

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA - MESTRADO
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: CLÍNICA INTEGRADA**

LIDIA YILENG TAY CHU JON

**EFEITO DO ARMAZENAMENTO EM ÁGUA SOBRE A CITOTOXICIDADE DE
MATERIAIS RESILIENTES PARA BASE DE PRÓTESES**

**PONTA GROSSA
2010**

LIDIA YILENG TAY CHU JON

**EFEITO DO ARMAZENAMENTO EM ÁGUA SOBRE A CITOTOXICIDADE DE
MATERIAIS RESILIENTES PARA BASE DE PRÓTESES**

Dissertação apresentada para obtenção do título de mestre na Universidade Estadual de Ponta Grossa, no Curso de Mestrado em Odontologia - Área de concentração em Clínica Integrada.

Orientador Profa Dra. Janaina Habib Jorge.

**PONTA GROSSA
2010**

Ficha Catalográfica Elaborada pelo Setor de Processos Técnicos BICEN/UEPG

T236e

Tay Chu Jon, Lidia Yileng

Efeito do armazenamento em água sobre a citotoxicidade de materiais resilientes para base de próteses. / Lidia Yileng Tay Chu Jon. Ponta Grossa, 2009.

69f.

Dissertação (Mestrado em Odontologia - Área de Concentração : Clínica Integrada) - Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Orientadora : Profa. Dra. Janaina Habib Jorge

1. Reembasadores resilientes. 2. Citotoxicidade
3. ³H – timidina. I. Jorge, Janaina Habib. II.T.

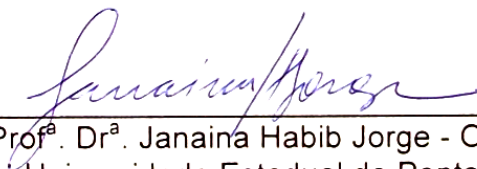
CDD : 617.6

LIDIA YILENG TAY CHU JON

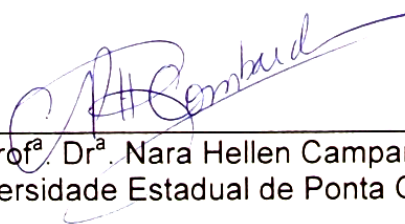
**EFEITO DO ARMAZENAMENTO EM ÁGUA SOBRE A CITOTOXICIDADE DE
MATERIAIS RESILIENTES PARA BASE DE PRÓTESES**

Dissertação apresentada para obtenção do título de mestre na Universidade Estadual de Ponta Grossa, no Curso de Mestrado em Odontologia - Área de concentração em Clínica Integrada.

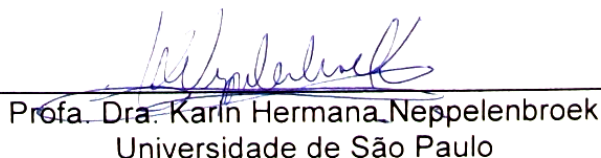
Ponta Grossa, 24 de Fevereiro de 2010.



Prof^a. Dr^a. Janaina Habib Jorge - Orientadora
Universidade Estadual de Ponta Grossa



Prof^a. Dr^a. Nara Hellen Campanha
Universidade Estadual de Ponta Grossa



Prof^a. Dr^a. Karin Hermana Neppelenbroek
Universidade de São Paulo

DADOS CURRICULARES

Lidia Yileng Tay Chu Jon

NASCIMENTO 05.08.1983	Lima, Perú
FILIAÇÃO	Felipe Constante Tay Loo Lidia Micaela Chu Jon Lay
2000 – 2004	Curso de Graduação em Estomatologia Facultad de Estomatología de la Universidad Peruana Cayetano Heredia (UPCH). Lima – Perú.
2006 – 2007	Curso de Aperfeiçoamento em Odontologia Restauradora e Estética. Facultad de Estomatología de la Universidad Peruana Cayetano Heredia (UPCH). Lima – Perú.
2007 – 2008	Curso de Aperfeiçoamento em Odontologia Geral Avançada. Facultad de Estomatología de la Universidad Peruana Cayetano Heredia (UPCH). Lima – Perú.
2007 – 2009	Membro ativo do International Association of Dental Research (IADR).
2008 – 2009	Membro ativo da Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica (SBPqO).
2008 – 2010	Curso de Pós-graduação em Odontologia. Área de concentração em Clínica Integrada. Nível Mestrado. Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG). Ponta Grossa – PR – Brasil.

AGRADECIMENTOS

A Deus pela vida e a sorte que me deu por colocar na minha vida, pessoas maravilhosas que são fundamentais para o meu crescimento pessoal e profissional.

Aos meus pais, Felipe Tay e Lídia Chu Jon, pela minha educação, por todos os valores que inculcaram em mim e por todo incentivo e apoio incondicional que têm me dado para eu seguir os meus objetivos.

Ao Prof. Dr. João Carlos Gomes pela amizade e carinho, pelo convite e pela oportunidade de realizar o curso de mestrado em odontologia na Universidade Estadual de Ponta Grossa no Brasil.

À minha querida orientadora Prof^a. Dr^a. Janaina Habib Jorge pela sua dedicação, importante contribuição acadêmica e sugestões na orientação desta dissertação, além da amizade, carinho e por receber-me na sua casa como uma filha.

À Prof^a Ms. Leyla Delgado Cotrina por confiar em mim na realização deste Mestrado e por sua ajuda incondicional.

À Coordenação do Curso de Mestrado em Odontologia da UEPG, na pessoa da Prof^a. Dr^a. Osnara Maria Mongruel Gomes por toda sua preocupação, empenho e dedicação contínua ao curso.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq pelo auxílio econômico para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao departamento de Materiais Dentários e Prótese da Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual Paulista - UNESP - Araraquara pelo apoio na realização deste trabalho.

A Profª. Drª. Iracilda Zeppone Carlos pela disponibilização do laboratório de Imunologia da Faculdade Ciências Farmacêuticas - UNESP Araraquara.

À Ms. Cristiane Campos Costa pela amizade e pela ajuda e guia para realizar os testes de citotoxicidade que com todo seu conhecimento e força de vontade conseguiu vencer junto comigo todos os obstáculos encontrados durante esta pesquisa.

À Marisa, técnica de laboratório de Imunologia da Faculdade Ciências Farmacêuticas - UNESP pela colaboração, dedicação, esforço e empenho na realização deste trabalho.

Ao Lucas e Dejanira, alunos do curso de pós-graduação de Farmácia da UNESP, pela atenção dada e ajuda com os problemas que se apresentaram no laboratório de Imunologia da Faculdade Ciências Farmacêuticas - UNESP.

Aos professores Dr. Alessandro Loguercio e Drª. Alessandra Reis pela amizade, palavras, conhecimentos, simpatia e incentivo que sempre me brindaram. Obrigada pelas oportunidades dadas.

À Profª. Drª. Elizabete Brasil dos Santos pela amizade, simpatia, conhecimentos e alegria que brinda durante os trabalhos feitos no laboratório.

Aos Professores do Curso de Mestrado em Odontologia da Universidade Estadual de Ponta Grossa, Abraham Lincoln Calixto, Benjamim de Melo Carvalho, Denise Stadler Wambier, Carlos Roberto Berger, Gislaïne Denise Czlusniak, Fábio André dos Santos, Gibson Luiz Pilatti, Leide Mara Schmidt, Nara Hellen Campanha, Stella Kossatz Pereira, Ulisses Coelho, Vitoldo Antônio Kozłowski Júnior pelas críticas, orientações, ensinamentos, e pelo aprendido em cada aula.

*À Secretária do Curso de Mestrado em Odontologia da Universidade Estadual de Ponta Grossa, **Morgana**, por toda sua atenção, colaboração, competência, disposição e amizade.*

Aos bons funcionários da Universidade Estadual de Ponta Grossa por criar as condições necessárias para a realização do mestrado.

*Aos meus colegas e amigos brasileiros **Elíana, Giovanna, Stella, João Paulo, Juliana, Yasmíne, Rafael, Tatiana, Carlos, Tamí, Síndianara e Rícélia** por introduzir a cultura brasileira e pela agradável e alegre convivência ao longo desses dois anos.*

*Aos meus queridos amigos e compañeros **Alexandra, Luís Alfonso, Miguel e Eugénio**, porque juntos aprendemos a morar numa cidade diferente a nossa, muito obrigado por todos os momentos de alegria, companheirismo, conhecimento e profunda amizade que nos mantiveram unidos até hoje e assim espero que permaneça.*

*Ao amor da minha vida **Daniel Rodrigo Herrera Morante**, enamorado, noivo e esposo, que durante esses dois anos de convivência me amou, me entendeu, me ouviu, me incentivou e me apoiou incondicionalmente na realização do meu trabalho. Eu não poderia ter feito o mestrado nesses dois anos sem você! Tem que ser você, sem por que sem para que...*

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

"Só uma coisa torna um sonho impossível: o medo do fracasso"

Paulo Coelho

Tay LY. Efeito do armazenamento em água sobre a citotoxicidade de materiais resilientes para base de próteses. [Dissertação – Mestrado em Odontologia – Área de Concentração – Clínica Integrada]. Ponta Grossa: Universidade Estadual de Ponta Grossa; 2010.

EFEITO DO ARMAZENAMENTO EM ÁGUA SOBRE A CITOTOXICIDADE DE REEMBASADORES RESILIENTES

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar, por meio do teste quantitativo de incorporação de ^3H -timidina, a citotoxicidade de materiais reembasadores resilientes em função do tempo de armazenamento em água e em função de um tratamento térmico. Doze corpos-de-prova de cada material reembasador resiliente (Dentusoft, Dentuflex, Trusoft e Ufi Gel P) e da resina termopolimerizável (Lucitone 550) foram confeccionados de forma asséptica em forma de discos e divididos em 4 grupos: GN: os corpos-de-prova não receberam nenhum tipo de tratamento ou armazenamento; G24: os corpos-de-prova foram armazenados em água destilada à 37°C por 24 horas; G48: os corpos-de-prova foram armazenados em água destilada à 37°C por 48 horas; GAQ: os corpos-de-prova foram imersos em água a 55°C por 10 minutos. Para a análise do efeito citotóxico, três corpos-de-prova de cada grupo experimental foram colocados dentro de tubos de ensaio com 9 mL de meio de cultura DMEM suplementado e incubados a 37°C por 24 horas. Durante esse período, as substâncias tóxicas foram difundidas para o meio de cultura, formando os extratos que foram utilizados no teste de citotoxicidade. Esta foi analisada quantitativamente por meio da incorporação do radioisótopo ^3H -timidina, verificando o número de células viáveis pela síntese de DNA. Os resultados foram submetidos à análise de variância em esquema fatorial de dois fatores incluindo ainda um grupo controle, ao nível de 5% de significância. Confrontando-se as médias obtidas de viabilidade celular com a classificação do efeito citotóxico estabelecida pela ISO 10993-5, verificou-se que o Ufi Gel P foi considerado não-citotóxico, o Trusoft levemente citotóxico e o Dentuflex discretamente citotóxico, em qualquer condição experimental. Observou-se também que o Dentusoft alternou entre levemente citotóxico e não-citotóxico porque suas médias de viabilidade variaram em torno de 75% e o Lucitone 550 apresentou efeito não-citotóxico quando armazenado em água por 48 horas, mas as outras médias ficaram em torno de 50% de viabilidade celular, entre levemente-citotóxico e discretamente citotóxico. Concluiu-se que os reembasadores resilientes a base de resina acrílica (Trusoft e Dentuflex) foram classificados como levemente citotóxico e discretamente citotóxico, respectivamente. O condicionador de tecido (Dentusoft) alternou entre levemente citotóxico e não citotóxico e o reembasador resiliente a base de silicone (Ufi Gel P) não teve efeito citotóxico. O armazenamento em água ou o tratamento térmico não diminuiu a citotoxicidade dos reembasadores resilientes e o armazenamento em água reduziu a citotoxicidade da resina acrílica para base de prótese (Lucitone 550).

Palavras-chave: Reembasadores de Dentadura. Citotoxicidade Imunológica. Timidina.

Tay LY. Effect of water storage on the cytotoxicity of resilient liners. [Dissertação – Mestrado em Odontologia – Área de Concentração – Clínica Integrada]. Ponta Grossa: Universidade Estadual de Ponta Grossa; 2010.

EFFECT OF WATER STORAGE ON THE CYTOTOXICITY OF RESILIENT LINERS

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the effect of water storage time and of a heat treatment on the cytotoxicity of soft lining denture material using the ^3H -thymidine incorporation test. Sample disks (10 mm X 1 mm) of soft lining denture Dentusoft, Dentuflex, Trusoft, Ufi Gel P and of denture base acrylic resin Lucitone 550 were fabricated under aseptic conditions. Twelve specimens of each material were prepared and divided into four groups: GN: The specimens received no treatment or storage in water, G24: The specimens were stored in distilled water at 37°C for 24 hours; G48: The specimens were stored in distilled water at 37°C for 48 hours, GHW: The specimens were immersed in water at 55 °C for 10 minutes. To analyze the cytotoxic effect, three samples of each experimental group were placed in test tubes with 9 ml of DMEM's medium supplemented and incubated at 37 °C for 24 hours. During this incubation period, the toxic substances were broadcast to the culture medium, forming the extracts that were used for the cytotoxicity test. The cytotoxicity of each material was analyzed quantitatively by the incorporation of radioactivity ^3H - thymidine by checking the number of viable cells for the synthesis of DNA. The results of DNA synthesis were subjected to analysis of variance in a factorial two-way (material and storage time in water). Comparing the averages of cell viability with the classification of cytotoxic established by ISO 10993-5, it was found that Ufi Gel P had non-cytotoxic effect, Trusoft had slightly cytotoxic effect, Dentuflex had a moderated cytotoxic effect, all in any experimental condition. It was also observed that the Dentusoft alternated between slightly cytotoxic and non-cytotoxic effect because their average viability ranged around 75% and Lucitone 550 had non-cytotoxic effect when stored in water for 48 hours, but the others had around 50% cell viability, the slightly moderated cytotoxic effect. It is concluded that the soft lining denture based in acrylic resin had a slightly and moderated cytotoxic effect, Ufi Gel P, the silicone based soft liner, was not cytotoxic; the effect of water storage after 24 hours or 48 hours and the heat treatment did not reduce the cytotoxicity effect of soft lining denture materials.

Keywords: Soft liners. Cytotoxicity. ^3H -thymidine.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	12
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	15
3	PROPOSIÇÃO.....	43
4	MATERIAL E MÉTODO.....	44
4.1	CONFEÇÃO DOS CORPOS DE PROVA.....	44
4.2	GRUPOS EXPERIMENTAIS.....	47
4.3	ESTERILIZAÇÃO DOS CORPOS DE PROVA.....	48
4.4	OBTENÇÃO DOS EXTRATOS.....	48
4.5	CULTURA E MANUTENÇÃO DAS CÉLULAS.....	49
4.6	QUANTIFICAÇÃO DAS CÉLULAS.....	50
4.7	TESTE DE CITOTOXICIDADE.....	51
4.8	METODOLOGIA ESTATÍSTICA.....	53
5	RESULTADOS.....	55
6	DISCUSSÃO.....	57
7	CONCLUSÃO.....	63
	REFERÊNCIAS.....	64

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	- A. Matriz metálica. B. Materiais inseridos nas matrizes vazadas e prensados manualmente entre duas placas de vidro. C. Corpos de prova dos reembasadores resilientes.....	45
Figura 2	- A. Matrizes metálicas. B. Inclusão dos moldes na mufla. C. Corpos de prova de resina acrílica termopolimerizável Lucitone 550.....	47
Figura 3	- Esterilização na capela de fluxo laminar.....	48
Figura 4	- Corpos de prova em meio de cultura para obtenção dos extratos.....	49
Figura 5	- Estufa para cultura de células e incubação de frascos.	50
Figura 6	- A. Centrifugação da suspensão por 10 minutos a 1500 rpm. B. Células precipitadas. C. Contagem das células viáveis na câmara hemocitométrica Neubauer.....	51
Figura 7	- A. ^3H – timidina. B. Placa de 96 orifícios com a suspensão de células. C. As células marcadas com material radioativo foram aspiradas pelo aparelho Filtermate Harvester. D. Células aderidas na placa 96 orifícios com filtro. E. Leitura do número de células viáveis no contador de cintilação.....	53
Gráfico 1	- Médias amostrais de porcentagens de viabilidade celular e intervalos de confiança de 95% para as médias populacionais, de acordo com o tempo em horas de armazenamento em água e tratamento térmico em água quente (AQ).....	56
Quadro 1	- Materiais e a sua composição.....	44
Tabela 1	- Viabilidade celular (%) de acordo com o material, tempo de armazenamento e tratamento térmico.....	55

1 INTRODUÇÃO

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

Haja vista esses efeitos deletérios, a adaptação das bases das próteses deve ser periodicamente reavaliada e, se for verificado desajuste, essas deverão ser readaptadas aos tecidos subjacentes. Dessa forma, os pacientes devem retornar ao consultório periodicamente para reavaliação do tratamento e reembasamento das bases acrílicas de suas próteses removíveis totais ou parciais.

O reembasamento direto das bases das próteses removíveis, utilizando-se materiais reembasadores rígidos e resilientes autopolimerizáveis, melhora as condições de suporte e estabilidade das próteses e a distribuição de forças ao rebordo residual (Braden et al.¹ 1995, McCabe² 1998, Murata et al.³ 2002, McCabe et al.⁴ 2002, Haywood et al.⁵ 2003). Esse método, também denominado reembasamento imediato, elimina as fases de inclusão e prensagem necessárias à realização do reembasamento do tipo mediato, sendo, por esse motivo, mais fácil, rápido e de custo acessível. Este tipo de reembasamento também está indicado quando verificada falta de estabilidade das bases da prótese na sessão de colocação.

Reembasadores resilientes têm sido desenvolvidos para minimizar o possível desconforto gerado pelas forças transmitidas pelas bases das próteses à mucosa. Esses reembasadores formam um grupo de materiais elásticos que preenchem total ou parcialmente a base da prótese, com a finalidade de diminuir o impacto da força mastigatória sobre a mucosa de revestimento, podendo ser utilizados temporariamente ou com um caráter mais permanente (Brown⁶ 1988, Murata et al.⁷ 1996). Outras indicações surgiram há alguns anos, como obturadores

após cirurgia maxilo-facial, para próteses durante o período de osseointegração de implantes ou ainda como meio retentivo para overdentures implanto-retidas (Braden⁸ 1970).

Os materiais reembasadores macios podem ser divididos atualmente em dois grupos: silicones e acrílicos (Braden et al.¹ 1995). Os reembasadores resilientes à base de resina acrílica quimicamente ativada consistem de um pó, polímero (polietil metacrilato ou copolímero) e um líquido, mistura de um éster aromático (dibutilftalato) e etanol, além da adição de agentes plastificantes. (Braden⁸ 1970). A maior vantagem desses materiais é a sua facilidade de utilização (Cerveira-Netto, Lin⁹ 1977). Os reembasadores macios à base de silicone são compostos por polímeros de dimetil siloxano, os quais lhes proporcionam boas propriedades elásticas. São quimicamente ativados e são fornecidos como um sistema de dois componentes que polimerizam via reação por condensação ou adição (Anusavice¹⁰ 1998, McCabe² 1998).

Durante o uso clínico, os reembasadores resilientes acrílicos entram em contato com a saliva e liberam substâncias solúveis por longos períodos (Craig¹¹ 2002). Estudos têm demonstrado que as substâncias potencialmente tóxicas originadas de resinas incluem metil metacrilato, formaldeído, ácido metacrílico e ácido benzóico (Lefebvre et al.¹² 1994, Lewis, Chestner¹³ 1981). Esses componentes tóxicos, difundidos em meio aquoso, podem ser capazes de agir inclusive em locais distantes da área de contato da resina. Dessa forma, áreas extensas de mucosa podem ficar expostas a componentes tóxicos por longo período de tempo (Lefebvre et al.¹⁴ 1995).

O aparecimento de reações adversas na mucosa bucal pelo uso de próteses tem despertado o interesse dos pesquisadores em determinar o comportamento biológico das resinas de base e reembasadores. Os sinais e sintomas clínicos mais freqüentes são vermelhidão, erosão na mucosa oral, queimação na mucosa e na língua (Fisher¹⁵ 1954, Hensten-Pettersen¹⁶ 1988). Histologicamente podemos observar um infiltrado inflamatório e um aumento da camada de queratina nas áreas da mucosa em contato com a prótese (Kapur, Shklar¹⁷ 1963).

As variações na composição química das resinas e materiais reembasadores, o grau de conversão de seus monômeros e as variáveis de

manipulação podem influenciar nas suas propriedades biológicas e físicas (Lefebvre e Schuster¹⁸ 1994). A concentração de monômero residual varia com as condições utilizadas para sua polimerização (McCabe, Basker¹⁹ 1976, Weaver, Goebel²⁰ 1980, Tsuchiya et al.²¹ 1993). Dessa forma, alguns aspectos técnicos são relevantes e podem auxiliar na redução do monômero residual, como o ciclo de polimerização utilizado, condições e tempo de armazenagem e o método de polimerização (Austin, Basker²² 1980).

Para evitar reações adversas, bem como para a diminuição da quantidade de monômero residual, vários autores têm sugerido a imersão da prótese em água antes da colocação no paciente (De Clerck²³ 1987, Lefebvre et al.¹⁴ 1995, Sheridan et al.²⁴ 1997). A redução da quantidade de monômero residual, após esse tratamento, ocorre em função da difusão do monômero em água de acordo com o tempo de imersão.

As substâncias tóxicas e seus efeitos sobre os tecidos têm sido constatados por meio de estudo em animais, observações clínicas e culturas de células in vitro. Alguns testes têm sido realizados para determinar a citotoxicidade dos materiais, como o MTT (brometo tetrazolium) e o da incorporação de produtos radioativos como a timidina, que avaliam a respiração celular e a síntese de DNA, respectivamente (Turner et al.²⁵ 1989, Tang et al.²⁶ 1999, Imazato et al.²⁷ 2000, Upadhyay, Bhaskar²⁸ 2000). Com eles, pode-se observar, pelo método de cultura de células, a proliferação ou a inibição do crescimento celular decorrente do contato com substâncias citotóxicas.

Após criterioso levantamento bibliográfico, poucos estudos foram encontrados visando avaliar a citotoxicidade dos reembasadores resilientes comumente utilizados na prática clínica. Assim, foi julgado oportuno avaliar, por meio do teste quantitativo de incorporação de ³H-timidina, a citotoxicidade de diferentes tipos de materiais reembasadores resilientes em função do tempo de armazenamento em água e em função de um tratamento térmico.

2 REVISÃO DA LITERATURA

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

2.1 Liberação de monômero residual e outros produtos

Fisher¹⁵ (1954) dividiu as reações às resinas acrílicas utilizadas em odontologia em duas categorias: 1- dermatite alérgica de contato que atinge dentistas e técnicos de prótese e 2- estomatite alérgica que afeta os pacientes portadores de próteses. No que se refere à dermatite de contato, o autor descreve quatro casos de dentistas e técnicos de laboratório sensíveis ao monômero residual. Por meio de teste de contato, foi comprovado que esses profissionais apresentavam sensibilidade aos monômeros das resinas auto, termo e quimicamente ativadas. Dois desses profissionais eram portadores de próteses de resina termoativadas, porém, não apresentavam reação alérgica nos tecidos bucais, provavelmente pelo fato do monômero ter sido completamente polimerizado. Sobre a estomatite que afeta os portadores de próteses, foram avaliados 20 pacientes, dos quais quatro relataram apresentar alergia ao monômero e que tinham sido orientados para a substituição das mesmas. Para somente um desses pacientes confirmou-se a sensibilidade ao monômero residual. Neste paciente, foi colocada uma prótese total com resina acrílica ativada pelo calor, adequadamente polimerizada, ocorrendo desaparecimento dos sintomas. Segundo os autores, as resinas termopolimerizáveis raramente provocam reações de sensibilidade ao monômero residual, ao contrário das autopolimerizáveis, as quais contém níveis suficientes do monômero para desencadear uma reação alérgica.

Axelsson e Nyquist²⁹ (1962) realizaram um estudo com o objetivo de quantificar o monômero residual liberado de resinas acrílicas para bases de próteses assim como determinar os seus efeitos sobre os tecidos. Inicialmente, 44 pacientes desdentados com mucosa bucal saudável receberam novas próteses e apenas 28

desses pacientes foram examinados até o final do estudo. Durante a confecção das próteses, corpos-de-prova de 2 a 3 g foram obtidos simultaneamente dentro das mesmas muflas. O ciclo de polimerização utilizado foi de 20°C a 70°C por 30 minutos permanecendo a 70°C por mais 2 horas. Depois da colocação das próteses, a mucosa dos pacientes foi analisada visualmente uma vez por dia durante uma semana e após 1, 3 e 6 meses de utilização das mesmas. Para determinar a quantidade de monômero residual, os corpos-de-prova e as próteses foram submetidos a análises químicas. Os resultados demonstraram que, em 24 dos 28 casos analisados, ocorreu uma diminuição na quantidade de monômero residual liberada ao longo do tempo e para 20 casos a liberação de monômero foi significativa. Durante a primeira semana de utilização das próteses, 34 dos 44 pacientes apresentaram hiperqueratoses e não foram observadas estomatites protéticas. Os autores não puderam confirmar se existe relação entre monômero residual liberado e estomatite protética ou hiperqueratose, necessitando-se de mais pesquisas.

Austin e Basker²² (1980) analisaram o conteúdo de monômero residual de algumas resinas acrílicas por meio da utilização da cromatografia líquida. Segundo os autores, as resinas para bases de próteses polimerizadas por meio de ciclos curtos (menos do que 2 horas) promovem cerca de sete vezes mais concentração de monômero residual do que aquelas polimerizadas por ciclos longos (mais do que 6 horas). Os autores observaram ainda que o monômero presente nas resinas termopolimerizáveis pode ser mais resistente à remoção por difusão em água.

Ruyter³⁰ (1980) realizou um estudo com o objetivo de avaliar a liberação e a origem do formaldeído de resinas acrílicas para bases de próteses. Segundo o autor, o formaldeído é um dos responsáveis por causar injúrias na mucosa oral dos pacientes portadores de próteses. Para o estudo, foram confeccionados corpos-de-prova com 50 mm de diâmetro e 0,5 mm de espessura com resinas termopolimerizáveis (Paladon 65, Swe Base e SR 3/60), resinas autopolimerizáveis do tipo pó (Palacast, Swe Flow e Ivocast) e autopolimerizáveis tipo massa (Palapress, Swebond Compact e Quick 20), de acordo com as instruções dos fabricantes. Os corpos-de-prova foram, então, tratados para que o formaldeído fosse liberado em solução. As soluções contendo formaldeído foram analisadas por

meio da cromatografia líquida de alta performance. Também foi verificada a composição de monômeros líquidos de cada resina, a quantidade de oxigênio dissolvido em cada monômero e a formação de formaldeído por meio da reação entre o oxigênio e o monômero. Os resultados mostraram que a quantidade de formaldeído liberada pelas resinas termopolimerizáveis foi menor do que a quantidade liberada pelas resinas autopolimerizáveis. Em relação à composição, as resinas autopolimerizáveis apresentaram diferentes tipos de monômeros líquidos com respectivos agentes de ligações cruzadas. Os resultados mostraram, ainda, que, após 4 semanas a 37°C, a reação entre metil metacrilato e oxigênio formou uma mistura contendo monômero metil metacrilato, metil piruvato, formaldeído e copolímero oxigênio-metil metacrilato, confirmando os resultados de estudos prévios que mostram que o formaldeído é decorrente da reação entre o oxigênio e o monômero residual.

Havendo vários relatos de reações na mucosa em pacientes portadores de próteses desde a década de 30, quando foram introduzidas as resinas acrílicas, Weaver e Goebel²⁰ (1980) realizaram uma revisão de literatura com o objetivo de elucidar tais relatos relacionados com os componentes liberados pelas resinas. Segundo os autores, as reações da cavidade bucal apresentam como sintomas ardência na língua, vermelhidão e erosão na mucosa. As causas mais prováveis desses sintomas são traumas causados por próteses mal adaptadas, doenças sistêmicas ou bucais não relacionadas com as resinas acrílicas, como a candidose, e irritação química local e hipersensibilidade causadas pelas resinas acrílicas e seus constituintes. Alguns estudos mostraram que o monômero metil metacrilato pode causar reação de hipersensibilidade e irritação química local quando não totalmente polimerizado, sendo as resinas autopolimerizáveis as maiores responsáveis por essas reações. Assim, as resinas termopolimerizáveis são mais indicadas na confecção de próteses, tendo como objetivo minimizar as reações na mucosa bucal.

Sabendo-se que o monômero residual é o principal causador de danos na mucosa de pacientes portadores de próteses, Lamb et al.³¹ (1982) avaliaram a quantidade de monômero residual em resinas autopolimerizáveis. Assim, corpos-de-prova foram confeccionados com temperaturas de polimerização de 22°C e 55°C por períodos de 5 a 30 minutos. Para a análise da quantidade de

monômero residual, as amostras foram armazenadas em água destilada por diferentes tempos, tendo sido as soluções analisadas em espectrofotômetro. Os resultados mostraram que a concentração de monômero residual foi reduzida por dois processos: 1) difusão do monômero em água e 2) polimerização adicional do monômero dentro da massa de resina. Os resultados mostraram, ainda, que o monômero residual pode ser minimizado se as resinas autopolimerizáveis forem polimerizadas em temperaturas acima de 55°C e que a difusão completa do monômero em água foi conseguida quando as amostras foram armazenadas por 14 dias a 22°C ou por 7 dias a 37°C, mostrando a importância do armazenamento das próteses em água, preferencialmente aquecida, anteriormente à colocação nos pacientes.

Passeri e Carvalho³² (1985) verificaram histologicamente a biocompatibilidade dos condicionadores de tecido: FITT, Lynal, Visco-gel, e uma pasta para impressão de óxido de zinco e eugenol. Os produtos foram testados em feridas intraorais e cavidades ósseas em ratos. A biocompatibilidade foi verificada histologicamente utilizando 120 ratos albinos. Os animais operados na mucosa palatal foram sacrificados após 2, 5, 10, e 15 dias pós-cirurgia, e os que foram operados na mandíbula foram sacrificados após 4, 8, 16 e 30 dias. Baseados nos cortes histológicos, concluíram que a pasta de óxido de zinco e eugenol é o material mais irritante para os tecidos, os condicionadores de tecido apresentaram vários graus de biocompatibilidade e os melhores resultados foram de Lynal e Visco-gel.

Os materiais de curto prazo à base de polímeros macios utilizados para o reembasamento de próteses são misturados com plastificantes para diminuir a temperatura de transição vítrea (Tg). Menor Tg permite maior mobilidade da cadeia polimérica, produzindo um material mais flexível. Graham et al.³³ (1991) avaliaram a perda de plastificantes, mediante lixiviação tanto in vivo e in vitro. Duas marcas comerciais de reembasadores resilientes para próteses (A e B) foram testados. Um estudo clínico foi realizado onde os pacientes usavam sequencialmente dois reembasadores macios para próteses, em ocasiões diferentes. Os dois materiais A e B foram distribuídos aleatoriamente para cada um dos dez pacientes e foram usados durante 14 e 30 dias, respectivamente. Com uma exceção, todos os pacientes usaram próteses com os dois tipos de reembasadores, num total de 19 avaliações clínicas. A perda do plastificante ocorrida durante o ensaio clínico foi determinada

por cromatografia em fase gasosa a partir da análise do conteúdo de plastificante dos reembasadores macios, tomadas ao início e ao término de cada dia. Os resultados desta análise foram comparados com os resultados obtidos a partir de um estudo in vitro de lixiviabilidade através do armazenamento em água a 37°C para os mesmos polímeros macios comercializados, realizado durante o mesmo tempo. Os resultados indicaram que uma maior perda de plastificante ocorreu in vivo, em comparação com os testes in vitro para 17 das 19 avaliações clínicas. Não se sabe quanto do plastificante foi perdido no ensaio in vivo pela ingestão ou devido à limpeza da prótese pelo paciente. Os autores concluíram que a avaliação in vivo dos reembasadores resilientes indicou que os materiais B e A perderam quatro e dez vezes mais plastificante, respectivamente, do que quando submetidos a condições de lixiviabilidade in vitro a 37°C em água destilada. Concluíram também que existe claramente uma necessidade de produzir reembasadores resilientes com menos plastificante, ou desenvolver reembasadores resilientes que não necessitem de plastificação externa.

Com o objetivo de quantificar plastificantes presentes na saliva de indivíduos portadores de prótese dentária, Lygre et al.³⁴ (1993) utilizaram a cromatografia a gás associada ou não à espectrometria de massa, identificando também, outros componentes orgânicos liberados. Para esse estudo, 4 homens e 7 mulheres que utilizavam prótese, com média de idade de 67,8 anos, foram selecionados. A maioria desses pacientes fazia uso de prótese total inferior e superior, sendo que somente um paciente usava prótese parcial removível superior e um, utilizava apenas a prótese total superior. Os pacientes selecionados receberam novas próteses confeccionadas com resina termopolimerizável (Vertex 5RS) de acordo com as instruções do fabricante. Para identificar as substâncias liberadas na saliva pelas próteses, corpos-de-prova medindo 26 x 26 x 3 mm foram preparados sob as mesmas condições das próteses, colocados em recipientes de vidro contendo 80 ml de etanol, cobertos com folha fina de alumínio e levados para agitação por 20 horas a 37°C. Em seguida, as amostras foram analisadas pela espectrometria de massa associada a cromatografia a gás, para identificação dos diferentes produtos liberados pela resina termopolimerizável. Como grupo controle, amostras de saliva de 11 indivíduos que não usavam prótese, com média de idade de 22,9 anos, foram coletadas. Amostras de saliva dos pacientes que utilizavam

próteses foram coletadas com a prótese antiga e após uma semana de utilização das próteses novas. A análise das substâncias liberadas por todas as amostras foi feita através da cromatografia a gás e da técnica da espectrometria de massa associada à cromatografia a gás. Os resultados mostraram que dibutilftalato e benzoato de fenil foram encontrados na saliva dos pacientes com próteses novas, sendo que nenhuma dessas substâncias foi encontrada nas amostras de saliva do grupo controle (que não utilizavam prótese). A concentração de dibutilftalato encontrada na saliva dos pacientes com prótese nova foi significativamente maior do que a encontrada nas amostras de saliva com a utilização de próteses antigas. O número de picos observado na cromatografia foi maior para as amostras com próteses novas e significativamente diferente do grupo controle, mas não significativamente diferente das amostras com prótese antigas. Esse estudo demonstra que os aditivos dos polímeros para base de próteses são liberados na saliva dos indivíduos que utilizam próteses novas em condições clínicas normais.

Sendo o formaldeído um dos agentes responsáveis pelas injúrias na mucosa bucal, Tsuchiya et al.²¹ (1993) quantificaram, através da análise de injeção de fluxo, o formaldeído liberado pelas resinas acrílicas para bases de próteses polimerizadas por diferentes métodos. Assim, corpos-de-prova com 8,5 mm de diâmetro e 2 mm de altura foram confeccionados, de acordo com as instruções dos fabricantes, utilizando-se uma resina autopolimerizável (Rebaron nº 3), uma termopolimerizável (Acron nº 8) e uma polimerizada por meio de microondas (Acron MC nº 8). Os discos foram colocados em frascos de vidro com 2 ml de água destilada e imersos em água a 37°C. Alíquotas de 50 a 70µl foram coletadas em diferentes intervalos de tempo e analisadas pelo método da injeção de fluxo. Para elucidar a influência do tempo na quantidade de substâncias liberadas, discos de resina autopolimerizável foram colocados em frascos contendo 2 ml de saliva artificial e incubados a 37°C, sendo que para alguns desses discos, a camada de inibição foi removida. A cada dia, a quantidade de formaldeído e de metacrilato de metila era determinada pela análise da injeção de fluxo e pela cromatografia líquida. Em seguida, esses discos de resina autopolimerizável eram enxaguados com água e nova alíquota de 2 ml de saliva artificial era colocada no frasco diariamente após cada análise. Os resultados demonstraram que as amostras coletadas dos corpos-de-prova imersos em água acumularam maior quantidade de formaldeído liberado

de acordo com o tempo, ou seja, a quantidade de formaldeído foi maior na amostra coletada em 10 dias do que em 5 e 1 dia para a resina autopolimerizável. As amostras, onde foi removida a camada de inibição dos discos de resina autopolimerizável, liberaram menor quantidade de formaldeído quando comparadas às outras amostras de resina autopolimerizável. Os discos de resina termopolimerizável liberaram pequena quantidade de formaldeído, sendo ainda menor para os discos de resina polimerizada por meio de microondas. Os resultados indicaram que esse método de análise é muito específico para quantificar o formaldeído liberado. Os corpos-de-prova imersos na saliva artificial, para determinar a influência do tempo na liberação de produtos pela resina acrílica autopolimerizável, mostraram que quanto maior o tempo transcorrido, menor a quantidade de produtos liberados. Após um dia de imersão, a liberação de formaldeído foi reduzida a metade, tendo sido a liberação de metacrilato de metila também maior no primeiro dia. A provável causa da formação do formaldeído liberado neste estudo é a oxidação do monômero residual metacrilato de metila. Dessa forma, o formaldeído liberado pode estar relacionado com a diferença de potencial alérgico entre as resinas autopolimerizáveis e termopolimerizáveis, uma vez que as resinas autopolimerizáveis liberam maior quantidade de monômero residual.

Tsuchiya et al.³⁵ (1994) determinaram a quantidade de formaldeído e de metacrilato de metila residual liberados pelas resinas acrílicas, assim como sua citotoxicidade. Dessa forma, foram confeccionados corpos-de-prova, com 8,5 mm de diâmetro e 2 mm de altura, com três diferentes tipos de resina (Rebaron nº 3 autopolimerizável, Acron nº 8 termopolimerizável e Acron MC nº 8 polimerizada por meio de microondas) e submetidos a diferentes testes. Alguns foram colocados na cavidade oral de indivíduos saudáveis e outros foram imersos em saliva artificial. Os discos de resina autopolimerizável foram colocados na cavidade oral para estimulação da saliva por 5 minutos. Para quantificar o formaldeído liberado, foi utilizada a análise de injeção de fluxo. A quantidade de metacrilato de metila foi analisada pela cromatografia líquida. Para análise da citotoxicidade, soluções de formaldeído ou metacrilato de metila foram misturadas ao meio de cultura contendo células na concentração de $6,0 \times 10^6$ células/ml e incubadas à 37°C por 2, 3 e 5 dias. Os resultados obtidos foram comparados ao número de células do grupo controle (células incubadas na ausência de substâncias liberadas pelos discos). Para se

testar um método que promovesse a liberação prévia de formaldeído e de metacrilato de metila, as técnicas de quantificação de produtos tóxicos e de citotoxicidade, descritas anteriormente, foram também aplicadas a discos de resina autopolimerizável imersos em água a temperatura ambiente, 20°C ou 50°C por 60 minutos. Os resultados mostraram que ocorreu liberação de formaldeído e de metacrilato de metila em todas as imersões e que o conteúdo liberado in vitro foi maior do que o in vivo. Observou-se também que há uma maior liberação de produtos pelas resinas autopolimerizáveis do que pelas resinas polimerizadas pelo calor e por meio de microondas. Em relação ao teste de citotoxicidade, tanto o formaldeído como o metacrilato de metila foram tóxicos às células, porém, o formaldeído mostrou ser citotóxico em menores concentrações. A imersão em água reduziu a quantidade de subprodutos liberados. Assim, a imersão das próteses de resina acrílica em água a 50°C antes da instalação, pode diminuir seu potencial citotóxico.

Lygre et al.³⁶ (1995) realizaram um estudo com o objetivo de separar, identificar e quantificar os componentes orgânicos liberados in vitro de alguns polimetacrilatos de metila para base de próteses. Dessa forma, corpos-de-prova de uma resina termopolimerizável (Vertex 5RS) e duas autopolimerizáveis (Palpress Vario e Swebond Compact) foram confeccionados de acordo com as instruções dos fabricantes com 50 mm de diâmetro e 0,5 mm de altura. A resina termopolimerizável foi submetida a dois tipos de processamento, um com temperatura de 100°C por 65 minutos e o outro com temperatura de 80°C por 45 minutos, ambos sob compressão. A resina autopolimerizável Palpress Vario foi processada a uma temperatura de 55°C por 15 minutos e a Swebond Compact a 40°C por 10 minutos, ambas sob compressão de 0,2 MPa. Depois da confecção, os corpos-de-prova foram colocados em solução de Ringer (40,5 g de NaCl, 89 g de KCl, 1,125 g de CaCl₂, água destilada, pH=6,0) por 7 dias ou em etanol por 20 horas para que ocorresse a liberação dos produtos. Vários testes foram utilizados para identificar e quantificar os produtos liberados pelas resinas, entre eles, a cromatografia a gás, a espectrometria de massa e a cromatografia líquida. Os resultados mostraram que várias substâncias são liberadas pelas resinas, como os componentes orgânicos, aditivos e outras substâncias incorporadas durante a manipulação ou decorrentes da degradação de produtos. Nesse estudo foi

observado que há uma relação inversa entre a temperatura de processamento e a quantidade de produtos liberados, ou seja, quanto maior a temperatura de processamento, menor a quantidade de produtos liberados. Outros estudos mostraram que as resinas a base de polimetacrilato de metila liberam substâncias como o monômero metacrilato de metila, ácido metacrílico, ácido benzóico, difenil benzoato e formaldeído. Porém, os componentes responsáveis pelo efeito citotóxico das resinas para base de próteses ainda não foram totalmente identificados.

Craig³⁷ (1997) relatou que o nível de monômero residual é reduzido a 6,6% após o processamento de uma resina por 1 hora a 70°C. Após o mesmo período a 100°C, o nível de monômero residual é diminuído para 0,31%, indicando, assim, que o acréscimo de 1 hora a 100°C no ciclo de polimerização deve ser indicado. Contudo, a temperatura não pode chegar a fervura antes que a maior parte da polimerização tenha sido completada. O autor relatou, ainda, que o armazenamento de próteses por vários dias em temperaturas acima de 50°C e sem o contato com o oxigênio reduz a quantidade de monômero residual. Havendo evidências de que o metil metacrilato possui pobre biocompatibilidade, todo método que visa eliminar ou reduzir o monômero deve ser realizado.

De acordo com Anusavice¹⁰ (1998) o aquecimento das resinas termopolimerizáveis em temperaturas acima de 60°C faz com que as moléculas de peróxido de benzoíla entrem em decomposição formando os radicais livres. Em seguida, cada radical reage com uma molécula de monômero disponível, iniciando o crescimento da cadeia polimérica, ou seja, iniciando o processo de polimerização. Nesse caso, o calor é denominado o ativador da reação e, o peróxido de benzoíla, o iniciador. Segundo o autor, dois ciclos de termopolimerização são utilizados com sucesso: 1) processamento em banho de água quente com temperatura constante de 74°C por 8 horas e 2) processamento a 74°C por 2 horas seguido por mais uma hora a 100°C. A polimerização das resinas acrílicas também pode ser iniciada por energia de microondas, tendo como principal vantagem a redução do tempo de polimerização, com propriedades físicas comparáveis às aquelas descritas para as resinas termopolimerizáveis. Além dos métodos mencionados, a ativação química também pode ser utilizada para iniciar a polimerização das resinas acrílicas por meio da adição de uma amina terciária ao monômero, a qual promove a decomposição do peróxido de benzoíla. Uma das desvantagens das resinas quimicamente ativadas,

em relação às termopolimerizáveis, é a maior quantidade de monômero residual, resultando na redução da resistência transversa e comprometendo sua biocompatibilidade.

Bartoloni et al.³⁸ (2000) fizeram um estudo com o objetivo de determinar o grau de conversão de monômero em polímero de resinas acrílicas, com variação da técnica de polimerização. Os autores utilizaram uma resina de ciclo longo, polimerizada em água a 74°C por 9 horas (Lucitone 199), uma polimerizada por meio de microondas a 500 W por 3 minutos (Acron MC) e outra de ciclo rápido, polimerizada em água a 100°C por 20 minutos (Accelar 20). Três corpos-de-prova de cada resina foram confeccionados, de acordo com as instruções dos fabricantes, medindo 50 x 50 x 1 mm, servindo a resina Lucitone 199 como grupo controle. Logo após a demuflagem, os corpos-de-prova foram preparados para análise em espectrometria infravermelha. Os resultados mostraram que o grau de conversão da resina polimerizada por meio do ciclo rápido foi significativamente menor do que as outras resinas, porém, todos os materiais excederam a conversão de 90%, indicando um alto grau de conversão de monômero em polímero.

Sabendo-se que o grau de conversão de monômero em polímero influencia as propriedades físicas das resinas acrílicas, Lee et al.³⁹ (2002) avaliaram o efeito da temperatura, da pressão e do ambiente de polimerização (água ou ar), sobre a quantidade de monômero residual liberada e sobre a dureza de uma resina autopolimerizável (Alike) e de uma termopolimerizável (Namilon). Para o estudo, discos de resina foram confeccionados com 17 mm de diâmetro e 2 mm de espessura. Os corpos-de-prova da resina Namilon foram polimerizados em água em ebulição por 60 minutos e serviram como grupo controle positivo. Os corpos-de-prova da resina autopolimerizável foram confeccionados variando-se a temperatura (24°C ou 50°C), a pressão (sem pressão ou a 250kPa) e o ambiente em que ocorreu a polimerização (água ou ar). As amostras polimerizadas em condição ambiente (24°C, sem pressão e no ar), serviram como grupo controle negativo. Após a confecção, os corpos-de-prova foram armazenados em água destilada por 7 dias a 37°C para a extração do monômero residual. Depois desse período, a quantidade de monômero residual foi determinada por meio da cromatografia líquida de alta performance. Os resultados mostraram que a resina autopolimerizável processada em condição ambiente (grupo controle negativo), liberou quantidade de monômero

residual significativamente maior do que os outros grupos, com valores de dureza significativamente menores. Os corpos-de-prova polimerizados em água quente (50°C), com ou sem pressão, produziram menor grau de liberação de monômero residual com maiores valores de dureza melhorando, assim, as propriedades físicas e reduzindo os efeitos citotóxicos das resinas autopolimerizáveis.

Uma vez que os monômeros residuais liberados por diferentes resinas são considerados potencialmente citotóxicos, Lai et al.⁴⁰ (2004) verificaram a citotoxicidade do líquido de uma resina acrílica autopolimerizável, utilizada para confecção de coroas provisórias e duas resinas acrílicas utilizadas para o reembasamento de base de próteses. Segundo os seus fabricantes, o monômero da resina AlikeTM é o metil metacrilato, o da resina Kooliner é o isobutil metacrilato e o da resina Tokuso Rebase é o 1,6-hexanodiol dimetacrilato. Para a análise da citotoxicidade, foram utilizados fibroblastos gengivais humanos e células do ligamento periodontal. Os resultados demonstraram que todos os monômeros foram citotóxicos para ambos os tipos de células e que o 1,6-hexanodiol dimetacrilato foi mais citotóxicos do que os outros líquidos testados. Os autores relataram que a citotoxicidade como fator primário da biocompatibilidade é geralmente determinada por testes in vitro com o uso de cultura de células. Em comparação com os testes in vivo, os testes in vitro são mais facilmente controlados, porém não podem ser quantitativamente correlacionados com as situações clínicas.

Munksgaard⁴¹ (2004) avaliou a perda dos plastificantes ftalato, glicolato butil ftalil, benzil benzoate, metil salicilate e benzil salicilate de quatro materiais de revestimento macios. 0,1% de solução aquosa de Triton X-100 foi utilizada como meio de imersão, uma vez que a solubilidade do plastificante neste meio foi próximo ao da saliva. A perda de plastificante foi monitorada até 30 dias após a mistura. Para dois dos materiais, a quantidade média de ftalato liberado no primeiro dia excedeu a ingestão diária tolerável para um adulto médio. Da mesma forma, para estes dois materiais, a quantidade média diária nos primeiros 30 dias de ftalato liberado foi de 2,2 e 6,6 vezes maior do que o limite, respectivamente. O acumulado liberado com mais de 30 dias para cada um dos quatro materiais foi de 128-253 mg/g de plastificante. Os resultados indicaram a necessidade de novas avaliações biológicas destes produtos.

Bayraktar et al.⁴² (2006) avaliaram a influência de diferentes métodos de polimerização, tipos de processamento e tempo de armazenamento em água sobre o conteúdo de monômero residual de resinas acrílicas. O monômero residual de 120 amostras foi medido por meio de cromatografia líquida de alta performance. Para as resinas termopolimerizáveis, o menor conteúdo de monômero residual foi obtido para o ciclo longo seguido do armazenamento em água destilada por 24 horas. Para as resinas autopolimerizáveis, o menor conteúdo de monômero residual foi obtido quando polimerizadas em água a 60°C e armazenadas em água destilada por 24 horas. Para as resinas polimerizadas por meio de microondas, o menor conteúdo de monômero residual foi obtido quando foram armazenadas em água destilada por 1 mês. Os autores concluíram que diferentes métodos de polimerização e diferentes tipos de processamento têm efeitos sobre o conteúdo de monômero residual. Além disso, foi demonstrado que o armazenamento em água destilada a 37°C é um método simples e eficaz na redução do monômero residual.

Com o objetivo de avaliar o monômero residual liberado de reembasadores resilientes polimerizados por diferentes métodos, León et al.⁴³ (2008) testaram dois materiais: Ever-Soft polimerizado por banho de água quente ou por energia de microondas, e Light Liner polimerizado quimicamente e por luz visível (polimerização dual). O monômero residual liberado foi mensurado em 12 espécimes (40 mm x 10 mm x 0,3 mm) fabricados para cada material e para cada método de polimerização. Os espécimes foram armazenados em água destilada por 168 horas a 37°C, e analisados diariamente por espectrometria ultravioleta. O monômero residual liberado em relação ao tempo foi determinado por análise de regressão polinomial. Os resultados mostram que o monômero residual liberado em 168 horas de teste ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) em espécimes polimerizados por banho de água quente foi significativamente maior que em espécimes processados por energia de microondas. Ever-Soft mostrou uma redução na liberação de monômero residual com o tempo, tendendo a se estabilizar em 96 horas. Light Liner continuou a liberar monômero com o tempo. Os autores concluíram que Ever-Soft pode ser polimerizado por energia de microondas. Os valores de monômero residual liberado foram baixos e os níveis de monômero diminuíram com o tempo.

Urban et al.⁴⁴ (2009) avaliaram o efeito do banho de água a 55°C durante 10 minutos sobre o conteúdo de monômero residual, grau de conversão,

resistência flexural e dureza de quatro resinas reembasadoras: Kooliner e New Truliner (monômeros monofuncionais), Ufi Gel Hard e Tokuso Rebase Fast (monômeros bifuncionais). Para avaliar o conteúdo de monômero residual foram confeccionadas 12 amostras, em forma de discos, de cada material e estas foram armazenadas em saliva artificial a 37°C. O monômero residual e os plastificantes liberados foram analisados por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC). O grau de conversão das resinas foi avaliado utilizando espectroscopia FT-Raman. Para esta análise 10 amostras de cada material foram confeccionadas. Os resultados mostraram que o banho de água produziu uma diminuição significativa na quantidade de monômero residual e plastificantes liberados em relação ao grupo controle. O banho de água aumentou o grau de conversão das resinas Kooliner e Tokuso Rebase Fast e a dureza das resinas New Truliner, Kooliner e Tokuso Rebase Fast. Somente a resina Kooliner mostrou aumento na resistência à flexão após o banho de água. Os autores sugeriram que clinicamente a imersão de próteses reembasadas em água a 55°C por 10 minutos poderia reduzir a quantidade de componentes residuais melhorando, assim, as propriedades mecânicas e biológicas de alguns dos materiais avaliados.

2.2 Avaliação da citotoxicidade

Leirskar e Helgeland⁴⁵ (1972) realizaram um experimento com o objetivo de estabelecer um teste de biocompatibilidade de alguns materiais dentários, utilizando cultura de células. Foram avaliados o crescimento celular próximo ao material, a adesão e o crescimento na superfície do material após longo período de contato. Foram preparados corpos-de-prova, na forma de discos com 30 mm de diâmetro e 1 mm de espessura dos seguintes materiais: liga de ouro (Gamma cast golg), amálgama de prata (DAB Standard Alloy), amálgama de cobre (Silbrin), duas resinas acrílicas termopolimerizáveis (QC 20 e Blident), cimento de silicato (Bio-Trey 9) e resina composta Addent 12. Com exceção da liga de ouro, os discos foram avaliados após 6 dias da confecção. Para a esterilização dos discos, os mesmos foram lavados em água destilada e tratados com atmosfera com 15% de óxido de etileno no ar por 30 minutos, menos os discos de cimento de silicato, que foram enxaguados em meio estéril contendo antibióticos para evitar a desidratação e

rachaduras. Discos de poliestireno foram utilizados como grupo controle. Os discos foram, então, colocados no centro de placas de Petri (100 mm x 20 mm) esterilizadas. Em seguida, 2×10^6 células e 25 ml de meio de cultura foram transferidos para cada placa e armazenados a 37°C com atmosfera com CO₂ no ar. As células utilizadas foram fibroblastos de hamster (L 929) e células epiteliais humanas (NCTC 2544) propagadas em meio de cultura Eagle acrescido de 10% de soro fetal bovino. Para análise do crescimento celular, as células foram contadas e realizou-se a estimativa do conteúdo de DNA em dois momentos: 1- no meio de cultura que foi removido das placas de Petri contendo os discos após 1, 3 e 6 dias e 2- nas células desprendidas dos corpos-de-prova após tratamento com tripsina (utilizada para desprender as células aderidas em alguma superfície). Os resultados desse estudo mostraram que as resinas acrílicas e a liga de ouro não inibiram o crescimento celular ao redor dos discos. Porém, o crescimento na superfície dos discos de resina foi menor do que o grupo controle para os fibroblastos de hamster após 24 horas de incubação e para os outros períodos o crescimento foi similar ao grupo controle. Ao redor dos discos de cimento de silicato houve uma inibição do crescimento de fibroblastos de hamster, sendo significativamente mais baixo após 3 dias provavelmente devido à liberação de ácido fosfórico. Após 6 dias, porém, não houve diferença significativa em relação ao grupo controle. O crescimento celular na superfície dos discos de silicato também foi inibido em relação ao grupo controle, assim como a síntese de DNA. Tanto para o amálgama de prata como para o de cobre não foi encontrada inibição do crescimento celular ao redor dos discos, porém, na superfície dos mesmos, o efeito citotóxico foi observado. Ao redor dos discos de Addent 12, o crescimento celular foi significativamente reduzido para ambos os tipos de células e a quantidade de DNA obtida, após 6 dias de incubação, foi de 50 a 70% do grupo controle. Os autores concluíram que o presente método é uma técnica simples para contagem das células e avaliação da adesão celular nos materiais dentários. O mais importante aspecto do método de cultura de células, porém, é a possibilidade de estudar o mecanismo de interação entre o material dentário e as células, tanto para a adesão como para avaliar o efeito das substâncias liberadas sobre o metabolismo celular.

Wennberg⁴⁶ (1986) realizou uma revisão de literatura com o objetivo de analisar diferentes métodos de citotoxicidade e discutir alguns problemas a eles

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

Hensten-Pettersen¹⁶ (1988) realizou uma revisão de literatura com o objetivo de comparar os métodos que avaliam a citotoxicidade dos materiais dentários. O autor relatou que diferentes métodos podem ser usados para monitorar os efeitos citotóxicos, como a inibição do crescimento celular, a citólise, as modificações na membrana ou no citoplasma e as alterações na atividade metabólica. Além disso, explicou que os testes de citotoxicidade podem ser divididos em iniciais, os quais envolvem o método de cultura de células, testes secundários, que incluem os estudos com implantação dos materiais testados em tecidos subcutâneos, testes de sensibilidade e irritação da membrana mucosa e os testes

pré-clínicos, que verificam a irritação pulpar e os implantes dentais. Dentre os testes utilizados para a análise da citotoxicidade dos materiais dentários, temos o método de incorporação de ^3H -timidina, o qual mede a síntese de DNA das células viáveis. Muitos testes de citotoxicidade são realizados por meio da utilização de extratos, obtidos a partir do contato entre as amostras dos materiais e o meio de cultura. Quando da obtenção de extratos, o autor relatou alguns dos fatores que podem influenciar nos resultados, como o tempo e a temperatura para a extração e a média entre o volume do meio e a superfície do corpo-de-prova. Contudo, o autor concluiu que alguns materiais dentários apresentaram-se tóxicos em alguns estudos e não tóxicos em outros, dependendo das condições em que os testes foram realizados, mostrando, assim, a necessidade da padronização dos testes de citotoxicidade.

Okita e Hensten-Pettersen⁴⁷ (1991) avaliaram a citotoxicidade dos condicionadores de tecido, classificados como metacrilatos e similares às resinas para base de próteses convencionais. Para isso, foram confeccionados corpos-de-prova de quatro condicionadores de tecido (Coe Comfort, GC Soft-Liner, Kerr FITT e Visco-Gel) com 12 mm de diâmetro e 2 mm de espessura, em condições assépticas e de acordo com as instruções do fabricante. Os corpos-de-prova foram armazenados em meios de cultura Eagle sem soro fetal bovino ou antibióticos por 1 hora, 24 horas, 8 e 15 dias à temperatura de 37°C. Paralelamente, fibroblastos de hamster (L929) foram propagados em Eagle suplementado com bicarbonato, 5% de soro fetal bovino, 100 µg/ml de penicilina, 100 IU/ml de estreptomicina e 1,25 µg/ml de anfotericina B. Depois de dois dias de incubação, foi adicionado ágar para solidificação do meio. Após a solidificação, os corpos-de-prova foram colocados sobre a superfície do ágar. A esse conjunto foram adicionadas as amostras contendo as substâncias liberadas pelos condicionadores. Após 24 horas de incubação a 37°C em umidade atmosférica de 4% de CO₂, as culturas foram examinadas no microscópio invertido analisando-se a lise e alterações celulares. Discos de polietileno foram utilizados como grupo controle negativo e de polivinilclorido como positivo. Como resultado, foi observado que o grupo controle negativo não causou alterações morfológicas nas células e que o positivo causou severa lise e alteração celular. Todos os condicionadores utilizados nesse estudo foram tóxicos às células e, no período de 15 dias, não houve diminuição significativa

da citotoxicidade, período esse que não excede a recomendação para a aplicação clínica dos condicionadores.

Pelo fato dos testes de citotoxicidade *in vitro* apresentarem um grande número de métodos e materiais, as normas da International Standard Organization (ISO) 10993-5⁴⁸ (1992) padronizam esses testes e selecionam o método para análise da citotoxicidade mais apropriado para cada material testado. Com isso, três categorias de testes foram listadas: o teste que utiliza extratos, o teste onde há o contato direto do material testado com as células utilizadas e o teste onde o contato é indireto, por meio da difusão em ágar ou filtros Millipore. Os diferentes métodos que avaliam a citotoxicidade dos materiais testados podem ser agrupados em categorias de acordo com o tipo de análise, tais como a avaliação dos danos pela morfologia celular, medida das células danificadas, medida do crescimento celular e medida de aspectos específicos do metabolismo celular. Os grupos controle negativo e positivo são bem definidos nessas normas, sendo o primeiro responsável por não provocar citotoxicidade, como, por exemplo, discos de polietileno e o segundo responsável por promover a citotoxicidade, como o polivinilclorido. Quando da produção de extratos, alguns tempos e temperaturas são recomendados, sendo que na temperatura de 37°C, o tempo não deve ser menor do que 24 horas. Além disso, a média entre a superfície do corpo de prova e o volume do meio utilizado para a extração deve estar entre 6 cm²/ml e 0,5 cm²/ml. O tipo de célula L 929 é uma das linhagens recomendadas pela ISO 10993-5 para a realização dos testes de citotoxicidade. Contudo, a citotoxicidade dos materiais testados pode ser determinada quantitativamente, por meio da verificação do número de colônias, proliferação ou inibição celular ou qualitativamente, pela utilização da microscopia, onde são observadas a morfologia, vacuolização e lise celular.

Silicones para impressão dentária são utilizados para gravar a geometria dos tecidos moles e duros. Eles são considerados dispositivos médicos e a avaliação da citotoxicidade é um passo necessário para testar sua biocompatibilidade. Por isso, Ciapetti et al.⁴⁹ (1998) avaliaram a citotoxicidade de seis silicones de adição e seis silicones de condensação usando as células L929. A citotoxicidade foi avaliada por três métodos diferentes: captação de vermelho neutro, coloração por iodeto e coloração de amido preto. De acordo com os ensaios

específicos selecionados, o contato entre células e extratos de cada material foi mantido por 24 horas na primeira parte dos experimentos, em seguida, considerando que, em aplicação *in vivo* destes materiais é restrita há alguns minutos, experimentos adicionais foram realizadas após 1 hora de contato entre células e extrato. A análise dos resultados mostrou que os silicones por adição não foram tóxicos, mesmo quando testados após exposição prolongada das células, enquanto que os silicones de condensação foram considerados citotóxicos após 24 horas de incubação. No entanto, o dano ao paciente realmente poderia ser desprezível, considerando seu pouco tempo de exposição *in vivo*. Este aspecto foi suportado pela descoberta de que a maioria dos materiais testados não foi tóxica após 1 hora de contato com as células. Os autores sugeriram que as condições experimentais dos testes de citotoxicidade são relevantes para a situação *in vivo*, por conseguinte, o tempo de exposição deve ser concebido com cuidado.

Com o objetivo de verificar a concentração de monômero residual e de metacrilato de metila liberados por diferentes resinas acrílicas comercialmente disponíveis, assim como determinar a sua citotoxicidade, Kedjarune et al.⁵⁰ (1999) realizaram um estudo utilizando três resinas autopolimerizáveis (Takilon, Tokuso e Meliodent) e três termopolimerizáveis (Rodex, Trevalon e Meliodent). Para isso, 15 corpos-de-prova de cada material foram obtidos, de acordo com as instruções dos fabricantes, com 8 mm x 35 mm x 3 mm, tendo sido 10 utilizados para determinar a concentração de monômero residual imediatamente após a confecção e 5 colocados em tubos contendo saliva para análise do metacrilato de metila liberado pelo método da cromatografia à gás. Para o teste de citotoxicidade, meio de cultura contendo fibroblastos gengivais humanos foi misturado com soluções de metacrilato de metila em diferentes concentrações e a viabilidade celular foi verificada pelo ensaio MTT. Os resultados mostraram que todas as resinas testadas apresentaram conteúdo de monômero residual e que sua quantidade não depende apenas do tipo de polimerização, mas também da proporção pó-líquido e do método de processamento. Quanto maior a quantidade de líquido adicionada à mistura, maior foi a quantidade de monômero residual. Além disso, quando o tempo de polimerização foi aumentado, a quantidade de monômero foi reduzida. Em relação ao teste de citotoxicidade, observou-se que quanto maior a concentração de metacrilato de metila na solução, maior é o seu efeito citotóxico. Outros estudos

mostraram que para uma concentração de 10 µg/ml de células epiteliais ou leucócitos, o metacrilato de metila foi citotóxico após 1 minuto de incubação e, após 30 minutos, a maioria das células estava totalmente desintegrada.

Tang et al.²⁶ (1999) compararam diferentes metodologias que avaliam a citotoxicidade dos materiais resinosos. Para isso, corpos-de-prova de alguns materiais resinosos foram confeccionados, de acordo com as instruções dos fabricantes, medindo 2 mm de espessura e 8 mm de diâmetro, os quais foram divididos em dois grupos: 1) corpos-de-prova com remoção da camada de inibição de oxigênio com acetona 99% e 2) corpos-de-prova sem remoção da camada de inibição de oxigênio. As amostras de cada grupo foram expostas a cultura de fibroblastos gengivais humanos por meio do contato direto (corpos-de-prova colocados sobre as células e células colocadas sobre os corpos-de-prova) ou por contato indireto (corpos-de-prova colocados sobre membranas contendo poros e células em contato com os extratos dos corpos-de-prova). Discos de vidro estéreis, com as mesmas dimensões das amostras em resina serviram como grupo controle negativo para cada grupo experimental acima descrito. Para a análise da citotoxicidade, três testes foram realizados após 1, 3 e 6 dias de exposição: teste MTT, que avalia a viabilidade celular por meio da atividade mitocondrial, teste do vermelho neutro, que avalia o número de células mortas e o teste que avalia a viabilidade celular pela síntese de DNA por meio da incorporação de um radioisótopo (³H-timidina). Os autores observaram que o contato direto dos discos de vidro com os fibroblastos causaram inibição do crescimento em comparação com as células cultivadas em contato indireto, tanto para o teste MTT como para o teste da incorporação de ³H-timidina. Dessa forma, os autores concluíram que, apesar da necessidade do grupo controle, o contato direto dos discos de vidro com as células pode influenciar na viabilidade celular, não pela liberação de substâncias tóxicas, mas sim por fatores físicos. Além disso, os resultados mostraram que a remoção da camada de inibição de oxigênio dos corpos-de-prova reduziu a citotoxicidade dos materiais. O estudo mostrou, também, que o teste da incorporação de ³H-timidina foi mais sensível do que o teste MTT. Assim, os autores concluíram que a utilização de diferentes métodos fornece informações mais completas sobre a citotoxicidade dos materiais resinosos.

Wagner et al.⁵¹ (1999) compararam em seu estudo que diferentes métodos para a análise da proliferação de linfócitos caninos, descreveram o teste MTT como sendo um método capaz de identificar a viabilidade celular por meio da enzima desidrogenase succínica, porém, não se mostrou preciso na identificação da proliferação de linfócitos caninos, sendo eficaz para isso, o teste da incorporação de ³H-timidina. Além disso, os autores citaram algumas desvantagens do teste ³H-timidina, como a necessidade de um equipamento especial de alto custo e a utilização de uma material radioativo e que, apesar disso, tal teste tem sido amplamente utilizado na determinação da proliferação celular.

Sabendo-se que a morte celular por apoptose é um processo ativo e fisiológico caracterizado por fragmentação nuclear, condensação da cromatina e preservação da integridade estrutural na ausência de reação inflamatória e que a morte celular por necrose é um processo degenerativo caracterizado pela ruptura da membrana plasmática e liberação das organelas na presença de reação inflamatória, Cimpan et al.⁵² (2000) determinaram a capacidade de indução de morte celular por necrose e/ou apoptose de alguns polímeros a base de polimetil metacrilato. Para isso, foram confeccionados corpos-de-prova com 50 mm de diâmetro e 0,5 mm de espessura, em condições assépticas e de acordo com as instruções dos fabricantes, das resinas para bases de próteses termopolimerizáveis Vertex RS, Superacryl e Superacryl New e das resinas acrílicas autopolimerizáveis Vertex SC, Quick SR, Duracryl e Duracryl New. Imediatamente após a confecção, os corpos-de-prova foram colocados em placas de Petri, de 60 mm de diâmetro, juntamente com meio de cultura Eagle e armazenados por 24 ou 48 horas a 37°C para a obtenção de extratos. As médias entre massa de corpo-de-prova e volume de meio de cultura utilizado para a extração das substâncias possivelmente tóxicas foram de 0,2 g/ml, 0,4 g/ml e 0,8 g/ml. Meio de cultura Eagle, incubado sob as mesmas condições serviram como grupo controle negativo. Para os testes de citotoxicidade, células L 929 foram cultivadas em meio de cultura Eagle acrescido de antibióticos e soro fetal bovino. Os efeitos das substâncias testadas foram avaliados por meio de microscopia eletrônica, contagem de colônias e verificação do comprometimento de DNA por meio do teste Annexin V-FITC, o qual determina o tipo de morte celular. Para a contagem de colônias, as células L 929 foram propagadas sobre os discos de resina imersos em meio de cultura Eagle, de acordo

com as proporções entre massa e volume já mencionadas, ou em contato com os extratos previamente obtidos, tendo sido armazenadas por 10 dias. Para a realização do teste com Annexin V-FITC, as células L 929 foram propagadas em placas de 24 orifícios em contato com os extratos obtidos, coradas com o corante propidium iodide, o qual marca o DNA das células e armazenadas por 24 e 48 horas, possibilitando a verificação da redução do DNA das células mortas por apoptose. As células aderidas nos corpos-de-prova e as que cresceram em contato com os extratos obtidos foram fixadas para análise em microscopia eletrônica. Por meio da contagem de colônia, os resultados mostraram que quanto maior a média entre a massa do corpo-de-prova e o volume do meio, maior é a citotoxicidade do material testado, tendo sido as resinas autopolimerizáveis mais tóxicas das que as termopolimerizáveis. A ordem dos materiais testados do mais tóxico para o menos tóxico verificada foi Duracryl > Duracryl New > Quick SR > Supracryl > Vertex SC > Supracryl New > Vertex RS. Além disso, observou-se que o contato direto entre as células e os discos de resina provoca maior redução do número de colônias. Na média de 0,8 g/ml, observou-se maior número de morte celular por apoptose ou por necrose em relação às outras proporções utilizadas. Para todas as resinas acrílicas testadas e em todas as proporções utilizadas entre massa do corpo-de-prova e volume do meio foi verificado maior número de morte celular por apoptose em relação aos outros padrões, fato confirmado pela microscopia eletrônica. Os autores relataram a importância da verificação do padrão de morte celular, uma vez que a morte por necrose induz inflamação e injúrias no tecido. Dessa forma, uma reação mais severa do tecido pode ocorrer quando o material testado in vitro provocar morte celular por necrose.

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

Métodos de impedância são rotineiramente utilizados para estimar a concentração de bactérias viáveis numa cultura. Upadhyay e Bhaskar²⁸ (2000)

adaptaram um método de impedância para acompanhar o crescimento de linfócitos. Neste método, linfócitos foram cultivados em micro-poços modificados com óxido de índio-titânio transparente revestidos de eletrodos na parte inferior. O ensaio foi totalmente automatizado e não envolvia a manipulação de substâncias radioativas. Como o método utilizou um procedimento não destrutivo da proliferação, as células poderiam ser usadas para outros estudos após o ensaio. Devido ao monitoramento em tempo real de proliferação, os resultados foram ser obtidos no prazo de 30 horas, e informações adicionais, tais como a taxa de proliferação e da taxa limitar no tempo zero podem também ser calculado instantaneamente. De acordo com os mesmos autores, vários testes têm sido utilizados para determinar a viabilidade celular, apesar de possuírem algumas limitações. O teste da incorporação de 3H-timidina apresenta como desvantagem a utilização de uma substância radioativa e o teste MTT, apesar de simples, apresenta pobre resolução em comparação aos outros testes.

Costa⁵³ (2001) descreveu uma metodologia de pesquisa para avaliação da citotoxicidade dos materiais odontológicos baseada na contagem de células, no metabolismo celular (teste MTT), na verificação do halo de inibição e na morfologia celular por meio da utilização da microscopia eletrônica de varredura. Sabendo-se que os testes de citotoxicidade podem ser divididos em iniciais, secundários e pré-clínicos, o autor destacou que os resultados dos testes iniciais apresentam limitações quanto a sua correlação direta com a situação clínica, porém são muito importantes porque fornecem um rápido e consistente resultado com relação a sua atividade biológica. Além disso, grupos controle negativos e positivos são fortemente recomendados para que se faça a comparação com os resultados dos materiais em teste, tendo sido classificados os materiais, de acordo com a sua citotoxicidade, em não tóxico, discretamente tóxico, tóxico e severamente tóxico. O autor relatou, ainda, algumas vantagens e desvantagens dos testes de citotoxicidade. Dentre as vantagens, a possibilidade de tornar a metodologia dos testes padronizados reproduzível em diversos laboratórios de diferentes países, permitindo a comparação dos resultados obtidos. Outra vantagem do teste de citotoxicidade in vitro, quando comparado às investigações in vivo, é que os testes laboratoriais possibilitam a obtenção de resultados mais confiáveis devido à rara possibilidade de interferências técnicas. Além disso, o autor destacou que, apesar

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

Lefebvre et al.⁵⁴ (2001) determinaram a efetividade da adição de um antifúngico, que contém triclosan (Microban), em um material para base de prótese (PermaSoft) na inibição do crescimento de *C. Albicans*, bem como o seu efeito citotóxico. Para isso, foram confeccionados corpos-de-prova de PermaSoft, de acordo com as instruções do fabricante, com 5 mm de diâmetro e 1 mm de espessura, com ou sem Microban. Para determinar a citotoxicidade do material, uma suspensão de fibroblastos de hamster foi colocada em cada orifício de uma placa com 24 orifícios. Sobre as células, foram colocados os corpos-de-prova, com ou sem Microban, imediatamente após a confecção ou após cinco dias de armazenamento em saliva artificial. As células foram, então, incubadas por 48 horas a 37° C em estufa contendo 5% de CO₂. Células cultivadas em meio de cultura, sem entrar em contato com os discos, serviram como grupo controle negativo. Após o período de incubação, a atividade da enzima desidrogenase succínica foi analisada por meio do teste MTT, determinando, dessa forma, a citotoxicidade de cada grupo experimental. Para a verificação do crescimento do fungo sobre a superfície dos corpos-de-prova, os mesmos foram contaminados com *C. Albicans* e a formação de colônias foi avaliada. Apesar do grupo controle apresentar maior densidade óptica e, portanto, maior número de células viáveis, os resultados mostraram que não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos experimentais e controle, em relação à citotoxicidade do material testado.

Huang et al.⁵⁵ (2001) avaliaram a compatibilidade de três diferentes extratos de resina para base de prótese e compararam os efeitos citotóxicos destes materiais em linhagem de células do epitélio oral humano (KB) e em fibroblastos orais humanos primários derivados de mucosa bucal. Os extratos dos espécimes de resinas polimerizadas por calor, resinas autopolimerizáveis e resinas polimerizadas por luz, foram obtidos em meio de cultura por 1, 3 e 5 dias. A citotoxicidade foi avaliada utilizando o ensaio da redução do brometo de tetrazólio (MTT). Os extratos obtidos a partir das resinas para base de prótese autopolimerizáveis,

termopolimerizáveis e polimerizadas por luz foram citotóxicas para a cultura dos fibroblastos orais humanos e para as células KB quando comparadas ao controle. A resina autopolimerizável foi considerada a mais tóxica dos materiais para base de prótese analisados para as duas culturas de células e a polimerizada por luz foi a menos citotóxica. Os autores concluíram que os materiais testados e os sistemas de cultivo celular influenciam nos testes de citotoxicidade. Os autores ainda afirmaram que a utilização de células primárias e permanentes é recomendada para uma melhor análise dos efeitos citotóxicos das resinas para base de prótese.

Thonemann et al.⁵⁶ (2002) avaliaram o uso adequado de células utilizadas nos testes de citotoxicidade de materiais restauradores dentais com o objetivo de verificar a relevância clínica dos resultados desses testes. Foram comparadas as respostas citotóxicas de células primárias, derivadas de papila dental de bovino (CPC), com duas linhagens de células secundárias, derivadas destas células primárias (tCPC B e tCPC E) e com fibroblastos de ratos (L929), comercialmente adquiridos, após exposição a vários compostos de resina por 24 horas. A citotoxicidade foi avaliada mediante o teste MTT. Os autores verificaram o efeito citotóxico dos compostos de resina nos quatro tipos de células, porém, a sensibilidade foi menor para as células CPC e maior para as células L929. A diferença da sensibilidade entre as células sugere a presença de propriedades específicas estruturais e funcionais relevantes nos testes em vivo.

Jorge et al.⁵⁷ (2003) escreveram um artigo revisando a literatura publicada entre os anos de 1973 e 2000, sobre a citotoxicidade de materiais para base de próteses comparando diferentes tipos de resinas, diferentes métodos e diferentes ciclos de polimerização. Em resumo, os autores relataram que as resinas autopolimerizáveis são mais citotóxicas do que as termopolimerizáveis que, por sua vez, são mais citotóxicas do que as polimerizadas por meio de microondas. Em relação ao ciclo de polimerização, os autores observaram nos estudos avaliados que a quantidade de monômero residual, bem como a citotoxicidade, pode ser diminuída com o ciclo de 7 horas a 70°C seguido de 1 hora a 100°C. Além disso, os autores relataram que outros fatores podem influenciar na citotoxicidade desses materiais, como a proporção pó/líquido e o armazenamento das amostras em resina em água.

Com a proposta de comparar os efeitos de tratamentos térmicos na citotoxicidade de três resinas para bases de próteses Jorge et al.⁵⁸ (2004)

analisaram o teste de incorporação de ^3H -timidina e o teste MTT. Para a análise do efeito citotóxico das substâncias liberadas pelos corpos-de-prova, foram obtidos extratos das substâncias hidrossolúveis dessas amostras. Para isso, três corpos-de-prova de cada grupo experimental, após terem recebido os tratamentos térmicos, foram colocados dentro de tubos de ensaio com 9 ml de meio de cultura Eagle e incubados a 37°C por 24 horas. Durante esse período de incubação, as substâncias provavelmente tóxicas são difundidas para o meio de cultura, formando, assim, os extratos a serem utilizados nos testes de citotoxicidade. Um tubo de ensaio contendo apenas 9 ml de meio de cultura foi armazenado sob as mesmas condições, servindo, assim, como grupo controle negativo. Os resultados desse estudo mostraram que as substâncias liberadas das três resinas testadas foram mais citotóxicas para as células L 929 quando comparadas ao controle negativo no teste de incorporação de ^3H -timidina. Os tratamentos térmicos não reduziram a citotoxicidade dos materiais avaliados. O teste de incorporação ^3H -timidina classificou os materiais como discretamente citotóxicos, e o MTT, como não citotóxicos sendo, portanto, considerado menos sensível.

Jorge et al.⁵⁹ (2004) realizaram uma revisão de literatura com o objetivo de elucidar diferentes testes de citotoxicidade para alguns materiais dentários. Com isso, os autores concluíram que os testes de citotoxicidade utilizando o método da cultura de células são muito importantes, pois determinam o comportamento biológico dos materiais dentários e/ou de seus componentes e que os testes de citotoxicidade podem ser realizados utilizando-se várias metodologias, porém todas devem ser regulamentadas e padronizadas para serem reproduzidas em qualquer laboratório.

Park et al.⁶⁰ (2004) determinaram a influência da termociclagem sobre as alterações do módulo de elasticidade e cor, bem como sobre a citotoxicidade de condicionadores de tecido. Para o estudo, os autores utilizaram três reembasadores resilientes de curto prazo a base de resina acrílica (Coe Comfort (CCM), Coe Soft (CST) e Soft Liner (SFL)), e um reembasador de longo prazo a base de silicone (Tokuso Soft Liner (TSL)), servindo como grupo controle. Os testes foram realizados antes e após termociclagem de 500, 1000, 1500 e 2000 ciclos. Para avaliação da citotoxicidade, após a termociclagem, os corpos-de-prova foram colocados em meio de cultura por 24 horas, e o teste MTT foi realizado. Os autores

concluíram que, embora a citotoxicidade tenha diminuído depois de repetidos ciclos térmicos, os reembasadores resilientes de curto prazo devem ser utilizados dentro de um tempo limitado em função das alterações significativas de suas propriedades.

Sabendo-se que a polimerização complementar em microondas ou em banho de água pode diminuir a quantidade de monômero residual e, portanto, diminuir a citotoxicidade das resinas acrílicas, Campanha et al.⁶¹ (2006) objetivaram avaliar o efeito da polimerização complementar em microondas ou em banho de água aquecida sobre a citotoxicidade de seis reembasadores diretos (Tokusso Rebase Fast, Ufi Gel Hard, Duraliner, Kooliner, New Truliner e Light Liner). Para o desenvolvimento do estudo, corpos-de-prova das resinas acrílicas testadas foram confeccionados, na forma de disco, em condições assépticas e de acordo com as instruções dos fabricantes. Logo após a confecção, as amostras receberam tratamento em microondas, a seco, ou tratamento em banho de água aquecida. Em seguida, foram obtidos extratos dessas amostras para a realização dos testes de citotoxicidade. Os resultados mostraram que o teste de incorporação de ³H-timidina foi mais sensível do que o teste MTT. Além disso, os autores verificaram que o tratamento em banho de água inibiu a proliferação celular para os materiais Tokusso Rebase Fast, New Truliner e Light Liner. Já o tratamento em microondas, houve também aumento da citotoxicidade dos materiais Kooliner, New Truliner e Light Liner. Os autores concluíram que, para o teste de incorporação do radioisótopo, a polimerização complementar em microondas ou em banho de água aquecida diminuiu a citotoxicidade da resina acrílica Ufi Gel Hard.

Muitos autores têm discutido o processo de polimerização das resinas acrílicas em relação à conversão do monômero em polímero devido a sua importância na melhora da biocompatibilidade e das propriedades físicas. Para assegurar a utilização desses materiais, testes preliminares de citotoxicidade in vitro têm sido desenvolvidos para avaliação da biocompatibilidade. Um dos ensaios biológicos sugeridos para a análise da citotoxicidade é o teste de incorporação de ³H-timidina, o qual mede o número de células por meio da síntese de DNA. Jorge et al.⁶² (2006) avaliaram, por meio deste teste, a citotoxicidade de duas resinas acrílicas para base de próteses submetidas ao tratamento térmico em microondas e em banho de água após a polimerização. Nove corpos-de-prova em forma de discos (10 x 1 mm) foram confeccionados com as resinas acrílicas Lucitone 550 e QC 20 de

acordo com as instruções dos fabricantes, e foram armazenados em água destilada a 37°C por 48 horas. Os corpos-de-prova foram divididos em três grupos: 1) tratamento em forno de microondas por 3 min a 500 W; 2) tratamento em banho de água a 55°C por 60 min; e 3) sem tratamento térmico. Extratos foram preparados pela colocação de 3 discos em tubos de ensaio estéreis com 9 mL de meio de cultura Eagle e incubação a 37°C por 24 horas. O efeito citotóxico dos extratos foi avaliado utilizando o teste de incorporação de ^3H -timidina. Os resultados indicaram que os componentes liberados pelas resinas foram citotóxicos para as células L929 exceto para as amostras tratadas em banho de água. Em comparação com o grupo sem tratamento, o banho de água diminuiu a citotoxicidade das resinas acrílicas. Os autores concluíram que o tratamento em microondas não influenciou a citotoxicidade das resinas acrílicas para bases de próteses.

Hashimoto et al.⁶³ (2007) examinaram a citocompatibilidade de 8 plastificantes a base de ésteres de vinil livres de etanol e ftalatos. Foi medida a atividade estrogênica e a citotoxicidade destes plastificantes com fibroblastos humanos e queratinócitos usando o teste de estrógenos e o teste de morte mitocondrial, respectivamente. Também foi avaliada a citotoxicidade de 3 condicionadores de tecido comumente comercializados em fibroblastos humanos cultivados em géis de colágeno. Finalmente, foi medido o efeito desses materiais sobre a expressão das citoquinas em culturas em três dimensões pela cadeia de reação transcriptasa-polimerasa e teste de imunossorção de enzimas. Nenhum dos materiais testados teve atividade estrogênica. Um dos condicionadores de tecido contendo vinil octanato apresentou menor citotoxicidade que os materiais convencionais.

Jorge et al.⁶⁴ (2009) realizaram um estudo com o objetivo de avaliar o efeito do tratamento térmico em microondas e do tempo de armazenamento em água sobre a citotoxicidade de resinas acrílicas para base e reembasamento de próteses (Kooliner, Tokuyama Rebase II, New Truliner, Acron MC, Lucitone 550, QC 20). Para isso, corpos-de-prova das resinas termopolimerizáveis foram confeccionados e armazenados em água destilada a 37°C por 0, 24 ou 48 horas. Amostras de todas as resinas foram divididas em 2 grupos: (1) amostras sem tratamento térmico e (2) amostras submetidas a tratamento térmico em microondas. O teste da incorporação de ^3H -timidina foi utilizado para determinar a citotoxicidade

dos materiais. Os resultados mostraram que o tratamento térmico em microondas melhorou a biocompatibilidade do reembasador Tokuyama Rebase II. Tokuyama Rebase II sem tratamento térmico e Acron MC sem armazenamento, em ambos os grupos experimentais foram classificados como discretamente citotóxicos. No tempo zero, as demais resinas foram classificadas como não citotóxicas. Após 24 horas de imersão em água, todos os materiais foram classificados como não citotóxicos. Após o armazenamento em água por 48 horas, Acron MC sem tratamento térmico e QC 20, em ambos os grupos experimentais foram classificados como discretamente citotóxicas. Lucitone 550 foi classificada como não citotóxica em todos os grupos experimentais. Os autores concluíram que o tratamento térmico em microondas e o armazenamento em água podem ser considerados uma alternativa para a redução da citotoxicidade de algumas resinas para base e reembasamento de prótese.

Ozdemir et al.⁶⁵ (2009) avaliaram a citotoxicidade de cinco reembasadores resilientes comumente utilizados: Viscogel (VG), Ufi Gel P (UGP), Softliner (S), Coe-Soft (CS) e Molloplast-B (MB) em termos de citotoxicidade usando o teste MTT. Dezesesseis espécimes, em forma de disco, de cada material foram preparados (de acordo com as instruções do fabricante), em matriz de aço inoxidável (10 mm de diâmetro e 1,5 mm de espessura). As amostras foram incubadas por 24, 48, 72 e 96 horas em meio de cultura DMEM e após cada período de incubação, a citotoxicidade dos extratos cultivados de cada material foi medida através do teste de MTT. Os dados foram analisados estatisticamente através da análise de variância (ANOVA) e teste de Duncan. Apesar das limitações do estudo, os autores concluíram que o material CS revelou elevado efeito citotóxico em todos os períodos de incubação. Os reembasadores VG, UGP, S (exceto no período de 96 horas) e o MB apresentaram altas taxas de viabilidade celular nos diferentes períodos de incubação.

3 PROPOSIÇÃO

Com base na revisão da literatura, julgou-se conveniente a realização do presente estudo, que teve como objetivo avaliar, por meio do teste quantitativo de incorporação de 3H-timidina:

1. a citotoxicidade de diferentes tipos de materiais reembasadores resilientes em função do tempo de armazenamento em água;
2. o efeito de um tratamento térmico sobre a citotoxicidade desses materiais.

4 MATERIAL E MÉTODO

4.1 CONFECÇÃO DOS CORPOS-DE-PROVA

Neste estudo foram utilizados três reembasadores resilientes (dois a base de resina acrílica e um de silicone) indicados para o reembasamento de próteses, um condicionador de tecidos e uma resina acrílica termopolimerizável para base de próteses (Quadro 1).

Material	Marca Comercial	Composição	Proporção
Reembasador resiliente a base de silicone	Ufi-gel P (Voco)	Polidimetilsiloxanos modificados e catalisador de platina.	1:1 (comprimentos iguais das pastas base e catalisadora)
Reembasador resiliente a base de resina acrílica	Dentuflex (Densell)	Pó: Polietil metacrilato, Peróxido de benzoíla Líquido: N-Butil metacrilato, Dibutilftalato, Trimetacrilato, Dimetil-p-toluidina.	Pó: 2 g Líquido: 1 mL
Reembasador resiliente a base de resina acrílica	Trusoft (Bosworth)	Pó: Polietil metacrilato pigmentado, Pigmentos de cádmio (pigmento rosa) Líquido: Álcool etílico, Plastificante	Pó: 1,06 g Líquido: 1 mL
Condicionador de tecido	Dentusoft (Densell)	Pó: Polietil metacrilato, peróxido de benzoíla, óxido de titânio. Líquido: Dibutil ftalato, álcool.	Pó: 2 g Líquido: 1 mL
Resina acrílica termopolimerizável	Lucitone 550 (Dentsply)	Pó: copolímero (metil-n-butil) metacrilato, peróxido de benzoíla e corantes minerais. Líquido: Metacrilato de metila, etileno glicol dimetacrilato e hidroquinona.	Pó: 2,1 g Líquido: 1 mL

Quadro 1: Materiais e a sua composição.

Os corpos-de-prova dos reembasadores resilientes Dentuflex (Densell, Buenos Aires – Argentina), Trusoft (Bosworth Company, Illinois – USA) e Ufi Gel (Voco, Cuxhaven – Alemanha) e do condicionador de tecido Dentusoft

(Densell, Buenos Aires – Argentina) foram confeccionados, individualmente, de maneira asséptica, a partir de matrizes metálicas vazadas, em forma de discos contendo no seu interior um orifício medindo 10 mm de diâmetro e 1 mm de espessura (Figura 1-A). Os materiais foram proporcionados e manipulados de acordo com instruções dos fabricantes. O pó foi proporcionado em balança de precisão Gehaka (Ind. e Com. Eletro – Eletrônica Gehaka Ltda, São Paulo – Brasil) em Dappens esterilizados que foram individualizados para cada material. O volume de monômero foi dispensado com o auxílio de pipetas de vidro graduadas, tomando-se cuidado de se usar pipetas diferentes para cada material, tendo em vista que a citotoxicidade dos reembasadores está relacionada com cada tipo de monômero. Após a manipulação, os materiais foram inseridos nas matrizes vazadas e prensados manualmente entre duas placas de vidro esterilizadas com duas folhas de acetato, também esterilizadas, interpostas até o término da polimerização (Figura 1-B). Os corpos-de-prova (Figura 1-C) foram retirados das matrizes e o excesso de material de cada amostra foi recortado com uma tesoura esterilizada.

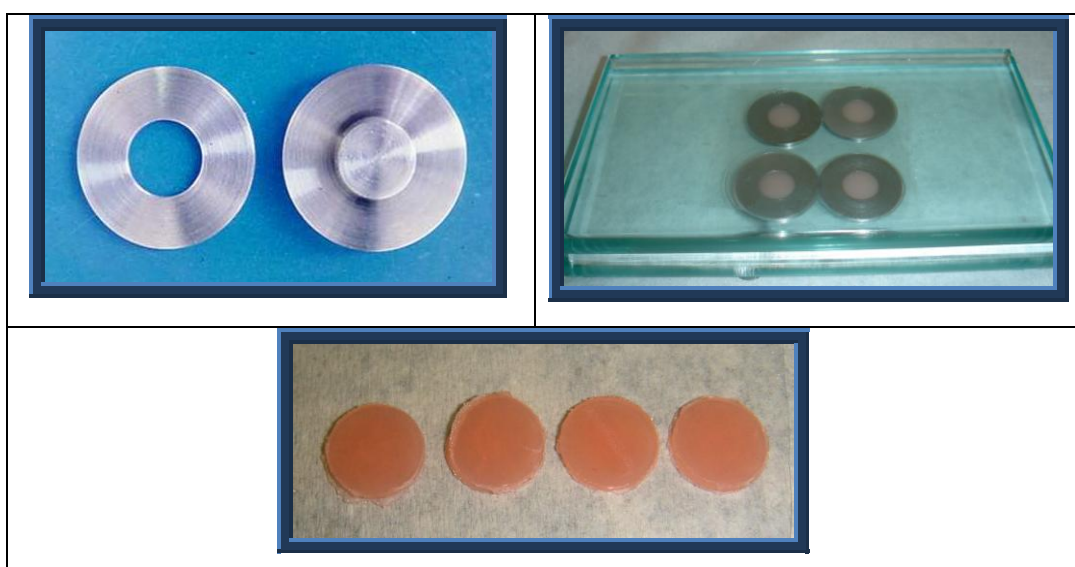


Figura 1: A. Matriz metálica. B. Materiais inseridos nas matrizes vazadas e prensados manualmente entre duas placas de vidro. C. Corpos-de-prova dos reembasadores resilientes.

Os corpos-de-prova da resina acrílica termopolimerizável Lucitone 550 (Dentsply Indústria e Comércio Ltda, Petrópolis - RJ – Brasil) foram confeccionados, também de maneira asséptica, a partir de matrizes metálicas, em forma de discos com 10 mm de diâmetro e 1 mm de espessura, previamente esterilizadas (Figura 2-A).

Foram obtidos moldes dessas matrizes com silicone de condensação Optosyl (Haraeus Kulzer GmbH & Co.KG, Hanau – Alemanha), os quais foram recortados para posterior inclusão em mufla. Para isso, primeiramente, as matrizes foram colocadas sobre uma placa de vidro recoberta com papel celofane e, sobre elas, o material leve foi posicionado com o auxílio de uma seringa para moldagem. Antes da presa do material leve, o denso foi acomodado e, então, outra placa de vidro com papel celofane foi posicionada. O conjunto foi levado à prensa hidráulica (Delta) até que as placas ficassem com um espaço de 10 mm entre elas, obtido pela colocação de espaçadores de metal. Após a presa do material, o molde foi recortado para posterior inclusão em mufla, sendo descartados os que apresentavam irregularidade ou bolhas.

Para a inclusão dos moldes e das matrizes ainda em posição, inicialmente, as muflas (metálica e plástica) foram isoladas com vaselina sólida e a parte inferior de cada uma delas foi preenchida com gesso pedra tipo III, na proporção de 100 gramas de pó para cada 30 ml de água, espatulado por 40 segundos. Antes da presa do gesso, o molde recortado foi inserido sobre ele até alcançar o nível da parte inferior da mufla (Figura 2-B). Após a presa, todo o conjunto foi recoberto com uma fina camada de isolante para gesso aplicado com pincel macio. A seguir, uma placa de vidro medindo 4,0 cm X 4,0 cm X 0,5 cm foi posicionada sobre o molde, e a parte superior da mufla, adequadamente isolada com vaselina sólida, foi adaptada e preenchida com nova porção de gesso pedra tipo III proporcionada sob as mesmas condições descritas anteriormente.

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

Para a prensagem e polimerização da resina acrílica termopolimerizável, o molde de silicone, juntamente com o gesso circundante, foram isolados com isolante para resina acrílica. Em seguida a resina, proporcionada e manipulada de acordo com as recomendações dos fabricantes, na sua fase plástica, foi inserida nos moldes de silicone até seu total preenchimento.

Posteriormente, as partes superior e inferior da mufla foram encaixadas e o conjunto foi levado novamente à prensa hidráulica sob pressão de 1,25 tonelada e assim mantido até que ocorresse a estabilização da pressão. Em seguida, os parafusos foram colocados em posição e a mufla foi retirada da prensa. Após o período de descanso de 30 minutos, a mufla foi imersa em água à temperatura de 73°C, assim permanecendo por 90 minutos e, em seguida, a temperatura foi elevada para 100°C e a mufla mantida por mais 30 minutos, utilizando-se um aparelho termopolimerizador.

Após a polimerização, a mufla foi deixada sobre a bancada para resfriamento por 30 minutos e, em seguida, colocada em água corrente por 15 minutos, de acordo com as recomendações do fabricante. Então, suas partes foram separadas e as amostras desincluídas. Finalmente, o excesso de material de cada amostra foi recortado com uma tesoura esterilizada (Figura 2-C).



Figura 2: A. Matrizes metálicas. B. Inclusão dos moldes na mufla. C. Corpos-de-prova de resina acrílica termopolimerizável Lucitone 550.

4.2 GRUPOS EXPERIMENTAIS

Doze corpos-de-prova de cada material foram confeccionados e divididos em quatro grupos anteriormente à realização do teste de citotoxicidade:

- Grupo N (GN): os corpos-de-prova não receberam nenhum tipo de tratamento ou armazenamento.
- Grupo 24 (G24): os corpos-de-prova foram armazenados em água destilada à 37°C por 24 horas.
- Grupo 48 (G48): os corpos-de-prova foram armazenados em água destilada à 37°C por 48 horas.

- Grupo AQ (GAQ): os corpos-de-prova, acondicionados em saquinhos plásticos, foram imersos em água a 55°C por 10 minutos em aparelho termopolimerizador. (Jorge et al.⁵⁸ 2004, Campanha et al.⁶¹ 2006, Urban et al.⁴⁴ 2009)

4.3 ESTERILIZAÇÃO DOS CORPOS-DE-PROVA

Os corpos-de-prova foram confeccionados dentro de condições assépticas para evitar a contaminação do meio de cultura. Assim, um único operador, atuando sobre uma superfície de papel estéril, confeccionou os corpos-de-prova utilizando instrumental esterilizado, roupas de proteção, luvas, óculos e máscaras descartáveis. Após terem sido armazenados e tratados termicamente, anteriormente à sua colocação no meio de cultura para a obtenção dos extratos, os corpos-de-prova foram colocados em sacos plásticos estéreis hermeticamente fechados e receberam banho de ultra-som (Ultrasonic Cleaner 1440D, Odontobrás, Ribeirão Preto – SP – Brasil) por 20 minutos. Em seguida, ficaram expostos à luz ultravioleta na capela de fluxo laminar (Veco do Brasil, Indústria e Comércio de Equipamentos Ltda, Campinas – SP – Brasil) (Figura 3) por mais 20 minutos para cada lado do corpo de prova com o objetivo de eliminar os possíveis microrganismos remanescentes (Pelka et al.⁶⁶ 2000, Jorge et al.⁵⁸ 2004, Campanha et al.⁶¹ 2006).



Figura 3: Esterilização na capela de fluxo laminar.

4.4 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS

Para a análise do efeito citotóxico das substâncias liberadas pelos corpos-de-prova, foram obtidos extratos das substâncias hidrossolúveis dessas amostras (Harrison e Huggett⁶⁷ 1992, Tsuchiya et al.²¹ 1993, Lefebvre et al.¹⁸ 1994, Pelka et al.⁶⁶ 2000, Jorge et al.⁵⁸ 2004, Campanha et al.⁶¹ 2006). Para isso, três corpos-de-prova de cada grupo experimental, após terem recebido o armazenamento em água e o tratamento térmico, foram colocados dentro de tubos de ensaio com 9 ml de meio de cultura DMEM (Instituto Adolfo Lutz, São Paulo – SP – Brasil), suplementado com 7,5% de soro fetal bovino (Instituto Adolfo Lutz, São Paulo – SP – Brasil) e 80 µg/ml de gentamicina (Indústria Química e Farmacêutica, Schering – Plough S/A, Rio de Janeiro - RJ – Brasil) (Figura 4), e incubados a 37°C por 24 horas. Durante esse período de incubação, as substâncias potencialmente tóxicas foram difundidas para o meio de cultura, formando, assim, os extratos que foram utilizados no teste de citotoxicidade. Um tubo de ensaio contendo apenas 9 ml de meio de cultura foi armazenado sob as mesmas condições, servindo, assim, como grupo controle negativo.

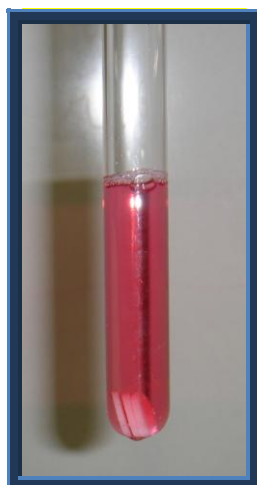


Figura 4: Corpos-de-prova em meio de cultura para obtenção dos extratos.

4.5 CULTURA E MANUTENÇÃO DAS CÉLULAS

O efeito citotóxico das substâncias liberadas pelos reembasadores foi avaliado pelo método de cultura de células. Dessa forma, fibroblastos de hamster

(L929 – Instituto Adolfo Lutz, São Paulo – SP - Brasil) foram propagados em meio de cultura de DMEM suplementado com 7,5% de soro fetal bovino e 80 µg/ml de gentamicina. O cultivo das células foi realizado em frascos para culturas de células com tampa contendo um filtro que permite a passagem de CO₂ (Costar, Corning Incorporated, Corning – NY – USA). Esses frascos foram incubados em estufa para cultura de células (Forma Scientific, Marietta – OH – USA) com 5% de CO₂, à temperatura de 37°C e ambiente com umidade controlada (Figuras 5).

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

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



Figura 5: Estufa para cultura de células e incubação de frascos.

4.6 QUANTIFICAÇÃO DAS CÉLULAS

Para a realização dos testes de citotoxicidade, uma suspensão de $1,0 \times 10^5$ células/ml de meio de cultura foi preparada. Para isso, as células foram descoladas do fundo da garrafa colocando-se tripsina. Em seguida, essa suspensão foi colocada em um tubo de 15 ml e levada para uma centrífuga especial autobalanceável (Fanem Ltda, São Paulo – SP – Brasil) (Figura 6-A), por 10 minutos a 1.500 rpm, com o objetivo de precipitar as células no fundo do tubo (Figura 6-B). Posteriormente, dentro da capela de fluxo laminar, o sobrenadante foi desprezado e 1 ml de meio de cultura DMEM, suplementado com 7,5% de soro fetal bovino e 80 µg/ml de gentamicina, foi acrescentado e as células misturadas a ele. A partir daí, 10 µl foram retirados e adicionados a 90 µl de corante azul de Tripán (Merck - Indústrias Químicas Rio de Janeiro – RJ – Brasil). Dessa solução, 10 µl foram removidos e introduzidos na câmara hemocitométrica tipo Neubauer (Boeco, Hamburg – Alemanha) (Figura 6-C) onde, então, as células viáveis foram contadas com a utilização de um microscópio óptico (Nikon – modelo YS 100, Tokyo – Japão) com aumento de 40x. Em seguida, a suspensão foi ajustada a uma concentração de $1,0 \times 10^5$ células/ml de meio de cultura para posterior utilização no teste de citotoxicidade, variando-se apenas o volume da suspensão.



Figura 6: A. Centrifugação da suspensão por 10 minutos a 1500 rpm. B. Células precipitadas. C. Contagem das células viáveis na câmara hemocitométrica Neubauer.

4.7 TESTE DE CITOTOXICIDADE

A citotoxicidade dos materiais foi analisada quantitativamente por meio da incorporação do radioisótopo ^3H – timidina (Amersham Pharmacia Biotech do Brasil Ltda, São Paulo – SP – Brasil) (Figura 7-A), verificando o número de células viáveis pela síntese de DNA.

Para a realização do teste, foi utilizada uma placa com 96 orifícios (Costar, Corning Incorporated, Corning – NY – USA) para cada material; em cada placa foi colocado 100 μl da suspensão contendo $1,0 \times 10^5$ células/ml, ou seja, $1,0 \times 10^4$ células/ml, em cada compartimento de cada placa com 96 orifícios e incubada em estufa com 5% de CO_2 , a 37°C por 24 horas. Após este período, o meio de cultura que alimentava as células foi descartado e 20 μl de meio de cultura DMEM contendo 0,25 μCi de ^3H – timidina foi inserido em cada orifício da placa juntamente com 50 μl de meio de cultura novo e 50 μl do extrato contendo as substâncias liberadas pelos corpos-de-prova de um material e incubada por 24 horas em estufa com 5% de CO_2 à temperatura de 37°C . Para cada grupo experimental de cada material, foram destinados cinco compartimentos da placa. Cinco orifícios de cada placa contendo as células aderidas receberam apenas a solução de timidina e 100 μl de meio de cultura DMEM novo, servindo, dessa forma, como grupo controle negativo (Figura 7-B). Após o período de 24 horas em contato com os extratos, o meio foi descartado e, em cada orifício da placa, foram colocados 50 μl de tripsina, sendo esta armazenada por 5 minutos na estufa a 37°C para que as células se desprendam do fundo do compartimento e fiquem em suspensão. Em seguida, as placas foram levadas para o aparelho Filtermate Harvester (Unifilter 96 GF/C – Packard Instrument Company, Meriden – CT – USA) (Figura 7-C), onde o sobrenadante foi desprezado e as células marcadas com material radioativo foram aspiradas, ficando presas em filtros de outra placa de 96 orifícios (Packard Instrument Company, Meriden – CT – USA). Após um período de 24 horas, as placas foram vedadas com um selador opaco na sua parte inferior e, então, 30 μl de líquido de cintilação (Microscint 20, Packard Instrument Company, Meriden – CT - USA) foram colocados em cada orifício. Posteriormente, um selador transparente foi colocado na parte superior das placas (Figura 7-D), levadas para análise da síntese de DNA em um contador de cintilação (Packard Instrument Company, Meriden – CT

– USA) (Figura 7-E). Através da vibração do líquido de cintilação, a qual ocorre devido à síntese de DNA, o contador cintilográfico realizou a leitura do número de células viáveis em cintilações por minuto (cpm). Todos os procedimentos foram repetidos, obtendo-se, assim, os resultados em duplicata (n=10).



Figura 7: A. ^3H – timidina. B. Placa de 96 orifícios com a suspensão de células. C. As células marcadas com material radioativo foram aspiradas pelo aparelho Filtermate Harvester. D. Células aderidas na placa 96 orifícios com filtro. E. Leitura do número de células viáveis no contador de cintilação.

4.8 METODOLOGIA ESTATÍSTICA

A avaliação da viabilidade celular, percentualmente em relação ao controle, entre materiais sob tempos diferentes de armazenamento em água foi realizada por uma análise de variância. Complementou-se a análise por comparações múltiplas de médias de viabilidade pelo teste de Tukey. Adotou-se o nível de significância de 5% para a tomada de decisão.

Após a avaliação estatística, comparando-se com o controle os resultados da incorporação de ^3H -timidina, os materiais serão classificados de acordo com o efeito citotóxico em: não-citotóxico (viabilidade celular acima de 75% em relação ao grupo controle), discretamente citotóxico (viabilidade celular entre 50 e 75% em relação ao grupo controle), moderadamente citotóxico (viabilidade celular entre 25 e 50% em relação ao grupo controle) e intensamente citotóxico (viabilidade celular abaixo de 25% em relação ao grupo controle) (Jorge et al.⁵⁸ 2004, Campanha et al.⁶¹ 2006).

5 RESULTADOS

Para a avaliação da citotoxicidade dos materiais: Lucitone 550, Dentusoft, Dentuflex, Ufi-gel, Trusoft, em função do tempo de armazenamento em água e em função de um tratamento térmico em água quente (55°C por 10 min.) os resultados do teste de incorporação de ^3H -timidina foram transformados em porcentagem em relação ao controle celular, o qual é considerado 100% viável. Na Tabela 1 são dadas as médias e desvios padrão de viabilidade celular (%), obtidos de acordo com o material empregado, tempos de armazenamento em água e tratamento térmico citado acima.

Tabela 1: Viabilidade celular (%) de acordo com o material, tempo de armazenamento e tratamento térmico.

Material		Tempo armazenamento em água (h) Água quente			
		0	24	48	10 min
Lucitone	Média	50,0 ^{AB} _a	57,7 ^{AB} _{ab}	78,1 ^B _b	47,8 ^{AB} _a
	DP	18,0	13,3	19,1	18,2
Dentusoft	Média	70,6 ^B _a	78,8 ^{BC} _a	66,6 ^{AB} _a	81,8 ^{CD} _a
	DP	17,1	10,1	9,7	9,0
Dentuflex	Média	32,9 ^A _a	42,3 ^A _a	48,8 ^A _a	45,7 ^A _a
	DP	8,8	13,6	18,9	16,5
Ufi Gel	Média	94,8 ^C _a	95,2 ^C _a	101,0 ^C _a	95,0 ^D _a
	DP	16,4	13,3	11,2	14,5
Trusoft	Média	69,4 ^B _a	64,7 ^B _a	65,4 ^{AB} _a	68,6 ^{BC} _a
	DP	10,0	9,4	9,7	10,2

Médias seguidas de letras iguais, minúsculas na linha ou maiúsculas na coluna, não são significativamente diferentes pelo teste de Tukey ao nível de 5%

A análise de variância apontou interação significativa ($p < 0,001$) entre material e condição experimental (tempo de armazenamento em água e tratamento térmico). Para estudar essa interação foi aplicado o teste de Tukey para comparações múltiplas de médias, com os resultados principais resumidos na Tabela 1. Em relação às condições experimentais, somente foi apontada diferença significativa entre médias de viabilidade para a resina acrílica Lucitone 550. Neste, a maior viabilidade de células se refere ao tempo de 48 horas de armazenamento, mas não significativamente maior do que a de 24 horas. Entre as outras três condições não houve evidência de diferença entre médias de viabilidade.

Para a comparação de médias de viabilidade (%) entre os materiais em cada condição, o gráfico 1 se constitui em um auxiliar eficiente. Respeitando o fato que prevalece o resultado do teste de Tukey, quanto maior a sobreposição dos intervalos de confiança de 95%, mais fraca é a evidência de diferença entre as médias. Assim, de modo geral, a maior viabilidade foi do Ufi Gel e a menor do Dentuflex. Os outros três materiais apresentaram viabilidade celular intermediária. Detalhes dessa alternância podem ser vistas por comparações particulares pelos resultados do teste de Tukey apresentados na Tabela 1.

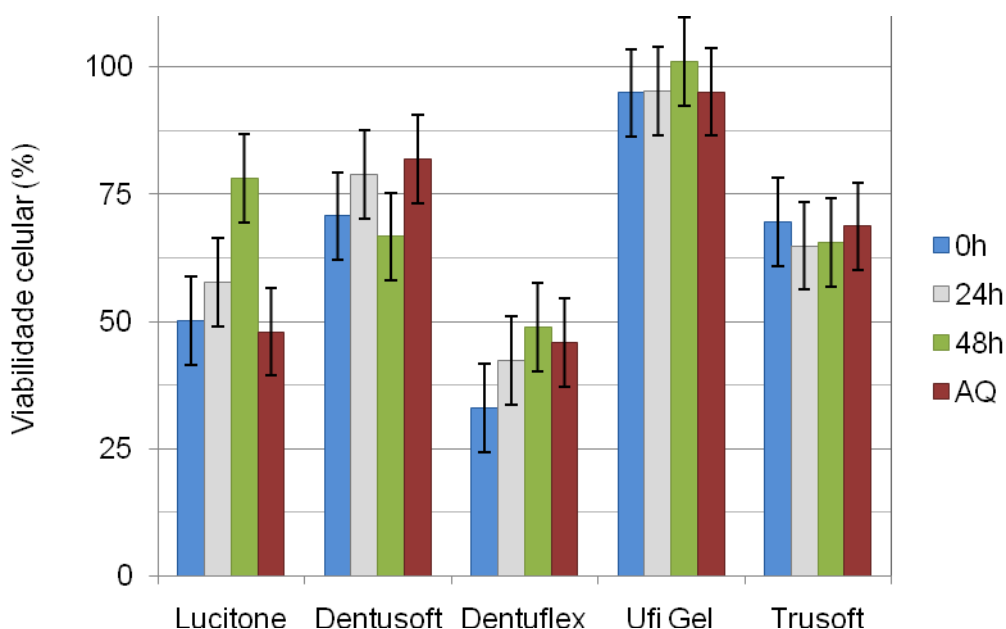


Gráfico 1: Médias amostrais de porcentagens de viabilidade celular (colunas) e intervalos de confiança de 95% para as médias populacionais (barra vertical), de acordo com o tempo em horas de armazenamento em água e tratamento térmico em água quente (AQ).

Confrontando-se as médias obtidas de viabilidade celular com a classificação do efeito citotóxico estabelecida pela ISO 10993-5, verificou-se que o Ufi Gel teve efeito não-citotóxico, o Trusoft efeito discretamente citotóxico e o Dentuflex efeito moderadamente citotóxico, todos em qualquer condição experimental. Observou-se também que o Dentusoft alternou entre discretamente citotóxico e não-citotóxico porque suas médias de viabilidade variaram em torno de 75% e o Lucitone 550 apresentou efeito não-citotóxico quando armazenado em água por 48 horas, mas as outras médias ficaram no em torno de 50% de viabilidade celular, entre levemente-citotóxico e discretamente citotóxico.

6 DISCUSSÃO

As propriedades biológicas e toxicológicas dos materiais odontológicos são importantes em relação ao seu uso clínico (Huang⁵⁵ 2001). Os testes de citotoxicidade são realizados para determinar como uma amostra de material afeta um determinado tipo de célula. Embora os experimentos com células, *in vitro*, não sejam capazes de reproduzir as condições *in vivo*, eles são muito utilizados por apresentarem métodos simplificados de investigação da citotoxicidade e limitarem o número de variáveis experimentais (Sheridan et al.²⁴ 1997, Costa et al.⁵³ 2001).

As substâncias tóxicas e seus efeitos sobre os tecidos têm sido constatados por meio de estudo em animais, observações clínicas e culturas de células *in vitro*. Os vários testes de biocompatibilidade foram divididos em iniciais, secundários e de aplicação, sendo este último descrito como teste pré-clínico (Wennberg⁴⁶ 1986, Hensten-Pettersen¹⁶ 1988, Costa⁵³ 2001). É importante lembrar que os resultados dos testes iniciais de citotoxicidade apresentam limitações quanto à sua correlação direta com situações clínicas (Costa⁵³ 2001). Sendo assim, tanto os resultados destes testes quanto daqueles realizados em animais (secundários ou de aplicação) não podem ser de imediato extrapolados para as condições clínicas, porém são muito importantes pois determinam o comportamento biológico dos materiais e/ou de seus componentes (Costa⁵³ 2001). Para análise da biocompatibilidade dos materiais reembasadores, neste estudo foi utilizado o método da cultura de células, o qual tem sido considerado relativamente simples, reproduzível, efetivo e controlado (Hensten-Pettersen¹⁶ 1988).

O contato entre as células e os materiais testados deve ser adequado e é de extrema importância para a realização dos testes de citotoxicidade. Podemos ter o contato direto do material com as células, o contato das células com as substâncias extraídas dos materiais ou, ainda, o contato indireto, quando as células ficam separadas dos materiais experimentais por filtros Millipore ou pelo Agar (ISO 10993-5⁴⁸, Wennberg⁴⁶ 1986). Neste estudo testamos as substâncias extraídas dos materiais e não o contato direto das amostras confeccionadas porque o contato direto poderia causar inibição do crescimento celular decorrente de condições físicas e não das substâncias tóxicas liberadas (Tang et al.²⁶ 1999). Para que as

substâncias sejam liberadas dos materiais testados, pode-se utilizar como meio para a extração água destilada, solução salina ou meio de cultura com ou sem soro. A quantidade do material testado para a obtenção do extrato pode ser expressa em peso ou em tamanho, e o extrato obtido depende da relação entre a superfície do corpo de prova e o volume do meio (Wennberg⁴⁶ 1986). No presente estudo, o extrato foi obtido por meio do armazenamento das amostras, de tamanho padronizado, em meio de cultura, estando de acordo com a metodologia de outros estudos (Harrison e Huggett⁶⁷ 1992, Tsuchiya et al.²¹ 1993, Lefebvre et al.¹⁸ 1994, Pelka et al.⁶⁶ 2000, Jorge et al.⁵⁸ 2004, Campanha et al.⁶¹ 2006).

Não somente o método de citotoxicidade é importante, mas também o tipo de célula a ser cultivada. A escolha vai depender da natureza das observações a serem realizadas. As células cultivadas *in vitro* podem ser haplóides ou diplóides. Culturas primárias diplóides de fibroblastos podem ser obtidas de uma variedade de tecidos, tais como polpa dental, ligamento periodontal, pele, pulmão, etc. Essas culturas tendem a se multiplicar lentamente e têm um tempo de vida finito. Células haplóides, por sua vez, têm crescimento infinito, são fáceis de cultivar, e a qualidade de sua cultura é mais previsível (Cimpan et al.⁵² 2000). Neste estudo, utilizamos fibroblastos de hamster L929, que são células haplóides comumente cultivadas e encontradas comercialmente com facilidade. Devido à sua alta capacidade de clonagem, as células L929 têm sido utilizadas para avaliação de citotoxicidade em diversos estudos (Lygre et al.³⁶ 1995, Cimpan et al.⁵² 2000).

Tendo em vista a liberação do monômero residual e de outros componentes pelas resinas acrílicas e havendo relatos de reações alérgicas em pacientes que fazem uso de próteses removíveis totais ou parciais (Fisher¹⁵ 1954, McCabe, Basker¹⁹ 1976), vários estudos que quantificam e identificam tais componentes (Lai et al.⁴⁰ 2004, León et al.⁴³ 2008, Urban et al.⁴⁴ 2009) bem como estudos que determinam a citotoxicidade das resinas acrílicas tornaram-se necessários (Jorge et al.⁵⁸ 2004, Campanha et al.⁶¹ 2006, Jorge et al.⁶² 2006). Uma vez observado que poucos estudos foram realizados visando analisar a citotoxicidade de alguns reembasadores resilientes, o objetivo deste estudo foi avaliar, por meio do teste quantitativo de incorporação de ³H-timidina, a citotoxicidade de diferentes tipos de reembasadores resilientes comumente

utilizados na prática clínica em função do tempo de armazenamento em água e em função de um tratamento térmico.

O teste de citotoxicidade por meio da incorporação de ^3H -timidina é um teste quantitativo e tem sido amplamente utilizado apesar de possuir algumas desvantagens, como a necessidade de um equipamento especial de alto custo e a utilização de um material radioativo (Upadhyay, Bhaskar²⁸ 2000). Porém, estudos anteriores (Tang et al.²⁶ 1999, Jorge et al.⁵⁸ 2004, Campanha et al.⁶¹ 2006, Jorge et al.⁶² 2006) demonstraram que o teste de incorporação de ^3H -timidina é mais sensível do que outros testes na determinação da citotoxicidade dos materiais odontológicos, justificando a escolha desse teste no presente estudo.

Um dos objetivos do nosso estudo foi avaliar o efeito de um tratamento térmico sobre a citotoxicidade dos reembasadores resilientes. Estudos relatam que, por meio da imersão em água aquecida, as moléculas de monômero residual provavelmente difundem-se mais rapidamente, atingindo os radicais livres remanescentes, proporcionando, assim, a reação complementar de polimerização (Weaver, Goebel²⁰ 1980, Lamb et al.³¹ 1982, Jorge et al.⁵⁸ 2004, Bayraktar et al.⁴² 2006, Campanha et al.⁶¹ 2006, Jorge et al.⁶² 2006). Urban et al.⁴⁴, em 2009, avaliaram o efeito do banho de água a 55°C durante 10 minutos sobre o conteúdo de monômero residual de quatro resinas acrílicas e sugeriram que clinicamente esse tratamento poderia reduzir a quantidade de componentes residuais. Nossos resultados, porém, mostraram que o tratamento térmico não influenciou na citotoxicidade dos reembasadores avaliados. A diferença entre os estudos citados acima pode ser atribuída às diferenças de composição química entre as resinas acrílicas convencionais e as resinas acrílicas macias.

A literatura revisada apontou a importância do armazenamento em água para a diminuição da citotoxicidade das resinas acrílicas. A diminuição da citotoxicidade em função do armazenamento pode ser atribuída à difusão do monômero em água e ao contínuo processo de polimerização (Lamb et al.³¹ 1982). Neste estudo, a resina acrílica para base de prótese (Lucitone 550) mostrou maior viabilidade celular após 48 horas de imersão, estando de acordo com os resultados de outros estudos (Lamb et al.³¹ em 1982, e Lee et al.³⁹). Anteriormente ao armazenamento, a resina acrílica Lucitone 550 apresentou-se moderadamente citotóxica. Após 48 horas de imersão em água, a mesma resina demonstrou

viabilidade celular acima de 75%. Lamb et al.³¹ em 1982, e Lee et al.³⁹ em 2002, mostram que a concentração de monômero residual das resinas acrílicas pode ser reduzida com o armazenamento das próteses em água, anteriormente à colocação nos pacientes. Jorge et al.⁶⁴, em 2009, realizaram um estudo com o objetivo de avaliar o efeito do tempo de armazenamento em água sobre a citotoxicidade de resinas acrílicas para base de próteses. Os resultados mostraram que houve diminuição da citotoxicidade dos materiais após o armazenamento e, assim, os autores concluíram que o armazenamento em água pode ser considerado uma alternativa para a redução da citotoxicidade de algumas resinas para base de próteses. Porém, ainda em relação ao armazenamento em água, os resultados do presente estudo mostraram que não houve redução da citotoxicidade dos reembasadores resilientes após 24 ou 48 horas de imersão, o que também poderia ser explicado pela composição dos materiais.

Os reembasadores resilientes são compostos por metacrilatos associados à plastificantes, como ftalatos e ésteres de outros ácidos aromáticos carboxílicos e etanol (Graham et al.³³ 1991, Hashimoto et al.⁶³ 2007). Munksgaard⁴¹ (2004) avaliou a perda dos plastificantes de quatro reembasadores resilientes durante 30 dias e demonstrou que os materiais liberam quantidades que excedem a ingestão diária tolerável de plastificante durante todo o tempo testado. Como os plastificantes são liberados continuamente e em grandes quantidades, o armazenamento em água e o tratamento térmico utilizados neste estudo, não influenciaram a citotoxicidade dos materiais testados. Além disso, os plastificantes apresentam difusão muito pequena em água. Graham et al.³³ (1991) determinaram a perda de plastificantes de reembasadores resilientes *in vitro* e *in vivo* e concluíram que a solubilidade dos plastificantes é muito menor em água comparada com a saliva. Igualmente, Munksgaard⁴¹ (2004) concluiu que a solubilidade dos ftalatos é 20 vezes maior em saliva humana do que em água. Dessa forma, estudos que avaliam a citotoxicidade dos reembasadores resilientes após armazenamento em saliva são sugeridos.

Independente da condição experimental, os resultados demonstraram que o Trusoft teve efeito discretamente citotóxico e o Dentuflex efeito moderadamente citotóxico. Observou-se também que o Dentusoft alternou entre discretamente citotóxico e não citotóxico porque suas médias de viabilidade

variaram em torno de 75%. Já o Ufi Gel P mostrou-se ser não citotóxico, com média de viabilidade celular próxima aos 100%.

Os reembasadores resilientes a base de polímeros (Trusoft e Dentuflex) utilizados neste estudo apresentam na sua composição plastificantes, os quais podem ser liberados em meio aquoso (Graham et al.³³ 1991). Segundo a literatura revisada, os plastificantes podem apresentar efeitos biológicos indesejáveis (Munksgard⁴¹ 2004, Hashimoto et al.⁶³ 2007). A liberação dos plastificantes durante as 24 horas de incubação das resinas para a formação dos extratos poderia explicar a citotoxicidade desses materiais. Esses resultados estão de acordo com Ozdemir et al.⁶⁵ e Park et al.⁶⁰, os quais avaliaram a citotoxicidade de vários reembasadores resilientes e observaram efeito citotóxico de todos os materiais testados. Os autores relacionaram a citotoxicidade encontrada ao plastificante presente na composição.

O Dentusoft, apesar de ser um material a base de polímero, apresentou efeito menos citotóxico do que os reembasadores Trusoft e Dentuflex. Esse resultado poderia ser explicado pelo fato de que o Dentusoft é um condicionador de tecido, um material provisório. Dentre as indicações dos condicionadores de tecido estão os cuidados no pós-operatório de cirurgias, estabilização de próteses, condicionamento dos tecidos fibromucosos e reembasamentos de próteses provisórias durante o período de osseointegração de implantes (Graham et al.³³ 1991). Em decorrência das suas indicações e devido ao contato direto com os tecidos, os condicionadores de tecidos deveriam ser não irritantes e não tóxicos (Ozdemir et al.⁶⁵ 2009). Apesar disso, o Dentusoft alternou entre levemente citotóxico e não citotóxico. Estes resultados poderiam ser explicados, também, pela liberação de plastificantes (embora em pequenas quantidades) e estão de acordo com os estudos de Okita e Hensten-Pettersen⁴⁸, que avaliaram a citotoxicidade dos condicionadores de tecidos e demonstraram que todos foram tóxicos às células.

O reembasador resiliente Ufi Gel P apresentou efeito não citotóxico para todas as condições experimentais. Para os materiais à base de silicone, o polímero é um elastômero e não necessita de plastificantes externos. A ausência de plastificante poderia explicar a ausência de citotoxicidade encontrada. Este material apresenta reação de polimerização muito parecida com os materiais para impressão à base de silicone. Ciapetti et al.⁴⁹, em 1998, avaliaram a citotoxicidade de diferentes

silicones para impressão e verificaram que os silicones não são tóxicos, mesmo quando testados após exposição prolongada às células.

Assim, de acordo com os resultados do presente estudo, sugere-se que alguns reembasadores deveriam ser usados com cautela. Além disso, fica evidente a importância da análise citotóxica para comparação entre os materiais. Porém, como os resultados dos testes iniciais de citotoxicidade apresentam limitações quanto à sua correlação direta com situações clínicas, pesquisas clínicas in vivo são sugeridas.

7 CONCLUSÃO

De acordo com a metodologia empregada e diante dos resultados obtidos neste estudo, pode-se concluir que:

1. Os reembasadores resilientes a base de resina acrílica, Trusoft e Dentuflex, foram classificados como discretamente citotóxico e moderadamente citotóxico, respectivamente;
2. O condicionador de tecido (Dentusoft) alternou entre discretamente citotóxico e não citotóxico;
3. O reembasador resiliente a base de silicone (Ufi Gel) não teve efeito citotóxico;
4. O armazenamento em água não diminui a citotoxicidade dos reembasadores resilientes;
5. O armazenamento em água por 48 horas diminuiu a citotoxicidade da resina acrílica para base de prótese (Lucitone 550);
6. O tratamento térmico não diminui a citotoxicidade dos materiais testados.

REFERÊNCIAS*

1. Braden M, Wright PS, Parker S. Soft lining materials – a review. Eur J Prosthodont Restor Dent. 1995 Jun;3(4):163-74.
2. McCabe JF. A polyvinylsiloxane denture soft lining material. J Dent. 1998 Jul-Aug;26(5-6):521-6.
3. Murata H, Taguchi N, Hamada T, Kawamura M, McCabe Jf. Dynamic viscoelasticity of soft liners and mastigatoy function. J Dent Res. 2002 Feb;81(2):123-8.
4. McCabe JF, Carrick TE, Kamohara H. Adhesive bond strength and compliance for denture soft lining materials. Biomaterials. 2002 Mar;23(5):1347-52.
5. Haywood J, Basker RM, Watson CJ, Wood DJ. A comparison of three hard chairside denture reline materials. Part I. Clinical evaluation. Eur J Prosthodont Restor Dent. 2003 Dec;11(4):157-63.
6. Brown D. Resilient soft liners and tissue conditioners. Br Dent J. 1988 Jun 11;164(11):357-60.
7. Murata H, McCabe JF, Jepson NJ, Hamada T. The influence of immersion solutions on the viscoelasticity of temporary soft lining materials. Dent Mater. 1996 Jan;12(1):19-24.
8. Braden M. Tissue conditioners: I. Composition and structure. J Dent Res. 1970 Jan-Feb;49(1):145-8.
9. Cerveira Netto H, Lin D. Condicionadores teciduais. Rev Fac Odont São José dos Campos. 1977;6(1/2):101-4.
10. Anusavice KJ. Resina para base de dentadura. In: Phillips materiais dentários. 10 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998.
11. Craig RG, Godwin WC. Properties of athletic mouth protectors and materials. J Oral Rehabil. 2002 Feb;29(2):146-50.

*De acordo com a norma do Programa de Pós-graduação em Odontologia da UEPG, baseado no modelo Vancouver. Abreviaturas dos periódicos em conformidade com o Medline

12. Lefebvre CA, Knoernschild KL, Schuster GS. Cytotoxicity of eluates from light-polymerized denture base resins. *J Prosthet Dent*. 1994 Dec;72(6):644-50.
13. Lewis BB, Chestner SB. Formaldehyde in dentistry: a review of mutagenic and carcinogenic potential. *J Am Dent Assoc*. 1981 Sep;103(3):429-34.
14. Lefebvre CA, Schuster GS, Marr JC, Knoernschild KL. The effect of pH on the cytotoxicity of eluates from denture base resins. *Int J Prosthodont*. 1995 Mar-Apr;8(2):122-8.
15. Fisher AA. Allergic sensitization of the skin and oral mucosa to acrylic denture materials. *J Am Med Assoc*. 1954 Sep 18;156(3):238-42.
16. Hensten-Pettersen A. Comparison of the methods available for assessing cytotoxicity. *Int Endodont J*. 1988 Mar;21(2):89-99.
17. Kapur K, Shklar G. The effect of complete dentures on alveolar mucosa. *J Prosthet Dent*. 1963 Nov-Dec;13(6):1030-7.
18. Lefebvre CA, Schuster GS. Biocompatibility of visible light-cured resin systems in prosthodontics. *J Prosthet Dent*. 1994 Feb;71(2):178-85.
19. McCabe JF, Basker RM. Tissue sensitive to acrylic resin: a method of measuring the residual monomer content and its clinical application. *Br Dent J*. 1976 May;140(18):347-50.
20. Weaver RE, Goebel WM. Reactions to acrylic resin dental prostheses. *J Prosthet Dent*. 1980 Feb;43(2):138-42.
21. Tsuchiya H, Hoshino Y, Kato H, Takagi N. Flow injection analysis of formaldehyde leached from denture-base acrylic resins. *J Dent*. 1993 Aug;21(4):240-3.
22. Austin AT, Basker RM. The level of residual monomer in acrylic denture materials with particular reference to a modified method of analysis. *Br Dent J*. 1980 Nov 18;149(10):281-6.
23. De Clerck JP. Microwave polymerization of acrylic resins used in dental prostheses. *J Prosthet Dent*. 1987 May;57(5):650-8.

24. 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.
25. Turner TD, Spyratou O, Schmidt J. Biocompatibility of wound management products: standardization of and determination of cell growth rate in L 929 fibroblast cultures. *J Pharm Pharmacol*. 1989 Nov;41(11):775-80.
26. Tang AT, Li J, Ekstrand J, Liu Y. Cytotoxicity tests of in situ polymerized resins: methodological comparisons and introduction of a tissue culture insert as a testing device. *J Biomed Mater Res*. 1999 Jun 5;45(3):214-22.
27. Imazato S, Tarumi H, Ebi N, Ebisu S. Cytotoxic effects of composite restorations employing self-etching primers or experimental antibacterial primers. *J Dent*. 2000 Jan;28(1):61-7.
28. Upadhyay P, Bhaskar S. Real time monitoring of lymphocyte proliferation by an impedance method. *J Immunol Methods*. 2000 Oct 20;244(1-2):133-7.
29. Axelsson B, Nyquist G. The leaching and biological effect of the residual monomer of methyl methacrylate. *Odontol Revy*. 1962;13:370-379.
30. Ruyter IE. Release of formaldehyde from denture base polymers. *Acta Odontol Scand*. 1980;38(1):17-27.
31. Lamb DJ, Ellis B, Priestley D. Loss into water of residual monomer from autopolymerizing dental acrylic resin. *Biomaterials*. 1982 Jul;3(3):155-9.
32. Passeri LA, de Carvalho AC. Biocompatibility of tissue conditioners – histological study in rats. *J Nihon Univ Sch Dent*. 1985 Sep;27(3):167-73.
33. Graham BS, Jones DW, Sutow EJ. An in vivo and in vitro study of the loss of plasticizer from soft polymer-gel materials. *J Dent Res*. 1991 May;70(5):870-3.
34. Lygre H, Solheim E, Gjerdet NR, Berg E. Leaching of organic additives from dentures in vivo. *Acta Odontol Scand*. 1993 Feb;51(1):45-51.
35. 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.

36. Lygre H, Solheim E, Gjerdet NR. Leaching from denture base materials in vitro. *Acta Odontol Scand*. 1995 Apr;53(2):75-80.
37. Craig RG. Prosthetics applications of polymers. In: *Restorative dental materials*. 10 ed. St. Louis: Mosby: 1997.
38. 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.
39. Lee SY, Lai YL, Hsu TS. Influence of polymerization conditions on monomer elution and microhardness of autopolymerized polymethyl methacrylate. *Eur J Oral Sci*. 2002 Apr;110(2):179-83.
40. 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.
41. Munksgaard EC. Leaching of plasticizers from temporary denture soft lining materials. *Eur J Oral Sci*. 2004 Feb;112(1):101-4.
42. 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.
43. León BT, Cury AD, Garcia RC. Loss of residual monomer from resilient lining materials processed by different methods. *Rev Odonto Ciênc*. 2008;23(3):215-219.
44. Urban VM, Machado AL, Vergani CE, Machado AL. Effect of water-bath post-polymerization on the mechanical properties, degree of conversion, and leaching of residual compounds of hard chairside relined resins. *Dent Mater*. 2009 May;25(5):662-71. Epub 2009 Jan 10.
45. Leirskar J, Helgeland K. A methodologic study of the effect of dental materials on growth and adhesion of animal cells in vitro. *Scand J Dent Res*. 1972;80(2):120-33.
46. Wennberg A. Cell culture in the biological evaluation of dental materials: a review. *Altern Lab Anim*. 1986;13:194-202.

47. Okita N, Hensten-Pettersen A. In vitro cytotoxicity of tissue conditioners. *J Prosthet Dent*. 1991 Nov;66(5):656-9.
48. International Standard. ISO 10993-5:1992. Biological evaluation of medical devices – part 5: Tests for cytotoxicity: in vitro methods. 1992.
49. Ciapetti G, Granchi D, Stea S, Savarino L, Verri E, Gori A, et al. Cytotoxicity testing of materials with limited in vivo exposure is affected by the duration of cell-material contact. *J Biomed Mater Res*. 1998 Dec 15;42(4):485-90.
50. 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 Mar;44(1):25-30.
51. Wagner U, Burkhardt E, Failing K. Evaluation of canine lymphocyte proliferation: comparison of three different colorimetric methods with the ³H-thymidine incorporation assay. *Vet Immunol and Immunopathol*. 1999 Sep;70(3/4):151-9.
52. Cimpan MR, Matre R, Cressey LI, Tysnes B, Lie SA, Gjertsen BT, et al. The effect of heat- and auto-polymerized denture base polymers on clonogenicity, apoptosis, and necrosis in fibroblasts: denture base polymers induce apoptosis and necrosis. *Acta Odontol Scand*. 2000 Oct;58(5):217-28.
53. Costa CAS. Testes de citotoxicidade em cultura de células. In: ESTRELA C. Metodologia científica: ensino e pesquisa em odontologia. 1 ed. São Paulo: Artes Médicas LTDA; 2001.
54. Lefebvre CA, Wataha JC, Cibirka RM, Schuster GS, Parr GR. Effects of triclosan on the cytotoxicity and fungal growth on a soft denture liner. *J Prosthet Dent*. 2001 Apr;85(4):352-6.
55. 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 Sep-Oct;14(5):439-43.
56. Thonemann B, Schmalz G, Hiller KA, Schweikl H. Responses of L929 mouse fibroblasts, primary and immortalized bovine dental papilla-derived cell lines to dental resin components. *Dent Mater*. 2002 Jun;18(4):318-23.
57. Jorge JH, Giampaolo ET, Machado AL, Vergani CE. Cytotoxicity of denture base acrylic resins: a literature review. *J Prosthet Dent*. 2003 Aug;90(2):190-3.

58. 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.
59. Jorge JH, Giampaolo ET, Pavarina AC. Citotoxicidade dos materiais dentários. Revisão da literatura. *Rev Odontol UNESP*. 2004;33(2):65-6.
60. Park SK, Lee YK, Lim BS, Kim CW. Changes in properties of short-term-use soft liners after thermocycling. *J Oral Rehabil*. 2004 Jul;31(7):717-24.
61. Campanha NH, Pavarina AC, Giampaolo ET, Machado AL, Carlos IZ, Vergani CE. Cytotoxicity of hard chair-side reline resins: effect of microwave irradiation and water-bath post-polymerization treatments. *Int J Prosthodont*. 2006 Mar-Apr;19(2):195-201.
62. 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.
63. Hashimoto Y, Tanaka J, Suzuki K, Nakamura M. Cytocompatibility of a tissue conditioner containing vinyl ester as a plasticizer. *Dent Mater J*. 2007 Nov;26(6):785-91.
64. 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):41-8.
65. Ozdemir KG, Yilmaz H, Yilmaz S. In vitro evaluation of cytotoxicity of soft lining materials on L929 cells by MTT assay. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2009 Jul;90(1):82-6.
66. 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.
67. Harrison A, Huggett R. Effect of the curing cycle on residual monomer levels of acrylic resin denture base polymers. *J Dent*. 1992 Dec;20(6):370-4.