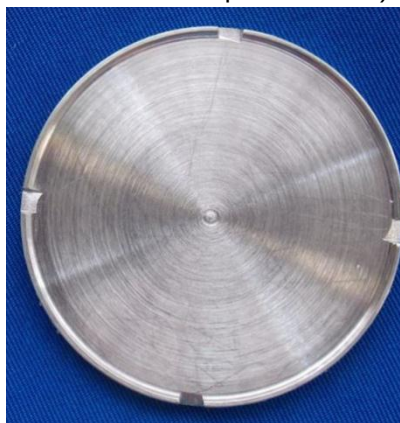
Para a análise de porosidade, foram confeccionados corpos de prova ($n=10$) retangulares nas dimensões de $50 \times 4 \times 2,0 \pm 0,1$ mm.⁶³ Matrizes metálicas nessas dimensões (Figura 19) foram moldadas utilizando silicone laboratorial entre duas placas de vidro. Para as análises de sorção de água e solubilidade, foram confeccionados corpos de prova ($n=10$) circulares nas dimensões de 50 mm de diâmetro x 0,5 mm de espessura⁵² utilizando-se matrizes metálicas (Figura 20).

FIGURA 19 – Matriz metálica retangular ($50 \times 4 \times 2,0 \pm 0,1$ mm)



Fonte: A autora.

FIGURA 20 – Matriz metálica circular (50 mm de diâmetro x 0,5 mm de profundidade)



Fonte: A autora.

O conjunto molde/matriz (Figura 21) ou apenas a matriz metálica (Figura 22) foram incluídos em muflas, metálicas ou plásticas, utilizando gesso pedra tipo III. A mufla foi fechada e permaneceu durante o tempo de presa do gesso sob carga de 0,5 t em prensa hidráulica. Após esse período, a mufla foi aberta, a matriz metálica foi removida e os materiais foram proporcionados e manipulados de acordo com as instruções do fabricante (Tabela 1) e inseridos na mufla. A mufla foi, então, fechada

e mantida sob carga de 1,25 t em prensa hidráulica durante 30 min. Os corpos de prova foram, então, submetidos aos ciclos de polimerização, convencional ou em micro-ondas, apresentados na Tabela 2.

FIGURA 21 - Inclusão do conjunto molde/matriz em mufla plástica para a análise de porosidade



Fonte: A autora.

FIGURA 22 – Inclusão da matriz metálica circular em mufla plástica para as análises de sorção de água e solubilidade



Fonte: A autora.

As muflas foram resfriadas em bancada por 30 min e em água corrente por 15 min antes da remoção dos corpos de prova. No caso dos espécimes de porosidade, foi realizado um procedimento de acabamento e polimento metalográfico utilizando lixas de carbetto de silício de granulação #100, 240 e 600 (Norton Abrasivos, São Paulo, SP). Para os corpos de prova de sorção de água e solubilidade, foram utilizadas fresas minicutt (Edenta, Suíça) para remoção de

irregularidades de suas bordas. Os espécimes foram, então, examinados visualmente e somente aqueles que apresentaram mínima porosidade foram utilizados.⁵²

3.2.3.2 Porosidade

A porosidade foi relacionada à quantidade de água que cada espécime absorveu após ter sido acondicionado em água destilada a 37°C. Para a realização do método, os corpos de prova foram pesados em uma balança analítica digital (AW220; Shimadzu do Brasil, São Paulo, SP, precisão de 0,0001 g) em duas etapas.

Na primeira etapa, o espécime foi pesado diariamente após um período de armazenamento em dessecador (Vidrolabor, São Paulo, SP). Na segunda etapa, o espécime também foi pesado diariamente após ter sido armazenado em água destilada em estufa a 37°C. O registro final das pesagens para o espécime seco e para o espécime úmido foi realizado no momento em que se atingiu massa estável, que ocorreu, em média, em 15 dias, evidenciada após estabilização em escala de miligrama (Figura 23).

FIGURA 23 – Pesagem do espécime seco e úmido em duas etapas: A – 1ª etapa: após armazenamento em dessecador; B – 2ª etapa: após imersão em água destilada a 37°C



Fonte: A autora.

A porosidade foi analisada utilizando-se o método de porosimetria por meio de gravimetria^{41,63,64} e, para isso, foi realizada uma pesagem adicional após cada

etapa experimental, com o espécime totalmente imerso em água destilada (Figura 24).

FIGURA 24 – Pesagem adicional com o espécime totalmente imerso em água destilada



Fonte: A autora.

A partir daí, a porosidade foi calculada de acordo com as seguintes Equações:

$$\text{Ve seco} = (m_s - m_{s'})/\rho_{\text{água}}$$

(2)

$$\text{Ve úmido} = (m_u - m_{u'})/\rho_{\text{água}}$$

(3)

$$\% \text{ Porosidade} = 100 \times (\text{Ve seco} - \text{Ve úmido})/\text{Ve seco}$$

(4)

nas quais: *Ve seco* (mL) representa o volume do espécime seco; m_s (g) representa a massa do espécime seco registrada no ar; $m_{s'}$ (g) representa a massa do espécime seco registrada com o espécime mergulhado imediatamente na água; $\rho_{\text{água}}$ (g/mL) representa a densidade da água; *Ve úmido* (mL) representa o volume do espécime úmido; m_u (g) representa a massa do espécime úmido registrada no ar e

m_u' (g) representa a massa do espécime úmido registrada com o espécime mergulhado imediatamente na água.

3.2.3.3 Sorção de água e solubilidade

Os corpos de prova foram submetidos a um processo de secagem com o objetivo de se atingir massa constante. Para isso, foram mantidos em dessecador a vácuo e pesados diariamente em balança digital até que a diferença entre as pesagens fosse inferior a 0,5 mg, em um período de 24 h. Após a obtenção da massa inicial, os corpos de prova foram armazenados em água destilada em estufa a 37°C e também foram pesados diariamente, após cuidadosa secagem com papel absorvente, até a estabilização que ocorreu em média em 7 dias.

Para calcular o grau de sorção e solubilidade, os corpos de prova passaram novamente pelo processo de secagem acima descrito. As porcentagens de sorção e solubilidade foram calculadas utilizando-se as seguintes Equações:⁶⁵

$$\% \text{ Sorção} = 100 \times (m_2 - m_3)/m_1$$

(5)

$$\% \text{ Solubilidade} = 100 \times (m_1 - m_3)/m_1$$

(6)

nas quais: m_2 representa a massa (mg) do corpo de prova após imersão em água; m_3 representa a massa (mg) do corpo de prova após a segunda dessecação e m_1 representa a massa (mg) do corpo de prova após a primeira dessecação.

3.2.3.4 Análise estatística de porosidade, sorção de água e solubilidade

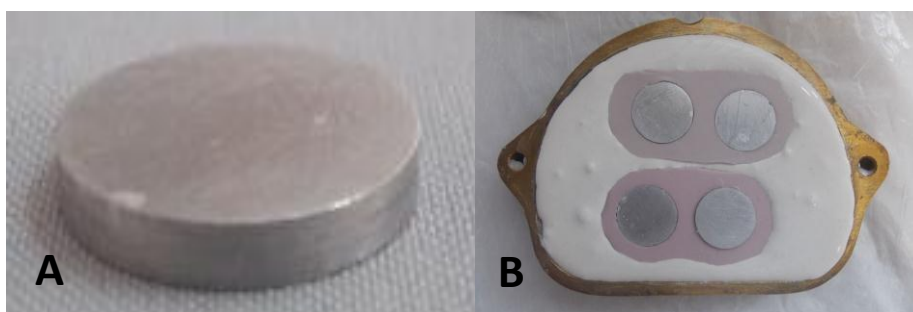
Os resultados de porosidade, sorção de água e solubilidade (%) foram submetidos à análise estatística utilizando a ANOVA 2 fatores (“material” e “ciclo de polimerização”) e teste de Tukey HSD ($\alpha=0,05$). Análises do poder da amostra foram realizadas para todos os dados obtidos utilizando o *software* (IBM SPSS 19; SPSS Inc., IBM Company, Armonk, NY, EUA).

3.2.4 EXPERIMENTO 4 – Efeito da imersão em líquidos potencialmente corantes associada a escovação simulada sobre a rugosidade de superfície e a cor de resinas acrílicas polimerizadas convencionalmente e em micro-ondas

3.2.4.1 Confeção dos corpos de prova para as análises de rugosidade de superfície e de estabilidade de cor

Os corpos de prova (n=5) foram confeccionados, a partir de moldes utilizando silicone laboratorial, de matrizes metálicas na forma de discos com dimensões de 20 mm de diâmetro e $3,0 \pm 0,1$ mm de espessura⁶⁶ (Figura 25A). O conjunto molde/matriz foi incluído em muflas, metálicas ou plásticas, utilizando gesso pedra tipo III (Figura 25B).

FIGURA 25 – A - Matriz metálica circular (20 mm de diâmetro x $3,0 \pm 0,1$ mm de espessura); B - Inclusão da matriz metálica circular em mufla metálica para as análises de rugosidade de superfície e estabilidade de cor



Fonte: A autora.

A mufla foi fechada e mantida sob carga de 0,5 t em prensa hidráulica durante o tempo de presa do gesso. Após esse período, a mufla foi aberta, as matrizes foram removidas e os materiais foram proporcionados e manipulados de acordo com as instruções do fabricante (Tabela 1) e inseridos na mufla. Os corpos de prova foram, então, submetidos aos ciclos de polimerização, convencional ou em micro-ondas apresentados na Tabela 2.

Em seguida, as muflas foram resfriadas em bancada por 30 min e em água corrente por 15 min.⁵² Os corpos de prova foram removidos dos moldes e submetidos a um procedimento de acabamento e polimento metalográfico em politriz a 100 rpm sob irrigação constante, seguindo uma sequência de lixas de carbetto de

silício (#240, 400, 600 e 1200; 3M, Campinas, SP, Brasil) durante 20 s cada nas duas faces do espécime.

Os corpos de prova (Figura 26) foram finalmente armazenados em água destilada em estufa a 37°C por 48 h.⁵² Uma tira de fio dental foi colada à lateral de cada corpo de prova para mantê-los suspensos, sem contato com o fundo do recipiente, e para que durante a avaliação da cor não houvesse interferência na face de leitura.⁶⁶ Este tempo de armazenamento inicial em água destilada foi considerado como T_0 .

FIGURA 26 – Corpo de prova das análises de rugosidade de superfície e estabilidade de cor após polimento



Fonte: A autora.

3.2.4.2 Soluções corantes e condições de imersão

Para a investigação da estabilidade de cor das resinas, foram selecionados dois alimentos líquidos com base em seu potencial de manchamento e frequência de ingestão pela população: café solúvel e vinho tinto; e a água destilada foi utilizada como líquido não corante.

A solução de café foi preparada na proporção de 3,6 g de café instantâneo solúvel (Nestlé Brasil Ltda., Araras, SP, Brasil) para cada 300 mL de água destilada em ebulição.⁶⁷ Os corpos de prova foram imersos nesta solução somente após seu resfriamento. Para a solução de vinho tinto, foi utilizado um vinho tinto seco de mesa da marca Campo Largo (Campo Largo, PR, Brasil).

Após o T_0 , foram feitas análises de rugosidade de superfície (Figura 27) e de cor (Figura 28) que corresponderam aos valores iniciais de cada corpo de prova. Na sequência, os espécimes foram imersos em 150 mL de uma das três soluções, também suspensos pelo fio dental, e armazenados em estufa a 37°C durante 36 dias (T_1). O tempo proposto foi baseado na especulação que 24 h de imersão em

café simularia o manchamento associado ao consumo por um mês.^{68,69}. Assim, 36 dias simularia 3 anos de uso de próteses removíveis. Após este período, as análises de rugosidade e de cor foram novamente realizadas correspondendo aos valores finais dos corpos de prova.

FIGURA 27 – Análise de rugosidade de superfície



Fonte: A autora.

FIGURA 28 – Análise de cor em espectrofotômetro



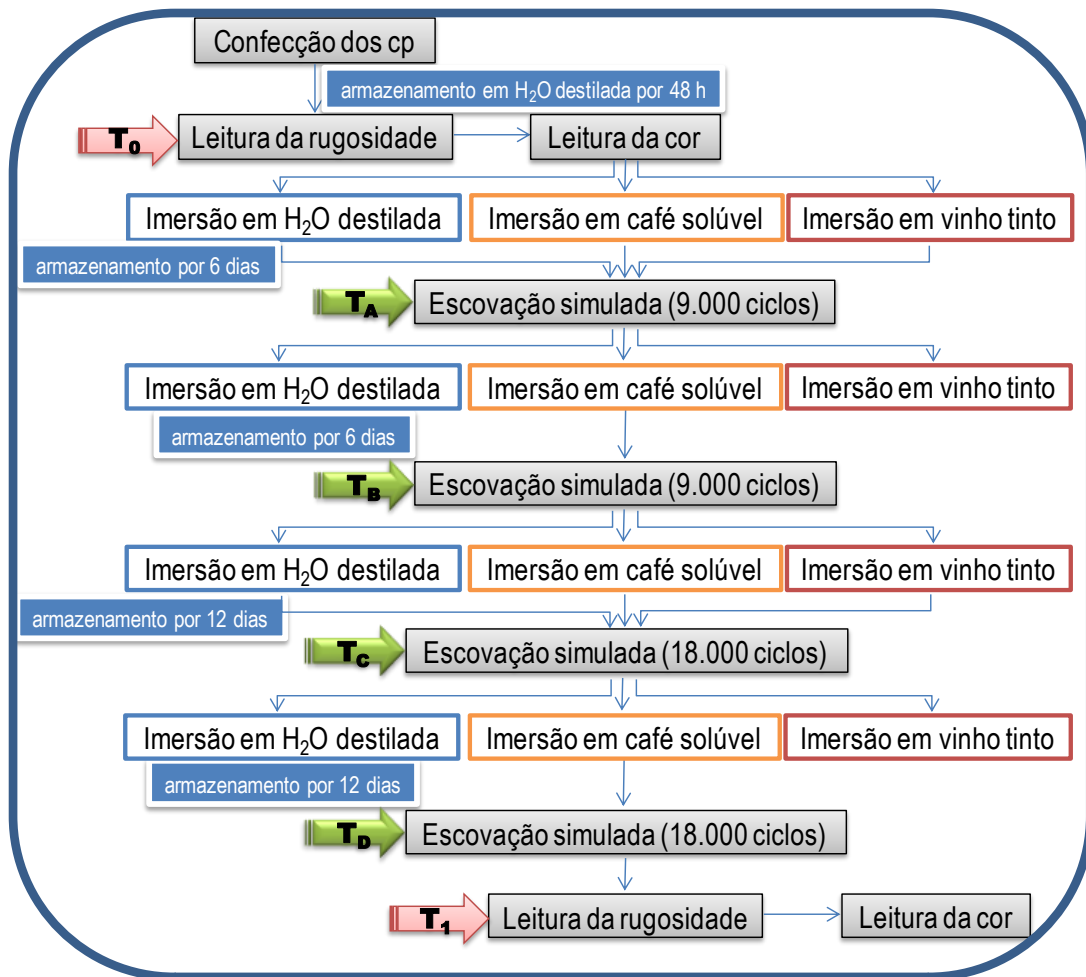
Fonte: A autora.

As soluções eram substituídas quando se verificava alterações nos valores de pH (DMPH-2; Digimed®, São Paulo, SP, Brasil), sinais visuais de contaminação fúngica e/ou precipitação de partículas no fundo dos recipientes. De acordo com estas avaliações, padronizou-se a substituição a cada 3 dias. Os pHs das soluções utilizadas foram em média de 3,0 para o vinho tinto, 5,0 para o café.

3.2.4.3 Delineamento do Experimento 4

A descrição ilustrada do experimento 4 está representada na Figura 29 sob a forma de um fluxograma.

FIGURA 29 – Fluxograma representando o delineamento do Experimento 4



Fonte: A autora.

3.2.4.4 Validação da etapa de escovação simulada

Para a determinação da forma como os corpos de prova seriam escovados num total de 54.000 ciclos, numa frequência de 370 ciclos por minuto, foram confeccionados espécimes ($n=3$) da resina de cor mais clara e maior translucidez (Vipi Cril) e imersos na solução com maior potencial de manchamento (vinho tinto)^{66,68} durante 36 dias e, a partir daí, foram avaliadas as propriedades de rugosidade de superfície e estabilidade de cor. Uma vez que 18.000 ciclos correspondem a um período de escovação regular de um paciente adulto durante um ano,⁷⁰ os espécimes foram escovados nas suas duas faces em três diferentes condições, anteriormente ao período final de análise T_1 :

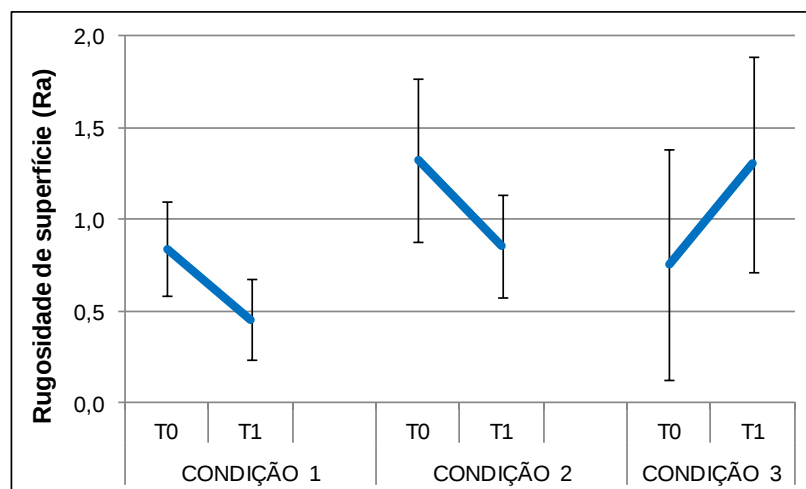
- condição 1 = escovação diária usando 1.500 ciclos durante 36 dias;
- condição 2 = * T_A : 6º dia → 9.000 ciclos equivalentes a seis meses;
* T_B : 12º dia → 9.000 ciclos equivalentes a seis meses.

- * T_C : 24° dia → 18.000 ciclos equivalentes a um ano;
- * T_D : 36° dia → 18.000 ciclos equivalentes a um ano.
- condição 3 = * T_E : 12° dia → 18.000 ciclos equivalentes a um ano;
- * T_F : 36° dia → 36.000 ciclos equivalentes a dois anos.

Os resultados de rugosidade de superfície (R_a , μm) e de alteração de cor (ΔE) da etapa de validação da escovação foram analisados por meio da ANOVA de fator único e da ANOVA 2 fatores de medidas repetidas, respectivamente, utilizando o *software* SPSS (IBM SPSS 19; SPSS Inc., IBM Company, Armonk, NY, EUA).

Não foi detectada diferença estatisticamente significativa entre as condições experimentais avaliadas para ambos os fatores ($P > 0,05$). A Figura 30 ilustra os resultados de rugosidade de superfície. Os resultados de ΔE $L^*a^*b^*$ não foram considerados clinicamente significantes (Tabela 4).

FIGURA 30 - Valores médios $\pm$ desvio padrão de rugosidade de superfície (R_a , μm) dos corpos de prova da resina VC na etapa de validação da escovação simulada



Fonte: A autora.

Tabela 4. Valores médios (desvio padrão) de ΔE $L^*a^*b^*$ dos corpos de prova da resina VC na etapa de validação da escovação simulada

Condição 1	Condição 2	Condição 3
2,1 (1,4)	3,3 (0,9)	2,6 (1,0)

Fonte: A autora.

3.2.4.5 Escovação simulada

Optou-se pela escovação simulada na condição 2, visto que a mesma resultou em um padrão de rugosidade de superfície mais próximo da condição 1, na qual a escovação foi feita diariamente (Figura 30). Portanto, utilizando a condição 2 de escovação simulada, após cada um dos períodos de imersão (T_A , T_B , T_C e T_D), os corpos de prova eram removidos das soluções (água destilada, café solúvel e vinho tinto) e lavados em água corrente. Em seguida, eram posicionados em *stubs* de cloreto de polivinila contendo resina acrílica incolor autopolimerizável (Jet; Artigos Odontológicos Clássico, São Paulo, SP, Brasil), e fixados com cera utilidade de modo que uma de suas faces ficasse alinhada ao bordo do *stub*.

Na máquina de escovação simulada (MSEt; Marcelo Nucci ME, São Carlos, SP, Brasil), foram adaptadas dez escovas com cerdas de nylon com comprimento uniforme,⁷¹ flexibilidade e extremidade arredondada (Tek®30; Johnson & Johnson do Brasil, São Paulo, SP, Brasil) (Figura 31). As escovas eram substituídas logo quando alguma deterioração ou desgaste das cerdas eram observados.^{72,73}

FIGURA 31 – Posicionamento dos *stubs* e corpos de prova na máquina de escovação



Fonte: A autora.

O dentífrico (Colgate Total 12 Clean Mint; Colgate Palmolive, São Paulo, SP, Brasil) foi diluído em água destilada na proporção em peso de 1:1. Essa mistura foi homogeneizada em agitador magnético (modelo 752; Fisatom, São Paulo, SP, Brasil) por 1 min. As soluções do dentífrico eram colocadas em seringas plásticas e, então, encaixadas na máquina de escovação.

O equipamento foi configurado para realização dos ciclos no eixo X com movimentos de vai e vem e uma carga vertical de 200 g foi regulada sobre cada corpo de prova.^{49,74} Os ciclos programados foram realizados nas duas faces de cada corpo de prova a uma temperatura de 37°C e, a cada 2 min, 2 mL da solução de dentífrico eram injetados sobre os espécimes.

3.2.4.6 Rugosidade de superfície

Em cada período de análise (Figura 29), os espécimes eram removidos do recipiente contendo uma das soluções de imersão, secos com papel absorvente e submetidos à avaliação da rugosidade de superfície (Ra).

Foi utilizado um rugosímetro de bancada (Surfcorder SE 1700; Kozaka Industry, Kozaka, Japão) de diâmetro de ponta ativa 2 μm e precisão de 0,01 μm de resolução, calibrado a um comprimento de 0,8 mm, 2,4 mm de percurso de medida, a uma velocidade de 0,5 mm/s de ida e 1 mm/s de volta.

Foram realizadas três mensurações em diferentes regiões de uma das faces dos corpos de prova, obtendo-se uma média aritmética que equivaleu ao valor médio de rugosidade de superfície para aquele espécime.^{50,75}

3.2.4.7 Estabilidade de cor

Após o término do tempo de armazenamento inicial de 48 h, os corpos de prova foram removidos da água destilada, secos delicadamente com papel absorvente e posicionados em um orifício específico na lateral do acessório para medida de reflexão difusa do espectrofotômetro, suspensos pelo fio dental como relatado anteriormente, para a mensuração inicial de cor.

Foi utilizada a técnica de espectrofotometria de reflectância, por meio do equipamento Varian-Cary, iluminante D-65, espectro de 830 nm a 360 nm, espaço de cor CIE-L*a*b* e ângulo de observador de 10°. Anteriormente à primeira leitura de cor, foi realizada a leitura de um fundo padrão branco universal, para correção de linha de base. A leitura inicial foi registrada em coordenadas referentes ao espaço internacional de cor CIE-L*a*b*.⁶⁶

Imediatamente após o término da primeira leitura de cor (T_0), os corpos de prova foram imersos por 36 dias em uma das soluções de armazenamento e submetidos aos ciclos de escovação conforme detalhado na Figura 29. Após os ciclos finais de escovação, os corpos de prova foram lavados em água corrente, secos cuidadosamente com papel absorvente e submetidos à leitura final de cor (T_1). Antes de cada mensuração, os corpos de prova eram retirados das soluções e secos delicadamente com papel absorvente. A comparação da cor antes e após a imersão nas soluções foi dada pela diferença de cor de acordo com a Equação 7:

$$\Delta E = \sqrt{(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2}$$

(7)

na qual: “ ΔL^* ”, “ Δa^* ” e “ Δb^* ” representam as diferenças de leituras das três coordenadas (eixo y, “ L^* ”; eixo x, “ a^* ” e eixo z, “ b^* ”) após e antes da imersão. O parâmetro “ L^* ” representa a luminosidade variando de 0 (preto) a 100 (branco); os parâmetros “ a^* ” e “ b^* ” refletem a cromaticidade variando de vermelho (+ a^*) a verde (- a^*) e amarelo (+ b^*) a azul (- b^*).

Por esse tipo de análise, considerou-se como clinicamente significativa a alteração de cor cujo $\Delta E L^*a^*b^*$ foi superior a 3,3. Além disso, as alterações de cor foram quantificadas pela *National Bureau of Standards* (NBS; Tabela 5) tendo em vista os valores de ΔE baseados em uma fórmula (Equação 8) constante de alteração de cor perceptível ao olho humano.⁶⁶

$$NBS = \Delta E L^*a^*b^* \times 0,92$$

(8)

Tabela 5. Escores de alteração de cor segundo o sistema NBS

Valores de alteração da cor	Visualização da alteração pelo olho humano
0,0 a 0,5	Traços de alteração
0,5 a 1,5	Alteração leve
1,5 a 3,0	Alteração perceptível
3,0 a 6,0	Alteração marcada
6,0 a 12,0	Alteração extremamente marcada
12,0 ou mais	Alteração para outra cor

Fonte: May KB, et al. Denture base resins: comparison study of color stability. J Prosthet Dent. 1992;68(1):78-82.⁴⁴

3.2.4.8 Análise estatística de rugosidade de superfície e estabilidade de cor

Os resultados de rugosidade de superfície foram submetidos à análise estatística utilizando a ANOVA 3 fatores (“ciclo de polimerização”, “solução” e “tempo de imersão”) de medidas repetidas seguida pelo teste de Bonferroni ($\alpha=0,05$). Os resultados de alteração de cor foram submetidos à ANOVA 2 fatores (“ciclo de polimerização” e “solução”) seguida pelo teste de Bonferroni ($\alpha=0,05$). Análises do

poder da amostra foram realizadas para todos os dados obtidos utilizando o *software* (IBM SPSS 19; SPSS Inc., IBM Company, Armonk, NY, EUA).

4 CAPÍTULOS

4.1 CAPÍTULO 1 – Artigo **Degree of conversion and kinetics of polymerization of denture base acrylic resins polymerized in conventional water-bath or microwave cycles** submetido para publicação no periódico *Dental Materials*.

4.2 CAPÍTULO 2 – Artigo **Citotoxicidade de resinas acrílicas para base de prótese polimerizadas convencionalmente ou por micro-ondas: Análise por MTT e Vermelho Neutro**, que será versado para a língua inglesa, revisado e submetido para publicação no periódico *Dental Materials*.

4.3 CAPÍTULO 3 – Artigo **Porosity, water sorption and solubility of denture base acrylic resins polymerized conventionally or in microwave** submetido para publicação no periódico *Journal of Prosthodontics*.

4.4 CAPÍTULO 4 – Artigo **Effect of immersion in potentially staining drinks associated with simulated brushing on roughness and color stability of denture base acrylic resins polymerized with different cycles**, que será revisado e submetido para publicação no periódico *Journal of Prosthetic Dentistry*.

4.1 CAPÍTULO 1 – Artigo **Degree of conversion and kinetics of polymerization of denture base acrylic resins polymerized in conventional water-bath or microwave cycles** submetido para publicação na revista *Dental Materials*.

• **Dental Materials** <ees.dema.0.35cc7e.905aa2d4@eesmail.elsevier.com>

Dez 7 em 10:23 PM ★

Para vanurban@yahoo.com

Full Length Article

Dear Dr. Vanessa Migliorini Urban,

Your submission entitled "Degree of conversion of denture base acrylic resins polymerized in conventional water-bath or experimental microwave cycles" has been received by Dental Materials

You may check on the progress of your paper by logging on to the Elsevier Editorial System as an author. The URL is <http://ees.elsevier.com/dema/>.

Your username is: vanurban@yahoo.com

If you need to retrieve password details, please go to: http://ees.elsevier.com/dema/automail_query.asp

Your manuscript will be given a reference number once an Editor has been assigned.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

Elsevier Editorial System
Dental Materials

Elsevier Editorial System(tm) for Dental
Materials
Manuscript Draft

Manuscript Number:

Title: Degree of conversion of denture base acrylic resins polymerized in conventional water-bath or experimental microwave cycles

Article Type: Full Length Article

Keywords: polymethyl methacrylate, microwave, Raman spectroscopy, Fourier transform infrared spectroscopy.

Corresponding Author: Dr. Vanessa Migliorini Urban, Ph.D.

Corresponding Author's Institution: State University of Ponta Grossa

First Author: Rosana M Figuerôa, MS

Order of Authors: Rosana M Figuerôa, MS; Cesar A Arrais, Ph.D.; Alyne D Pedroso, DDS; Anelise A Tiburski, DDS; Elisângela F Janoski, DDS; Karin H Neppelenbroek, Ph.D.; Vanessa Migliorini Urban, Ph.D.

Abstract: Objectives. To evaluate the degree of conversion (DC) of heat-polymerized acrylic resins (Vipi Cril-VC and Vipi Wave-VW) after conventional or experimental microwave-cured cycles. Methods. Specimens (n=6; 50x2 mm) were made, cured: 1-WB=65°C during 90 min + boiling during 90 min (VC cycle-control group); 2-M630/25=10 min at 270 W + 5 min at 0 W + 10 min at 360 W (VW cycle); 3-M550/3=3 min at 550 W; 4-M650/5=5 min at 650 W, and then immersed in distilled water at 37°C for 48 h. A micro-FT-Raman spectrometer evaluated DC (%). An FTIR spectrometer in ATR mode also measured the kinetics of polymerization of the materials prior to thermal activation. Data were submitted to 2 way-ANOVA/Bonferroni ($\alpha=0.05$). Results. For VC resin, there was no significant difference among the groups. For VW resin, the lowest values appeared in the M630/25 and M650/5 cycles ($P<0.03$). WB cycle resulted in the highest mean values for both materials ($P<0.05$). DC values ranged from 68.5 to 85.9%. A similarity of the kinetic of polymerization results was observed and both the materials presented 36.8% of conversion before the cycles. Significance. Microwave polymerization presents several advantages in relation to water-bath conventional cycles such as great time reduction. To polymerize a conventional-formulated denture base material using a shorter microwave cycle with DC values similar to longer cycles represents an improvement because the resulting material may present adequate physical and mechanical properties.

Degree of conversion and kinetics of polymerization of denture base acrylic resins polymerized in conventional water-bath or microwave cycles

Rosana Marques Silva Figuerôa^a, Cesar Augusto Galvão Arrais^a, Alyne Dayane Pedroso^a, Anelise Aparecida Tiburski^a, Elisângela de Fátima de Lima Janoski^a, Karin Hermana Neppelenbroek^b, Vanessa Migliorini Urban^{a*}

^a Department of Dentistry, State University of Ponta Grossa, Ponta Grossa, PR, Brazil

^b Department of Prosthodontics, Bauru School of Dentistry, University of Sao Paulo, Bauru, SP, Brazil

* Corresponding author. Tel: +55 42 32203106; fax: +55 42 32203102.

Av. General Carlos Cavalcanti 4748, Uvaranas, 84030-900, Ponta Grossa, Paraná, Brazil.

E-mail address: vanurban@yahoo.com (V. M. Urban).

ABSTRACT

Objectives. To evaluate the degree of conversion (DC) and kinetics of polymerization of heat-polymerized acrylic resins (Vipi Cril–VC and Vipi Wave–VW) after conventional or microwave-cured cycles.

Methods. Specimens (n=6; 50x2 mm) were made, cured: 1-WB=65°C during 90 min + boiling during 90 min (VC cycle–control group); 2-M630/25=10 min at 270 W + 5 min at 0 W + 10 min at 360 W (VW cycle); 3-M550/3=3 min at 550 W; 4–M650/5=5 min at 650 W, and then immersed in distilled water at 37°C for 48 h. A micro-FT-Raman spectrometer evaluated DC (%). An FTIR spectrometer in ATR mode also measured the kinetics of polymerization of the materials prior to thermal activation. Data were submitted to 2 way-ANOVA/Bonferroni ($\alpha=0.05$).

Results. For VC resin, there was no significant difference among the groups. For VW resin, the lowest values appeared in the M630/25 and M650/5 cycles ($P<0.03$). WB cycle resulted in the highest mean values for both materials ($P<0.05$). DC values ranged from 66.9 to 85.9%. A similarity of the kinetic of polymerization results was observed and both the materials presented 36.8% of conversion before the cycles.

Significance. Microwave polymerization presents several advantages in relation to water-bath conventional cycles such as great time reduction. To polymerize a conventional-formulated denture base material using a shorter microwave cycle with DC values similar to longer cycles represents an improvement because the resulting material may present adequate physical and mechanical properties.

Keywords: polymethyl methacrylate, microwave, Raman spectroscopy, Fourier transform infrared spectroscopy.

1. Introduction

For many decades, the most common material used for making denture bases has been the polymethyl methacrylate. These acrylic resins are heat-activated and processed within controlled temperature during specific periods. Over the years, one of the most significant changes in the use of these materials was related to advances in faster polymerization cycles. The purpose of shorter or conventional processing cycles is to polymerize resins without creating porosity. In the conventional water-bath method, the heating of resin is slow because the monomer molecules are passively moved due to the thermal shock of other molecules [1]. In microwave polymerization, the monomer molecules move due to internal heat produced by a high-frequency electromagnetic field [2], eliminating the time required to transfer the heat from the water bath until the resin inside the flask. Thus, this alternative method has advantages such as time reduction [2], ease and cleaning during acrylic resin processing [3], minimal color change in the denture base resin, and low risk of fracture of artificial teeth during deflasking [4].

The addition polymerization of these materials requires thermal activation of the initiator benzoyl peroxide to form free radicals. These molecules attract methacrylate monomers, which have their carbon double bonds ($C=C$) converted into single bonds ($C-C$). A series of chemical reactions occur with the formation of polymers from a large number of monomer molecules. Theoretically, these reactions should proceed with the increased heat until all the monomer has converted to polymer [5]. However, as the temperature of polymerization decreases, polymer formation also decreases so residual monomer molecules remain in the polymerized resin [6].

Studies have shown that the amount of residual monomer may be influenced by time, temperature [7], and polymerization method, being higher in autopolymerizing resins than that of the heat-polymerizing denture base resin, and low in microwaved resins [8]. Due to its

plasticizing effect, monomer may adversely affect the physical [9] and mechanical properties [1] of the resulting polymer; and the higher the degree of conversion of double bonds, the higher the mechanical properties of the resins [7]. Furthermore, the residual monomer released from the denture base material can cause cytotoxicity [10] and irritate the soft tissues associated to the denture [11,12].

Proper selection of microwave curing cycles is important to prevent overheating of the monomer that could cause degradation, porosity, and consequent damage to the properties of the prosthesis [2]. According to Bafille et al. [13], resins formulated for use in a microwave oven could contain triethylene or tetraethyleneglycol dimethacrylate in their composition. These dimethacrylates have low vapor pressure, allowing polymerization at elevated temperatures (between 100°C and 150°C) without risk of porosities, unlike methyl methacrylate, which has a high vapor pressure [13].

While several studies have assessed the conversion of resin composites, little information is available on denture base acrylic resins [1,14-16]. The analysis of degree of conversion is a tool for evaluation of the mechanical properties of the polymer and its clinical performance [17] and the authors found no work in the literature that had evaluated the degree of conversion of conventional acrylic resins or resins formulated for microwave after experimental microwave curing cycles. Thus, this study aimed to evaluate the degree of conversion of acrylic resins Vipi Cril (VIPI Produtos Odontológicos, Pirassununga, Sao Paulo, Brazil) and Vipi Wave (VIPI Produtos Odontológicos) after water-bath conventional and microwave curing cycles. In addition, the authors measured the kinetics of polymerization of the materials prior to thermal activation. The hypotheses evaluated in this study were that the resins would differ in their degree of conversion and kinetics of polymerization.

2. Material and methods

2.1 Materials

The acrylic resin denture bases selected for this study are presented in Table 1.

2.2 Specimen preparation

To obtain specimens (n=6) with the dimensions recommended by ISO 1567 [18] specification for the evaluation of residual monomer content [6,16], stainless steel circular matrixes with the dimensions of 50 mm diameter and 3 mm in thickness were used. The metal matrixes were molded using laboratory silicone (Zetalabor-Zhermack, Labordental, São Paulo, SP, Brazil) and the set mold/matrix was invested in metal (OGP, Bragança Paulista, SP, Brazil) or plastic flasks (Vipi Ltda., Pirassununga, SP, Brazil). The materials were handled according to the manufacturer's instructions (Table 1) and packed into the flask. The specimens then underwent conventional water-bath (SL-155/22, Solab, Piracicaba, SP, Brazil) or microwave (MEF 41, Electrolux, Manaus, AM, Brazil) polymerization cycles shown in Table 2.

The flasks were bench cooled for 30 min and then in running water for 15 min [18]. After deflasking, 0.5 mm on each side of the specimens was removed using metal devices to obtain the thickness of 2 mm [18]. The finishing and polishing (Aropol E-200, Cotia, SP, Brazil) procedures employed silicon carbide sandpapers #240, 400, 600, 1200, 2000, and felt discs with diamond pastes of 6, 3, and 1 μm (3M Brazil, Sumaré, SP, Brazil) under constant irrigation. The specimens were then stored in distilled water at 37°C for 48 h [18].

2.3 Degree of conversion analysis

Analysis employed the FT-Raman spectrometer (Bruker Senterra DU420A-OE-152, Bruker Optics GmbH, Ettlingen, Baden-Württemberg, Germany) coupled with optical microscopy. The spectra were recorded at room temperature. The experimental parameters were: neodymium:yttrium-aluminum-garnet (Nd:YAG) laser at 532 nm and 20 mW as a source; CCD detector thermoelectrically cooled; spectral resolution of 3 to 5 cm^{-1} ; wavelength from 2750 to 1520 cm^{-1} ; five co-additions and integration time of 2 s. Of three random

measurements, the average value represented each specimen. The software Spectroscopy Opus version 6.5 (Bruker Optics Inc., Billerica, MA, USA) was used to data processing.

2.4 Kinetics of polymerization assessment

These analyses employed an FT-IR spectrophotometer (Tensor27, Bruker Optics GmbH, Ettlingen, Baden-Württemberg, Germany). The spectra were recorded at room temperature in kinetics mode at a rate of 1 spectrum/s with a resolution of 4 cm⁻¹ in a wavelength range of 800-4000 cm⁻¹ in the ATR mode.

Analyses described the kinetics of polymerization of the materials, prior to thermal activation by the polymerization cycles. So, the materials were handled and directly positioned on the ATR crystal surface and the analyses were made during 50 min (15-20 min for the dough to reach the plastic phase plus 30 min simulating the time for pressure).

2.5 Degree of conversion and kinetics of polymerization calculation

The degree of conversion (%) and the kinetics of polymerization were calculated using the baseline standard technique [19] by comparing the peak heights of the absorbance of alkene (C=C) at 1640 cm⁻¹ and ester functional groups (C=O) at 1720 cm⁻¹ (internal standard) [16], before (immediately after the material handling), and during the polymerization (kinetics) or after the polymerization of the specimens. From the ratio between these absorbance values, the unreacted double bonds were calculated:

$$DC\% = 1 - [(Abs\ C=C/Abs\ C=O)_{after}/(Abs\ C=C/Abs\ C=O)_{before}] \times 100$$

2.6 Statistical analysis

The degree of conversion data (%) were submitted to two-way ANOVA (“material” and “curing cycle” factors) followed by Bonferroni test ($\alpha=0.05$). Post-hoc power analysis was performed using the personal statistical software (IBM SPSS 19, SPSS Inc., IBM Company, Armonk, NY, USA).

3. Results

Figures 1A and 1B show the infrared spectra overlap obtained immediately after handling Vipi Cril and Vipi Wave resins, respectively, after the plastic phase (15-20 min), after an additional 30 min (pressing period), and after M550/3 microwave polymerization cycle. It can be seen the progressive reduction of the peak height at $\approx 1640\text{ cm}^{-1}$ in comparison with the peak of reference. Figures 2A and 2B show the infrared spectra overlap obtained for the powder and the liquid, respectively, of Vipi Cril and Vipi Wave resins. As shown, the materials have similar composition.

For the number of specimens used to evaluate the degree of conversion ($n=6$), this study had adequate power for the interaction “material” and “curing cycle” (91.5%; $\alpha=0.05$). The results of degree of conversion are shown in Table 3.

According to Table 3, there was no statistically significant difference among all groups ($P>0.587$) for Vipi Cril resin. For Vipi Wave, the lowest degree of conversion values were obtained in M630/25 and M650/5 cycles ($P<0.03$) and only in these cycles, there was a statistically significant difference ($P=0.000$) between the materials with Vipi Cril resin showing the highest degree of conversion values. The conventional water-bath cycle promoted the highest degree of conversion values for both materials ($P<0.05$). Average values were between 66.9% and 85.9%.

Figure 3 shows the kinetics of polymerization of Vipi Cril and Vipi Wave resins prior to thermal activation. It is possible to observe the similarity between the curves and both materials reached conversion rates of around 36% prior to polymerization cycles.

4. Discussion

FT-Raman spectroscopy used in this study is an alternative method widely used to determine the carbonic double bonds ($\text{C}=\text{C}$) converted into single bonds ($\text{C}-\text{C}$) [16,20]. The low power

of the laser near to infrared of the FT-Raman spectrophotometer makes it possible to analyse colored species, which can be heated by laser beam without loss of sensitivity by fluorescence of organic compounds [21]. This technique can be used on pigmented denture base materials, unlike the direct infrared method which can only be used for transparent polymeric materials [22]. Other advantages of this method include a quick scan with a minimum of preparation of specimens because incident radiation can be focused on the sample and the scattered radiation is collected by suitable optical lenses. To use the micro-FT-Raman in this study, the specimens needed only present an extremely smooth surface, obtained with the sequential polishing with silicon carbide papers and felt discs with diamond pastes. Furthermore, Raman scattering has a sensitivity to highly symmetric C=C vibration of the acrylate-based resins used in Dentistry [20]. The peak absorbance at 1710 cm^{-1} used as an internal standard in this study is considered ideal for acrylic resin analysis [15]. However, not every polymethyl methacrylate in the polymerized resin has resulted from methyl methacrylate monomer conversion [15]. The acrylic resins are supplied in powder form containing prepolymeric polymethyl methacrylate beads and liquid that contains the monomers. Thus, this study calculated the degree of conversion of the polymerized specimen by comparing it with the degree of conversion of the initial acrylic resin dough immediately after handling to eliminate this bias.

The hypotheses evaluated in this study that “*the resins would differ in their degree of conversion and kinetics of polymerization*” were partially accepted, since difference was noted between two polymerization cycles only for Vipi Wave resin and in these cycles, the Vipi Cril resin was superior. The kinetics of polymerization of the materials was similar and resulted in equal final values; however Vipi Cril resin converted faster, sooner.

From analysis of the powder and liquid of the resins in infrared spectroscopy, a similarity in the materials' composition was observed, as can be seen in Table 1 that contains

the information provided by the manufacturer. Truong and Thomasz [23] also reported no difference in the composition of conventional or microwave acrylic resins after flexural strength, hardness, water sorption and solubility, and porosity. Likewise, Bonatti et al. [24] found no difference in color stability between conventional heat-polymerizing and other microwaveable resin after accelerated aging and immersion in liquid food dyes. They related the results to the fact that the materials had the same manufacturer, presenting therefore similar compositions. However, a previous study carried out under the same conditions of this study reported that, despite the manufacturer reporting the same chemical composition for both resins, it was likely that Vipi Cril resin presented a greater concentration of ethyleneglycol dimethacrylate as crosslinking agent than Vipi Wave resin because the conventional resin showed greater flexural strength and modulus of elasticity [25]. This may explain the fact that there was no difference between polymerization cycles, either in water-bath or microwave, to Vipi Cril resin and its initially faster chemically activated kinetics of polymerization. The heat generated by water or microwave causes an increased mobility in the monomer molecules and dimethacrylate resulting in more highly crosslinked polymer chains [26], which results in a higher conversion of monomer to polymer [27].

As reported, there was no difference between materials when conventionally polymerized in water bath and higher values of degree of conversion were observed. It has been reported that the higher the water bath temperature, the better the polymerization and the lower the residual monomer concentration [6,22], especially in cycles including a final temperature at 100°C for at least 30 min [6,27].

Nevertheless, both resins polymerized in shorter microwave cycles showed conversion values without significant difference from the conventional cycle. Shorter polymerization and lower residual monomer content are two advantages of this alternative processing. One possible explanation concerns high-frequency mobility of monomer molecules within the

polymer mass during polymerization, causing rapid internal heating and hence resulting in a higher conversion [2]. Higher temperatures usually promote faster conversion of monomer, since the propagation constant and the diffusion coefficient increases with temperature. However, a high increase in temperature as occurs during microwave irradiation can affect the quality of the polymer, resulting in lower molecular weight chains or degrading polymers [28].

Therefore, it should be emphasized that one can polymerize the conventional heat-polymerizing acrylic resin Vipi Cril in short cycles using temperatures above 100°C, like those of microwave processing, with adequate conversion values and no difference from the water bath polymerization. Ilbay et al. [29] also concluded that the microwave polymerization might be also applied to conventional acrylic resins without harming their properties.

The lowest values of conversion in this study were those of Vipi Wave resin when polymerized using the cycle recommended by the manufacturer. A longer cycle in microwave theoretically generates greater energy, but during the 5 min break before reprogramming the microwave to the second stage of the cycle, a decrease of the energy levels of the excited molecules can be expected [30]. This fact associated to the possibility that this material has a lower amount of crosslinking agents can explain its lower conversion than Vipi Cril resin.

This study observed conversion values between 66.9% and 85.9% for Vipi Cril and Vipi Wave resins when polymerized conventionally or by microwave. These values are close to the percentages observed including for denture base resins polymerized at longer cycles [31]. In addition, this study also observed the effect of tertiary amine in the powder composition on the degree of conversion of the heat-polymerizing resins. During the bench polymerization, the chemical activation of benzoyl peroxide by amine reached conversion values of around 36%. Thus, the heat supplied by polymerization cycle accounted for an average of 42.7% of the polymer conversion.

However, for the analysis of the polymerization reaction, besides the evaluation of the degree of conversion of the materials, it would also be interesting to characterize the polymeric structure formed by measuring its degree of crosslinking. The degree of conversion, despite its importance, is an average assessment that does not consider that regions of low and high conversion of the polymer can demonstrate remaining double bonds as if the material had been homogeneously polymerized. Furthermore, the polymers differ linearly and even with different crosslinking densities, they can have similar values of degree of conversion [26]. Although other factors such as analysis of porosity affect the performance of the denture base material [1], the polymerized materials in the experimental cycles evaluated in this study had adequate conversion values, suggesting potentially low levels of residual monomer. Nevertheless, some authors suggest immersing the prosthesis in water prior to installation in the patients to reduce the intraoral release of residual monomer [8,27].

Acknowledgements

This study was supported by Fundação Araucária (grant 230/2010 - 17471).

REFERENCES

- [1] Bartoloni JA, Murchison DF, Wofford DT, Sarkar NK. Degree of conversion in denture base materials for varied polymerization techniques. *J Oral Rehabil.* 2000;27:488-93.
- [2] De Clerck JP. Microwave polymerization of acrylic resins used in dental prostheses. *J Prosthet Dent.* 1987;57:650-8.
- [3] Wallace PW, Graser GN, Myers ML, Proskin HM. Dimensional accuracy of denture resin cured by microwave energy. *J Prosthet Dent.* 1991;66:403-8.
- [4] Kimura H, Teraoka F, Ohnishi H, Saito T, Yato M. Applications of microwave for dental technique (part 1). Dough-forming and curing of acrylic resins. *J Osaka Univ Dent Sch.* 1983;23:43-9.

- [5] Anusavice KJ. Phillips' Science of Dental Materials. 11 ed. Philadelphia: W. B. Saunders; 2003.
- [6] Urban VM, Machado AL, Oliveira RV, Vergani CE, Pavarina AC, Cass QB. Residual monomer of reline acrylic resins. Effect of water-bath and microwave post-polymerization treatments. *Dent Mater.* 2007;23:363-8.
- [7] Lee SY, Lai YL, Hsu TS. Influence of polymerization conditions on monomer elution and microhardness of autopolymerized polymethyl methacrylate resin. *Eur J Oral Sci.* 2002;110:179-83.
- [8] 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.
- [9] Arima T, Murata H, Hamada T. The effects of cross-linking agents on the water sorption and solubility characteristics of denture base resin. *J Oral Rehabil.* 1996;23:476-80.
- [10] 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.
- [11] 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.
- [12] Goncalves 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.
- [13] Bafile M, Graser GN, Myers ML, Li EK. Porosity of denture resin cured by microwave energy. *J Prosthet Dent.* 1991;66:269-74.
- [14] Ruyter IE, Oysaed H. Conversion in denture base polymers. *J Biomed Mater Res.* 1982;16:741-54.

- [15] Duray SJ, Gilbert JL, Lautenschlager EP. Comparison of chemical analysis of residual monomer in a chemical-cured dental acrylic material to an FTIR method. *Dent Mater.* 1997;13:240-5.
- [16] Urban VM, Machado AL, Vergani CE, Giampaolo ET, Pavarina AC, de Almeida FG, et al. Effect of water-bath post-polymerization on the mechanical properties, degree of conversion, and leaching of residual compounds of hard chairside reline resins. *Dent Mater.* 2009;25:662-71.
- [17] Salim N, Satterthwaite J, Rautemaa R, Silikas N. Impregnation with antimicrobials has an impact on degree of conversion and colour stability of acrylic liner. *Dent Mater J.* 2012;31:1008-13.
- [18] ISO. International Organization for Standardization. Specification 1567: denture base polymers. Switzerland: ISO; 2001.
- [19] Rueggeberg FA. Determination of resin cure using infrared analysis without an internal standard. *Dent Mater.* 1994;10:282-6.
- [20] 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. *Dent Mater.* 1993;9:317-24.
- [21] Rehman I, Harper EJ, Bonfield W. In situ analysis of the degree of polymerization of bone cement by using FT-Raman spectroscopy. *Biomaterials.* 1996;17:1615-9.
- [22] Austin AT, Basker RM. The level of residual monomer in acrylic denture base materials with particular reference to a modified method of analysis. *Br Dent J.* 1980;149:281-6.
- [23] Truong VT, Thomasz FG. Comparison of denture acrylic resins cured by boiling water and microwave energy. *Aust Dent J.* 1988;33:201-4.
- [24] Bonatti MR, Cunha TR, Regis RR, Silva-Lovato CH, Paranhos HF, de Souza RF. The effect of polymerization cycles on color stability of microwave-processed denture base resin. *J Prosthodont.* 2009;18:432-7.

- [25] Spartalis GK, Cappelletti LK, Schoeffel AC, Michél MD, Pegoraro TA, Arrais CAG, et al. Effect of conventional water-bath and experimental microwave polymerization cycles on the flexural properties of denture base acrylic resins. *Dent Mater J*. 2015;34:623-8.
- [26] Asmussen E, Peutzfeldt A. Influence of selected components on crosslink density in polymer structures. *Eur J Oral Sci*. 2001;109:282-5.
- [27] 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.
- [28] Bural C, Aktas E, Deniz G, Unlucerci Y, Bayraktar G. Effect of leaching residual methyl methacrylate concentrations on in vitro cytotoxicity of heat polymerized denture base acrylic resin processed with different polymerization cycles. *J Appl Oral Sci*. 2012;19:306-12.
- [29] Ilbay SG, Guvener S, Alkumru HN. Processing dentures using a microwave technique. *J Oral Rehabil*. 1994;21:103-9.
- [30] Yannikakis S, Zissis A, Polyzois G, Andreopoulos A. Evaluation of porosity in microwave-processed acrylic resin using a photographic method. *J Prosthet Dent*. 2002;87:613-9.
- [31] Urban VM, Machado AL, Vergani CE, Jorge EG, dos Santos LPS, Leite ER, et al. Degree of conversion and molecular weight of one denture base and three reline resins submitted to post-polymerization treatments. *Mater Res*. 2007;10:191-7.
- [32] Patil PS, Chowdhary R, Mandokar RB. Effect of microwave postpolymerization treatment on residual monomer content and the flexural strength of autopolymerizing reline resin. *Indian J Dent Res*. 2009;20:293-7.

Captions to Tables and Figures

Table 1 – Denture base acrylic resins used in this study

Table 2 – Experimental polymerization cycles evaluated in this study

Fig. 1 – Infrared spectra (FTIR) of resins immediately after handling, plastic phase, pressing period, and microwave polymerization (M550/3). A – Vipi Cril; B – Vipi Wave

Fig. 2 - Infrared spectra (FTIR) of Vipi Cril and Vipi Wave resins. A – powder samples; B – liquid samples

Table 3 – Means, standard deviation, and statistical significance of degree of conversion (%) for the evaluated polymerization cycles

Fig. 3 - Kinetics of polymerization of Vipi Cril and Vipi Wave resins prior to polymerization cycles

HIGHLIGHTS

- Vipi Cril and Vipi Wave have similar chemical composition.
- DC values of Vipi Cril polymerized both conventionally or in microwave are similar.
- Vipi Wave had the lowest DC when polymerized using its recommended cycle.
- Chemical activation resulted in DC close to 36%.
- The final polymerization by the cycles resulted in DC around 78.7%.

Table 1 – Denture base acrylic resins used in this study

Material (acronym)	Type	Composition† (batch)		Powder/liquid ratio	Manufacturer
		Powder	Liquid		
Vipi Cril® (VC)	Conventional	Polymethyl methacrylate (PMMA), benzoyl peroxide, pigments (00773)	Methyl methacrylate (MMA), ethyleneglycol dimethacrylate (EGDMA), inhibitor (32144)	2.15 g/1 mL	Vipi, Pirassununga, SP, Brazil
Vipi Wave® (VW)	Microwaved- processed	PMMA, benzoyl peroxide, pigments (12041)	MMA, EGDMA, inhibitor (33576)	2.15 g/1 mL	Vipi, Pirassununga, SP, Brazil

† According to the MSDS provided by the manufacturer.

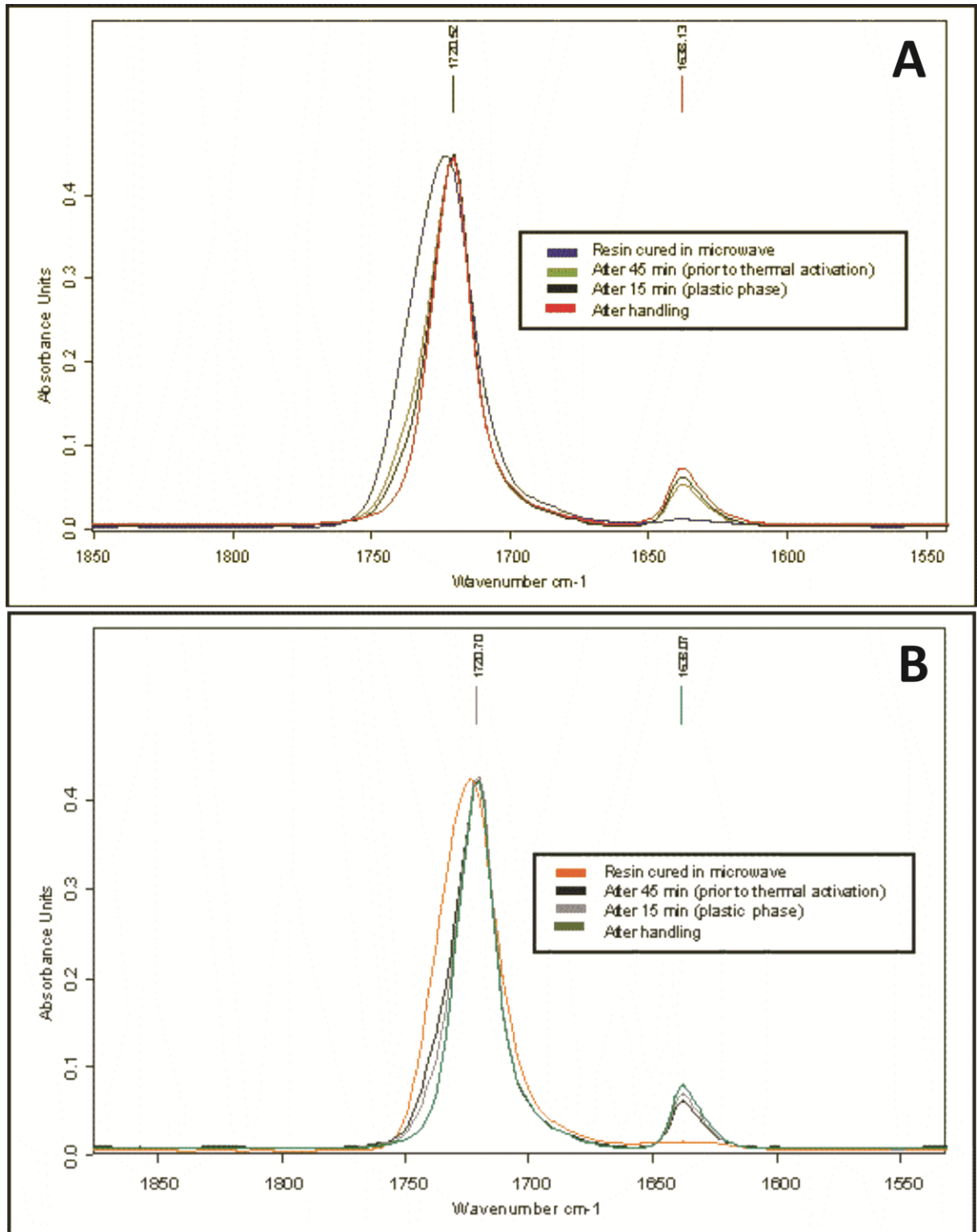
Table 2 – Experimental polymerization cycles evaluated in this study

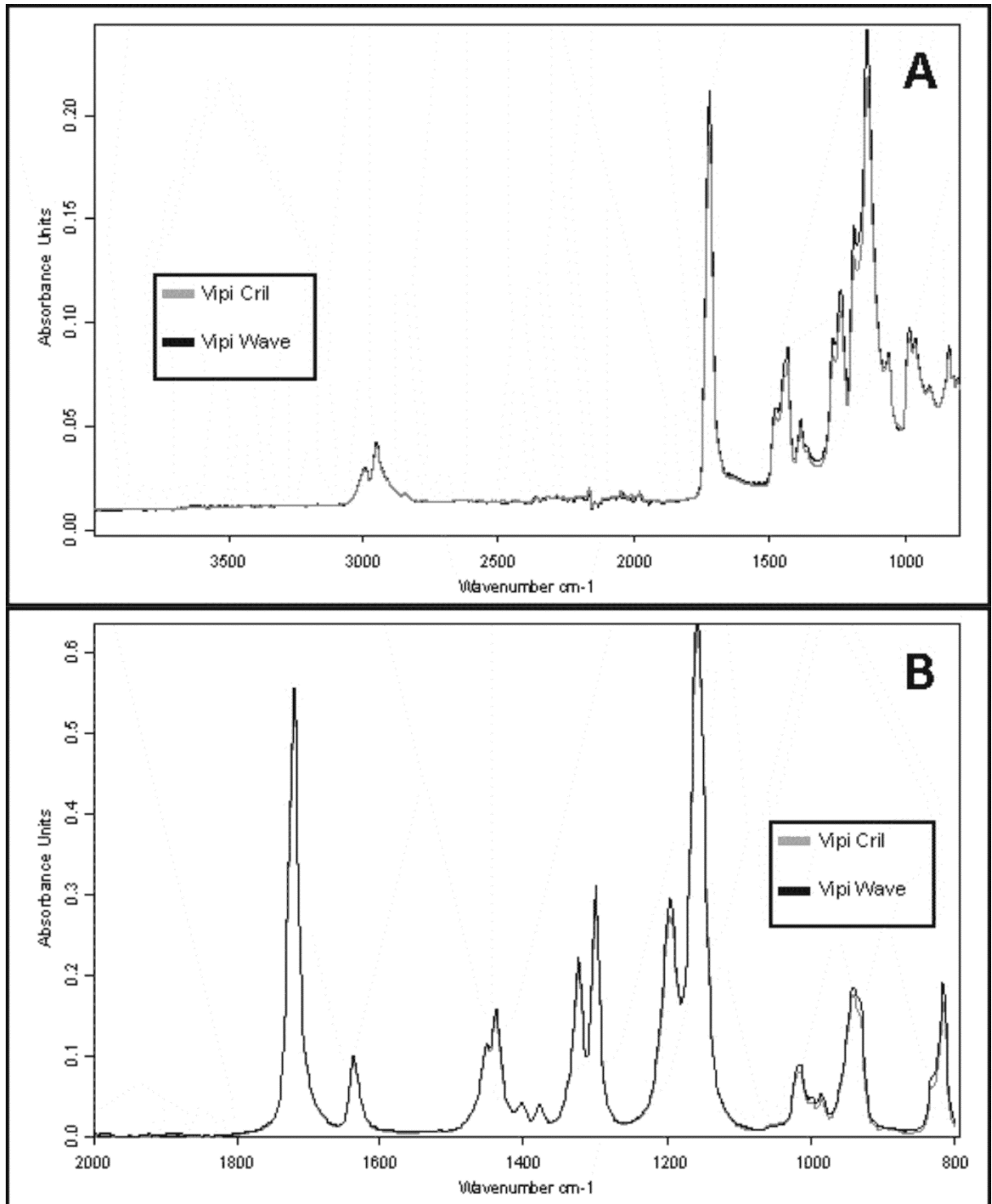
Group	Polymerization cycles	Reference
WB (water-bath – conventional polymerization)	• immerse the flask in cold water; • heat water up to 65°C during 30 min and maintain for 1 h; • heat water until boiling point during 30 min and maintain for 1 h; • turn off the water-bath and let cool down	Manufacturer's recommended cycle to cure VC resin
M630/25	270 W for 10 min 0 W for 5 min 360 W for 10 min	Manufacturer's recommended cycle to cure VW resin
M550/3	550 W for 3 min	Ilbay et al. [29]
M650/5	650 W for 5 min	Patil et al. [32]

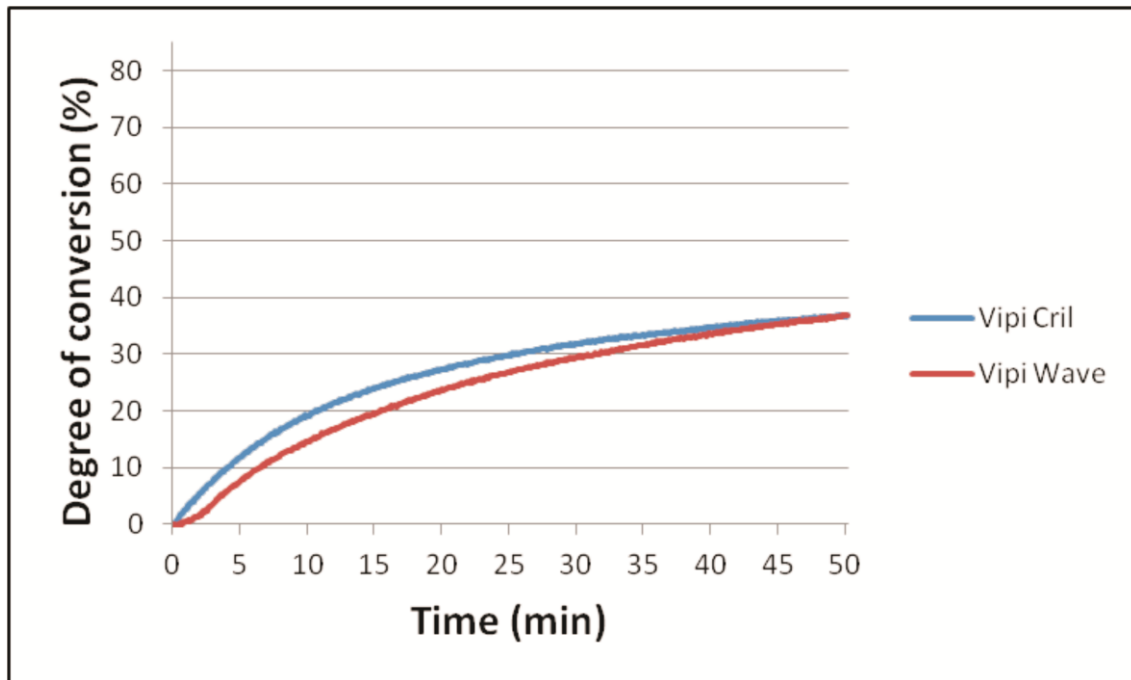
Table 3 – Means, standard deviation, and statistical significance of degree of conversion (%) for the evaluated polymerization cycles

Materials	Polymerization Cycle			
	WB	M630/25	M550/3	M650/5
VC	84.6 (4.2) Aa	85.8 (5.4) Aa	79.9 (5.7) Aa	85.9 (5.1) Aa
VW	82.8 (6.3) Aa	66.9 (7.8) Bb	74.9 (6.3) ABa	68.5 (8.2) Bb

Means followed by different letters (uppercase: within row; lowercase: within column) are significantly different at $\alpha=0.05$.







[HOME](#) [CONTACT US](#) [HELP](#)

 SEARCH
[About Us](#)[Pricing](#)[Scholarships](#)[Additional Resources](#)[Submit Document](#)**Thank you for your order!**

Cesar Arrais
R OLEGARIO MARIANO 399 AP 11
NEVES,
PONTA GROSSA, PR 84020-420
Brazil

Papercheck, LLC
666 Natoma Street,
San Francisco, CA 94103
USA

Submitted Document:	DC_of_denture_base_resins_conv_1446385038.docx
Returned Document:	DC_of_denture_base_resins_conv_1446385038-e.docx
Document ID:	589656
Submitted:	11/1/2015 1:45:20 PM
Returned:	11/4/2015 12:57:17 PM
Pickup:	11/6/2015 4:01:04 AM
Page Count:	11.04
Word Count:	3312
Reference Count:	0
Priority:	Standard (72-hour turnaround time) \$ 6.95 per page
Writing Style:	Leave The Format As It Is
Editing Style:	Executive
English Type:	US English
PaperTomb Charge:	\$0.00
SMS Charge:	\$1.00
Non-Standard Style Charge:	\$0.00
Reference Charge:	\$0.00
Document Editing Charge:	\$76.73
Final Charges:	\$77.73
Thank you for using Papercheck!	

[Print](#) [Close Window](#)
[About Us](#) | [Guarantee](#) | [Home](#) | [Hours of Operation](#) | [Privacy Policy](#) | [Site Map](#) | [Support](#) | [Testimonials](#) | [User Agreement](#)

Copyright © 2001–2015 Papercheck, LLC. All rights reserved.
Papercheck® is a registered trademark of Papercheck, LLC.

4.2 CAPÍTULO 2 – Artigo **Citotoxicidade de resinas acrílicas para base de prótese polimerizadas convencionalmente ou por micro-ondas: Análise por MTT e Vermelho Neutro**, que será versado para a língua inglesa, revisado e submetido para publicação no periódico *Dental Materials*.

Citotoxicidade de resinas acrílicas para base de prótese polimerizadas convencionalmente ou por micro-ondas: Análise por MTT e Vermelho Neutro

Rosana Marques Silva Figuerôa^a, Stéfanie Taques Wolff^a, Raíssa Dias Cardoso^a, Letícia Antonelo Campos^a, Nara Hellen Campanha Bombarda^a, Fábio André dos Santos^a, Karin Hermana Neppelenbroek^b, Vanessa Migliorini Urban^{a*}

^a Departamento de Odontologia, Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, PR, Brasil

^b Departamento de Prótese, Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, Bauru, SP, Brasil

* Autor para correspondência. Tel: +55 42 32203106; fax: +55 42 32203102.

Av. General Carlos Cavalcanti 4748, Uvaranas, 84030-900, Ponta Grossa, Paraná, Brasil.

Endereço de e-mail: vanurban@yahoo.com (V. M. Urban).

RESUMO

Objetivos. O objetivo deste estudo foi quantificar a citotoxicidade de resinas acrílicas para base de próteses (Vipi Cril-VC e Vipi Wave-VW) após terem sido submetidas a ciclos de polimerização recomendados pelo fabricante e experimentais em micro-ondas.

Métodos. Os grupos avaliados foram: 1) BA = (65°C por 90 min + 90 min em ebulição), ciclo recomendado para a resina VC; 2) M630/25 = 10 min a 270 W + 5 min a 0 W + 10 min a 360 W, ciclo recomendado para a resina VW; 3) M650/5 = 5 min a 650 W; 4) M550/3 = 3 min a 550 W. Corpos de prova (n=9; 10 x 1 mm) foram confeccionados e armazenados em água destilada estéril a 37°C por 48 h. Após esterilização em luz ultravioleta, os corpos de prova foram armazenados em 9 mL de meio de cultura Eagle, suplementado com 1% de soro fetal bovino e 80 µg/mL de gentamicina e incubados a 37°C por 24 h para obtenção dos extratos. Fibroblastos de hamster (3T3) foram propagados no meio de cultura suplementado. A citotoxicidade dos materiais foi analisada quantitativamente por meio das análises colorimétricas MTT e Vermelho Neutro, utilizando um espectrofotômetro a 570 e a 540 nm, respectivamente. Os grupos foram classificados em: não citotóxico, discretamente citotóxico, moderadamente citotóxico e intensamente citotóxico. Os valores de viabilidade celular foram avaliados pela ANOVA-2 fatores ($\alpha=0,05$).

Resultados. Não houve diferença estatisticamente significativa ($P>0,05$) entre os materiais e os grupos experimentais e todas as condições resultaram em efeitos não citotóxicos (viabilidade celular superior a 75%), em ambas as análises MTT e Vermelho neutro.

Significância. A polimerização em micro-ondas apresenta vantagens em relação à polimerização convencional em banho de água, como redução do tempo de execução. A utilização de ciclos curtos em micro-ondas para polimerização de uma resina convencional que resulte em um material não citotóxico representa uma facilitação do processo e uma relação custo-benefício favorável.

Palavras-chave: polimetil metacrilato, microondas, técnicas de cultura de células, espectrofotometria.

1. Introdução

A resina acrílica à base de polimetil metacrilato tem sido o material de escolha para a confecção de bases de próteses removíveis e dentes artificiais desde o início do século XX. Segundo Anusavice (2003) [1], a reação de polimerização destes materiais deveria prosseguir com o aumento do calor, até que todo monômero tivesse se convertido em polímero [1]. Entretanto, à medida que ocorre a diminuição da temperatura de polimerização, a formação de polímeros também diminui e, conseqüentemente, certa quantidade de monômero residual permanece na resina polimerizada [2]. Devido à sua ação plastificante [3], a presença desse monômero no interior da massa polimérica, pode influenciar negativamente as propriedades físicas [4] e mecânicas [5] dos materiais.

Além disso, o monômero residual, subprodutos da reação de polimerização e produtos de degradação liberados a partir das resinas acrílicas [6-11] têm sido apontados como uma das possíveis causas de alterações na mucosa oral dos pacientes portadores de próteses. Reações alérgicas e irritação química local têm sido relatadas [12-14] e a queixa clínica mais frequente é a sensação de queimação [15], primariamente na mucosa palatal em contato com as próteses [12], além da língua, mucosa oral e orofaringe [12,14]. Um caso de reação alérgica na forma de urticária crônica foi reportado como o primeiro relato de envolvimento sistêmico isolado causado por materiais à base de resina acrílica [16], sendo, dessa forma, imprescindível dispensar maior atenção a indivíduos com história prévia de sensibilidade [17].

Alguns estudos têm demonstrado que a quantidade de monômero residual pode ser influenciada por fatores como o tempo, a temperatura [17,18] e o método de polimerização

utilizados [8,19]. No caso da polimerização em micro-ondas, tem sido relatada a importância da seleção adequada do ciclo utilizado, visando impedir um superaquecimento do monômero que poderia acarretar degradação [20], porosidade no material e consequente prejuízo às propriedades físicas e mecânicas da prótese [21]. Além disso, a seleção adequada da energia e do tempo de polimerização em micro-ondas é importante para reduzir a quantidade de monômero residual e resultar em baixa citotoxicidade [3]. De acordo com Bafille et al. (1991) [22], as resinas formuladas para serem utilizadas em forno de micro-ondas podem conter trietileno ou tetraetilenoglicol dimetacrilato em sua composição. Esses dimetacrilatos apresentam baixa pressão de vapor, permitindo que a polimerização seja realizada em temperaturas elevadas (entre 100°C e 150°C) sem risco de porosidades, o que não ocorre com o polimetil metacrilato que apresenta uma alta pressão de vapor.

Testes *in vitro* de citotoxicidade têm sido utilizados como parâmetros preliminares para a avaliação da biocompatibilidade dos materiais [23]. Métodos de cultura de células são relativamente simples, reprodutíveis e apresentam boa relação custo-benefício [24], entre os quais pode-se destacar a análise colorimétrica utilizando o 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio brometo (MTT) [7,25-27] e a análise da viabilidade celular com auxílio de corantes vitais, como o Vermelho Neutro (VN). Não foram encontrados na literatura estudos de citotoxicidade avaliando resinas acrílicas convencionais para base de prótese polimerizadas em ciclos curtos de micro-ondas. Com base nessas informações, o objetivo deste estudo foi avaliar quantitativamente a citotoxicidade por meio do método colorimétrico MTT e pela incorporação do VN de resinas acrílicas para base de próteses (Vipi Cril e Vipi Wave) após terem sido submetidas a ciclos de polimerização recomendados pelo fabricante e experimentais em micro-ondas. A hipótese nula testada neste estudo foi que não haveria diferença de citotoxicidade entre os materiais, independentemente do ciclo de polimerização utilizado para seu processamento.

2. Material e métodos

2.1 Material

As resinas acrílicas selecionadas para este estudo estão descritas na Tabela 1.

2.2 Confeção dos corpos de prova

Os corpos de prova (n=9) dos materiais foram confeccionados, de maneira asséptica, a partir de moldes de matrizes metálicas na forma de discos com dimensões de 10 mm de diâmetro e 1 mm de espessura [28]. Os moldes foram obtidos utilizando silicone laboratorial (Zetalabor-Zhermack, Labordental, São Paulo, SP, Brasil) entre duas placas de vidro. O conjunto molde/matriz foi incluído em muflas, metálicas (OGP, Bragança Paulista, SP, Brasil) ou plásticas (Vipi Ltda., Pirassununga, SP, Brasil), utilizando gesso pedra tipo III.

Os materiais foram proporcionados e manipulados de acordo com as instruções do fabricante. Um único operador atuou sobre um campo estéril e confeccionou os corpos de prova utilizando instrumental esterilizado, roupas de proteção, luvas, óculos e máscaras descartáveis. Após a manipulação, os materiais foram inseridos nos moldes em silicone; a mufla foi fechada e mantida sob carga de 1,250 t em prensa hidráulica durante 30 min. Após esse período, os corpos de prova foram submetidos aos ciclos de polimerização, convencional ou em micro-ondas, apresentados na Tabela 2 [29,30].

Em seguida, as muflas foram resfriadas em água corrente por 30 min e em bancada por 15 min [31]. Os corpos de prova foram, então, removidos dos moldes e submetidos a um procedimento de acabamento, apenas para remover eventuais excessos, utilizando lixa estéril. Foram armazenados em frascos âmbar estéreis com 10 mL de água destilada estéril em estufa a 37°C por 48 h [28].

2.3 Validação da etapa de esterilização dos corpos de prova

Para a determinação do processo de esterilização que seria utilizado neste estudo, corpos de prova adicionais (n=3) foram armazenados em uma placa de 20 orifícios contendo 200 µL de meio de cultura Eagle, suplementado com 1% de soro fetal bovino (SFB) e 80 µg/mL de gentamicina, em estufa para cultura de células (Forma Scientific, Marietta, OH, EUA) com 5% de CO₂ e ambiente com umidade controlada à temperatura de 37°C durante 2 dias. Um dos orifícios continha apenas meio de cultura para servir como controle. Foram testadas quatro possibilidades de esterilização (Tabela 3).

Em nenhum dos processos foi observada turvação do meio de cultura, sendo considerado que todos os processos de esterilização, inclusive não submeter a nenhum procedimento, resultavam em corpos de prova assépticos. Entretanto, para garantir a assepsia e não causar a eluição do monômero residual e outras substâncias potencialmente tóxicas dos corpos de prova durante o processo de imersão em banho de ultrassom, cada corpo de prova foi exposto à luz ultravioleta em câmara de fluxo laminar (Veco do Brasil, Indústria e Comércio de Equipamentos Ltda., Campinas, SP, Brasil) por 20 min para cada face visando a eliminação de possíveis microrganismos remanescentes [32-34].

2.4 Taxa de proliferação celular

Anteriormente à realização dos testes de citotoxicidade, foi determinada a concentração de SFB que deveria ser adicionada ao meio de cultura Eagle através de uma curva de proliferação celular de fibroblastos de hamster (3T3-Universidade Federal do Paraná – UFPR, Curitiba, PR, Brasil), pois possuem reprodutibilidade, genética e estabilidade metabólica [35,36]. Em uma placa de cultura de quarenta orifícios, foram semeadas $0,25 \times 10^3$ células/poço em meio de cultura Eagle, suplementado com 10% de SFB e 80 µg/mL de gentamicina, e a placa foi incubada em estufa com 5% de CO₂ a 37°C. Após aproximadamente 16 h, o meio foi substituído por diferentes concentrações de SFB (0%, 0,1%, 1%, 5% e 10%) e a placa foi novamente incubada. Após 48 h, a viabilidade celular foi

avaliada utilizando o método MTT (3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio brometo) (Molecular probes, Eugene, Oregon, EUA).

Os resultados da taxa de proliferação das células 3T3, pelo método MTT, podem ser observados na Figura 1. Estes resultados foram submetidos à ANOVA-1 fator (“concentração de SFB”) e teste de Tukey HSD ($\alpha=0,05$) utilizando o *software* IBM SPSS 19 (SPSS Inc., IBM Company, Armonk, NY, EUA). Foi notado um aumento estatisticamente significativo ($P=0,000$) da proliferação celular com o aumento da concentração de SFB até 1%. A concentração de SFB de 5% resultou em uma redução da proliferação das células 3T3 em relação à concentração de 1% ($P=0,014$). Não houve diferença estatisticamente significativa ($P=0,998$) na proliferação celular utilizando as concentrações de SFB de 1 e 10%. Por isso, optou-se pela utilização da concentração de SFB a 1%.

2.5 Obtenção dos extratos dos corpos de prova

Após o procedimento de esterilização com luz ultravioleta, três corpos de prova de cada grupo experimental foram colocados em tubos de ensaio com 9 mL de meio de cultura Eagle, suplementado com 1% de SFB e 80 $\mu\text{g/mL}$ de gentamicina e incubados em estufa a 37°C por 24 h para obtenção do extrato das substâncias hidrossolúveis dessas amostras com o objetivo de analisar o efeito citotóxico das substâncias liberadas a partir dos corpos de prova [7,8,32]. Um tubo de ensaio contendo apenas 9 mL de meio de cultura foi armazenado sob as mesmas condições, servindo, assim, como grupo controle [33,34]. A proporção de área de superfície dos corpos de prova e volume do meio de cultura estava dentro da faixa de 0,5 a 6,0 cm^2/mL de acordo com o recomendado pela ISO 10993-5 [28]. Uma vez que foram confeccionados 3 corpos de prova para cada grupo experimental, em triplicata, o n amostral de cada grupo foi composto por 9 corpos de prova ($n=9$).

2.6 Cultivo celular

Células 3T3 foram propagadas em meio de cultura Eagle suplementado. O cultivo das células foi realizado em frascos (Costar, Corning Incorporated, Corning, NY, EUA) com tampa contendo um filtro que permitia a passagem de CO₂. Esses frascos foram incubados em estufa com 5% de CO₂ a 37°C [33,34]. Estas células foram repicadas para novos frascos após períodos de 3 dias de incubação, até o momento de realização do teste de citotoxicidade.

Todos os procedimentos foram realizados em área asséptica dentro da câmara de fluxo laminar previamente desinfetada com álcool 70°. Além disso, os materiais utilizados, com exceção das células, foram esterilizados previamente em luz ultravioleta durante 20 min dentro da câmara de fluxo laminar [33,34].

Para a realização do teste de citotoxicidade, uma suspensão de 3×10^3 células/mL de meio de cultura foi preparada. Após 5 min em estufa com 5% de CO₂, 3 mL de meio de cultura Eagle suplementado foram adicionados na garrafa com as células já desprendidas. Essa suspensão foi transferida para um tubo de ensaio e colocada em centrífuga (Centribio, Equipar, Curitiba, PR, Brasil) por 10 min a 1.200 rpm. Em seguida, o sobrenadante foi desprezado e 1 mL de meio de cultura Eagle suplementado foi adicionado e as células, homogeneizadas. A partir daí, 10 µL de meio com as células foram retirados e adicionados 10 µL do corante azul de Tripán. Dessa solução, 10 µL foram removidos e introduzidos na câmara hemocitométrica tipo Neubauer (Boeco, Hamburg, Alemanha), onde, então, as células viáveis foram contadas com a utilização de um microscópio óptico (modelo YS 100, Nikon, Tóquio, Japão) com aumento de 25x. Em seguida, a suspensão foi ajustada a uma concentração de 3×10^3 células/mL de meio de cultura. Duzentos microlitros dessa suspensão foram colocados em cada compartimento de duas placas com 96 orifícios (uma para o MTT e uma para o VN), as quais foram incubadas em estufa com 5% de CO₂ a 37°C por 24 h.

Posteriormente, o meio de cultura foi desprezado e 200 µL dos extratos foram acrescentados em cada orifício da placa. Na sequência, as placas foram incubadas em estufa

com 5% de CO₂ a 37°C por mais 24 h. A citotoxicidade dos materiais foi, então, analisada quantitativamente por meio da análise colorimétrica MTT e incorporação de Vermelho Neutro.

2.7 Teste de citotoxicidade pelo método MTT

Neste método, o sal metiltetrazólio é incorporado à cultura de células. A enzima desidrogenase succínica das células viáveis quebra a estrutura do sal tetrazólio, produzindo cristais de formazan cor azul. Quanto maior a atividade mitocondrial, maior será a intensidade da luz azul e, assim, maior o número de células viáveis [33,34].

Para o teste MTT, os extratos foram removidos e 200 µL de uma solução de meio de cultura e sal metiltetrazólio foram adicionados em cada orifício da placa de cultura, a qual foi incubada em estufa com 5% de CO₂ a 37°C por 3 a 4 h para a formação dos cristais de formazan. Para cada grupo experimental, foram destinados quatro compartimentos da placa (quadruplicata). Quatro orifícios receberam apenas 200 µL de meio de cultura novo (controle). Em seguida, a solução de MTT foi retirada e 200 µL de solução solubilizadora de MTT (propanol) foram adicionados a cada orifício da placa, a qual foi agitada levemente por 5 min, para solubilizar o sal. Logo após, cada solução foi transferida para novos orifícios para evitar interferências das células aderidas ao fundo dos poços na leitura pelo equipamento. Posteriormente, a análise da atividade mitocondrial foi feita em espectrofotômetro (Biotek EL 800, Biotek, Winooski, VT, EUA) com comprimento de onda de 570 nm. Todos os procedimentos foram repetidos três vezes.

2.8 Teste de citotoxicidade pelo método Vermelho Neutro

A viabilidade celular também pode ser evidenciada com auxílio de corantes vitais, como o Vermelho Neutro (Sigma, St. Louis, MO, EUA). Este reagente é solúvel em água e consegue atravessar a membrana celular, concentrando-se nos lisossomos e fixando-se por meio de ligações eletrostáticas hidrofóbicas em sítios aniônicos na matriz lisossomal. Muitas

substâncias, dentre elas o monômero residual, danificam as membranas, resultando no decréscimo de captura e ligação do Vermelho Neutro (VN). Portanto, é possível distinguir entre células vivas e danificadas ou mortas pela medida de intensidade de cor da cultura celular [37].

Para a incorporação do VN, os extratos foram removidos e os poços, lavados com PBS. A solução de VN (40 µg/mL) foi previamente centrifugada a 3.200 rpm por 10 min. Em seguida, duzentos microlitros desta solução foram adicionados em cada poço (Figura 18). As placas foram incubadas por 3 h para permitir a incorporação do corante nas células vivas. O meio foi removido e as placas, lavadas com uma mistura de CaCl₂ 1% e formaldeído 0,5% (eficiente em remover o corante externo). Duzentos microlitros de solução de ácido acético/etanol (1%/50%) foram adicionados. Após 10 min à temperatura ambiente e agitação durante poucos segundos no agitador de placas, a análise da atividade lisossomal foi feita em espectrofotômetro a 540 nm. Todos os procedimentos foram repetidos três vezes.

2.9 Análise dos dados

A citotoxicidade foi determinada de acordo com a inibição encontrada em relação ao grupo controle e os grupos foram classificados em: não citotóxico (inibição do crescimento celular menor que 25%); discretamente citotóxico (inibição entre 25% e 50%); moderadamente citotóxico (inibição entre 50% e 75%) e intensamente citotóxico (inibição maior que 75%) [28].

Os resultados de viabilidade celular (%) foram submetidos à ANOVA-2 fatores ($\alpha=0,05$; “material” e “ciclo de polimerização”) para cada teste, MTT ou VN, utilizando o *software* SAS 8.0 for Windows (SAS Institute Inc., Cary, EUA).

3. Resultados

Os valores (%) de viabilidade celular em relação ao controle (respiração ou permeabilidade) pelo método MTT e pelo método do VN podem ser visualizados nas Figuras 2 e 3, respectivamente.

Não houve diferença estatisticamente significativa ($P>0,05$) entre os materiais e os ciclos de polimerização avaliados para ambos os métodos testados, MTT e VN. Todos os grupos experimentais foram classificados como não citotóxicos, com viabilidade celular superior a 75%.

4. Discussão

Existem relatos na literatura de que as resinas acrílicas apresentam variados graus de citotoxicidade in vitro e respostas alérgicas in vivo, provavelmente causados pelo monômero residual e subprodutos da reação de polimerização [27]. Os efeitos das substâncias tóxicas lixiviadas a partir das resinas acrílicas têm sido relatados em observações clínicas [12,38], modelos animais [39] e em cultura de células in vitro [35,40-45].

Os testes de citotoxicidade in vitro com cultura de células são amplamente utilizados, porque são rápidos, econômicos e não requerem a utilização de animais. Estes testes podem ser feitos utilizando métodos diretos ou indiretos. No método indireto, é possível utilizar os mesmos corpos de prova em variados intervalos de tempo, uma vez que os extratos (eluatos) podem ser retirados do meio repetidamente. Ao passo que no método direto, os espécimes são estatisticamente independentes [27]. A metodologia mais frequentemente utilizada para avaliar a citotoxicidade em culturas de células é a exposição dos eluatos durante períodos pré-estabelecidos e comparar seus efeitos citotóxicos em relação ao grupo controle (meio de cultura contendo apenas as células) [7,23,25,26,33-35]. Essa metodologia proporciona resultados importantes de toxicidade para diferentes composições de resinas acrílicas para base de prótese, apesar de não identificar a importância de cada substância liberada [36].

Neste estudo, o teste de citotoxicidade foi realizado por meio da obtenção de eluatos dos corpos de prova após 24 h de incubação no meio de cultura, e, portanto, realizado pelo método indireto.

O MTT e o Vermelho Neutro são conhecidos corantes utilizados em ensaios que quantificam a cor em resposta à viabilidade das células. Enquanto o ensaio MTT baseia-se na mensuração da atividade da desidrogenase mitocondrial das células, o VN é incorporado principalmente pelos lisossomos de células viáveis. Uma vez que estes corantes quantificam a viabilidade celular por diferentes mecanismos, é recomendado combinar ensaios para melhor compreender a interação entre células e substâncias tóxicas [46]. O teste MTT tem sido um dos mais comumente empregados para avaliar a citotoxicidade dos materiais [7,25-27,33,47], sendo que nenhum estudo de citotoxicidade de resinas acrílicas utilizando o VN em complementação ao MTT foi encontrado.

De acordo com Huang et al. (2001) [25], a sensibilidade do teste de citotoxicidade depende dos materiais avaliados e da cultura de células utilizada. Diferentes linhagens de células têm sido utilizadas nos estudos in vitro. Apesar das células primárias simularem melhor a situação clínica, sua utilização acarreta algumas desvantagens de razões práticas: tempo maior para isolar clinicamente, disponibilidade de infraestrutura laboratorial imediatamente após a coleta, número menor de células, as quais ainda apresentam uma vida útil limitada [25].

A hipótese nula de “que não haveria diferença de citotoxicidade entre os materiais, independentemente do ciclo de polimerização utilizado para seu processamento” foi aceita uma vez que todos os grupos experimentais foram não citotóxicos. Efeitos semelhantes de viabilidade e proliferação celular foram observados para eluatos (formaldeído, metil metacrilato, ácido metacrílico, ácido benzoico, dentre outros) de materiais após 24 h de

incubação. Nestes estudos, as resinas acrílicas foram classificadas como discretamente ou não citotóxicas [26,48] e os valores de viabilidade celular foram superiores a 80% [27].

No presente estudo, tanto a resina formulada para polimerização em banho de água como a indicada para processamento utilizando energia de micro-ondas, processadas convencionalmente ou em micro-ondas, apresentaram efeito não citotóxico às células 3T3. Outros estudos compararam resinas termopolimerizáveis convencionais com resinas para micro-ondas e também não observaram diferenças significantes entre os materiais após 24 h e, neste período, todos os materiais foram classificados como não-citotóxicos [26,44,48]. Chaves et al. (2012) [36], em uma revisão sistemática da literatura, concluíram que as resinas acrílicas termopolimerizáveis para base de prótese causam baixa morte celular [35] e, geralmente, não são encontradas diferenças significantes de citotoxicidade entre marcas comerciais [26,34,35,48]. Bural et al. (2010) [49] encontraram uma correlação negativa entre liberação de monômero residual e valores de proliferação celular, indicando que o conteúdo de monômero das resinas termopolimerizáveis acarreta em citotoxicidade in vitro. Existe uma relação inversa entre o conteúdo de monômero residual e o grau de conversão dos materiais; quanto maior a conversão, menor o conteúdo de monômero residual [17,19]. Jorge et al. (2004) [26] associaram seus resultados de citotoxicidade sem diferença entre resinas termopolimerizáveis convencionais e para micro-ondas à possibilidade de ambas terem atingido graus de conversão adequados, assim como o estudo de Bartoloni et al. (2000) [5].

A utilização de ciclos de polimerização em banho de água que incluem uma temperatura final de 100°C durante 30 min resulta em reduzido conteúdo de monômero residual [2,19,50,51]. Neste estudo, foi avaliado o ciclo em banho de água recomendado pelo fabricante que incluía ao final um período de 1 h em ebulição e, quando utilizado para processar ambas as resinas Vipi Cril e Vipi Wave, não resultou em efeitos citotóxicos. Isso foi devido ao aumento da temperatura de polimerização que resultou em uma maior mobilidade

das cadeias moleculares, facilitando a conversão de monômero em polímero [52]. Com relação aos ciclos de polimerização em micro-ondas, menor tempo de polimerização e menor conteúdo de monômero residual [53] são consideradas vantagens para esse processamento alternativo. Uma possível explicação está relacionada a alta frequência de mobilidade das moléculas de monômero no interior da massa polimérica durante a polimerização, causando um rápido aquecimento interno e, conseqüentemente, resultando em uma maior conversão do monômero em polímero [21]. Ainda, a imersão dos corpos de prova em água a 37°C durante 48 h [31] anteriormente à preparação dos extratos também pode ter resultado nos efeitos citotóxicos similares observados para ambos os materiais [26].

Apesar de não ter sido avaliado neste estudo, é possível supor que as resinas Vipi Cril e Vipi Wave nas condições de polimerização testadas não causem efeitos citotóxicos em períodos maiores de observação. Sheridan et al. (1997) [44] relataram que quanto maior o tempo de obtenção dos extratos das resinas, menor o efeito citotóxico exercido sobre as células. Além disso, um estudo prévio mostrou que a maior parte das substâncias que não reagiram após a polimerização foi liberada nas primeiras 24 horas [54] e Lefebvre et al. (1994) [7] observaram efeitos tóxicos a células epiteliais orais em maior grau de inibição celular dentro das primeiras 24 horas. De acordo com o padrão de eluição dos componentes potencialmente tóxicos, a alteração tecidual que ocorre logo após a instalação de próteses novas poderia ser relacionada aos materiais e, dessa forma, a imersão das próteses por 48 h deveria ser recomendada [25].

Entretanto, visando explicar melhor os achados encontrados no presente estudo, seria interessante identificar e quantificar os componentes que eluem a partir das resinas. Além disso, deve ser considerada a avaliação dos mecanismos envolvidos na morte celular (apoptose ou necrose) induzida por estes materiais, pois possibilitaria o desenvolvimento de materiais e ciclos de polimerização mais adequados [35]. Testes *in vitro* proporcionam

informação importante sobre o comportamento biológico dos materiais dentários, num ambiente laboratorial controlado. Apesar disso, as próteses estão sujeitas a vários outros fatores no meio oral [55], sendo, portanto, necessária a realização de estudos clínicos.

Agradecimentos

Este estudo foi financiado pela Fundação Araucária (Auxílio 230/2010 - 17471).

REFERÊNCIAS

- [1] Anusavice KJ. Phillips' Science of Dental Materials. 11 ed. Philadelphia: W. B. Saunders; 2003.
- [2] Urban VM, Machado AL, Oliveira RV, Vergani CE, Pavarina AC, Cass QB. Residual monomer of reline acrylic resins. Effect of water-bath and microwave post-polymerization treatments. Dent Mater. 2007;23:363-8.
- [3] 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.
- [4] Arima T, Murata H, Hamada T. The effects of cross-linking agents on the water sorption and solubility characteristics of denture base resin. J Oral Rehabil. 1996;23:476-80.
- [5] Bartoloni JA, Murchison DF, Wofford DT, Sarkar NK. Degree of conversion in denture base materials for varied polymerization techniques. J Oral Rehabil. 2000;27:488-93.
- [6] 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.
- [7] Lefebvre CA, Knoernschild KL, Schuster GS. Cytotoxicity of eluates from light-polymerized denture base resins. J Prosthet Dent. 1994;72:644-50.

- [8] 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.
- [9] Lygre H, Solheim E, Gjerdet NR. Leaching from denture base materials in vitro. *Acta Odontol Scand.* 1995;53:75-80.
- [10] Urban VM, Machado AL, Vergani CE, Giampaolo ET, Pavarina AC, de Almeida FG, et al. Effect of water-bath post-polymerization on the mechanical properties, degree of conversion, and leaching of residual compounds of hard chairside reline resins. *Dent Mater.* 2009;25:662-71.
- [11] Urban VM, Machado AL, Vergani CE, Giampaolo ET, Pavarina AC, Cass QB. Leachability of degradation products from hard chairside reline resins in artificial saliva: Effect of water-bath post-polymerization treatment. *J Appl Polym Sci.* 2012;123:732-9.
- [12] Ali A, Bates JF, Reynolds AJ, Walker DM. The burning mouth sensation related to the wearing of acrylic dentures: an investigation. *Br Dent J.* 1986;161:444-7.
- [13] Koutis D, Freeman S. Allergic contact stomatitis caused by acrylic monomer in a denture. *Australas J Dermatol.* 2001;42:203-6.
- [14] Weaver RE, Goebel WM. Reactions to acrylic resin dental prostheses. *J Prosthet Dent.* 1980;43:138-42.
- [15] van Joost T, van Ulsen J, van Loon LA. Contact allergy to denture materials in the burning mouth syndrome. *Contact Dermatitis.* 1988;18:97-9.
- [16] Lunder T, Rogl-Butina M. Chronic urticaria from an acrylic dental prosthesis. *Contact Dermatitis.* 2000;43:232-3.
- [17] Lee SY, Lai YL, Hsu TS. Influence of polymerization conditions on monomer elution and microhardness of autopolymerized polymethyl methacrylate resin. *Eur J Oral Sci.* 2002;110:179-83.

- [18] Kedjarune U, Charoenworluk 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.
- [19] 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.
- [20] Gettleman L, Nathanson D, Myerson RL. Effect of rapid curing procedures on polymer implant materials. *J Prosthet Dent.* 1977;37:74-82.
- [21] De Clerck JP. Microwave polymerization of acrylic resins used in dental prostheses. *J Prosthet Dent.* 1987;57:650-8.
- [22] Bafile M, Graser GN, Myers ML, Li EK. Porosity of denture resin cured by microwave energy. *J Prosthet Dent.* 1991;66:269-74.
- [23] Hensten-Pettersen A. Comparison of the methods available for assessing cytotoxicity. *Int Endod J.* 1988;21:89-99.
- [24] Wennberg A. Cell culture in the biological evaluation of dental materials: a review. *ATLA.* 1986;13:194-202.
- [25] Huang FM, Tai KW, Hu CC, Chang YC. Cytotoxic effects of denture base materials on a permanent human oral epithelial cell line and on primary human oral fibroblasts in vitro. *Int J Prosthodont.* 2001;14:439-43.
- [26] Jorge JH, Giampaolo ET, Vergani CE, Machado AL, Pavarina AC, Carlos IZ. Cytotoxicity of denture base resins: effect of water bath and microwave postpolymerization heat treatments. *Int J Prosthodont.* 2004;17:340-4.
- [27] Ata SO, Yavuziyilmaz H. In vitro comparison of the cytotoxicity of acetal resin, heat-polymerized resin, and auto-polymerized resin as denture base materials. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2009;91:905-9.

- [28] ISO. International Organization for Standardization. Specification 10993-5: biological evaluation of medical devices - part 5. Tests for cytotoxicity: in vitro methods. Geneva: ISO; 1992.
- [29] Ilbay SG, Guvener S, Alkumru HN. Processing dentures using a microwave technique. *J Oral Rehabil.* 1994;21:103-9.
- [30] Patil PS, Chowdhary R, Mandokar RB. Effect of microwave postpolymerization treatment on residual monomer content and the flexural strength of autopolymerizing reline resin. *Indian J Dent Res.* 2009;20:293-7.
- [31] ISO. International Organization for Standardization. Specification 1567: denture base polymers. Switzerland: ISO; 1998.
- [32] Pelka M, Danzl C, Distler W, Petschelt A. A new screening test for toxicity testing of dental materials. *J Dent.* 2000;28:341-5.
- [33] Campanha NH, Pavarina AC, Giampaolo ET, Machado AL, Carlos IZ, Vergani CE. Cytotoxicity of hard chairside reline resins: effect of microwave irradiation and water bath postpolymerization treatments. *Int J Prosthodont.* 2006;19:195-201.
- [34] Jorge JH, Giampaolo ET, Vergani CE, Machado AL, Pavarina AC, Carlos IZ. Biocompatibility of denture base acrylic resins evaluated in culture of L929 cells. Effect of polymerisation cycle and post-polymerisation treatments. *Gerodontology.* 2007;24:52-7.
- [35] Cimpan MR, Cressey LI, Skaug N, Halstensen A, Lie SA, Gjertsen BT, et al. Patterns of cell death induced by eluates from denture base acrylic resins in U-937 human monoblastoid cells. *Eur J Oral Sci.* 2000;108:59-69.
- [36] Chaves CA, Machado AL, Vergani CE, de Souza RF, Giampaolo ET. Cytotoxicity of denture base and hard chairside reline materials: a systematic review. *J Prosthet Dent.* 2012;107:114-27.

- [37] Ciapetti G, Granchi D, Verri E, Savarino L, Cavedagna D, Pizzoferrato A. Application of a combination of neutral red and amido black staining for rapid, reliable cytotoxicity testing of biomaterials. *Biomaterials*. 1996;17:1259-64.
- [38] McCabe JF, Basker RM. Tissue sensitivity to acrylic resin. A method of measuring the residual monomer content and its clinical application. *Br Dent J*. 1976;140:347-50.
- [39] Nagem-Filho H, Chiodi-Netto J, De Araujo PA. Biocompatibility of acrylic resins implants in connective tissue. *Estomatol Cult*. 1973;7:120-3.
- [40] Okita N, Hensten-Pettersen A. In vitro cytotoxicity of tissue conditioners. *J Prosthet Dent*. 1991;66:656-9.
- [41] Lefebvre CA, Schuster GS, Richardson DW, Barron DJ. The cytotoxic effects of denture base resin sealants. *Int J Prosthodont*. 1992;5:558-62.
- [42] Barron DJ, Schuster GS, Caughman GB, Lefebvre CA. Biocompatibility of visible light-polymerized denture base resins. *Int J Prosthodont*. 1993;6:495-501.
- [43] 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.
- [44] Sheridan PJ, Koka S, Ewoldsen NO, Lefebvre CA, Lavin MT. Cytotoxicity of denture base resins. *Int J Prosthodont*. 1997;10:73-7.
- [45] Vallittu PK, Ekstrand K. In vitro cytotoxicity of fibre-polymethyl methacrylate composite used in dentures. *J Oral Rehabil*. 1999;26:666-71.
- [46] Ishiyama M, Tominaga H, Shiga M, Sasamoto K, Ohkura Y, Ueno K. A combined assay of cell viability and in vitro cytotoxicity with a highly water-soluble tetrazolium salt, neutral red and crystal violet. *Biol Pharm Bull*. 1996;19:1518-20.
- [47] Melilli D, Curro G, Perna AM, Cassaro A. Cytotoxicity of four types of resins used for removable denture bases: in vitro comparative analysis. *Minerva Stomatol*. 2009;58:425-34.

- [48] Jorge JH, Giampaolo ET, Vergani CE, Pavarina AC, Machado AL, Carlos IZ. Effect of microwave postpolymerization treatment and of storage time in water on the cytotoxicity of denture base and reline acrylic resins. *Quintessence Int.* 2009;40:e93-100.
- [49] Bural C, Aktas E, Deniz G, Unlucerci Y, Bayraktar G. Effect of leaching residual methyl methacrylate concentrations on in vitro cytotoxicity of heat polymerized denture base acrylic resin processed with different polymerization cycles. *J Appl Oral Sci.* 2012;19:306-12.
- [50] 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.
- [51] Bayraktar G, Guvener B, Bural C, Uresin Y. Influence of polymerization method, curing process, and length of time of storage in water on the residual methyl methacrylate content in dental acrylic resins. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2006;76:340-5.
- [52] Sideridou I, Achilias DS, Kyrikou E. Thermal expansion characteristics of light-cured dental resins and resin composites. *Biomaterials.* 2004;25:3087-97.
- [53] 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.
- [54] Ferracane JL, Condon JR. Rate of elution of leachable components from composite. *Dent Mater.* 1990;6:282-7.
- [55] Jorge JH, Giampaolo ET, Vergani CE, Machado AL, Pavarina AC, Carlos IZ. Effect of post-polymerization heat treatments on the cytotoxicity of two denture base acrylic resins. *J Appl Oral Sci.* 2006;14:203-7.

Legendas das Tabelas e Figuras

Tabela 1 – Resinas acrílicas termopolimerizáveis para base de prótese avaliadas

Tabela 2 – Ciclos de polimerização avaliados neste estudo

Tabela 3 – Procedimentos de esterilização testados neste estudo

Fig. 1 – Taxa de proliferação celular (3T3) pelo método MTT.

Símbolos iguais denotam valores sem diferença estatisticamente significativa ($P>0,05$)

Fig. 2 – Viabilidade celular (% em relação ao controle) pelo método MTT ($P>0,05$)

Fig. 3 – Integridade de membrana celular (% em relação ao controle) pelo método VN ($P>0,05$)

Tabela 1 - Resinas acrílicas termopolimerizáveis para base de prótese avaliadas

Material (sigla)	Classificação	Composição† (lote)		Proporção pó/líquido	Fabricante
		Pó	Líquido		
Vipi Cril® (VC)	Convencional	PMMA, peróxido de benzoíla, pigmentos (00773)	MMA, EGDMA, inibidor (32144)	2,15 g/mL	Vipi Ltda., Pirassununga, SP, Brasil
Vipi Wave® (VW)	Formulada para micro-ondas	PMMA, peróxido de benzoíla, pigmentos	MMA, EGDMA, inibidor	2,15 g/mL	Vipi Ltda., Pirassununga, SP, Brasil

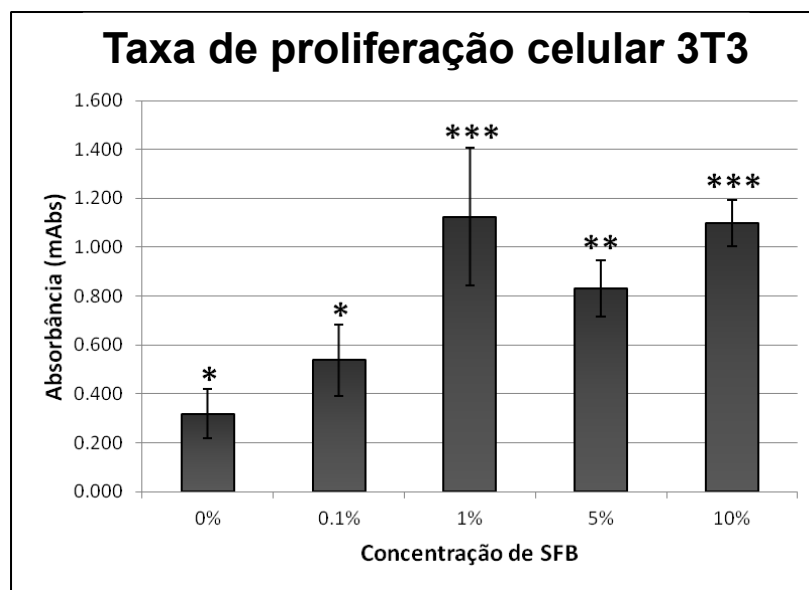
Fonte: †*Ficha de segurança*. PMMA: polimetil metacrilato; MMA: metil metacrilato; EGDMA: etilenoglicol dimetacrilato.

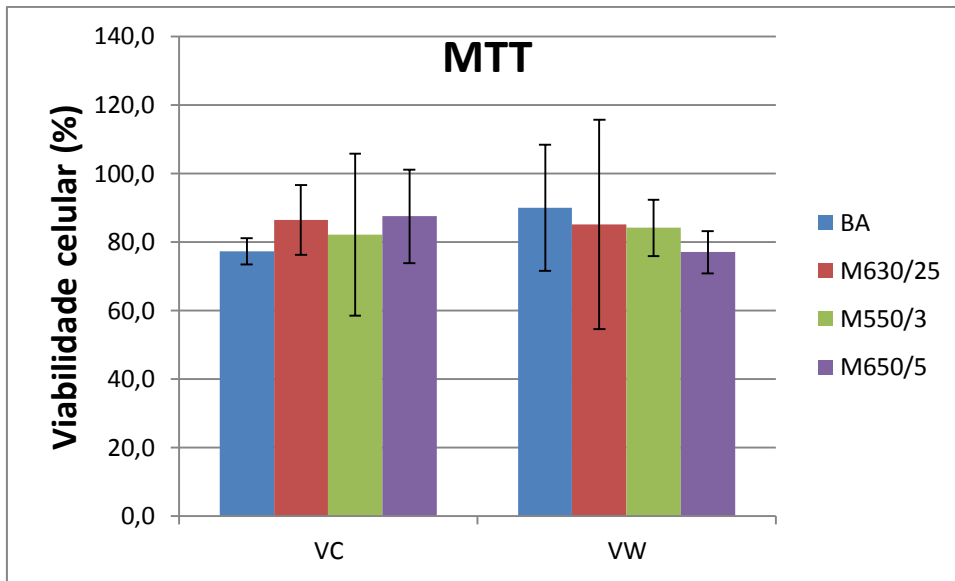
Tabela 2. Ciclos de polimerização avaliados neste estudo

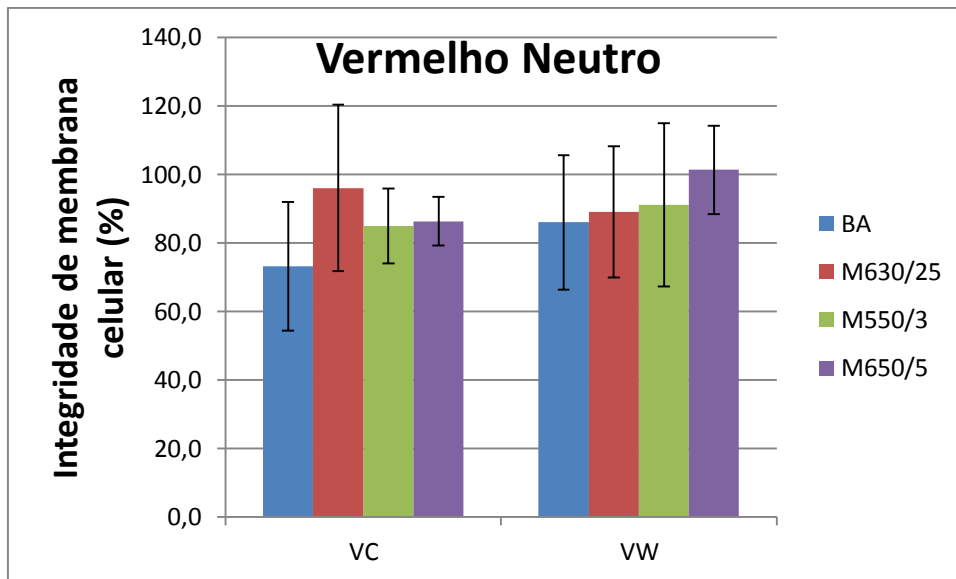
Grupo	Ciclo de polimerização		Referência
BA (banho de água – polimerização convencional)	• colocar a mufla em água fria; • aquecer a água até 65°C durante 30 min e manter por 1 h; • aquecer a água até a ebulição durante 30 min e manter por 1 h; • desligar e deixar esfriar		Ciclo recomendado pelo fabricante para a polimerização da resina VC
	270 W	10 min	Ciclo recomendado pelo fabricante para a polimerização da resina VW
	0 W	5 min	
	360 W	10 min	
M550/3	550 W	3 min	Ilbay et al. [29]
M650/5	650 W	5 min	Patil et al. [30]

Tabela 3. Procedimentos de esterilização testados neste estudo

Grupos	Processo de esterilização
Banho de água (BA)	• Nenhum
	• Banho de ultrassom por 20 min
	• Exposição à luz ultravioleta (UV) por 20 min para cada face do espécime
	• Banho de ultrassom + luz UV
Micro-ondas (M)	• Nenhum
	• Banho de ultrassom por 20 min
	• Exposição à luz ultravioleta (UV) por 20 min para cada face do espécime
	• Banho de ultrassom + luz UV







4.3 CAPÍTULO 3 – Artigo **Porosity, water sorption and solubility of denture base acrylic resins polymerized conventionally or in microwave** submetido para publicação no periódico *Journal of Prosthodontics*.

06/12/2015

ScholarOne Manuscripts

ScholarOne Manuscripts™

Vanessa Urban ▼

[Instructions & Forms](#)[Help](#)[Log Out](#)**Journal of Prosthodontics**
Implant, Esthetic, and Reconstructive Dentistry**ACP** Your smile.
Our specialty.®[Main Menu](#) / [Author Dashboard](#) / [Submission Confirmation](#)

Submission Confirmation

[Print](#)

Thank you for your submission

Submitted to Journal of Prosthodontics

Manuscript ID JOPR-15-597

Title Porosity, water sorption and solubility of denture base acrylic resins polymerized conventionally or in microwave

Authors Figueróe, Rosana
Conterno, Bruna
Arrais, Cesar
Neppelenbroek, Karin
Urban, Vanessa

Date Submitted 06-Dec-2015

[Author Dashboard >](#)

Title

Porosity, water sorption and solubility of denture base acrylic resins polymerized conventionally or in microwave

Running Title

Physical properties of microwaved acrylic resins

Authors

Rosana M. S. Figuerôa, DDS, MS,¹ Bruna Conterno, DDS,¹ César A. G. Arrais, DDS, MS, PhD,¹ Karin H. Neppelenbroek, DDS, MS, PhD,² & Vanessa M. Urban, DDS, MS, PhD.¹

Institutions

¹ Department of Dentistry, State University of Ponta Grossa, Ponta Grossa, Brazil

² Department of Prosthodontics, Bauru School of Dentistry, University of Sao Paulo, São Paulo, Brazil

Correspondence: Vanessa Migliorini Urban, Av. General Carlos Cavalcanti, 4748 – Uvaranas – 84030-900, Ponta Grossa, Parana, Brazil. E-mail: vanurban@yahoo.com.

Supported by Fundação Araucária (grant 230/2010 - 17471).

The authors deny any conflicts of interest.

Abstract

Purpose: The aim of this study was to evaluate the porosity, water sorption and solubility of acrylic resins (Vipi Cril–VC and Vipi Wave–VW) after conventional or microwave polymerization cycles.

Materials and Methods: Specimens ($n = 10$) were made and cured: 1-WB = 65°C during 90 min + boiling during 90 min (VC cycle – control group); 2-M630/25 = 10 min at 270 W + 5 min at 0 W + 10 min at 360 W (VW cycle); 3-M550/3 = 3 min at 550 W; and 4-M650/5 = 5 min at 650 W. Afterward, they were polished and dried in a dessicator until a constant mass was reached. Specimens were then immersed in distilled water at 37°C and weighed regularly until a constant mass was achieved. For porosity, an additional weight was made with the specimen immediately immersed in distilled water. For water sorption and solubility, the specimens were dried again until equilibrium was reached. Data were submitted to 2 way-ANOVA and Tukey HSD ($\alpha = 0.05$).

Results: Porosity mean values below 1.52% with no significant difference among groups for both materials were observed. Resins showed water sorption and solubility values without a significant difference. However, there was a significant difference among groups for these both properties ($P < 0.013$). The highest sorption (2.43%) and solubility (0.13%) values were obtained for WB and M550/3, respectively.

Conclusions: The conventional acrylic resin could be polymerized in a microwave since both the materials showed similar performance in the evaluated properties. Shorter microwave cycles could be used for both the materials without any detectable increase in volume porosity.

Keywords: Polymethyl methacrylate; polymerization; physical properties.

Polymethyl methacrylate acrylic resin has been the material of choice for making denture bases since the beginning of the twentieth century. This material has been modified in order to improve physical and mechanical properties and facilitate the laboratory procedure using microwave polymerization, visible light curing, and vacuum pressure at low temperature curing systems.¹

During the microwave polymerization, there is a rapid and homogeneous internal heating.² This alternative polymerization method has advantages such as ease and cleanliness during acrylic resin processing,³ rapid temperature increase⁴ and, thus, a reduction in execution time,² minimum color change in the denture base acrylic resin and less risk of artificial teeth fracture during deflasking.⁵

The importance of the proper selection of the microwave curing cycle has been reported in order to prevent overheating of the monomer that could cause degradation,⁶ porosity and consequent injury to the properties of the prosthesis.² According to Bafille et al,⁷ resins designed for microwave polymerization could contain triethylene or tetraethylene glycol dimethacrylate in their composition. These dimethacrylates have low vapor pressure, allowing the polymerization to be carried out at elevated temperatures (between 100°C and 150°C) without risk of porosity, which would not occur with methyl methacrylate since it has a high vapor pressure.

The porosity is a non-desirable characteristic to the acrylic resin denture base.¹ Severe porosity can weaken the dentures⁸ and result in high internal stress, leading to greater vulnerability to distortion and warpage.⁹ A porous surface promotes colonization of the material by oral microorganisms such as *Candida albicans*¹⁰ and facilitates the retention of substances and deposition of calculus, resulting in staining and impaired aesthetic.^{1,11} Water absorbed by acrylic resins during the use of prosthesis acts as a plasticizer and can result in volume changes, so the water sorption evaluation also has clinical relevance. Furthermore,

residual monomer and other water soluble byproducts are released into the oral cavity and may cause tissue irritation; therefore, it is desired that these materials have low solubility.¹²

Despite the advantages of microwave polymerization, this method has gained only limited clinical acceptance, and materials specifically formulated for use in a microwave have a higher cost compared to those for conventional polymerization. Thus, aiming to overcome these disadvantages, the polymerization of a conventional resin was tested in a microwave oven, and this study evaluated the porosity and water sorption and solubility properties of the acrylic resins Vipi Cril (VC) and Vipi Wave (VW) after polymerization using experimental microwave cycles and the cycles recommended by the manufacturer. The hypotheses evaluated in this study were: 1) there would be differences regarding the porosity results between the materials in the evaluated polymerization cycles; and 2) the water sorption and solubility results would be different between the materials conventionally polymerized or cured by microwave.

MATERIALS AND METHODS

Materials

The acrylic resins selected for this study are shown in Table 1.

Specimen preparation

For the analysis of porosity, specimens ($n = 10$) were made in the dimensions of $50 \times 4 \times 2 \pm 0.1$ mm.¹³ Metal matrixes in such dimensions were molded using laboratory silicone (Zetalabor-Zhermack; Labordental, São Paulo, SP, Brazil) between two glass plates. For the analysis of water sorption and solubility, specimens ($n = 10$) were made in the dimensions of 50 mm in a diameter $\times$ 0.5 mm thickness¹⁴ using metal matrixes.

The mold/matrix set or just the metal matrix was included in metallic (OGP, Bragança Paulista, SP, Brazil) or plastic (Vipi Ltda., Pirassununga, SP, Brazil) flasks using type III stone (Herodent; Vigodent Coltène SA Ind. e Com., Rio de Janeiro, RJ, Brazil). The flask was closed and remained under a load of 0.5 t in a hydraulic press (VH, Araraquara, SP, Brazil) during the setting time of the stone. After this period, the materials were handled according to the manufacturer's instructions (Table 1) and inserted into the mold inside the flask, which was kept under a load of 1.25 t during 30 min. The specimens were then submitted to conventional (SL-155/22; Solab, Piracicaba, SP, Brazil) or microwave (MEF 41; Electrolux, Manaus, AM, Brazil) polymerization cycles as shown in Table 2.

Then the flasks were bench cooled for 30 min and subsequently cooled in running water for 15 min before the removal of the specimens.¹⁴ For the porosity analysis, the specimens were polished (Aropol E; Arotec, Cotia, SP, Brazil) using silicon carbide sandpapers (#100, #240, and #600; 3M, Campinas, SP, Brazil) under constant water irrigation. For the water sorption and solubility specimens, a minicut carbide bur (Edenta; Hauptstrasse, Switzerland) was used to remove irregularities of their edges. The specimens were then visually examined, and only those with minimal porosity were used.¹⁴

Porosity

Porosity was related to the amount of absorbed water by each specimen after storing in distilled water at 37°C. The samples were weighed on a digital analytical balance (four decimal places AW220; Shimadzu do Brazil, São Paulo, SP, Brazil) in two stages. In the first one, the specimen was daily weighed after a storing period in a desiccator (Vidrolabor, São Paulo, SP, Brazil). In the second one, the specimen was also daily weighed after a storing period in distilled water in an oven (New Instruments, Piracicaba, SP, Brazil) at 37°C. The

final record of weighing for dry and wet specimens was carried out at the time that they reached a stable mass, evidenced after stabilization in a milligram scale.

The porosity was analyzed using the gravimetric method based on Archimedes' principle^{7,13,15} and, therefore, an additional weighing was performed after each stage with the specimen immersed in distilled water.^{13,15}

Thereafter, the porosity was calculated according to the following equations:

$$Vs\ dry = (m_d - m_d')/\rho_{water} \quad [1]$$

$$Vs\ wet = (m_w - m_w')/\rho_{water} \quad [2]$$

$$Porosity\ \% = 100 \times (Vs\ dry - Vs\ wet)/Vs\ dry \quad [3]$$

where: $Vs\ dry$ (mL) is the volume of the dry specimen; m_d (g) is the mass of the dry specimen recorded in air; m_d' (g) is the mass of the dry specimen recorded with the specimen immediately immersed in water; ρ_{water} (g/mL) is the density of water; $Vs\ wet$ (mL) is the volume of the wet specimen; m_w (g) is the mass of the wet specimen recorded in air; and m_w' (g) is the mass of the wet specimen recorded with the specimen immediately immersed in water.

Water sorption and solubility

Specimens were subjected to a drying process in order to achieve a constant weight. So, they were kept in a vacuum desiccator and daily weighed on a digital analytical balance until the difference between sequential weight measurements was less than 0.5 mg. After obtaining the constant mass, specimens were stored in distilled water at 37°C and were also daily weighed until stabilization, but always after careful drying with absorbent paper.

To calculate the water sorption and solubility, specimens passed again by the above drying process. The water sorption and solubility percentages were calculated using the following equations:¹⁶

$$\% \text{ Sorption} = 100 \times (m_2 - m_3)/m_1 \quad [4]$$

$$\% \text{ Solubility} = 100 \times (m_1 - m_3)/m_1 \quad [5]$$

where: m_2 is the mass (mg) of the specimen after immersion in water; m_3 is the mass (mg) of the specimen after the second drying; and m_1 is the mass (mg) of the specimen after the first drying.

Statistical analysis

The results of porosity, water sorption and solubility (%) were analyzed using two-way ANOVA (“material” and “polymerization cycle” factors) and followed by Tukey HSD test ($\alpha = 0.05$) using a personal software (IBM SPSS 19, SPSS Inc., IBM Company, Armonk, NY, USA). *Post-hoc* Power analysis was performed for statistical analyses of all data using the personal statistical software (IBM SPSS 19).

RESULTS

For the number of specimens used to evaluate the porosity, water sorption and solubility properties ($n = 10$) of denture base acrylic resins, this study showed adequate power for both factors “material” and “polymerization cycle” for the three properties (100%, 85.2%, and 80.4%, respectively; $\alpha = 0.05$).

The porosity results are shown in Figure 1. There were no significant differences ($P > 0.05$) between the materials and among the evaluated polymerization cycles, and the observed mean values were less than 1.52%.

For the water sorption and solubility analyses, there was no significant difference between the acrylic resins ($P > 0.05$). However, significant differences were noted ($P < 0.013$) among the experimental cycles for both the properties (Figures 2 and 3). According to Figure 2, the highest water sorption mean values were obtained in the WB cycle (2.43%); intermediate values in the M630/25 cycle (2.25%); and the lowest values in the experimental microwave cycles M550/3 (2.20%) and M650/5 (2.17%). Figure 3 shows that the M550/3 cycle resulted in the highest mean solubility values (0.13%); intermediate values were observed in the M650/5 and WB cycles (0.05%); and the lowest values in the M630/25 cycle (0.03%).

DISCUSSION

The first hypothesis evaluated in this study, in which *“there would be differences regarding the porosity results between the materials in the evaluated polymerization cycles,”* was not accepted, since no significant differences were observed between the acrylic resins conventionally polymerized in the water-bath or processed in a microwave.

A variety of methods have been used to measure the porosity of acrylic resins using microscopy, mercury porosimetry and the classic method by measuring the weight of the specimen before and after immersion in water, the volume of the specimen and density of acrylic resin and the water and air confined in the pores.^{7,11,15,17} According to Yannikakis et al,¹¹ the classic method is more objective but does not provide detailed information on the size and location of the pores. However, this study aimed not to describe the pores but objectively compare the polymerized groups according to the manufacturer's instructions or experimentally.

The porosity is a complex phenomenon attributed to a variety of factors depending on the laboratory technique and partially on the conjunction of the polymerization method and

material.^{11,18} All factors related to the laboratory technique that would influence the porosity results; the proportioning and incorporation of the powder to the liquid; and the pressing, cooling of the flask and polishing time were controlled.¹⁹ The results of other studies^{7,19-21} also found no significant differences in porosity values when the thicknesses of the specimens polymerized in several cycles were around 3 mm. Also, Yannikakis et al¹¹ reported that it is possible to polymerize a conventional resin in a microwave when its thickness is equal or less than 3 mm, since this thickness is representative of dimensions commonly used for making denture bases.¹¹ With regard to materials, a similarity in their composition could be noted in Table 1 that shows the information provided by the manufacturer. Thus, it is possible to suppose that there was no difference between the results of porosity due to standardization in the laboratory technique, the thickness of the specimens and the similar composition of the materials.

According to the American Dental Association specifications,²² there should be no bubbles or voids in the denture base polymer when viewed without magnification. Furthermore, porosity values above 11% have been associated with reduced mechanical properties, impaired appearance and retention of fluids and microorganisms,²³ and levels lower than this one may be considered clinically acceptable.¹ In this study, visible pores and bubbles were not observed and all porosity values were less than 1.52%. Since handling errors were eliminated, the evaporation of the monomer due to the high temperature (external heat + exothermic reaction) is then the most likely cause of the detected internal porosity.¹¹

The hypothesis that *“the water sorption and solubility results would be different between the materials conventionally polymerized or cured in microwave”* was partially proven as there was no difference between the tested materials, but the polymerization cycles resulted in different values for water sorption and solubility.

There are two techniques to quantify the water sorption. The technique recommended by ADA N° 1221 takes into consideration the specimen weight after saturation (m_2) minus the initial dry weight (m_1). This technique assesses the relative sorption of specimens. The technique described by Kazanji and Watkinson (1988)¹⁶ measures the weight after saturation (m_2) minus the final dry weight (m_3) and not the initial dry weight. This technique is considered the sorption of the polymer network as it takes into account the absorbed liquid minus the liquid released by the material. In the evaluation of water sorption and solubility, the Kazanji and Watkinson technique¹⁶ is more representative (data in percent) and has less variable (surface area, results in mg/cm^2) in the calculations.²⁴ In this study, the technique recommended by Kazanji and Watkinson¹⁶ was used.

The fact that there was no difference between the materials for water sorption and solubility, as well as for porosity, is due to their similar composition as mentioned earlier. The water sorption mean values were between 2.17% and 2.43%. These values have been considered appropriate since the acrylic resin initially desiccated becomes saturated after sorption of approximately 2% of water.²⁵ The solubility values found in this study (between 0.0065% and 0.4715%) were within the range of values observed in another study (between 0.417% and 0.815%) that evaluated the effect of chemical or mechanical polishing on the solubility of Vipi Cril resin. This large variation, mainly observed in the solubility data, can be attributed to small measured variations in weight.²⁴ Lower values of solubility than water sorption are due to slow elution of the residual monomer in comparison to water diffusion.²⁶ This is because the dissolution of the monomer is 0.5 to 1.7×10^{-2} times smaller than the water sorption of the resin based on polymethyl methacrylate.²⁷

The acrylic resins contain polar carbonyl groups that therefore attract water molecules.²⁶ Water molecules, in turn, diffuse between the polymer intermolecular gaps separating them slightly²⁸ and gradually infiltrate deeper into the resin.²⁶ The most important

consequence of water sorption is the dimensional change,²⁸ resulting in change in the vertical dimension of occlusion previously determined. In contrast, it has been reported that the water sorption partially compensates the polymerization shrinkage of heat-polymerized acrylic resin, and after reaching the saturation, the prosthesis should fit better than immediately after processing since there has been no change in paraprosthetic tissues.²⁹

The highest water sorption values observed in the water-bath conventional polymerization group may be related to a low residual monomer content^{12,30} and a higher degree of conversion. The use of a final temperature for at least 30 min in the water-bath polymerization cycles has led to reduced residual monomer content.³¹⁻³⁴ This study evaluated the water-bath polymerization recommended by the manufacturer that was included at the end of the cycle a period of 1 h in boiling for both resins. The reduction of the residual monomer is related to the temperature increase at the end of the polymerization cycle, which results in increased mobility of the molecular chains, thus facilitating the conversion of monomer to polymer.³⁵ Similarly, the lowest water sorption results observed in M550/3 and M650/5 groups can be associated with a low degree of conversion values. Moreover, the highest solubility values found in the M550/3 group can be due to a higher residual monomer content because it has been related to higher levels of solubility of acrylic resins.^{12,36}

This study evaluated only two brands of heat-polymerized denture base acrylic resins. Additional studies evaluating physical, mechanical and biological properties and the material behavior after aging conditions are needed to decide if faster microwave polymerization cycles can be used to cure conventional acrylic resins.

CONCLUSION

Within the limitations of this in vitro study, it can be concluded that the conventional acrylic resin Vipi Cril could be polymerized in a microwave, since both the materials behaved

similarly in the evaluated properties. Shorter microwave polymerization cycles could be used for both the materials without any detectable increase in volume porosity. The lowest water sorption and the highest solubility values were detected by using the microwave polymerization at 550 W for 3 min.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by Fundação Araucária (FA 2009/17471-PPP).

References

1. Singh S, Palaskar JN, Mittal S: Comparative evaluation of surface porosities in conventional heat polymerized acrylic resin cured by water bath and microwave energy with microwavable acrylic resin cured by microwave energy. *Contemp Clin Dent* 2013;4:147-151
2. De Clerck JP: Microwave polymerization of acrylic resins used in dental prostheses. *J Prosthet Dent* 1987;57:650-658
3. Wallace PW, Graser GN, Myers ML, et al: Dimensional accuracy of denture resin cured by microwave energy. *J Prosthet Dent* 1991;66:403-408
4. Lai YL, Chen YT, Lee SY, et al: Cytotoxic effects of dental resin liquids on primary gingival fibroblasts and periodontal ligament cells in vitro. *J Oral Rehabil* 2004;31:1165-1172
5. Kimura H, Teraoka F, Ohnishi H, et al: Applications of microwave for dental technique (part 1). Dough-forming and curing of acrylic resins. *J Osaka Univ Dent Sch* 1983;23:43-49
6. Gettleman L, Nathanson D, Myerson RL: Effect of rapid curing procedures on polymer implant materials. *J Prosthet Dent* 1977;37:74-82
7. Bafille M, Graser GN, Myers ML, et al: Porosity of denture resin cured by microwave energy. *J Prosthet Dent* 1991;66:269-274
8. Alkhatib MB, Goodacre CJ, Swartz ML, et al: Comparison of microwave-polymerized denture base resins. *Int J Prosthodont* 1990;3:249-255
9. Wolfaardt JF, Cleaton-Jones P, Fatti P: The occurrence of porosity in a heat-cured poly (methyl methacrylate) denture base resin. *J Prosthet Dent* 1986;55:393-400
10. Davenport JC: The oral distribution of *Candida* in denture stomatitis. *Br Dent J* 1970;129:151-156
11. Yannikakis S, Zissis A, Polyzois G, et al: Evaluation of porosity in microwave-processed acrylic resin using a photographic method. *J Prosthet Dent* 2002;87:613-619
12. Cucci AL, Vergani CE, Giampaolo ET, et al: Water sorption, solubility, and bond strength of two autopolymerizing acrylic resins and one heat-polymerizing acrylic resin. *J Prosthet Dent* 1998;80:434-438
13. Pero AC, Barbosa DB, Marra J, et al: Influence of microwave polymerization method and thickness on porosity of acrylic resin. *J Prosthodont* 2008;17:125-129
14. ISO: International Organization for Standardization. Specification 1567: denture base polymers. ISO, Switzerland, 2001
15. Compagnoni MA, Barbosa DB, de Souza RF, et al: The effect of polymerization cycles on porosity of microwave-processed denture base resin. *J Prosthet Dent* 2004;91:281-285
16. Kazanji MN, Watkinson AC: Soft lining materials: their absorption of, and solubility in, artificial saliva. *Br Dent J* 1988;165:91-94
17. Tager A: Physical chemistry of polymers. Mir Publisher: Moscow, 1978

18. Keller JC, Lautenschlager EP: Porosity reduction and its associated effect on the diametral tensile strength of activated acrylic resins. *J Prosthet Dent* 1985;53:374-379
19. Oliveira VM, Leon BL, Del Bel Cury AA, et al: Influence of number and position of flasks in the monomer release, Knoop hardness and porosity of a microwave-cured acrylic resin. *J Oral Rehabil* 2003;30:1104-1108
20. Reitz PV, Sanders JL, Levin B: The curing of denture acrylic resins by microwave energy. Physical properties. *Quintessence Int* 1985;16:547-551
21. Ilbay SG, Guvener S, Alkumru HN: Processing dentures using a microwave technique. *J Oral Rehabil* 1994;21:103-109
22. Anusavice KJ: Phillips' Science of Dental Materials. W. B. Saunders: Philadelphia, 2003
23. Jerolimov V, Brooks SC, Huggett R, et al: Rapid curing of acrylic denture-base materials. *Dent Mater* 1989;5:18-22
24. El-Hadary A, Drummond JL: Comparative study of water sorption, solubility, and tensile bond strength of two soft lining materials. *J Prosthet Dent* 2000;83:356-361
25. Craig RG, Powers JM: Restorative dental materials. Mosby: St. Louis, 2002
26. Tsuboi A, Ozawa K, Watanabe M: Water absorption characteristics of two types of acrylic resin obturators. *J Prosthet Dent* 2005;94:382-388
27. Takahashi Y, Chai J, Kawaguchi M: Equilibrium strengths of denture polymers subjected to long-term water immersion. *Int J Prosthodont* 1999;12:348-352
28. Ristic B, Carr L: Water sorption by denture acrylic resin and consequent changes in vertical dimension. *J Prosthet Dent* 1987;58:689-693
29. Woelfel JB, Paffenbarger GC, Sweeney WT: Dimensional changes occurring in dentures during processing. *J Am Dent Assoc* 1960;61:413-430
30. Cucci AL, Giampaolo ET, Leonardi P, et al: Unrestricted linear dimensional changes of two hard chairside reline resins and one heat-curing acrylic resin. *J Prosthet Dent* 1996;76:414-417
31. 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;8:365-371
32. 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;106:588-593
33. Bayraktar G, Guvener B, Bural C, et al: Influence of polymerization method, curing process, and length of time of storage in water on the residual methyl methacrylate content in dental acrylic resins. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2006;76:340-345
34. Urban VM, Machado AL, Oliveira RV, et al: Residual monomer of reline acrylic resins. Effect of water-bath and microwave post-polymerization treatments. *Dent Mater* 2007;23:363-368
35. Sideridou I, Achilias DS, Kyrikou E: Thermal expansion characteristics of light-cured dental resins and resin composites. *Biomaterials* 2004;25:3087-3097
36. Bates JF, Stafford GD, Huggett R, et al: Current status of pour type denture base resins. *J Dent* 1977;5:177-189
37. Patil PS, Chowdhary R, Mandokar RB: Effect of microwave postpolymerization treatment on residual monomer content and the flexural strength of autopolymerizing reline resin. *Indian J Dent Res* 2009;20:293-297

Table 1. Denture base acrylic resins used in this study

Material (acronym)	Type	Composition† (batch)		Powder/liquid ratio	Manufacturer
		Powder	Liquid		
Vipi Cril® (VC)	Conventional	PMMA, benzoyl peroxide, pigments (0083)	MMA, EGDMA, inhibitor (12087)	2.15 g/1 mL	Vipi Ltda., Pirassununga, SP, Brazil
Vipi Wave® (VW)	Microwaved- processed	PMMA, benzoyl peroxide, pigments (12041)	MMA, EGDMA, inhibitor (12049)	2.15 g/1 mL	Vipi Ltda., Pirassununga, SP, Brazil

PMMA: polymethyl methacrylate; MMA: methyl methacrylate; EGDMA: ethylene glycol dimethacrylate.

† According to the MSDS provided by the manufacturer.

Table 2. Polymerization cycles evaluated in this study

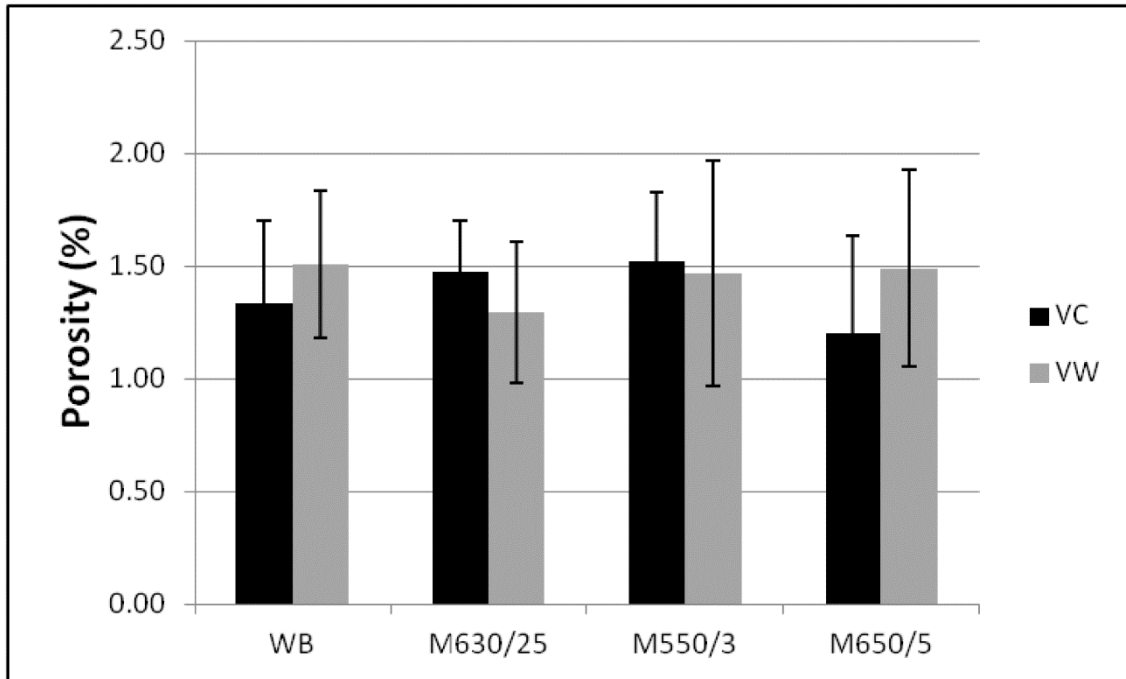
Group	Polymerization cycle	Reference
WB (water-bath – conventional polymerization)	• immerse the flask in cold water; • heat water up to 65°C during 30 min and maintain for 1 h • heat water until boiling point during 30 min and maintain for 1 h; • turn off the water-bath and let cool down	Manufacturer's recommended cycle to cure VC resin
M630/25	270 W for 10 min 0 W for 5 min 360 W for 10 min	Manufacturer's recommended cycle to cure VW resin
M550/3	550 W for 3 min	Ilbay et al ²¹
M650/5	650 W for 5 min	Patil et al ³⁷

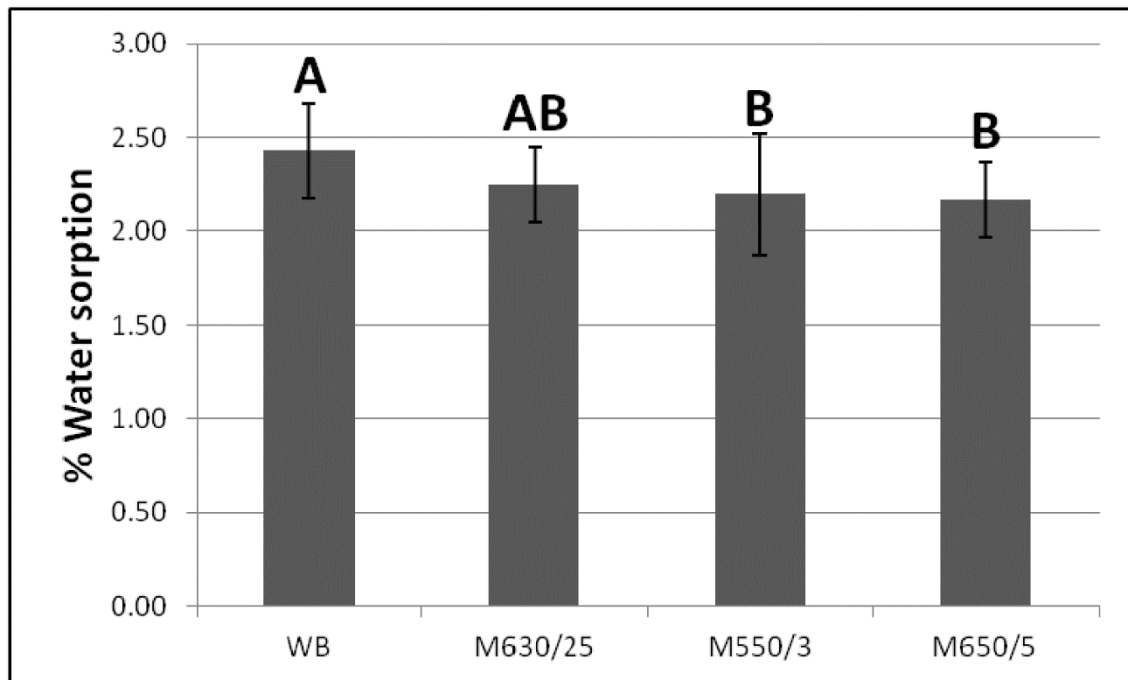
Figure legends

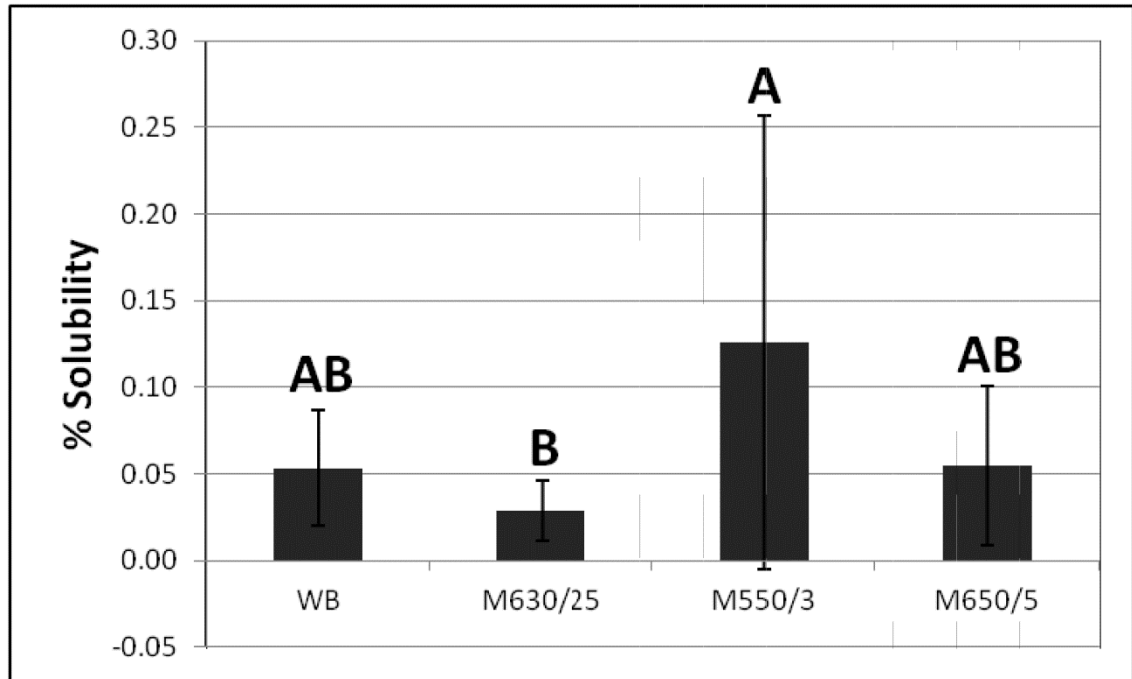
Figure 1 - Mean and standard deviation porosity values (%) for VC and VW resins polymerized in water-bath and microwave cycles ($P > 0.05$)

Figure 2 - Mean and standard deviation water sorption values (%) obtained polymerizing in water-bath and microwave cycles regardless of the material. *Identical capital letters indicate values with no statistically significant difference ($P > 0.05$)*

Figure 3 - Mean and standard deviation solubility values (%) obtained polymerizing in water-bath and microwave cycles regardless of the material. *Identical capital letters indicate values with no statistically significant difference ($P > 0.05$)*









Print View—593725 (/receipt.asp?nDocid=594266)

THANK YOU FOR YOUR ORDER!

Cesar Arrais

R OLEGARIO MARIANO 399 AP 11, NEVES
PONTA GROSSA, Parana 84020-420
Brazil

Papercheck, LLC

666 Natoma Street,
San Francisco, CA 94103
USA

Submitted Document: Porosity__water_sorption_and_s_1448044535.docx**Document ID:** 593725**Submitted:** 11/20/2015 6:37:08 PM**Returned:** 11/23/2015 5:43:39 PM**Pickup:** 11/23/2015 7:34:52 PM**Page Count:** 9.72**Word Count:** 2916**Priority:** Standard (72-hour turnaround time) \$ 6.95 per page**Writing Style:** Leave The Format As It Is**Editing Style:** Executive**English Type:** US English**PaperTomb Charge:** \$0.00**SMS Charge:** \$1.00**Non-Standard Style Charge:** \$0.00**Document Editing Charge:** \$67.55

4.4 CAPÍTULO 4 – Artigo **Effect of immersion in potentially staining drinks associated with simulated brushing on roughness and color stability of denture base acrylic resins polymerized with different cycles**, que será revisado e submetido para publicação no periódico *Journal of Prosthetic Dentistry*.

Effect of immersion in potentially staining drinks associated with simulated brushing on roughness and color stability of denture base acrylic resins polymerized with different cycles

Rosana M. S. Figuerôa, DDS, MS,^a Kamylla B. de Albuquerque, DDS,^b Christiane P. F. Borges, MS, PhD,^c Alfonso Sánchez-Ayala, DDS, MS, PhD,^d César A. G. Arrais, DDS, MS, PhD,^e Nara H. C. Bombarda, DDS, MS, PhD,^e Karin H. Neppelenbroek, DDS, MS, PhD,^f Vanessa M. Urban, DDS, MS, PhD^e

^a Postgraduate student, Department of Dentistry, State University of Ponta Grossa, Ponta Grossa, Paraná, Brazil.

^b Department of Dentistry, State University of Ponta Grossa, Ponta Grossa, Paraná, Brazil.

^c Assistant Professor, Department of Chemistry, State University of Ponta Grossa, Ponta Grossa, Paraná, Brazil.

^d Adjunct Professor, Department of Dentistry, State University of Ponta Grossa, Ponta Grossa, Paraná, Brazil.

^e Assistant Professor, Department of Dentistry, State University of Ponta Grossa, Ponta Grossa, Paraná, Brazil.

^f Assistant Professor, Department of Prosthodontics, Bauru School of Dentistry, University of São Paulo, Bauru, São Paulo, Brazil.

Presented at the 32th Brazilian Division of International Association for Dental Research, Campinas, São Paulo, Brazil, September 2015.

Supported by Fundação Araucária (grant FA 230/2010 – 17.471).

Corresponding author:

Dr Vanessa Migliorini Urban

Department of Dentistry

State University of Ponta Grossa

Av. General Carlos Cavalcanti, 4748, 84030-900, Uvaranas, Ponta Grossa, PR, Brazil

Tel: +55-42-3220-3106

Fax: +55-42-3220-3102

E-mail: vanurban@yahoo.com

Acknowledgements:

The authors thank Fundação Araucária (grant FA 230/2010 – 17.471) for financial support.

Effect of immersion in potentially staining drinks associated with simulated brushing on roughness and color stability of denture base acrylic resins polymerized with different cycles

ABSTRACT

Purpose. To evaluate the effect of potentially staining drinks associated with simulated brushing on the roughness and color stability of acrylic resins (Vipi Cril [VC] and Vipi Wave [VW]) polymerized with different cycles.

Material and methods. Specimens ($n=5$; $20 \times 3 \text{ mm}$) were made: 1-WB (water bath)= 65°C during 90min + boiling during 90min (VC cycle); 2-M630/25=10min at 270W + 5min at 0W + 10min at 360W (VW cycle); and 3-M550/3=3min at 550W; 4-M650/5=5min at 650W and stored in distilled water at 37°C for 48h (T_0) and in distilled water, coffee or red wine at 37°C during 36 days (T_1). Specimens were brushed after 6, 12, 24, and 36 days (54,000 cycles). Roughness measurements and color evaluation by reflectance spectroscopy were performed at T_0 and T_1 periods. Data were submitted to ANOVA/Bonferroni ($\alpha=.05$).

Results. After immersion in coffee, the M550/3 and WB groups of VC showed the highest and the lowest roughness, respectively ($P=.008$). An increase in roughness was also found in the M550/3 group after immersion in wine ($P=.02$). For VW, the M650/5 group presented a rougher surface after immersion in coffee ($P=.02$). No difference in color was found among the cycles for VW, and VC showed some changes ($P=.00$). All average values were classified as acceptable, with the exception of VW (M630/25 group), which presented NBS=4.49 after immersion in wine ($P=.02$).

Conclusions. The beverages and brushing slightly changed the roughness of the materials cured using the evaluated cycles. With the exception of VW resin cured using the manufacturer's recommended microwave cycle, potentially staining beverages did not result in clinically relevant color changes after simulated brushing.

Keywords: polymethyl methacrylate; microwave; coloring agents; surface properties; toothbrushing.

INTRODUCTION

Polymethyl methacrylate has been used for making removable denture bases since 1937. These materials are routinely processed in a temperature-controlled water bath during specific periods of immersion. As there is a decrease in the polymerization temperature, the formation of polymer also decreases, and hence, a certain amount of residual monomer remains in the polymerized resin.¹ Due to its plasticizing action, the residual monomer can negatively influence the physical and mechanical² properties of the materials. Its concentration may be influenced by factors such as time, temperature, and polymerization method.³⁻⁵

In the conventional water bath method, the heating of resin is slow because the monomer molecules are passively moved due to the thermal shock of other molecules.² In microwave polymerization, the monomer molecules move due to the internal heat produced by a high-frequency electromagnetic field,⁶ eliminating the time required to transfer the heat from the water bath to the resin inside the flask. Thus, this alternative method has advantages, such as time reduction,⁶ ease and cleaning during acrylic resin processing,⁷ minimal color change in the denture base resin, and low risk of fracture of the artificial teeth during deflasking.⁸

It has been reported that the proper selection of the microwave curing cycle is important in order to prevent overheating of the monomer, which could cause degradation,⁹ porosity, and consequent injury to the physical and mechanical properties of the prosthesis.⁶ In addition, according to Bafille et al. (1991),¹⁰ the resins formulated for use in a microwave oven could contain triethylene or tetraethylene glycol dimethacrylate in their compositions.

These dimethacrylates have low vapor pressure, thus allowing the polymerization to be carried out at elevated temperatures (between 100°C and 150°C) without the risk of porosities. This does not occur with the polymethyl methacrylate, which has a high vapor pressure. However, according to the manufacturer, Vipi Cril (conventional) and Vipi Wave (formulated for microwave) heat-polymerized denture base acrylic resins presented similar compositions based on polymethyl methacrylate.

During use, the dentures are subject to the deposition or surface adsorption of fluids¹¹ depending on their characteristics and the environmental conditions.¹² Extrinsic pigments associated with the staining of denture base polymers such as coffee, tea, nicotine, and red wine can cause aesthetic problems.^{13,14} While brushing is one of the methods patients use to clean their dentures,¹⁵⁻¹⁸ the possibility of increased surface roughness of the material exists due to the abrasive effect of the mechanical action of the brush bristles and toothpaste particles.¹⁹ Thus, irregularities could favor the penetration of microorganisms,^{16,20} biofilm retention,²¹ and greater color change.²² The aim of this study was to evaluate the effect of immersion in potentially staining drinks (coffee and red wine) associated with simulated brushing on the surface roughness and color stability of denture base acrylic resins polymerized with different cycles. The hypotheses evaluated in this study were: 1. different polymerization cycles result in materials with surfaces likely to increase roughness due to brushing; 2. the color change of acrylic resins may be related to the roughness resulting from simulated brushing; 3. red wine causes greater color change in the material regardless of the polymerization cycle that has undergone.

MATERIAL AND METHODS

Materials

The denture base acrylic resins selected for this study are presented in Table I.

Specimen preparation

Specimens (n=5) were made in the dimensions of 20 mm in diameter and 3.0 ± 0.1 mm thickness.²³ Metal matrixes in such dimensions were molded using laboratory silicone (Zetalabor-Zhermack; Labordental) between two glass plates. The mold/matrix set was included in metallic (OGP) or plastic (Vipi Ltda.) flasks using type III stone (Herodent; Vigodent Coltène SA Ind. e Com.). The flask was closed and remained under a load of 0.5 t in a hydraulic press (VH). After this period, the materials were handled according to the manufacturer's instructions (Table I) and inserted into the mold inside the flask, which was kept under a load of 1.25 t during 30 min. The specimens were then submitted to conventional (SL-155/22; Solab) or microwave (MEF 41; Electrolux) polymerization cycles as shown in Table II.²⁴⁻²⁶

Then, the flasks were bench cooled for 30 min and subsequently cooled in running water for 15 min.²⁷ The specimens were removed from the molds and subjected to a metallographic finishing and polishing procedure (Aropol E; Arotec) using silicon carbide sandpapers (#240, #400, #600, and #1200; 3M) for 20 s each on both sides of the specimens.

Specimens were finally stored in distilled water in an oven (Nova Instruments) at 37°C for 48 h.²⁷ Each specimen was suspended with dental floss so that it did not come into contact with the container or other specimens.²³ This initial storage time in distilled water was considered T_0 .

Potentially staining drinks and immersion conditions

Two liquid foods were selected based on their potential for staining and the frequency of intake by the population: instant coffee and red wine. Distilled water was used as a non-staining solution.

The coffee solution was prepared at a ratio of 3.6 g instant coffee (Nestlé Brasil Ltda.) for each 300 mL of boiling distilled water.²⁸ The specimens were immersed in this

solution only after total cooling. For the wine solution, a dry red wine brand (Campo Largo) was used.

After T_0 , surface roughness and color analyses were made and corresponded to the initial values. Subsequently, the specimens were immersed in 150 mL of one of the three solutions also suspended by the dental floss and stored in an oven at 37°C for 36 days (T_1). The proposed time was based on the speculation that 24 h of immersion in coffee would simulate the staining associated with consumption for one month.^{29,30} Thus, 36 days would simulate three years of use of removable dentures. After this period, roughness and color analyses were performed again and corresponded to the final values.

The solutions were replaced when changes in the pH (DMPH-2; Digimed®), visual signs of fungal contamination, and/or precipitation of the particles were observed. According to these assessments, the replacements were made every three days. The pH of the solutions used averaged 3.0 for wine and 5.0 for coffee.

Experimental design

An illustrated description of the experiment is shown in Figure 1.

Validation of simulated brushing

The simulated brushing is an in vitro simple method that the ISO/DTS 145692 considers to be suitable for the quantification of abrasive acrylic resin.³¹

Specimens ($n=3$) of the lighter color and highest-translucency Vipi Cril resin were prepared and immersed in the solution with the greatest potential for staining red wine,^{23,29} for 36 days. Once 18,000 cycles correspond to a regular toothbrushing period during one year of an adult patient,³² these specimens were brushed on both sides in three different conditions prior to the final period of analysis T_1 :

- condition 1 = 1,500 cycles per day for 36 days;
- condition 2 = T_A : 6th day $\rightarrow$ 9,000 cycles equivalent to six months;

T_B : 12th day $\rightarrow$ 9,000 cycles equivalent to six months;

T_C : 24th day $\rightarrow$ 18,000 cycles equivalent to one year;

T_D : 36th day $\rightarrow$ 18,000 cycles equivalent to one year.

- condition 3 = T_E : 12th day $\rightarrow$ 18,000 cycles equivalent to one year;

T_F : 36th day $\rightarrow$ 36,000 cycles equivalent to two years.

The results of surface roughness (R_a , μm) and color change (ΔE) from the validation of simulated brushing were analyzed with one-way ANOVA and two-way ANOVA for repeated measures ($\alpha=.05$), respectively, using a personal software (IBM SPSS 19; SPSS Inc., IBM Company).

There was no statistically significant difference among the experimental conditions for both properties surface roughness (Figure 2) and color change in the validation of simulated brushing ($P>.05$). The ΔE results were 2.1 ± 1.4 , 3.3 ± 0.9 , and 2.6 ± 1.0 for conditions 1, 2, and 3, respectively.

Simulated brushing

For the study, the condition 2 was selected because it resulted in specimens with a surface roughness pattern similar to those of condition 1, where the brushing was done daily.

Specimens were removed from the solutions (distilled water, instant coffee, and red wine) after each immersion period (T_A , T_B , T_C , and T_D), rinsed in running water, and brushed using condition 2.

The toothbrushes were cut at the neck and fixed by screws placed on the sides and top of the support for the brush in the equipment. The correct adjustment of these screws allowed for the leveling of the appropriate brush. The brushes used had nylon bristles with uniform length,³³ flexibility, and rounded ends (Tek® 30; Johnson & Johnson do Brasil) and were quickly replaced when any deterioration or wear of the bristles was observed.³⁴⁻³⁷

The dentifrice (Colgate Total 12 Clean Mint; Colgate Palmolive) was mixed with distilled water at a ratio of 1:1 (g/mL).³⁸ This suspension was homogenized in a magnetic stirrer (model 752; Fisatom, São Paulo, SP, Brazil) for 1 min at room temperature.

The simulated brushing machine (MSEt; Marcelo Nucci ME) allowed 10 specimens to be simultaneously brushed with linear movement (forth and back). The equipment was set to brush at a rate of 370 cycles per minute and to provide 200 gf vertical load on each specimen.^{19,39} Scheduled cycles were performed on both sides of each specimen at 37°C, and 2 mL of the suspension with dentifrice were injected onto the specimens every 2 min.

Surface roughness

Specimens were removed from the distilled water (T₀) or from the brushing machine (T₁), rinsed in running water, dried with absorbent paper, and subjected to the evaluation of surface roughness (Ra, µm).

Surface roughness was analyzed with a surface roughness profilometer (Surfcorder SE 1700; Kozaka Industry) featuring a diamond stylus (tip diameter 2 µ). Three measurements were performed in the central area of each specimen at intervals of 0.8 mm and the mean reading was obtained.^{20,40} The diamond was perpendicular to the long axis of the specimen. Resolution was 0.01 µm, interval (cut-off length) was 0.8 mm, transverse length was 2.4 mm at a speed of 0.5 mm/s.⁴¹

Color stability

After the surface roughness analyses, specimens were submitted to color evaluation (T₀ and T₁ periods). The spectrophotometric reflectance technique was used by means of a Varian-Cary equipment, illuminant D-65, wavelength ranging from 380 to 700 nm, color space CIE-L*a*b*, and observer angle of 10°.²³

Color changes were expressed by the formula:

$$\Delta E = \sqrt{(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2}$$

where: ΔL^* , Δa^* and Δb^* represent the coordinates of the three reading differences (axis y, x, and z, respectively) before and after immersion in the staining solutions and brushing. The L^* parameter represents lightness ranging from 0 (black) to 100 (white); the parameters a^* and b^* reflect the chromaticity from red (+ a^*) to green (- a^*) and yellow (+ b^*) to blue (- b^*).

For this analysis, it was considered a clinically significant color change when $\Delta E_{L^*a^*b^*}$ was greater than 3.3.^{13,42} In addition, color changes were quantified by the National Bureau of Standards (NBS). The values of NBS units make it possible to convert color change data (ΔE) into values with clinical relevance:^{23,43}

$$NBS = \Delta E_{L^*a^*b^*} \times 0,92.$$

Statistical analysis

Surface roughness data were analyzed using three-way ANOVA for repeated measures followed by Bonferroni test ($\alpha=.05$). Color stability data were submitted to two-way ANOVA followed by Bonferroni test ($\alpha=.05$). *Post-hoc* Power analysis was performed for statistical analyses of all data using the personal statistical software (IBM SPSS 19).

RESULTS

For the number of specimens used to evaluate the surface roughness ($n=5$), this study had adequate power for the triple interaction "curing cycle" x "solution" x "time" for both materials (83.3%; $\alpha=.05$).

No significant difference ($P>.05$) was found among the polymerization cycles for the specimens immersed in distilled water for both materials before (T_0) and after (T_1) brushing (Table III). With immersion in coffee, Vipi Cril specimens from the M550/3 and WB groups presented the highest and lowest roughness values, respectively ($P=.008$). An increase in roughness of the specimens in the M550/3 group was found after immersion in wine ($P=.02$).

Vipi Wave specimens from the M650/5 group presented a rougher surface after immersion in coffee ($P=.02$).

For the number of specimens used to evaluate the color stability ($n=5$), this study had adequate power for the interaction "curing cycle" and "solution" for both materials (99.6%; $\alpha=.05$).

No significant difference was found among the polymerization cycles for the specimens immersed in distilled water for Vipi Wave ($P>.05$; Table IV), and Vipi Cril showed some changes ($P=.00$; Table IV). All color changes observed were not considered clinically significant, as the ΔE average values were acceptable ($\Delta E \leq 3.3$), except for in the case of the Vipi Wave cured using the manufacturer's recommended cycle (M630/25), which presented an average NBS=4.49 after immersion in red wine ($P=.02$).

DISCUSSION

The first hypothesis tested in this study, that "*different polymerization cycles result in materials with surfaces likely to increase roughness due to simulated brushing,*" was not accepted because no difference was found among the curing cycles in the roughness values of the specimens immersed in distilled water for both materials before and after brushing.

The magnitude of the surface abrasion caused by brushing depends on factors such as technique, frequency and brushing force, stiffness of the brush bristles, toothpaste abrasiveness, and hardness of denture base materials.^{17,19} All factors that can influence the results related to brushing were standardized in this study. Nylon soft and flexible bristles were used in order to prevent wear of the acrylic resin³⁴ and because they are products available and widely used by denture wearers.³⁶ The degree of abrasiveness of the dentifrice is influenced by its chemical composition, crystal structure, brittleness, solubility, concentration, hardness, size and shape of the particles, and compatibility with the other components of the

formulation.³⁶ The Colgate Total dentifrice selected for this study presents a neutral pH, has hydrated silica as an abrasive agent, and has a small diameter and regular-shape particles.³⁸ This dentifrice is classified as medium abrasiveness according to the Relative Dentin Abrasivity (RDA=70). The fact that increased roughness after the simulated brushing using this dentifrice was not observed is due to the size and shape of its particles and the presence of highly soluble silica that results in a polishing surface rather than making it rougher.^{16,36} According to Oliveira et al. (2008),⁴¹ dentifrices with these characteristics are indicated for cleaning acrylic resins.

With regard to the material, due to the fact that the composition of the acrylic resin is based on a low hardness polymer, its abrasion resistance can be changed via different polymerization methods.³⁶ In this study, no difference in roughness was found when the curing cycles were assessed without the influence of the potentially staining solutions as previously reported. Change occurred only when brushing was associated with immersion in coffee or red wine. Because the hardness has been directly related to the degree of conversion of dental polymers, it was possible to suppose that both materials presented adequate degree of conversion values. However, a better polymerization and a low residual monomer concentration could be obtained for conventionally polymerized Vipi Cril specimens, which presented the lowest roughness values after immersion in coffee, especially because a polymerization cycle including a final temperature at 100°C for at least 30 min^{1,5} was used. Also, the higher the temperature, the better the polymerization will be.¹ Spartalis et al. (2015)²⁴ measured the surface temperature of the specimens at the end of the microwave polymerization cycles analyzed in the present study, and the authors observed lower temperature values in the M650/5 and M550/3 cycles. It is possible to assume that the lower temperature associated with a shorter microwave polymerization time was responsible for the

inferior degree of conversion values, resulting in an increase in the roughness of the specimens after immersion in coffee and wine.

One limitation of this study was that the specimen polishing was not done the same clinically, which is not performed on completely flat surfaces and is highly dependent on the operator.⁴¹ This could overestimate the results of roughness and the potential for the staining of acrylic resins. However, the effect of polishing was the same for all evaluated groups.²⁹ Ideally, the lowest surface roughness is recommended for reducing microorganism retention.²¹ The surface roughness mean values of denture base acrylic resins ranging from 1.36 to 9.43 μm have been found in the literature.^{17,36,39} Once the average scores observed in this study ($R_a=1.83 \mu\text{m}$) were lower than or equal to those obtained in other studies, it is possible that the resins subjected to the evaluated polymerization cycles facilitate denture cleaning and preserve the health of the mucosa covering the residual ridge.³⁹ Although Bollen et al. (1997)²¹ suggested that no microorganism retention occurs in acrylic resin with a level of roughness lower than 0.2 μm , surface roughness is not the only factor involved in adhesion to polymers. Other factors, such as saliva film, surface energy, wettability, hydrophobicity, and electrostatic interactions, may also influence microbial retention.²⁰

According to Crispin et al. (1979),²² rougher samples had significantly more color change. In this study, the hypothesis that "*the color change of acrylic resins may be related to the roughness resulting from simulated brushing*" was discarded. As described above, there was not a considerable change in roughness that could be related to a possible color change.

According to Table IV, no significant difference was noted among Vipi Wave specimens submitted to the different cycles and immersed in distilled water, while significant differences were observed for Vipi Cril resin in the same conditions ($P=.000$; Table IV). In this study, experimental microwave polymerization cycles^{25,26} and manufacturers' recommended cycles for each acrylic resin were evaluated. It has been reported that the resin

formulated for microwave polymerization exhibits minimal color change,^{8,11} due to reduced water absorption.¹² Furthermore, the evaluated Vipi Cril resin presented lower chroma and higher translucency than did the Vipi Wave, so more color change could be expected in Vipi Cril.

However, all color changes observed in the study were not considered to be clinically significant, as the ΔE average values were acceptable ($\Delta E \leq 3.3$), with the exception of Vipi Wave cured using the manufacturer's recommended cycle presenting an average NBS=4.49 after immersion in red wine. Thus, the third hypothesis that *"red wine cause greater color change in the material regardless of the polymerization cycle that has undergone"* has been partly accepted. The evidence that the effect of wine was only observed on the group M630/25 for the Vipi Wave resin may also be related to a lower degree of conversion of the experimental microwave cycles in comparison to the evaluated conventional water-bath cycle. It has been suggested that color stability may be related to residual monomer content, so higher residual monomer content would lead to greater color change.¹¹ Other studies have shown a significant effect of wine, which caused higher resin staining after prolonged immersion than did coffee.^{23,29,30} Also, ΔE values around 10 to 12 have been observed.^{23,29} This has been related to the affinity of the dye present in red wine (tannic acid) to an acrylic resin surface.²⁹

Sorgini et al. (2012)¹⁶ highlighted the importance of how abrasive a cleaning agent must be to provide effective prosthesis cleaning once only product abrasiveness has been evaluated without any association with its cleaning ability. Only one study was found in the literature that evaluated the color change of denture base acrylic resins after brushing cycles.¹³ In that study,¹³ the authors observed ΔE values close to those observed in the current study after immersion in coffee associated with brushing using the dentifrice Colgate One (Colgate-Palmolive, Lysaker, Norway). In this study, the dentifrice probably enhanced the mechanical

cleaning action of the brush due to its abrasive components and detergents, silica and sodium lauryl sulfate, respectively. In addition, the uniform length of the flexible bristles allowed for a higher contact area to the resin surface, promoting more effective cleaning.³³ An important limitation of the study was the lack of biofilm on the surface of the acrylic resins before immersion in the potentially staining solutions,²⁹ once the biofilm acts as a matrix for addition of colorants.¹⁸ However, the results of a previous study¹⁹ showed that brushing cycles were able to remove *Candida albicans* that had adhered to the surface of conventional heat-cured acrylic resin disks, and the authors attributed this to the action of the mechanical cleaning of silica particles and the antimicrobial effect of the triclosan agent present in the dentifrice composition of Colgate Total dentifrice, which was also used in this study.

CONCLUSIONS

The beverages coffee and red wine along with simulated brushing slightly changed the roughness of the Vipi Cril and Vipi Wave materials cured using the conventional and experimental microwave cycles. With the exception of Vipi Wave resin cured using the manufacturer's recommended microwave cycle, potentially staining beverages did not result in clinically relevant color changes after simulated brushing.

REFERENCES

1. Urban VM, Machado AL, Oliveira RV, Vergani CE, Pavarina AC, Cass QB. Residual monomer of reline acrylic resins. Effect of water-bath and microwave post-polymerization treatments. *Dent Mater* 2007;23:363-8.
2. Bartoloni JA, Murchison DF, Wofford DT, Sarkar NK. Degree of conversion in denture base materials for varied polymerization techniques. *J Oral Rehabil* 2000;27:488-93.
3. Blagojevic V, Murphy VM. Microwave polymerization of denture base materials. A comparative study. *J Oral Rehabil* 1999;26:804-8.
4. 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.
5. 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.
6. De Clerck JP. Microwave polymerization of acrylic resins used in dental prostheses. *J Prosthet Dent* 1987;57:650-8.
7. Wallace PW, Graser GN, Myers ML, Proskin HM. Dimensional accuracy of denture resin cured by microwave energy. *J Prosthet Dent* 1991;66:403-8.
8. Kimura H, Teraoka F, Ohnishi H, Saito T, Yato M. Applications of microwave for dental technique (part 1). Dough-forming and curing of acrylic resins. *J Osaka Univ Dent Sch* 1983;23:43-9.
9. Gettleman L, Nathanson D, Myerson RL. Effect of rapid curing procedures on polymer implant materials. *J Prosthet Dent* 1977;37:74-82.
10. Bafile M, Graser GN, Myers ML, Li EK. Porosity of denture resin cured by microwave energy. *J Prosthet Dent* 1991;66:269-74.

11. May KB, Razzoog ME, Koran A, 3rd, Robinson E. Denture base resins: comparison study of color stability. *J Prosthet Dent* 1992;68:78-82.
12. Keyf F, Etikan I. Evaluation of gloss changes of two denture acrylic resin materials in four different beverages. *Dent Mater* 2004;20:244-51.
13. Buyukyilmaz S, Ruyter IE. Color stability of denture base polymers. *Int J Prosthodont* 1994;7:372-82.
14. Dhir G, Berzins DW, Dhuru VB, Periathamby AR, Dentino A. Physical properties of denture base resins potentially resistant to *Candida* adhesion. *J Prosthodont* 2007;16:465-72.
15. Coelho CM, Sousa YT, Dare AM. Denture-related oral mucosal lesions in a Brazilian school of dentistry. *J Oral Rehabil* 2004;31:135-9.
16. Sorgini DB, Silva-Lovato CH, de Souza RF, Davi LR, Paranhos Hde F. Abrasiveness of conventional and specific denture-cleansing dentifrices. *Braz Dent J* 2012;23:154-9.
17. Richmond R, Macfarlane TV, McCord JF. An evaluation of the surface changes in PMMA biomaterial formulations as a result of toothbrush/dentifrice abrasion. *Dent Mater* 2004;20:124-32.
18. Jagger DC, Al-Akhazam L, Harrison A, Rees JS. The effectiveness of seven denture cleansers on tea stain removal from PMMA acrylic resin. *Int J Prosthodont* 2002;15:549-52.
19. Harrison Z, Johnson A, Douglas CW. An in vitro study into the effect of a limited range of denture cleaners on surface roughness and removal of *Candida albicans* from conventional heat-cured acrylic resin denture base material. *J Oral Rehabil* 2004;31:460-7.
20. Verran J, Maryan CJ. Retention of *Candida albicans* on acrylic resin and silicone of different surface topography. *J Prosthet Dent* 1997;77:535-9.
21. Bollen CM, Lambrechts P, Quirynen M. Comparison of surface roughness of oral hard materials to the threshold surface roughness for bacterial plaque retention: a review of the literature. *Dent Mater* 1997;13:258-69.

22. Crispin BJ, Caputo AA. Color stability of temporary restorative materials. *J Prosthet Dent* 1979;42:27-33.
23. Sepulveda-Navarro WF, Arana-Correa BE, Borges CP, Jorge JH, Urban VM, Campanha NH. Color stability of resins and nylon as denture base material in beverages. *J Prosthodont* 2011;20:632-8.
24. Spartalís GK, Cappelletti LK, Schoeffel AC, Michél MD, Pegoraro TA, Arrais CAG, et al. Effect of conventional water-bath and experimental microwave polymerization cycles on the flexural properties of denture base acrylic resins. *Dent Mater J* 2015;34:623-8.
25. Patil PS, Chowdhary R, Mandokar RB. Effect of microwave postpolymerization treatment on residual monomer content and the flexural strength of autopolymerizing relined resin. *Indian J Dent Res* 2009;20:293-7.
26. Ilbay SG, Guvener S, Alkumru HN. Processing dentures using a microwave technique. *J Oral Rehabil* 1994;21:103-9.
27. ISO. International Organization for Standardization. Specification 1567: denture base polymers. Switzerland: ISO; 2001.
28. Sham AS, Chu FC, Chai J, Chow TW. Color stability of provisional prosthodontic materials. *J Prosthet Dent* 2004;91:447-52.
29. Regis RR, Zanini AP, Della Vecchia MP, Silva-Lovato CH, Oliveira Paranhos HF, de Souza RF. Physical properties of an acrylic resin after incorporation of an antimicrobial monomer. *J Prosthodont* 2011;20:372-9.
30. Guler AU, Yilmaz F, Kulunk T, Guler E, Kurt S. Effects of different drinks on stainability of resin composite provisional restorative materials. *J Prosthet Dent* 2005;94:118-24.
31. Murray ID, McCabe JF, Storer R. Abrasivity of denture cleaning pastes in vitro and in situ. *Br Dent J* 1986;161:137-41.

32. de Freitas KM, Paranhos HF. Weight loss of five commercially available denture teeth after toothbrushing with three different dentifrices. *J Appl Oral Sci* 2006;14:242-6.
33. Dyer D, MacDonald E, Newcombe RG, Scratcher C, Ley F, Addy M. Abrasion and stain removal by different manual toothbrushes and brush actions: studies in vitro. *J Clin Periodontol* 2001;28:121-7.
34. Harte DB, Manly RS. Four variables affecting magnitude of dentrifice abrasiveness. *J Dent Res* 1976;55:322-7.
35. Harrington E, Jones PA, Fisher SE, Wilson HJ. Toothbrush-dentifrice abrasion. A suggested standard method. *Br Dent J* 1982;153:135-8.
36. Pisani MX, Bruhn JP, Paranhos HF, Silva-Lovato CH, de Souza RF, Panzeri H. Evaluation of the abrasiveness of dentifrices for complete dentures. *J Prosthodont* 2010;19:369-73.
37. ISO. International Organization for Standardization. Specification 8627: stiffness of the tufted area of toothbrushes. Switzerland: ISO; 1987.
38. Pascaretti-Grizon F, Mabilieu G, Chappard D. Abrasion of 6 dentifrices measured by vertical scanning interference microscopy. *J Appl Oral Sci* 2013;21:475-81.
39. Izumida FE, Ribeiro RC, Giampaolo ET, Machado AL, Pavarina AC, Vergani CE. Effect of microwave disinfection on the surface roughness of three denture base resins after tooth brushing. *Gerodontology* 2011;28:277-82.
40. Moura JS, da Silva WJ, Pereira T, Del Bel Cury AA, Rodrigues Garcia RC. Influence of acrylic resin polymerization methods and saliva on the adherence of four *Candida* species. *J Prosthet Dent* 2006;96:205-11.
41. Oliveira LV, Mesquita MF, Henriques GE, Consani RL, Fragoso WS. Effect of polishing technique and brushing on surface roughness of acrylic resins. *J Prosthodont* 2008;17:308-11.

42. Ruyter IE, Nilner K, Moller B. Color stability of dental composite resin materials for crown and bridge veneers. *Dent Mater* 1987;3:246-51.
43. Hong G, Murata H, Li Y, Sadamori S, Hamada T. Influence of denture cleansers on the color stability of three types of denture base acrylic resin. *J Prosthet Dent* 2009;101:205-13.

Table I. Denture base acrylic resins used in this study

Material (acronym)	Type	Composition† (batch)		Powder/liquid ratio	Manufacturer
		Powder	Liquid		
Vipi Cril® (VC)	Conventional	PMMA, benzoyl peroxide, pigments (00773)	MMA, EGDMA, inhibitor (32144)	2.15 g/1 mL	Vipi Ltda., Pirassununga, SP, Brazil
Vipi Wave® (VW)	Microwaved- processed	PMMA, benzoyl peroxide, pigments (12041)	MMA, EGDMA, inhibitor (33576)	2.15 g/1 mL	Vipi Ltda., Pirassununga, SP, Brazil

PMMA: polymethyl methacrylate; MMA: methyl methacrylate; EGDMA: ethylene glycol dimethacrylate.

† According to the MSDS provided by the manufacturer.

Table II. Experimental polymerization cycles evaluated in this study

Group	Polymerization cycle	Reference
WB (water-bath – conventional polymerization)	• immerse the flask in cold water; • heat water up to 65°C during 30 min and maintain for 1 h • heat water until boiling point during 30 min and maintain for 1 h; • turn off the water-bath and let cool down	Manufacturer's recommended cycle to cure VC resin
M630/25	270 W for 10 min 0 W for 5 min 360 W for 10 min	Manufacturer's recommended cycle to cure VW resin
M550/3	550 W for 3 min	Ilbay et al ²⁶
M650/5	650 W for 5 min	Patil et al ²⁵

Table III. Roughness (Ra, μm), standard deviation, and statistical significance for acrylic resins after immersion in staining drinks followed by simulated brushing

Material	Polymerization cycles	Distilled water		Coffee		Red wine	
		T ₀	T ₁	T ₀	T ₁	T ₀	T ₁
Vipi Cril	WB	2.01 (0.62) Aa	2.19 (0.43) Aa	1.63 (0.69) Aa	1.22 (0.58) Ba	1.10 (0.35) Aa	1.43 (0.44) Aa
	M630/25	2.41 (0.94) Aa	2.35 (0.37) Aa	3.14 (1.06) Aa	2.15 (0.84) ABa	0.82 (0.78) Aa	1.28 (0.55) Aa
	M550/3	2.16 (0.39) Aa	1.73 (0.44) Aa	2.57 (1.80) Aa	2.33 (0.72) Aa	0.77 (0.88) Ab	1.75 (0.32) Aa
	M650/5	1.78 (0.70) Aa	1.58 (0.53) Aa	1.73 (1.26) Aa	1.82 (0.68) ABa	1.96 (1.09) Aa	1.34 (0.38) Aa
Vipi Wave	WB	2.09 (0.40) Aa	2.36 (0.45) Aa	2.10 (1.37) Aa	1.66 (0.84) Aa	1.10 (0.51) Aa	1.70 (0.30) Aa
	M630/25	3.01 (0.82) Aa	2.35 (0.76) Aa	1.91 (1.29) Aa	1.63 (0.89) Aa	1.61 (0.59) Aa	1.67 (0.19) Aa
	M550/3	2.02 (0.30) Aa	1.87 (0.22) Aa	2.12 (1.12) Aa	2.06 (0.83) Aa	2.05 (1.23) Aa	1.60 (0.48) Aa
	M650/5	2.20 (0.65) Aa	1.41 (0.29) Ab	0.93 (0.91) Bb	1.57 (0.59) Aa	1.92 (0.70) Aa	1.66 (0.86) Aa

Means followed by different letters (lowercase: within row for each solution; uppercase: within column for each material) are significantly different at $\alpha=0.05$.

Table IV. ΔE values, standard deviation, and statistical significance for acrylic resins after immersion in staining drinks followed by simulated brushing

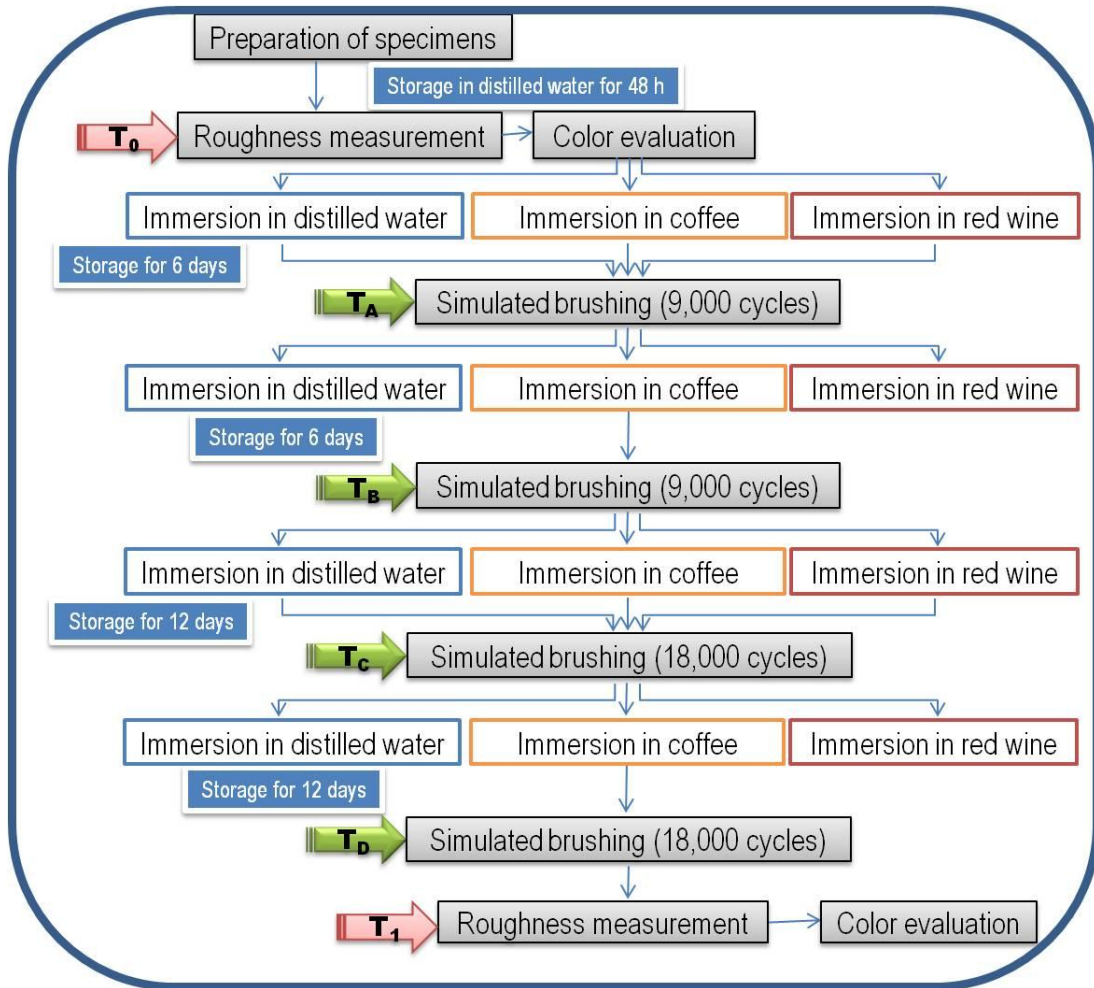
Material	Polymerization cycles	Distilled water	Coffee	Red wine
Vipi Cril	WB	3.15 (1.33) Aa	3.04 (0.47) Aa	2.02 (0.18) Aa
	M630/25	1.06 (0.54) Bb	1.18 (0.77) Bb	2.19 (0.31) Aa
	M550/3	0.96 (0.65) Bb	2.42 (1.47) ABa	1.84 (0.22) Aa
	M650/5	3.33 (1.06) Aa	1.90 (0.96) ABb	2.12 (0.23) Aab
Vipi Wave	WB	0.86 (0.48) Aa	2.33 (0.85) Aa	2.33 (0.64) ABa
	M630/25	1.70 (1.43) Ab	1.71 (1.09) Ab	4.88 (0.97) Aa
	M550/3	2.39 (2.51) Aa	2.63 (2.40) Aa	3.10 (3.44) Ba
	M650/5	1.98 (1.16) Aa	1.78 (1.19) Aa	2.34 (0.69) ABa

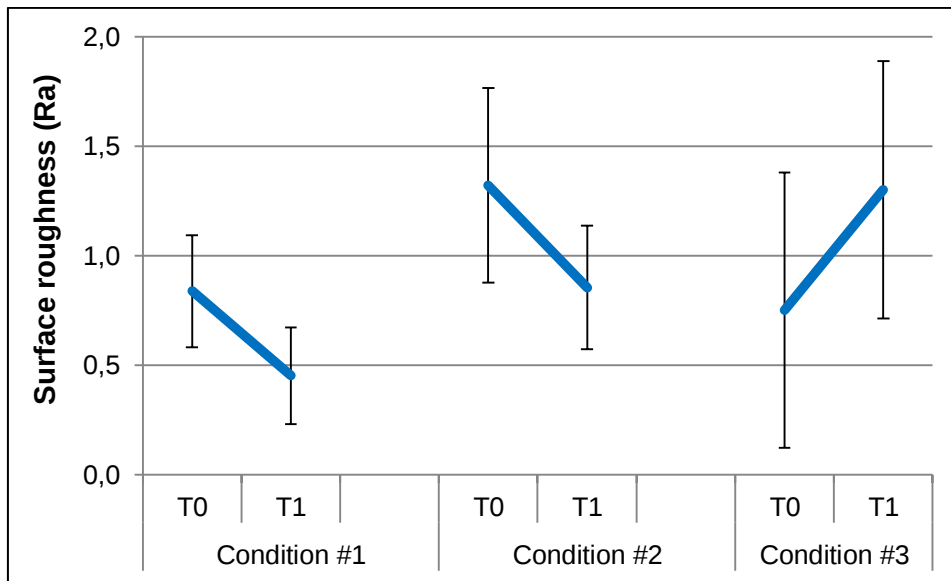
Means followed by different letters (lowercase: within row; uppercase: within column for each material) are significantly different at $\alpha=0.05$.

Figure legends

Figure 1 - Flowchart representing the experimental design of this study

Figure 2 - Mean and standard deviation surface roughness (Ra, μm) of VC resin specimens in the validation of simulated brushing







Print View—603289 (/receipt.asp?nDocid=603610)

THANK YOU FOR YOUR ORDER!

Cesar Arrais

R OLEGARIO MARIANO 399 AP 11, NEVES
 PONTA GROSSA, Parana 84020-420
 Brazil

Papercheck, LLC

666 Natoma Street,
 San Francisco, CA 94103
 USA

Submitted Document: Manuscript_for_paper_check_1453278772.docx**Document ID:** 603289**Submitted:** 1/20/2016 8:35:11 AM**Returned:** 1/21/2016 11:56:15 PM**Pickup:** 1/23/2016 10:50:00 AM**Page Count:** 13.353**Word Count:** 4006**Priority:** Standard (72-hour turnaround time) \$ 6.95 per page**Writing Style:** Leave The Format As It Is**Editing Style:** Executive**English Type:** US English**PaperTomb Charge:** \$0.00**SMS Charge:** \$1.00**Non-Standard Style Charge:** \$0.00**Document Editing Charge:** \$92.80

5 DISCUSSÃO

Apesar de Bafile et al. (1991)⁴¹ especularem que resinas formuladas para polimerização em micro-ondas pudessem conter outros monômeros agentes de ligação cruzada como o trietileno ou o tetraetilenoglicol dimetacrilato em sua composição, a análise por espectroscopia infravermelha por Transformada de Fourier do pó e do líquido das resinas acrílicas Vipi Cril e Vipi Wave demonstrou uma semelhança na composição desses materiais. Isto também pode ser constatado nas informações fornecidas pelo próprio fabricante que comercializa estes produtos similares para polimerizações diversas.

A análise de conversão destes materiais mostrou que ambos apresentaram cinéticas de polimerização química previamente aos ciclos de polimerização com valores finais semelhantes, embora a resina Vipi Cril tenha apresentado uma conversão inicial mais rápida. Essa diferença pode estar relacionada à presença de uma maior concentração do agente etilenoglicol dimetacrilato em sua composição se comparada à resina Vipi Wave, uma vez que existe uma correlação entre concentrações aumentadas de agentes de ligação cruzada e maiores valores de resistência à flexão e módulo de elasticidade⁹ e a resina Vipi Cril apresentou valores superiores à resina Vipi Wave em estudo anterior que avaliou os mesmos ciclos de polimerização testados na presente investigação.⁷⁶

Ambas as resinas apresentaram efeito não citotóxico às células 3T3. Outros estudos compararam resinas termopolimerizáveis convencionais com resinas para micro-ondas e também não observaram diferenças significantes após 24 h e, neste período, todos os materiais foram classificados como não-citotóxicos.^{60,77,78} Jorge et al. (2004)⁷⁷ associaram seus resultados de citotoxicidade sem diferença entre resinas termopolimerizáveis convencionais e para micro-ondas à possibilidade de ambas terem atingido graus de conversão adequados. Chaves et al. (2012),⁷⁹ em uma revisão sistemática da literatura, concluíram que as resinas acrílicas termopolimerizáveis para base de prótese causam baixa morte celular⁸⁰ e, geralmente, não são encontradas diferenças significantes de citotoxicidade entre marcas comerciais.^{58,77,78,80} No presente estudo, também foram observados alguns valores de viabilidade celular acima de 100% e, portanto, maiores que o controle positivo. Efeitos similares também foram descritos previamente na literatura.⁸¹ Esses

resultados podem indicar que os eluatos apresentam uma baixíssima toxicidade e que, em um primeiro momento, poderiam estimular o crescimento celular.

Não houve diferença entre os materiais para os resultados de porosidade e sorção de água e solubilidade e isto foi associado à composição similar das resinas acrílicas. Além disso, outros estudos^{39-41,82} também não encontraram diferenças nos valores de porosidade quando foram utilizados corpos de prova com espessuras em torno de 3 mm polimerizados em diversos ciclos. Ainda, Yannikakis et al. (2002)⁴⁷ relataram ser possível polimerizar seguramente uma resina termopolimerizável convencional em micro-ondas quando sua espessura for igual ou inferior a 3 mm, uma vez que esta espessura é representativa de dimensões comumente utilizadas para confecção de base de próteses.⁴⁷

A resistência à abrasão dos polímeros de baixa dureza utilizados para bases de próteses também pode ser afetada pela utilização de diferentes ciclos de polimerização.⁸³ Como não houve diferença significativa entre os valores de rugosidade quando os corpos de prova submetidos aos diferentes ciclos de polimerização foram imersos apenas em água destilada, também foi sugerido que ambos os materiais tenham atingido valores adequados de grau de conversão.

Quando analisado o efeito dos ciclos de polimerização, não foi observada diferença entre as resinas acrílicas Vipi Cril e Vipi Wave polimerizadas convencionalmente em banho de água e valores superiores de grau de conversão foram observados. Tem sido relatado que quanto mais elevada for a temperatura do banho de água, melhor será a polimerização e menor a concentração de monômero residual,^{1,84} principalmente quando são utilizados ciclos que incluem uma temperatura final a 100°C por pelo menos 30 min.^{1,85-87} Neste estudo, foi avaliado o ciclo em banho de água recomendado pelo fabricante que incluía ao final um período de 1 h em ebulição, o qual não resultou em efeitos citotóxicos quando utilizado para processar ambas as resinas. Os valores mais altos de sorção de água observados no grupo de polimerização convencional também foram relacionados a um conteúdo mais baixo de monômero residual^{16,88} e a um mais alto grau de conversão. Estes resultados foram associados ao aumento da temperatura de polimerização ao final do ciclo em banho de água que resulta em uma maior mobilidade das cadeias moleculares, facilitando a conversão de monômero em polímero.⁸⁹

Apesar disso, ambas as resinas polimerizadas em ciclos mais curtos em micro-ondas também apresentaram valores de conversão sem diferença significativa do ciclo convencional em banho de água. Uma possível explicação está relacionada à alta frequência de mobilidade das moléculas de monômero no interior da massa polimérica durante a polimerização, causando um rápido aquecimento interno e, conseqüentemente, resultando na conversão mais rápida do monômero em polímero.³¹ Temperaturas mais altas usualmente favorecem uma conversão mais rápida, uma vez que a constante de propagação e o coeficiente de difusão aumentam com a temperatura. Entretanto, um aumento muito rápido como ocorre durante a irradiação em micro-ondas pode afetar a qualidade do polímero resultando em cadeias de peso molecular mais baixo ou ainda degradando os polímeros.⁹⁰

Os valores mais baixos de conversão observados foram apresentados pela resina Vipi Wave quando polimerizada utilizando o ciclo em micro-ondas recomendado pelo próprio fabricante (M630/25). Ainda, as alterações de cor observadas neste estudo não foram consideradas clinicamente significantes, uma vez que os valores médios de ΔE foram aceitáveis ($\leq 3,3$), exceto para a resina Vipi Wave polimerizada no ciclo M630/25 e, na sequência, imersa em vinho tinto. Um ciclo mais longo em micro-ondas teoricamente gera uma maior energia, porém, durante os 5 min de pausa antes da reprogramação do forno para o segundo estágio do ciclo, uma diminuição dos níveis de energia das moléculas excitadas pode ser esperada.⁴⁷ A evidência de que o efeito do vinho foi observado apenas para o grupo M630/25 para a resina Vipi Wave poderia, portanto, estar relacionada a um grau de conversão mais baixo em comparação com o ciclo convencional. Isto porque quanto maior o conteúdo de monômero residual, maior poderá ser a alteração de cor.⁴⁴ Este fato em associação à possibilidade da resina Vipi Wave apresentar uma menor quantidade de agentes de ligação cruzada como mencionado anteriormente podem explicar uma menor conversão neste ciclo em comparação com a resina Vipi Cril.

Quanto maior a temperatura, melhor será a polimerização do material.¹ Spartalis et al. (2015)⁷⁶ mensuraram a temperatura superficial dos corpos de prova ao final dos ciclos de polimerização em micro-ondas também avaliados na presente investigação. Foram observados valores mais baixos de temperatura ao final dos ciclos M650/5 e M550/3. É possível supor que uma temperatura mais baixa associada a um tempo mais curto de polimerização em micro-ondas seja

responsável por valores inferiores de grau de conversão em relação ao ciclo convencional em banho de água. Isto explicaria os resultados mais baixos de sorção de água observados nos ciclos M550/3 e M650/5 e aos mais altos valores de solubilidade encontrados no ciclo M550/3. Além disso, nestes ciclos, também foi observado aumento da rugosidade nos corpos de prova após imersão em café ou vinho tinto.

Apesar das diferenças observadas nas propriedades avaliadas, o valor médio de grau de conversão obtido para as resinas acrílicas nos grupos experimentais em estudo foi de, aproximadamente, 78,7% e este valor é próximo das porcentagens que têm sido observadas nos estudos, inclusive para resinas de base polimerizadas em ciclos mais longos.⁵⁴ Não foram observados poros e bolhas visíveis e todos os valores médios foram inferiores a 1,52%. De acordo com as especificações da *American Dental Association*,⁹¹ não deve haver bolhas ou espaços vazios no polímero para base de prótese quando observado sem magnificação. Além disso, segundo Singh et al. (2013), níveis de porosidade inferiores a 11% podem ser considerados aceitáveis clinicamente. Os valores médios de sorção de água encontrados foram entre 2,17% e 2,43%. Estes valores foram considerados apropriados uma vez que a resina acrílica inicialmente dessecada torna-se saturada após sorção de aproximadamente 2% de água.⁹² Os valores de solubilidade obtidos (entre 0,0065% e 0,4715%) estavam dentro da faixa de valores observada em outra investigação (entre -0,417% e 0,815%) que avaliou o efeito do polimento químico ou mecânico sobre a solubilidade da resina Vipi Cril.⁹³ Valores médios de rugosidade de superfície de resinas para bases de prótese entre 1,36 a 9,43 μm têm sido encontrados na literatura.^{74,83,94,95} Uma vez que os resultados médios observados neste estudo ($R_a=1,83 \mu\text{m}$) foram inferiores ou iguais aos obtidos em outros estudos, é possível que as resinas submetidas aos ciclos de polimerização experimentais avaliados facilitem a higienização das próteses e preservem a saúde da fibromucosa que recobre o rebordo residual.⁷⁴ Todas as alterações de cor observadas não foram consideradas clinicamente significantes, uma vez que os valores médios de ΔE foram inferiores a 3,3, exceto para a resina Vipi Wave polimerizada no ciclo M630/25 e imersa em vinho tinto ($\Delta E=4,88$), como ressaltado previamente. Entretanto, outros estudos que avaliaram alteração de cor de resinas acrílicas para base de prótese, porém não submeteram os corpos de

prova à escovação simulada, verificaram um efeito significativo do vinho tinto e valores de ΔE em torno de 10 a 12 foram observados.^{66,68}

Portanto, deve ser ressaltado ser possível polimerizar a resina acrílica termopolimerizável convencional Vipi Cril em ciclos curtos em micro-ondas e obter valores de conversão adequados e sem diferença do ciclo em banho de água. Ilbay et al. (1994)⁴⁰ também concluíram que o método de polimerização em micro-ondas poderia ser aplicado também para resinas acrílicas convencionais sem prejuízo às suas propriedades. Tendo em vista as vantagens da polimerização em micro-ondas como, principalmente, a grande redução no tempo de execução,^{31,33} e devido à difícil disponibilidade e custo mais alto do material formulado especialmente para polimerização em micro-ondas, a polimerização alternativa desta resina traria alguns benefícios.

Avaliando conjuntamente os resultados dos testes realizados, julgou-se como melhor condição experimental a polimerização em micro-ondas a 650 W por 5 min da resina acrílica termopolimerizável convencional Vipi Cril pela relação de valor custo-benefício. Testes in vitro proporcionam informação importante sobre o comportamento dos materiais em um ambiente laboratorial controlado. Apesar disso, as próteses estão sujeitas a vários outros fatores no meio oral⁹⁶ e, dessa forma, os resultados deste estudo in vitro não podem ser extrapolados para situações clínicas, sendo necessários estudos in vivo.

6 CONCLUSÕES

Dentro das limitações deste estudo *in vitro*, pode ser concluído que:

1. A melhor condição experimental pela relação custo-benefício foi a polimerização da resina Vipi Cril em micro-ondas a 650 W por 5 min.
2. Existe uma semelhança entre as composições químicas das resinas Vipi Cril e Vipi Wave;
3. A resina Vipi Cril polimerizada em micro-ondas apresentou valores de conversão semelhantes aos obtidos no ciclo convencional;
4. A resina Vipi Wave apresentou valores mais baixos de conversão quando polimerizada utilizando o ciclo em micro-ondas recomendado para seu processamento e os valores mais altos foram observados quando este material foi polimerizado convencionalmente;
5. A ativação química das resinas Vipi Cril e Vipi Wave resultou em valores de conversão próximos a 36% e a polimerização final pelos ciclos possibilitou que os materiais atingissem valores de conversão em torno de 78,7%;
6. Não houve diferença entre as resinas Vipi Cril e Vipi Wave e os ciclos de polimerização avaliados e todas as condições resultaram em efeitos não citotóxicos às células 3T3, em ambas as análises MTT e Vermelho neutro;
7. Não houve diferença entre as resinas Vipi Cril e Vipi Wave para as propriedades de porosidade, sorção de água e solubilidade;
8. Os ciclos mais curtos de polimerização em micro-ondas puderam ser utilizados para ambas as resinas Vipi Cril e Vipi Wave sem que houvesse um aumento do volume detectável de porosidade;
9. Os valores mais baixos de sorção de água e os mais altos de solubilidade foram detectados utilizando a polimerização em micro-ondas a 550 W por 3 min;
10. As soluções de imersão café e vinho tinto e a escovação simulada pouco alteraram a rugosidade das resinas acrílicas Vipi Cril e Vipi Wave polimerizadas utilizando os ciclos convencional e experimentais em micro-ondas;

11. As soluções potencialmente corantes não resultaram em alterações de cor clinicamente relevantes nas resinas Vipi Cril e Vipi Wave após período de escovação simulada.

REFERÊNCIAS

1. Urban VM, Machado AL, Oliveira RV, Vergani CE, Pavarina AC, Cass QB. Residual monomer of reline acrylic resins. Effect of water-bath and microwave post-polymerization treatments. *Dent Mater*. 2007 Mar;23(3):363-8.
2. Anusavice KJ. Phillips' Science of Dental Materials. 11 ed. Philadelphia: W. B. Saunders; 2003.
3. Austin AT, Basker RM. Residual monomer levels in denture bases. The effects of varying short curing cycles. *Br Dent J*. 1982 Dec 21;153(12):424-6.
4. 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(1):17-23.
5. 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 Mar;44(1):25-30.
6. Lee SY, Lai YL, Hsu TS. Influence of polymerization conditions on monomer elution and microhardness of autopolymerized polymethyl methacrylate resin. *Eur J Oral Sci*. 2002 Apr;110(2):179-83.
7. Lamb DJ, Ellis B, Priestley D. The effects of process variables on levels of residual monomer in autopolymerizing dental acrylic resin. *J Dent*. 1983 Mar;11(1):80-8.
8. 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 Sep;31(7):463-8.
9. Arima T, Hamada T, McCabe JF. The effects of cross-linking agents on some properties of HEMA-based resins. *J Dent Res*. 1995 Sep;74(9):1597-601.
10. 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 Jul;23(7):476-80.
11. Stafford GD, Bates JF, Huggett R, Handley RW. A review of the properties of some denture base polymers. *J Dent*. 1980 Dec;8(4):292-306.
12. 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 Nov;21(6):641-8.

13. Dogan A, Bek B, Cevik NN, Usanmaz A. The effect of preparation conditions of acrylic denture base materials on the level of residual monomer, mechanical properties and water absorption. *J Dent*. 1995 Oct;23(5):313-8.
14. Blagojevic V, Murphy VM. Microwave polymerization of denture base materials. A comparative study. *J Oral Rehabil*. 1999 Oct;26(10):804-8.
15. Fujii K. Fatigue properties of acrylic denture base resins. *Dent Mater J*. 1989 Dec;8(2):243-59.
16. Cucci AL, Vergani CE, Giampaolo ET, Afonso MC. Water sorption, solubility, and bond strength of two autopolymerizing acrylic resins and one heat-polymerizing acrylic resin. *J Prosthet Dent*. 1998 Oct;80(4):434-8.
17. Dixon DL, Breeding LC, Ekstrand KG. Linear dimensional variability of three denture base resins after processing and in water storage. *J Prosthet Dent*. 1992 Jul;68(1):196-200.
18. Salim N, Satterthwaite J, Rautemaa R, Silikas N. Impregnation with antimicrobials has an impact on degree of conversion and colour stability of acrylic liner. *Dent Mater J*. 2012 31(6):1008-13.
19. Ruyter IE, Oysaed H. Conversion in denture base polymers. *J Biomed Mater Res*. 1982 Sep;16(5):741-54.
20. Duray SJ, Gilbert JL, Lautenschlager EP. Comparison of chemical analysis of residual monomer in a chemical-cured dental acrylic material to an FTIR method. *Dent Mater*. 1997 Jul;13(4):240-5.
21. Bartoloni JA, Murchison DF, Wofford DT, Sarkar NK. Degree of conversion in denture base materials for varied polymerization techniques. *J Oral Rehabil*. 2000 Jun;27(6):488-93.
22. Urban VM, Machado AL, Vergani CE, Giampaolo ET, Pavarina AC, de Almeida FG, et al. Effect of water-bath post-polymerization on the mechanical properties, degree of conversion, and leaching of residual compounds of hard chairside reline resins. *Dent Mater*. 2009 May;25(5):662-71.
23. Lefebvre CA, Knoernschild KL, Schuster GS. Cytotoxicity of eluates from light-polymerized denture base resins. *J Prosthet Dent*. 1994 Dec;72(6):644-50.
24. Lewis BB. Formaldehyde in dentistry. *J Am Dent Assoc*. 1993 Sep;124(9):14, 6.
25. Urban VM, Machado AL, Vergani CE, Giampaolo ET, Pavarina AC, Cass QB. Leachability of degradation products from hard chairside reline resins in artificial

- saliva: Effect of water-bath post-polymerization treatment. *J Appl Polym Sci.* 2012 123(2):732-9.
26. 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 Dec;31(12):1165-72.
 27. Bohnenkamp DM. Traumatic stomatitis following an intraoral denture reline: a clinical report. *J Prosthet Dent.* 1996 Aug;76(2):113-4.
 28. Kallus T. Evaluation of the toxicity of denture base polymers after subcutaneous implantation in guinea pigs. *J Prosthet Dent.* 1984 Jul;52(1):126-34.
 29. Weaver RE, Goebel WM. Reactions to acrylic resin dental prostheses. *J Prosthet Dent.* 1980 Feb;43(2):138-42.
 30. Singh S, Palaskar JN, Mittal S. Comparative evaluation of surface porosities in conventional heat polymerized acrylic resin cured by water bath and microwave energy with microwavable acrylic resin cured by microwave energy. *Contemp Clin Dent.* 2013 Apr;4(2):147-51.
 31. De Clerck JP. Microwave polymerization of acrylic resins used in dental prostheses. *J Prosthet Dent.* 1987 May;57(5):650-8.
 32. Bindo MJ, Nakamae AE, Santos Lde B, Ishikawa KH, Guarnieri Tde C, Tamaki R. Study of the surface hardness and modulus of elasticity of conventional and microwave-cured acrylic resins. *Braz Oral Res.* 2009 Jan-Mar;23(1):68-75.
 33. Hayden WJ. Flexural strength of microwave-cured denture baseplates. *Gen Dent.* 1986 Sep-Oct;34(5):367-71.
 34. Sanders JL, Levin B, Reitz PV. Porosity in denture acrylic resins cured by microwave energy. *Quintessence Int.* 1987 Jul;18(7):453-6.
 35. Wallace PW, Graser GN, Myers ML, Proskin HM. Dimensional accuracy of denture resin cured by microwave energy. *J Prosthet Dent.* 1991 Sep;66(3):403-8.
 36. Kimura H, Teraoka F, Ohnishi H, Saito T, Yato M. Applications of microwave for dental technique (part 1). Dough-forming and curing of acrylic resins. *J Osaka Univ Dent Sch.* 1983 Dec;23:43-9.
 37. Gettleman L, Nathanson D, Myerson RL. Effect of rapid curing procedures on polymer implant materials. *J Prosthet Dent.* 1977 Jan;37(1):74-82.

38. Takamata T, Setcos JC, Phillips RW, Boone ME. Adaptation of acrylic resin dentures as influenced by the activation mode of polymerization. *J Am Dent Assoc.* 1989 Aug;119(2):271-6.
39. Reitz PV, Sanders JL, Levin B. The curing of denture acrylic resins by microwave energy. Physical properties. *Quintessence Int.* 1985 Aug;16(8):547-51.
40. Ilbay SG, Guvener S, Alkumru HN. Processing dentures using a microwave technique. *J Oral Rehabil.* 1994 Jan;21(1):103-9.
41. Bafile M, Graser GN, Myers ML, Li EK. Porosity of denture resin cured by microwave energy. *J Prosthet Dent.* 1991 Aug;66(2):269-74.
42. Alkhatib MB, Goodacre CJ, Swartz ML, Munoz-Viveros CA, Andres CJ. Comparison of microwave-polymerized denture base resins. *Int J Prosthodont.* 1990 May-Jun;3(3):249-55.
43. Wolfaardt JF, Cleaton-Jones P, Fatti P. The occurrence of porosity in a heat-cured poly (methyl methacrylate) denture base resin. *J Prosthet Dent.* 1986 Mar;55(3):393-400.
44. May KB, Razzoog ME, Koran A, 3rd, Robinson E. Denture base resins: comparison study of color stability. *J Prosthet Dent.* 1992 Jul;68(1):78-82.
45. Keyf F, Etikan I. Evaluation of gloss changes of two denture acrylic resin materials in four different beverages. *Dent Mater.* 2004 Mar;20(3):244-51.
46. Dhir G, Berzins DW, Dhuru VB, Periathamby AR, Dentino A. Physical properties of denture base resins potentially resistant to *Candida* adhesion. *J Prosthodont.* 2007 Nov-Dec;16(6):465-72.
47. Yannikakis S, Zissis A, Polyzois G, Andreopoulos A. Evaluation of porosity in microwave-processed acrylic resin using a photographic method. *J Prosthet Dent.* 2002 Jun;87(6):613-9.
48. Coelho CM, Sousa YT, Dare AM. Denture-related oral mucosal lesions in a Brazilian school of dentistry. *J Oral Rehabil.* 2004 Feb;31(2):135-9.
49. Harrison Z, Johnson A, Douglas CW. An in vitro study into the effect of a limited range of denture cleaners on surface roughness and removal of *Candida albicans* from conventional heat-cured acrylic resin denture base material. *J Oral Rehabil.* 2004 May;31(5):460-7.
50. Verran J, Maryan CJ. Retention of *Candida albicans* on acrylic resin and silicone of different surface topography. *J Prosthet Dent.* 1997 May;77(5):535-9.

51. Patil PS, Chowdhary R, Mandokar RB. Effect of microwave postpolymerization treatment on residual monomer content and the flexural strength of autopolymerizing reline resin. *Indian J Dent Res.* 2009 Jul-Sep;20(3):293-7.
52. ISO. International Organization for Standardization. Specification 1567: denture base polymers. Switzerland: ISO; 2001.
53. Rueggeberg FA. Determination of resin cure using infrared analysis without an internal standard. *Dent Mater.* 1994 Jul;10(4):282-6.
54. Urban VM, Machado AL, Vergani CE, Jorge EG, dos Santos LPS, Leite ER, et al. Degree of conversion and molecular weight of one denture base and three reline resins submitted to post-polymerization treatments. *Mater Res.* 2007 10(2):191-7.
55. ISO. International Organization for Standardization. Specification 10993-5: biological evaluation of medical devices - part 5. Tests for cytotoxicity: in vitro methods. Geneva: ISO; 1992.
56. Pelka M, Danzl C, Distler W, Petschelt A. A new screening test for toxicity testing of dental materials. *J Dent.* 2000 Jul;28(5):341-5.
57. Campanha NH, Pavarina AC, Giampaolo ET, Machado AL, Carlos IZ, Vergani CE. Cytotoxicity of hard chairside reline resins: effect of microwave irradiation and water bath postpolymerization treatments. *Int J Prosthodont.* 2006 Mar-Apr;19(2):195-201.
58. Jorge JH, Giampaolo ET, Vergani CE, Machado AL, Pavarina AC, Carlos IZ. Biocompatibility of denture base acrylic resins evaluated in culture of L929 cells. Effect of polymerisation cycle and post-polymerisation treatments. *Gerodontology.* 2007 Mar;24(1):52-7.
59. Schuster GS, Lefebvre CA, Dirksen TR, Knoernschild KL, Caughman GB. Relationships between denture base resin cytotoxicity and cell lipid metabolism. *Int J Prosthodont.* 1995 Nov-Dec;8(6):580-6.
60. Sheridan PJ, Koka S, Ewoldsen NO, Lefebvre CA, Lavin MT. Cytotoxicity of denture base resins. *Int J Prosthodont.* 1997 Jan-Feb;10(1):73-7.
61. 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 Jun;71(6):618-24.
62. Ciapetti G, Granchi D, Verri E, Savarino L, Cavedagna D, Pizzoferrato A. Application of a combination of neutral red and amido black staining for rapid, reliable cytotoxicity testing of biomaterials. *Biomaterials.* 1996 Jul;17(13):1259-64.

63. Pero AC, Barbosa DB, Marra J, Ruvolo-Filho AC, Compagnoni MA. Influence of microwave polymerization method and thickness on porosity of acrylic resin. *J Prosthodont.* 2008 Feb;17(2):125-9.
64. Compagnoni MA, Barbosa DB, de Souza RF, Pero AC. The effect of polymerization cycles on porosity of microwave-processed denture base resin. *J Prosthet Dent.* 2004 Mar;91(3):281-5.
65. Kazanji MN, Watkinson AC. Soft lining materials: their absorption of, and solubility in, artificial saliva. *Br Dent J.* 1988 Aug;165(3):91-4.
66. Sepulveda-Navarro WF, Arana-Correa BE, Borges CP, Jorge JH, Urban VM, Campanha NH. Color stability of resins and nylon as denture base material in beverages. *J Prosthodont.* 2011 Dec;20(8):632-8.
67. Sham AS, Chu FC, Chai J, Chow TW. Color stability of provisional prosthodontic materials. *J Prosthet Dent.* 2004 May;91(5):447-52.
68. Regis RR, Zanini AP, Della Vecchia MP, Silva-Lovato CH, Oliveira Paranhos HF, de Souza RF. Physical properties of an acrylic resin after incorporation of an antimicrobial monomer. *J Prosthodont.* 2011 Jul;20(5):372-9.
69. Guler AU, Yilmaz F, Kulunk T, Guler E, Kurt S. Effects of different drinks on stainability of resin composite provisional restorative materials. *J Prosthet Dent.* 2005 Aug;94(2):118-24.
70. de Freitas KM, Paranhos HF. Weight loss of five commercially available denture teeth after toothbrushing with three different dentifrices. *J Appl Oral Sci.* 2006 Aug;14(4):242-6.
71. Dyer D, MacDonald E, Newcombe RG, Scratcher C, Ley F, Addy M. Abrasion and stain removal by different manual toothbrushes and brush actions: studies in vitro. *J Clin Periodontol.* 2001 Feb;28(2):121-7.
72. Harrington E, Jones PA, Fisher SE, Wilson HJ. Toothbrush-dentifrice abrasion. A suggested standard method. *Br Dent J.* 1982 Aug;153(4):135-8.
73. ISO. International Organization for Standardization. Specification 8627: stiffness of the tufted area of toothbrushes. Switzerland: ISO; 1987.
74. Izumida FE, Ribeiro RC, Giampaolo ET, Machado AL, Pavarina AC, Vergani CE. Effect of microwave disinfection on the surface roughness of three denture base resins after tooth brushing. *Gerodontology.* 2011 Dec;28(4):277-82.

75. Moura JS, da Silva WJ, Pereira T, Del Bel Cury AA, Rodrigues Garcia RC. Influence of acrylic resin polymerization methods and saliva on the adherence of four *Candida* species. *J Prosthet Dent*. 2006 Sep;96(3):205-11.
76. Spertalis GK, Cappelletti LK, Schoeffel AC, Michél MD, Pegoraro TA, Arrais CAG, et al. Effect of conventional water-bath and experimental microwave polymerization cycles on the flexural properties of denture base acrylic resins. *Dent Mater J*. 2015 34(5):623-8.
77. Jorge JH, Giampaolo ET, Vergani CE, Machado AL, Pavarina AC, Carlos IZ. Cytotoxicity of denture base resins: effect of water bath and microwave postpolymerization heat treatments. *Int J Prosthodont*. 2004 May-Jun;17(3):340-4.
78. Jorge JH, Giampaolo ET, Vergani CE, Pavarina AC, Machado AL, Carlos IZ. Effect of microwave postpolymerization treatment and of storage time in water on the cytotoxicity of denture base and reline acrylic resins. *Quintessence Int*. 2009 Nov-Dec;40(10):e93-100.
79. Chaves CA, Machado AL, Vergani CE, de Souza RF, Giampaolo ET. Cytotoxicity of denture base and hard chairside reline materials: a systematic review. *J Prosthet Dent*. 2012 Feb;107(2):114-27.
80. Cimpan MR, Cressey LI, Skaug N, Halstensen A, Lie SA, Gjertsen BT, et al. Patterns of cell death induced by eluates from denture base acrylic resins in U-937 human monoblastoid cells. *Eur J Oral Sci*. 2000 Feb;108(1):59-69.
81. Weyermann J, Lochmann D, Zimmer A. A practical note on the use of cytotoxicity assays. *Int J Pharm*. 2005 288:369-76.
82. Oliveira VM, Leon BL, Del Bel Cury AA, Consani S. Influence of number and position of flasks in the monomer release, Knoop hardness and porosity of a microwave-cured acrylic resin. *J Oral Rehabil*. 2003 Nov;30(11):1104-8.
83. Pisani MX, Bruhn JP, Paranhos HF, Silva-Lovato CH, de Souza RF, Panzeri H. Evaluation of the abrasiveness of dentifrices for complete dentures. *J Prosthodont*. 2010 Jul;19(5):369-73.
84. Austin AT, Basker RM. The level of residual monomer in acrylic denture base materials with particular reference to a modified method of analysis. *Br Dent J*. 1980 Nov 18;149(10):281-6.

85. 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 Jun;8(6):365-71.
86. 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 Feb;106(1):588-93.
87. Bayraktar G, Guvener B, Bural C, Uresin Y. Influence of polymerization method, curing process, and length of time of storage in water on the residual methyl methacrylate content in dental acrylic resins. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2006 Feb;76(2):340-5.
88. Cucci AL, Giampaolo ET, Leonardi P, Vergani CE. Unrestricted linear dimensional changes of two hard chairside reline resins and one heat-curing acrylic resin. *J Prosthet Dent.* 1996 Oct;76(4):414-7.
89. Sideridou I, Achilias DS, Kyrikou E. Thermal expansion characteristics of light-cured dental resins and resin composites. *Biomaterials.* 2004 Jul;25(15):3087-97.
90. Bural C, Aktas E, Deniz G, Unlucerci Y, Bayraktar G. Effect of leaching residual methyl methacrylate concentrations on in vitro cytotoxicity of heat polymerized denture base acrylic resin processed with different polymerization cycles. *J Appl Oral Sci.* 2012 Aug;19(4):306-12.
91. Rawls HR. Polímeros odontológicos. In: Anusavice KJ, editor. *Phillips Materiais dentários*. 11 ed ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2005. p. 135-59.
92. Craig RG, Powers JM. *Restorative dental materials*. St. Louis: Mosby; 2002.
93. Machado C, Rizzatti-Barbosa CM, Gabriotti MN, Joia FA, Ribeiro MC, Sousa RL. Influence of mechanical and chemical polishing in the solubility of acrylic resins polymerized by microwave irradiation and conventional water bath. *Dent Mater.* 2004 Jul;20(6):565-9.
94. Zissis AJ, Polyzois GL, Yannikakis SA, Harrison A. Roughness of denture materials: a comparative study. *Int J Prosthodont.* 2000 Mar-Apr;13(2):136-40.
95. Richmond R, Macfarlane TV, McCord JF. An evaluation of the surface changes in PMMA biomaterial formulations as a result of toothbrush/dentifrice abrasion. *Dent Mater.* 2004 Feb;20(2):124-32.

96. Jorge JH, Giampaolo ET, Vergani CE, Machado AL, Pavarina AC, Carlos IZ. Effect of post-polymerization heat treatments on the cytotoxicity of two denture base acrylic resins. *J Appl Oral Sci.* 2006 Jun;14(3):203-7.