



INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE EGAS MONIZ

MESTRADO INTEGRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**CITOTOXICIDADE DE MONÓMEROS PRESENTES EM
MATERIAIS DENTÁRIOS**

Trabalho submetido por
Rita Carvalho Teixeira de Oliveira Marques
para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

novembro de 2016



INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE EGAS MONIZ

MESTRADO INTEGRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**CITOTOXICIDADE DE MONÓMEROS PRESENTES EM
MATERIAIS DENTÁRIOS**

Trabalho submetido por
Rita Carvalho Teixeira de Oliveira Marques
para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

Trabalho orientado por
Professora Doutora Isabel Maria Correa Calvente de Barahona

novembro de 2016

*Ondas douradas nestes nossos ventos
Fazem a serenidade chegar.
Compulsivas risadas passeando pela areia
Preenchem vazios diários.
Acheço quente de amor incondicional
Dá sentido a uma vida.*

Obrigada D

Agradecimentos

À minha orientadora Professora Doutora Isabel Barahona por todo o apoio que me prestou ao longo do trabalho.

À Professora Susana Bandarra pela ajuda e dedicação que teve desde o início.

Aos meus pais, por me apoiarem incondicionalmente em todas as minhas escolhas, sem nunca desistirem de mim.

Ao Dinis, pelo amor incondicional.

Ao Gonçalo, por estar sempre ao meu lado e por me apoiar incondicionalmente, dando-me força para nunca desistir, mesmo nos momentos mais difíceis.

À minha segunda família, pelo enorme orgulho que sempre demonstraram em mim.

Às minhas amigas da faculdade Carla Soares, Daniela Cravidão, Joana Landeiro, Patricia Garcia, Mariana Jesus, Margarida Matos, Sara Guedes e Cristina Carrasco, pela enorme paciência, por toda amizade e por todos os momentos de palhaçada.

À Equipa dos Serviços Farmacêuticos do Hospital Beatriz Ângelo e à equipa da Farmácia Silveira Fórum Sintra por todo o tempo despendido durante o meu estágio curricular e por todo o conhecimento que me foi transmitido, bem como aos meus colegas de estágio por toda a entajuda e boa disposição.

Ao Instituto Superior de Ciências da Saúde Egas Moniz, ao seu corpo docente e não docente, pela maneira como sempre fui recebida.

Ao CAEM, por tudo aquilo que me ensinou e proporcionou desde o primeiro ensaio.

Por último, aos restantes colegas e amigos que, de alguma forma, influenciaram positivamente o meu crescimento profissional e pessoal.

A todos, um muito sincero *Muito obrigada!*

RESUMO

Introdução: A libertação de substâncias potencialmente tóxicas de resinas utilizadas em restauração provisória é motivo de apreensão em Medicina Dentária e, conseqüentemente, de investigação sobre a biocompatibilidade dos materiais dentários.

Objetivo: O objetivo do presente estudo é determinar o grau de citotoxicidade de três diferentes monómeros, nomeadamente o metil metacrilato (MMA), o trietilenoglicol dimetacrilato (TEGDMA) e o dimetacrilato de diuretano (UDMA). Estas substâncias estão habitualmente associadas a resinas utilizadas em restauração provisória dentária, como as resinas Tab 2000[®], Protemp 4[™] e Structur 3[®].

Métodos: Foram feitas culturas de fibroblastos 3T3 e estas foram expostas a diferentes concentrações dos monómeros. A viabilidade celular e o grau de citotoxicidade de cada composto foram avaliados através de ensaios de MTT.

Resultados: Há evidência de que os monómeros TEGDMA e UDMA são citotóxicos. Contudo, não foi possível verificar se os monómeros têm um efeito dose-dependente sobre a viabilidade celular e qual dos monómeros apresenta maior citotoxicidade.

Conclusão: Os monómeros TEGDMA e UDMA têm efeitos citotóxicos ao nível dos fibroblastos, mas não há diferenças significativas no seu grau de citotoxicidade.

Palavras-chave: 3T3, MMA, TEGDMA, UDMA

ABSTRACT

Introduction: The release of potentially toxic substances from resins used in temporary restoration is cause for concern in Dental Medicine and, consequently, investigation on the biocompatibility of dental materials.

Objective: The aim of the present study is to determine the degree of cytotoxicity of three different monomers, namely methyl methacrylate (MMA), triethylene glycol dimethacrylate (TEGDMA) and diurethane dimethacrylate (UDMA). These substances are usually associated with resins used in temporary dental restorations, such as resins Tab 2000[®], Protemp 4[™] and Structur 3[®].

Methods: Cultures of 3T3 fibroblasts were made and these were exposed to different concentrations of the monomers. The cell viability and degree of cytotoxicity of each compound were evaluated by MTT assays.

Results: There is evidence that TEGDMA and UDMA monomers are cytotoxic. However, it has not been possible to verify whether the monomers have a dose-dependent effect on cell viability and which of the monomers has the highest cytotoxicity.

Conclusion: TEGDMA and UDMA monomers have cytotoxic effects on fibroblasts, but there are no significant differences in their degree of cytotoxicity.

Keywords: 3T3, MMA, TEGDMA, UDMA

ÍNDICE GERAL

RESUMO	1
ABSTRACT	3
ÍNDICE GERAL	5
ÍNDICE DE FIGURAS	7
ÍNDICE DE TABELAS	9
ÍNDICE DE GRÁFICOS	11
LISTA DE ABREVIATURAS.....	13
INTRODUÇÃO.....	15
1. Coroas Provisórias.....	15
1.1 Confeção.....	16
1.2 Materiais de confeção.....	17
1.2.1 Resinas acrílicas à base de metacrilatos	17
1.2.2 Resinas compostas.....	18
1.3 Propriedades das resinas dentárias	19
1.3.1 Propriedades materiais.....	19
1.3.2 Polimerização	21
1.3.3 Monómeros residuais.....	22
1.4 Degradação das resinas dentárias e o periodonto.....	24
1.5 Toxicidade celular das resinas dentárias	25
2. Análise da citotoxicidade das resinas dentárias.....	28
2.1 Teste de Tripan blue.....	30
2.2 Teste de redução do MTT	30
2.3 Estudos de citotoxicidade em resinas provisórias.....	31
OBJETIVO.....	33
HIPÓTESES EXPERIMENTAIS	33

MATERIAIS E MÉTODOS.....	35
1. Materiais	35
1.1 Linha celular.....	35
1.2 Reagentes	36
1.3 Equipamentos	36
2. Métodos	37
2.1 Cultura de células – 3T3 fibroblastos.....	37
2.1.1 Subculturas	38
2.2 Ensaio de Tripã blue.....	38
2.3 Ensaio de redução do MTT	39
2.3.1 Ensaio A – Otimização do número de células.....	39
2.3.2 Ensaio B – Determinação de toxicidade dos monómeros	39
3. Análise estatística	41
RESULTADOS	43
Ensaio A – Otimização do número de células	43
Ensaio B – Determinação da toxicidade dos monómeros.....	43
DISCUSSÃO DOS RESULTADOS	47
CONCLUSÃO.....	53
BIBLIOGRAFIA	55
ANEXOS.....	64

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Testes de citotoxicidade (Laboratories, 2014).....	29
Figura 2 – Redução do MTT por via enzimática (adaptado de Kronek, Paulovicova, Paulovicova, Kronekova, & Lusto, 2013).....	30
Figura 3 – Células 3T3 observadas ao M.O (ATCC, 2014).....	35
Figura 4 – Câmara de Neubauer (V. N. Gonçalves, 2011).....	38

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 – Soluções de monómeros utilizadas no ensaio II.	40
Tabela 2 – Soluções de controlo utilizadas no ensaio II.....	40
Tabela 3 - Valores médios de absorvância (595 nm) referentes ao número de células do inóculo \pm desvios padrão após ensaio de redução do MTT.....	43
Tabela 4 – Valores médios de percentagem de viabilidade celular após 24 horas de contacto com as diferentes diluições dos monómeros MMA, TEGDMA e UDMA referente ao ensaio de redução do MTT \pm desvio padrão.....	44
Tabela 5 – Valores de absorvância obtidos nos dois ensaios para a otimização do número de células, bem como média e desvio padrão.	65
Tabela 6 – Valores de absorvância obtidos no ensaio B.1 para a determinação da citotoxicidade dos monómeros, bem como média e desvio padrão.	66
Tabela 7 – Valores de absorvância obtidos no ensaio B.2 para a determinação da citotoxicidade dos monómeros, bem como média e desvio padrão.	67
Tabela 8 – Valores de absorvância obtidos no ensaio B.3 para a determinação da citotoxicidade dos monómeros, bem como média e desvio padrão.	68

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Valores médios de absorvância (595 nm) obtidos através do ensaio do MTT referentes ao número de células do inóculo.....	43
Gráfico 2 - Percentagem de viabilidade celular dos fibroblastos 3T3 após 24 horas de contacto com diferentes concentrações do monómero MMA determinado pelo ensaio de redução do MTT \pm desvio padrão.....	44
Gráfico 3 - Percentagem de viabilidade celular dos fibroblastos 3T3 após 24 horas de contacto com diferentes concentrações do monómero TEGDMA determinado pelo ensaio de redução do MTT \pm desvio padrão.....	45
Gráfico 4 - Percentagem de viabilidade celular dos fibroblastos 3T3 após 24 horas de contacto com diferentes concentrações do monómero UDMA determinado pelo ensaio de redução do MTT \pm desvio padrão.....	45

LISTA DE ABREVIATURAS

3T3 – *3-day transfer, inoculum 3x10⁵ cells*

ADN – ácido desoxirribonucleico

ARN_m – ácido ribonucleico mensageiro

BCS – *bovine calph serum* (soro bovino de vitelo)

Bis-GMA – bisfenol glicidil metacrilato

Bis-EMA – etoxilato bisfenol A dimetacrilato

BPA – bisfenol A

COX-2 – ciclo-oxigenase-2

DMEM – *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*

DMSO – dimetilsulfóxido

EC₅₀ – *half maximum effect concentration* (concentração para se obter 50% da resposta máxima)

EMA – etil metacrilato

FCS – *fetal calph serum* (soro fetal de vitelo)

FNT- α – fator de necrose tumoral *alfa*

FC- β – fator de crescimento *beta*

GMA – metacrilato de glicidil

HEMA – hidroxietil metacrilato

i-BMA – *iso*-butilmetacrilato

IL – interleucina

ISO – *International Organization Standardization* (Organização Internacional de Estandardização)

PBS – *phosphate buffered saline* (tampão salino de fosfato)

PCR – *polymerase chain reaction* (reação em cadeia de polimerase)

PEMA – polietil metacrilato

PGE₂ – prostaglandina E2

PNA – piruvato de sódio

PMMA – polimetil metacrilato

PVEMA – polivinil metacrilato

MEM – *non-essential amino acid solution* (solução de aminoácidos não essenciais)

MMA – metil metacrilato

MTT – brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2, 5-difenil-2H-tetrazólio

ROS – *reactive oxygen species* (espécies reativas de oxigénio)

TEGDMA – trietilenoglicol dimetacrilato

UDMA – dimetacrilato de diuretano

INTRODUÇÃO

O tratamento de reabilitação de dentes danificados ou perdidos por prótese fixa, em Medicina Dentária, requer um bom planeamento do tratamento, bem como conhecimento dos aspetos biológicos e mecânicos dos materiais a aplicar (Schillinburg et al., 2012).

O restauro da peça dentária decorre entre o começo do tratamento e a cimentação da restauração definitiva, confeccionada em laboratório (Balkenhol, Ferger, Mautner, & Wöstmann, 2007; Burns, Beck, & Nelson, 2003).

Nesta fase provisória, há um contacto íntimo entre a restauração provisória e os tecidos periodontais e, como tal, esta não deve pôr em causa a saúde do periodonto. Contudo, a irritação da mucosa oral devido a este contacto íntimo é um dos efeitos adversos locais mais frequentes, podendo esta inflamação gengival estar relacionada com o efeito citotóxico provocado pelos monómeros residuais libertados pelos materiais dentários (Borzangy, Labban, & Windsor, 2013; Gautam et al., 2012). Assim, de modo a evitar as reações nocivas provocadas pela restauração provisória e a obter um melhor perfil de tecido gengival em redor da prótese definitiva, foram desenvolvidos vários testes *in vitro* e *in vivo* para quantificar e qualificar a biocompatibilidade dos biomateriais aplicados na clínica (Borzangy et al., 2013; Pourabbas et al., 2009). Dentro dos estudos *in vitro*, estão os testes de citotoxicidade, a primeira etapa dos testes de biocompatibilidade, os quais consistem em colocar o material direta ou indiretamente em contacto com células e observar a existência ou não de alterações celulares, entre elas, a inibição de crescimento ou mesmo morte celular (Rogerio, Lugão, Ikeda, & Cruz, 2003). Os monómeros libertados pelas resinas resinas Tab 2000[®], Protemp 4[™] e Structur 3[®], identificados em estudos anteriores (Catrau, 2015), e no trabalho por mim desenvolvido na Unidade Curricular Iniciação à Investigação I, são provavelmente a causa da toxicidade apresentada pelos eluídos destas resinas (Luís, 2014).

Neste trabalho, pretende-se definir as concentrações de diferentes monómeros presentes nas resinas que diminuem a viabilidade celular e comparar com as concentrações tóxicas destes monómeros definidas por outros autores que utilizam outros tipos de células e/ou outras condições experimentais para testar a viabilidade celular.

1. Coroas Provisórias

Em estudos anteriores, verificou-se que os materiais provisórios utilizados em Medicina Dentária têm diferentes níveis de toxicidade, os quais são atribuídos aos

diferentes monómeros presentes na sua composição. Quais os vários constituintes dos diferentes materiais dentários e as taxas de libertação dos monómeros associadas a estes materiais não é claro, pois, frequentemente, esta divulgação está protegida por patentes (Ulker et al., 2009).

1.1 Confeção

Existe um vasto número de técnicas de confeção da restauração provisória, unitária ou múltipla, mas que, de um modo geral, estão compreendidas em 3 técnicas: o método direto, com a peça produzida intraoralmente; o método indireto, com a peça produzida extraoralmente; e a combinação destas duas últimas, com a peça produzida extraoralmente e o acabamento intraoralmente (Ayuso-Montero, Martinez-Gomis, Lujan-Climent, Salsench, & Peraire, 2009; Konstantinidis, Kotsakis, Pallis, & Walter, 2013; Walls, Nohl, & Wassell, 2002).

No caso da técnica direta, amplamente utilizada pelos clínicos, é mais vantajosa devido ao encurtamento do número de consultas e a um baixo custo. Contudo, apresenta várias desvantagens, como o facto da manipulação dos materiais ser feita intraoralmente, a diminuição da visibilidade e a presença de saliva. É também uma desvantagem o tipo de materiais utilizados nestas técnicas, pois estes libertam monómeros residuais, prejudiciais à polpa, e têm uma reação de polimerização exotérmica, provocando reações inflamatórias nos tecidos periodontais (Michalakis, Pissiotis, Hirayama, Kang, & Kafantaris, 2006). E tal é apresentado por Zach e Cohen (1965), onde “um aumento de 5,6°C leva a uma perda da vitalidade da polpa na ordem dos 15%, um aumento de 11°C a uma perda de 60% e temperaturas superiores a 16.6°C leva à necrose de 100% da polpa” (Zach & Cohen, 1965). Posteriormente, vários estudos avaliaram a libertação de calor aquando a polimerização de diversos materiais dentários e estes mostraram que todos os materiais sofrem uma reação exotérmica, com as resinas PMMA a libertarem mais calor, seguidas das PEMA e pelas resinas bis-acril (Kim, 2004; Michalakis et al., 2006).

No caso da técnica indireta, esta possibilita uma melhor manipulação do material, por ser extraoral, o que leva à melhoria das propriedades mecânicas e da adaptação marginal. Para além disto, uma das grandes vantagens é o facto de se evitar uma reação de polimerização exotérmica dos materiais, não havendo, assim, irritação e sensibilização da polpa. Contudo, esta técnica obriga a equipamento específico, tornando-a mais cara e demorada (Patras, Naka, Doukoudakis, & Pissiotis, 2012).

No caso de combinação das duas técnicas, as coroas podem ser produzidas de uma forma individual ou serem pré fabricadas. As coroas individuais são confeccionadas recorrendo-se à utilização de matrizes como guias (chaves de silicone, feitas com diferentes materiais de impressão) para a execução das restaurações provisórias, através da reprodução de um dente existente na boca ou no enceramento de diagnóstico (Burns et al., 2003). As restaurações provisórias pré-fabricadas, de policarbonato ou de metal, existem em diferentes tamanhos e são escolhidas de acordo com a anatomia de cada dente, embora esta técnica possa implicar uma maior margem de erro do que na técnica indireta, pois o tratamento não será tão personalizado. No caso das de policarbonato, estas funcionam como uma matriz para o dente já preparado com resinas acrílicas, sendo finalizadas *a posteriori* pelo Médico Dentista (Burns et al., 2003; Lee, Lai, & Hsu, 2002).

1.2 Materiais de confecção

Apesar da existência de uma grande variedade de materiais polimerizáveis para o fabrico de restaurações provisórias, estes podem ser divididos em dois grupos, de acordo com a sua natureza química: as resinas acrílicas à base de metacrilatos (as mais comuns, PMMA, PEMA e PVEMA) e as resinas compostas (bis-acrílicas e dimetacrilatos de uretano fotopolimerizáveis) (Balkenhol, Mautner, Ferger, & Wöstmann, 2008; Burns et al., 2003; Michalakis et al., 2006; Patras et al., 2012).

Também o tipo de reação de polimerização poderá agrupar este tipo de materiais em autopolimerizáveis (fator químico), termopolimerizáveis (fator térmico), ou fotopolimerizáveis (luz). Estes materiais podem ainda ser classificados como dual, quando são auto e fotopolimerizáveis (Altintas, Yondem, Tak, & Usumez, 2008; Bettencourt et al., 2010). A maioria das resinas acrílicas são autopolimerizáveis e as resinas compostas autopolimerizáveis ou dual (Balkenhol et al., 2008b).

1.2.1 Resinas acrílicas à base de metacrilatos

PMMA (polimetil metacrilato)

Utilizados desde os anos 40 na confecção de restaurações provisórias em Medicina Dentária, estes materiais apresentam-se como **suspensões** e requerem uma manipulação manual. A sua fase líquida corresponde ao monómero MMA não polimerizado e a sua fase sólida corresponde à resina de polimetilmetacrilato prépolimerizada, sob a forma de microesferas. Ao serem misturados, estes dois componentes formam uma pasta que irá polimerizar (Anusavice, 2012; Balkenhol et al., 2008b; Burns et al., 2003; Mathur et al.,

2013). Para além destes componentes, esta resina contém hidroquinona, na fase líquida, cuja função é a de inibir a polimerização indevida, e peróxido de benzoílo, na fase sólida, cuja função é a de iniciar a polimerização (Leggat & Kedjarune, 2003).

São resinas de elevada dureza e resistência mecânica, de fácil manuseamento e reparação, e de estabilidade estética por longos períodos, onde a sua cor, características óticas e propriedades dimensionais mantêm-se estáveis na boca. Contudo, as suas maiores desvantagens são uma elevada contração de polimerização, uma polimerização exotérmica e uma elevada taxa de libertação de monómeros residuais (Mathur et al., 2013; Walls et al., 2002).

PEMA (polietil metacrilato)

Para ultrapassar as desvantagens das resinas de PMMA, surgem nos anos 60 as resinas PEMA, apresentando-se também como uma suspensão, sendo a fase sólida constituída pelo polímero e peróxido de benzoílo, e a fase líquida por etil metacrilato (Mathur et al., 2013; Walls et al., 2002).

Nestas resinas, há um menor grau de contração de polimerização e uma reação menos exotérmica do que as PMMA, o que as torna bons materiais para utilização intraoral. Contudo, as suas maiores desvantagens serão uma inferior estabilidade de cor e piores características óticas e propriedades dimensionais, levando a que sejam as resinas PMMA as mais utilizadas (Mathur et al., 2013; Walls et al., 2002).

PVEMA (polivinil metacrilato)

Também estas sob a forma de uma suspensão, as resinas de polivinil metacrilato são de pouca utilização na confeção de restaurações provisórias devido a terem piores propriedades físicas quando comparadas com as PMMA e com as PEMA, apesar de uma reação de polimerização menos exotérmica (Mathur et al., 2013).

1.2.2 *Resinas compostas*

Recentemente, as resinas compostas têm vindo a substituir as resinas acrílicas à base de monometacrilatos. As resinas bis-acrílicas e os dimetacrilatos de uretano fotopolimerizáveis apresentam-se sob a forma de uma pasta e têm associado um sistema de auto mistura que permite um manuseamento mais fácil (Burns et al., 2003).

Resinas Bis-acrílicas

As resinas bis-acrílicas surgiram do reforço de resinas de PMMA autopolimerizáveis com partículas de cerâmica, produzindo um polímero muito estável, duradouro e estético,

tendo, como uma das suas grandes vantagens, uma reação exotérmica que não atinge temperaturas tão altas como as PMMA (Burns et al., 2003; Walls et al., 2002).

Estas são compostas por diferentes dimetacrilatos como o Bis-GMA ou o homólogo Bis-EMA (Burns et al., 2003; Kerby, Knobloch, Sharples, & Peregrina, 2013; Peutzfeldt, 1997; Walls et al., 2002).

Dimetacrilatos de Uretano Fotopolimerizáveis

Ainda mais recente, surgiram as resinas sem Bis-GMA, que contêm na sua composição o UDMA, o que confere maior resistência às forças mecânicas e, assim, maior flexibilidade, esta última devido à presença das ligações de uretano no interior do polímero. Como as demais resinas compostas, contêm também partículas de sílica (Kerby et al., 2013).

1.3 Propriedades das resinas dentárias

1.3.1 *Propriedades materiais*

Na restauração provisória, há sempre a necessidade da observação das características do material a utilizar, nomeadamente a sua adaptação marginal, a estabilidade de cor, a resposta da polpa e a citotoxicidade celular.

No que diz respeito à adaptação marginal, esta deverá ser boa, pois é esta que vai proteger o dente de estímulos de diversos estímulos, como térmicos, químicos e bacterianos. A adaptação marginal relaciona-se com a contração de polimerização, visto que a densidade do polímero e a dos monómeros é diferente (Burns et al., 2003; Patras et al., 2012). Apesar de se esperar que as resinas compostas, nomeadamente as bis-acril, estivessem associadas a uma melhor adaptação marginal, devido à sua menor percentagem de contração, comparativamente a resinas à base de metacrilatos (por exemplo, PMMA), Balkenhol *et al.* (2008a) concluem que a adaptação marginal estará mais relacionada com o produto/marca e a sua composição em si do que com o tipo de material estudado. Ou seja, não há relação direta entre a contração de polimerização e adaptação marginal, visto que, por vezes, a contração de polimerização é compensada pelo aumento volumétrico do material. Para além da contração de polimerização, também o tipo de confeção da peça dentária influencia esta adaptação, onde coroas confeccionadas com resinas à base de e metacrilatos pelo método indireto apresentam melhorias significativas, até 70%, quando comparadas com aquelas feitas pelo método direto

(Balkenhol et al., 2008a; Burns et al., 2003; S. H. Kim & Watts, 2004; Lepe, Bales, & Johnson, 1999; Rakhshan, 2015).

A dureza e resistência à fratura são também características que se deve ter em conta nas coroas provisórias. E esta necessidade será tanto maior quanto maior for tempo de permanência da restauração na boca e quanto maior for a reabilitação. De entre todas, as resinas à base de metacrilatos, por apresentarem uma menor dureza mas uma maior resistência à fratura, tendo, assim, elasticidade superior às resinas compostas, são as mais resistentes às forças mastigatórias e de maior durabilidade (Kim & Watts, 2007; Poonacha, Poonacha, Salagundi, & Raghavan, 2013).

No caso da estética, a estabilidade de cor é um elemento muito importante da coroa provisória, pretendendo-se que, para o êxito da peça, esta não sofra alterações de cor com o tempo. Contudo, os materiais dentários são sempre submetidos a mecanismos de absorção e adsorção de pigmentos presentes em líquidos, nas condições do meio oral, que, em conjunto com a porosidade, o polimento da superfície da peça e hábitos de higiene oral, irão influenciar a pigmentação das restaurações. Por exemplo, o café encontra-se no topo dos líquidos estudados que mais pigmenta as resinas acrílicas. De entre os dois tipos de resinas, parece haver uma superioridade na estabilidade de cor das resinas à base de metacrilatos, quando comparadas com as resinas compostas autopolimerizáveis, havendo, contudo, alguns estudos que revelam que as resinas bis-acril serão mais resistentes à descoloração ao serem sujeitas a irradiação UV. (Bayindir, Kürklü, & Yanikoğlu, 2012; Sham, Chu, Chai, & Chow, 2004; Walls et al., 2002).

Tal como já anteriormente dito, as resinas acrílicas sofrem reação exotérmica aquando a sua polimerização, o que torna importante avaliar a extensão desta, visto que agressões desta natureza podem provocar pulpíte ou mesmo necrose da polpa. Nos estudos de Altintas *et al.* (2008), demonstrou-se que as resinas compostas libertam significativamente menos calor do que resinas acrílicas (como PMMA). No entanto, visto que o estudo não tem em conta variáveis como a condução térmica dos materiais em questão, não é possível concluir sobre eventuais lesões pulpares. O mesmo conclui Michalakis *et al.* (2006) no seu estudo ao observar que a resina de PMMA estudada foi aquela que apresentou uma reação exotérmica mais extensa, quando comparada com outras resinas acrílicas. No entanto, Michalakis conclui também que a resina composta de dimetacrilato de uretano, não tendo uma reação exotérmica superior às restantes resinas do estudo (PMMA, PEMA e bis-acrílicas), foi a que provocou o maior aumento de temperatura intrapulpal. Segundo os autores, tal poderá dever-se à acumulação da

energia libertada e à absorção da irradiação do material durante a sua polimerização (Michalakis et al., 2006). Para além da reação de polimerização, a libertação de calor irá também depender da quantidade de material provisório utilizado e do material matriz para a colocação da resina em boca, no método direto (Altintas et al., 2008; Burns et al., 2003; Michalakis et al., 2006).

Também como anteriormente mencionado, as resinas PMMA permitem a reparação e modificação, melhor do que as resinas bis-acril, não acontecendo o mesmo com as resinas compostas (Mathur et al., 2013).

1.3.2 Polimerização

As resinas são constituídas por monómeros, moléculas de baixo peso molecular, que, em conjunto, formam uma cadeia, o polímero, sendo a formação deste dependente do tipo de monómeros constituintes e das condições de polimerização.

A polimerização da resina depende dos radicais livres que a iniciam. No caso das resinas PMMA, estas são autopolimerizáveis e o processo de polimerização é induzido normalmente pela mistura de uma amina terciária (ativador) com peróxido de benzoílo (iniciador), onde a presença da amina irá reduzir a energia térmica necessária para dissociar o iniciador em radicais livres à temperatura ambiente. No caso das resinas compostas, estas podem tanto ser autopolimerizáveis como *dual*, sendo que, no caso da polimerização *dual*, está presente um fotoativador (canferoquinona), para além de iniciadores químicos, que, em combinação com uma amina orgânica (por exemplo, dimetilaminoetilo), geram radicais livres sob a irradiação de luz visível com comprimentos de onda na ordem dos 470 nm (Anusavice et al., 2012; Balkenhol et al., 2008b; S.-Y. Lee et al., 2002).

No decorrer da polimerização, a cadeia e os seus constituintes tornam-se mais estáticos e as moléculas ficam presas nesta rede, o que provoca a diminuição da velocidade e capacidade de polimerização. As ligações simples de carbono formadas durante a polimerização, a sua extensão e *crosslinking*, e a organização das cadeias entre si irão determinar as propriedades dos materiais, nomeadamente a sua dureza. Também a estrutura e a funcionalidade dos monómeros nestes polímeros irá determinar a viscosidade, o índice refratário, as características hidrofóbicas e hidrofílicas, a reatividade e contribuição para o grau de conversão e densidade do material, mais do que os grupos metacrilato, também estes presentes na resina acrílica. Quando há mistura de vários tipos de monómeros, estas características sofrem um efeito aditivo (Floyd & Dickens, 2006;

Stansbury, 2012). Na técnica direta, os monómeros são escolhidos por forma a aumentar o *crosslinking*, o que promove o aumento do módulo de elasticidade e dureza, resistência à adsorção e à pigmentação (Stansbury, 2012).

A presença de compostos residuais reflete as substâncias que não estão incorporadas na cadeia polimérica, como monómeros, aditivos e produtos da reação, e que, conseqüentemente, podem ser libertados. A libertação desses produtos depende da taxa de conversão do monómero em polímero (ou seja, a percentagem de grupos metacrilato que reagiram) e da quantidade de monómeros existentes inicialmente. Tal, pode provocar reações sistêmicas ou locais, sendo que a sua concentração e reatividade dependerá do método e ciclo de polimerização, bem como do tratamento após a polimerização. De um modo geral, existirá uma maior quantidade de monómeros residuais nas resinas autopolimerizáveis do que nas resinas fotopolimerizáveis, levando a que haja a preferência pelas resinas compostas, à base de dimetacrilatos e de polimerização *dual* (Gautam et al., 2012).

1.3.3 *Monómeros residuais*

Tal como referido anteriormente, as propriedades das resinas dependem tanto da sua constituição monomérica como do tipo de polimerização. Ambos influenciam a reatividade, a viscosidade, a contração de polimerização e a absorção de água por parte dos materiais dentários (Krifka, Spagnuolo, Schmalz, & Schweikl, 2013; I. D. Sideridou & Papanastasiou, 2008).

De um modo geral, os monómeros que constituem as resinas podem ser divididos em monometacrilatos (MMA, HEMA, EMA e i-BMA, entre outros) e dimetacrilatos (Bis-GMA, Bis-EMA, UDMA e TEGDMA, entre outros), sendo as PMMA e PEMA constituídas essencialmente por monometacrilatos e as resinas compostas por dimetacrilatos (Anusavice, 2012; Balkenhol et al. 2008a; Walls et al., 2002).

MMA

O MMA é um éster de ácido metacrilato amplamente utilizado na Medicina Dentária, facilmente polimerizável por luz, calor, oxigénio, radiação ou agentes catalisadores, e faz parte das resinas de PMMA (Leggat & Kedjarune, 2003; Yang, Chou, Chou, & Chang, 2003).

Bis-GMA, TEGDMA e HEMA

Devido à elevada dureza das resinas de PMMA e, conseqüentemente, da sua elevada friabilidade, os fabricantes introduziram nesta base monómeros Bis-GMA ou Bis-EMA, o que permitiu o aumento da flexibilidade da resina (Kerby et al., 2013). Contudo, devido ao seu alto grau de viscosidade, a estas resinas também foram adicionados monómeros mais pequenos que funcionam como diluentes, por exemplo o TEGDMA ou o HEMA, permitindo um melhor manuseamento (Reichl et al., 2012; Sideridou, Tserki, & Papanastasiou, 2002; Stansbury, 2012).

Quanto ao Bis-GMA, este é um dimetacrilato preparado a partir de BPA e GMA e que foi desenvolvido especificamente para utilização em Medicina Dentária devido à elevada viscosidade que apresenta, permitindo um aumento da flexibilidade do material (Burns et al., 2003; Lemon, Jones, & Stansbury, 2007; Stansbury, 2012). Por ser de maior peso molecular do que o MMA, é menos volátil, sofrendo menor contração de polimerização, e é menos tóxico, tendo uma menor difusão para os tecidos (Sideridou et al., 2002). O Bis-GMA e o Bis-EMA são análogos, sendo o segundo menos viscoso que o primeiro devido a dois grupos hidroxilo presentes nas extremidades do primeiro (Sideridou et al., 2002), o que, numa resina à base de Bis-EMA, poderá levar à dispensa da associação do monómero TEGDMA (F. Gonçalves, Kawano, Pfeifer, Stansbury, & Braga, 2009).

Quanto ao TEGDMA, este funciona essencialmente como diluente, mas a sua presença piora as propriedades da resina, pois aumenta a absorção de água, a contração de polimerização e a libertação de monómeros residuais por parte destas resinas. Ou seja, se, por um lado, a sua presença é necessária para tornar a resina menos viscosa, facilitando o seu manuseamento e aumentando o grau de conversão, por outro lado, o aumento da contração de polimerização levará à formação de espaços vazios na resina, diminuindo a qualidade da resina (Floyd & Dickens, 2006; Sideridou et al., 2002; Stansbury, 2012).

No caso do HEMA, para além de funcionar como diluente, tem também como função facilitar a penetração de moléculas, como o Bis-GMA e UDMA, em ambientes hidrofílicos, como a dentina, não tendo, no entanto, capacidade de formar uma matriz tridimensional como o TEGDMA, pois apenas contém uma dupla ligação (Reichl et al., 2012).

UDMA

Como alternativa à associação Bis-GMA/TEGDMA, surge o UDMA, um dimetacrilato com peso molecular semelhante ao Bis-GMA, mas com menor viscosidade,

deixando de ser necessária a associação ao TEGDMA (Balkenhol et al., 2008a). Por ter poucas ligações de hidrogénio, tem menor viscosidade que o Bis-GMA, mas, devido à presença de grupos uretano, tem maior viscosidade que o Bis-EMA ou o TEGDMA e conferem uma maior flexibilidade e melhoram a rigidez das resinas (Chang et al., 2012; Peutzfeldt, 1997; Sideridou et al., 2002; Stansbury, 2012).

Sabendo que contêm ligações ao grupo uretano, os polímeros à base de UDMA tendem a ser hidrofílicos, o que permite a formação de ligações de hidrogénio com a água e, assim, a absorção de água pelo polímero. Tal, levará à degradação hidrolítica da matriz polimérica e, assim, à diminuição de propriedades mecânicas destes materiais, como a resistência à fratura ou a elasticidade, tornando-os mais frágeis (Kerby et al., 2013).

1.4 Degradação das resinas dentárias e o periodonto

Devido à polimerização incompleta, quer em fases iniciais quer em fases mais tardias do processo de degradação, os constituintes dos materiais dentários podem ser libertados na cavidade oral (Krifka et al., 2013; Van Landuyt et al., 2011). Também diferentes fatores responsáveis pela degradação das resinas acrílicas, nomeadamente as características da saliva, a mastigação e as alterações químicas e térmicas da dieta, podem provocar a libertação de compostos potencialmente tóxicos (Bettencourt et al., 2010; Gautam et al., 2012).

Existem dois tipos de degradação que as resinas presentes na cavidade oral podem sofrer: a degradação química (hidrólise, reações enzimáticas) ou a degradação física (penetração de moléculas de água da saliva na rede polimérica, promovendo a libertação de aditivos e/ou monómeros não polimerizados). Além disto, também a hidrólise enzimática pode originar subprodutos metabólicos, também estes potencialmente tóxicos, como, por exemplo, o ácido metacrílico (Emmler et al., 2008).

Sabendo que, na constituição das resinas, diferentes monómeros têm diferentes graus de conversão e contração de polimerização, este é também um fator muito importante no grau de biodegradação. Por exemplo, resinas compostas por UDMA sofrem mais degradação hidrolítica do que resinas compostas à base de Bis-GMA (Bettencourt et al., 2010; Chang et al., 2014; Stansbury, 2012).

Da polimerização incompleta e biodegradação, há a libertação de monómeros e estes interagem com os tecidos orais, promovendo o aparecimento de processos inflamatórios entre os quais a inflamação gengival e recessão. Por exemplo, em 80% dos casos avaliados por Donaldson (1973), houve recessão gengival e a persistência desta dependia

do tempo de permanência da restauração provisória na cavidade bucal (Donaldson, 1973; Luthardt, Stöbel, Hinz, & Vollandt, 2000; Rakhshan, 2014).

Tanto a inflamação como a recessão da gengiva são despoletadas pela degradação do colagénio nas zonas circundantes da peça. Sabendo que o tipo de célula predominante no tecido conjuntivo periodontal é o fibroblasto, este desempenha um papel significativo na remodelação da matriz extracelular através da síntese de fibras de colagénio e responde a várias citocinas inflamatórias e fatores de crescimento, de modo a controlar o equilíbrio entre a síntese e a degradação da matriz extracelular. Para além das células imunitárias (linfócitos, granulócitos, monócitos e macrófagos), as citocinas/fatores de crescimento podem ser secretadas pelas células epiteliais, células endoteliais e fibroblastos. Podendo ter tanto uma função pró-inflamatória (como IL-1, FNT- α , IL-6, IL-8 e IL-12) como anti-inflamatória (IL-1Ra, IL-4, IL-10, IL-11, IL-13 e FC- β), as citocinas/fatores de crescimento modificam a expressão das metaloproteinases, como resposta à presença de produtos tóxicos, e, assim, alteram a remodelação da matriz celular, devido à habilidade das metaloproteinases clivarem a matriz. Foi observado nos estudos de Borzangy *et al.* (2013) que as células epiteliais, na presença de resinas PMMA e PEMA, irão produzir menos IL-3 (regulação da apoptose celular), o que pode permitir a ocorrência de apoptose celular, perda de gengiva e, conseqüentemente, uma resposta inflamatória (Borzangy *et al.*, 2013; Labban, Song, Al-Shibani, & Windsor, 2008).

Outra problemática que surge com o processo de degradação de resinas dentárias na cavidade oral é a inflamação da polpa dentária. Para além de poder haver lesão da polpa com a libertação de calor durante o processo de polimerização, levando à pulpite ou mesmo necrose, também este tipo de inflamação poderá estar associado a uma reação imunológica devido à difusão de monómeros tóxicos até à polpa. Monómeros como o TEGDMA, HEMA ou UDMA difundem-se pela dentina e provocam a desregulação do ciclo celular e alteração do balanço redox das células na dentina, podendo causar a apoptose das mesmas (Chang *et al.*, 2014; Schweikl, Spagnuolo, & Schmalz, 2006).

1.5 Toxicidade celular das resinas dentárias

Tanto os monómeros como co-monómeros, aditivos e outras substâncias libertados pelas resinas são motivos de apreensão e, conseqüentemente, de investigação da biocompatibilidade dos materiais acrílicos, devido à possibilidade de estes serem alergénicos e provocar efeitos adversos locais e sistémicos, bem como de também poderem ser citotóxicos, genotóxicos e/ou mutagénicos. Não havendo ainda um total conhecimento sobre quais os mecanismos biológicos que estarão por trás da

citotoxicidade deste tipo de material, diversos estudos nos últimos anos afirmam que o efeito nocivo dos monómeros residuais terá três causas principais – a depleção de glutathione nas células, o descontrole do balanço redox por aumento da produção de subprodutos oxidativos (ROS) e a alteração da transcrição de ciclooxigenase-2 (COX-2) (Chang et al., 2012; Durner, Wellner, Hickel, & Reichl, 2012; Emmeler et al., 2008; Lee, Kim, Lim, Lee, & Yang, 2009).

Substâncias como peróxido de hidrogénio, superóxido e radicais hidroxilo existem em todas as células, produzidos de forma endógena e exógena. Devido à existência destes ROS no meio intracelular, há um conjunto de mecanismos celulares de proteção que utilizam diferentes moléculas, não enzimáticas e enzimáticas. Uma destas é a glutathione, um antioxidante não enzimático que permite o controlo do balanço redox na célula. Sabendo que os monómeros de resinas originam a depleção da glutathione, há, assim, um aumento de ROS e um desequilíbrio entre subprodutos oxidativos e moléculas antioxidantes. Diversos estudos em fibroblastos da polpa dentária sugerem que tanto o TEGDMA como o HEMA promovem estes dois fenómenos, levando ao aumento do *stress* oxidativo celular e, eventualmente, à paragem do ciclo celular ou mesmo apoptose. Tal, indica que estes monómeros intervêm nas vias de transdução de sinal das células (Becher et al., 2006; Krifka et al., 2013; Schweickl et al., 2006).

Existe também a possibilidade de que a combinação de depleção de glutathione e o aumento de ROS intracelular, ao aumentarem o *stress* oxidativo, possam estar relacionados com a regulação da expressão da COX-2, podendo conduzir ao aumento de uma resposta inflamatória (Lee et al., 2009). A enzima COX-2, responsável por processos inflamatórios, quer agudos quer crónicos, é essencial na produção de mediadores inflamatórios como as prostaglandinas, nomeadamente a PGE₂, sendo esta apenas expressa em situação de inflamação e a sua expressão regulada por um conjunto de citocinas como a IL1, IL6 e TNF α (Chang et al., 2012; Chang et al., 2014; D. H. Lee et al., 2009). Em diversos estudos, é demonstrada uma relação entre a presença dos monómeros TEGDMA e HEMA e o aumento da expressão da COX-2. Segundo Lee *et al.* (2009), a presença de ambos aumenta a expressão de COX-2, mas apenas o TEGDMA aumenta a produção de PGE₂. Nas células onde há um aumento da expressão de COX-2 induzida pelo HEMA, este parece não ser suficiente para que haja um aumento na produção da prostaglandina. A indução da expressão COX-2 deu-se com doses subletais de TEGDMA, de 0,1 – 0,4 mM. Segundo Chang *et al.* (2012), estas mesmas doses subletais terão sido de 1 - 5 mM, com efeitos na expressão do ARNm e da COX-2, sendo

que a concentração de 2,5 mM foi aquela que mais aumentou a expressão de COX-2. Tal como o autor nos indica, esta diferença significativa de concentrações em relação ao estudo de Lee deve-se ao facto de terem sido estudadas células com metabolismos diferentes nos dois ensaios (células da polpa humanas, ricas em fibroblastos, e monócitos de roedor, respetivamente). Para além do aumento da expressão de COX-2 e de PGE₂, o autor verificou que, aquando a exposição das células a concentrações 1 - 2,5 mM de TEGDMA, ocorre paragem do ciclo celular entre as fases G2/M e, a concentrações superiores a 5 mM, ocorre a paragem do ciclo celular na fase S.

Para além dos monómeros TEGDMA e HEMA, também o monómero UDMA está associado à regulação da expressão da COX-2, segundo Chang *et al.* (2014). Na presença de UDMA a uma concentração de 0,25 mM, as células da polpa alteram a quantidade do ARNm e da proteína COX-2, e, a uma concentração de 0,35 mM, ocorre apoptose. Neste mesmo estudo, verificou-se que a taxa de sobrevivência das células da polpa foi superior após a introdução nas células de enzimas responsáveis pela degradação de ROS, mostrando, assim, a associação entre a citotoxicidade do UDMA e a produção de ROS e/ou diminuição de glutathione. Resultados e conclusões similares surgem em ensaios do mesmo tipo feitos anteriormente para o monómero TEGDMA (Lee, Lim, Lee, Ahn, & Yang, 2006).

Em clínica, os monómeros não se encontram no seu estado puro, mas numa mistura com os diversos constituintes da resina, nomeadamente outros monómeros. E, sobre a combinação de monómeros, existe pouca informação sobre o seu potencial tóxico na cavidade oral. Observando o estudo de Dürner *et al.* (2012), onde foi investigado o efeito citotóxico sinérgico de diversas misturas binárias de monómeros, a mistura Bis-GMA/TEGDMA apresentou o menor EC₅₀¹, ou seja, a combinação mais tóxica. Sabendo que a literatura nos diz que o Bis-GMA tem o menor EC₅₀, seguido por UDMA>TEGDMA>HEMA>MMA, é possível que a mistura BisGMA/TEGDMA tenha o menor valor EC₅₀ em comparação com as outras misturas, pois o BisGMA e o TEGDMA são o monómero e o co-monómero, respetivamente, mais tóxicos, ou seja, com os menores valores de EC₅₀ (Becher *et al.*, 2006; Durner *et al.*, 2012; Geurtsen, Lehmann, Spahl, & Leyhausen, 1998).

Os monómeros TEGMA, HEMA, Bis-GMA e UDMA são também mediadores de efeitos genotóxicos, para além da já mencionada citotoxicidade. Estes tanto podem afetar

¹ EC₅₀ – Concentração capaz de produzir metade dos efeitos da resposta máxima.

o mecanismo de síntese de ADN como promover o aumento da quantidade de ROS intracelular, produtos estes que também degradam o ADN. No caso dos monómeros HEMA e MMA, não foram detetadas mutações genéticas; contudo, elevadas concentrações de HEMA induziram um número elevado de micronúcleos, indicando aberrações cromossomais *in vitro*. Tal facto poderá indicar que o HEMA estará também envolvido em processos que danificam o ADN (Schweickl et al., 2006).

De todos os monómeros presentes na literatura, o MMA é o menos citotóxico. No entanto, o MMA é descrito como um agente irritante da pele e do sistema respiratório, é também um sensibilizante, causador de reações alérgicas tipo eczema na pele, podendo haver alguma toxicidade no consultório pela sua volatilidade. Assim, o maior risco associado a este monómero é para o clínico devido à sua repetida exposição ao MMA, a qual poderá causar dermatite de contato devido à manipulação de resinas, nomeadamente PMMA, através de mecanismos de ativação/desativação de enzimas e reconhecimentos de antigénios ao interagir com proteínas à superfície da pele (Pemberton & Lohmann, 2014; Peutzfeldt, 1997). Segundo o estudo de Yang *et al.* (2003), existe inibição de crescimento celular na presença de MMA, dependendo da dose e do tempo de exposição, mesmo a concentrações tão baixas como $9,33 \times 10^{-7}$ mM em células de hamster, mas os mecanismos biológicos associados continuam desconhecidos. O autor conclui que o MMA é capaz de inibir a síntese de ADN, mas que tal poderá estar associado à alteração do metabolismo lipídico, à produção de citoquinas, à inibição da viabilidade celular via atividade mitocondrial, ou até por inibição da síntese de ADN, sendo prematuro falar em genotoxicidade.

Apesar da importância da avaliação da toxicidade individual dos monómeros presentes nas resinas e dos seus efeitos, é necessária a determinação das quantidades libertadas de cada componente e quais os seus valores tóxicos, quer em separado, quer em diferentes misturas, de modo a mimetizar o que ocorre clinicamente (Van Landuyt et al., 2011).

2. Análise da citotoxicidade das resinas dentárias

A biocompatibilidade pode ser definida como a capacidade de um material exercer as suas funções específicas quando aplicado em tecidos vivos de determinado hospedeiro, sem causar danos ou prejuízo ao mesmo. Em Medicina Dentária, esta é uma problemática dos materiais utilizados, pois nenhum material dentário e/ou os seus componentes é inerte do ponto de vista biológico, devendo, assim, ser testados com o objetivo de simular reações biológicas e ajudar na compreensão das respostas obtidas. A *International*

Organization Standardization (ISO) e o Council on Dental Materials Instruments and Equipment of the American Dental Association recomendam um vasto conjunto de testes *in vivo* e *in vitro* para estudar a biocompatibilidade dos materiais e, de acordo com as normas, a principal categoria de testes com este objetivo é a dos testes de biocompatibilidade, sendo que os estudos *in vitro* constituem a primeira etapa destes testes (Jorge, Giampaoli, & Pavarina, 2004; Vitral, Silva, Souza, Ferreira, & Vitral, 2008).

Os testes de citotoxicidade encontram-se dentro dos testes de biocompatibilidade *in vitro* e são recomendados para todos os materiais usados na área de saúde. Têm como vantagens permitirem uma rápida avaliação, protocolos padronizados, produzirem dados quantitativos e comparáveis, e, devido à sua sensibilidade, permitirem também que os materiais tóxicos sejam descartados, evitando os testes *in vivo* em animais ou humanos. Existem diversos testes utilizados para a avaliação da citotoxicidade (figura 1), podendo avaliar a viabilidade celular, tanto com a ajuda de corantes vitais (MTT, Vermelho neutro, Cristal violeta, *Tripan blue*, LDH) por intermédio de reações enzimáticas que originam compostos corados e mensuráveis por absorvância, bem como através de marcadores genéticos fluorescentes (teste de BrdU) (Jorge et al., 2004; Moharamzadeh, Brook, & Van

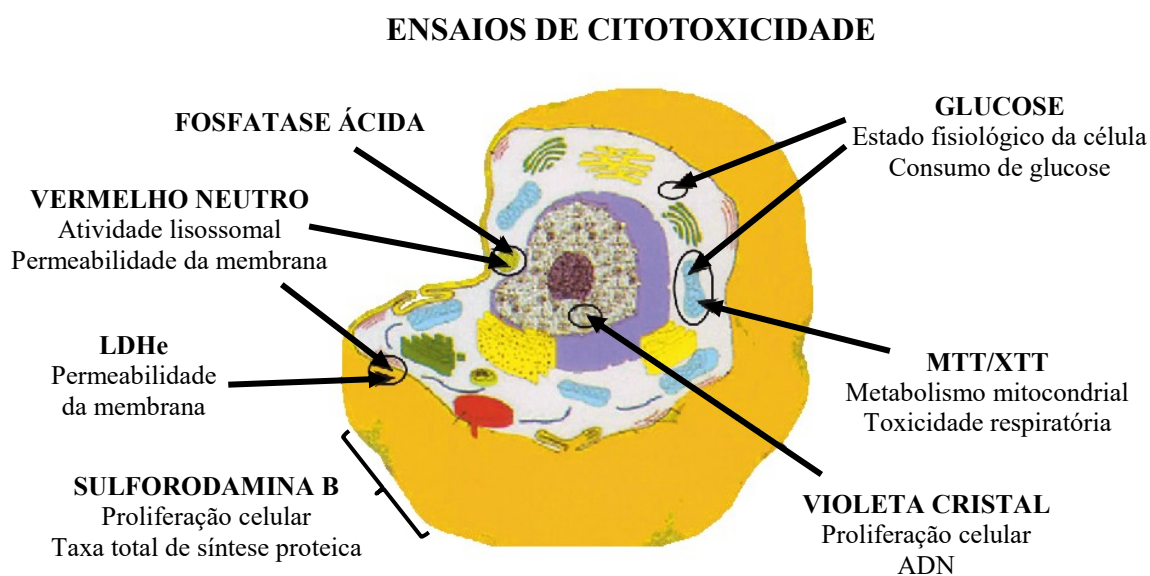


Figura 1 - Testes de citotoxicidade (Laboratories, 2014).

O objetivo do presente trabalho consiste na determinação dos graus de citotoxicidade de três monómeros (MMA, TEGDMA e UDMA), presentes em resinas utilizadas na execução de coroas provisórias, quando em contacto com fibroblastos de ratinho. Para

tal, foram feitos os ensaios de *Tripán blue* e de MTT que permitem quantificar a viabilidade celular, ou seja, o número de células viáveis após o contacto com os monómeros.

2.1 Teste de *Tripán blue*

Para assegurar que uma cultura celular tem um nível de crescimento ótimo antes de se proceder a ensaios de citotoxicidade, é importante saber a percentagem de células viáveis e a percentagem de células mortas, e, assim, saber qual o estado geral das células em cultura. Tal pode ser estimado pela aparência das células ao microscópico, onde o uso do ensaio colorimétrico de *Tripán blue* permite uma análise quantitativa das condições da cultura celular. Quando uma suspensão celular é corada com *Tripán blue*, este apenas irá atravessar a membrana de células mortas/não viáveis. Assim, as células viáveis ficam pequenas, redondas e refratáveis, ao contrário das células não-viáveis, que ficam inchadas, maiores e azuis-escuras. Este ensaio permite determinar tanto o número total de células por mililitro e a percentagem de células viáveis (Doyle & Bryan Griffiths, 1998).

2.2 Teste de redução do MTT

O ensaio colorimétrico do MTT (brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio), desenvolvido por Mossman em 1983, demonstra os efeitos sobre a viabilidade das células por alteração da atividade da desidrogenase mitocondrial. Este teste baseia-se na capacidade de células viáveis converterem metabolicamente o sal tetrazólio MTT de cor amarela e solúvel em água, em formazan de cor violeta, insolúvel em água, pela atividade da enzima mitocondrial succinato desidrogenase (figura 2) (Doyle & Bryan Griffiths, 1998; Moharamzadeh et al., 2009; Wang et al., 2010).

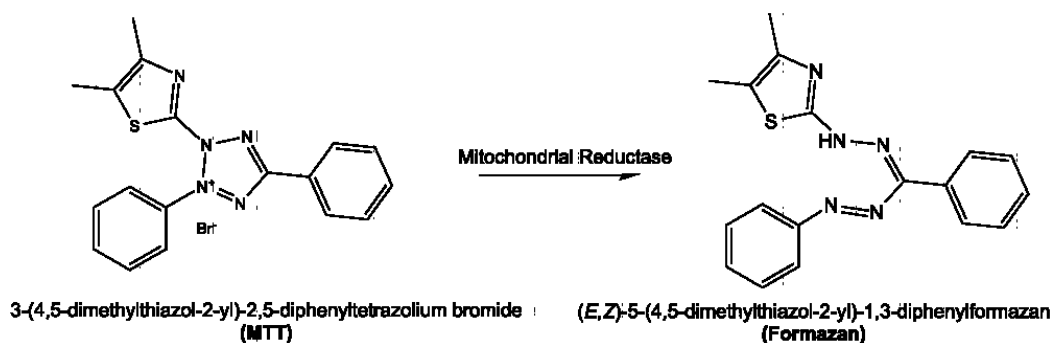


Figura 2 – Redução do MTT por via enzimática (adaptado de Kronek, Paulovicova, Paulovicova, Kronekova, & Lusto, 2013)

Os cristais de formazan são dissolvidos num solvente orgânico, como o DMSO ou o isopropanol, e a absorvância da solução corada pode ser quantificada por espectrofotometria UV/visível a um comprimento de onda de 500 - 600 nm. A quantidade de formazan produzido é diretamente proporcional ao número de células viáveis, ou seja, quanto maior a absorvância, maior o número de cristais de formazan formados e, conseqüentemente, maior o número de células viáveis na cultura celular. Esta técnica permite o processamento de um grande número de amostras com um elevado grau de precisão pela utilização de um espectrofotómetro multicanal (leitor micro-ELISA). O teste MTT é o teste mais comum para avaliar a citotoxicidade de materiais dentários, pois é um método rápido e barato (Doyle & Bryan Griffiths, 1998; Moharamzadeh et al., 2009; Wang et al., 2010).

2.3 Estudos de citotoxicidade em resinas provisórias

Nos estudos sobre resinas utilizadas na elaboração de coroas provisórias (Catrau, 2015; Luís, 2014), foram produzidos extratos provenientes de diferentes tipos de resinas, quer acrílicas (Tab 2000[®], da Kerr) quer compostas bis-acrílicas (Protemp 4[™], da 3M ESPE, e Structur 3[®], da VOCO).

De acordo com Luís (2014), através de testes de biocompatibilidade (ensaios do MTT e do Cristal Violeta), foi determinado que os fibroblastos 3T3 são sensíveis aos extratos de diferentes tipos de resinas (Tab 2000[®], Protemp 4[™] e Structur 3[®]) nas diversas concentrações testadas. Foi determinado que a citotoxicidade da resina Structur 3[®] (resina composta bis-acrílica) é a mais elevada em extratos mais concentrados e em todos os períodos de incubação e, por apresentar uma viabilidade celular de cerca de 21,89%, é classificada como altamente citotóxica, comparativamente às outras duas resinas mencionadas, Protemp 4[™] e Tab 2000[®]. Estas são classificadas como ligeiramente citotóxicas (percentagens de viabilidade celular de ~73,20% e ~66,72%, respetivamente) (norma ISO 10993-5:2009 (2009)).

Já no estudo de Catrau (2015), através da análise cromatográfica de extratos destas mesmas resinas, foi determinado que todas elas apresentam TEGDMA (em maior quantidade na resina TAB 2000[®]), que o monómero MMA aparece na constituição das resinas TAB 2000[®] e Structur 3[®] (em maior quantidade na TAB 2000[®]) e que as duas resinas compostas estudadas têm na sua constituição UDMA (em maior quantidade na Structur 3[®]). Destes resultados, observou-se que a resina Structur 3[®] era a que continha três dos quatro monómeros avaliados e potencialmente tóxicos (TEGDMA, MMA e

UDMA), mas que, apesar do estudo recente de Durner e colaboradores (2012) demonstrar que há um efeito sinérgico na toxicidade quando se misturam vários monómeros, é prematuro concluir que a elevada toxicidade da resina advenha apenas do efeito sinérgico entre os monómeros detetados por Catrau, pois esta resina tem muitos outros constituintes desconhecidos.

O monómero TEGDMA libertado da resina TAB 2000[®] encontra-se em concentração tóxica (4 mM), sendo este valor superior ao necessário para induzir expressão da COX-2 (enzima fundamental para a produção de mediadores inflamatórios como as prostaglandinas, regulada por uma série de citocinas como a IL1, IL6 e TNF α), tanto segundo o estudo de Lee *et al.* (2009) (0,1 – 0,4 mM) como no de Chang *et al.* (2012) (1 – 5 mM), e, assim, o suficiente para poder induzir toxicidade. A concentração de TEGDMA encontrada nas amostras das resinas Protemp 4[™] e Structur 3[®] (0,5 – 0,7 mM e 0,6 – 0,7 mM, respetivamente) é superior à necessária para induzir expressão da COX-2, segundo o estudo de Lee *et al.* (2009), mas é considerada inferior à necessária para induzir a expressão da COX-2, segundo o estudo de Chang *et al.* (2012). Como tal, o TEGDMA libertado pelas resinas Protemp 4[™] e Structur 3[®] encontra-se em concentração tóxica segundo o estudo de Lee *et al.* (2009), mas não tóxica segundo o estudo de Chang *et al.* (2012).

O monómero UDMA, libertado pela resina Protemp 4[™], encontra-se em concentração não tóxica, pois a concentração deste monómero encontrada nas amostras desta resina (0,08 – 0,1 mM) é inferior à considerada tóxica no estudo de Chang *et al.* (2014) (0,35mM). Nas amostras das resinas Structur 3[®], a concentração de UDMA encontra-se no limiar de toxicidade, de acordo com o estudo de Chang *et al.* (2014). Segundo este, a uma concentração de 0,025 mM, ocorre alteração da expressão de mRNA e da COX-2, e, a uma concentração de 0,35 mM, ocorre apoptose das células. Assim, a concentração de UDMA na resina Structur3[®] variou entre 0,3 e 0,4 mM, o suficiente para induzir alteração da expressão de mRNA e COX-2, sendo que apenas nos primeiros 7 dias a concentração é suficiente para levar à apoptose celular (0,4 mM) (Chang et al., 2014).

As concentrações de MMA encontradas nas amostras das resinas TAB 2000[®] e Structur 3[®] são bastante superiores (1 e 0,1 mM, respetivamente) à concentração considerada tóxica no estudo de Yang *et al.* (2003), estudo este onde, a doses tão baixas como $9,33 \times 10^{-7}$ mM, o MMA mostrou-se citotóxico.

OBJETIVO

Neste trabalho, pretendeu-se determinar os graus de citotoxicidade de três diferentes monómeros, nomeadamente definir as concentrações de MMA, TEGDMA e UDMA que induzem a morte celular, de acordo com as condições experimentais do teste de MTT utilizadas no nosso laboratório. Estes monómeros integram habitualmente a composição de resinas utilizadas em restauração provisória dentária.

HIPÓTESES EXPERIMENTAIS

Hipótese Nula:

Os monómeros MMA, TEGDMA e UDMA não têm diferentes graus de citotoxicidade celular em contato com os fibroblastos da linha celular 3T3 de murganho.

Hipótese Alternativa:

Os monómeros MMA, TEGDMA e UDMA têm diferentes graus de citotoxicidade celular em contato com os fibroblastos da linha celular 3T3 de murganho.

MATERIAIS E MÉTODOS

1. Materiais

1.1 Linha celular

As células utilizadas foram as NIH/3T3 (ATCC® CRL-1658™), adquiridas na ATCC (American Type Culture Collection, 2016), as quais correspondem a uma linha celular obtida a partir de fibroblastos embrionários de ratinho (3T3), de grande utilização em vários tipos de estudos, sendo, por isso, considerados fibroblastos de referência.

A linha celular 3T3 foi isolada pela primeira vez em 1962, por George Todaro e Howard Green, no Departamento de Patologia da Universidade de Medicina de Nova Iorque, e tornou-se uma linha celular imortalizada, permitindo a sua multiplicação indefinida padronizada. Esta linha celular tem sido regularmente utilizada para estudos de citotoxicidade *in vitro*, uma vez que estas células apresentam inibição de contacto e não são tumorigénicas, propriedades estas similares às células *in vivo* (ATCC, 2014). Vários estudos têm indicado que a resposta citotóxica em linhagens celulares primárias de humanos têm a mesma ordem de classificação que as linhas celulares contínuas (Thonemann, Schmalz, Hiller, & Schweikl, 2002).

As células 3T3 em cultura (figura 3) apresentam uma forma fusiforme com núcleo central e prolongamentos citoplasmáticos.

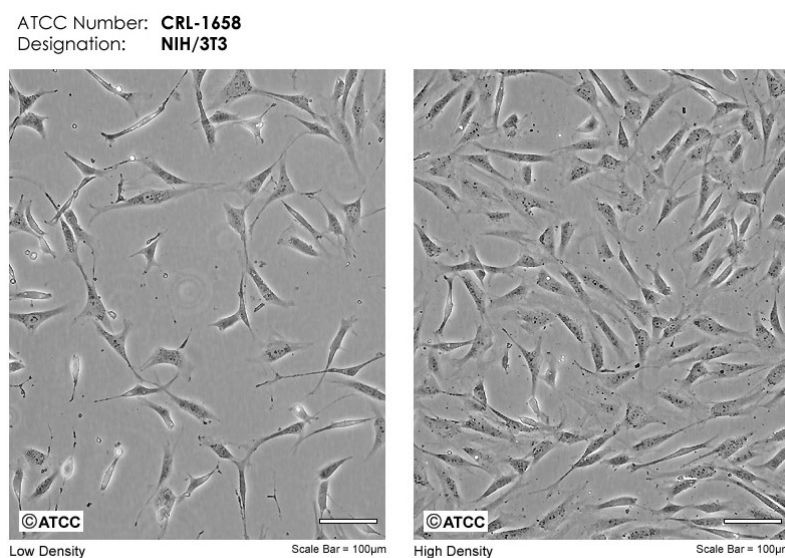


Figura 3 – Células 3T3 observadas ao M.O (ATCC, 2014).

1.2 Reagentes

Os reagentes utilizados nas culturas celulares foram: *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM), filtrado-esterilizado e testado para endotoxinas (Sigma, Reino Unido; ref. D5671); *Bovine Calph Serum* (BCS), filtrado-esterilizado e testado para endotoxinas (Sigma, USA; ref. 12133C); *Non-essential Amino Acid Solution* (MEM) 100x; filtrado-esterilizado e testado para endotoxinas (Gibco, Reino Unido; ref. 11140/035); *Phosphate Buffered Saline* (PBS), 10x pH 7,2 (Gibco, Reino Unido; ref. 70013-016); Solução de Piruvato de Sódio 1mM (PNA) (Gibco, Reino Unido; ref. 11360/039); Solução L-glutamina-penicilina-streptomicina (200mM L-glutamina, 10000 U/ml Penicilina, 10mg/ml Streptomicina) (Pen-Strep-Glut), filtrada-esterilizada (Gibco, Reino Unido; ref. 10378/016); Gentamicina 50mg/ml (Gibco, Reino Unido; ref. 15750/037); Dimetilsulfóxido (DMSO); 99% puro (Merck, EUA; ref. 317275); Tripsina de pâncreas suíno, filtrado-esterilizado, 10x pH 6,4-7,0 (Sigma, Reino Unido; ref. 15090/046); e solução de *Tripan Blue* (0,4%) (Sigma, Reino Unido; ref. T8154). A água utilizada nas diluições do tampão Fosfato foi captada a partir de um sistema de purificação (*Millipore*, França) e autoclavada a 120°C durante 20 minutos.

Os reagentes utilizados nos ensaios de MTT foram: os monómeros metil metacrilato (MMA), trietilenoglicol dimetacrilato (TEGDMA) e dimetacrilato de diuretano (UDMA), (Sigma, Reino Unido; ref. M55909, 261548 e 436909, respectivamente); Dimetilsulfóxido (DMSO); 99% puro (Merck, EUA; ref. 317275); Brometo 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio (MTT), 99% puro (Sigma, Reino Unido; ref. M5655).

1.3 Equipamentos

Para a manipulação celular, foi utilizada uma câmara de fluxo laminar Mars Safety Class 2 (LaboGene, Dinamarca), uma incubadora 2406 SHEL LAB Basic CO² Jacketed Incubator (Hirschmann, Alemanha), um microscópio óptico invertido Axiovert 25 (Zeiss, EUA), uma câmara de Neubauer, modelo 8100104 (Hirschmann, Alemanha) e uma centrífuga modelo 3-16 K (Sigma). Para além dos equipamentos descritos, utilizou-se material de uso comum na manipulação de culturas celulares, como pipetas graduadas, frascos de cultura de 25 cm² (T25), e tubos de centrífuga de 15 e 50 ml, adquiridos comercialmente estéreis (VWR equipment).

Para os ensaios de MTT, foi utilizada a câmara de fluxo laminar e a incubadora, já citadas, bem como o espectrofotómetro de microplacas Model 680 (Bio-Rad, California).

2. Métodos

Todas as técnicas envolvidas no manuseamento das células e respetivos meios foram efetuadas em condições de assepsia, com material estéril, e em câmara de fluxo laminar. Os materiais e reagentes utilizados foram adquiridos comercialmente estéreis, ou foram esterilizados no próprio laboratório através de um processo de esterilização em autoclave a 121°C durante 30 minutos, exceto indicação em contrário. A manipulação das culturas celulares foi sempre efetuada em câmaras de fluxo laminar vertical, sistematicamente desinfetada com etanol a 70%. Proteção adicional foi conferida pela utilização da luz ultravioleta aplicada nas câmaras de fluxo laminar durante sete minutos, antes e após a manipulação das culturas celulares.

2.1 Cultura de células – 3T3 fibroblastos

As células 3T3 estavam guardadas inicialmente em criotubos a -80°C, em 1mL de 80% DMEM suplementado com 10% de soro e 10% de DMSO, tendo sido descongeladas rapidamente, a 37°C. As células foram transferidas para um tubo Falcon e, a estas, adicionou-se 5 mL de DMEM simples. Após centrifugação (3 min., 1000 rpm), o sobrenadante foi descartado e foram adicionados 6 mL de meio de cultura DMEM suplementado. As células foram ressuspensas, transferidas para um frasco de cultura de 25 cm² (T25) e foram incubadas a 37°C, numa atmosfera humidificada com 5% CO².

As células 3T3 foram cultivadas em meio de cultura suplementado (DMEM suplementado com 10% de BCS, 1% de PNA 100 mM, 1% MEM 100x, 1% de solução de Pen-Strep-Glut e 0,1% de gentamicina 50 mg/mL).

A cada 3 dias, foram subcultivadas, dado que as células atingiam uma confluência de cerca de 80-90%, como se confirmava pela observação ao microscópio invertido e pela mudança de cor do meio de cultura. O novo meio de cultura foi previamente aquecido a 37°C no banho, as células foram semeadas a uma densidade menor (de acordo com o que se pretendia) observadas ao microscópio invertido e colocadas na estufa com atmosfera e temperatura controladas onde as células cresciam de novo até atingirem uma confluência de cerca de 80%.

Para congelar as células, utilizou-se as células de um frasco T25 com a confluência de 80%, que, após o tratamento com tripsina, se encontram numa suspensão em meio de cultura, à qual foi adicionado 10% de DMSO e 10% de soro. As células devem ser congeladas lentamente e, para isso, devem ser primeiro colocadas em gelo, depois guardadas a -20°C durante a noite e finalmente armazenadas a -80°C.

2.1.1 Subculturas

O meio de cultura existente no frasco de cultura T25 com as células 3T3 aderentes foi aspirado e as células lavadas duas vezes com PBS 1x (3 mL de tampão fosfato 1x). De seguida, fez-se o tratamento com tripsina (1,5 mL de tripsina 1x) para hidrolisar as proteínas de adesão, possibilitando o destacamento e recolha das células. A tripsinização decorreu na estufa (2-3 min., 37°C), foi verificado ao microscópio se as células tinham descolado e foi adicionado meio de cultura suplementado para parar esta reação (2 vezes o volume de tripsina – 3 mL). As suspensões celulares foram centrifugadas (5 min., 1000 rpm), o sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em meio suplementado novo.

As subculturas foram mantidas em frascos de cultura de 25 cm² com meio de cultura DMEM suplementado e as células foram subcultivadas (passadas) 10 a 15 vezes, o que significa que os testes de viabilidade celular foram realizados quando as células 3T3 tinham entre 10 a 15 passagens.

2.2 Ensaio de Tripán blue

O número de células foi calculado com a ajuda de uma câmara de Neubauer (figura 4), utilizando uma suspensão de células coradas com uma solução de *Tripán blue* (1:1), tendo o número de células por 1 mL sido calculado da seguinte forma:

$$\text{N}^{\circ} \text{ de células/mL} = \frac{\text{n}^{\circ} \text{ de células por quadrante A (4 contagens)}}{4} \times \text{fator de diluição} \times 10^4$$

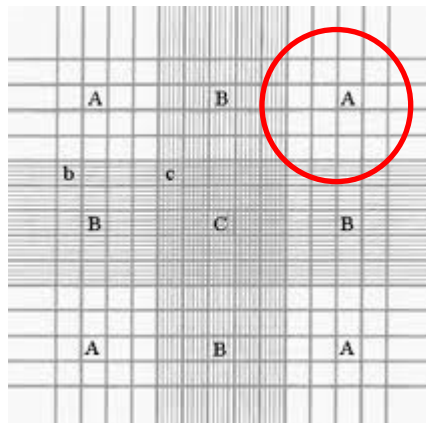


Figura 4 – Câmara de Neubauer (V. N. Gonçalves, 2011).

2.3 Ensaio de redução do MTT

As células 3T3 foram incubadas em meio durante 24 horas, a 37°C numa atmosfera humidificada com 5% CO₂. Ao fim das 24 horas, foi removido o meio e foram adicionados 200 µl de uma solução com o composto eventualmente tóxico que se quer testar e meio de cultura das células. Após as 24h de incubação nas mesmas condições, a solução tóxica/meio foi retirada e foram adicionados 200 µl de uma solução de MTT por poço, numa concentração de 0,5 mg/ml, dissolvido em meio de cultura. A placa foi novamente incubada durante 2 horas. Após a incubação, a solução de MTT foi retirada das placas, por inversão da placa e remoção do líquido por absorção em papel, que, depois de estarem bem secas, adicionou-se 200 µl de DMSO concentrado a cada poço e solubilizou-se muito bem os cristais de MTT formados. As placas foram lidas num leitor de microplacas, num comprimento de onda de 595 nm. Os valores de absorvância dos poços das culturas-controlo, correspondentes às células incubadas em meio de cultura, sem o composto tóxico, corresponde a 100% de viabilidade celular. Aos restantes valores de absorvância obtidos, foi subtraída a absorvância dos poços das culturas-controlo, após solubilização com DMSO. A viabilidade celular foi calculada da seguinte forma:

$$\% \text{ viabilidade celular} = \frac{\text{Absorvância com tóxico}}{\text{Absorvância do controlo}} \times 100$$

2.3.1 Ensaio A – Otimização do número de células

Inicialmente, as células foram cultivadas em placas de 96 poços, com concentrações crescentes de células (1×10^3 , 5×10^3 , 1×10^4 e 2×10^4) em 200 µl de DMEM suplementado por poço, incubadas a 37°C, com uma atmosfera humidificada com 5% CO₂, durante 24 horas, seguindo-se o procedimento descrito anteriormente.

Foram realizados dois ensaios experimentais independentes, com 8 réplicas para cada concentração de células.

2.3.2 Ensaio B – Determinação de toxicidade dos monómeros

As células foram semeadas em placas de 96 poços, a uma concentração de 1×10^4 em 200 µl de meio de cultura por poço, incubadas numa atmosfera a 37°C e humidificada com 5% CO₂, por 24 horas.

Para a obtenção das diferentes concentrações de monómeros, foram feitas soluções-mãe (S1) para cada um, com solução de DMSO 20%, e filtradas através de filtros de

celulose com 0,45 µm de poro. Destas, foram feitas diluições sequenciais (S2 - S6) com solução de DMSO 20%, como descrito na tabela 1. A concentração de DMSO final (no poço) foi de 0,5%.

Tabela 1 – Soluções de monómeros utilizadas no ensaio II.

Monómero	Concentração (mM)	Tóxico (mL)	Sol. 20% DMSO (mL)	Concentração final/poço (mM)
MMA	600 (S1)	0,128	1,872	15
	400 (S2)	0,667 (S1)	1,333	10
	200 (S3)	1,000 (S2)	1,000	5
	40 (S4)	0,400 (S3)	1,600	1
TEGDMA	200 (S1)	0,104	1,896	5
	80 (S2)	0,800 (S1)	1,200	2
	40 (S3)	1,000 (S2)	1,000	1
	20 (S4)	1,000 (S3)	1,000	0,5
	4 (S5)	0,400 (S4)	1,600	0,1
UDMA	40 (S1)	0,0376 g	1,966	1
	24 (S2)	0,802 (S1)	1,198	0,6
	12 (S3)	1,000 (S2)	1,000	0,3
	4 (S4)	0,666 (S3)	1,334	0,1
	2 (S5)	1,000 (S4)	1,000	0,05
	0.4 (S6)	0,400 (S5)	1,600	0,01

Após as 24 horas, o meio que esteve em contacto com as células foi removido e foi adicionado o meio contendo os monómeros a diferentes concentrações.

Para cada concentração de monómeros, foi utilizada 1 coluna, com 8 poços, e, a cada poço com as células aderentes, foi adicionado um volume de 5 µl da solução com tóxico a testar e 195 µl de DMEM suplementado, perfazendo um total de 200 µl de cada, de modo a se obter a concentração final a ser testada. Como controlos, foi feito um branco, um negativo e um positivo, tal como descrito na tabela 2. Foi utilizada 1 coluna, com 8 poços, e, a cada poço com as células aderentes, adicionado um volume total de 200 µl.

Tabela 2 – Soluções de controlo utilizadas no ensaio II.

		DMEM Suplementado (µL)	Solução PBS 1x (µL)	Sol. 20% DMSO (µL)	Etanol absoluto (µL)
Controlo	Branco	195	5	-	-
	Negativo	195	-	5	-
	Positivo	180	-	-	20

Após as 24 horas de incubação com o composto, foram adicionados 200 µl de solução de MTT, como descrito anteriormente, e os valores de absorvância foram lidos no espectrofotómetro.

Foram realizados três ensaios experimentais independentes, cada um com 8 réplicas para cada concentração de monómero.

3. Análise estatística

Toda a análise estatística foi realizada no programa SPSS (Statistical Package for the Social Sciences), versão 23.0 para *Microsoft Windows*.

Os dados obtidos foram objeto de uma análise descritiva e de uma apresentação gráfica.

Os pressupostos de normalidade e de uniformidade de cada uma das variáveis independentes foram validados com testes de Kolmogorov-Smirnov ($p \geq 0,05$ para todos os grupos)

De modo a aferir a existência ou ausência de diferenças significativas entre os resultados obtidos, realizou-se o teste t-student para uma amostra.

RESULTADOS

Ensaio A – Otimização do número de células

No ensaio A, foram semeadas diferentes números de células no mesmo volume de meio de cultura (200µl) para verificar qual o melhor número de células para obter uma redução de MTT constante e com valores de absorvância dentro da lei de Lambert-beer para o comprimento de onda utilizado (595 nm).

Tabela 3 - Valores médios de absorvância (595 nm) referentes ao número de células do inóculo ± desvios padrão após ensaio de redução do MTT.

<i>Número de células do inóculo</i>	<i>Valor médio de absorvância</i>	<i>Desvio-padrão</i>
1×10^3	0,108	0,032
5×10^3	0,315	0,105
1×10^4	0,859	0,226
2×10^4	1,751	0,580

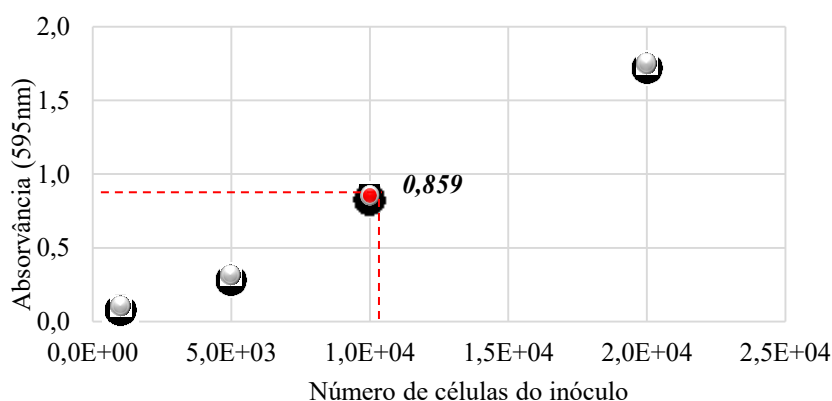


Gráfico 1 - Valores médios de absorvância (595 nm) obtidos através do ensaio do MTT referentes ao número de células do inóculo.

Os valores médios de absorvância estão descritos na tabela 3, tendo sido escolhido o valor de 1×10^4 células por poço nas placas de 96 como número de células para os ensaios de toxicidade (gráfico 1). Para esta quantidade de células, a absorvância obtida, após solubilização dos cristais de formazan, encontra-se próximo de 1.

Ensaio B – Determinação da toxicidade dos monómeros

No ensaio B, foram utilizadas 1×10^4 células por poço incubadas durante 24 horas com diferentes diluições dos monómeros MMA, TEGDMA e UDMA.

Após as 24 horas de incubação das células com os monómeros, realizou-se o ensaio de redução do MTT para quantificar a percentagem de viabilidade celular. Os cristais de

cor púrpura de formazan formados através da metabolização das enzimas desidrogenases mitocondriais das células viáveis foram solubilizados com DMSO e as placas foram lidas por espectrofotometria num comprimento de onda de 595 nm.

Os valores médios de viabilidade celular estão representados na tabela 4.

Tabela 4 – Valores médios de percentagem de viabilidade celular após 24 horas de contacto com as diferentes diluições dos monómeros MMA, TEGDMA e UDMA referente ao ensaio de redução do MTT ± desvio padrão.

<i>Monómero</i>	<i>Concentração (mM)</i>	<i>Percentagem de viabilidade celular (%)</i>
<i>Negativo</i>	-	100,00
<i>Positivo</i>	-	7,38 ± 0,87
<i>MMA</i>	1	112,21 ± 13,12
	5	123,23 ± 25,67
	10	120,86 ± 19,04
	15	109,89 ± 13,77
	0.1	71,99 ± 16,24
<i>TEGDMA</i>	0.5	74,82 ± 6,68
	1	95,47 ± 13,22
	2	109,78 ± 20,69
	5	94,84 ± 17,74
	0,01	69,97 ± 10,16
<i>UDMA</i>	0,05	62,83 ± 25,09
	0,1	77,19 ± 28,67
	0,3	85,96 ± 40,91
	0,6	86,92 ± 21,11
	1	79,74 ± 36,82

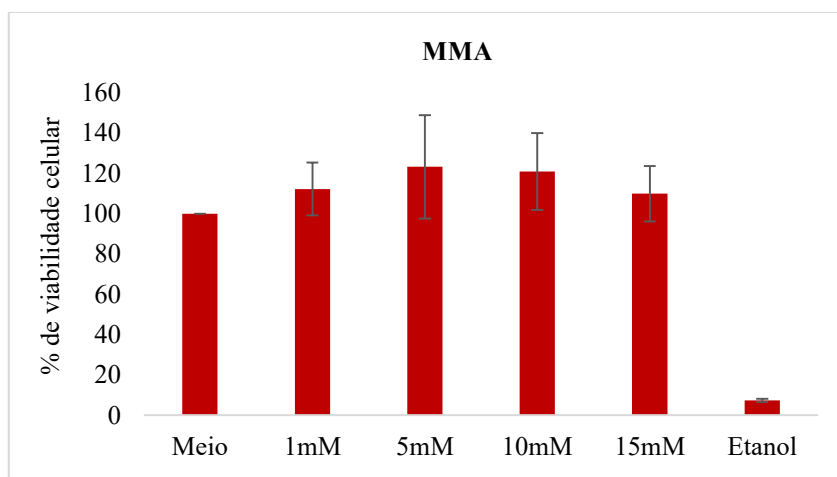


Gráfico 2 - Percentagem de viabilidade celular dos fibroblastos 3T3 após 24 horas de contacto com diferentes concentrações do monómero MMA determinado pelo ensaio de redução do MTT ± desvio padrão.

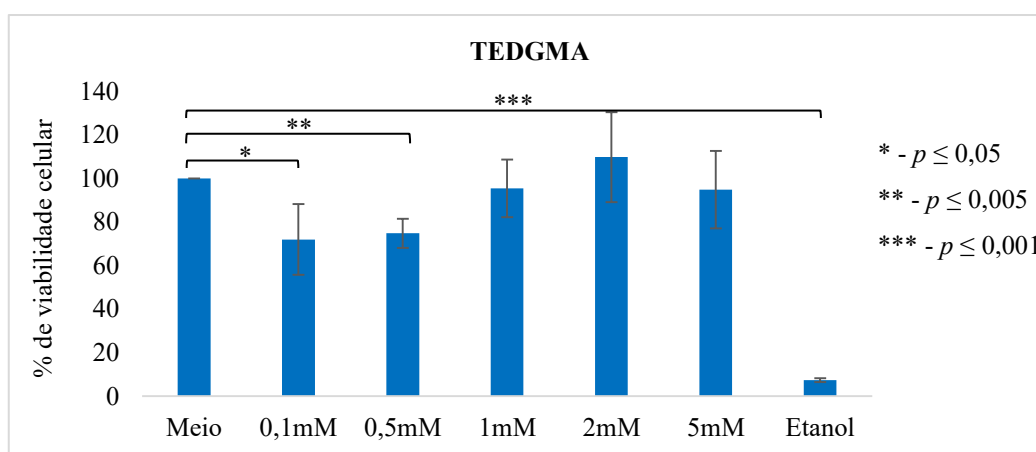


Gráfico 3 - Percentagem de viabilidade celular dos fibroblastos 3T3 após 24 horas de contacto com diferentes concentrações do monómero TEGDMA determinado pelo ensaio de redução do MTT \pm desvio padrão.

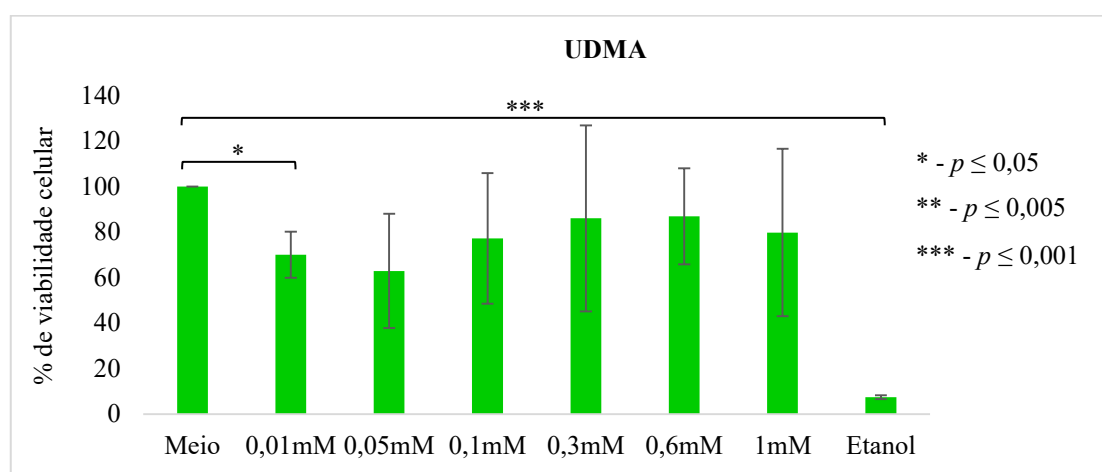


Gráfico 4 - Percentagem de viabilidade celular dos fibroblastos 3T3 após 24 horas de contacto com diferentes concentrações do monómero UDMA determinado pelo ensaio de redução do MTT \pm desvio padrão.

Como controlo de células não expostas (controlo negativo), foram utilizadas células em contacto apenas com 200 μ l de meio de cultura, sem a presença de monómeros, correspondendo a 100% de viabilidade celular.

Pela análise dos valores representados nos gráficos 2, 3 e 4, pode-se concluir que os dois monómeros TEGDMA e UDMA são citotóxicos em contacto com os fibroblastos 3T3, dado que a viabilidade celular é menor que 100%. O monómero MMA não é citotóxico em contacto com os fibroblastos 3T3, visto que a viabilidade celular é maior que 100% em todas as concentrações.

DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

A biocompatibilidade de um material, em Medicina Dentária, é determinada principalmente pela libertação de substâncias, quer por solubilidade quer por corrosão, substâncias estas que, na maioria dos materiais, causam uma reação (por exemplo, inflamação ou necrose) nos tecidos adjacentes (por exemplo, mucosa oral ou osso alveolar). Deste modo, uma grande variedade de diferentes métodos foram desenvolvidos para avaliar o risco de tais danos e assegurar a compatibilidade do material antes da sua comercialização. Contudo, os resultados de tais avaliações dependem não só do material testado, mas também do método de ensaio utilizado (Schmalz, 2009; Schmalz & Arenholt-Bindslev, 2009).

As células em cultura são utilizadas para a avaliação da biocompatibilidade de diferentes materiais para a realização de ensaios *in vitro*. Dentro destes ensaios *in vitro*, os testes citotóxicos são rápidos e simples, padronizados, capazes de produzir dados quantitativos e comparáveis, e adequados para avaliação do comportamento biológico em relação aos materiais dentários e/ou dos seu componentes. A citotoxicidade pode ser determinada utilizando o ensaio colorimétrico do MTT, o qual indicará o número de células viáveis e o nível de atividade metabólica celular numa amostra (Jorge et al., 2004; Vitral et al., 2008).

Neste estudo, foi testado o efeito citotóxico de três monómeros (MMA, TEGDMA e UDMA), presentes em resinas utilizadas na elaboração de coroas dentárias provisórias (Tab 2000®, da Kerr; Protemp 4TM, da 3M ESPE; e Structur 3®, da VOCO), que na cavidade oral estão em contacto com fibroblastos gengivais, tendo sido utilizado o ensaio de redução do MTT.

Após revisão bibliográfica, concluiu-se que não existem estudos publicados onde tenham sido testada a citotoxicidade dos monómeros utilizados neste trabalho nas mesmas condições experimentais que nós, ou seja, utilizando a linha celular permanente 3T3-NHI. Por esta razão, não é possível comparar os valores nominais obtidos neste estudo com valores obtidos noutros estudos.

Apesar de vários estudos utilizarem células primárias humanas em estudos de citotoxicidade de extratos de resinas e de monómeros puros, a escolha de fibroblastos da linhagem NHI/3T3 neste estudo justifica-se por estes representarem um tipo celular aceite

para estudos de citotoxicidade dos materiais, uma vez que pertencem a uma linha celular permanente, de fácil proliferação, de comportamento conhecido, consistente e constante (Chang et al., 2012; Chang et al., 2014; Gonçalves, Schmitt, Thomas, Souza, & Menezes, 2008; Lai, Chen, Lee, Shieh, & Hung, 2004; Lee et al., 2009; Yang et al., 2003).

Após análise estatística, verificou-se que os monómeros TEGDMA e UDMA são citotóxicos para os fibroblastos gengivais apenas em determinadas concentrações. No entanto, não foi possível indicar qual dos monómeros provocou maior diminuição da viabilidade celular, dada a grande variabilidade de resultados obtidos.

De modo a se poder verificar qual o número de células apropriado para este estudo, foi feito um primeiro ensaio para otimizar o número de células. O objetivo deste ensaio é de obter-se uma confluência das células de cerca de 80 - 100% nos poços controle das placas de 96 no dia em que se adiciona o MTT, para que o valor de absorvância dos controles (células não expostas) correspondam ao máximo de viabilidade celular e esteja dentro dos critérios da lei de Lambert-beer (proporcional ao número de células viáveis). O número de células escolhido para o ensaio seguinte foi de 1×10^4 células por poço das placas de 96.

Foram realizados vários ensaios para otimizar as condições experimentais com o objetivo de se obter um protocolo que levasse a resultados consistentes. Ao longo destes, houve dificuldade em solubilizar totalmente os monómeros nas soluções-mãe, quer em apenas em DMEM suplementado, quer apenas em PBS 1x. Por isso, optou-se por seguir a indicação da ISO para este tipo de problemática e as soluções-mãe dos monómeros foram elaborados com DMSO.

A nível de resultados propriamente ditos, verificou-se que os monómeros TEGDMA e UDMA utilizados neste estudo são citotóxicos para os fibroblastos gengivais e que o monómero MMA não. No entanto, não foi possível verificar se os monómeros têm um efeito dose-dependente, ou seja, um aumento da concentração dos monómeros em contato com os fibroblastos não leva a uma diminuição da sua taxa de sobrevivência celular.

Na realidade, nos ensaios efetuados ocorreram problemas experimentais dado que as células nos controlos negativos, onde apenas foi adicionado às células DMSO em DMEM suplementado, apresentaram uma viabilidade celular inferior às células expostas às diferentes concentrações de MMA e à concentração 2 mM de TEGDMA.

De acordo com a norma ISO 10993-5 (2009), o grau de citotoxicidade dos materiais é classificada da seguinte maneira: não-citotóxicos quando a viabilidade celular é maior que 75%; ligeiramente citotóxico entre 50 a 75%; moderadamente citotóxico entre 25 e 50%; e altamente citotóxico quando é menor que 25% (ISO, 2009).

Observando os resultados obtidos neste trabalho, o monómero TEGDMA é classificado como ligeiramente citotóxico nas concentrações 0,1 e 0,5 mM, com percentagens de viabilidade de 71,99 ($p \leq 0,05$) e 74,82 % ($p \leq 0,005$), respetivamente, mas não citotóxico a concentrações superiores, o que contraria os resultados publicados anteriormente. No caso do monómero UDMA, este é também classificado como ligeiramente citotóxico na concentração 0,01 mM, com percentagem de viabilidade de 69,97 % ($p \leq 0,05$), mas não citotóxico a concentrações superiores, o que também não era expectável.

Alguns estudos realizados para pesquisar o efeito citotóxico de monómeros que frequentemente estão presentes na composição de resinas observam uma relação direta entre a sua concentração e o grau de citotoxicidade (Chang et al., 2012; Chang et al., 2014; Lee et al., 2009; Yang et al., 2003). Contrariamente a estes, não se verificou um efeito dose-dependente com todos os monómeros deste estudo.

Yang *et al.* (2003) demonstrou haver efeitos citotóxicos para concentrações do monómero MMA tão baixas como $9,32 \times 10^{-7}$ mM, o que contraria a ausência de citotoxicidade em todos os ensaios neste presente estudo (1 – 15 mM), pois não há evidência de que haja diferença na viabilidade celular entre a ausência de tóxico e as células expostas às diferentes concentrações do monómero.

Este monómero é conhecido pela sua volatilidade, o que poderá estar na base desta ausência de citotoxicidade (Kedjarune, Charoenworaluk, & Koontongkaew, 1999; Pemberton & Lohmann, 2014). Na elaboração dos ensaios e durante a colocação dos monómeros nos poços já com células aderentes, este passo do protocolo requereu cerca de 40 minutos para preencher 96 poços de apenas uma placa. Se o monómero for colocado nas primeiras fileiras de poços e seguido pela colocação de outro monómero nas restantes e posteriores fileiras, parte do monómero poder-se-á ter volatilizado nestas circunstâncias, bem como durante todo o ensaio de MTT na estufa, o que provocaria uma grande diminuição da concentração de MMA nos poços para níveis não citotóxicos. Tal, explicaria a ausência de citotoxicidade pelo monómero. Outra questão que surge com este monómero foi o facto de se ter obtido um controlo negativo com percentagem de viabilidade

celular inferior à das células expostas. Gonçalves *et al* (2008) descreve um fenómeno similar, quando observou uma menor viabilidade celular nas células expostas por 24 horas do que nas células do controlo negativo, mas uma maior viabilidade celular nas células expostas por 48 horas que o controlo negativo. O autor refere que tal fenómeno poderá derivar de um comportamento de sobreconfluência nas células 3T3-NIH e que este conduzirá à apoptose, resultando num menor número de células viáveis nos controlos do que nas células expostas.

No caso do monómero TEGDMA, Lee *et al.* (2009) e Chang *et al.* (2012) observaram efeitos citotóxicos a partir de concentrações que diferem entre os autores (0,1 e 1 mM, respetivamente). Os resultados deste presente trabalho vão de encontro aos resultados obtido por Lee *et al.* (2009) apenas para as concentrações 0,1 e 0,5 mM, pois não há evidência de que a viabilidade celular seja diferente entre a ausência de tóxico e as células expostas a concentrações superiores do monómero.

Tal como anteriormente referido, a diferença entre os valores obtidos pelos diferentes autores pode ser resultado das diversas atividades metabólicas nos diferentes tipos de células, uma vez que Chang *et al.* (2012) utiliza células de polpa dentária humana e Lee *et al.* (2009) utiliza fibroblastos pulmonares V79-4 e a linha de células clonadas RPC-C2A. Embora os resultados do ensaio de MTT estejam geralmente relacionados com o número de células viáveis, a taxa de redução de MTT reflète a atividade metabólica geral ou a taxa de produção de NADH glicolítico, variável com as condições de cultura (por exemplo, pH e conteúdo de glucose do meio) e o estado fisiológico das células (Berridge & Tan, 1993; Berridge, Herst, & Tan, 2005). As discrepâncias verificadas nos resultados deste trabalho provavelmente refletem um mau estado fisiológico das células, que não se deteta pela simples observação ao microscópio ótico.

No caso do UDMA, observou-se um efeito citotóxico apenas na concentração de 0,01 mM, concentração esta inferior à concentração mais baixa a provocar citotoxicidade no estudo de Chang *et al* (2014) (0,025 – 0,35mM).

Sobre a ausência da relação dose-efeito, este facto poderá dever-se a falhas técnicas, a alterações na linha celular utilizada e à dificuldade na solubilização dos monómeros e filtração das soluções.

Durante um processo analítico, podem ocorrer diversas falhas técnicas, as quais poderão influenciar os resultados, nomeadamente obtenção de resultados heterogéneos.

Neste trabalho, verificou-se essa heterogeneidade e não linearidade entre a viabilidade celular e as concentrações dos monómeros, podendo dever-se a erros de pipetagem.

No início do desenvolvimento do ensaio de MTT com Mosmann (1983), acreditava-se na ideia de que as "propriedades observadas são todas consistentes apenas com a clivagem do MTT por mitocôndrias ativas", onde o envolvimento direto da enzima succinato desidrogenase se baseou no trabalho inicial com inibidores que atuam em locais seletivos na cadeia de transporte de elétrons mitocondrial (Altman, 1976). No entanto, estudos mais recentes sobre o local de redução do MTT contestaram a ideia de que o MTT é sempre reduzido nas mitocôndrias, indicando que o NADH é responsável pela maior parte da redução do MTT e que este está associado não apenas às mitocôndrias, mas também ao citoplasma, às membranas no compartimento endossoma/lisossoma e à membrana plasmática (Bernas & Dobrucki, 2002; Berridge & Tan, 1993; Berridge et al., 2005). Ora, se as mitocôndrias não são a única fonte de redução do MTT, este fato torna-se numa limitação do método utilizado, pondo em causa a suposta relação direta entre o número de células vivas e a concentração de formazan formado após contacto das células expostas ao composto tóxico.

Outra questão é a alteração da linha celular utilizada. Tal como supõe Riss *et al.* (2004) no seu estudo, a possibilidade de haver condições de cultura adversas, como, por exemplo, o pH alterado, a depleção de nutrientes essenciais (por exemplo, a glicose) ou mesmo a presença de microrganismos (por exemplo, micoplasma), poderá ter alterado a capacidade das células para reduzir MTT, levando também à perda de linearidade entre a absorvância e o número de células viáveis.

Observou-se que, quando se fizeram as soluções-stock para os três monómeros deste estudo, houve sempre dificuldade em solubilizar totalmente os três monómeros, tanto quando solubilizados com uma solução de PBS 1x como com uma solução de DMSO 20%. Dos estudos analisados, esta problemática nunca é colocada pelos autores. Observa-se que alguns autores utilizam a indicação da norma ISO na utilização de DMSO 0,5% como solvente dos monómeros, mas mais nenhum outro detalhe/dificuldade é facultado. Assim, se o monómero não for bem solubilizado, a concentração calculada não será a utilizada para nos ensaios e a citotoxicidade não poderá ser classificada de um modo correto. Dos valores obtidos, o maior grau de citotoxicidade é observado em concentrações mais baixas, diminuindo à medida que aumenta a concentração do monómero, podendo tal dever-se ao facto de ser mais fácil a solubilização de compostos em soluções menos concentradas do em soluções mais concentradas.

Para além de não se ter solubilizado completamente os monómeros, também a filtração das soluções poderão ter interferido com os resultados finais. Se parte do monómero se encontra em suspensão numa solução, a filtração desta solução irá remover essa porção do monómero e a sua concentração em contato com as células será muito menor, impossibilitando obter resultados fiáveis nos ensaios.

CONCLUSÃO

Perante os resultados obtidos neste estudo e tendo em conta as limitações associadas a este, pode-se aceitar a hipótese alternativa: há diferenças nos graus de citotoxicidade dos fibroblastos da linha celular 3T3 de murganho quando em contacto com os monómeros.

- Os fibroblastos da linha celular 3T3 de murganho são sensíveis a determinadas concentrações dos monómeros TEGDMA (0,1 e 0,5 mM) e UDMA (0,01 mM).
- O monómero MMA não apresentou nenhum grau de citotoxicidade.
- Não há evidência da diferença de percentagem de viabilidade celular na variação da concentração dos MMA, TEGDMA e UDMA, não tendo sido possível verificar se os monómeros têm um efeito dose-dependente sobre a viabilidade celular.

Deverão ser feitos mais ensaios com o objetivo de se obter uma maior significância nos resultados de citotoxicidade induzidos por estes monómeros, bem como avaliar outros monómeros e outros constituintes de resinas dentárias, quer isolados, quer agrupados. A utilização de outras linhas celulares deve também ser considerada, nomeadamente a linha celular L-929, assinaladas pela ISO.

BIBLIOGRAFIA

- Altintas, S. H., Yondem, I., Tak, O., & Usumez, A. (2008). Temperature rise during polymerization of three different provisional materials. *Clinical Oral Investigations*, 12(3), 283–286. <http://doi.org/10.1007/s00784-007-0163-7>
- Altman, F. P. (1976). *Tetrazolium Salts and Formazans* (Vol. 9). Stuttgart: Gustav Fischer Verlag. [http://doi.org/10.1016/S0079-6336\(76\)80015-0](http://doi.org/10.1016/S0079-6336(76)80015-0)
- American Type Culture Collection. (2016). MCF 10A (ATCC® CRL-10317™). Retrieved November 12, 2015, from <https://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/CRL-1658.aspx>
- Anusavice, K. J. (2012). Biocompatibility. In K. J. Anusavice, C. Shen, & H. R. Rawls (Eds.), *Phillips' Science of Dental Materials* (12th ed., pp. 111–147). St. Luis, Missouri: Elsevier.
- Ayuso-Montero, R., Martinez-Gomis, J., Lujan-Climent, M., Salsench, J., & Peraire, M. (2009). Influence of matrix type on surface roughness of three resins for provisional crowns and fixed partial dentures. *Journal of Prosthodontics*, 18(2), 141–144. <http://doi.org/10.1111/j.1532-849X.2008.00392.x>
- Balkenhol, M., Ferger, P., Mautner, M. C., & Wöstmann, B. (2007). Provisional crown and fixed partial denture materials: Mechanical properties and degree of conversion. *Dental Materials*, 23(12), 1574–1583. <http://doi.org/10.1016/j.dental.2007.06.024>
- Balkenhol, M., Knapp, M., Ferger, P., Heun, U., & Wöstmann, B. (2008). Correlation between polymerization shrinkage and marginal fit of temporary crowns. *Dental Materials*, 24(11), 1575–1584. <http://doi.org/10.1016/j.dental.2008.07.001>
- Balkenhol, M., Mautner, M. C., Ferger, P., & Wöstmann, B. (2008). Mechanical properties of provisional crown and bridge materials: Chemical-curing versus dual-curing systems. *Journal of Dentistry*, 36(1), 15–20. <http://doi.org/10.1016/j.jdent.2007.10.001>
- Bayindir, F., Kürklü, D., & Yanikoğlu, N. D. (2012). The effect of staining solutions on the color stability of provisional prosthodontic materials. *Journal of Dentistry*, 40(Suppl.2), e41–e46. <http://doi.org/10.1016/j.jdent.2012.07.014>
- Becher, R., Kopperud, H. M., Al, R. H., Samuelsen, J. T., Morisbak, E., Dahlman, H. J., ... Dahl, J. E. (2006). Pattern of cell death after in vitro exposure to GDMA, TEGDMA, HEMA and two compomer extracts. *Dental Materials*, 22(7), 630–640. <http://doi.org/10.1016/j.dental.2005.05.013>

- Bernas, T., & Dobrucki, J. (2002). Mitochondrial and nonmitochondrial reduction of MTT: Interaction of MTT with TMRE, JC-1, and NAO mitochondrial fluorescent probes. *Cytometry*, 47(4), 236–242. <http://doi.org/10.1002/cyto.10080>
- Berridge, M. V., & Tan, A. S. (1993). Characterization of the Cellular Reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): Subcellular Localization, Substrate Dependence, and Involvement of Mitochondrial Electron Transport in MTT Reduction. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 303(2), 474–482. <http://doi.org/10.1006/abbi.1993.1311>
- Berridge, M. V., Herst, P. M., & Tan, A. S. (2005). Tetrazolium dyes as tools in cell biology: New insights into their cellular reduction. In *Biotechnology Annual Review* (Vol. 11, pp. 127–152). [http://doi.org/10.1016/S1387-2656\(05\)11004-7](http://doi.org/10.1016/S1387-2656(05)11004-7)
- Bettencourt, A. F., Neves, C. B., de Almeida, M. S., Pinheiro, L. M., Oliveira, S. A. E., Lopes, L. P., & Castro, M. F. (2010). Biodegradation of acrylic based resins: A review. *Dental Materials*, 26(5), e171–e180. <http://doi.org/10.1016/j.dental.2010.01.006>
- Borzangy, S., Labban, N., & Windsor, L. J. (2013). Effects of interim acrylic resins on the expression of cytokines from epithelial cells and on collagen degradation. *The Journal of Prosthetic Dentistry*, 110(4), 296–302. [http://doi.org/10.1016/S0022-3913\(13\)60379-0](http://doi.org/10.1016/S0022-3913(13)60379-0)
- Burns, D. R., Beck, D. A., & Nelson, S. K. (2003). A review of selected dental literature on contemporary provisional fixed prosthodontic treatment: Report of the Committee on Research in Fixed Prosthodontics of the Academy of Fixed Prosthodontics. *The Journal of Prosthetic Dentistry*, 90(5), 474–497. <http://doi.org/10.1016/S0022391303002592>
- Catrau, M. (2015). *Caracterização dos monómeros de diferentes resinas por HPLC*. Instituto Superior de Ciências da Saúde Egas Moniz.
- Chang, H.-H., Chang, M.-C., Huang, G.-F., Wang, Y.-L., Chan, C.-P., Wang, T.-M., ... Jeng, J.-H. (2012). Effect of triethylene glycol dimethacrylate on the cytotoxicity, cyclooxygenase-2 expression and prostanooids production in human dental pulp cells. *International Endodontic Journal*, 45(9), 848–858. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2591.2012.02042.x>.
- Chang, H.-H., Chang, M.-C., Wang, H.-H., Huang, G.-F., Lee, Y.-L., Wang, Y.-L., ... Jeng, J.-H. (2014). Urethane dimethacrylate induces cytotoxicity and regulates cyclooxygenase-2, hemeoxygenase and carboxylesterase expression in human

- dental pulp cells. *Acta Biomaterialia*, 10(2), 722–731.
<http://doi.org/10.1016/j.actbio.2013.10.006>
- Donaldson, D. (1973). Gingival Recession Associated With Temporary Crowns. *Journal of Periodontology*, 44(11), 691–696. <http://doi.org/10.1902/jop.1973.44.11.691>
- Doyle, A., & Bryan Griffiths, J. (Eds.). (1998). MTT Assay. In *Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures in Biotechnology* (pp. 62–64). Chichester: John Wiley & Sons Ltd. Retrieved from <http://elibrary.kiu.ac.ug:8080/jspui/handle/123456789/1948>
- Durner, J., Wellner, P., Hickel, R., & Reichl, F. X. (2012). Synergistic interaction caused to human gingival fibroblasts from dental monomers. *Dental Materials*, 28(8), 818–823. <http://doi.org/10.1016/j.dental.2012.04.031>
- Emmler, J., Seiss, M., Kreppel, H., Reichl, F. X., Hickel, R., & Kehe, K. (2008). Cytotoxicity of the dental composite component TEGDMA and selected metabolic by-products in human pulmonary cells. *Dental Materials*, 24(12), 1670–1675. <http://doi.org/10.1016/j.dental.2008.04.001>
- Floyd, C. J. E., & Dickens, S. H. (2006). Network structure of Bis-GMA- and UDMA-based resin systems. *Dental Materials*, 22(12), 1143–1149. <http://doi.org/10.1016/j.dental.2005.10.009>
- 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*, 100B(5), 1444–1450. <http://doi.org/10.1002/jbm.b.32673>
- Geurtsen, W., Lehmann, F., Spahl, W., & Leyhausen, G. (1998). Cytotoxicity of 35 dental resin composite monomers/additives in permanent 3T3 and three human primary fibroblast cultures. *Journal of Biomedical Materials Research*, 41(3), 474–480. [http://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4636\(19980905\)41:3<474::AID-JBM18>3.0.CO;2-I](http://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4636(19980905)41:3<474::AID-JBM18>3.0.CO;2-I)
- Gonçalves, F., Kawano, Y., Pfeifer, C., Stansbury, J. W., & Braga, R. R. (2009). Influence of BisGMA, TEGDMA, and BisEMA contents on viscosity, conversion, and flexural strength of experimental resins and composites. *European Journal of Oral Sciences*, 117(4), 442–446. <http://doi.org/10.1111/j.1600-0722.2009.00636.x>
- Gonçalves, T. S., Schmitt, V. M., Thomas, M., Souza, M. A. L. de, & Menezes, L. M. de. (2008). Cytotoxicity of Two Autopolymerized Acrylic Resins Used in Orthodontics. *The Angle Orthodontist*, 78(5), 926–930. <http://doi.org/10.2319/072407-343.1>

- Gonçalves, V. N. (2011). Técnica de Câmara de Neubauer. Retrieved October 7, 2016, from <http://www.ebah.pt/content/ABAAAezrAAC/tecnica-camara-neubauer>
- ISO. (2009). ISO 10993-5. Suíça: ISO. Retrieved from [http://matsec.ustb.edu.cn/downloadpdf.do?path=bioevaluationstandard&filename=ISO 10993-5-2009.pdf](http://matsec.ustb.edu.cn/downloadpdf.do?path=bioevaluationstandard&filename=ISO%2010993-5-2009.pdf)
- Jorge, J. H., Giampaoli, E. T., & Pavarina, A. C. (2004). Citotoxicidade dos materiais dentários. Revisão de literatura. *Revista de Odontologia Da UNESP*, 33(2), 65–68. Retrieved from <http://www.revodontolunesp.com.br/files/v33n2/v33n2a03.pdf>
- Kedjarune, U., Charoenworoluk, N., & Koontongkaew, S. (1999). Release of methyl methacrylate from heat-curved and autopolymerized resins: Cytotoxicity testing related to residual monomer. *Australian Dental Journal*, 44(1), 25–30. <http://doi.org/10.1111/j.1834-7819.1999.tb00532.x>
- Kerby, R. E., Knobloch, L. a., Sharples, S., & Peregrina, A. (2013). Mechanical properties of urethane and bis-acryl interim resin materials. *The Journal of Prosthetic Dentistry*, 110(1), 21–28. [http://doi.org/10.1016/S0022-3913\(13\)60334-0](http://doi.org/10.1016/S0022-3913(13)60334-0)
- Kim, S. (2004). Exotherm behavior of the polymer-based provisional crown and fixed partial denture materials. *Dental Materials*, 20(4), 383–387. <http://doi.org/10.1016/j.dental.2003.11.001>
- Kim, S. H., & Watts, D. C. (2004). Polymerization shrinkage-strain kinetics of temporary crown and bridge materials. *Dental Materials*, 20(1), 88–95. [http://doi.org/10.1016/S0109-5641\(03\)00101-5](http://doi.org/10.1016/S0109-5641(03)00101-5)
- Kim, S., & Watts, D. C. (2007). In vitro study of edge-strength of provisional polymer-based crown and fixed partial denture materials. *Dental Materials*, 23(12), 1570–1573. <http://doi.org/10.1016/j.dental.2007.06.023>
- Konstantinidis, I., Kotsakis, G., Pallis, K., & Walter, M. H. (2013). A novel technique for the direct fabrication of fixed interim restorations. *The Journal of Prosthetic Dentistry*, 109(3), 198–201. [http://doi.org/10.1016/S0022-3913\(13\)60044-X](http://doi.org/10.1016/S0022-3913(13)60044-X)
- Krifka, S., Spagnuolo, G., Schmalz, G., & Schweikl, H. (2013). A review of adaptive mechanisms in cell responses towards oxidative stress caused by dental resin monomers. *Biomaterials*, 34(19), 4555–4563. <http://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.03.019>
- Kronek, J., Paulovicova, E., Paulovicova, L., Kronekova, Z., & Lusto, J. (2013). Biocompatibility and Immunocompatibility Assessment of Poly(2-Oxazolines). In A. O. Andrade, A. A. Pereira, E. L. M. Naves, & A. B. Soares (Eds.), *Practical*

- Applications in Biomedical Engineering* (pp. 257–284). InTech.
<http://doi.org/10.5772/51501>
- Labban, N., Song, F., Al-Shibani, N., & Windsor, L. J. (2008). Effects of provisional acrylic resins on gingival fibroblast cytokine/growth factor expression. *The Journal of Prosthetic Dentistry*, *100*(5), 390–397. [http://doi.org/10.1016/S0022-3913\(08\)60242-5](http://doi.org/10.1016/S0022-3913(08)60242-5)
- Laboratories, M. (2014). Cytotoxicity / Cell Culture / Cell Line Generation. Retrieved October 25, 2016, from <http://microqa.com/laboratories/molecular-cell-biology-virology-testing/cytotoxicity-cell-culture-cell-line/>
- Lai, Y.-L., Chen, Y.-T., Lee, S.-Y., Shieh, T.-M., & Hung, S.-L. (2004). Cytotoxic effects of dental resin liquids on primary gingival fibroblasts and periodontal ligament cells in vitro. *Journal of Oral Rehabilitation*, *31*(12), 1165–1172. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2842.2004.01355.x>
- Lee, D. H., Kim, N. R., Lim, B.-S., Lee, Y.-K., & Yang, H.-C. (2009). Effects of TEGDMA and HEMA on the expression of COX-2 and iNOS in cultured murine macrophage cells. *Dental Materials*, *25*(2), 240–246. <http://doi.org/10.1016/j.dental.2008.05.014>
- Lee, D. H., Lim, B.-S., Lee, Y.-K., Ahn, S.-J., & Yang, H.-C. (2006). Involvement of oxidative stress in mutagenicity and apoptosis caused by dental resin monomers in cell cultures. *Dental Materials*, *22*(12), 1086–1092. <http://doi.org/10.1016/j.dental.2005.09.002>
- Lee, S., Lai, Y., & Hsu, T. (2002). Influence of polymerization conditions on monomer elution and microhardness of autopolymerized polymethyl methacrylate resin. *European Journal of Oral Sciences*, *110*(2), 179–183. <http://doi.org/10.1034/j.1600-0722.2002.11232.x>
- Leggat, P. A., & Kedjarune, U. (2003). Toxicity of methyl methacrylate in dentistry. *International Dental Journal*, *53*(3), 126–131. <http://doi.org/10.1111/j.1875-595X.2003.tb00736.x>
- Lemon, M. T., Jones, M. S., & Stansbury, J. W. (2007). Hydrogen bonding interactions in methacrylate monomers and polymers. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, *83A*(3), 734–746. <http://doi.org/10.1002/jbm.a.31448>
- Lepe, X., Bales, D. J., & Johnson, G. H. (1999). Retention of provisional crowns fabricated from two materials with the use of four temporary cements. *The Journal of Prosthetic Dentistry*, *81*(4), 469–475. <http://doi.org/10.1016/S0022->

3913(99)80016-X

- Luís, A. R. (2014). *Estudo in vitro do grau de citotoxicidade de resinas acrílicas usadas na confecção de coroas provisórias*. Instituto Superior de Ciências da Saúde Egas Moniz.
- Luthardt, R. G., Stöbel, M., Hinz, M., & Vollandt, R. (2000). Clinical performance and periodontal outcome of temporary crowns and fixed partial dentures: A randomized clinical trial. *Journal of Prosthetic Dentistry*, 83(1), 32–39. [http://doi.org/10.1016/S0022-3913\(00\)70086-2](http://doi.org/10.1016/S0022-3913(00)70086-2)
- Mathur, S., Shah, A., Makwana, R., Shah, M., Shah, A., & Jatha, N. (2013). Provisional Restorative Materials In Fixed Prosthodontics: A Comprehensive Review. *BUJOD*, 3(3), 49–57. Retrieved from [http://www.bujod.in/sep2013/BUJOD 2013-sept-8.pdf](http://www.bujod.in/sep2013/BUJOD%2013-sept-8.pdf)
- Michalakis, K., Pissiotis, A., Hirayama, H., Kang, K., & Kafantaris, N. (2006). Comparison of temperature increase in the pulp chamber during the polymerization of materials used for the direct fabrication of provisional restorations. *The Journal of Prosthetic Dentistry*, 96(6), 418–423. <http://doi.org/10.1016/j.prosdent.2006.10.005>
- Moharamzadeh, K., Brook, I. M., & Van Noort, R. (2009). Biocompatibility of Resin-based Dental Materials. *Materials*, 2(2), 514–548. <http://doi.org/10.3390/ma2020514>
- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 65(1–2), 55–63. [http://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](http://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4)
- Patras, M., Naka, O., Doukoudakis, S., & Pissiotis, A. (2012). Management of Provisional Restorations' Deficiencies: A Literature Review. *Journal of Esthetic and Restorative Dentistry*, 24(1), 26–38. <http://doi.org/10.1111/j.1708-8240.2011.00467.x>
- Pemberton, M. A., & Lohmann, B. S. (2014). Risk Assessment of residual monomer migrating from acrylic polymers and causing Allergic Contact Dermatitis during normal handling and use. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 69(3), 467–475. <http://doi.org/10.1016/j.yrtph.2014.05.013>
- Peutzfeldt, A. (1997). Resin composites in dentistry: the monomer systems. *European Journal of Oral Sciences*, 105(2), 97–116. <http://doi.org/10.1111/j.1600-0722.1997.tb00188.x>
- Poonacha, V., Poonacha, S., Salagundi, B., & Raghavan, R. (2013). In vitro comparison of flexural strength and elastic modulus of three provisional crown materials used in

- fixed prosthodontics. *Journal of Clinical and Experimental Dentistry*, 5(5), e212-217. <http://doi.org/10.4317/jced.51136>
- Pourabbas, R., Farajnia, S., Kimyai, S., Mohammadnejad, L., Johnson, A., & Nejatian, T. (2009). In vitro assessment of cytotoxicity of giomer on human gingival fibroblasts. *African Journal of Biotechnology*, 8(20). <http://doi.org/10.5897/AJB09.1149>
- Rakhshan, V. (2015). Marginal integrity of provisional resin restoration materials: A review of the literature. *The Saudi Journal for Dental Research*, 6(1), 33–40. <http://doi.org/10.1016/j.sjdr.2014.03.002>
- Reichl, F.-X., Löhle, J., Seiss, M., Furche, S., Shehata, M. M., Hickel, R., ... Durner, J. (2012). Elution of TEGDMA and HEMA from polymerized resin-based bonding systems. *Dental Materials*, 28(11), 1120–1125. <http://doi.org/10.1016/j.dental.2012.06.010>
- Riss, T. L., Moravec, R. A., Niles, A. L., Duellman, S., Benink, H. A., Worzella, T. J., & Minor, L. (2004). Cell Viability Assays. In G. S. Sittampalam, N. P. Coussens, H. Nelson, M. Arkin, D. Auld, C. Austin, ... J. Weidner (Eds.), *Assay Guidance Manual*. Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK144065/>
- Rogero, S. O., Lugão, A. B., Ikeda, T. I., & Cruz, Á. S. (2003). Teste in vitro de citotoxicidade: estudo comparativo entre duas metodologias. *Materials Research*, 6(3), 317–320. <http://doi.org/10.1590/S1516-14392003000300003>
- Schillinburg, H. T., Sather, D. A., Wilson, E. L., Cain, J. R., Mitchell, D. L., Blanco, L. J., & Kessler, J. C. (2012). *Fundamentals of Fixed Prosthodontics*. (and W. Chicago, Berlin, Tokyo, London, Paris, Milan, Barcelona, Istanbul, Moscow, New Delhi, São Paulo, Ed.) (4th ed.). Quintessence Publishing Co, Inc.
- Schmalz, G. (2009). Determination of Biocompatibility. In G. Schmalz & D. Arenholt-Bindslev (Eds.), *Biocompatibility of Dental Materials* (pp. 13–43). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. http://doi.org/10.1007/978-3-540-77782-3_2
- Schmalz, G., & Arenholt-Bindslev, D. (2009). Basic Aspects. In G. Schmalz & D. Arenholt-Bindslev (Eds.), *Biocompatibility of Dental Materials* (pp. 1–12). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. http://doi.org/10.1007/978-3-540-77782-3_1

- Schweikl, H., Spagnuolo, G., & Schmalz, G. (2006). Genetic and Cellular Toxicology of Dental Resin Monomers. *Journal of Dental Research*, 85(10), 870–877. <http://doi.org/10.1177/154405910608501001>
- Sham, a. S. K., Chu, F. C. S., Chai, J., & Chow, T. W. (2004). Color stability of provisional prosthodontic materials. *Journal of Prosthetic Dentistry*, 91(5), 447–452. <http://doi.org/10.1016/j.prosdent.2004.03.005>
- Sideridou, I. D., & Papanastasiou, G. E. (2008). Sorption of binary liquid mixtures in methacrylate-based biomaterials; Simultaneous determination of the diffusion coefficients and the uptake fraction at equilibrium of the components of ethanol-water mixtures by a new iterative method. *Journal of Applied Polymer Science*, 107(2), 1047–1056. <http://doi.org/10.1002/app.26672>
- 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. [http://doi.org/10.1016/S0142-9612\(01\)00308-8](http://doi.org/10.1016/S0142-9612(01)00308-8)
- Stansbury, J. W. (2012). Dimethacrylate network formation and polymer property evolution as determined by the selection of monomers and curing conditions. *Dental Materials*, 28(1), 13–22. <http://doi.org/10.1016/j.dental.2011.09.005>
- Thonemann, B., Schmalz, G., Hiller, K.-A., & Schweikl, H. (2002). Responses of L929 mouse fibroblasts, primary and immortalized bovine dental papilla-derived cell lines to dental resin components. *Dental Materials*, 18(4), 318–323. [http://doi.org/10.1016/S0109-5641\(01\)00056-2](http://doi.org/10.1016/S0109-5641(01)00056-2)
- Ulker, M., Ulker, H. E., Zortuk, M., Bulbul, M., Tuncdemir, A. R., & Bilgin, M. S. (2009). Effects of current provisional restoration materials on the viability of fibroblasts. *European Journal of Dentistry*, 3(2), 114–119. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2676070/>
- 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*, 27(8), 723–747. <http://doi.org/10.1016/j.dental.2011.05.001>
- Vitral, J. C. de A., Silva, A. A., Souza, M. A. de, Ferreira, A. P., & Vitral, R. W. F. (2008). Avaliação da Citotoxicidade de Materiais Odontológicos Através do Método de MTT e Produção de Óxido Nítrico: Descrição de uma Técnica. *Pesquisa Brasileira Em Odontopediatria E Clínica Integrada*, 8(3), 359–365. <http://doi.org/10.4034/1519.0501.2008.0083.0018>

- Walls, A. W. G., Nohl, F. S. A., & Wassell, R. W. (2002). Crowns and other extra-coronal restorations: Resin-bonded metal restorations. *British Dental Journal*, *193*(3), 135–142. <http://doi.org/10.1038/sj.bdj.4801506a>
- Wang, X., Xia, Y., Liu, L., Liu, M., Gu, N., Guang, H., & Zhang, F. (2010). Comparison of MTT assay, flow cytometry, and RT-PCR in the evaluation of cytotoxicity of five prosthodontic materials. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, *95B*(2), 357–364. <http://doi.org/10.1002/jbm.b.31723>
- Yang, H.-W., Chou, L. S.-S., Chou, M.-Y., & Chang, Y.-C. (2003). Assessment of genetic damage by methyl methacrylate employing in vitro mammalian test system. *Biomaterials*, *24*(17), 2909–2914. [http://doi.org/10.1016/S0142-9612\(03\)00132-7](http://doi.org/10.1016/S0142-9612(03)00132-7)
- Zach, L., & Cohen, G. (1965). Pulp response to externally applied heat. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology*, *19*(4), 515–530. [http://doi.org/10.1016/0030-4220\(65\)90015-0](http://doi.org/10.1016/0030-4220(65)90015-0)

ANEXOS

Tabela 5 – Valores de absorvância obtidos nos dois ensaios para a otimização do número de células, bem como média e desvio padrão.

<i>N^o de células/mL</i>	<i>Ensaio I</i>					<i>Ensaio I</i>				
	<i>0</i>	<i>1x10³</i>	<i>5x10³</i>	<i>1x10⁴</i>	<i>2x10⁴</i>	<i>0</i>	<i>1x10³</i>	<i>5x10³</i>	<i>1x10⁴</i>	<i>2x10⁴</i>
<i>Poço A</i>	0,036	0,152	0,279	1,015	1,203	0,033	0,120	0,281	0,698	2,071
<i>Poço B</i>	0,033	0,149	0,358	1,123	1,198	0,032	0,112	0,246	0,530	2,225
<i>Poço C</i>	0,038	0,218	0,488	1,058	2,542	0,032	0,114	0,287	0,761	2,025
<i>Poço D</i>	0,032	0,181	0,617	1,315	2,094	0,032	0,109	0,315	0,619	2,011
<i>Poço E</i>	0,033	0,161	0,385	1,195	2,634	0,035	0,112	0,214	0,746	1,899
<i>Poço F</i>	0,035	0,178	0,444	0,950	1,035	0,032	0,103	0,316	0,798	1,895
<i>Poço G</i>	0,033	0,131	0,419	0,905	0,498	0,033	0,136	0,275	0,628	1,812
<i>Poço H</i>	0,035	0,139	0,267	1,070	1,296	0,031	0,144	0,383	0,860	2,108
<i>Média I</i>	0,034	0,164	0,407	1,079	1,563	0,033	0,119	0,290	0,705	2,006
<i>Desvio padrão</i>	0,002	0,028	0,114	0,132	0,769	0,001	0,014	0,051	0,108	0,133
<i>Média II²</i>	0	0,129	0,373	1,045	1,528	0	0,086	0,257	0,673	1,973

² Os valores de absorvância em Média II correspondem à subtração do valor de absorvância do Branco aos valores de absorvância d

Tabela 6 – Valores de absorvância obtidos no ensaio B.1 para a determinação da citotoxicidade dos monómeros, bem como média e desvio padrão.

<i>Compostos</i>	<i>Controlos</i>				<i>MMA (mM)</i>				<i>TEGDMA (mM)</i>					<i>UDMA (mM)</i>					
	<i>Branco</i>	<i>Meio</i>	<i>Meio + DMSO</i>	<i>Etanol</i>	<i>1</i>	<i>5</i>	<i>10</i>	<i>15</i>	<i>0,1</i>	<i>0,5</i>	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>5</i>	<i>0,01</i>	<i>0,05</i>	<i>0,1</i>	<i>0,3</i>	<i>0,6</i>	<i>1</i>
<i>Poço A</i>	0,028	0,535	0,613	0,087	0,650	0,650	0,721	0,669	0,431	0,414	0,726				0,273	0,303		0,417	
<i>Poço B</i>	0,028	0,655		0,085	0,627	0,563	0,656	0,586		0,517		1,086	0,506		0,262	0,315		0,445	
<i>Poço C</i>		0,635	0,646		0,750		0,644		0,329	0,473		0,448	0,468	0,380	0,247		0,305		0,282
<i>Poço D</i>				0,083	0,571		0,659	0,645	0,494	0,432	0,612	0,468	0,501	0,494	0,238	0,261	0,296	0,422	0,309
<i>Poço E</i>	0,035	0,749	0,639			0,608	0,520	0,640			0,617	0,665	0,459	0,486	0,217	0,369	0,247	0,403	0,225
<i>Poço F</i>	0,031		0,659	0,077		0,577	0,665	0,529	0,353	0,415	0,481		0,496	0,715	0,244		0,299	0,375	0,168
<i>Poço G</i>	0,028	0,682	0,632	0,078	0,577			0,624	0,340		0,385	0,588		0,414		0,239	0,282		0,260
<i>Poço H</i>	0,034	0,601	0,692	0,074	0,586	0,743			0,283	0,462	0,371	0,677	0,566	0,473		0,330	0,349	0,440	0,314
<i>Média I</i>	0,031	0,647	0,643	0,081	0,627	0,628	0,644	0,616	0,372	0,452	0,532	0,655	0,499	0,494	0,247	0,303	0,296	0,417	0,260
<i>Desvio padrão</i>	0,003	0,066	0,025	0,005	0,076	0,072	0,074	0,051	0,077	0,040	0,142	0,232	0,038	0,131	0,022	0,053	0,037	0,029	0,062
<i>Média II³</i>	0	0,647	0,612	0,050	0,596	0,598	0,614	0,585	0,341	0,422	0,501	0,625	0,469	0,463	0,216	0,272	0,266	0,386	0,229
<i>% Viabilidade</i>	-	-	100,00	8,17	97,38	97,61	100,22	95,53	55,70	68,85	81,89	102,04	76,56	75,62	35,31	44,45	43,41	63,11	37,40

³ Os valores de absorvância em Média II correspondem à subtração do valor de absorvância do Branco aos valores de absorvância de Média I.

Tabela 7 – Valores de absorvância obtidos no ensaio B.2 para a determinação da citotoxicidade dos monómeros, bem como média e desvio padrão.

<i>Compostos</i>	<i>Controlos</i>				<i>MMA (mM)</i>				<i>TEGDMA (mM)</i>					<i>UDMA (mM)</i>					
	<i>Branco</i>	<i>Meio</i>	<i>Meio + DMSO</i>	<i>Etanol</i>	<i>1</i>	<i>5</i>	<i>10</i>	<i>15</i>	<i>0,1</i>	<i>0,5</i>	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>5</i>	<i>0,01</i>	<i>0,05</i>	<i>0,1</i>	<i>0,3</i>	<i>0,6</i>	<i>1</i>
<i>Poço A</i>	0,030	1,300	1,117		1,657	1,569	1,507	1,332	0,970				1,171	0,695			1,544	1,142	1,265
<i>Poço B</i>	0,029	1,358			1,608	1,615	1,518	1,344	0,982					0,683	1,077		1,496	1,132	1,261
<i>Poço C</i>	0,026		1,485	0,108		1,489		1,457		0,984	1,236	1,138	1,091	0,791	1,053	1,350	1,682		1,475
<i>Poço D</i>	0,025			0,078		1,360	1,595			1,123	1,321	1,241	1,256	0,787	1,013	1,163		1,258	1,155
<i>Poço E</i>	0,027	1,507	1,209	0,088	1,405	1,545	1,621	1,422	0,790	0,955	1,177	1,217	1,243	0,701	0,993	1,069	1,540		
<i>Poço F</i>	0,026	1,202	1,309	0,107	1,414	1,491	1,499	1,411	0,862	0,992	1,163	1,227	1,161		1,105	1,095	1,432	1,291	1,528
<i>Poço G</i>		1,113	1,399	0,108	1,479				0,872	1,087	1,238	1,050				1,372		1,140	
<i>Poço H</i>		1,060	1,480	0,115	1,445		1,437	1,233	0,891	0,947	0,981	1,089	1,178	0,704	1,021	1,183	1,512	1,015	1,016
<i>Média I</i>	0,027	1,236	1,236	0,105	1,506	1,516	1,534	1,371	0,899	1,019	1,191	1,165	1,188	0,731	1,048	1,210	1,539	1,168	1,288
<i>Desvio padrão</i>	0,002	0,158	0,145	0,010	0,118	0,098	0,074	0,090	0,079	0,081	0,128	0,088	0,066	0,053	0,046	0,142	0,092	0,110	0,215
<i>Média II⁴</i>	0	1,358	1,209	0,078	1,479	1,489	1,507	1,344	0,872	0,992	1,163	1,138	1,161	0,704	1,021	1,183	1,512	1,140	1,261
<i>% Viabilidade</i>			100,00	6,45	122,28	123,12	124,61	111,13	72,10	82,04	96,21	94,08	95,98	58,24	84,44	97,80	125,01	94,31	104,25

⁴ Os valores de absorvância em Média II correspondem à subtração do valor de absorvância do Branco aos valores de absorvância de Média I.

Tabela 8 – Valores de absorvância obtidos no ensaio B.3 para a determinação da citotoxicidade dos monómeros, bem como média e desvio padrão.

Compostos	Controlos				MMA (mM)				TEGDMA (mM)					UDMA (mM)					
	Branco	Meio	Meio + DMSO	Etanol	1	5	10	15	0,1	0,5	1	2	5	0,01	0,05	0,1	0,3	0,6	1
<i>Poço A</i>	0,033	0,951	1,007		1,242	1,587	1,542	1,128	0,985	0,741	1,241	1,342	1,395	0,921	0,692	0,899	0,901	1,041	0,983
<i>Poço B</i>	0,032	1,225		0,104	1,124	1,500	1,387		1,039		1,091	1,383	1,128	0,572	0,880	0,791	1,021		1,013
<i>Poço C</i>	0,032	1,125		0,114	1,200	1,635	1,535		0,976	0,870	0,975			0,766	0,661			1,045	0,970
<i>Poço D</i>	0,033	1,027	1,241	0,114	1,178	1,568	1,243	1,289	0,836	0,806			1,220		0,524	0,819	1,059	1,234	0,703
<i>Poço E</i>	0,034	1,228	1,382	0,101				1,239		0,698	1,195	1,055	0,980	0,537	0,505	0,785	0,827	0,904	1,218
<i>Poço F</i>	0,033		1,334		1,440		1,530	1,439	0,768			1,220					0,830	0,760	1,173
<i>Poço G</i>			1,089	0,109		1,373		1,293		0,833	1,109	1,637	1,005	1,115		1,201			
<i>Poço H</i>		0,871	1,094	0,076	1,048	1,501	1,250	1,208	0,888	0,661	1,097	1,577	1,202	0,848	1,055	1,065	0,931	1,424	
<i>Média I</i>	0,033	1,040	1,040	0,108	1,211	1,533	1,420	1,271	0,921	0,774	1,123	1,374	1,160	0,799	0,725	0,932	0,934	1,073	1,015
<i>Desvio padrão</i>	0,001	0,125	0,143	0,006	0,148	0,101	0,158	0,116	0,114	0,090	0,102	0,243	0,171	0,244	0,238	0,190	0,107	0,263	0,203
<i>Média II⁵</i>	0	1,228	1,007	0,076	1,178	1,500	1,387	1,239	0,888	0,741	1,091	1,342	1,128	0,766	0,692	0,899	0,901	1,041	0,983
<i>% Viabilidade</i>			100,00	7,51	116,98	148,96	137,76	123,00	88,18	73,57	108,30	133,23	111,98	76,05	68,74	89,31	89,45	103,34	97,58

⁵ Os valores de absorvância em Média II correspondem à subtração do valor de absorvância do Branco aos valores de absorvância de Média I.