



**INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE EGAS
MONIZ**

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA

**CARACTERIZAÇÃO DOS COMPOSTOS ORGÂNICOS
LIBERTADOS APÓS A CONFEÇÃO E USO DE PRÓTESES
ACRÍLICAS REMOVÍVEIS – ESTUDO IN VITRO**

Trabalho submetido por
João Pedro Ramos Baptista
para obtenção do grau de Mestre em Medicina Dentária

Outubro 2014



INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE EGAS MONIZ

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA

CARACTERIZAÇÃO DOS COMPOSTOS ORGÂNICOS LIBERTADOS APÓS A CONFECÇÃO E USO DE PRÓTESES ACRÍLICAS REMOVÍVEIS – ESTUDO IN VITRO

Trabalho submetido por
João Pedro Ramos Baptista
para obtenção do grau de Mestre em Medicina Dentária

Orientador: Doutora Ana Cristina Manso
Co-orientador: Doutora Alexandra Bernardo
Co-orientador: Doutor João Paulo da Costa de Noronha

Outubro 2014

Dedicatória

Dedico à minha família em especial ao meu pai, à minha mãe e à minha irmã, a quem devo tudo, o apoio e o amor incondicional. Dedico também ao meu avô, que Deus o tem, mas que está sempre presente no meu coração e no meu pensamento.

Agradecimentos

À Doutora Ana Cristina Manso, agradeço todo o apoio, disponibilidade, exigência e confiança desde o primeiro dia em que me aceitou como orientando.

À Doutora Alexandra Bernardo, agradeço a indispensável ajuda e disponibilidade durante toda a fase laboratorial da investigação.

Ao Doutor João Paulo Noronha, agradeço o indispensável acompanhamento e constante apoio durante a fase laboratorial prestada na Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa.

Ao Dr. Pedro Pires, agradeço a enorme ajuda e os constantes ensinamentos dados ao longo da fase inicial do trabalho, no Laboratório Interno da Escola Superior de Ciências da Saúde.

Ao Doutor Luís Proença, agradeço a ajuda com o tratamento estatístico dos dados.

A todos os Professores do ISCSEM, que permitiram a minha formação académica.

À minha namorada Sara Manso, agradeço o amor, o apoio, os conselhos, a paciência e a força que sempre me deu.

A todos os meus grandes amigos, em especial ao meu amigo João Vasconcelos, por ser um irmão nos momentos bons e maus e por tudo o que vivemos e partilhámos ao longo dos anos.

Aos meus professores e colegas de música, agradeço a aprendizagem e as conquistas que me deram num mundo sem o qual não sei viver.

Aos meus colegas, com os quais partilhei 6 anos de vida académica.

Resumo

Objectivos: Identificação e quantificação de monómeros residuais (MMA) libertados em saliva artificial, presentes em blocos de acrílico com distintas áreas superficiais, caracterizando o seu decaimento por unidade de tempo.

Materiais e Métodos: 30 blocos de resina acrílica *ProBase® Hot* foram seleccionados por conveniência e divididos em 3 grupos de estudo de diferentes áreas superficiais: GA (n=10) 2 cm x 2 cm x 2 mm; GB (n=10) 2 cm x 2 cm x 4 mm; GC (n=10) 2 cm x 2 cm x 8 mm (largura x comprimento x espessura respectivamente) (n=10). O seu armazenamento deu-se em saliva artificial, a 37° C +/- 1° C, e foram analisadas amostras às 24 h, 48 h e 72 h por HPLC. Utilizaram-se medidas estatísticas, tomando como referência, para a rejeição das hipóteses nulas, um nível de significância de 5% ($p \leq 0,05$).

Resultados: Os valores médios de concentração de MMA às 24 h do GA ($0,0094 \pm 0,0033 \mu\text{g mL}^{-1}$), GB ($0,0150 \pm 0,0026 \mu\text{g mL}^{-1}$) e GC ($0,0240 \pm 0,0057 \mu\text{g mL}^{-1}$) foram estatisticamente significativos: GA e GB ($p = 0,015$), GA e GC ($p < 0,001$), GB e GC ($p < 0,001$). Os valores médios de concentração de MMA no GC às 24 h ($0,0228 \pm 0,0052 \mu\text{g mL}^{-1}$), 48 h ($0,0063 \pm 0,0031 \mu\text{g mL}^{-1}$) e 72 h ($0,0011 \pm 0,0007 \mu\text{g mL}^{-1}$) foram também estatisticamente significativos: 24 h e 48 h ($p < 0,001$), 24 h e 72 h ($p < 0,001$), 48 h e 72 h ($p = 0,001$). Os valores médios de concentração de MMA foram significativamente diferentes do valor de referência da norma ISO 1567-1999 ($p < 0,001$).

Conclusões: Os monómeros residuais MMA foram identificados e quantificados na saliva artificial. Verificou-se um decaimento (por unidade de tempo) da concentração dos monómeros na saliva artificial, nos diferentes grupos de estudo.

Palavras-chave: próteses acrílicas, cromatografia, monómeros residuais, metacrilatos.

Abstract

Objectives: To identify and quantify residual monomers (MMA) leached to artificial saliva, present in acrylic blocks with different surface areas, characterizing its decay per time unit.

Materials and Methods: 30 acrylic blocks of *ProBase*® Hot acrylic resin were selected by convenience and divided in 3 study groups of different surface areas: GA (n=10) 2 cm x 2 cm x 2 mm; GB (n=10) 2 cm x 2 cm x 4 mm; GC (n=10) 2 cm x 2 cm x 8 mm (length x width x height respectively) (n=10). Their storage was made in artificial saliva, at 37° C +/- 1° C and samples were analyzed at 24 h, 48 h and 72 h by HPLC. Statistical measures were used, taking as reference to the rejection of the null hypothesis a significance level of 5% ($p \leq 0,05$).

Results: The mean values of MMA concentration at 24h of GA ($0,0094 \pm 0,0033 \mu\text{g mL}^{-1}$), GB ($0,0150 \pm 0,0026 \mu\text{g mL}^{-1}$) and GC ($0,0240 \pm 0,0057 \mu\text{g mL}^{-1}$) were statistically significant: GA and GB ($p = 0,015$), GA and GC ($p < 0,001$), GB and GC ($p < 0,001$). The mean values of MMA concentration in GC at 24 h ($0,0228 \pm 0,0052 \mu\text{g mL}^{-1}$), 48 h ($0,0063 \pm 0,0031 \mu\text{g mL}^{-1}$) and 72 h ($0,0011 \pm 0,0007 \mu\text{g mL}^{-1}$) were also statistically significant: 24 h and 48 h ($p < 0,001$), 24 h and 72 h ($p < 0,001$), 48 h and 72 h ($p = 0,001$). The mean values of MMA concentration were significantly different from the reference value of the ISO 1567-1999 standard ($p < 0,001$).

Conclusions: Residual MMA monomers were identified and quantified in artificial saliva. There was a decay (per unit time) of the monomer's concentration in the artificial saliva in the different study groups.

Key-words: acrylic dentures, chromatography, residual monomers, methacrylates.

Índice

I. Introdução.....	17
1. Monómeros como materiais dentários.....	24
2. Poli(metilmetacrilato)	26
3. Metilmetacrilato (MMA)	27
4. O ambiente oral e a sua relação com a biodegradação dos materiais dentários.....	28
5. Saliva Humana e Saliva artificial.....	32
5.1. Breve nota sobre a composição da saliva.....	32
5.2. Saliva e condições orais.....	33
6. Cromatografia – HPLC como meio de identificação e quantificação de monómeros.....	33
7. Justificação e pertinência clínica do estudo.....	39
8. Objectivos de estudo.....	40
9. Hipóteses de estudo.....	41
II. Materiais e Métodos.....	43
1. Caracterização do estudo.....	43
2. Local de estudo.....	43
3. Selecção da amostra.....	43
3.1. Critérios de inclusão.....	45
4. Pré-requisitos para a selecção da amostra	45
4.1. Preparação da saliva artificial.....	45
4.2. Preparação dos blocos de acrílico.....	46
4.2.1. Resina acrílica utilizada no estudo - <i>ProBase® Hot (Ivoclar Vivadent – technical)</i>	46
4.2.2. Material laboratorial utilizado na realização dos blocos de acrílico dos Grupo A, B e C.....	47
4.2.3. Preparação dos blocos de acrílico do Grupo A.....	48
4.2.4. Preparação dos blocos de acrílico do Grupo B.....	50
4.2.5. Preparação dos blocos de acrílico do Grupo C.....	52
5. Armazenamento.....	55
5.1. Armazenamento <i>ProBase® Hot (Ivoclar Vivadent – technical)</i>	55
5.2. Armazenamento blocos de acrílico.....	55

6. Reagentes e soluções HPLC.....	57
7. Quantificação e identificação por HPLC-DAD.....	57
8. Linearidade e limites mínimos de quantificação e de detecção.....	58
9. Desenvolvimento dos métodos cromatográficos.....	59
10. Análise estatística.....	60
III. Resultados	61
1. Identificação dos monómeros residuais libertados dos blocos de acrílico para a saliva artificial.....	61
2. Quantificação dos monómeros residuais libertados dos blocos de acrílico para a saliva artificial.....	65
2.1. Análise comparativa das concentrações médias de MMA - $\mu\text{g mL}^{-1}$ - entre os grupos A, B, C às 24 h, 48 h e 72 h.....	66
2.2. Análise comparativa das concentrações médias de MMA - $\mu\text{g mL}^{-1}$ - entre diferentes tempos de armazenamento (24 h, 48 h e 72 h) nos grupos A, B e C.....	69
2.3. Relação entre a concentração de MMA libertado e o valor de referência da norma ISO 1567-1999.....	73
2.4. Componentes libertados que não estão descritos pelo fabricante....	75
IV. Discussão.....	77
1. Avaliação e comparação da quantidade de monómeros libertados para a saliva artificial.....	77
2. Libertação de monómeros residuais.....	80
3. Consequências da libertação de monómeros residuais.....	85
V. Conclusões.....	87
VI. Bibliografia.....	89

Índice de Figuras

Figura 1. Estrutura molecular MMA e PMMA (http://www.alunosonline.com.br/quimica/polimetilmetacrilato-acrilico.html).....	27
Figura 2. Dermatite associada ao manuseamento de acrílicos – metacrilatos (Vieira et al., 2003).....	30
Figura 3. Sistema de solventes do aparelho HPLC-DAD (FCT-UNL).....	36
Figura 4. HPLC-DAD (FCT-UNL).....	37
Figura 5. Coluna de fase reversa instalada no aparelho HPLC-DAD (FCT-UNL).....	37
Figura 6. Detector de fotodíodos (Photodiode Array Detector) do aparelho HPLC-DAD (FCT-UNL).....	38
Figura 7 e 8. Conjunto de 5 vials no carrossel do aparelho HPLC-DAD e Micropipetas (FCT-UNL).....	44
Figura 9. Saliva artificial no balão volumétrico e material utilizado na realização da solução de saliva artificial (FCT-UNL).....	45
Figura 10 e 11. Resina acrílica utilizada no estudo - <i>ProBase® Hot (Ivoclar Vivadent – technical)</i> (ESCSEM).....	47
Figura 12 e 13. Exemplo de 6 placas termoplásticas (<i>Dentaflux</i>) utilizadas neste estudo (ESCSEM) e da mufla com 6 placas termoplásticas.....	48
Figura 14. Exemplo de bloco do grupo A.....	50
Figura 15. Exemplo de bloco do grupo B.....	52
Figura 16. Exemplo de bloco do grupo C.....	54

Figura 17. Material utilizado no Laboratório Interno (ESCSEM).....	54
Figura 18 e 19. Polimerizadora, panela e prensa utilizadas no Laboratório Interno (ESCSEM).....	54
Figura 20. Exemplo de 10 frascos de vidro (SCHOTT DURAN), envolvidos em alumínio, com os blocos de acrílico do GA, em 10 mL de saliva artificial.....	55
Figura 21. Exemplo de 10 frascos de vidro (SCHOTT DURAN), envolvidos em alumínio, com os blocos de acrílico do GB, em 10 mL de saliva artificial.....	55
Figura 22. Exemplo de 10 frascos de vidro, envolvidos em alumínio, com os blocos de acrílico do GC, em 10 mL de saliva artificial.....	56
Figura 23, 24 e 25. Exemplo de 3 frascos de vidro (sem alumínio), correctamente identificados, com os blocos de acrílico do GA, GB e GC, em 10 mL de saliva artificial.....	56
Figura 26. Amostras na estufa (FCT-UNL).....	56
Figura 27. Aparelho de HPLC-DAD utilizado neste estudo (FCT-UNL).....	58
Figura 28. Cromatograma de 50 μL da solução padrão de MMA + EMA a $0,1 \mu\text{g mL}^{-1}$, com uma coluna de fase reversa C_{18} , de forma isocrática unitária, com a fase móvel $\text{AcCN}/\text{H}_2\text{O}$ (75:25, v/v) a pH 7, a um fluxo de $0,4 \text{ mL min}^{-1}$ ($t_{\text{MMA}} = 4,70$ e $t_{\text{EMA}} = 5,23$).....	61
Figura 29. Cromatograma de 50 μL da solução padrão de MMA + EMA a $0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$, com uma coluna de fase reversa C_{18} , de forma isocrática unitária, com a fase móvel $\text{AcCN}/\text{H}_2\text{O}$ (75:25, v/v) a pH 7, a um fluxo de $0,4 \text{ mL min}^{-1}$ ($t_{\text{MMA}} = 4,70$ e $t_{\text{EMA}} = 5,23$).....	62
Figura 30. Cromatograma de 50 μL da solução padrão de MMA + EMA a $1,0 \mu\text{g mL}^{-1}$, com uma coluna de fase reversa C_{18} , de forma isocrática unitária, com a fase móvel	

AcCN/H ₂ O (75:25, v/v) a pH 7, a um fluxo de 0,4 mL min ⁻¹ (t _{MMA} = 4,70 e t _{EMA} = 5,23).....	62
Figura 31. Cromatograma de 50 µL da solução padrão de MMA + EMA a 2,5 µg mL ⁻¹ , com uma coluna de fase reversa C ₁₈ , de forma isocrática unitária, com a fase móvel AcCN/H ₂ O (75:25, v/v) a pH 7, a um fluxo de 0,4 mL min ⁻¹ (t _{MMA} = 4,70 e t _{EMA} = 5,23).....	63
Figura 32. Exemplo de cromatograma de 50 µL do grupo A (A10) às 24 h, com uma coluna de fase reversa C ₁₈ , de forma isocrática unitária, com a fase móvel AcCN/H ₂ O (75:25, v/v) a pH 7, a um fluxo de 0,4 mL min ⁻¹ (t _{MMA} = 4,70 e t _{EMA} = 5,23).....	63
Figura 33. Exemplo de cromatograma de 50 µL do grupo B (B2) às 24 h, com uma coluna de fase reversa C ₁₈ , de forma isocrática unitária, com a fase móvel AcCN/H ₂ O (75:25, v/v) a pH 7, a um fluxo de 0,4 mL min ⁻¹ (t _{MMA} = 4,70 e t _{EMA} = 5,23).....	64
Figura 34. Exemplo de cromatograma de 50 µL do grupo C (C1) às 24 h, com uma coluna de fase reversa C ₁₈ , de forma isocrática unitária, com a fase móvel AcCN/H ₂ O (75:25, v/v) a pH 7, a um fluxo de 0,4 mL min ⁻¹ (t _{MMA} = 4,70 e t _{EMA} = 5,23).....	64
Figura 35. Espectro de U.V. dos monómeros MMA (A) e EMA (B) – λ _{detecção} = 202 nm.....	65
Figura 36. Rectas de calibração para o MMA e EMA.....	65
Figura 37. Concentração de MMA no Grupo A, B e C às 24 h.....	67
Figura 38. Concentração de MMA no Grupo A, B e C às 48 h.....	68
Figura 39. Concentração de MMA no Grupo A, B e C às 72 h.....	69
Figura 40. Concentração de MMA às 24 h (1), 48 h (2) e 72 h (3) de armazenamento no Grupo A.....	70

Figura 41. Concentração de MMA às 24 h (1), 48 h (2) e 72 h (3) de armazenamento no Grupo B.....71

Figura 42. Concentração de MMA às 24 h (1), 48 h (2) e 72 h (3) de armazenamento no Grupo C.....72

Índice de Tabelas

Tabela 1. Estrutura química e linear dos monómeros MMA e EMA.....	23
Tabela 2. Propriedades físicas dos monómeros MMA e EMA.....	24
Tabela 3. Métodos de eluição dos compostos no estudo de detecção.....	58
Tabela 4. Resultados da calibração linear.....	66
Tabela 5. Valores de LOQ e LOD referentes ao MMA e EMA.....	66
Tabela 6 . Média e desvio padrão da [MMA] ($\mu\text{g mL}^{-1}$) dos grupos A, B e C às 24 h...67	
Tabela 7. Análise comparativa da [MMA] ($\mu\text{g mL}^{-1}$) entre grupos às 24 h.....	67
Tabela 8. Média e desvio padrão da [MMA] ($\mu\text{g mL}^{-1}$) dos grupos A, B e C às 48 h....	68
Tabela 9. Análise comparativa da [MMA] ($\mu\text{g mL}^{-1}$) entre grupos às 48 h.....	68
Tabela 10. Média e desvio padrão da [MMA] ($\mu\text{g mL}^{-1}$) dos grupos A, B e C às 72 h..	69
Tabela 11. Análise comparativa da [MMA] ($\mu\text{g mL}^{-1}$) entre grupos às 72 h.....	69
Tabela 12. Média e desvio padrão da [MMA] ($\mu\text{g mL}^{-1}$) às 24 h, 48 h e 72 h no grupo A.....	70
Tabela 13. Análise comparativa da [MMA] ($\mu\text{g mL}^{-1}$) entre tempos de armazenamento no grupo A.....	70
Tabela 14. Média e desvio padrão da [MMA] ($\mu\text{g mL}^{-1}$) às 24 h, 48 h e 72 h no grupo B.....	71

Tabela 15. Análise comparativa da [MMA] ($\mu\text{g mL}^{-1}$) entre tempos de armazenamento no grupo B.....	71
Tabela 16. Média e desvio padrão da [MMA] ($\mu\text{g mL}^{-1}$) às 24 h, 48 h e 72 h no grupo C.....	72
Tabela 17. Análise comparativa da [MMA] ($\mu\text{g mL}^{-1}$) entre tempos de armazenamento no grupo C.....	73
Tabela 18. Média e desvio padrão da [MMA] ($\mu\text{g mL}^{-1}$) às 24 h, 48 h e 72 h no grupo A (para comparação com o valor de referência $2,2 \times 10^{-8} \mu\text{g mL}^{-1}$)	74
Tabela 19. Análise comparativa da [MMA] ($\mu\text{g mL}^{-1}$) às 24 h, 48 h e 72 h no grupo A, com o valor de referência $2,2 \times 10^{-8} \mu\text{g mL}^{-1}$	74
Tabela 20. Média e desvio padrão da [MMA] ($\mu\text{g mL}^{-1}$) às 24 h, 48 h e 72 h no grupo B (para comparação com o valor de referência $2,2 \times 10^{-8} \mu\text{g mL}^{-1}$).....	74
Tabela 21. Análise comparativa da [MMA] ($\mu\text{g mL}^{-1}$) às 24 h, 48 h e 72 h no grupo B, com o valor de referência $2,2 \times 10^{-8} \mu\text{g mL}^{-1}$	74
Tabela 22. Média e desvio padrão da [MMA] ($\mu\text{g mL}^{-1}$) às 24 h, 48 h e 72 h no grupo C (para comparação com o valor de referência $2,2 \times 10^{-8} \mu\text{g mL}^{-1}$).....	75
Tabela 23. Análise comparativa da [MMA] ($\mu\text{g mL}^{-1}$) às 24 h, 48 h e 72 h no grupo C, com o valor de referência $2,2 \times 10^{-8} \mu\text{g mL}^{-1}$	75
Tabela 24. Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$) de MMA encontrada em vários estudos com resinas termopolimerizáveis.....	79

Lista de Abreviaturas

Bis-GMA	Bis-glicidil-dimetacrilato
C	Carbono
cm	centímetro
CaCl₂.2H₂O	Cloreto de Cálcio Dihidratado
°C	Graus Celsius
DAD	“ <i>Diode Array Detector</i> ”, Detector de Fotodíodos
°F	Graus Fahrenheit
g	grama
GC	“ <i>Gas Chromatography</i> ”, Cromatografia Gasosa
GPa	Gigapascal
Hema	Hidroxietilmetacrilato
HPLC	“ <i>High Performance Liquid Chromatography</i> ”, Cromatografia Líquida de Alta Resolução
IgA/IgG/IgM	Imunoglobulina A/ Imunoglobulina G/ Imunoglobulina M
KH	Knoop Hardness
KCl	Cloreto de Potássio
LOD	“ <i>Limit of Detection</i> ”, Limite de detecção

LOQ	“ <i>Limit of Quantitation</i> ”, Limite de quantificação
mL	mililitro
MPa	Megapascal
MMA	Metilmetacrilato
MA	Ácido Metacrílico
mm	milímetro
mg	miligrama
NaCl	Cloreto de Sódio
Na₂S·9H₂O	Sulfito de Sódio Dihidratado
nm	nanómetro
PMMA	Poli(metilmetacrilato)
TEGDMA	Trietilenoglicol Dimetacrilato
UDMA	Uretano Dimetacrilato
U.V.	Ultravioleta
µL	microlitro
µg	micrograma

I. Introdução

Desde a antiguidade que o uso de próteses maxilofaciais é uma realidade. Civilizações antigas, como os egípcios ou os chineses, usavam resinas e ceras para a reconstrução e substituição de regiões craniofaciais. O francês Ambroise Paré, no século XVI, foi responsável pela criação de um conjunto de próteses que substituíam funcionalmente e esteticamente as estruturas maxilofaciais. A partir da I e II Guerras Mundiais, a necessidade de próteses maxilofaciais, nomeadamente de próteses dentárias, permitiu um aumento quantitativo e uma melhoria qualitativa destes materiais (Anusavice, Shen & Rawls, 2013).

Apesar dos inúmeros avanços ao longo da história, e principalmente no último século, os materiais dentários utilizados, por exemplo na confecção de próteses acrílicas, não são totalmente ideais. Um material ideal deve ser em primeiro lugar biocompatível, ou seja, capaz de exercer a sua função terapêutica quando aplicado, sem causar qualquer reacção adversa, local ou sistémica (Gautam et al., 2010; Anusavice et al., 2013). Características como a fácil manipulação, a resistência e a estabilidade química e dimensional, com capacidade de resistir a variações térmicas e químicas, são propriedades muito importantes. Estes materiais têm como objectivo a confecção de dispositivos protéticos, que reabilitem e substituam funcionalmente e esteticamente as estruturas anatómicas em falta, como as peças dentárias, se possível de forma pouco dispendiosa (Anusavice et al., 2013).

O doente parcialmente ou totalmente desdentado apresenta comprometimento ao nível do sistema estomatognático. No caso de um doente totalmente edêntulo, existem grandes alterações no suporte e posicionamento muscular, na estética e mastigação, na dimensão vertical e na saúde psicológica e geral (Assaoka, Cesar & Oliveira, 2012). A necessidade do uso de próteses dentárias, totais ou parciais, é por estes motivos uma realidade. Um estudo recente demonstrou que cerca de 21,4 % dos indivíduos entre os 15 e 74 anos são portadores de prótese dentária. O mesmo estudo refere que, no grupo etário entre os 55 e os 64 anos, a utilização de próteses parciais removíveis aumenta para 22,2 % (Carr & Brown, 2011; Assaoka et al., 2012).

Segundo a Academia de Prosthodontia (2005), uma prótese total é definida como uma prótese dentária removível, que substitui toda a dentição do indivíduo e as estruturas mandibulares e maxilares associadas. É um dispositivo protético que tem como objectivo a substituição de todos os dentes maxilares e mandibulares, restabelecendo desta forma a função mastigatória, estética, fonética e devolvendo comodidade ao doente. A sua utilização é também importante na restauração do osso alveolar, reabsorvido pela perda de peças dentárias (Assaoka et al., 2012). De igual modo, uma prótese parcial, tal como o nome indica, visa substituir a dentição de indivíduos parcialmente edêntulos (dentes maxilares e/ou mandibulares), restabelecendo também a função mastigatória, estética e fonética. As próteses parciais permitem a preservação do periodonto e das peças dentárias remanescentes (Assaoka et al., 2012). As próteses são constituídas por dentes artificiais, que se encontram ligados a uma base acrílica protética. Podem ser suportadas pela mucosa, pelos dentes, ou por ambos. Podem ainda ser implantosuportadas (Anusavice et al., 2013).

Durante a década de 30 e 40, vários polímeros sintéticos foram desenvolvidos. A maior parte deles serviam como materiais protéticos, mas tinham um sucesso limitado. Com a introdução no mercado de poli(metilmetacrilato), em 1936, como um material dentário processado termicamente, este polímero passou a ser largamente utilizado. Em 1940, para além da aplicação em próteses dentárias, o PMMA já era usado na realização de coroas, restaurações indirectas e próteses fixas. Em 1950, surgiu a primeira resina dentária colorida para dentes anteriores, a qual era constituída por monómeros de MMA e por PMMA (Anusavice et al., 2013). As resinas acrílicas datam de há mais de 60 anos (Golbidi & Asghari, 2009) e o seu uso tem sido exponencial, sendo que a maior parte dos sistemas resinosos apresentam na sua constituição o metacrilato MMA, entre outros como o UDMA, o TEGDMA e o Bis-GMA (Palitsh, Hannig, Fergner & Balkenhol, 2012).

Assim, grande parte das próteses são constituídas por polímeros e é comum a utilização de monómeros metacrilatos como componentes de materiais dentários (Seiss, Track, Hickel & Reichl, 2009). Existem várias técnicas para a utilização destes polímeros na confecção de próteses acrílicas totais ou parciais. Em qualquer uma das técnicas é essencial, primariamente, a realização de correctas impressões preliminares, e se possível impressões definitivas, tanto da arcada dentária que vai receber o dispositivo

protético, como da arcada antagonista. Assim, obtêm-se modelos de estudo/trabalho, a partir dos quais se irá realizar a prótese. A cera é colocada no modelo de gesso e dentes artificiais são montados na cera, tendo sempre em conta a relação com a arcada oponente. Entre os vários passos laboratoriais realizados para a confecção da prótese, e antes da entrega da prótese acrilizada, é essencial avaliar os procedimentos clinicamente na boca do doente (Anusavice et al., 2013).

Como já foi referido, a maior parte das resinas acrílicas, desde da década de 40, são compostas pelo polímero poli(metilmetacrilato), um sólido transparente que pode ser processado para obter cor e translucidez. O poli(metilmetacrilato) é o polímero mais utilizado no fabrico de resinas em medicina dentária, principalmente na confecção de próteses dentárias acrílicas removíveis (Pfeiffer & Rosenbauer, 2004; Palitsh et al., 2012). Vários estudos *in vitro* mostram a sua biocompatibilidade (Gautam et al., 2012). Este polímero apresenta propriedades dimensionais, ópticas, de coloração e físicas estáveis no meio intra-oral, características favoráveis à sua aplicação em medicina dentária. Também é um polímero de fácil manipulação, apresentando-se normalmente num sistema de pó-líquido. O pó contém grandes quantidades de poli(metilmetacrilato) prepolimerizado, normalmente em forma de esferas, ao contrário do líquido. Estes dois componentes, ao serem misturados nas proporções definidas pelo fabricante, criam uma massa acrílica que irá constituir a prótese, após a sua total polimerização (Anusavice et al., 2013). Em termos químicos, os ésteres metílicos do ácido metacrílico são as unidades básicas de PMMA, mas existem outros componentes contidos nestes acrílicos (Gautam et al., 2012).

As próteses acrílicas podem ser constituídas por resinas acrílicas autopolimerizáveis, fotopolimerizáveis ou termopolimerizáveis, consoante o factor que inicia a reacção (Tuna, Rohlig, Sancakli, Evlioglu & Gencay, 2013). Nas resinas autopolimerizáveis, activadores químicos como a amina terciária causam a decomposição de peróxido de benzoílo. Através desta activação química inicia-se a polimerização, podendo esta reacção ocorrer à temperatura ambiente. Estas resinas consistem normalmente em dois componentes, constituídos por um pó e um líquido, ou duas pastas misturadas posteriormente (Altintas & Usumez, 2009).

As resinas fotopolimerizáveis são constituídas por matrizes de uretano dimetacrilato, sílica e monómeros de resina acrílica de alto peso molecular (num só componente). Através da incidência de luz, com um comprimento de onda entre os 400 e 500 nm, ocorre a activação de agentes fotossensíveis, como a canforoquinona, que são iniciadores da fotopolimerização (Shalaby & Salz, 2007; Anusavice et al., 2013). Aos fotoiniciadores juntam-se co-iniciadores, inibidores, fotoestabilizadores e componentes inorgânicos na sua constituição (Durner et al., 2010).

Nas resinas acrílicas termopolimerizáveis, a polimerização é iniciada por energia térmica, seja através de um banho de água, seja através de energia microondas (Gautam et al., 2012). O sistema pó-líquido característico destas resinas apresenta na forma de pó, para além de poli(metilmetacrilato), pequenas quantidades do iniciador peróxido de benzoílo, o qual inicia a polimerização, plastificantes como o dibutilftalato, pigmentos e opacos (Singh et al., 2012). O líquido é composto por monómeros de metilmetacrilato (ou outros como o hexametilglicol dimetacrilado e o hidroxiletilmetacrilato), pequenas quantidades do inibidor hidroquinona, importante para aumentar o tempo de trabalho (retarda a polimerização) e prevenir o processo de polimerização indesejado, e plastificantes. A principal diferença das resinas autopolimerizáveis e termopolimerizáveis reside na forma pela qual o peróxido de benzoílo, que faz parte do pó do sistema pó-líquido, se divide e liberta radicais livres. Segundo Danesh et al. (2012), as resinas termopolimerizáveis são normalmente constituídas por PMMA, enquanto as fotopolimerizáveis derivam não só de PMMA mas também de UDMA.

O metilmetacrilato é um componente comum no líquido destas resinas de poli(metilmetacrilato). Este composto é um importante agente “cross-linking” que possui em cada molécula uma ligação dupla carbono-carbono (C-C), as quais são essenciais na formação de cadeias de polímeros. O glicol dimetacrilato é outro agente “cross-linking”, quimicamente e estruturalmente similar ao metilmetacrilato, que pode também estar presente. Este apresenta duas ligações duplas carbono-carbono (C-C) por molécula, o que o torna capaz de polimerizar duas cadeias de polímeros separadas. Estes agentes estão presentes numa concentração de cerca de 1 a 2 % (Lung & Darvell, 2005; Gautam et al., 2012; Anusavice et al., 2013).

A libertação de monómeros pelas resinas de PMMA depende de dois grandes factores: a conversão monómero-polímero e o conteúdo/quantidade de monómeros residuais. A taxa de conversão de monómero para polímero indica o número de ligações duplas insaturadas que são convertidas em ligações simples saturadas, durante a polimerização (Gautam et al., 2012). Quanto menor a conversão, maior a eluição de monómeros e maior a citotoxicidade associada (Jorge, Giampaolo, Machado & Vergani, 2003).

A concentração de monómeros residuais depende da libertação de substâncias não incorporadas na rede polimérica, tais como monómeros, produtos da reacção e aditivos. Esta está dependente de três factores: o método de polimerização, as condições de tempo e temperatura a que ocorre o ciclo de polimerização e da existência/inexistência de tratamentos pós-polimerização (Bayraktar, Guvener, Bural & Uresin, 2006). Relativamente ao método de polimerização, são vários os estudos que demonstram que a técnica de polimerização térmica está associada a uma menor libertação de monómeros não ligados da rede de poli(metilmetacrilato). Tuna et al. (2013) demonstrou que o método de polimerização é um importante factor na libertação de monómeros e que as resinas polimerizadas por energia microondas apresentam uma eluição menor. Vallittu, Ruyter & Buykuilmaz (1998) e Bayraktar et al. (2006) concluíram nos seus estudos, que a concentração de monómeros residuais de MMA das resinas de PMMA termopolimerizáveis, foi menor do que das resinas autopolimerizáveis. Zissis, Yannikakis, Polyzois & Harrison (2008), durante 38 meses, após polimerização e armazenamento em água de amostras de resinas acrílicas, também demonstraram que as resinas termicamente polimerizadas apresentam uma menor percentagem de monómeros residuais libertados, face às quimicamente polimerizadas.

Estudos comparativos entre resinas termopolimerizáveis e resinas processadas por outros métodos, comprovam que as resinas termicamente processadas sofrem uma menor difusão molecular e libertam menos monómeros para o meio em estudo. Desta forma, a citotoxicidade associada a estes materiais também é menor (Ata & Yavuzylmaz, 2009). Assim, será de esperar que uma maior libertação destes monómeros aumente o potencial citotóxico dos materiais (Michelsen, 2007).

Em relação às condições de polimerização, investigações indicam que quanto maior a temperatura utilizada e quanto mais tempo de polimerização, menor é o conteúdo em

produtos residuais (Lung & Darvell, 2005; Goldibi & Asghari, 2009). Harrison & Hugget (1992), utilizando uma amostra de 23 próteses termopolimerizáveis, referem que ciclos longos de cerca de 7 h são preferíveis a ciclos curtos de 1 h a 1,5 h. O mesmo estudo refere que a temperatura de polimerização a 100° C confere melhores resultados do que a 70° C.

Vários tratamentos pós-polimerização são eficazes na diminuição da quantidade de monómeros residuais (Araújo, Sayer, Poço & Giudici, 2002). A imersão em água/saliva de próteses dentárias, após a sua confecção, é recomendada para todo o tipo de resinas (Gautam et al., 2012). O risco de irritação e sensibilidade pode ser minimizado pela imersão em água durante 24 h, antes da sua entrega e inserção (Singh et al., 2012). Estudos como o de Singh et al. (2012) e de Tuna et al. (2013) mostram uma maior libertação nas primeiras 24 h após a polimerização e uma contínua diminuição ao longo do tempo desta eluição. O uso de ondas microondas pós-polimerização em amostras de resinas auto, foto ou termopolimerizáveis, reduz também a quantidade de monómeros residuais (Sheet, Almkhtar & Al-Ali, 2011). O mesmo acontece com tratamentos térmicos como o banho de água (Bural et al., 2011).

Segundo Anusavice et al. (2013), o grau de polimerização obtido pelas resinas termopolimerizáveis é maior do que nas autopolimerizáveis, o que demonstra maior libertação de monómeros residuais por estas resinas quimicamente polimerizadas. A libertação de monómeros não ligados, não só irá provocar alterações nas propriedades físicas e químicas das próteses, como também são uma fonte de reacções adversas e alérgicas de importância clínica. Além disto, as resinas termopolimerizáveis apresentam uma estabilidade de cor maior. A presença de amins terciárias nas resinas quimicamente polimerizadas torna-as susceptíveis à oxidação e a alterações na aparência da resina.

O tempo de utilização das próteses acrílicas na boca dos doentes e a espessura da prótese dentária são factores também a ter em conta, em relação à libertação de substâncias de resinas acrílicas (Lamb, Ellis & Priestley, 1982; Fletcher et al., 1983; Sadamori & Kotani, 1992). Segundo Sadamori & Kotani (1992), a concentração de monómeros residuais tende a ser menor em próteses utilizadas durante longos períodos de tempo, face a períodos curtos. No trabalho de Fletcher et al. (1983), secções de maior

espessura de resinas acrílicas autopolimerizáveis apresentaram menos libertação, em comparação com secções de menor espessura.

Deste modo, constata-se que a polimerização de MMA em PMMA não é uma reacção química completa, o que faz com que a rede polimérica apresente monómeros livres, os quais afectam as propriedades químicas, físicas e mecânicas dos materiais (Urban et al., 2007; Sousa et al., 2014). A libertação destes monómeros está associada a inúmeras reacções adversas, podendo atingir não só as estruturas da cavidade oral, como podem ser ingeridos pela saliva e excretados pela urina (Kleinsasser et al., 2006; Arossi, Lehmann, Dihl, Reguly & De Andrade, 2010). Como de uma forma geral, as próteses acrílicas removíveis são constituídas pelo polímero poli(metilmetacrilato), é importante a caracterização dos monómeros residuais libertados, nomeadamente de metilmetacrilato, de forma a diminuir a exposição dos doentes a estes compostos.

Neste estudo realizou-se a análise quantitativa e qualificativa dos compostos orgânicos libertados para a saliva artificial, após a confecção de amostras de resina acrílica termopolimerizável. A tabela 1 mostra a estrutura química e linear dos monómeros MMA e EMA libertados pelas amostras. Na tabela 2 são apresentadas algumas propriedades físicas relevantes associadas a estes monómeros.

Tabela 1. - Estrutura química e linear dos monómeros MMA e EMA

Monómero	Estrutura Química	Estrutura Linear
MMA CAS: 80-62-6		$\text{CH}_2=\text{C}(\text{CH}_3)\text{COOCH}_3$
EMA CAS: 128440-92-6		$\text{CH}_2=\text{C}(\text{CH}_3)\text{COOC}_2\text{H}_5$

Nota: disponível em <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.6406.html?rid=8d4cf1bc-70f4-43cb-833a-41683c401201>; <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.7066.html?rid=6140e395-ab6a-45d3-96b6-fe72d8add03f>

Tabela 2. Propriedades físicas dos monómeros MMA e EMA

Monómero	Peso Molecular	Densidade (20°C)	Ponto de Ebulição	Índice de Refracção
MMA	100,12 g mol ⁻¹	0,945 g mL ⁻¹	100,8° C	n ²⁰ / _D 1,414
EMA	114,14 g mol ⁻¹	0,917 g mL ⁻¹	118-119° C	n ²⁰ / _D 1,413

Nota: disponível em <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.6406.html?rid=8d4cf1bc-70f4-43cb-833a-41683c401201>; <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.7066.html?rid=6140e395-ab6a-45d3-96b6-fe72d8add03f>

1. Monómeros como materiais dentários

Os polímeros são macromoléculas constituídas por monómeros. São formados através de reacções químicas de polimerização (Arrais, Giannini & Rueggeberg, 2009), que convertem uma grande quantidade de moléculas de baixo peso molecular, designados de monómeros, em macromoléculas constituídas por longas cadeias de alto peso molecular (Anusavice et al., 2013). Um radical iniciador inicia a reacção e a propagação da mesma ocorre de forma linear (uma ligação dupla por monómero). Constituídas as cadeias lineares, estas formam entre si polímeros tridimensionais. Forma-se assim uma estrutura tridimensional, a partir da polimerização dos radicais livres da matriz de monómeros (Shalaby & Salz, 2007).

As resinas acrílicas são compostas quer por estas macromoléculas e monómeros, quer por outros componentes que fornecem propriedades úteis aos materiais dentários. Por exemplo, ao nível da dentisteria, os materiais acrílicos necessitam de ser moldados e esculpados antes de estarem completamente polimerizados. Assim, as resinas poliméricas são plásticos que podem ser moldados permanentemente através de calor, reacção química, ou pressão, apesar da sua estabilidade dimensional. De acordo com o seu comportamento a alterações térmicas, os polímeros podem ser termoplásticos, se adquirem uma mudança morfológica reversível quando aquecidos, ou polímeros “termo setting”, se adquirem uma mudança morfológica irreversível (Anusavice et al., 2013).

Existem resinas acrílicas do ponto de vista químico, que derivam do ácido acrílico ($\text{CH}_2=\text{CHCOOH}$) e outras que derivam do ácido metacrílico ($\text{CH}_2=\text{C}(\text{CH}_3)\text{COOH}$). Em ambas a polimerização ocorre por adição, na qual vários grupos ésteres destes poliácidos permitem a reacção de ligação entre monómeros (Anusavice et al., 2013). Na reacção de polimerização ocorre a quebra de ligações duplas C-C, a diminuição da distância intermolecular entre as cadeias poliméricas (0,3 - 0,4 nm) e formam-se ligações covalentes C-C de aproximadamente 0,15 nm de distância. As resinas acrílicas passam de um estado viscoso para rígido (Gonçalves, Filho, Guimarães, Poskus & Silva, 2008; Vasugeva, 2009).

Os poliácidos apresentam polaridade ao nível do grupo carboxilo, o que faz com que a água tenda a separar as cadeias poliméricas, provocando a libertação de monómeros e a diminuição da sua força e resistência (Anusavice et al., 2013). Na presença de monómeros residuais há menos conversão monómero-polímero e há um aumento da solubilidade e adsorção de água pelos materiais (Goldibi & Asghari, 2009).

O grau de conversão diz respeito ao número de ligações duplas C-C que passam a ligações simples, durante a polimerização (Michelsen, 2007; Miletic, Santini & Trkulja, 2009). A degradação, a resistência mecânica e a solubilidade dos materiais são propriedades influenciadas pelo grau de conversão (Gioka et al., 2005). Quanto menor for o grau, maior a solubilidade dos materiais e conseqüente libertação de monómeros residuais (Gonçalves et al., 2008; Miletic et al., 2009). Quanto maior, mais resistência mecânica apresentam os materiais (Sideridou, Tserki & Papanastasiou, 2002).

Segundo Seiss et al. (2009), após a polimerização, os materiais resinosos podem apresentar 60% de ligações duplas carbono-carbono. Existem assim reacções duplas que não reagem, provocando a libertação de monómeros residuais para a cavidade oral. Estes monómeros também podem permanecer pendentos na cadeia polimérica (Sideridou et al., 2002; Gonçalves et al., 2008).

As resinas e materiais poliméricos apresentam uma grande diversidade de aplicações, sendo usados em áreas como a ortopedia, oftalmologia, cirurgia reconstrutiva e medicina dentária (Sousa et al., 2014). Os materiais dentários são dos materiais

sintéticos mais utilizados em humanos (Michelsen et al., 2012). Na prostodontia são utilizados na confecção de próteses acrílicas, como materiais de impressão e de rebasamento, como restaurações provisórias e agentes de cimentação. Na dentisteria operatória são utilizados como materiais de restauração e de selamento radicular, sistemas de adesão, cimentos de resina e ionómeros de vidro, selantes de fissura, vellers e para preenchimento de cavidades. Materiais poliméricos de preenchimento canal, como gutta-percha e selantes de canais radiculares, são também utilizados na endodontia. Ao nível da ortodontia podem ser aplicados na confecção de brackets e resinas de adesão (Kopperad, Kleven & Wellendorf, 2010; Durner et al., 2010; Anusavice et al., 2013).

2. Poli(metilmetacrilato)

O poli(metilmetacrilato), o polímero de MMA, é uma resina transparente com uma claridade semelhante à água, que transmite luz num comprimento de onda de 250 nm. A sua cor não sofre qualquer alteração com a luz ultravioleta, para além de apresentar boas propriedades relativamente ao envelhecimento, o que demonstra a grande estabilidade desta resina. Também se apresenta quimicamente estável a temperaturas menores ou iguais a 125° C, tornando-se um material termoplástico moldável. O PMMA acima dos 125° C começa a sofrer despolimerização e a formar um PMMA de menor peso molecular, à medida que liberta monómeros de MMA. Aos 450° C, 90% do polímero encontra-se despolimerizado. Com uma dureza de Knoop de 18 a 20 KHN, é uma resina resistente. A sua densidade é de 1,19 g / cm³, o seu módulo de elasticidade é de 2,4 GPa, e a sua força de tensão é de aproximadamente 60 MPa. É um polímero de fácil manipulação, biocompatível e de grande durabilidade (Anusavice et al., 2013).

Na presença de água, o PMMA tem tendência a absorvê-la, ou seja, os seus grupos carboxilo, mesmo esterificados, podem formar pontes de hidrogénio com a água. Esta difusão molecular ocorre, pois este polímero apresenta uma estrutura não cristalina com grande energia interna e é necessária uma menor quantidade de energia de activação. Este polímero de estrutura linear é solúvel não só à água, mas também a outros solventes orgânicos como a acetona e o clorofórmio (Anusavice et al., 2013).

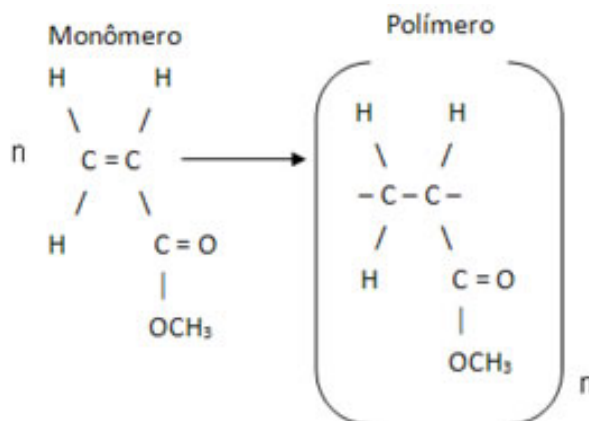


Figura 1. Estrutura molecular MMA e PMMA

(<http://www.alunosonline.com.br/quimica/polimetilmetacrilato-acrilico.html>)

3. Metilmetacrilato (MMA)

À temperatura ambiente o monómero metilmetacrilato é um líquido transparente. Este monómero é utilizado nas várias áreas da medicina dentária, tendo uma importância considerável no fabrico de próteses removíveis totais e parciais. Na maior parte das resinas acrílicas, o líquido MMA é misturado com o polímero poli(metilmetacrilato), dissolvendo-o e formando uma massa plástica, que será posteriormente totalmente polimerizada. Apresenta um conjunto de características que tornam a sua aplicação favorável em áreas como a prostodontia e a dentisteria: ponto de fusão de 48° C, ponto de ebulição de 100,8° C, densidade de 0,945 g mL⁻¹ aos 20° C, peso molecular de 100,12 g mol⁻¹, temperatura de polimerização de 12,9 kcal mol⁻¹, uma elevada pressão de vapor e é um excelente solvente orgânico (Anusavice et al., 2013).

Este monómero pode ser polimerizado numa grande variedade de condições. Esta polimerização pode ocorrer através de calor, luz visível ou ultravioleta, ou ainda quimicamente, através de um iniciador. O grau de ligação entre monómeros e a formação de cadeias de polímeros dependem de factores como o grau de pureza, a concentração do iniciador e a temperatura. A contracção de polimerização é um factor a ter em conta, pois o MMA puro sofre uma diminuição de volume de 21 % com esta contracção (Anusavice et al., 2013).

4. O ambiente oral e a sua relação com a biodegradação dos materiais dentários

A biodegradação das resinas acrílicas é um factor de enorme importância do ponto de vista clínico. É definida como a mudança das características físicas, químicas e mecânicas dos materiais, devido às condições orais (Bettencourt et al., 2010; Ivkovic Bozovic, Ristic, Mirjanic & Jankovic, 2013).

O ambiente oral contém componentes endógenos, tais como proteínas (IgA e mucinas) e enzimas (histatinas, lisozimas, amilases), e componentes exógenos (álcoois, ácidos, bases, compostos provenientes da dieta) que podem interagir de forma complexa e variável com os materiais dentários utilizados (Bettencourt et al., 2010). Factores como a saliva, a mastigação e alterações químicas e térmicas da dieta, influenciam o comportamento dos materiais dentários (Gautam et al., 2012). A temperatura pode variar de 25° C a 45° C, o pH pode alterar-se rapidamente de ácido para básico e as forças mastigatórias podem ser muito fortes (Singh et al., 2012). Estas interações estão relacionadas com a biodegradação dos materiais, que podem alterar as suas características e funções (Ferracane, 2006; Ivkovic et al., 2013).

A biodegradação envolve a libertação de compostos, que poderão ser responsáveis por inúmeras reacções adversas celulares e tecidulares dos tecidos moles e estruturas da cavidade oral. Estes monómeros são assim resultantes de um processo de difusão, em que a água penetra na matriz de polímeros e separa a ligação entre as cadeias poliméricas (Chaves, Machado, Vergani, De Souza & Giampaolo, 2012). O uso de inúmeros materiais dentários à base de resinas acrílicas, em áreas como a dentisteria, reabilitação oral, ortodontia, entre outros, aumenta a importância clínica relativamente à biocompatibilidade dos materiais (Ebadian, Razavi, Soleimanpour & Mosharraf, 2008; Bettencourt et al., 2010; Ivkovic et al., 2013).

A solubilidade e absorção são dois fenómenos que permitem a troca de compostos entre o ambiente oral e os materiais dentários. A solubilidade em água dos monómeros metacrilatos depende da sua estrutura química (Michelsen et al. 2012). A absorção de água pode provocar, através de hidrólise, alterações nas propriedades físicas e químicas dos materiais acrílicos e causar a libertação de monómeros residuais. A saliva é assim um dos factores mais importantes na biodegradação das resinas acrílicas (Hagio,

Kawaguchi, Motokawa & Miyazaki, 2006). Este líquido é constituído principalmente por água, a qual tem capacidade de se difundir nos materiais acrílicos polares e provocar a libertação de monómeros residuais não ligados ou outros compostos (Poplawski, Loba, Pawlowska, Szczepanska & Blasiak, 2010; Costella, Trochmann & Oliveira, 2010).

As resinas acrílicas na cavidade oral são também degradadas através da hidrólise enzimática. A acção enzimática de hidrolases e esterases presentes na saliva, ao nível das ligações éster da rede de polímeros de metacrilato, leva à produção de produtos tóxicos, nomeadamente o ácido metacrilato (MA) (Bettencourt et al., 2010; Ivkovic et al., 2013). Este pode ser oxidado e produzir formaldeído (Kopperud et al., 2010). A biodegradação também ocorre pelo metabolismo de microorganismos orais, através da colonização bacteriana de materiais à base de resina. A fadiga dos materiais devido à mastigação, ou seja, à repetição contínua de forças fracas, é mais um factor responsável pela biodegradação. Alterações térmicas e químicas da dieta podem provocar alterações intraorais que também afectam a degradação dos materiais (Bettencourt et al., 2010; Ivkovic et al., 2013).

As reacções adversas associadas à libertação de monómeros residuais, nomeadamente o MMA, são frequentes na prática clínica (Huang, Hu, Chang & Chou, 2000; Leggat & Kedjarune, 2003). Os principais sinais clínicos orais são o rubor, a sensibilidade e dor na mucosa oral e na deglutição, o aparecimento de vesículas e úlceras. Situações patológicas como irritação, inflamação, reacções alérgicas com possível envolvimento sistémico, edema labial e doenças como a estomatite protética ou a síndrome de boca ardente, são também alguns exemplos (Chaves et al., 2012). Neste último, a sensação de queimadura ocorre primeiro na mucosa palatina, em contacto com o dispositivo protético maxilar, mas também na língua, mucosa oral e orofaringe. A urticaria crónica já foi também reportada (Chaves et al., 2012). Vários estudos provam a citotoxicidade e genotoxicidade dos monómeros residuais de materiais dentários acrílicos (Imazato, Horikawa, Nishida & Ebisu, 2007; Bural et al., 2011; Ivkovic et al., 2013). Na presença de sinais e sintomas orais deve ser sempre considerada a existência de reacções alérgicas ou irritações (Chaves et al., 2012).

Segundo Michelsen et al. (2012), vários estudos *in vitro* têm demonstrado que grandes concentrações de monómeros metacrilatos, resultantes de materiais resinosos, são tóxicos em células de mamíferos. As reacções adversas ao PMMA e aos monómeros residuais de MMA são comuns. Estas reacções ocorrem, quer através da formação de um produto resultante da reacção, entre o ambiente e um componente da resina, quer através do contacto directo com os monómeros, polímeros, iniciadores, inibidores ou pigmentos (Anusavice et al., 2013). Por outro lado, investigações clínicas mostram que um grande número de doentes apresentam reacções adversas, não só pouco tempo depois da entrega das próteses, como também após meses ou mesmo anos (Ivkovic et al., 2013). Mikai, Koike & Fujii (2006) demonstraram que existe uma contínua libertação de monómeros residuais ao longo dos anos, mesmo após 10 anos de utilização.

Também os profissionais de saúde, que contactam directamente com os materiais dentários, apresentam reacções como irritação e dermatite. Estas condições são devidas ao contacto com monómeros, sem qualquer protecção das mãos e dedos. Também deve haver um especial cuidado relativamente à manipulação destes materiais, a qual deve ser feita em áreas bem ventiladas, impedido a sua inalação excessiva (Anusavice et al., 2013). Um exemplo de que a manipulação e uso de MMA deve ser tida em conta em termos de saúde ocupacional, reside na sua utilização em vários “settings” cirúrgicos e procedimentos médico-cirúrgicos. Apesar de não existirem provas concretas do seu potencial carcinogénico, este apresenta potenciais efeitos adversos, como efeitos tóxicos em células neuronais e no sistema respiratório (Leggat, Smith & Kedjarune, 2009). A figura 2 representa um caso de dermatite nos dedos de um profissional, associada à manipulação de acrílicos.



Figura 2. Dermatite associada ao manuseamento de acrílicos - metacrilatos (Vieira et al., 2003)

Segundo Bettencourt et al. (2010), inúmeras investigações indicaram que os vários compostos libertados pelas resinas acrílicas utilizadas em medicina dentária, em particular as constituídas por MMA, têm um potencial de efeitos adversos, podendo provocar citotoxicidade, genotoxicidade e alterações na expressão de factores de crescimento. Este potencial de efeitos adversos está directamente relacionado com a concentração de monómeros residuais, parecendo existir uma relação directamente proporcional (Van Landuyt et al., 2011). Desta forma, todos os materiais dentários à base de resina, utilizados na confecção de próteses dentárias, devem cumprir o requisito da norma ISO 1567-1999, ou seja, devem apresentar um valor de concentração de monómeros residuais libertados inferior a 2,2 wt%. (Pfeiffer et al., 2004; Mohamed, Al-jadi & Ajaal 2008; Lemus, Lancón, Maldonado & Morales, 2010).

Como resposta a estas reacções adversas, várias investigações foram elaboradas para o estudo da libertação de monómeros residuais de resinas acrílicas. Dentro dos vários monómeros residuais estudados, o metilmetacrilato é um monómero presente em inúmeros materiais dentários, nomeadamente em resinas acrílicas termopolimerizáveis e autopolimerizáveis. De uma forma geral, os estudos consistem na colocação de amostras confeccionadas segundo o fabricante, com formas e tamanhos diferentes, num líquido à temperatura ambiente ou a 37° C, durante um período de tempo variado. Um dos líquidos utilizados é a saliva humana ou artificial (Zissis et al., 2008; Bettencourt et al., 2010; Ivkovic et al., 2013).

Num estudo levado a cabo por Kedjarune, Charoenworluk & Koontongkaew (1999) usou-se saliva humana não estimulada, para a quantificação da libertação de metilmetacrilato de resinas autopolimerizáveis e termopolimerizáveis. Noutro estudo, Gonçalves et al. (2008) quantificou o nível de metilmetacrilato libertado por resinas autopolimerizáveis. O estudo realizado por Singh et al. (2012) tinha como objectivo determinar a quantidade de MMA eluído, na saliva de doentes portadores de próteses totais.

Os vários estudos, apesar da metodologia diferente, demonstram que a biodegradação de resinas acrílicas está associada à libertação de componentes como o MMA, ésteres ftálicos e aditivos como o peróxido de benzoílo (Lygre, Solheim & Gjerdet 1995).

Várias investigações, como a de Sofou, Tsoupi, Emmanouil & Karayannis (2005) e de Singh et al. (2012), demonstraram que a libertação de maiores quantidades de monómeros residuais eluídos ocorre nas primeiras 24 horas, após a confecção e colocação da amostra no meio em estudo. A libertação é dependente do tempo, já que após as 24 horas há uma menor e mais lenta eluição ao longo do tempo (Kopperud et al., 2010). Esta diminuição pode ser expressa por uma hipérbole (Sadamori et al., 1992).

5. Saliva Humana e Saliva artificial

A saliva é um líquido de relativa viscosidade presente na cavidade oral de forma abundante. Com exceção do sulco gengival, este líquido banha todas as superfícies dentárias, a mucosa e os ecossistemas primários desta cavidade (Sala & Garcia, 2013). É a este meio que os materiais dentários, como as próteses acrílicas, estão sujeitos. Preferencialmente, os estudos relativos à biodegradação de materiais dentários devem ser realizados neste meio. Apesar disto, a saliva natural é instável e por isso inadequada para estudos *in vitro* padronizados. A síntese de saliva artificial, com características similares à saliva natural, tornou-se uma opção válida, mas apesar disto, a duplicação exacta de saliva natural é impossível, devido à instabilidade da mesma. Souder e Sweeney, em 1931, realizaram a primeira solução de saliva artificial, ao estudarem o envenenamento por mercúrio associado a restaurações de amálgama. Desde aí, cerca de 60 soluções foram criadas e vários estudos utilizaram soluções de saliva artificial, cuja composição varia consoante o estudo. Quando se realiza uma solução de saliva artificial é essencial clarificar a importância de cada componente na saliva (Leung & Darvell, 1997; Duffó & Castillo, 2004).

5.1. Breve nota sobre a composição da saliva

Cada glândula salivar produz saliva com características e composições diferentes, de acordo com o tipo de alimentação, factores intrínsecos da própria pessoa e higiene oral. Apesar disto, todas elas formam e secretam uma solução aquosa com 99 % de água e compostos orgânicos e inorgânicos diluídos. A saliva é composta ainda por cálcio, fosfatos, fluoretos, tiocianato, hipotiocianato, iodo, cloro, bicarbonato, potássio, sódio, magnésio, amoníaco e outros. Dos seus constituintes orgânicos destacam-se: hidratos de carbono, lípidos, proteínas, glucoproteínas e péptidos. Das glucoproteínas, assumem

especial importância as proteínas ricas em prolina, as histatinas, as estaterinas, as cistatinas, a alfa-amilase, a lactoperoxidase, a lactoferrina e as lisozimas (Sala & Garcia, 2013).

5.2. Saliva e condições orais

As resinas acrílicas utilizadas em medicina dentária estão expostas ao ambiente hostil e variável da cavidade oral. Alterações térmicas intraorais induzem stress mecânico e provocam a biodegradação da rede de polímeros dos materiais resinosos poliméricos, e a consequente libertação de compostos residuais para a saliva (Bettencourt et al., 2010). Por outro lado, alterações químicas do pH podem influenciar a degradação dos materiais. Segundo Cilli, Pereira & Prakki (2012), a hidrólise de resinas compostas actuais é maior num pH alcalino em relação a um pH neutro ou ácido. A manutenção do pH entre valores normais de 6,5 e 7,5, através de reguladores da capacidade tampão como o ião bicarbonato, impede que ocorra uma diminuição excessiva do pH, associada à desmineralização dentária e ao aparecimento de lesões de cárie, ou um aumento excessivo do pH, associado à formação de tártaro. Esta capacidade tampão da saliva impede assim a existência de grandes alterações de pH, associadas à biodegradação das resinas acrílicas (Sala & Garcia, 2013).

6. Cromatografia – HPLC como meio de identificação e quantificação de monómeros

O termo cromatografia diz respeito a uma família de técnicas capazes de separar amostras complexas em elementos mais simples. A cromatografia líquido-líquido (LC) e a cromatografia gás-líquido (GC) são as duas principais técnicas cromatográficas. (Michelsen, 2007; Ranjel et al., 2011). Segundo as normas ISO, a cromatografia gasosa e a cromatografia líquida de alta resolução (HPLC) são os métodos para a análise de monómeros residuais (Viljanen, Langer, Skrifvars & Vallittu, 2006). Shim & Watts (1999) referem que estes são os métodos mais descritos na literatura. Estas técnicas permitem uma análise segura, precisa, exacta e medições quantitativas selectivas de monómeros em saliva. A cromatografia tem sido o método mais utilizado em investigações relacionadas com a libertação de compostos orgânicos de materiais dentários resinosos, tanto *in-vitro* como *in-vivo* (Michelsen et al., 2012).

Segundo Bird (1989), a separação das moléculas através de cromatografia, depende das diferenças nas propriedades físicas das moléculas contidas nas amostras: a solubilidade em solventes orgânicos e aquosos, o tamanho molecular e a sua carga (negativa ou positiva). A separação também depende da natureza química e das propriedades físicas da fase estacionária e da fase móvel a que a amostra é sujeita.

Uma coluna cromatográfica é usada para a separação de diferentes compostos. A separação dos componentes de uma amostra complexa é possível através das interações ao longo de uma fase móvel (líquido ou gás), que percorre a coluna, e outra fase estacionária, que se encontra no interior da coluna. Na cromatografia líquida, ambas as fases são líquidas, enquanto que na cromatografia gás-líquido, a fase estacionária é um líquido e a fase móvel um gás. A fase estacionária é responsável pela definição e pela leitura de vários compostos analisados, pois é a sua maior ou menor afinidade para com eles que possibilita que estes sejam arrastados a diferentes velocidades ao longo da coluna, apresentando diferentes tempos de retenção. A migração e separação dos compostos eluídos da amostra original é realizada através da fase móvel para um detector. Os sinais produzidos designam-se picos e vários picos formam o cromatograma da substância. (Michelsen, 2007; Meyer, 2010; Ranjel et al., 2011). Mediante as condições laboratoriais, cada componente analisado apresenta no cromatograma o seu tempo de retenção, que irá corresponder ao ponto no qual o sinal aparece no ecrã. A área e a altura de cada representação gráfica é proporcional à quantidade de composto (Meyer, 2010).

Os picos formados no cromatograma fornecem informação quantitativa e qualitativa da amostra:

- Quantitativa – a quantidade de composto injectado é proporcional à altura e à área do pico; a partir destas duas variáveis, altura e área, obtidas de várias soluções com concentrações conhecidas, é possível a realização de um gráfico de calibração, a partir do qual se determina a concentração dos compostos de uma amostra desconhecida (Meyer, 2010);
- Qualitativa – o tempo de retenção corresponde ao período percorrido entre a injeção da amostra e a obtenção do sinal máximo de um determinado composto

pelo cromatógrafo; o tempo de retenção de um composto é constante para as mesmas condições cromatográficas; o pico de um determinado composto pode ser identificado através da injeção do composto pretendido e depois comparando tempos de retenção; factores como a velocidade de fluxo, o tamanho da amostra, as dimensões da coluna, a composição da fase móvel, o tipo de fase estacionária e a temperatura são condições cromatográficas qualitativas a ter em conta (Meyer, 2010).

O primeiro estudo sistemático relacionado com o que designamos hoje de cromatografia foi realizado pelo botânico russo Michael Tswett. A técnica cromatográfica evoluiu, e a partir da década de 1970, a técnica HPLC, devido ao seu largo espectro de aplicabilidade em inúmeras amostras, passou a ser muito utilizada, chegando mesmo, nos dias de hoje, a ser o método cromatográfico mais utilizado (Lough & Wainer, 2003). É um método validado cientificamente apresentando precisão, exactidão, especificidade, linearidade, robustez e estabilidade, o que permite uma análise segura e confiável (Lough & Wainer, 2003). Esta técnica é também muitas vezes designada de cromatografia líquida de alta pressão, pois segundo Martin e Synge em 1941, os pais da cromatografia moderna, a fase estacionária, para dirigir a fase móvel pelo trajecto da coluna, necessita de partículas muito pequenas e de uma alta pressão (Meyer, 2010).

Neste estudo é realizada uma análise quantitativa e qualificativa dos compostos orgânicos libertados para a saliva artificial, através do HPLC. Investigações recentes desenvolveram e validaram este método, para a determinação de monómeros residuais de materiais dentários poliméricos (Samanidou, Hadjicharalampous & Palaghias, 2012; Gul, Miloglu & Akgul, 2014).

A cromatografia líquida de alta performance é portanto utilizada na detecção de substâncias que se encontram em concentrações vestigiais numa amostra, sendo estes compostos em fase líquida separados normalmente em condições de fase reversa. Os componentes são detectados pela absorção de radiação U.V./visível. Para que seja possível esta separação são utilizadas colunas cromatográficas, percorridas por uma fase móvel líquida relativamente polar (normalmente água) e compostas por materiais apolares (Soeiro, 2009).

Para que a separação ocorra é fundamental um equipamento especializado e dispendioso, que resista às elevadas pressões associadas a este processo. Os resultados reprodutíveis exigem condições de separação reprodutíveis (Skoog, Holler & Crouch, 2007). Um instrumento de HPLC pode ser concebido com um único aparelho, ou pode ser composto por vários elementos individuais, sendo este último mais flexível em caso de falha de um componente individual. Além disto, não é necessário que todas as partes do equipamento pertençam ao mesmo fabricante (Meyer, 2010). Os elementos de um aparelho HPLC são: o reservatório do solvente (um ou mais), uma bomba de alta pressão, um dispositivo de injeção da amostra, um detector, um sistema de aquisição e tratamento de dados e uma coluna cromatográfica (elemento de menor tamanho, apesar da sua importância). Existe ainda um termostato para controlo da temperatura (Meyer, 2010).

- Solvente – o solvente ou fase móvel é usualmente uma mistura de elementos polares e não polares, em concentrações variadas consoante a composição da amostra (água, acetona, acetonitrilo, metanol); qualquer contaminante presente na coluna, como gases dissolvidos, pode causar alterações no solvente que passa a coluna; esta contaminação está associada a variabilidade nos tempos de retenção em vários ensaios repetidos, ou mesmo a alterações irreversíveis da coluna (Skoog et al., 2007);



Figura 3. Sistema de solventes do aparelho HPLC-DAD (FCT-UNL) – fotografia do autor

- Bomba – é responsável por impulsionar o solvente e a amostra ao longo do trajecto da coluna; este componente deve ser mantido constante, sem pulsações, com uma adequada taxa de fluxo, algo que é conseguido na presença de bombas

de multi-pistões; a existência de dois pistões vai possibilitar que a taxa de fluxo seja controlada por um pistão, enquanto outro é recarregado; a bomba de seringa (bomba de infusão) é outro tipo de bomba que não pode ser usada no HPLC, pois não produz tanta pressão como a bomba de pistão, apesar de haver um maior controlo da taxa de fluxo (Skoog et al., 2007);



Figura 4. HPLC-DAD (FCT-UNL) – fotografia do autor

- Coluna – neste componente, os compostos da amostra são separados de acordo com as diferentes interações com o conteúdo da coluna; os compostos que ficam mais tempo adsorvidos ao adsorvente da coluna, pois interagem mais fortemente com a fase estacionária desta, apresentam tempos de retenção maiores; existem as colunas homogéneas, caso contenham sólidos como sílica ou alumina na fase estacionária, e colunas ligadas (“bonded columns”) quando a fase estacionária é um líquido ligado a um suporte sólido (sílica ou alumina) (Skoog et al., 2007);



Figura 5. Coluna de fase reversa instalada no aparelho HPLC-DAD (FCT-UNL) – fotografia do autor

- Detector – regista a presença dos vários compostos da amostra; apesar de não existir um detector universal, o detector de HPLC comum é um detector de absorção U.V., que absorve radiação U.V. de moléculas com tamanho médio e grande; existem outros detectores que medem o índice de refração e a fluorescência; está em desenvolvimento uma técnica que combina HPLC com um detector NMR, que permite a quantificação e a identificação de componentes de uma amostra por ressonância magnética nuclear, após a separação pelo HPLC (Skoog et al., 2007).

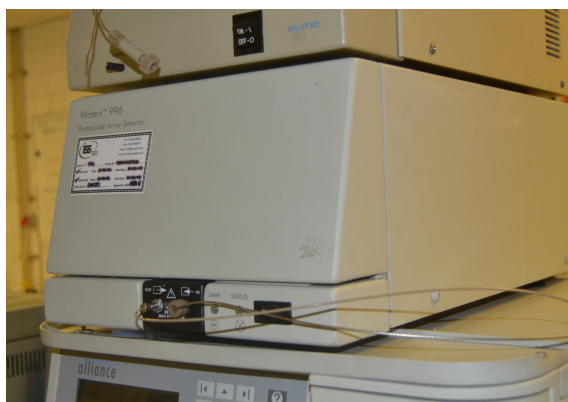


Figura 6. Detector de fotodíodos (Photodiode Array Detector) do aparelho HPLC-DAD (FCT-UNL) – fotografia do autor

O uso do HPLC está relacionado a riscos de saúde causados por solventes tóxicos, irritação pulmonar pela fase estacionária e perigos relacionados com altas pressões. Estes riscos inerentes à sua utilização devem estar sempre associados ao respeito pelas normas de segurança gerais e do próprio instrumento, tal como deve acontecer com qualquer outro equipamento laboratorial (Meyer, 2010).

Para que um método analítico seja realizado correctamente, este deve apresentar vários aspectos fundamentais: definição do problema, obtenção da amostra, realização se necessário de pré-tratamentos da amostra, medição, cálculo, avaliação e “reporting” dos resultados. É essencial saber exactamente o que se pretende analisar e como obter a amostra. Para que uma amostra seja representativa é necessário ter em consideração se esta é sólida, e por isso não homogénea, ou líquida/gasosa, e assim homogénea. Os pré-tratamentos são cruciais para assegurar que o analito está numa concentração apropriada e numa fase compatível com a técnica de medição. Medir, calcular, avaliar e “to report”,

juntamente com métodos estatísticos, fazem obviamente parte de uma análise completa (Lough & Wainer, 2003).

7. Justificação e pertinência clínica do estudo

A utilização em medicina dentária de materiais com base em resinas acrílicas e a aplicação de monómeros metacrilatos e do polímero poli(metilmetacrilato) é, atualmente, bastante generalizada em várias áreas. Uma delas é a prostodontia, nomeadamente na confecção de próteses dentárias totais e parciais (Seiss et al., 2009). Características como a insolubilidade e a impermeabilidade aos fluidos orais, a biocompatibilidade e a não toxicidade têm sido largamente estudadas (Schedle, Ortengren, Eidler, Gabauer & Hensten, 2007). Nos vários estudos realizados verifica-se que estas resinas, ao contactarem com meios como a água ou a saliva, apresentam libertação de componentes para o meio (Dogan, Bek, Cevikt & Usanmaz, 1995; Vallittu, Miettinen & Alakuijala, 1995; Bettencourt et al., 2010). A libertação de compostos, em particular de monómeros residuais como o MMA, está associada a reacções adversas tais como irritações, úlceras, edemas, mas também a citotoxicidade e a genotoxicidade (Bettencourt et al., 2010; Chaves et al., 2012; Ivkovic et al., 2013). A eluição de monómeros está dependente de factores como o método de polimerização, as condições de temperatura e de tempo a que ocorre o ciclo de polimerização, o tempo de utilização das próteses dentárias, a espessura da mesma, e da existência/inexistência de tratamentos pós-polimerização (Lamb et al., 1982; Fletcher et al., 1983; Bayraktar et al., 2006).

O poli(metilmetacrilato) é o polímero mais utilizado na confecção de próteses dentárias acrílicas removíveis (Palitsh et al., 2012), e o metilmetacrilato o principal componente das resinas de poli(metilmetacrilato) (Anusavice et al., 2013). Considerando que a polimerização de MMA em PMMA não é uma reacção química completa, e que os monómeros residuais resultantes desta reacção estão associados a inúmeras reacções adversas, torna-se importante este estudo de investigação, em termos científicos e clínicos, de forma a diminuir a exposição dos doentes a estes componentes.

8. Objectivos de estudo

1. Identificar os monómeros residuais, presentes na saliva artificial, libertados pelos blocos de acrílico com distintas áreas superficiais;
2. Quantificar os monómeros residuais, presentes na saliva artificial, libertados pelos blocos de acrílico com distintas áreas superficiais;
3. Identificar os componentes químicos libertados pelos blocos de acrílico que possam não estar descritos pelo fabricante;
4. Quantificar e qualificar a concentração dos monómeros existentes na saliva artificial, relativamente ao seu potencial de efeitos adversos;
5. Caracterizar o decaimento (por unidade de tempo) da concentração dos monómeros existentes na saliva artificial, em função das diferentes áreas superficiais dos blocos de acrílico.

9. Hipóteses de estudo

As hipóteses nulas $H(0)$ deste trabalho são:

- A quantidade de monómeros libertados na saliva é independente da área superficial do bloco de acrílico utilizado;
- A concentração de monómeros libertados na saliva artificial é independente do seu decaimento por unidade de tempo;
- Não existe uma relação proporcional entre a concentração de monómeros presentes na saliva artificial e o seu potencial de efeitos adversos.

As hipóteses $H(1)$ deste trabalho são:

- A quantidade de monómeros libertados na saliva não é independente da área superficial do bloco de acrílico utilizado;
- A concentração de monómeros libertados na saliva artificial não é independente do seu decaimento por unidade de tempo;
- Existe uma relação proporcional entre a concentração de monómeros presentes na saliva artificial e o seu potencial de efeitos adversos.

II. Materiais e métodos

1. Caracterização do estudo

Este é um estudo observacional, analítico e prospectivo. Foram confeccionados 30 blocos de acrílico em resina acrílica *ProBase® Hot (Ivoclar Vivadent – technical)*, e analisados *in vitro* em saliva artificial.

2. Local do estudo

Este estudo foi realizado no Laboratório de Bioquímica do Instituto Superior de Ciências da Saúde Egas Moniz, no Laboratório Interno de Prótese Dentária da Escola Superior de Saúde Egas Moniz e no Laboratório de Química Orgânica Física-Química Radicalar do Departamento de Química da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa.

3. Selecção da amostra

Foram confeccionados com resina acrílica *ProBase® Hot (Ivoclar Vivadent – technical)*, consoante as instruções do fabricante, 30 blocos de acrílico. Os mesmos foram seleccionados por conveniência e divididos em 3 grupos de estudo com áreas superficiais distintas:

- Grupo A – 10 blocos apresentaram 2 cm largura x 2 cm comprimento x 2 mm espessura; Imediatamente após a polimerização dos blocos de acrílico, cada bloco foi colocado e identificado num frasco de vidro (SCHOTT DURAN) envolvido em alumínio, e imerso em 10 mL de saliva artificial, durante 72 h a $37^{\circ} \text{C} \pm 1^{\circ} \text{C}$. Após 24 h, 48 h e 72 h foram retirados 200 μL de cada amostra, com o auxílio de uma micropipeta (Labnet International, Inc e Microlit), e colocados num insert de 200 μL , dentro de um vial (Specanalítica equipamentos científicos, lda).

- Grupo B - 10 blocos apresentaram 2 cm largura x 2 cm comprimento x 4 mm espessura; Imediatamente após a polimerização dos blocos de acrílico, cada bloco foi colocado e identificado num frasco de vidro (SCHOTT DURAN) envolvido em alumínio, e imerso em 10 mL de saliva artificial, durante 72 h a $37^{\circ} \text{C} \pm 1^{\circ} \text{C}$. Após 24 h, 48 h e 72 h foram retirados 200 μL de cada amostra, com o auxílio de uma micropipeta (Labnet International, Inc e Microlit), e colocados num insert de 200 μL , dentro de um vial (Specanalítica equipamentos científicos, lda).
- Grupo C - 10 blocos apresentaram 4 cm largura x 4 cm comprimento x 8 mm espessura; Imediatamente após a polimerização dos blocos de acrílico, cada bloco foi colocado e identificado num frasco de vidro (SCHOTT DURAN) envolvido em alumínio, e imerso em 10 mL de saliva artificial, durante 72 h a $37^{\circ} \text{C} \pm 1^{\circ} \text{C}$. Após 24 h, 48 h e 72 h foram retirados 200 μL de cada amostra, com o auxílio de uma micropipeta (Labnet International, Inc e Microlit), e colocados num insert de 200 μL , dentro de um vial (Specanalítica equipamentos científicos, lda).



Figura 7 e 8. Conjunto de 5 vials no carrossel do aparelho HPLC-DAD e Micropipetas (FCT-UNL) – fotografia do autor

3.1. Critérios de inclusão

Foram incluídos na amostra todos os blocos de acrílico de resina acrílica termopolimerizável *ProBase® Hot (Ivoclar Vivadent – technical)*, que foram obtidos a partir das condições apresentadas pelas instruções do fabricante.

4. Pré-requisitos para a selecção da amostra

4.1. Preparação da saliva artificial

A saliva artificial foi realizada tendo por base a fórmula descrita por Urban et al. (2009), a qual, por sua vez, foi descrita por Fussyama, et al. (1963). Neste estudo, a fórmula utilizada tem algumas alterações na concentração de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, face à fórmula base, pois quando o pH passava a neutro, a solução tinha a tendência a se tornar turva e criar precipitados de cálcio. Desta forma, usou-se a fórmula NaCl (0,4 g), KCl (0,4 g), $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0,2 g), $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0,78 g), $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ (0,005 g), ureia (1,0 g) e água destilada (1000 mL), com um pH neutro.

Todos estes reagentes foram retirados da sua embalagem com uma espátula metálica, colocados numa balança analítica para pesagem e adicionados a 1000 mL de água Milli-Q. Através de uma placa de agitação magnética conseguiu-se uma melhor homogeneização dos componentes (Urban et al, 2009). A solução de saliva artificial foi preparada num balão volumétrico com um volume de 1000 mL e conservada à temperatura ambiente.

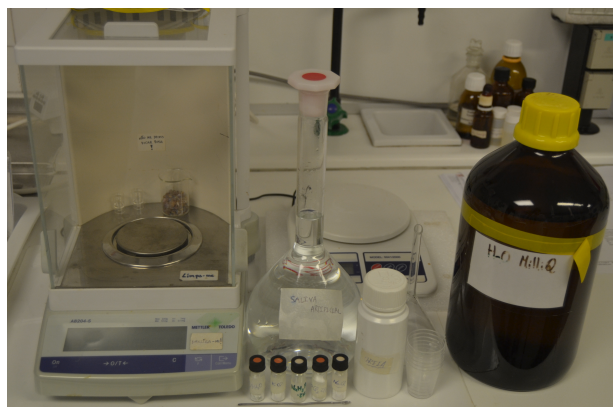


Figura 9. Saliva artificial no balão volumétrico e material utilizado na realização da solução de saliva artificial (FCT-UNL) – fotografia do autor

4.2. Preparação dos blocos de acrílico

4.2.1. Resina acrílica utilizada no estudo - *ProBase® Hot (Ivoclar Vivadent – technical)*

A *ProBase® Hot (Ivoclar Vivadent - technical)* é uma resina acrílica termopolimerizável, utilizada em medicina dentária na confecção de próteses acrílicas. Vários métodos de polimerização térmica permitem várias aplicações deste material.

Aplicação: O *ProBase® Hot (Ivoclar Vivadent - technical)* aplica-se da seguinte forma, segundo o fabricante - eliminar a cera do gesso com água a ferver, isolar as superfícies do gesso húmidas com duas camadas do isolante *Separating Fluid Ivoclar Vivadent* e deixar secar, e por fim, com gesso, posicionar o modelo no interior da mufla (podem-se criar retenções nos dentes, para assegurar uma correcta união com o material da prótese). A proporção ideal de mistura para uma prótese é de 22,5 g de pó (polímero) e 10 mL de líquido (monómero). Para realizar uma mistura com uma proporção ideal, e para que ocorra uma mínima contracção de polimerização, o fabricante aconselha o uso de um sistema de dosagem (com dois cilindros de medida, um para o pó, outro para o líquido, ambos graduados). O fabricante também aconselha o armazenamento do material num local escuro, bem ventilado e fresco, a uma temperatura de 2 a 28° C.

Composição: esta resina termopolimerizável é constituída por um sistema pó-líquido. Apresenta componentes sob a forma de pó, como o poli(metilmacrilato) em grandes quantidades, e em menores quantidades o iniciador peróxido de benzoílo, o qual é responsável pela iniciação do processo de polimerização, pigmentos e agentes de amolecimento. Os componentes líquidos são predominantemente monómeros não polimerizados de metilmacrilato, catalisadores e o agente de ligação dimetacrilato.

Indicações: confecção de próteses totais, próteses parciais, próteses combinadas e rebasamentos.

Contra-indicações: contacto intra-oral directo com o material não polimerizado e caso o doente apresente qualquer alergia provada a um dos componentes da resina (efeitos colaterais como reacções alérgicas).



Figura 10 e 11. Resina acrílica utilizada no estudo - *ProBase® Hot (Ivoclar Vivadent – technical)* (ESCSEM) – fotografia do autor:

4.2.2. Material laboratorial utilizado na realização dos blocos de acrílico dos Grupo A, B e C

- Espátula de gesso;
- Bisturi / Faca de cera / Faca de gesso;
- Graal;
- Balança digital (*Digital Scale – Velleman*);
- Godé de silicone;
- Proveta de vidro de 25 mL;
- Muflas (2);
- Isolante gesso-gesso / acrílico-gesso;
- Placas termoplásticas 0,80 (*Dentaflux*)
- Resina acrílica *ProBase® Hot (Ivoclar Vivadent - technical)*
- Polimerizadora;
- Isolante *Separating Fluid Ivoclar Vivadent*;
- Espátula para manipulação do acrílico;
- Prensa;
- Material de acabamento e polimento;
- Bridas;
- Vibrador.

4.2.3. Preparação dos blocos de acrílico do Grupo A

Foram realizados 10 blocos de placas termoplásticas 0,80 (*DentaFlux*) com as dimensões 2 cm x 2 cm x 2 mm, para posterior confecção dos blocos de acrílico em resina termopolimerizável; Espatulou-se gesso tipo III para preenchimento da mufla e colocou-se o gesso na mufla; Foram colocados os blocos de placas termoplásticas no gesso (6 numa mufla e 4 noutra mufla); Isolou-se o gesso e os blocos com separador de gesso (*Separating Fluid Ivoclar Vivadent*), sendo retirado o excesso de isolante, e deixou-se secar; Preencheu-se a contra-mufla com gesso tipo III e fechou-se a tampa da mufla;

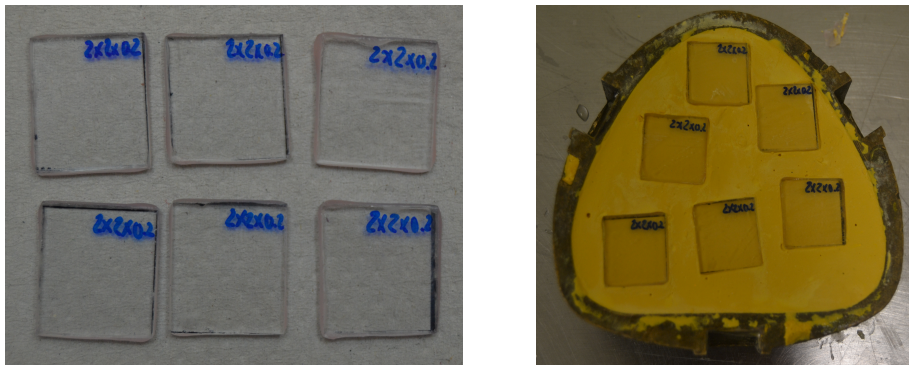


Figura 12 e 13. Exemplo de 6 placas termoplásticas (*Dentaflux*) utilizadas neste estudo (ESCSEM) e da mufla com 6 placas termoplásticas – fotografia do autor

Aplicação:

Foram colocadas as muflas em bridas (com capacidade para 3 muflas) em água a ferver durante cerca de 5 minutos, para evitar que os blocos de placas termoplásticas derretessem; Removeram-se os blocos, isolaram-se as superfícies de gesso húmidas com duas camadas de *Separating Fluid Ivoclar Vivadent* e deixou-se secar;

Mistura:

A proporção ideal de mistura para uma prótese, para a resina acrílica *ProBase® Hot (Ivoclar Vivadent - technical)*, é de 22,5 g de pó (polímero) e 10 mL de líquido (monómero); Com uma espátula metálica misturou-se completamente o polímero e o monômero na proporção indicada; Deixou-se o material maturar no recipiente de

manipulação fechado durante 8 a 10 minutos (máximo), na temperatura ambiente (23° C / 73° F);

Tempo útil de Trabalho:

Após maturação de 8 a 10 minutos, trabalhou-se o material durante 20 minutos (máximo), à temperatura de 23° C / 73° F;

Prensagem:

Com quantidade suficiente de resina acrílica, preencheu-se as duas metades isoladas da mufla; Segundo as instruções do fabricante, a resina devia estar a uma temperatura de 40° C / 104° F, instrução esta que não foi cumprida, por incapacidade de medir a temperatura a que a resina se encontrava; Cuidadosamente, fechou-se a mufla na prensa com 80 bar de pressão; Travou-se a mufla e manteve-se a pressão;

Polimerização

Colocou-se a mufla fechada em água fria, aqueceu-se até 100° C (212° F) e deixou-se ferver durante 45 minutos.

Arrefecimento

Deixou-se a mufla arrefecer durante 30 minutos à temperatura ambiente e de seguida arrefeceu-se com água fria;

Desmuflagem e acabamento

A mufla foi aberta totalmente fria e removeu-se o gesso; Foi feito o acabamento e polimento de maneira habitual.

Nota: O aumento da temperatura de polimerização e o prolongamento do tempo de polimerização podem alterar o teor de monómeros residuais. Este procedimento padrão é recomendado por permitir um nível óptimo de monómero residual (< 2,2 %).

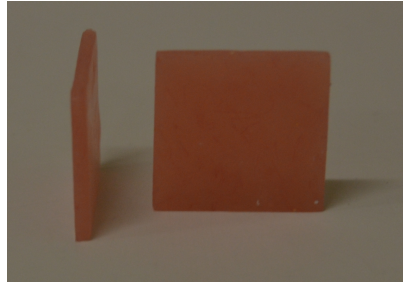


Figura 14. Exemplo de bloco do grupo A – fotografia do autor

4.2.4. Preparação dos blocos de acrílico do Grupo B:

Foram realizados 20 blocos de placas termoplásticas 0,80 (*DentaFlux*) com as dimensões 2 cm x 2 cm x 4 mm, para posterior confecção dos blocos de acrílico em resina termopolimerizável (foram colocadas 2 placas termoplásticas uma em cima da outra para obter 4 mm de espessura); Espatulou-se gesso tipo III para preenchimento da mufla e colocou-se o gesso na mufla; Foram colocados os blocos de placas termoplásticas no gesso (12 numa mufla e 8 noutra mufla); Isolou-se o gesso e os blocos com separador de gesso (*Separating Fluid Ivoclar Vivadent*), sendo retirado o excesso de isolante, e deixou-se secar; Preencheu-se a contra-mufla com gesso tipo III e fechou-se a tampa da mufla;

Aplicação:

Foram colocadas as muflas em bridas (com capacidade para 3 muflas) em água a ferver durante cerca de 5 minutos, para evitar que os blocos de placas termoplásticas derretessem; Removeram-se os blocos, isolaram-se as superfícies de gesso húmidas com duas camadas de *Separating Fluid Ivoclar Vivadent* e deixou-se secar;

Mistura:

A proporção ideal de mistura para uma prótese, para a resina acrílica *ProBase® Hot (Ivoclar Vivadent - technical)*, é de 22,5 g de pó (polímero) e 10 mL de líquido (monómero); Com uma espátula metálica misturou-se completamente o polímero e o monómero na proporção indicada; Deixou-se o material maturar no recipiente de

manipulação fechado durante 8 a 10 minutos (máximo), na temperatura ambiente (23° C / 73° F);

Tempo útil de Trabalho:

Após maturação de 8 a 10 minutos, trabalhou-se o material durante 20 minutos (máximo), à temperatura de 23° C / 73° F;

Prensagem:

Com quantidade suficiente de resina acrílica, preencheu-se as duas metades isoladas da mufla; Segundo as instruções do fabricante, a resina devia estar a uma temperatura de 40° C / 104° F, instrução esta que não foi cumprida, por incapacidade de medir a temperatura a que a resina se encontrava; Cuidadosamente, fechou-se a mufla na prensa com 80 bar de pressão; Travou-se a mufla e manteve-se a pressão;

Polimerização

Colocou-se a mufla fechada em água fria, aqueceu-se até 100° C (212° F) e deixou-se ferver durante 45 minutos.

Arrefecimento

Deixou-se a mufla arrefecer durante 30 minutos à temperatura ambiente e de seguida arrefeceu-se com água fria;

Desmuflagem e acabamento

A mufla foi aberta totalmente fria e removeu-se o gesso; Foi feito o acabamento e polimento de maneira habitual.

Nota: O aumento da temperatura de polimerização e o prolongamento do tempo de polimerização podem alterar o teor de monómeros residuais. Este procedimento padrão é recomendado por permitir um nível óptimo de monómero residual (< 2,2 %).

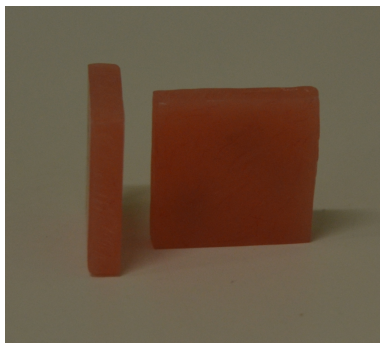


Figura 15. Exemplo de bloco do grupo B – fotografia do autor

4.2.5. Preparação dos blocos de acrílico do Grupo C:

Foram realizados 40 blocos de placas termoplásticas 0,80 (*DentaFlux*) com as dimensões 2 cm x 2 cm x 8 mm, para posterior confecção dos blocos de acrílico em resina termopolimerizável (foram colocadas 4 placas termoplásticas umas em cima das outras para obter 8 mm de espessura); Espatulou-se gesso tipo III para preenchimento da mufla e colocou-se o gesso na mufla; Foram colocados os blocos de placas termoplásticas no gesso (24 numa mufla e 16 noutra mufla); Isolou-se o gesso e os blocos com separador de gesso (*Separating Fluid Ivoclar Vivadent*), sendo retirado o excesso de isolante, e deixou-se secar; Preencheu-se a contra-mufla com gesso tipo III e fechou-se a tampa da mufla;

Aplicação:

Foram colocadas as muflas em bridas (com capacidade para 3 muflas) em água a ferver durante cerca de 5 minutos, para evitar que os blocos de placas termoplásticas derretessem; Removeram-se os blocos, isolaram-se as superfícies de gesso húmidas com duas camadas de *Separating Fluid Ivoclar Vivadent* e deixou-se secar;

Mistura:

A proporção ideal de mistura para uma prótese, para a resina acrílica *ProBase® Hot (Ivoclar Vivadent - technical)* é de 22,5 g de pó (polímero) e 10 mL de líquido (monómero); Com uma espátula metálica misturou-se completamente o polímero e o monômero na proporção indicada; Deixou-se o material maturar no recipiente de

manipulação fechado durante 8 a 10 minutos (máximo), na temperatura ambiente (23° C / 73° F);

Tempo útil de Trabalho:

Após maturação de 8 a 10 minutos, trabalhou-se o material durante 20 minutos (máximo), à temperatura de 23° C / 73° F;

Prensagem:

Com quantidade suficiente de resina acrílica, preencheu-se as duas metades isoladas da mufla; Segundo as instruções do fabricante a resina devia estar a uma temperatura de 40° C / 104° F, instrução esta que não foi cumprida, por incapacidade de medir a temperatura a que a resina se encontrava; Cuidadosamente, fechou-se a mufla na prensa com 80 bar de pressão; Travou-se a mufla e manteve-se a pressão;

Polimerização

Colocou-se a mufla fechada em água fria, aqueceu-se até 100° C (212° F) e deixou-se ferver durante 45 minutos.

Arrefecimento

Deixou-se a mufla arrefecer durante 30 minutos à temperatura ambiente e de seguida arrefeceu-se com água fria;

Desmuflagem e acabamento

A mufla foi aberta totalmente fria e removeu-se o gesso; Foi feito o acabamento e polimento de maneira habitual.

Nota: O aumento da temperatura de polimerização e o prolongamento do tempo de polimerização podem alterar o teor de monómeros residuais. Este procedimento padrão é recomendado por permitir um nível óptimo de monómero residual (< 2,2 %).

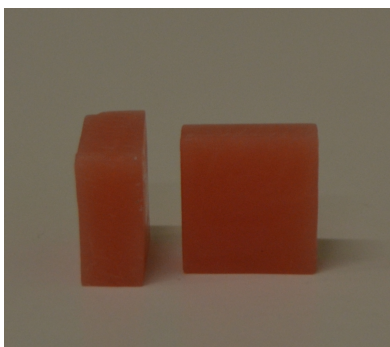


Figura 16. Exemplo de bloco do grupo C – fotografia do autor



Figura 17. Material utilizado no Laboratório Interno (ESCSEM) – fotografia do autor

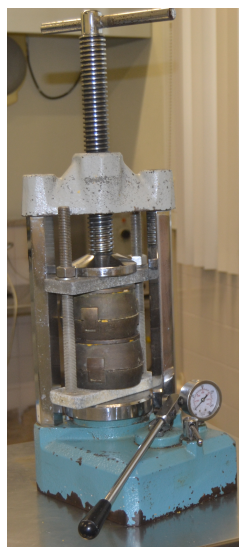


Figura 18 e 19. Polimerizadora, panela e prensa utilizadas no Laboratório Interno (ESCSEM) – fotografia do autor

5. Armazenamento

5.1. Armazenamento *ProBase® Hot (Ivoclar Vivadent - technical)*

A resina acrílica termopolimerizável *ProBase® Hot (Ivoclar Vivadent – technical)* foi armazenada segundo as instruções do fabricante num local escuro, fresco e bem ventilado, a uma temperatura entre 2 e 28° C (36 a 82° F).

5.2. Armazenamento blocos de acrílico

Logo a seguir à confecção dos blocos de acrílico de cada um dos grupos, estes foram colocados num frasco de vidro (envolvido em alumínio), correctamente identificado, com 10 mL de saliva artificial, e imediatamente armazenados numa estufa (J.P. Selecta, s.a. - nº de série 0452742) a 37° C \pm 1° C, durante 72 h. No grupo A e B foram utilizados frascos de vidro SCHOTT DURAN. No grupo C, para que o volume de saliva artificial não fosse alterado entre grupos, ou seja, para que os blocos de 2 mm x 2 mm x 8 mm de espessura ficassem totalmente imersos no mesmo volume (10 mL de saliva artificial) foram utilizados outros frascos de vidro.



Figura 20. Exemplo de 10 frascos de vidro (SCHOTT DURAN), envolvidos em alumínio, com os blocos de acrílicos do GA, em 10 mL de saliva artificial – fotografia do autor



Figura 21. Exemplo de 10 frascos de vidro (SCHOTT DURAN), envolvidos em alumínio, com os blocos de acrílicos do GB, em 10 mL de saliva artificial – fotografia do autor



Figura 22. Exemplo de 10 frascos de vidro, envolvidos em alumínio, com os blocos de acrílicos do GC, em 10 mL de saliva artificial - fotografia do autor



Figura 23,24 e 25. Exemplo de 3 frascos de vidro (sem alumínio), correctamente identificados, com os blocos de acrílicos do GA, GB e GC, em 10 mL de saliva artificial – fotografia do autor



Figura 26. Amostras na estufa (FCT-UNL) - fotografia do autor

6. Reagentes e soluções HPLC

A fase móvel foi preparada com os solventes acetonitrilo (grau para HPLC), obtido pela Carlo Erba Reagents Group (D1N029121N), e água ultra pura, obtida pelo sistema Milli-Q50 de purificação de água (Diwer Technologies – n° de série DW100-06090026), na proporção de 75:25 respectivamente. Estes solventes foram filtrados por vácuo, através de filtros de nylon, com 47 mm de diâmetro e 0,45 µm de tamanho de poro (Millipore).

Os compostos utilizados neste estudo foram o metilmetacrilato – MMA - (adquirido pela Sigma-Aldrich Chemistry – lote STBB1655A0) e o etilmetacrilato – EMA - (adquirido pela Sigma-Aldrich Chemistry – lote SHBB5460V). Os constituintes da solução de saliva artificial, já descrita anteriormente, foram os restantes reagentes utilizados.

Foram preparadas soluções frescas de MMA e EMA em saliva artificial, ambas com 200 µg mL⁻¹ (solução mãe), para posteriormente se elaborarem as curvas de calibração.

7. Quantificação e identificação por HPLC-DAD

Para a quantificação e identificação dos monómeros residuais das amostras de saliva artificial em estudo após 24 h, 48 h e 72 h, foi utilizada uma High Performance Liquid Chromatography (HPLC) Waters Alliance 2690 de bomba quaternária, associada a um detector de fotodíodos (DAD – photodiode array detector, Waters 996). As amostras foram separadas usando uma coluna de fase reversa C18 (Kinetex 150 x 4,6 mm; 2,6 µm de tamanho de partícula). A eluição dos compostos MMA e EMA realizou-se de forma isocrática unitária, a um fluxo de 0,4 mL min⁻¹, usando como eluente uma solução de acetonitrilo a 75 % e água Milli-Q50 a 25 %. A eluição foi registada numa gama espectral entre os 190 e 400 nm. O tempo total de corrida foram 7 minutos e o volume de injeção foi de 50 µL. Cada amostra foi injectada em duplicado. O sistema HPLC foi controlado pelo software MassLynx v4.1. Para os dois compostos preparou-se uma série de diluições da solução mãe (200 µg mL⁻¹) em saliva artificial, para uma gama de concentrações de 0,1; 0,5; 1 e 2,5 µg mL⁻¹.



Figura 27. Aparelho de HPLC-DAD utilizado neste estudo (FCT-UNL) - fotografia do autor

8. Linearidade e limites mínimos de quantificação e de detecção

Para a quantificação dos compostos MMA e EMA durante os vários ensaios, foi efectuada uma recta de calibração de concentração vs. área do pico, usando o método de padrão externo. A análise do coeficiente de regressão (R^2) das rectas e dos limites mínimos, detectável e quantificável (LOD, LOQ), tendo em consideração o desvio padrão residual (s_y/x) de cada recta, permitiu determinar a linearidade para cada composto. Das várias amostras dos diferentes grupos, imersas num frasco com 10 mL de saliva artificial, foram retirados de cada frasco 200 μ L, e colocados em diferentes vials, os quais foram congelados para armazenamento. Posteriormente, estes 200 μ L de cada amostra foram colocados num insert de 200 μ L, que por sua vez foi colocado num vial com tampa e septo de teflon, preparado para ser colocado no auto-sampler do cromatógrafo.

Tabela 3. Métodos de eluição dos compostos no estudo de detecção

Monómero	Fase Móvel		λ detecção (nm)	Tempo de Retenção (min.)	Fluxo (mL min ⁻¹)
	A %	B %			
MMA	75	25	202	4,70	0,4
EMA	75	25	202	5,23	0,4
A – Acetonitrilo B – Água Milli-Q					

9. Desenvolvimento dos métodos cromatográficos

Foi realizada uma optimização das condições cromatográficas, que permitiram a detecção dos monómeros residuais, antes da análise das amostras. Para a optimização das variáveis em HPLC, na análise dos monómeros MMA e EMA, foi usada, nas condições cromatográficas descritas anteriormente, a coluna de fase reversa C18 (Kinetex 150 x 4,6 mm; 2,6 µm de tamanho de partícula).

Para a optimização do método cromatográfico e estabelecimento das condições cromatográficas, foi preparada uma solução mãe de 200 µg mL⁻¹ em saliva artificial, para o composto MMA e para o composto EMA. Desta solução realizaram-se 4 diluições com concentrações de 0,1 µg mL⁻¹, 0,5 µg mL⁻¹, 1 µg mL⁻¹ e 2,5 µg mL⁻¹, e posteriormente foram injectados 50 µL de cada uma das diluições, para análise no HPLC-DAD.

Para a validação do método e dos resultados e para assegurar a credibilidade dos mesmos, foi avaliada a linearidade. Como já foi referido, a partir de uma solução-mãe de 200 µg mL⁻¹, foram preparadas em saliva artificial quatro soluções-padrão a diluições crescentes, que variavam entre 0,1; 0,5; 1; 2,5 µg mL⁻¹. A análise destas soluções permitiu realizar uma recta de calibração, a qual relaciona a concentração do composto com a área do pico do analito (resposta do instrumento). Foi feita a análise de cada concentração em duas replicadas, sendo determinado o desvio-padrão das áreas dos picos.

O limite de quantificação (LOQ) corresponde à quantidade de analito que pode ser seguramente quantificado sob as condições experimentais estabelecidas (Lough & Wainer, 2003), ou seja, é a mais pequena quantidade de analito quantificável numa amostra, com o detector utilizado. No método utilizado, a determinação do LOQ foi realizada considerando a equação 1:

$$LOQ = \frac{10DP}{B} \text{ (equação 1)}$$

onde DP corresponde ao desvio padrão residual, B ao declive e o valor 10 corresponde a uma constante K, que toma o valor de 10 para um nível de confiança de 99,7%, tendo em conta que a distribuição de erros é representada por uma curva de gausse (Rangel et al., 2011).

O limite de detecção (LOD) corresponde à quantidade de analíto que pode ser seguramente detectado, sob as condições experimentais estabelecidas (Lough & Wainer, 2003), ou seja, é a mais pequena quantidade de analíto que é possível detectar numa amostra, com o detector utilizado. A determinação do LOD foi realizada considerando a equação 2, em que a constante K toma o valor de 3,33 (Rangel et al., 2011):

$$LOD = \frac{3,33DP}{B} \text{ (equação 2)}$$

10. Análise estatística

Os dados obtidos foram analisados com recurso ao software IBM SPSS Statistics (v. 21). Utilizaram-se medidas de estatística descritiva (média, desvio padrão) e metodologias de análise estatística inferencial, nomeadamente testes para a comparação dos valores médios, tomando como referência, para a rejeição das hipóteses nulas, um nível de significância de 5% ($p \leq 0,05$).

III. Resultados

No presente estudo foram analisados 30 blocos de acrílico, confeccionados com a resina acrílica *ProBase® Hot (Ivoclar Vivadent –technical)*, divididos em 3 grupos de 10 blocos, com distintas áreas superficiais. Esta análise permitiu identificar e quantificar a libertação de monómeros residuais por parte desta resina acrílica.

1. Identificação dos monómeros residuais libertados pelos blocos de acrílico para a saliva artificial

Foram identificados, através da técnica de HPLC, dois monómeros residuais nas amostras analisadas, MMA e EMA, em qualquer um dos Grupos (A, B ou C). As figuras 28 a 34, demonstram que o método utilizado apresentou uma detecção e separação dos analitos adequada e eficiente.

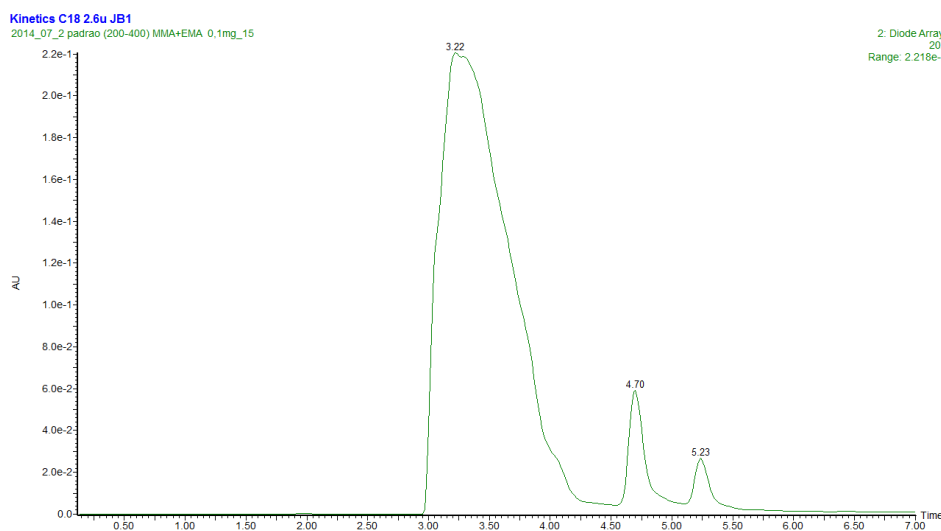


Figura 28. Cromatograma de 50 μL da solução padrão de MMA + EMA a $0,1 \mu\text{g mL}^{-1}$, com uma coluna de fase reversa C_{18} , de forma isocrática unitária, com a fase móvel $\text{AcCN}/\text{H}_2\text{O}$ (75:25, v/v) a pH 7, a um fluxo de $0,4 \text{ mL min}^{-1}$ ($t_{\text{rMMA}} = 4,70$ e $t_{\text{rEMA}} = 5,23$)

Caracterização dos compostos orgânicos libertados após a confecção e uso de próteses acrílicas removíveis – estudo in vitro

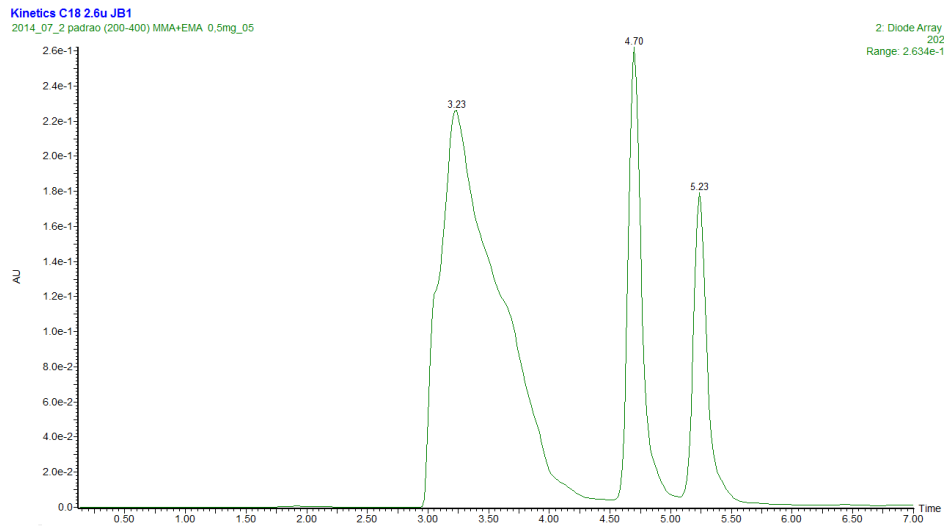


Figura 29. Cromatograma de 50 μL da solução padrão de MMA + EMA a $0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$, com uma coluna de fase reversa C_{18} , de forma isocrática unitária, com a fase móvel $\text{AcCN}/\text{H}_2\text{O}$ (75:25, v/v) a pH 7, a um fluxo de $0,4 \text{ mL min}^{-1}$ ($t_{\text{MMA}} = 4,70$ e $t_{\text{EMA}} = 5,23$)

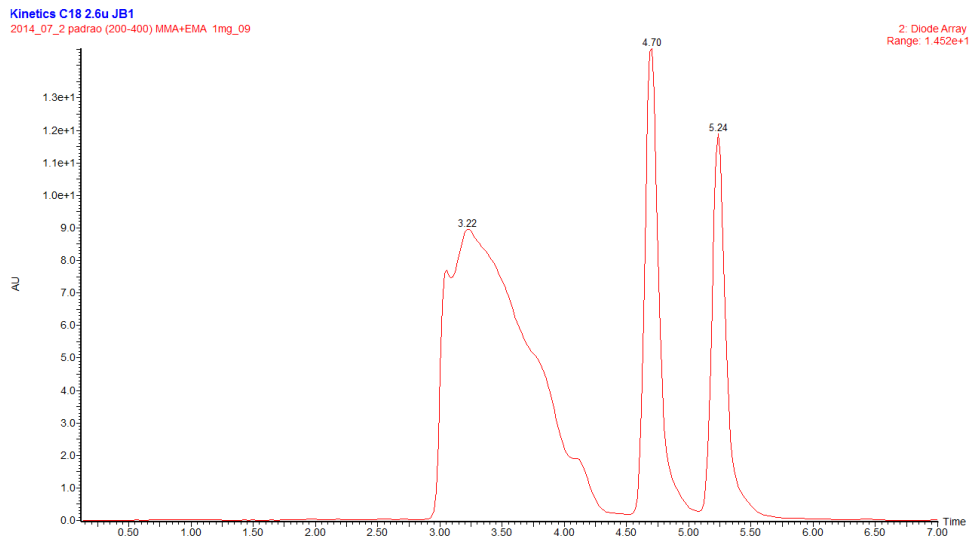


Figura 30. Cromatograma de 50 μL da solução padrão de MMA + EMA a $1 \mu\text{g mL}^{-1}$, com uma coluna de fase reversa C_{18} , de forma isocrática unitária, com a fase móvel $\text{AcCN}/\text{H}_2\text{O}$ (75:25, v/v) a pH 7, a um fluxo de $0,4 \text{ mL min}^{-1}$ ($t_{\text{MMA}} = 4,70$ e $t_{\text{EMA}} = 5,23$)

Resultados

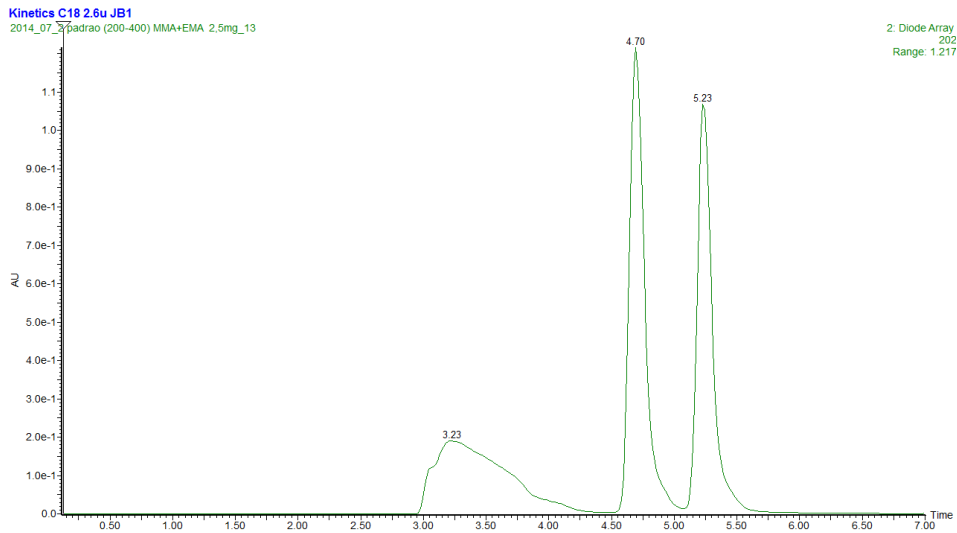


Figura 31. Cromatograma de 50 μL da solução padrão de MMA + EMA a $2,5 \mu\text{g mL}^{-1}$, com uma coluna de fase reversa C_{18} , de forma isocrática unitária, com a fase móvel $\text{AcCN}/\text{H}_2\text{O}$ (75:25, v/v) a pH 7, a um fluxo de $0,4 \text{ mL min}^{-1}$ ($t_{\text{MMA}} = 4,70$ e $t_{\text{EMA}} = 5,23$)

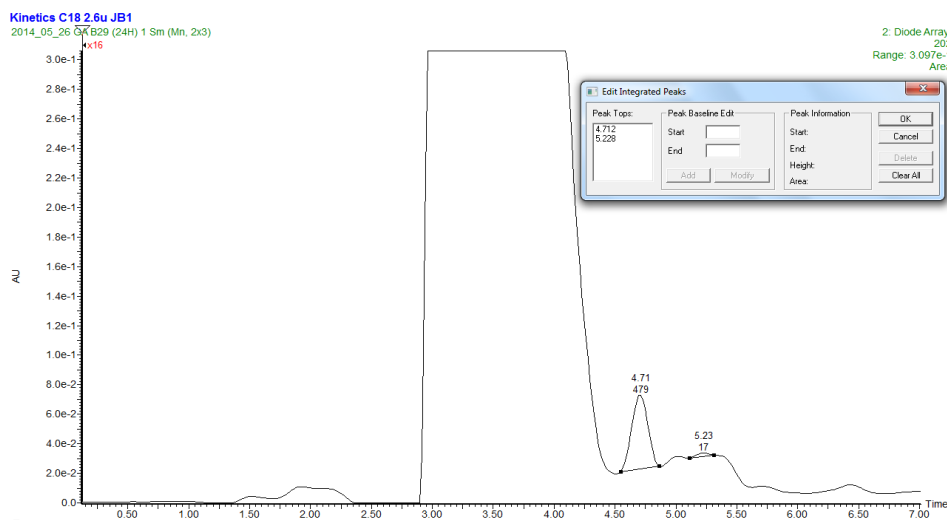


Figura 32. Exemplo de cromatograma de 50 μL do grupo A (A10) às 24 h, com uma coluna de fase reversa C_{18} , de forma isocrática unitária, com a fase móvel $\text{AcCN}/\text{H}_2\text{O}$ (75:25, v/v) a pH 7, a um fluxo de $0,4 \text{ mL min}^{-1}$ ($t_{\text{MMA}} = 4,70$ e $t_{\text{EMA}} = 5,23$)

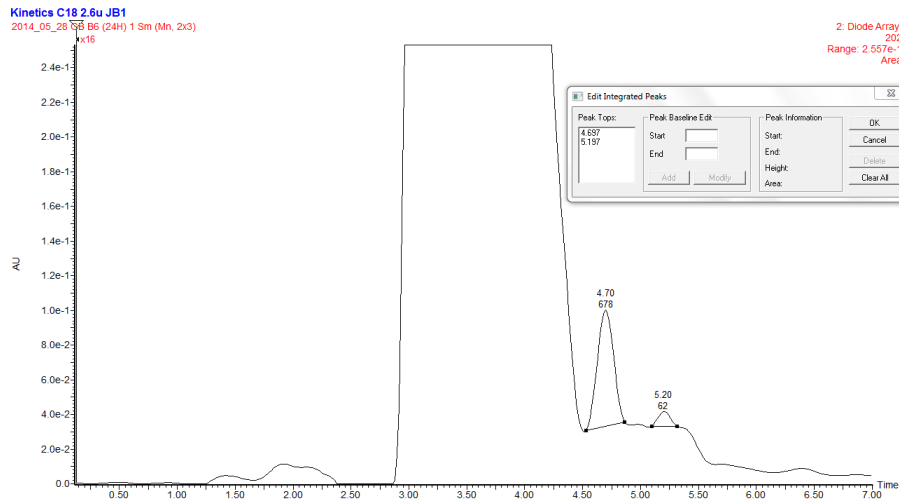


Figura 33. Exemplo de cromatograma de 50 μL do grupo B (B2) às 24 h, com uma coluna de fase reversa C_{18} , de forma isocrática unitária, com a fase móvel $\text{AcCN}/\text{H}_2\text{O}$ (75:25, v/v) a pH 7, a um fluxo de $0,4 \text{ mL min}^{-1}$ ($t_{\text{TMA}} = 4,70$ e $t_{\text{EMA}} = 5,23$)

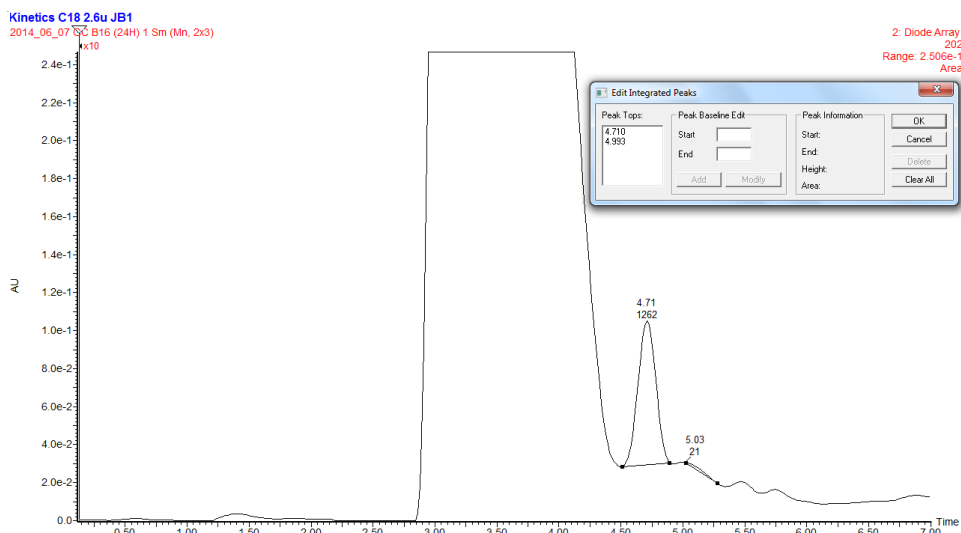


Figura 34. Exemplo de cromatograma de 50 μL do grupo C (C1) às 24 h, com uma coluna de fase reversa C_{18} , de forma isocrática unitária, com a fase móvel $\text{AcCN}/\text{H}_2\text{O}$ (75:25, v/v) a pH 7, a um fluxo de $0,4 \text{ mL min}^{-1}$ ($t_{\text{TMA}} = 4,70$ e $t_{\text{EMA}} = 5,23$)

Resultados

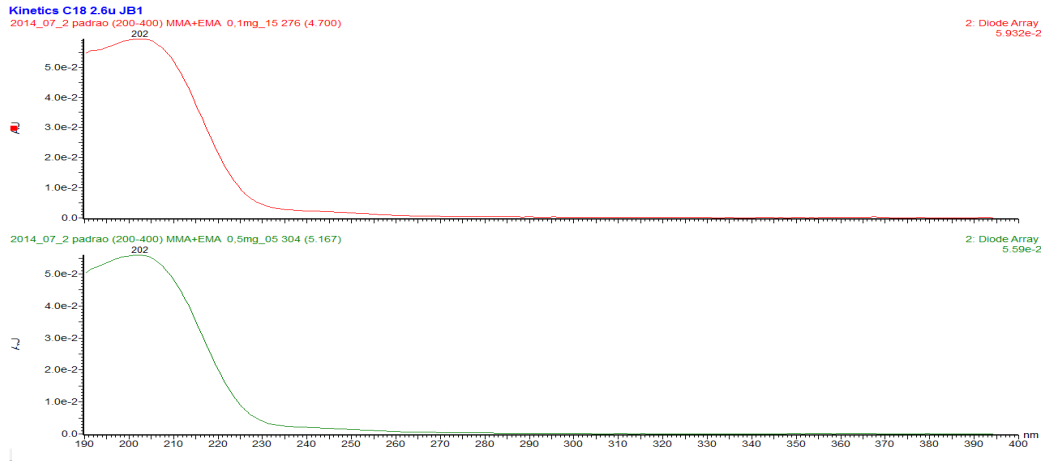


Figura 35. Espectro de U.V. dos monómeros MMA (A) e EMA (B) – $\lambda_{\text{deteccção}} = 202 \text{ nm}$.

2. Quantificação dos monómeros residuais libertados pelos blocos de acrílico para a saliva artificial

Como referido anteriormente, a análise de quatro soluções-padrão a diluições crescentes, que variavam entre $0,1 \mu\text{g mL}^{-1}$, $0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$, $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ e $2,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ (a partir de uma solução-mãe de $200 \mu\text{g mL}^{-1}$), foi essencial para relacionar a concentração do composto com a área do pico do analito (resposta do instrumento), através de uma recta de calibração que traduzisse esta relação (figura 36).

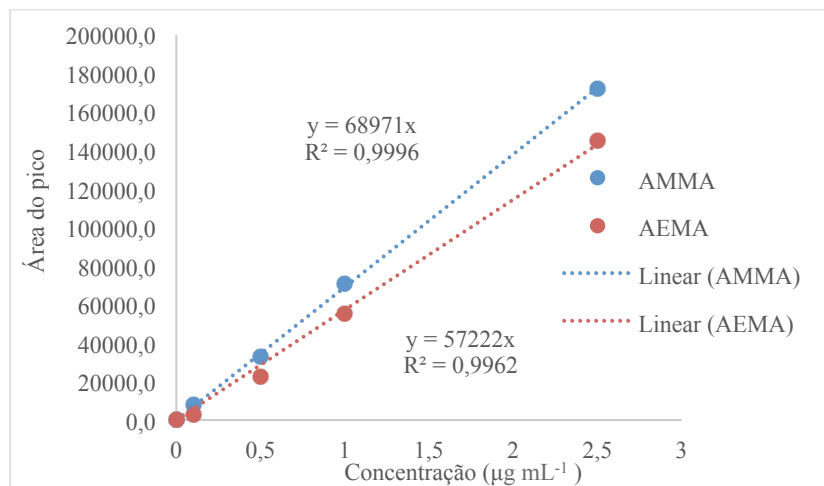


Figura 36. Rectas de calibração para o MMA e EMA

A análise de cada concentração em duas replicadas e a determinação do desvio-padrão das áreas dos picos, permitiu verificar que existe uma linearidade satisfatória no

intervalo selecionado, com coeficientes de correlação de 0,9996 para o MMA e 0,9962 para o EMA.

Tabela 4. Resultados da calibração linear

Monómeros	Equação da Recta	R ²
MMA	$y = 6897x$	0,9996
EMA	$y = 5722x$	0,9962

Relativamente ao limite de quantificação e ao limite de detecção, os valores de LOD e LOQ, para cada um dos compostos, estão descritos na tabela 5.

Tabela 5. Valores de LOQ e LOD referentes ao MMA e EMA

Monómero	LOQ	LOD
MMA	5,7263E-09	1,7179E-09
EMA	4,4388E-09	1,3317E-09

A concentração do monómero MMA em cada uma das amostras foi obtida através da análise por HPLC e da realização das rectas de calibração, descritas anteriormente. Foi calculada a média e o desvio padrão para cada grupo de amostras (A, B e C) às 24 h, 48 h e 72 h de armazenamento

2.1. Análise comparativa das concentrações médias de MMA – $\mu\text{g mL}^{-1}$ - entre os grupos A, B, C às 24 h, 48 h e 72 h

Análise comparativa da libertação de MMA entre grupos às 24 h

A análise comparativa dos valores de concentração de MMA entre os grupos A, B e C às 24 h, revelou que a quantidade de monómeros libertados na saliva artificial não é independente da área superficial do bloco de acrílico utilizado (tabelas 6 e 7), tendo-se encontrado diferenças com significado estatístico, para um nível de significância de 5 %, nos valores médios de concentração de MMA, entre os três grupos: entre A e B ($p =$

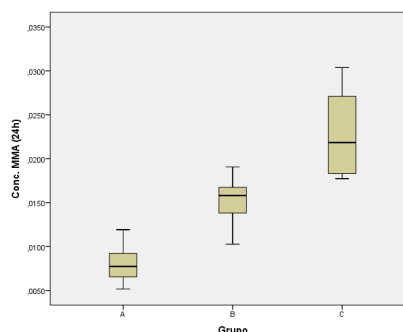
0,015; teste Tukey HSD), entre A e C ($p < 0,001$; teste Tukey HSD), e entre B e C ($p < 0,001$; teste Tukey HSD), às 24 h. A figura 37 ilustra esta comparação.

Tabela 6. Média e desvio padrão da [MMA] ($\mu\text{g mL}^{-1}$) dos grupos A, B e C às 24 h

Grupo	N	Média	Desvio Padrão
A	9	0,0094	0,0033
B	10	0,0150	0,0026
C	10	0,0240	0,0057

Tabela 7. Análise comparativa da [MMA] ($\mu\text{g mL}^{-1}$) entre grupos às 24 h

Grupo	p
A B	0,015*
A C	0,000*
B A	0,015*
B C	0,000*
C A	0,000*
C B	0,000*



*Diferença com significado estatístico **Figura 37.** Concentração de MMA no Grupo A, B e C às 24 h

Análise comparativa da libertação de MMA entre grupos às 48 h

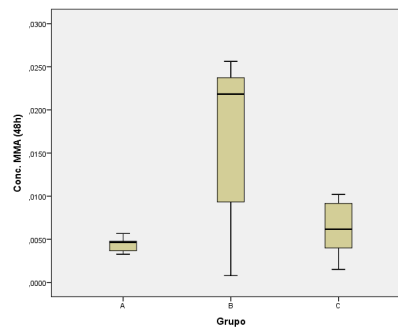
A análise comparativa dos valores de concentração de MMA entre os grupos A, B e C às 48 h, revelou que a quantidade de monómeros libertados na saliva artificial não é independente da área superficial do bloco de acrílico utilizado (tabelas 8 e 9), entre os grupos A e B ($p = 0,005$; teste Games-Howell) e B e C ($p = 0,017$; teste Games-Howell), tendo-se encontrado diferenças com significado estatístico, para um nível de significância de 5 %, nos valores médios de concentração de MMA. Também revelou que a quantidade de monómeros libertados na saliva artificial é independente da área superficial do bloco de acrílico utilizado (tabelas 8 e 9), entre os grupos A e C ($p = 0,071$; teste Games-Howell), não se tendo encontrado valores médios de concentração de MMA significativamente diferentes, para um nível de significância de 5 %. A figura 38 ilustra esta comparação.

Tabela 8. Média e desvio padrão da [MMA] ($\mu\text{g mL}^{-1}$) dos grupos A, B e C às 48 h

Grupo	N	Média	Desvio Padrão
A	8	0,0043	0,0008
B	10	0,0165	0,0088
C	10	0,0066	0,0029

Tabela 9. Análise comparativa da [MMA] ($\mu\text{g mL}^{-1}$) entre grupos às 48 h

Grupo	p
A B	0,005*
A C	0,071
B A	0,005*
B C	0,017*
C A	0,071
C B	0,017*



*Diferença com significado estatístico **Figura 38.** Concentração de MMA no Grupo A, B e C às 48 h

Análise comparativa da liberação de MMA entre grupos às 72 h

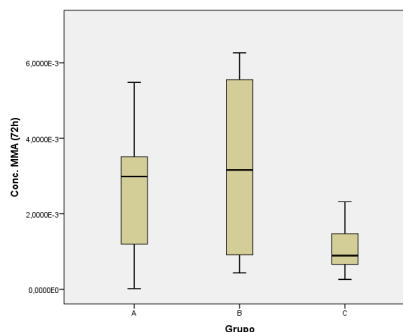
A análise comparativa dos valores de concentração de MMA entre os grupos A, B e C às 72 h, revelou que a quantidade de monômeros libertados na saliva artificial não é independente da área superficial do bloco de acrílico utilizado (tabelas 10 e 11), entre os grupos B e C ($p = 0,045$; teste Games-Howell), tendo-se encontrado diferenças com significado estatístico, para um nível de significância de 5 %, nos valores médios de concentração de MMA. Também revelou que a quantidade de monômeros libertados na saliva artificial é independente da área superficial do bloco de acrílico utilizado (tabelas 10 e 11), entre os grupos A e B ($p = 0,447$; teste Games-Howell) e A e C ($p = 0,271$; teste Games-Howell), não se tendo encontrado valores médios de concentração de MMA significativamente diferentes, para um nível de significância de 5 %. A figura 39 ilustra esta comparação.

Tabela 10. Média e desvio padrão da [MMA] ($\mu\text{g mL}^{-1}$) dos grupos A, B e C às 72 h

Grupo	N	Média	Desvio Padrão
A	9	0,0022	0,0019
B	8	0,0034	0,0024
C	8	0,0011	0,0007

Tabela 11. Análise comparativa da [MMA] ($\mu\text{g mL}^{-1}$) entre grupos às 72 h

Grupo	p
A B	0,447
A C	0,271
B A	0,447
B C	0,045*
C A	0,271
C B	0,045



*Diferença com significado estatístico **Figura 39.** Concentração de MMA no Grupo A, B e C às 72h

2.2. Análise comparativa das concentrações médias de MMA – $\mu\text{g mL}^{-1}$ - entre diferentes tempos de armazenamento (24 h, 48 h e 72 h) nos grupos A, B e C

Análise comparativa da liberação de MMA entre os três tempos de armazenamento para o Grupo A

Relativamente à concentração de MMA entre os diferentes tempos de armazenamento (24 h, 48 h e 72 h) no Grupo A, podemos observar que a concentração de monómeros libertados na saliva artificial não é independente do seu decaimento por unidade de tempo, entre o período de 24 h de armazenamento e os tempos 48 h e 72 h. É independente entre o período de armazenamento de 48 h e as 72 h (tabelas 12 e 13).

A figura 40 é representativa das diferenças com significado estatístico, para um nível de significância de 5%, nos valores médios de concentração de MMA, entre as 24 h de armazenamento e as 48 h ($p = 0,013$; teste anova de medidas repetidas), e entre as 24 h de armazenamento e as 72 h ($p = 0,003$; teste anova de medidas repetidas), no Grupo A. Entre as 48 h de armazenamento e as 72 h ($p = 0,104$; teste anova de medidas

repetidas), não existem valores médios de concentração de MMA significativamente diferentes, para um nível de significância de 5 %, no Grupo A.

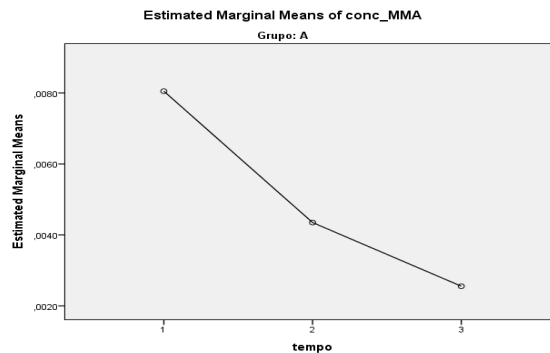


Figura 40. Concentração de MMA às 24 h (1), 48 h (2) e 72 h (3) de armazenamento no Grupo A

Tabela 12. Média e desvio padrão da [MMA] ($\mu\text{g mL}^{-1}$) às 24 h, 48 h e 72 h no grupo A

Tempo (h)	N	Média	Desvio Padrão
24	7	0,0080	0,0023
48	7	0,0044	0,0009
72	7	0,0026	0,0019

Tabela 13. Análise comparativa da [MMA] ($\mu\text{g mL}^{-1}$) entre tempos de armazenamento no grupo A

Grupo	p
1 2	0,013*
1 3	0,003*
2 1	0,013*
2 3	0,104
3 1	0,003*
3 2	0,104

*Diferença com significado estatístico

Análise comparativa da libertação de MMA entre os três tempos de armazenamento para o Grupo B

Relativamente à concentração de MMA entre os diferentes tempos de armazenamento (24 h, 48 h e 72 h) no Grupo B, podemos observar que a concentração de monómeros libertados na saliva artificial não é independente do seu decaimento por unidade de

tempo entre o período de 72 h de armazenamento e os tempos 24 h e 48 h. É independente entre o período de armazenamento de 24 h e as 48 h (tabelas 14 e 15).

A figura 41 é representativa das diferenças com significado estatístico, para um nível de significância de 5 %, nos valores médios de concentração de MMA, entre as 72 h de armazenamento e as 24 h ($p < 0,001$; teste anova de medidas repetidas) e entre as 72 h de armazenamento e as 48 h ($p = 0,001$; teste anova de medidas repetidas), no Grupo B. Entre as 24 h de armazenamento e as 48 h ($p = 0,652$; teste anova de medidas repetidas) não existem valores médios de concentração de MMA significativamente diferentes, para um nível de significância de 5 %, no Grupo B.

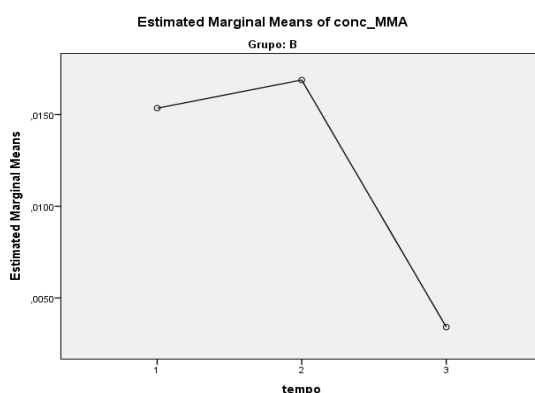


Figura 41. Concentração de MMA às 24 h (1), 48 h (2) e 72 h (3) de armazenamento no Grupo B

Tabela 14 . Média e desvio padrão da [MMA] ($\mu\text{g mL}^{-1}$) às 24 h, 48 h e 72 h no grupo B

Tempo (h)	N	Média	Desvio Padrão
24	9	0,0153	0,0026
48	9	0,0169	0,0093
72	9	0,0034	0,0024

Tabela 15. Análise comparativa da [MMA] ($\mu\text{g mL}^{-1}$) entre tempos de armazenamento no grupo B

Grupo	p
1 2	0,652
1 3	0,000*
2 1	0,652
2 3	0,001*
3 1	0,000*
3 2	0,001*

*Diferença com significado estatístico

Análise comparativa da liberação de MMA entre os três tempos de armazenamento para o Grupo C

Relativamente à concentração de MMA entre os diferentes tempos de armazenamento (24 h, 48 h e 72 h) no Grupo C, podemos observar que a concentração de monómeros libertados na saliva artificial não é independente do seu decaimento por unidade de tempo, entre todos os períodos de armazenamento.

A figura 42 é representativa das diferenças com significado estatístico, para um nível de significância de 5 %, nos valores médios de concentração de MMA, entre os três períodos de armazenamento no Grupo C: entre as 24 h e as 48 h ($p < 0,001$; teste anova de medidas repetidas), entre as 24 h e as 72 h ($p < 0,001$; teste anova de medidas repetidas) e entre as 48 h e as 72 h ($p = 0,001$; teste anova de medidas repetidas).

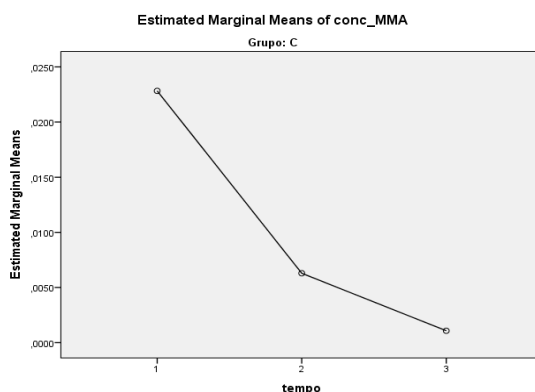


Figura 42. Concentração de MMA às 24 h (1), 48 h (2) e 72 h (3) de armazenamento no Grupo C

Tabela 16. Média e desvio padrão da [MMA] ($\mu\text{g mL}^{-1}$) às 24 h, 48 h e 72 h no grupo C

Tempo (h)	N	Média	Desvio Padrão
24	8	0,0228	0,0052
48	8	0,0063	0,0031
72	8	0,0011	0,0007

Tabela 17. Análise comparativa da [MMA] ($\mu\text{g mL}^{-1}$) entre tempos de armazenamento no grupo C

	Grupo	p
1	2	0,000*
	3	0,000*
2	1	0,000*
	3	0,001*
3	1	0,000*
	2	0,001*

*Diferença com significado estatístico

2.3. Relação entre a concentração de MMA libertado e o valor de referência da norma ISO 1567-1999

Segundo a norma ISO 1567-1999, todos os materiais utilizados na confecção de próteses dentárias devem apresentar um valor de concentração de monómeros residuais libertados inferior a 2,2 wt% (Pfeiffer & Rosenbauer, 2004; Mohamed et al., 2008; Lemus et al., 2010). Através da conversão deste valor para $\mu\text{g mL}^{-1}$ ($2,2 \times 10^{-8} \mu\text{g mL}^{-1}$), foi possível a comparação desta concentração com o presente estudo. Nesta investigação verificou-se que a libertação do composto MMA em todos os grupos de estudo (A, B e C), nos três tempos de armazenamento (24 h, 48 h e 72 h), se encontrava acima deste valor. Todos os valores médios são significativamente superiores ao valor de referência. Existem assim diferenças significativas, para um nível de significância de 5 %, entre os valores médios de concentração de MMA e o valor de referência, no grupo A (tabelas 18, 19), no grupo B (tabelas 20, 21), e no grupo C (tabelas 22, 23), nos três tempos de armazenamento ($p < 0,001$; teste t-Student). Pode-se desta forma observar, que não existe uma relação proporcional entre a concentração de monómeros existentes na saliva artificial e o seu potencial de efeitos adversos.

Tabela 18. Média e desvio padrão da [MMA] ($\mu\text{g mL}^{-1}$) às 24 h, 48 h e 72 h no grupo A (para comparação com o valor de referência $2,2 \times 10^{-8} \mu\text{g mL}^{-1}$)

Tempo (h)	n	Média	Desvio Padrão
24	9	0,0094	0,0033
48	8	0,0043	0,0008
72	9	0,0022	0,0019

Tabela 19. Análise comparativa da [MMA] ($\mu\text{g mL}^{-1}$) às 24 h, 48 h e 72 h no grupo A, com o valor de referência $2,2 \times 10^{-8} \mu\text{g mL}^{-1}$

Tempo (h)	p
24	0,000*
48	0,000*
72	0,008*

*Diferença com significado estatístico

Tabela 20. Média e desvio padrão da [MMA] ($\mu\text{g mL}^{-1}$) às 24 h, 48 h e 72 h no grupo B (comparação com o valor $\mu\text{g mL}^{-1}$)

Tempo (h)	N	Média	Desvio Padrão
24	10	0,0150	0,0026
48	10	0,016	0,0088
72	9	0,0034	0,0024

Tabela 21. Análise comparativa da [MMA] ($\mu\text{g mL}^{-1}$) às 24 h, 48 h e 72 h no grupo B, com o valor de referência $2,2 \times 10^{-8} \mu\text{g mL}^{-1}$

Tempo (h)	p
24	0,000*
48	0,000*
72	0,003*

*Diferença com significado estatístico

Tabela 22. Média e desvio padrão da [MMA] ($\mu\text{g mL}^{-1}$) às 24 h, 48 h e 72 h no grupo C (comparação com o valor $\mu\text{g mL}^{-1}$)

Tempo (h)	N	Média	Desvio Padrão
24	10	0,0240	0,0057
48	10'	0,0066	0,0029
72	8	0,0011	0,0007

Tabela 23. Análise comparativa da [MMA] ($\mu\text{g mL}^{-1}$) às 24 h, 48 h e 72 h no grupo C, com o valor de referência $2,2 \times 10^{-8} \mu\text{g mL}^{-1}$

Tempo (h)	p
24	0,000*
48	0,000*
72	0,003*

*Diferença com significado estatístico

2.4. Componentes libertados que não estão descritos pelo fabricante

Para além do monómero MMA referenciado, foi identificado um componente não descrito pelos fabricantes, nos grupos de estudo A, B e C, em todos os tempos de armazenamento. Este monómero é o etilmetacrilato (EMA).

IV. Discussão

1. Avaliação e comparação da quantidade de monómeros libertados para a saliva artificial

A avaliação dos resultados obtidos no presente estudo, permite afirmar que a quantidade de monómeros libertados para a saliva artificial está de acordo com os valores apresentados em vários estudos prévios, com condições comparáveis. No primeiro artigo apresentado na tabela 6 (Tuna et al., 2013) o monómero MMA foi identificado em amostras de saliva artificial (pH 7), que continham blocos de resina termopolimerizável, confeccionados segundo um rácio monómero / polímero igual ao utilizado neste estudo (10 mL / 22,5 g), e armazenados durante 24 h. A concentração obtida, após 24 h de imersão em saliva artificial, foi ligeiramente maior no estudo deste autor ($0,074 \pm 0,005 \mu\text{g mL}^{-1}$), que nesta investigação (em qualquer um dos grupos de estudo). Este ligeiro aumento pode dever-se ao maior tamanho dos blocos confeccionados, apresentando todos eles 65 mm de diâmetro e 40 mm de altura. Desta forma, o estudo realizado, o qual apresenta uma metodologia semelhante, parece ir de encontro aos resultados obtidos nesta investigação de Tuna et al. (2013).

Relativamente ao segundo artigo apresentado na tabela 6 (Singh et al., 2013), foi identificado e quantificado o monómero MMA, na saliva humana de 30 doentes portadores de próteses totais, após 24 h e 72 h da sua colocação na boca. Verifica-se que a concentração do composto às 24 h ($0,3 \pm 0,09 \mu\text{g mL}^{-1}$) e às 72 h ($0,05 \pm 0,01 \mu\text{g mL}^{-1}$) é superior às concentrações obtidas em qualquer um dos grupos neste estudo (nos mesmo tempos de armazenamento). Apesar de serem valores comparáveis, a diferença na quantidade de monómeros libertados poder-se-á dever não só, ao facto dos blocos confeccionados no presente estudo (GA, GB e GC) apresentarem uma dimensão muito inferior às próteses totais, como também por estas estarem sob a acção da saliva natural e das condições variáveis da cavidade oral (hidrólise enzimática, alterações da temperatura e mudanças químicas, mastigação, acção microbiana), as quais estão associadas a uma maior biodegradação e libertação de monómeros residuais. Contrariamente ao estudo de Singh et al. (2013), no trabalho realizado os blocos foram imersos em saliva artificial a pH neutro, a uma temperatura constante, sem qualquer enzima.

Como se pode observar na tabela 6, Soufou et al. (2005) apresentou no seu artigo concentrações de MMA de três resinas termopolimerizáveis diferentes (20 a 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$, diminuindo das 24 h para as 72 h) superiores aos obtidos neste estudo. Apesar de existirem algumas variações na metodologia, pois os blocos de menores dimensões foram armazenados em água de-ionizada ($23 \pm 2^\circ \text{C}$) durante 24 h, antes da sua colocação em 8 mL de saliva artificial, os resultados são comparáveis tanto às 24 h, como às 48 h e 72 h de armazenamento. Também no estudo de Celebi et al. (2008) se verifica que a concentração após 48 h de armazenamento em água nanopura é superior ao presente estudo ($0,564 \pm 0,131 \mu\text{g mL}^{-1}$).

As resinas termopolimerizáveis utilizadas actualmente no mercado apresentam uma menor concentração de MMA libertado, comparativamente a investigações mais antigas. É o caso do quinto estudo apresentado na tabela 6, da autoria de Vallittu et al. (1995), que utiliza para a realização de três blocos de resina acrílica, uma resina termopolimerizável da mesma marca comercial que a seleccionada para o presente estudo. A concentração de MMA após 24 h de armazenamento ($34,5 \pm 9,8 \mu\text{g mL}^{-1}$) apresenta-se bastante superior relativamente ao trabalho realizado. Apesar do armazenamento ter sido feito num meio diferente (água a 37°C), e os blocos confeccionados no estudo de Vallittu et al. (1995) serem ligeiramente menores (2 mm x 4 mm x 50 mm) que os grupos A, B e C da presente investigação, os valores obtidos por resinas termopolimerizáveis da mesma marca comercial (*Probase Hot, Ivoclar*) são comparáveis. A concentração mais elevada parece demonstrar que, de 1995 para os dias de hoje, existiu uma evolução relativamente à diminuição quantitativa de monómeros residuais libertados.

O mesmo acontece no último artigo de Kedjarune et. al. (1999) apresentado na tabela 6, no qual as concentrações de MMA descritas, comparativamente ao presente estudo, são bastante superiores após 24 h e 48 h de armazenamento. No trabalho de investigação deste autor, através de cromatografia gasosa, foram medidas as quantidades de MMA presentes em amostras de saliva humana não estimulada, as quais continham blocos de resina termopolimerizável (8 mm x 35 mm x 3 mm). Foi realizada a mesma metodologia para três resinas diferentes. O facto dos blocos estarem imersos em saliva natural poderá ser uma das razões para a maior quantidade de MMA libertado, pois esta

apresenta constituintes enzimáticos que aumentam a degradação dos materiais dentários. A dimensão dos blocos é outro factor a ter em conta.

Tabela 24. Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$) de MMA encontrada em vários estudos com resinas termopolimerizáveis

Autor	Técnica cromatográfica	[MMA] ($\mu\text{g mL}^{-1}$) – média \pm desvio padrão (após 24 h / 48 h / 72 h de armazenamento)*	Resina termopolimerizável utilizada (rácio monómero/polímero)
Tuna et al. (2013)	HPLC	24 h – $0,074 \pm 0,005$	<i>Paladent, Hevaeus</i> Kulzer GmbH (10 mL / 22,5 g)
Singh et al. (2013)	HPLC	24 h – $0,3 \pm 0,09$ 72 h – $0,05 \pm 0,01$	<i>Trevalon, Dentsply</i> India Pvt Ltd, Delhi, India ($0,417 \text{ mL g}^{-1}$)
Sofou et al. (2005)	HPLC (limite de detecção $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ a $100 \mu\text{g mL}^{-1}$)	Após 24 h / 48 h / 72 h a concentração está próxima do limite de detecção, diminuindo das 24 h para as 72 h	<i>Triplex, Ivoclar AG</i> , Schaan Liechtenstein (1:3.5); <i>Paladon 65</i> , Kulzer & Co. GmbH, Germany (1:3.5); <i>Type 15, Ivoclar AG</i> , Schaan Liechtenstein (1:3.5)
Çelebi et al. (2008)	HPLC	48 h – $0,564 \pm 0,131$	<i>Paladent, Hevaeus</i> Kulzer GmbH (10 mL / 23,4 g)
Vallittu et al. (1995)	HPLC	24 h – $34,5 \pm 9,8$	<i>Probase Hot, Ivoclar</i> , Schaan, Liechtenstein (10 mL / 22,5 g)
Kedjarune et al. (1999)	GC (limite de detecção 14 g mL^{-1});	H1: 24 h – <1 ; 48 h – $2,36 \pm 4,73$; H2: 24 h – $68,21 \pm 36,98$; 48 h – $34,13 \pm 60,33$; H3: 24 h – $243,2 \pm 155,5$; 48 h – $6,38 \pm 5,78$;	H1- <i>Rodex</i> ($0,428 \text{ mL g}^{-1}$); H2- <i>Trevalon</i> ($0,417 \text{ mL g}^{-1}$); H3- <i>Meliodent</i> ($0,427 \text{ mL g}^{-1}$)

Nota: são apresentadas as concentrações de MMA nos tempos contemplados nos estudos.

2. Libertação de monómeros residuais

O ambiente da cavidade oral interage de forma complexa com os materiais dentários. Esta interacção está dependente de componentes endógenos, como enzimas, e exógenos, como componentes da dieta (Bettencourt et al., 2010). O comportamento de materiais à base de resinas acrílicas é influenciado por factores como a saliva, a mastigação, alterações térmicas e químicas, a hidrólise enzimática e os microorganismos orais (Gautam et al., 2010; Bettencourt et al., 2010).

Segundo Bettencourt et al. (2010) e Ivkovic et al. (2013), as forças mastigatórias provocam um stress mecânico, que pode influenciar a degradação dos materiais. Estes artigos também referem, que a ingestão de alimentos gera alterações térmicas e químicas, que tornam a cavidade oral um ambiente propício à degradação dos materiais dentários e libertação de monómeros. O pH rapidamente se altera de ácido para básico e a temperatura pode variar entre os 45° C e os 25° C (Singh et al., 2012). O estudo de Graham et al. (1991), referido no artigo de Bettencourt et al. (2010), demonstrou que, num período de tempo igual, há uma maior libertação de componentes de *liners* utilizados em próteses totais *in vivo*, que quando armazenados *in vitro*. Além disto, a colonização de bactérias e o seu metabolismo pode provocar a degradação dos materiais, diminuindo o pH (Ferracane, 2006).

Todos estes factores estão associados à biodegradação dos materiais, na qual ocorrem mudanças físicas, químicas e mecânicas. A libertação de compostos para a cavidade oral, devido à biodegradação, é muitas vezes responsável pelo aparecimento de reacções adversas nos tecidos moles e estruturas da cavidade oral (Chaves et al., 2012).

Estes factores inerentes ao ambiente oral, como a mastigação, alterações químicas e térmicas da dieta e o metabolismo dos microorganismos orais, não afectam as amostras deste estudo. No entanto, nesta investigação a difusão da saliva nos blocos de acrílico, associada à hidrólise das ligações éster da rede de PMMA, foi um dos factores considerados neste trabalho.

A reacção química de conversão monómero-polímero e a quantidade de monómeros residuais são dois factores de grande importância, associados à libertação de

monómeros residuais, pelas resinas de PMMA (Gautam et al., 2012). Esta reacção de polimerização não é completa, ou seja, nem todas as ligações duplas insaturadas são convertidas em ligações simples saturadas (Gautam et al., 2012) (Sousa et al., 2014). Desta forma, os monómeros não incorporados na rede de polímeros são eluídos na saliva. Segundo Bayraktar et al. (2006), factores como o método de polimerização, as condições de tempo e temperatura do ciclo de polimerização, e a presença ou ausência de tratamentos pós-polimerização são factores a ter em conta, na libertação de monómeros residuais.

Estudos como o de Vallittu et al. (1998) e de Zissis et al. (2008) concluíram que, relativamente ao método de polimerização, a polimerização térmica está relacionada com uma libertação de compostos menor e com uma menor difusão molecular. Devido a este factor, foi escolhida neste estudo uma resina acrílica termopolimerizável para a confecção dos blocos de acrílico. Como todos os blocos foram termopolimerizados, este parâmetro de comparação não foi considerado no estudo.

No que diz respeito às condições de polimerização, quanto mais tempo de polimerização e quanto maior a temperatura, menor a eluição de produtos residuais (Lung & Darvell, 2005; Goldibi & Asghari, 2009). Neste trabalho, as condições de polimerização foram iguais em todos os blocos de acrílico, respeitando as instruções do fabricante: colocou-se a mufla fechada em água fria, aqueceu-se até 100° C (212° F) e deixou-se ferver durante 45 minutos.

Em relação aos tratamentos pós-polimerização, um dos exemplos é a imersão de próteses acrílicas em água ou saliva após a sua polimerização (Gautam et al., 2012). Singh et al. (2012) afirma que a imersão em água durante 24 h, antes da entrega da prótese dentária, diminui o risco de irritação e sensibilidade. Tratamentos térmicos como o banho de água ou o uso de energia microondas são outros dois métodos pós-polimerização, que podem ser usados para a diminuição da quantidade de monómeros residuais, nomeadamente MMA (Bural et al., 2011; Sheet et al., 2011). Nesta investigação, os blocos de acrílico foram armazenados em frascos de vidro (envolvidos em alumínio) com saliva artificial durante 72 h. Através deste armazenamento, foi possível criar condições aproximadas ao ambiente na cavidade oral. A exposição à luz foi impedida, para não influenciar a polimerização e libertação de MMA para a saliva

artificial. A temperatura foi mantida a $37^{\circ} \text{C} \pm 1^{\circ} \text{C}$ e o pH da solução manteve-se neutro. No presente estudo verificou-se a libertação de monómeros MMA em todos os grupos de estudo, nos três tempos de armazenamento. A concentração de monómeros MMA obtida nas amostras de saliva artificial prova a influência dos tratamentos pós-polimerização, como a imersão em saliva artificial, na libertação de monómeros residuais.

Esta influência pode ser explicada, pelo facto da saliva ser responsável pela libertação de monómeros da rede polimérica. Este líquido, sendo principalmente constituído por água, difunde-se nos materiais acrílicos polares e pode provocar, através da hidrólise, alterações físicas e químicas e a libertação de monómeros residuais como o MMA (Hagio et al., 2006; Poplawski et al., 2010; Costella et al., 2010). A solubilidade e absorção são dois fenómenos intimamente relacionados com a troca de compostos entre os materiais dentários e o ambiente oral. Dependendo da estrutura química, existe uma maior/menor solubilidade à água por parte dos metacrilatos (Michelsen et al., 2012). Quanto maior a solubilidade e difusão, maior a libertação de monómeros de MMA.

São vários os estudos que, utilizando tratamentos pós-polimerização (imersão em água / saliva), logo após a polimerização de blocos de acrílico, demonstram que existe uma maior libertação de monómeros residuais nas primeiras 24 h após a polimerização. Além disto, demonstram uma contínua diminuição desta concentração ao longo do tempo. (Singh et al., 2012; Tuna, et al., 2013). O decaimento (por unidade de tempo) da concentração de monómeros foi considerado neste estudo, verificando-se que o factor tempo pode ser um aspecto estatisticamente importante na libertação de MMA, principalmente no grupo C. No grupo A verificou-se que a concentração de monómeros libertados na saliva artificial não é independente do seu decaimento por unidade de tempo entre as 24 h de armazenamento e após 48 h e 72 h de armazenamento. No grupo B verificou-se que a concentração de monómeros libertados na saliva artificial não é independente do seu decaimento por unidade de tempo, entre as 24 h de armazenamento e após 72 h, e entre 48 h de armazenamento e 72 h. Finalmente no grupo C verificou-se que a concentração de monómeros libertados na saliva artificial não é independente do seu decaimento por unidade de tempo, entre os três tempos de armazenamento. Esta dependência entre a concentração de monómeros de MMA libertados na saliva artificial e o seu decaimento por unidade de tempo, pode ser explicada pelo facto de, uma vez

que se inicia a libertação de MMA, é necessário que entre os blocos de acrílico e a saliva artificial ocorra um equilíbrio, até que a libertação de MMA atinja o valor máximo (Singh et al., 2012). Ao fim de 24 h de armazenamento, e uma vez atingido o equilíbrio, a concentração de monómeros residuais começa a diminuir (Singh et al., 2012).

A espessura da prótese dentária e o tempo de utilização das prótese acrílicas também podem influenciar a libertação de substâncias de resinas acrílicas (Fletcher et al., 1983; Sadamori et al., 1992). Secções de maior espessura apresentam uma menor libertação de monómeros, relativamente a secções de menor espessura (Fletcher et al., 1983). Segundo Fletcher et al. (1983), este facto pode dever-se à reacção exotérmica e ao calor libertado durante a polimerização, atingindo nas secções mais espessas temperaturas mais elevadas, maior grau de conversão e menor libertação de monómeros. Próteses utilizadas em períodos de tempo mais longos, apresentam concentrações de monómeros residuais menores, face a próteses utilizadas em períodos de tempo curtos (Sadamori et al., 1992).

Nesta investigação foram realizados três grupos com diferentes áreas superficiais. Os três grupos concebidos neste estudo apresentavam 2 cm de largura e 2 cm de comprimento, mas entre eles existiam alterações na sua espessura. O grupo A apresentava 2 mm de espessura, o grupo B 4 mm de espessura, e por fim o grupo C tinha 8 mm de espessura. O presente estudo demonstra que a espessura, e por conseguinte a área superficial dos blocos de acrílico, pode influenciar, de forma estatisticamente significativa, a libertação de MMA, principalmente após 24h de armazenamento. Às 24h de armazenamento verificou-se que a quantidade de monómeros libertados na saliva artificial não é independente da área superficial do bloco de acrílico utilizado, entre os três grupos de estudo. Às 48h de armazenamento verificou-se que a quantidade de monómeros libertados na saliva artificial não é independente da área superficial do bloco de acrílico utilizado, entre os grupos A e B e entre os grupos B e C. Às 72h de armazenamento verificou-se que a quantidade de monómeros libertados na saliva artificial não é independente da área superficial do bloco de acrílico utilizado entre os grupos B e C. Apesar disto, e ao contrário do estudo de Fletcher et al., (1983), o grupo de maior espessura (grupo C) apresenta, às 24 h, valores de concentração de MMA libertado, com significado estatístico, maiores que os

outros grupos de menor espessura (A e B). Às 48 h, o grupo B (espessura intermédia) apresenta uma maior libertação de MMA que o grupo A e C. Por fim às 72 h, o grupo B continua a apresentar maior libertação de monómeros de MMA que o grupo A e C.

Na presente investigação, verificou-se a existência de alguma variabilidade de concentrações de MMA obtidas entre amostras do mesmo grupo. Esta variabilidade ocorreu nos três tempos de armazenamento, mas foi maior após 72 h de armazenamento. São três os possíveis factores associados à metodologia do presente estudo, que podem estar na origem desta variabilidade: diferenças nas várias fases da confecção dos blocos de acrílico do mesmo grupo, variações associadas à pipetagem das amostras contidas nos frascos de vidro para os vials (utilizados no HPLC) e as condições cromatográficas a que as amostras estiveram sujeitas no aparelho de HPLC-DAD.

Relativamente ao primeiro factor, o facto dos blocos de acrílico do mesmo grupo não terem sido feitos todos ao mesmo tempo é um aspecto a ter em conta. Para a confecção dos blocos, várias alterações podem ter ocorrido de uma mufla para outra. Aquando da mistura do pó (polímero) com o líquido (monómero) podem ter existido alterações na proporção ideal, para a confecção de uma prótese com esta resina termopolimerizável (22,5 g de polímero e 10 mL de monómero). Diferenças no tempo de mistura (8 a 10 minutos) e no tempo de trabalho (máximo de 20 minutos), na pressão utilizada na prensagem das muflas (80 bar de pressão), e no tempo de polimerização (aquecer até 100° C e deixar ferver durante 45 minutos) são fases deste método que estão sujeitas a pequenas variações das condições de execução. Além disto, na realização das placas termoplásticas de 2 cm x 2 cm x 2 mm, essenciais à confecção dos blocos, existiam pequenas diferenças nas suas dimensões (± 2 mm). O acabamento e polimento final dos blocos pode também ter influenciado a concentração de monómeros de MMA libertados.

Cada frasco de vidro continha 10 mL de saliva artificial, a qual mantinha imersos os blocos de acrílico. Durante a pipetagem de 200 μ L de amostra para os vials, apesar dos frascos terem sido agitados antes da recolha para homogeneizar a amostra, podem ter existido alterações no volume de amostra pipetado.

Por fim, em relação às condições cromatográficas do aparelho de HPLC-DAD, a eluição do composto MMA foi realizada numa fase móvel de 25% de água Milli-Q50 e 75% de acetonitrilo. A saliva artificial utilizada no armazenamento dos blocos de acrílico era muito rica em sais, podendo ser um factor que condicionou a “performance” da coluna e influenciou os resultados obtidos.

3. Consequências da libertação de monómeros residuais

A libertação de monómeros residuais para a cavidade oral, a partir de resinas acrílicas utilizadas na confecção de próteses acrílicas, está associada a consequências negativas a nível celular e tecidual (Bettencourt et al., 2010). A biodegradação dos materiais resinosos provoca a eluição destes componentes, nomeadamente através de um processo de difusão, em que a água da saliva penetra na matriz de polímeros e quebra as ligações entre monómeros (Chaves et al., 2012).

Vários estudos demonstram que as reacções adversas, derivadas da acção destes monómeros, são frequentes na prática clínica (Huang et al., 2000; Leggat & Kedjarune, 2003). A libertação de compostos como monómeros de MMA pode provocar um conjunto de reacções adversas, tais como irritações, edemas e úlceras. Investigações indicaram que a libertação de compostos de resinas acrílicas, constituídas por MMA, apresentam um potencial de efeitos adversos, provocando genotoxicidade, citotoxicidade e alterações na expressão de factores de crescimento. Sinais clínicos orais como o rubor, a sensibilidade e a dor na mucosa oral, situações patológicas como reacções alérgicas e edema labial e doenças como a síndrome da boca ardente, a estomatite protética ou a urticaria crónica, são outros exemplos (Chaves et al., 2012).

Segundo Anusavice et al. (2013), estas reacções podem ocorrer quer através do contacto directo com os monómeros da resina, quer pela formação de um produto que resulte da reacção entre o ambiente e um componente da resina. Ivkovic et al. (2013) refere várias investigações em que os doentes apresentam reacções resultantes da libertação de monómeros de próteses após meses ou anos da sua entrega. Os monómeros libertados podem não só actuar nas estruturas da cavidade oral, como também serem ingeridos pela saliva e excretados pela urina (Kleinsasser, 2006; Arossi et al., 2010). Foram identificados compostos residuais na urina (15%), nas fezes (2%) e no ar inalado pelos

pulmões (70%) (Schwengberg et al., 2005). Os profissionais de saúde, como os médicos dentistas ou os técnicos de prótese dentária, podem também apresentar situações patológicas como dermatite e irritação. O contacto directo com os materiais dentários, sem protecção das mãos ou dos dedos, está na base destas reacções (Anusavice et al., 2013).

Entre outros objectivos, este estudo pretende clarificar que os monómeros de MMA libertados pelas resinas acrílicas utilizadas na confecção de próteses acrílicas, apresentam um importante potencial de efeitos adversos. Todos os materiais utilizados na realização de próteses dentárias devem apresentar um valor inferior a 2,2 wt%, relativamente à concentração de monómeros residuais libertados, cumprindo desta forma o requisito da norma ISO 1567-1999 (Pfeiffer & Rosenbauer, 2004; Mohamed et al., 2008; Lemus et al., 2010). Sendo o metilmetacrilato o principal componente das resinas de poli(metilmetacrilato) (Anusavice et al., 2013), e tendo em conta que o PMMA é o polímero mais usado na realização de próteses acrílicas removíveis (Palitsh et al., 2012), é crucial a caracterização quantitativa e qualitativa deste monómero libertado pelos materiais resinosos. Todos estes factores aumentam a importância clínica e científica do estudo da biocompatibilidade dos materiais (Ebadian et al., 2008; Bettencourt et al., 2010; Ivkovic et al., 2013).

Segundo Van Landuyt et al. (2011), existe uma relação directamente proporcional entre a concentração de monómeros residuais libertados e o seu potencial de efeitos adversos. Na presente investigação verificou-se a libertação do composto MMA em três grupos de estudo com diferentes áreas superficiais (A, B e C), durante 24 h, 48 h e 72 h. Neste estudo, ao contrário do estudo levado a cabo por este autor, não existe esta relação de proporcionalidade. Apesar disto, a concentração de MMA libertado apresentou-se significativamente superior ao valor da norma ISO 1567-1999 (2,2 wt%) em todos os grupos, nos três tempos de armazenamento. Desta forma, a concentração de monómeros de MMA, presente nas amostras de saliva artificial, apresenta um elevado potencial de efeitos adversos. Além disto, a colocação de próteses dentárias em meios de armazenamento como a saliva artificial parece ser deste modo, um método importante para diminuir a existência de reacções adversas (Singh et al., 2012).

V. Conclusões

Os resultados obtidos no estudo de investigação permitiram retirar as seguintes conclusões:

1. Foram identificados na saliva artificial os monómeros residuais MMA e EMA, libertados pelos blocos de acrílico com distintas áreas superficiais;
2. Foram quantificados na saliva artificial os monómeros residuais MMA, libertados pelos blocos de acrílico com distintas áreas superficiais;
3. Foi identificado um componente químico libertado pelos blocos de acrílico, que não está descrito pelos fabricantes. O componente não descrito é o etilmetacrilato (EMA);
4. A concentração dos monómeros existentes na saliva artificial apresentou-se superior ao valor de referência da norma ISO 1567-1999, e apresentou um elevado potencial de efeitos adversos em todos os grupos de estudo, nos três tempos de armazenamento;
5. Existiu um decaimento (por unidade de tempo) da concentração dos monómeros existentes na saliva artificial, nos grupos de estudo com diferentes áreas superficiais. O maior decaimento ocorreu no Grupo C.

Este estudo permitiu também concluir, através dos valores de LOQ e LOD obtidos, que a técnica cromatográfica HPLC é um método adequado para a identificação e quantificação dos monómeros residuais libertados pela resina acrílica termopolimerizável em estudo. A construção de curvas de calibração, para os monómeros MMA e EMA, contribuiu para uma maior precisão no método analítico.

Será necessário no futuro, um estudo mais aprofundado da libertação de monómeros residuais, de materiais utilizados em medicina dentária. A realização de estudos *in-vitro* com condições similares à cavidade oral, e de investigações *in-vivo* de longo prazo

(longitudinais), que permitam o estudo desta libertação e das reacções adversas associadas, torna-se essencial para uma maior compreensão científica e clínica. A libertação de compostos orgânicos de materiais dentários tem uma causa multifactorial, sendo por isso crucial, em investigações futuras, o estudo da importância destes vários factores.

VI Bibliografia

Altintas, S. H. & Usumez, A. (2009). HPLC analysis of HEMA released from two different adhesive systems. *Journal of Biomedical Materials Research, Part B Applied Biomaterials*, 91(2), 924-929.

Anusavice, K. J., Shen, C., Rawls, H. R. (2013). *Philip's Science of Dental Materials*. 12^a edição. St. Louis, Missouri: Elsevier.

Araújo, P. H. H., Sayer, C., Poço, J. G. R. & Giudici, R. (2002). Techniques for reducing residual monomer content in polymers : a review. *Polymer Engineering and Science*, 42(7), 1442-1468.

Arossi, G. A., Lehmann, M., Dihl, R. R., Reguly, M. L. & De Andrade, H. H. (2010). Induced DNA damage by dental resin monomers in somatic cells. *Basic and Clinical Pharmacology & Toxicology*, 106(2), 124-129.

Arrais, C. A., Giannini, M. & Rueggeberg, F. A. (2009). Kinetic analysis of monomer conversion in auto- and dual-polymerizing modes of commercial resin luting cements. *The Journal of Prosthetic Dentistry*, 101(2), 128-136.

Assaoka, S. K., Cesar, E. A., Oliveira, F. D., (2012), *Prótese Dentária- Princípios Fundamentais Técnicas Laboratoriais*, 2^aedição. São Paulo, Brasil: Napoleão Editora.

Ata, S. O. & Yavuzylmaz, H. (2009). In vitro comparison of the cytotoxicity of acetal resin, heat-polymerized resin, and auto-polymerized resin as denture base materials. *Journal of Biomedical Materials Research. Part B, Applied Biomaterials*, 91(2), 905–909. doi:10.1002/jbm.b.31473

Bayraktar, G., Guvener, B., Bural, C., & Uresin, Y. (2006). Influence of polymerization method, curing process, and length of time of storage in water on the residual methyl

methacrylate content in dental acrylic resins. *Journal of Biomedical Materials Research. Part B, Applied Biomaterials*, 76(2), 340–345. doi: 10.1002/jbm.b.30377

Bettencourt, A. F., Neves, C. B., De Almeida, M. S., Pinheiro, L. M., Oliveira, S. A., Lopes, L. P. & Castro, M. F. (2010). Biodegradation of acrylic based resins: a review. *Dental Materials*, 26(5), 171-180.

Bird, I. M., (1989). High performance liquid chromatography: principles and clinical applications. *British Medical Journal*. 299(6702), 783–787.

Bural, C., Aktaş, E., Deniz, G., Ünlüçerçi, Y., Kızılcın, N. & Bayraktar, G. (2011). Effect of post-polymerization heat-treatments on degree of conversion, leaching residual MMA and in vitro cytotoxicity of autopolymerizing acrylic repair resin. *Dental Materials: Official Publication of the Academy of Dental Materials*, 27(11), 1135–1143. doi:10.1016/j.dental.2011.08.007

Carr, A.B. & Brown, D.T., (2012), *McCracken – Prótese Parcial Removível*, 12^a edição. Rio de Janeiro, Brasil: Mosby Elsevier.

Çelebi, N., Yuzugullu, B., Canay, S. & Yucel, U. (2008). Effect of polymerization methods on the residual monomer level of acrylic resin denture base polymers. *Polymers for Advanced Technologies*. 19, 201-206.

Chaves, C. D. A. L., Machado, A. L., Vergani, C. E., De Souza, R. F. & Giampaolo, E. T. (2012). Cytotoxicity of denture base and hard chairside reline materials: a systematic review. *The Journal of Prosthetic Dentistry*, 107(2), 114–127. doi: 10.1016/S0022-3913(12)60037-7

Cilli, R., Pereira, J. C. & Prakki, A. (2012). Properties of dental resins submitted to pH catalyzed hydrolysis. *Journal of Dentistry*. 40 (12), 1144-1150.

Costella, A. M., Trochmann, J. L. & Oliveira, W. S. (2010). Water sorption and diffusion coefficient through an experimental dental resin. *Journal of Materials Science. Materials Medicin.* 21(1), 67-72.

Danesh, G., Hellak, T., Reinhardt, K. J., Végh, A., Schäfer, E. & Lippold, C. (2012). Elution characteristics of residual monomers in different light- and auto-curing resins. *Experimental and Toxicologic Pathology: Official Journal of the Gesellschaft Für Toxikologische Pathologie*, 64(7-8), 867–872. doi: 10.1016/j.etp.2011.03.008

Dogan, A., Bek, B., Cevikt, N. N. & Usanmaz, A. (1995) The effect of preparation conditions of acrylic denture base materials on the level of residual monomer, mechanical properties and water absorption, *Journal of Dentistry*, 23 (5), 313-318

Duffó, G. S. & Castillo, E. Q. (2004). Development of an artificial saliva solution for studying the corrosion behavior of dental alloys, *Corrosion Engineering Section.* 60(6), 594–602.

Durner, J., Spahl, W., Zaspel, J., Schweikl, H., Hickel, R. & Reichl, F. X. (2010). Eluted substances from unpolymerized and polymerized dental restorative materials and their nernst partition coefficient. *Dental Materials: Official Publication of the Academy of Dental Materials*, 26(1), 91–99. doi:10.1016/j.dental.2009.08.014

Ebadian, B., Razavi, M., Soleimanpour, S. & Mosharraf, R. (2008). Evaluation of tissue reaction to some denture-base materials: an animal study. *The Journal of Contemporary Dental Practice.* 9(4), 67-74.

Ferracane, J. L. (2006). Hygroscopic and hydrolytic effects in dental polymer networks. *Dental Materials: Official Publication of the Academy of Dental Materials*, 22(3), 211–222. doi:10.1016/j.dental.2005.05.005

Fletcher, A. M., Purnaveja, S, Amin, W. M., Ritchie G. M., Moradians, S. & Dodd, A. W. (1983). The level of residual monomer in self-curing denture-base materials. *Journal of Dental Research*, 62(2), 118-120

Gautam, R., Singh, R. D., Sharma, V. P., Siddhartha, R., Chand, P. & Kumar, R (2012). Biocompatibility of polymethylmethacrylate resins used in dentistry. *Journal of Biomedical Materials Research. Part B, Applied Biomaterials*, 100(5), 1444–1450. doi:10.1002/jbm.b.32673

Gioka, C., Bourauel, C., Hiskia, A., Kletsas, D., Eliades, T. & Eliades, G. (2005). Light-cured or chemically cured orthodontic adhesive resins? A selection based on the degree of cure, monomer leaching, and cytotoxicity. *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics*. 127(4), 413-419.

Golbidi, F. & Asghari, G. (2009) The level of residual monomer in acrylic denture base materials. *Research Journal of Biological Sciences*, 4(2), 244-249.

Gonçalves, L., Filho, J. D., Guimarães, J. G., Poskus, L. T. & Silva, E. M. (2008). Solubility, salivary sorption and degree of conversion of dimethacrylate-based polymeric matrixes. *Journal Biomedical Materials Research. Part B, Applied Biomaterials*, 85(2), 320-325.

Gul, P., Miloglu, F. D. & Akgul, N. (2014). HPLC analysis of eluted monomers from dental composite using different immersion media. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 37(2), 155–170. doi: 10.1080/10826076.2012.738619

Hagio, M., Kawaguchi, M., Motokawa, W. & Miyazaki, K. (2006). Degradation of methacrylate monomers in human saliva. *Dental Materials Journal*. 25(2), 241-246.

Harrison, A. & Hugget, R. (1992). Effect of the curing cycle on residual monomer levels of acrylic resin denture base polymers. *Journal of Dentistry*. 20(6), 370–374.

Huang, F. M., Hu, C. C., Chang, Y. C. & Chou, M.Y. (2000). Residual monomer releasing from acrylic denture base in water. *Chinese Dental Journal*. 19(1), 17-22.

Imazato, S., Horikawa, D., Nishida, M. & Ebisu, S. (2009). Effects of monomers eluted from dental resin restoratives on osteoblast-like cells. *Journal of Biomedical Materials Research. Part B, Applied Biomaterials*, 88(2), 378–386. doi: 10.1002/jbm.b.31067

ISO 1567-1999. Dentistry - Denture base polymers. (2000). Berlin: Beuth.

Ivkovic, N., Bozovic, D., Ristic, S., Mirjanic, V. & Jankovic, O. (2013). The Residual Monomer in Dental Acrylic Resin and Its Adverse Effects. *Contemporary Materials*, IV(1), 84-91. doi: 10.7251/COMEN1301084I

Jorge, J. H., Giampaolo, E. T., Machado, A. L. & Vergani, C. E. (2003). Cytotoxicity of denture base acrylic resins: a literature review. *The Journal of Prosthetic Dentistry*, 90(2), 190–193. doi:10.1016/S0022391303003494

Kedjarune, U., Charoenworluk, N. & Koontongkaew, S. (1999). Release of methyl methacrylate from heat-cured and autopolymerized resins: cytotoxicity testing related to residual monomer. *Australian Dental Journal*, 44(1), 25–30. Disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10217017>

Kleinsasser, N. H., Schmid, K., Sassen, A. W., Harréus, U. A., Staudenmaier, R., Folwaczny, M. & Reichl, F.X. (2006), Cytotoxic and genotoxic effects of resin monomers in human salivary gland tissue and lymphocytes as assessed by the single cell microgel electrophoresis (Comet) assay. *Biomaterials*. 27(9), 1762-1770.

Kopperud, H. M., Kleven, I. S. & Wellendorf, H. (2011). Identification and quantification of leachable substances from polymer-based orthodontic base-plate materials. *European Journal of Orthodontics*, 33(1), 26–31. doi: 10.1093/ejo/cjq020

Lamb, D. J., Ellis, B. & Priestley, D. (1982). Loss into water of residual monomer from autopolymerizing dental acrylic resin. *Biomaterials*, 3(3), 155-159.

Leggat, P. A. & Kedjarune, U. (2003). Toxicity of methyl methacrylate in dentistry. *Internacional Dental Journal*, 53(3), 126–131. Disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12873108>

Leggat, P., Smith, D. R. & Kedjarune, U. (2009). Surgical applications of methyl methacrylate: a review of toxicity. *Archives of Environmental & Occupational Health*, 64(3), 207–212. doi:10.1080/19338240903241291

Lemus, F. S., Lancón, R. D. V., Maldonado, V. M. & Morales, S. L. (2010). Determinación de monómero residual de metacrilato de metilo en 3 diferentes marcas comerciales para base de dentaduras por cromatografía de gases, *Revista Odontológica Mexicana*, 14(2), 91-98.

Leung, V. W. & Darvell, B. W. (1997). Artificial salivas for in vitro studies of dental materials. *Journal of Dentistry*, 25(6), 475–484. Disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9604578>

Lough W. J. & Wainer, I. W. (1996). *High Performance Liquid Chromatography: Fundamental Principles and Practice*, Glasgow, Scotland: Blackie Academic & Professional.

Lung, C. Y. K. & Darvell, B. W. (2005). Minimization of the inevitable residual monomer in denture base acrylic. *Dental Materials: Official Publication of the Academy of Dental Materials*, 21(12), 1119–1128. doi:10.1016/j.dental.2005.03.003

Lygre, H., Solheim, E. & Gjerdet N. R. (1995). Leaching from denture base materials in vitro. *Acta Odontol Scand*, 53(2), 75-80.

Meyer, V. R., (2010), *Practical High-Performance Liquid Chromatography*. United

Kingdom: John Wiley and Sons, Ltd.

Michelsen, V. B. (2007). Organic leachables from resinbased dental restorative materials (Dissertação de Douturamento), Universidade de Bergen, Noruega.

Michelsen, V. B., Kopperud, H. B. M., Lygre, G. B., Björkman, L., Jensen, E., Kleven, I. S., . . . Lygre, H. (2012). Detection and quantification of monomers in unstimulated whole saliva after treatment with resin-based composite fillings in vivo. *European Journal of Oral Sciences*, 120(1), 89–95. doi:10.1111/j.1600-0722.2011.00897.x

Mikai, M., Koike, M. & Fujii, H. (2006). Quantitative analysis of allergenic ingredients in eluate extracted from used denture base resin. *Journal of Oral Rehabilitation*, 33(3), 216–220. doi:10.1111/j.1365-2842.2005.01561.x

Miletic, V., Santini, A. & Trkulia, I. (2009). Quantification of monomer elution and carbon–carbon double bonds in dental adhesive systems using HPLC and micro-Raman spectroscopy. *Journal of Dentistry*, 37(3), 177-184.

Mohamed, S. H., Al-jadi, A. M. & Ajaal, T. (2008). Using of HPLC analysis for evaluation of residual monomer content in denture base material and their effect on mechanical properties, *Journal of Physical Science*, 19(2), 127–135.

Palitsch, A., Hannig, M., Ferger, P. & Balkenhol, M. (2012). Bonding of acrylic denture teeth to mma/pmma and light-curing denture base materials: the role of conditioning liquids. *Journal of Dentistry*, 40(3), 210–221. doi: 10.1016/j.jdent.2011.12.010.

Pfeiffer, P. & Rosenbauer, E. U. (2004). Residual methyl methacrylate monomer, water sorption, and water solubility of hypoallergenic denture base materials. *The Journal of Prosthetic Dentistry*, 92(1), 72–78. doi:10.1016/S0022391304002057.

Poplawski, T., Loba, K., Pawlowska, E., Szczepanska, J. & Blasiak, J. (2010). Genotoxicity of urethane dimethacrylate, a tooth restoration component. *Toxicology in vitro*, 24(3), 854-862.

Rangel, J., Manso, A. C., Proença, L., Noronha, J. P., Bernardo, M. A. & Mesquita, M. F. (2011). Chromatographic Analysis of Eluted Monomers From Three Resin Cements. *Budapeste Journal of Dentistry Restorative*, 90(Spec Iss B):151275.

Sadamori, S. & Kotani, H. (1992). The usage contents period of dentures and their residual monomer, *The Journal of Prosthetic Dentistry*, 68(2), 2–4.

Sala, E. C. & García, P. L., (2013), *Odontología Preventiva y Comunitaria – Principios, métodos y aplicaciones*. 4ª edição. Barcelona, Espanha: Elsevier Masson.

Samanidou, V., Hadjicharalampous, M. & Palaghias, G. (2012). Development and validation of an isocratic HPLC method for the simultaneous determination of residual monomers released from dental polymeric materials in artificial saliva. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*. 35(4), 511-523.

Schedle, A., Ortengren, U., Eidler, N., Gabauer, M. & Hensten, A. (2007) Do adverse effects of dental materials exist? What are the consequences, and how can they be diagnosed and treated?, *Clinical oral Implants Research*, 18(3), 232-256.

Schwengberg, S., Bohlen, H., Kleinsasser, N., Kehe, K., Seiss, M., Walther, U. I., . . . Reichl, F.X., (2005), In vitro embryotoxicity assessment with dental restorative materials. *Journal of Dentistry*. 33(1), 49-55.

Seiss, M., Track, N., Hickel, R. & Reichl, F. X. (2009). In vitro stability of methylmethacrylate acid, tegdma and hema exposed to esterases. *Dental Materials: Official Publication of the Academy of Dental Materials*, 25(8), 1044-1049. doi: 10.1016/j.dental.2009.03.005

Shalaby, S.W. & Salz U. (2007) *Polymers for Dental and Orthopedic Applications*. Boca Raton, EUA: CRC Press Taylor & Francis Group.

Sheet, O. A., Almkhtar, A. M. & Al-Ali, A. A. (2011). The effect of additional microwave curing cycle on residual monomer release from different acrylic resin materials. *Al – Rafidain Dental Journal*, 11(2), 397–403.

Shim, J. S. & Watts, D. C. (1999). Residual monomer concentrations in denture-base acrylic resin after an additional, soft-liner, heat-cure cycle. *Dental Materials: Official Publication of the Academy of Dental Materials*, 15(4), 296–300. Disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10551098>

Sideridou, I., Tserki, V. & Papanastasiou, G. (2002). Effect of chemical structure on degree of conversion in light-cured dimethacrylate-based dental resins. *Biomaterials*. 23(8), 1819-1829.

Singh, R. D., Gautam, R., Siddhartha, R., Singh, B. P., Chand, P., Sharma, V. P. & Jurel, S. K. (2013). High performance liquid chromatographic determination of residual monomer released from heat-cured acrylic resin. an in vivo study.. *Journal of Prosthodontics : Official Journal of the American College of Prosthodontics*, 22(5), 358–361. doi:10.1111/jopr.12004

Skoog, D. A., Holler, F. J., Crouch, S. R. (2007) *Principles of Instrumental Analysis*, Belmont, CA USA: Thomson Brooks/Cole.

Soeiro, C. R. P. (2009). Estudo do Tratamento Biológico seguido de Fotólise para Remoção de Xenobióticos de Águas Residuais (Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Biotecnologia). Universidade Nova de Lisboa, Faculdade de Ciências e Tecnonologia, Portugal.

Sofou, A., Tsoupi, I., Emmanouil, J. & Karayannis, M. (2005). HPLC determination of residual monomers released from heat-cured acrylic resins. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 381(7), 1336–1346. doi:10.1007/s00216-005-3059-x

Sousa, T. F. A., Aniceto, M. C., Amorim, C. G., Souto-Lopes, M., Pérez-Mongiovi, D., Montenegro, M. C. B. S. M. & Araújo, A. N. (2014). Vortex-assisted liquid-liquid micro-extraction and high-performance liquid chromatography for a higher sensitivity methyl methacrylate determination in biological matrices. *Biomedical Chromatography : BMC*, 28(5), 680–685. doi:10.1002/bmc.3089

The Academy of Prosthodontics (2005). The Glossary of Prosthodontics Terms, *Journal of Prosthetic Dentistry*, 94 (1), 10-92.

Tuna, E. B., Rohlig, B. G., Sancakli, E., Evlioglu, G. & Gencay, K. (2013). Influence of acrylic resin polymerization methods on residual monomer release. *The Journal of Contemporary Dental Practice*, 14(2), 259-264.

Urban, V. M., Machado, A. L., Oliveira, R. V, Vergani, C. E., Pavarina, A. C. & Cass, Q. B. (2007). Residual monomer of reline acrylic resins. Effect of water-bath and microwave post-polymerization treatments. *Dental Materials : Official Publication of the Academy of Dental Materials*, 23(3), 363–368. doi: 10.1016/j.dental.2006.01.021

Vallittu, P. K., Miettinen, V. & Alakuijala, P. (1995) Residual monomer content and its release into water from dentures base materials, *Dental Materials*, 11(6), 338-342.

Vallittu, P. K., Ruyter, I. E. & Buykuilmaz, S. (1998). Effect of polymerization temperature and time on the residual monomer content of denture base polymers. *European Journal of Oral Sciences*, 106(1), 588–593. Disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9527360>

Van Landuyt, K. L., Nawrot T., Geebelen B., De Munck, J., Snauwaert, J., Yoshihara, K., . . . Van Meerbeek, B. (2011) How much do resin-based dental materials release? A meta-analytical approach, *Dental Materials*, 11(6), 723-747.

Vasugeva, G. (2009). Monomer systems for dental composites and their future: a review. *Journal of the California Dental Association*, 37(6), 389-398.

Vieira, R., Fernandes, B., Gonçalo, M. & Figueiredo, A. (2003) Dermatite de Contacto Alérgica Ocupacional por Acrilatos (Boletim Informativo GPEDC). Serviço de Dermatologia dos Hospitais da Universidade de Coimbra, Portugal.

Viljanen, E. K., Langer, S., Skrifvars, M. & Vallittu, P. K. (2006). Analysis of residual monomers in dendritic methacrylate copolymers and composites by HPLC and headspace-GC/MS. *Dental Materials : Official Publication of the Academy of Dental Materials*, 22(9), 845–851. doi:10.1016/j.dental.2005.11.012

Zissis, A., Yannikakis, S., Polyzois, G. & Harrison, A. (2008). A Long Term Study on Residual Monomer Release from Denture Materials. *The European Journal of Prosthodontics.and Restorative. Dentistry*, 16(2), 81-84.

<http://www.alunosonline.com.br/quimica/polimetilmetacrilato-acrilico.html>.

<http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.6406.html?rid=6b2830a7-30f9-4818-93aa-2d00780405d0>.

<http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.6406.html?rid=8d4cf1bc-70f4-43cb-833a-41683c401201>.

<http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.7066.html?rid=6140e395-ab6a-45d3-96b6-fe72d8add03f>.