UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

Quantificação de metacrilatos residuais e avaliação da liberação em saliva artificial a partir de resinas acrílicas para reembasamento imediato

Fernando Gonçalves de Almeida*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Química, área de concentração Química Orgânica

Orientadora: Profa. Dra. Quezia Bezerra Cass (DQ/UFSCar)
Co-Orientadora: Profa. Dra. Ana Lucia Machado (FOAr/Unesp)

*** Bolsista CNPq**

São Carlos – SP
2008

Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da Biblioteca Comunitária da UFSCar

A447qm

Almeida, Fernando Gonçalves de.
Quantificação de metacrilatos residuais e avaliação da liberação em saliva artificial a partir de resinas acrílicas para reembasamento imediato / Fernando Gonçalves de Almeida. -- São Carlos : UFSCar, 2008.
85 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2008.

1. Resinas acrílicas. 2. Cromatografia líquida de alta eficiência. 3. Quantificação. 4. Monômeros. 5. Saliva artificial. I. Título.

CDD: 545.89 (20ª)

Dedico esta Dissertação aos meus pais, ***Herta e José Edson****, que sempre fizeram todos os sacrifícios para que eu pudesse chegar aonde cheguei, além de me terem incentivado, mesmo de longe, a batalhar pelos meus objetivos.*

A minha eterna companheira, ***Claudia****, que sempre esteve ao meu lado, me dando força e alegria.*

AGRADECIMENTOS

À **Profa. Dra. Quezia B. Cass**, por sua orientação e dedicação. Muito obrigado pela oportunidade de trabalhar em seu grupo e por ter acreditado na minha capacidade: com certeza me proporcionou uma excelente formação profissional.

À **Profa. Dra. Ana Lucia Machado,** pela sua co-orientação e iniciativa de submeter este projeto ao edital universal da CNPq. A sua co-orientação foi imprescindível para a realização deste trabalho.

A **todo corpo técnico e administrativo** do Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos-UFSCar.

A **todos os professores** do Departamento de Química da UFSCar.

Aos meus amigos do grupo de Síntese Orgânica e CLAE: **Aline Aparecida Becaro, Angela Cavallini De Pietro, Ariele Frederice Fogolin, Bianca Rebelo Lopes, Bruna Netto de Oliveira Cury Moreira, Carmen Lúcia Cardoso, Fernando C. Costa Rodrigues de Paula, Graziani Ferrer Corrêa, Juliana Cristina Barreiro, Kátia Roberta Anacleto Belaz, Kenia Lourenço Vanzolini, Lúcia Regina Rocha Martins, Marcela Cristina Moraes, Mariana Coimbra, Mariana Fioramonte, Marina Denadai, Neila Maria Cassiano, Regina Vincenzi de Oliveira, Rejane Carla de Souza, Tiago de Campos Lourenço e Vanessa Migliorinni Urban.** Agradeço a todos pela amizade, incentivo, colaboração e momentos descontraídos durante todos esses anos de convívio.

A **Rui Sintra, Paula Rodrigues, Bianca Rebelo e Lucia Regina**, pelas suas contribuições para a redação desta dissertação.

A **Angela Cavallini De Pietro**, por ter me orientado desde que entrei nesse grupo, pelos seus ensinamentos em cromatografia, e pela amizade.

Ao **Alexandre Augusto Cruz,** pela disponibilidade em ajudar com os equipamentos, e pela amizade.

Ao **Gabriel Cruz de Souza** e ao **Lucio Cezar de Almeida**, pela amizade, conselhos e brincadeiras.

Ao **Fernando C. Costa Rodrigues de Paula**, por sua disposição em ajudar no desenvolvimento do trabalho, e pela amizade.

Aos meus amigos da turma de Química 2002-UFSCar e Repúblicas: **Alexandre da Cruz Valeta**, **Allan Taguchi da Silva, Bruno Campos Janegitz**, **Hesly Contieiro Siqueira (Bin Laden)**, **Luis Fernando Toloi**, **Rafael de Oliveira (Pastel)**, **Lincoln Romualdo**, **Juliana Shiki**, **Inara de Aguiar e Beatriz da Cruz Gonzalez**, por todos os momentos descontraídos, apoio e alegria, que foram muito importantes para ter conseguido continuar em frente.

À **Profa. Dra. Regina Vincenzi de Oliveira,** pela sua disposição em me ajudar, pela sua amizade e incentivo.

À **Profa. Dra. Vanessa Migliorini Urban,** pela sua colaboração e ensinamentos, que contribuíram muito para o desenvolvimento deste trabalho.

À **Claudia Rodrigues**, por sempre ter estado do meu lado, me incentivando e apoiando nos momentos importantes da minha vida.

A **toda família Rodrigues,** por sempre me ter acolhido no conforto de seu lar.

Aos meus inigualáveis pais, **Herta** e **José Edson**, por toda a dedicação, apoio, amor e carinho, os quais sempre me fortalecem para encarar todos os obstáculos da vida.

Aos meus queridos tios, **Dina** e **Ricardo**, por todo o apoio, carinho e preocupação.

Aos meus primos-irmãos **Renata** e **Ricardo,** por sempre terem compartilhado os momentos importantes de nossas vidas.

À minha prima-sobrinha **Ana Lívia,** pela sua alegria e energia contagiantes.

Ao **CNPq** pela bolsa fornecida e apoio financeiro.

A todos os que contribuíram para que este trabalho fosse realizado.

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS:

λ	Comprimento de onda
AAEM	Metacrilato de Acetoacetoxietila
ACN	Acetonitrila
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BCR	*Bureau Communautaire de Reference*
BDMA	Dimetacrilato de 1,4 - butanodiol
BMA	Metacrilato de Butila
C_{18}	Octadecil-Sílica
CG	Cromatografia Gasosa
CHMA	Metacrilato de Cicloexila
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CV%	Coeficiente de Variação
d.i.	Diâmetro Interno
EDMA	Dimetacrilato de 1,2 – Etanodiol
EHMA	Metacrilato de 2 – Etilexila
EM	Espectrometria de Massas
FDA	Food and Drug Administration
HDMA	Dimetacrilato de 1,6 Hexanodiol
HEMA	Metacrilato de 2 – Hidroxietila
HPLC	*High Performance of Liquid Chromatography*
IBMA	Metacrilato de Isobutila
ICH	*International Conference on Harmonization*
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial
IV	Infravermelho
ISO	*International Organization for Stardardization*
K	Fator de Retenção
LD	Limite de Detecção
LQ	Limite de Quantificação
MeOH	Metanol
MMA	Metacrilato de metila
NDMA	Dimetacrilato de 1,9 – Nonanodiol
NPL	*National Physical Laboratory*
NIST	*National Institute of Standards and Technology*
PEMA	Poli-metacrilato de etila

pH	Potencial Hidrogeniônico
PMMA	Poli-metacrilato de metila
PTB	*Physikalisch-Technische Bundesanstalt*
r	Coeficiente de Correlação
RAM	Fases de Acesso Restrito (*Restricted-Access Media*)
RE	Resina Experimental
RSD	Desvio Padrão Relativo (*Relative Standard Deviation*)
SRM	Materiais de Referência Certificados (*Standard Reference Materials*)
THF	Tetraidrofurano
TKY	Tokuyama Rebase Fast II
USP	*United States Pharmacopeia*
UV	Ultravioleta

LISTA DE FIGURAS

Introdução

FIGURA 1. 1. Estrutura química de acrilatos e metacrilatos. 8
FIGURA 1. 2. Estrutura química de alguns dimetacrilatos utilizados em resinas odontológicas. 9
FIGURA 1. 3. Estrutura química de alguns metacrilatos utilizados em resinas odontológicas. 10

Resultados e Discussões

FIGURA 4. 1. Espectros de UV-vis dos monômeros: a) AAEM; b) EDMA; c) BDMA; d) CHMA. (—) Comprimento de onda de máxima absorção; (—) Comprimento de onda utilizado. 34
FIGURA 4. 2. Estrutura dos metacrilatos analisados. 35
FIGURA 4. 3. Cromatograma da amostra de AAEM em metanol (168µg/mL). Condições cromatográficas: coluna analítica C_{18}-Nucleosil (15 x 0,46 cm d.i., 100 Å, 5µm); fase móvel ACN:H_2O (35:65 v/v); vazão 1,0 mL/min; volume de injeção 25 µL e λ = 230 nm. 36
FIGURA 4. 4. Cromatogramas obtidos a partir da análise de amostras de fragmentos e de raspas da resina TKY, submetidas à extração por 2 horas em MeOH. Condições cromatográficas: coluna analítica C_{18}-Nucleosil (15 x 0,46 cm d.i., 100 Å, 5µm); fase móvel: (—) ACN:H_2O (40:60 v/v) e (—) ACN:H_2O (35:65 v/v); vazão 1,0 mL/min; volume de injeção 25 µL e λ = 230 nm. 37
FIGURA 4. 5. Cromatogramas obtidos a partir da análise de amostras de fragmentos da resina TKY, submetidas à extração durante: (—) 0 - 2 horas e (—) 2 - 4 horas. Condições cromatográficas: coluna analítica C_{18}-Nucleosil (15 x 0,46 cm d.i., 100 Å, 5µm); fase móvel ACN:H_2O (40:60 v/v); vazão 1,0 mL/min; volume de injeção 25 µL e λ = 230 nm. 38
FIGURA 4. 6. Cromatograma da amostra de AAEM em metanol (112µg/mL). Condições cromatográficas: coluna analítica C_{18}-Nucleosil (15 x 0,46 cm d.i., 100 Å, 5µm), fase móvel ACN:H_2O (35:65 v/v); vazão 1,0 mL/min; volume de injeção 25 µL e λ = 230 nm. 41

FIGURA 4. 7. Cromatogramas obtidos da amostra de (a) EDMA, (b) CHMA, (c) BDMA.e (d) EDMA, CHMA e BDMA preparadas em metanol. Condições cromatográficas: coluna analítica C_{18}-Nucleosil (15 x 0,46 cm d.i., 100 Å, 5µm); fase móvel ACN:H_2O (60:40 v/v); vazão 1,0 mL/min; volume de injeção 25 µL; λ = 230 nm e tempo de análise de 20 minutos.....47

FIGURA 4. 8. Cromatogramas obtidos a partir da análise de amostras de raspas da resina RE3 submetidas a extração em (—) isopropanol e (—) metanol. Condições cromatográficas: coluna analítica C_{18}-Nucleosil (15 x 0,46 cm d.i., 100 Å, 5µm); fase móvel ACN:H_2O (60:40 v/v); vazão 1,0 mL/min; volume de injeção 25 µL; λ = 230 nm e tempo de análise de 20 min. 48

FIGURA 4. 9. Cromatogramas obtidos a partir da análise de amostras da resina RE3 submetidas a extração em (—) raspas e (—) fragmentos . Condições cromatográficas: coluna analítica C_{18}-Nucleosil (15 x 0,46 cm d.i., 100 Å, 5µm); fase móvel ACN:H_2O (60:40 v/v); vazão 1,0 mL/min; volume de injeção 25 µL; λ = 230 nm e tempo de análise de 20 min. 49

FIGURA 4. 10. Cromatogramas obtidos a partir da análise de amostras de extração de raspas da resina RE3 submetidas a extração em (—) 0 - 2 horas e (—) 0 - 4 horas. Condições cromatográficas: coluna analítica C_{18}-Nucleosil (15 x 0,46 cm d.i., 100 Å, 5µm); fase móvel ACN:H_2O (60:40 v/v); vazão 1,0 mL/min; volume de injeção 25 µL; λ = 230 nm e tempo de análise de 20 min.....49

FIGURA 4. 11. Cromatograma da amostra de EDMA (120µg/mL), BDMA (100µg/mL) e CHMA (210µg/mL) em MeOH. Condições cromatográficas: coluna analítica C_{18}-Nucleosil (15 x 0,46 cm d.i., 100 Å, 5µm), fase móvel ACN:H_2O (60:40 v/v); vazão 1,0 mL/min; volume de injeção 25 µL; λ = 230 nm e tempo de análise de 20 min. ...52

FIGURA 4. 12. Cromatogramas obtidos nas análises de: (—) amostra extraída da resina RE1 e (—) padrões EDMA e CHMA preparados em metanol. Condições cromatográficas: coluna analítica C_{18}-Nucleosil (15 x 0,46 cm d.i., 100 Å, 5µm); fase móvel ACN:H_2O (60:40 v/v); vazão 1,0 mL/min; volume de injeção 25 µL e λ = 230 nm. 60

FIGURA 4. 13. Cromatogramas obtidos nas análises de: (—) amostra extraída da resina RE2 e (—) padrões EDMA e BDMA preparados em metanol. Condições cromatográficas: coluna analítica C_{18}-Nucleosil (15 x 0,46 cm d.i., 100 Å, 5µm); fase móvel ACN:H_2O (60:40 v/v); vazão 1,0 mL/min; volume de injeção 25 µL; λ = 230 nm e tempo de análise de 20 min. 63

FIGURA 4. 14. Cromatograma obtido da amostra de AAEM (25µg/mL), preparada em saliva artificial. Condições cromatográficas: coluna analítica C_{18}-Nucleosil (15 x 0,46 cm d.i., 100 Å, 5µm); fase móvel ACN:H_2O (35:65 v/v); vazão 1,0 mL/min; volume de injeção 25 µL e λ = 230 nm.....66

FIGURA 4. 15. Corpo-de-prova armazenado em recipiente plástico na estufa microbiológica. 67

FIGURA 4. 16. Cromatograma de amostra AAEM padrão (100µg/mL) preparadas em saliva artificial. Condições cromatográficas: coluna analítica C_{18}-Nucleosil (15 x 0,46 cm d.i., 100 Å, 5µm); fase móvel ACN:H_2O (35:65 v/v); vazão 1,0 mL/min; volume de injeção 25 µL e λ = 230 nm. 69

LISTA DE TABELAS

Introdução

TABELA 1. 1. Diferentes composições de saliva artificial. 14

Resultados e Discussões

TABELA 4. 1. Composição das resinas acrílicas autopolimerizáveis. 33
TABELA 4. 2. Resultados obtidos a partir de amostras (raspas) de extrações do monômero AAEM realizadas durante 6 dias consecutivos. 39
TABELA 4. 3. Precisão e exatidão obtidas para as soluções de calibração do AAEM. 42
TABELA 4. 4. Precisão e exatidão intra e inter-dias obtidas para as soluções controles de qualidade do AAEM. 42
TABELA 4. 5. Precisão e exatidão para as amostras de AAEM em MeOH no teste cego (n=5). 43
TABELA 4. 6. Resultados obtidos a partir de amostras (raspas) de extrações do monômero AAEM realizadas durante 6 dias consecutivos. 44
TABELA 4. 7. Resultados obtidos de extrações dos monômeros EDMA, BDMA e CHMA realizadas durante 6 dias consecutivos, a partir das amostras (raspas) da resina RE3.....50
TABELA 4. 8. Precisão e exatidão obtidas para as soluções de calibração para os três monômeros, EDMA, BDMA e CHMA em MeOH. 54
TABELA 4. 9. Precisão e exatidão intra e inter-dias obtidas para as soluções controles de qualidade para os três monômeros, EDMA, BDMA e CHMA em MeOH. 55
TABELA 4. 10. Precisão e exatidão obtidas no teste cego para soluções dos três monômeros preparados em MeOH. 56
TABELA 4. 11. Limites de quantificação e detecção para EDMA, BDMA e CHMA. .56
TABELA 4. 12. Resultados obtidos de extrações dos monômeros EDMA, BDMA e CHMA realizadas durante 6 dias consecutivos a partir de amostras (raspas) da resina RE3.....57

TABELA 4. 13. Resultados obtidos a partir de amostras (raspas) de extrações dos monômeros EDMA e CHMA realizadas durante 6 dias consecutivos, a partir da resina RE1.....61
TABELA 4. 14. Resultados obtidos a partir de amostras (raspas) de extrações dos monômeros EDMA e BDMA realizadas durante 6 dias consecutivos, a partir da resina RE2.....64
TABELA 4. 15. Resultados obtidos a partir da liberação do monômero AAEM da resina TKY durante os ciclos de 1, 3, 5, 24, 72 horas de imersão em saliva artificial. 67
TABELA 4. 16. Precisão e exatidão obtidas para as concentrações da curva analítica do método. 70
TABELA 4. 17. Precisão e exatidão intra e inter-dias obtidas para os controles de qualidade para o AAEM em saliva artificial. 71
TABELA 4. 18. Precisão e exatidão para o teste cego do AAEM em saliva artificial. 71
TABELA 4. 19. Resultados obtidos a partir da liberação do monômero AAEM da resina TKY durante os ciclos de 1, 3, 5, 24, 72 horas de imersão em saliva artificial. 71

LISTA DE ESQUEMAS

Introdução

ESQUEMA 1. 1. Mecanismo proposto da reação de polimerização. 6

Resultados e Discussões

ESQUEMA 4. 1. Cálculo da porcentagem de AAEM não polimerizado. (---) Cálculo de volta a partir da concentração encontrada. 45
ESQUEMA 4. 2. Cálculo da quantidade total de monômeros extraído da resina RE3. (---) Cálculo de volta a partir da concentração encontrada. 59
ESQUEMA 4. 3. Cálculo da quantidade total de monômeros extraído da resina RE1. (---) Cálculo de volta a partir das concentrações encontradas. 62
ESQUEMA 4. 4. Cálculo da quantidade total de monômeros extraído da resina RE2. (---) Cálculo de volta a partir das concentrações encontradas. 65

LISTA DE GRÁFICOS

Resultados e Discussões

GRÁFICO 4. 1. Curva analítica obtida por padronização externa do AAEM em MeOH. Equação de regressão linear: y = 21059,23357 + 5385,3442x. Coeficiente de correlação, r = 0,99948. F_{exp} = 19,07. 41

GRÁFICO 4. 2. Curva analítica obtida por padronização externa do EDMA, BDMA e CHMA em MeOH. Equações de regressão linear: y = 46427,8538 + 11730,46542x; y = -28831,63243 + 10383,12448x e y = 19042,16942 + 8299,17454x para o EDMA, BDMA e CHMA, respectivamente. Coeficiente de correlação r = 0,99834, r = 0,99866 e r = 0,99756 para o EDMA, BDMA e CHMA, respectivamente. F_{exp} = 16,08 (EDMA), F_{exp} = 4,49 (BDMA) e F_{exp} = 9,66 (CHMA).....53

GRÁFICO 4. 3. Curva analítica obtida por padronização externa do AAEM em saliva artificial. Equação de regressão linear: y = -9416,88999 + 5922,23915x. Coeficiente de correlação, r =0,99801. F_{exp} = 18,54. 70

LISTA DE DIAGRAMAS

Resultados e Discussões

DIAGRAMA 4. 1. Diagrama de preparo das soluções de trabalho do AAEM em MeOH, para a curva analítica e controle de qualidade.....40
DIAGRAMA 4. 2. Diagrama de preparo das soluções de trabalho do EDMA, BDMA e CHMA em MeOH para a curva analítica e controle de qualidade 51
DIAGRAMA 4. 3. Diagrama de preparo das soluções de calibração e de controle de qualidade a partir das soluções de trabalho para AAEM em saliva artificial. 68

RESUMO

Neste trabalho, foram desenvolvidos métodos analíticos, por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), para a quantificação de monômeros metacrilatos não polimerizados de resinas acrílicas autopolimerizáveis, utilizadas em tratamentos odontológicos para reembasamento de bases de prótese.

A importância da quantificação de metacrilatos residuais está associada à sua toxicidade, uma vez que podem causar reações alérgicas e irritações na mucosa bucal do paciente. Além disso, altas concentrações de monômeros não polimerizados podem comprometer as propriedades físicas e mecânicas da resina e, consequentemente, a qualidade do tratamento de reembasamento.

Para isso, foram analisadas três resinas experimentais e uma resina comercial, a Tokuyama Rebase Fast II (TKY). As resinas experimentais (RE1, RE2 e RE3) estão em desenvolvimento pela empresa VIPI Indústria Comércio Exportação e Importação de Produtos Odontológicos Ltda, em colaboração com a Faculdade de Odontologia de Araraquara (FOAr - Unesp). O desenvolvimento dessas novas resinas deve-se à necessidade de se ter uma resina de fabricação nacional, visando reduzir o custo do tratamento, uma vez que as resinas utilizadas para este fim são todas importadas.

Para a quantificação de monômeros residuais, realizou-se a extração destes a partir das resinas com metanol refrigerado em banho de gelo, e processo foi validado através de extrações em replicata. Os monômeros quantificados foram: metacrilato de acetoacetoxietil (AAEM - resina TKY), dimetacrilato de butila (BDMA), dimetacrilato de etila (EDMA) e metacrilato de cicloexila (CHMA) - resinas experimentais. As maiores concentrações foram encontradas para as resinas experimentais, nas quais as concentrações de monômeros não polimerizados variaram aproximadamente de 120µg/mL a 500µg/mL, de 150µg/mL a 500µg/mL e de 100 a 300µg/mL para as resinas RE3, RE1 e RE2, respectivamente. A variação encontrada para a resina TKY foi de 70 a 110µg/mL.

Para a resina comercial (TKY) foi realizado um estudo no sentido de avaliar a quantidade de monômero não polimerizado e liberado *in vitro* em saliva artificial. Foram encontradas concentrações de 5,00 a 64,0µg/mL, sendo que os maiores valores foram obtidos nas primeiras 24 horas. Após uma semana de imersão em saliva artificial não se observou a liberação do monômero AAEM.

ABSTRACT

This work reports the development of analytical methods, using High Performance of Liquid Chromatography (HPLC), to quantify unreacted monomers from dental reline autopolimerizing acrylic resins.

The quantification of these unreacted methacrylates is directly related with theirs toxicity, once that these may not only be irritant to the mucosa, but may also cause allergic and inflammatory reactions. In addition to this, high concentrations of unreacted monomers may cause alterations in physical and mechanical properties.

For this purpose, three experimental resins (RE1, RE2 and RE3) and a commercial resin, Tokuyama Rebase Fast II (TKY), were selected to be analyzed. The development of these experimental resins has been carried out in cooperation with Faculty of Dentistry, Araraquara (FOAr - Unesp) and the dental corporation VIPI Ltda (Pirassununga, SP). The relevance of development these new resins is related to the necessity to have a national confectioned resin, because all resins used for these treatments are imported and reducing the cost of treatment.

For quantification of unreacted monomers was necessary to extract them from the resins, so the extraction procedure was carried out in an ice-bath using methanol as extraction solvent. This procedure was validated through extractions in replicates. The monomers quantified were acetoacetoxy ethyl methacrylate (AAEM) from TKY resin, ethylene glycol dimethacrylate (EDMA), buthanediol dimethacrylate (BDMA) and cyclo hexyl metharylate (CHMA) all from experimental resins. Higher concentrations were found for experimental resins which the unreacted monomers concentrations range were, approximately 120µg/mL to 500µg/mL, 150µg/mL to 500µg/mL and 100 to 300µg/mL for resins RE3, RE1 e RE2, respectively

Only for TKY resin was carried out a procedure to evaluate the quantity of unreacted monomer leached out *in vitro* in artificial saliva. There were found concentration in the range from 5.00 to 64.0µg/mL, in view of that the higher concentrations were leached from resin in the first 24 hours and after one week of artificial saliva immersion it was not observed the leaching of AAEM monomer.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 2
1.1. A saúde bucal e o uso de próteses dentárias 2
1.2. Resinas acrílicas autopolimerizáveis 3
1.3. Monômeros residuais e a polimerização 4
1.4. Acrilatos e metacrilatos 7
1.5. Análise de resíduos de monômeros e o estado da arte 10
1.6. A importância da saliva na saúde bucal e a saliva artificial 13
1.7. Validação de métodos analíticos por CLAE 15
1.7.1. Seletividade 17
1.7.2. Linearidade 17
1.7.3. Exatidão 17
1.7.4. Precisão 18
1.7.5. Robustez 19
1.7.6. Limite de quantificação (LQ) 19
1.7.7. Limite de detecção (LD) 19

2. OBJETIVOS 21

3. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL 23
3.1. Generalidades 23
3.2. Preparo da coluna analítica 24
3.3. Confecção do corpo-de-prova 24
3.4. Determinação das condições de extração dos monômeros 25
3.5. Análise da liberação in vitro dos monômeros 26
3.6. Desenvolvimento dos métodos cromatográficos 26
3.6.1. Preparo das soluções padrões do AAEM em solvente 27
3.6.2. Preparo das soluções de calibração e controle de qualidade para o AAEM em solvente 27
3.6.3. Preparo das soluções padrões de AAEM em saliva artificial 28
3.6.4. Preparo das soluções de calibração e controle de qualidade para o AAEM em saliva artificial 28
3.6.5. Preparo das soluções padrões de BDMA, CHMA e EDMA em solvente 29

3.6.6. Preparo das soluções de calibração e controle de qualidade para BDMA, CHMA e EDMA em solvente 30
3.6.7. Obtenção das curvas analíticas e confirmação das linearidades 31

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES 33
4.1. As resinas acrílicas autopolimerizáveis e seus monômeros 33
4.2. Desenvolvimento do método e determinação de condições para a extração do AAEM a partir da resina acrílica comercial Tokuyama Rebase Fast II 35
4.3. Construção da curva analítica e validação do método para a quantificação de AAEM extraídos da resina TKY 40
4.4. Quantificação de AAEM extraídos da resina TKY 43
4.5. Desenvolvimento do método e determinação de condições de extração para o BDMA, EDMA e CHMA a partir das resinas acrílicas experimentais ... 46
4.6. Construção da curva analítica e validação do método para quantificação de EDMA, BDMA e CHMA extraídos das resinas experimentais. 51
4.7. Quantificação de EDMA, BDMA e CHMA extraídos da resina RE3 56
4.8. Quantificação de EDMA e CHMA extraídos da resina RE1 60
4.9. Quantificação de EDMA e BDMA extraídos da resina RE2 62
4.10. Desenvolvimento do método para análise da liberação do AAEM em saliva artificial, a partir da resina TKY 65
4.11. Construção da curva analítica e validação do método para a quantificação de AAEM liberados em saliva artificial a partir da resina TKY .. 68
4.12. Quantificação de AAEM liberados em saliva artificial a partir da resina TKY 71

5. CONCLUSÕES 74

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 77

Introdução

E agora, José?
A festa acabou,
a luz apagou,
o povo sumiu,
a noite esfriou,
e agora, José?
e agora, você?
você que é sem nome,
que zomba dos outros,
você que faz versos,
que ama, protesta?
e agora, José?

Carlos Drummond de Andrade – José – Primeira estrofe

1. Introdução

1.1. A saúde bucal e o uso de próteses dentárias

O Levantamento das Condições de Saúde Bucal da População Brasileira – SB, Brasil, realizado em 2003 pelo Ministério da Saúde, apontou a perda dentária como um grave problema de saúde pública. Cerca de 85% da população adulta, e quase 99% dos idosos, utilizam ou necessitam de algum tipo de prótese dentária, tanto na arcada superior quanto na arcada inferior.

Especificamente, com relação ao uso e à necessidade de prótese total, mais de 28% dos adultos não possuem nenhum dente funcional ao menos em uma arcada, e mais de 15% necessitam de ao menos de uma dentadura. Entre os idosos, os dados são ainda mais preocupantes, pois 75% deles não possuem nenhum dente funcional, e mais de 36% necessitam de ao menos de uma prótese total.

Assim, e paralelamente ao câncer de boca, a ausência de dentes é um dos mais graves problemas da saúde bucal no Brasil[1]. As próteses dentárias mais comumente utilizadas são as próteses dentárias totais, ou parciais removíveis, sendo que ambas requerem um tratamento de reabilitação.

No tratamento de reabilitação de pacientes, total ou parcialmente desdentados, por meio de próteses removíveis, a manutenção da adaptação entre a parte interna das bases e os tecidos de suporte, pode ser considerada como um dos aspectos críticos do tratamento. Isso decorre do fato de o rebordo residual apresentar constantes alterações morfológicas, devido ao processo de reabsorção óssea, que é crônico, progressivo, irreversível e de origem multifatorial.

Em função dessa reabsorção, a readaptação das bases das próteses aos tecidos subjacentes deve ser periodicamente corrigida, para a manutenção das condições de retenção e estabilidade obtidas inicialmente[2]. Essa readaptação pode ser realizada no próprio consultório, por meio do reembasamento do tipo imediato, que dentre os tratamentos disponíveis é o que apresenta maior facilidade e rápida execução, possibilitando que ao final da consulta, o paciente possa sair do consultório com a prótese reajustada ao seu ambiente bucal.

1.2. Resinas acrílicas autopolimerizáveis

O reembasamento, do tipo imediato, pode ser realizado utilizando três tipos principais de resinas acrílicas, classificadas de acordo com o respectivo modo de ativação da sua reação de polimerização: *fotopolimerizável*, ativada por luz visível; *termopolimerizável*, ativada via aquecimento e *autopolimerizável*, ativada quimicamente. Estas últimas apresentam-se como as mais vantajosas, devido à praticidade da sua manufatura que dispensa a etapa de aquecimento.

As resinas acrílicas autopolimerizáveis, disponíveis comercialmente, são todas importadas. São constituídas, basicamente, por um pó e um líquido, cujas composições químicas determinam as diferenças entre elas. Para a confecção do material reembasador, as proporções de pó e líquido são pré-determinadas pelos fabricantes.

O pó do material reembasador é basicamente constituído por poli-metacrilato de etila (PEMA) ou por poli-metacrilato de metila (PMMA), com uma pequena porcentagem de peróxido de benzoíla. Entre os fabricantes, há uma maior variação para a composição dos líquidos, os quais podem ser constituídos por monômeros metacrilatos, agentes de ligação cruzada e amina terciária. A proporção entre estes componentes pode influenciar, significativamente, nas propriedades físicas e mecânicas dos materiais reembasadores.

PRICE[3] realizou um estudo, relacionando a influência da composição de algumas resinas acrílicas autopolimerizáveis, dando especial atenção aos agentes de ligação cruzada, com suas propriedades mecânicas. Nesse trabalho, observou-se que os agentes de ligação cruzada podem se incorporar na cadeia linear de polímeros, melhorando a sua dureza e resistência à temperatura[3]. Porém, de uma maneira geral, as concentrações desses reagentes não podem ultrapassar 15%[3] da composição do líquido do material reembasador, pois o excesso desse reagente pode causar a diminuição da resistência à tração e ao impacto.

Ainda assim, resinas reembasadoras, que contêm esses agentes de ligação cruzada, apresentam algumas vantagens face às resinas reembasadoras convencionais, tais como: odor mais agradável, menor irritação da mucosa bucal e menor aquecimento durante a polimerização. Porém, a sua interface com a base de prótese é considerada mais fraca que as das resinas convencionais[4].

No entanto, a importância da composição das resinas utilizadas para o tratamento de reembasamento imediato não está apenas associada às propriedades mecânicas e físicas da resina[5,6], estando associada também à saúde bucal do paciente. Durante o reembasamento, no ambiente bucal do paciente, o material reembasador pode causar incômodo, devido ao calor gerado pela reação de polimerização e pela presença de monômeros não reagidos[6-8], aditivos orgânicos[9-11] e produtos de degradação[9,12], os quais podem ser liberados gradativamente para o ambiente bucal[13-15].

1.3. Monômeros residuais e a polimerização

A liberação de monômeros está relacionada, de forma direta, às reações de polimerização que ocorrem via radicalar e dificilmente são completas. Na literatura foram reportados diversos casos, relacionando os efeitos clínicos à presença de monômeros liberados no ambiente bucal, como: reações alérgicas locais[16], irritação na mucosa bucal[16], genotoxicidade[17,18], citotoxicidade[10,19-21] e estomatite[22].

Os efeitos indesejáveis desses compostos não atingem apenas os usuários de próteses, estando também relacionados com os trabalhadores das indústrias químicas e profissionais da área odontológica, que sofrem com a freqüente exposição ao vapor dessas substâncias e apresentam, além dos efeitos mencionados anteriormente, problemas de asma[23].

Assim, uma reação de polimerização completa é algo almejado pela indústria de polímeros, em especial pelo seguimento de materiais odontológicos. Além disso, produtos que contenham uma pequena quantidade de resíduos de monômeros ganham maior destaque no mercado.

A reação de polimerização pode ser dividida em três etapas principais: iniciação, propagação e terminação, representadas no **Esquema 1.1**.

Na etapa de iniciação, o par de elétrons do nitrogênio da amina terciária ataca o oxigênio da molécula de peróxido de benzoíla, proporcionando a quebra da ligação O–O, formando o íon benzoato e uma espécie catiônica. A espécie catiônica formada, por ser instável, quebra-se homoliticamente na ligação N–O, dando origem a um radical livre e a uma espécie cátion-radical. O íon benzoato captura um próton da espécie cátion-radical, formando o ácido benzóico.

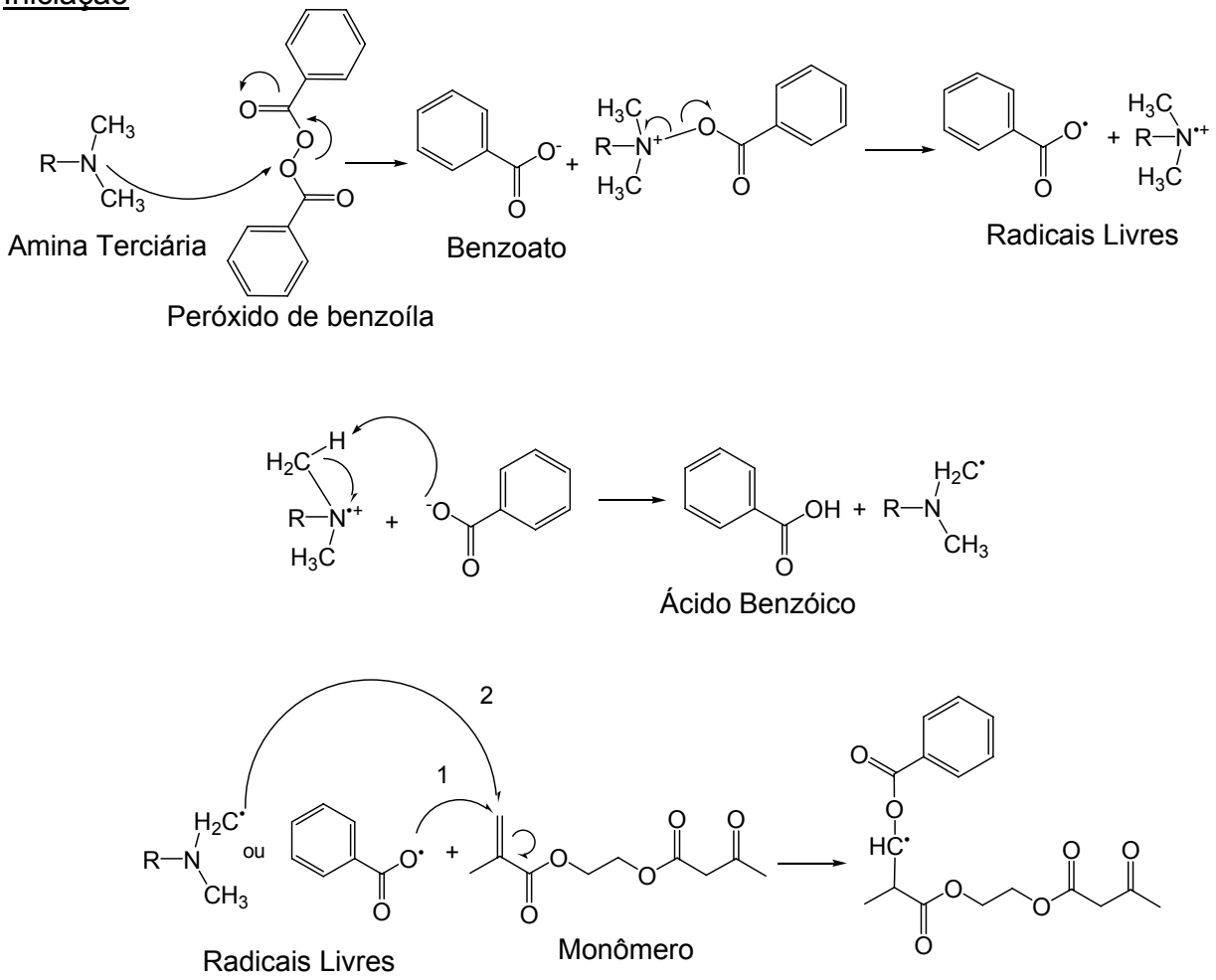
Portanto, no fim da primeira etapa da reação de polimerização, forma-se ácido benzóico e dois tipos de radicais livres, sendo um proveniente do peróxido de benzoíla, e outro da amina terciária.

Com a formação dos radicais livres, inicia-se a etapa de propagação, na qual estes reagem com os monômeros, através das ligações C=C do monômero, proporcionando uma reação em cadeia e dando origem ao polímero.

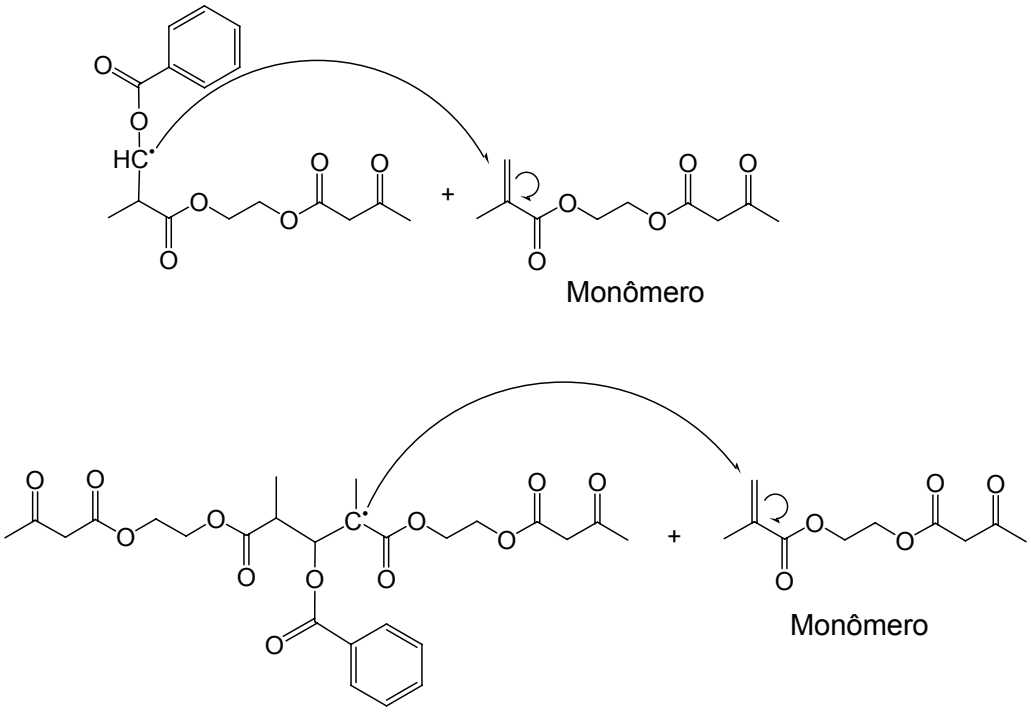
Na etapa de terminação, dois radicais livres, que tenham reagido com diversas unidades de monômeros, se encontram para finalizar a reação de polimerização.

Na literatura existem diversas propostas de mecanismos para a formação dos radicais livres na etapa de iniciação da reação de polimerização, envolvendo aminas terciárias e peróxido de benzoíla[24-26]. Porém, não são mecanismos detalhados. O **Esquema 1.1** ilustra um possível mecanismo detalhado, para a etapa de iniciação, baseado nos estudos de VAZQUEZ *et al*[25], e para as etapas subseqüentes da reação de polimerização.

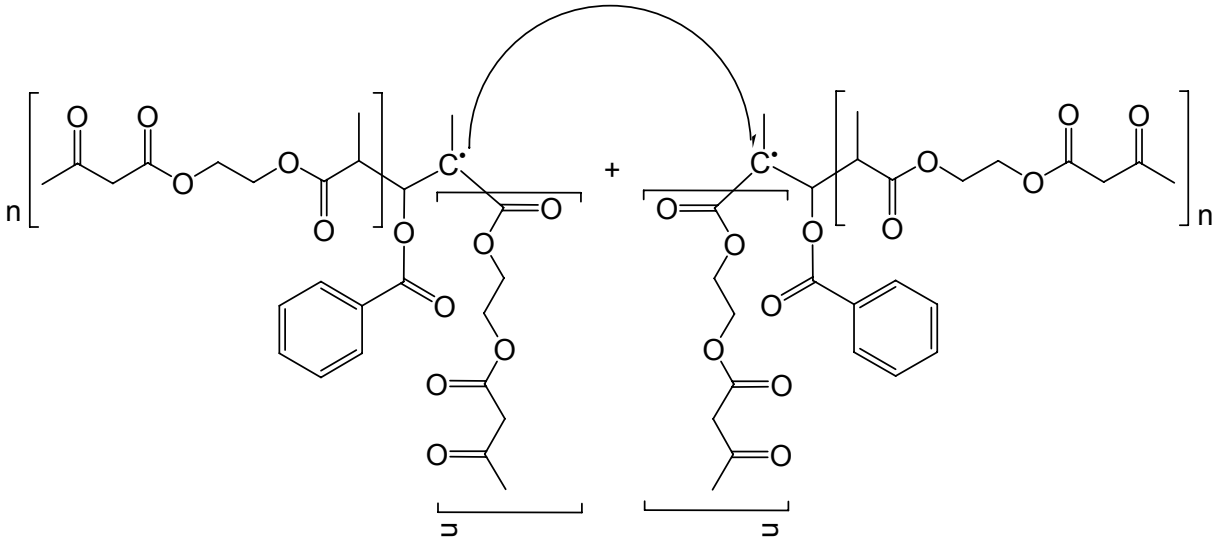
<u>Iniciação</u>



Propagação



Terminação



ESQUEMA 1. 1. Mecanismo proposto da reação de polimerização.

Como se pode observar no mecanismo acima, na etapa de iniciação forma-se - além de radicais livres, que reagem com os monômeros - Ácido Benzóico, que pode ser liberado no ambiente bucal, junto com monômeros não reagidos. A liberação, em saliva artificial, de compostos orgânicos presentes na composição de resinas acrílicas, já foi estudado por LYGRE *et al*[12] e, nesse trabalho, foram

encontradas diferentes concentrações de fenil benzoato e fenil salicilato[12]. TSUCHIYA *et al*[10] identificaram a liberação, em saliva artificial, de formaldeído, a partir de resinas acrílicas autopolimerizáveis e termopolimerizáveis[10].

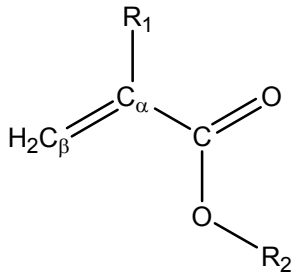
As condições de polimerização[27-29] podem influenciar diretamente diversas propriedades como a tração e a resistência[30] da resina, bem como a quantidade de monômero liberado pela mesma[30].

Em 2002, LEE *et al*[27] realizaram um estudo sistemático para avaliar a influência das condições de polimerização na liberação de monômeros, levando em consideração fatores, como: temperatura, pressão e presença de ar. Os autores observaram que um aumento de 30ºC a 60ºC na temperatura de polimerização, resultou em uma significativa diminuição dos monômeros liberados, uma vez que a elevação da temperatura provocou o aumento da energia cinética das moléculas, fazendo com que houvesse mais choques efetivos entre as mesmas, o que contribui para uma melhor polimerização.

Foi observado, também, que na ausência de oxigênio, a quantidade de monômeros diminuiu significativamente. Esta diminuição está relacionada com as propriedades químicas do oxigênio que, por ser paramagnético, tem a capacidade de reagir com radicais livres, ocasionando uma inibição da reação de polimerização. O último fator levado em consideração, nesse trabalho, foi a pressão: qualquer alteração verificada não provocou nenhuma mudança na quantidade de monômeros liberados.

1.4. Acrilatos e metacrilatos

Os acrilatos e metacrilatos são compostos produzidos em grandes quantidades, em diversos tipos de indústrias, como as de cola, produtos medicinais e odontológicos. A sua utilização está crescendo, principalmente na área odontológica, em função da substituição de materiais à base de mercúrio, como o amálgama. Os acrilatos e metacrilatos são compostos reativos, que podem se degradar com facilidade em meio aquoso[7,31] ou em saliva humana[15] e a sua reatividade está diretamente relacionada à sua estrutura molecular (**Figura 1.1**)[32-34].



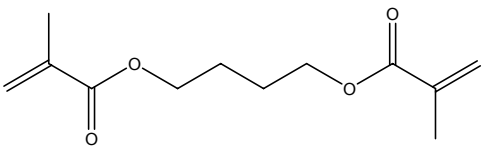
R_1 = H; acrilatos
R_1 = CH_3; metacrilatos
R_2 = cadeia alquílica

FIGURA 1. 1. Estrutura química de acrilatos e metacrilatos.

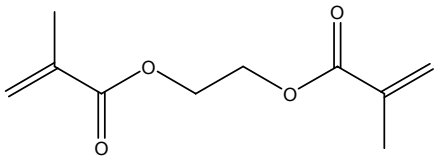
O esqueleto básico de acrilatos e metacrilatos é o mesmo, sendo que a diferença entre as duas classes químicas é o substituinte R_1, que será –H para acrilatos e $–CH_3$ para metacrilatos[32].

Na tentativa de compreender como metacrilatos e acrilatos reagem no meio biológico e quais as relações com suas respectivas toxicidades, FREIDIG *et al*[35] testaram a reatividade de compostos metacrilatos e acrilatos, frente a três diferentes nucleófilos, como água (H_2O), ânion hidroxila (HO^-) e glutationa.

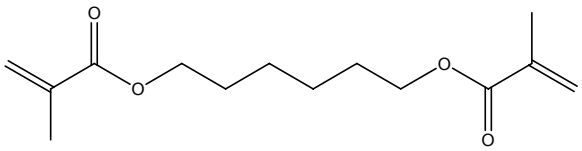
Na procura por monômeros altamente reativos, que ofereçam quantidade mínima de resíduos de monômero e que, simultaneamente, apresentem boas propriedades mecânicas e físicas, tem sido dada especial atenção a monômeros conhecidos como agentes de ligação cruzada[20] – metacrilatos bifuncionalizados (**Figura 1.2**). Esses compostos apresentam dupla ligação C=C terminal em ambas as extremidades da molécula e podem proporcionar uma resticulação entre os oligômeros formados. O resultado é o aumento da polimerização e uma diminuição da quantidade de monômeros não-reagidos[36,37], influenciando, assim, nas características da resina dentária, na absorção de água e na degradação da mesma[38,39].



dimetacrilato 1,4 - butanodiol - BDMA



dimetacrilato de etanodiol - EDMA



dimetacrilato de 1,6 - hexanodiol - HDMA

FIGURA 1. 2. Estrutura química de alguns dimetacrilatos utilizados em resinas odontológicas.

Os monômeros bifuncionalizados são considerados menos tóxicos do que os monofuncionalizados, devido à menor volatilidade e por apresentarem uma menor difusão nos tecidos biológicos[37].

Como já foi descrito, alguns autores afirmam que teores acima de 15% desses agentes, na composição de uma resina, podem prejudicar as propriedades mecânicas da mesma. Em contraponto a isso, ARIMA *et al* realizaram um estudo demonstrando que há diversas vantagens em utilizar altas porcentagens de agentes de ligação cruzada, pois proporcionam, além de uma melhora nas propriedades mecânicas da resina[2,40], uma diminuição na absorção de água[38].

Mesmo com o desenvolvimento dos monômeros bifuncionalizados, a maioria das resinas comerciais utiliza uma mistura de monômeros monofuncionalizados e bifuncionalizados. Da mesma forma, a busca por monômeros monofuncionalizados, que possam apresentar uma boa polimerização, também tem sido alvo da indústria de resinas acrílicas. Na **Figura 1.3** tem-se alguns monômeros monofuncionalizados na composição dos líquidos das resinas.

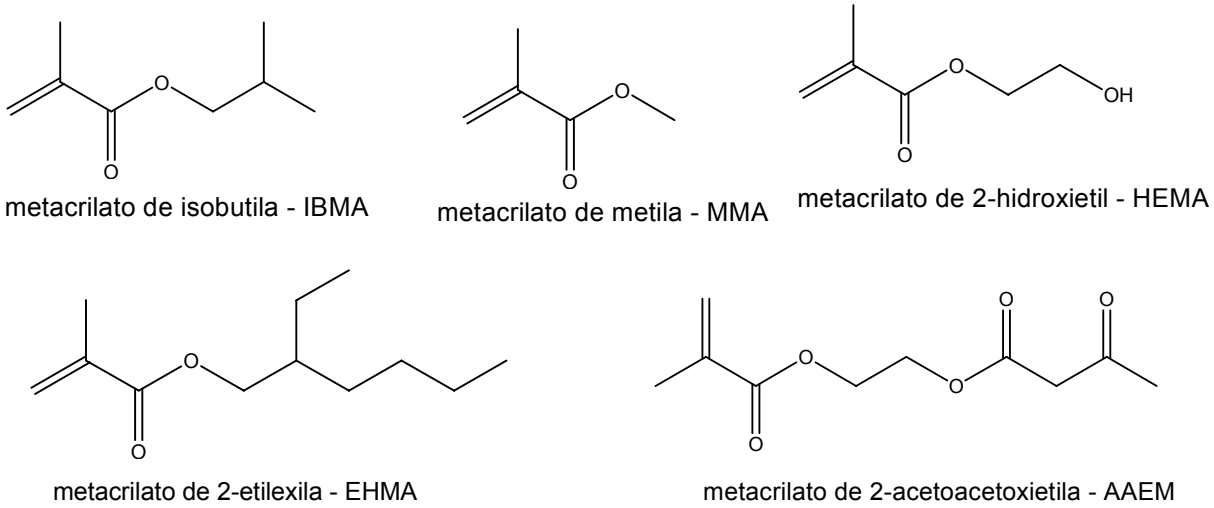


FIGURA 1. 3. Estrutura química de alguns metacrilatos utilizados em resinas odontológicas.

Além do desenvolvimento de novos monômeros para resinas acrílicas autopolimerizáveis, alguns autores propõem a realização de um tratamento pós-polimerização, que possa minimizar a quantidade de monômeros residuais[41-44]. LUNG *et al*[45] discutem que é inevitável a presença de monômeros nestas reações de polimerização, para base de próteses à base de metacrilato de metila (MMA) e, como alternativa, testaram um tratamento pós-polimerização, através da imersão do material em água durante 3 horas a 70°C. A análise desses resultados mostrou uma significativa diminuição na quantidade de monômeros após o tratamento.

1.5. Análise de resíduos de monômeros e o estado da arte

As primeiras análises de resíduos de monômeros, a partir de resinas com aplicação odontológica, começaram em 1980 BASKER e AUSTIN[6] avaliaram a porcentagem de MMA em duas resinas acrílicas comercias por cromatografia gasosa (CG) e espectrofotometria de infravermelho (IV). Os autores descrevem um processo de extração de monômeros, a partir de uma pequena quantidade da resina. O processo de extração foi realizado em banho de gelo, permanecendo em refluxo durante uma hora aproximadamente. Neste estudo, os autores encontraram alta porcentagem de MMA residuais.

SZABÓ *et al*[44] avaliaram a quantidade de monômeros utilizando a técnica de CG para três diferentes tipos de resinas acrílicas. Os autores fizeram a comparação da quantidade de monômeros extraídos, a partir de resinas auto, termo

e fotopolimerizáveis. Observou-se que as resinas ativadas por radiação ultravioleta apresentaram uma menor quantidade de monômeros residuais.

Em 1988, BAKER *et al*[7] foram os primeiros a desenvolver um método para avaliar a quantidade de MMA em fluidos biológicos, tais como; saliva, sangue e urina utilizando CG. Os autores relataram dificuldades em realizar as análises do composto em saliva, uma vez que o tempo de meio-vida, neste fluido, a 37°C, era de, aproximadamente, 1 hora; tendo ocorrido uma diminuição para 10% da concentração inicial depois de 19 horas de imersão. Os autores relataram também que não foi possível analisar o composto em sangue e em urina, devido à presença de impurezas nestes fluidos, as quais interferiram na análise do composto.

Em 1990, KODA *et al*[46] avaliaram a liberação de MMA, ácido metacrílico e ácido benzóico, a partir de resinas acrílicas para bases de próteses em saliva artificial, utilizando, pela primeira vez, cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). As liberações foram avaliadas em diferentes pH's a 37°C.

LYGRE *et al*, em 1993[9], utilizaram a técnica de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM) para identificar aditivos orgânicos e quantificar ésteres ftalatos liberados a partir de bases de próteses. Em seguida, utilizando as mesmas técnicas, avaliaram os possíveis produtos de degradação[12].

VALLITTU *et al*[8], em 1995, avaliaram a liberação de MMA em água, a partir de base de prótese, utilizando CLAE. A extração dos monômeros foi realizada em duas temperaturas diferentes a 22°C e 37°C, utilizando Tetraidrofurano (THF) como solvente extrator.

Em 2000, BARTOLONI *et al*[29] desenvolveram um método para determinação de monômeros residuais em resinas termopolimerizáveis utilizando a técnica de IV. A determinação dos monômeros foi feita monitorando a intensidade da banda de estiramento axial C=C em 1636 cm^{-1}, antes e depois da reação de polimerização, obtendo-se assim uma relação conhecida como grau de conversão, a qual expressa quanto de monômero foi convertido em polímero.

Em 2004, DARVELL e LUNG[47] desenvolveram e validaram um método para quantificar MMA utilizando CG. Até então, não havia técnicas para a quantificação de MMA, ou seja, os métodos desenvolvidos eram apenas qualitativos e qualquer tentativa de quantificação era baseada em porcentagens de bandas cromatográficas.

Em 2006, URBAN *et al*[48] desenvolveram métodos para a determinação e quantificação de quatro monômeros residuais, sendo estes: MMA, metacrilato de butila (BMA), metacrilato de isobutila (IBMA) e dimetacrilato de hexila (HDMA), os quais foram extraídos de cinco resinas acrílicas comerciais e analisados por CLAE. Após este trabalho, em 2007, URBAN *et al*[42] realizaram novos estudos, nos quais foi observada a influência do tratamento de pós-polimerização em resinas acrílicas na redução da quantidade de monômeros residuais. Os tratamentos de pós-polimerização testados foram de radiação de microondas e banho de água aquecida, e as análises também foram realizadas por CLAE[49].

Como é possível observar, a análise de resíduos de monômeros tem crescido, ao longo dos anos, de acordo com as possibilidades de análises mais rápidas e mais precisas. Inicialmente, fazia-se o uso de CG e IV, que proporcionavam uma análise rápida, embora com algumas limitações para a quantificação de monômeros. Em seguida, veio a utilização de outras técnicas, como CLAE, que proporcionam o desenvolvimento de métodos mais rápidos e precisos.

Os métodos desenvolvidos utilizando CG tiveram uma grande contribuição para a determinação de MMA, como monômero residual, a partir de base de próteses. Porém, atualmente, com o desenvolvimento de diversas composições de resinas odontológicas, existe uma variedade de monômeros que são usados e não podem ser analisados por CG, diferentemente do MMA, pois se degradam com facilidade em altas temperaturas.

Os métodos desenvolvidos, utilizando IV, apresentam, por sua vez, algumas limitações, pois em concentrações mais altas existem desvios de comportamento em relação à lei de Beer; além disso, pode haver sobreposição de bandas em espectros mais complexos[47], sendo que a análise de monômeros fica limitada a resinas foto e termopolimerizáveis.

Neste sentido, os métodos desenvolvidos por CLAE[8,15,28,42,48,50,51] destacam-se, não só por apresentarem a capacidade de quantificar os monômeros a partir de resinas acrílicas autopolimerizáveis, mas também por auxiliar no desenvolvimento de novas resinas comerciais. Até o momento, apenas propriedades físicas e mecânicas da resina são levadas em consideração para tal desenvolvimento.

1.6. A importância da saliva na saúde bucal e a saliva artificial

A saliva é um fluido presente em toda a cavidade oral e desempenha um papel importante para a saúde bucal[52-54]. Uma alteração na sua composição, ou a falta de produção da mesma (xerostomia)[54], pode resultar em dores na língua e na mucosa bucal, alterações no paladar, dificuldades na deglutinação e mastigação, perda de dentes e aumento do risco de infecção bucal[52].

Assim, a saliva tem como principais funções: a contribuição para a digestão de alimentos, a defesa contra bactérias, vírus e fungos e a proteção da cavidade bucal (lubrificação, remineralização do dente e camada de proteção à mucosa)[53].

A importância da saliva está diretamente relacionada à sua composição. A saliva é composta por uma variedade de íons inorgânicos, como: sódio, cloreto, potássio, cálcio, amônio, bicarbonato e fosfato. Ela é composta também por anticorpos, proteínas, enzimas e uréia[53].

Cada componente da saliva tem a sua contribuição para a manutenção da saúde bucal de um indivíduo. Os íons bicarbonato, fosfato e uréia atuam como agentes reguladores de pH e são responsáveis pela capacidade tamponante da saliva. As proteínas atuam na higiene bucal, ligando-se a alguns microorganismos e contribuindo para a não formação de placas bacterianas. Os íons cálcio e fosfato atuam, em conjunto, com algumas proteínas para evitar a desmineralização e contribuir para a remineralização dos dentes. Por fim as enzimas, proteínas e anticorpos atuam como agentes antibactericidas[53].

As análises de saliva, que têm o intuito de descobrir qualquer alteração na composição da mesma, servem de guia para identificar patologias como a diabete[55], bem como identificar a má-nutrição protéica[56]. Além disso, a saliva é uma matriz biológica muito utilizada em análises químicas nas áreas forense[57,58], toxicológica[17], farmacêutica[59] e odontológica[7,17], pois é de fácil obtenção, exige pouco pré-tratamento e diversos compostos são facilmente solubilizados por ela.

A utilização de saliva natural, para o desenvolvimento de métodos de análise, torna-se, em muitos casos, de difícil execução, uma vez que implica na necessidade de aprovações legais de comitês de ética. Sendo assim, diversos grupos de pesquisa utilizam Materiais de Referência Certificados (SRM – Standard Reference Materials) ou matrizes artificiais disponíveis comercialmente, tais como:

sangue, urina, cabelo, solo, água do mar, alimento e etc. Estes materiais são produzidos por laboratórios altamente qualificados, como NIST (National Institute of Standards and Technology), NPL (National Physical Laboratory), PTB (Physikalisch-Technische Bundesanstalt), BCR (Bureau Communautaire de Reference), reproduzindo, com um bom intervalo de confiança, os valores de análises realizadas com matrizes naturais.

A saliva artificial não existe como material de referência certificado. Por isso, existem diversas composições de saliva artificial que são utilizadas para análises podendo ou não reproduzir dados de análises realizadas em saliva natural. Em 1963, FUSAYAMA *et al* utilizaram uma composição de saliva artificial para analisar o processo de corrosão de amálgama de ouro *in vitro* e desde então essa composição tem sido muito utilizada na área odontológica. Atualmente, diversas composições de saliva artificial tem-se baseado na composição determinada por FUSAYAMA *et al*, com algumas alterações como pode ser observado na **Tabela 1.1**.

TABELA 1. 1. Diferentes composições de saliva artificial.

	FUSAYAMA *et al*[60]	ELLICKSON *et al*[61]	LYGRE *et al*[12]	TSUCHIYA *et al*[10]
NaCl	$6,80 \times 10^{-3}$ M	$7,00 \times 10^{-3}$ M	$6,90 \times 10^{-1}$ M	$1,00 \times 10^{-3}$ M
KCl	$5,40 \times 10^{-3}$ M	$5,00 \times 10^{-3}$ M	1,19 M	$7,00 \times 10^{-4}$ M
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	$5,40 \times 10^{-3}$ M	$5,00 \times 10^{-3}$ M	$7,60 \times 10^{-3}$ M	-
$NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$	$5,00 \times 10^{-3}$ M	$4,00 \times 10^{-3}$ M	-	$4,00 \times 10^{-4}$ M
$Na_2S \cdot 9H_2O$	$2,00 \times 10^{-5}$ M	-	-	-
Uréia	$1,60 \times 10^{-2}$ M	$1,70 \times 10^{-2}$ M	-	-
água destilada	$1,00 \times 10^{3}$ mL	$1,00 \times 10^{3}$ mL	$1,00 \times 10^{3}$ mL	$1,00 \times 10^{3}$ mL
mucina	-	0,4% m/v	-	-
$CaSO_4$	-		-	$3,00 \times 10^{-4}$ M
KH_2PO_4	-		-	$4,00 \times 10^{-4}$ M

A composição da saliva artificial difere da saliva natural, uma vez que a primeira é composta, basicamente, por sais inorgânicos, com exceção da descrita por ELLICKSON *et al* que contém mucina. Já a saliva natural apresenta, além de sais inorgânicos, proteínas, enzimas e anti-corpos. Desta forma, a diversidade na composição da saliva artificial tem uma relação direta com o tipo de análise

envolvida. Para análises por por CG e/ou CLAE, normalmente utiliza-se saliva artificial que contenha apenas sais inorgânicos e uréia. Sendo assim, como em outros trabalhos que avaliaram a liberação de monômeros a partir de resinas dentárias em saliva artificial[10,12,46], para este trabalho foi utilizada a saliva artificial baseada na composição de FUSAYAMA *et al*.

1.7. Validação de métodos analíticos por CLAE

A validação de um método analítico é um processo contínuo, onde se determina a capacidade do mesmo em fornecer os resultados para o qual foi desenvolvido. Ela deve-se iniciar no planejamento da estratégia analítica, continuando ao longo de todo o desenvolvimento [62,63].

O conceito de validação é algo que está em constante evolução, e a existência de diferentes órgãos reguladores faz com que existam diferentes definições. Os principais órgãos reguladores são: (internacionais) – FDA (Food and Drug Administration), USP (United States Pharmacopeia) e ICH (International Conference on Harmonization); (nacionais) – ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) e INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial). Estes órgãos disponibilizam os seus guias para validação de métodos analíticos por CLAE, em cujas diretrizes percebem-se diferenças conceituais, tais como:

- A validação de métodos assegura a credibilidade destes, durante o uso rotineiro, sendo por vezes mencionado como o processo que fornece uma evidência documentada, que comprova que o método atinge o objetivo para o qual foi indicado (USP)[64];
- O objetivo de validação de um procedimento analítico é demonstrar que o método é satisfatório para seu propósito planejado (ICH)[65];
- A validação de um método é o processo no qual ele é avaliado quanto à sua confiabilidade, exatidão e precisão (FDA-US)[66];
- Comprovação, através do fornecimento de evidência objetiva, de que os requisitos para uma aplicação ou uso específicos pretendidos foram atendidos (INMETRO)[67];

- A validação deve garantir, através de estudos experimentais, que o método atende as exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados (ANVISA)[68].

Assim, para que um novo método analítico gere informações confiáveis e interpretáveis sobre uma determinada amostra, ele deverá passar pelo processo denominado de validação.

A validação de métodos analíticos, por CLAE, é algo bem comum e rotineiro, principalmente quando se tratam de matrizes, como por exemplo, alimentos e fluidos biológicos para diferentes analitos. Porém, quando se tratam de amostras odontológicas, como é o caso deste trabalho, é possível encontrar algumas informações sobre como desenvolver e validar métodos para análise de resinas dentárias, os quais se mostram bem limitados.

Um dos documentos no qual é possível se basear, para desenvolver métodos para análise de monômeros de resinas dentárias, é um dos anexos do International Standard (ISO/FDIS 1567 – 1998), denominado “HPLC method for determination of MMA content”, no qual está descrito um procedimento para extração e análise de MMA. Neste procedimento é recomendado que a extração do monômero seja realizada durante 72 ± 2 horas, à temperatura ambiente, em três diferentes soluções: a primeira, contendo apenas metanol, a segunda contendo acetona e a terceira contendo uma mistura de acetona e metanol. Além disso, assume-se que a construção da curva analítica é suficiente para a validação do método.

Portanto, a ISO/FDIS 1567 é um guia que apresenta algumas limitações, visto que o método desenvolvido é destinado apenas à determinação de MMA e, atualmente, existem outros monômeros nas diversas composições de resinas dentárias. Além disso, o tempo de extração proposto (72 horas) tem sido questionado por diversos trabalhos, demonstrando que 2 e 4 horas de extração é considerado tempo mais que suficiente para extrair uma alta porcentagem de monômeros não-reagidos[48].

Desta forma, este trabalho pode contribuir para o desenvolvimento e validação de um método que possa servir de guia para a análise de diversas resinas dentárias, utilizando CLAE.

Durante o desenvolvimento e validação de um método analítico, são avaliados diversos parâmetros como exatidão, precisão, seletividade, limite de detecção, limite de quantificação, linearidade, robustez e estabilidade. De acordo com a ANVISA[68], os intervalos de aceitação destes parâmetros, principalmente para a precisão e exatidão, podem variar de acordo com o tipo de matriz no qual o método está sendo desenvolvido. Desta forma, são considerados dois tipos de métodos distintos a serem desenvolvidos e validados: analítico e bioanalítico.

Os métodos analíticos são considerados aqueles nos quais as amostras são preparadas em solventes.

Os métodos bioanalíticos são aqueles nos quais as amostras são preparadas em matrizes complexas, tais como sangue, soro, plasma ou urina, nas quais se pode observar um alto grau de variabilidade.

Portanto, foram desenvolvidos, para este trabalho, os dois tipos de métodos e em ambos foram avaliados os parâmetros acima citados.

1.7.1. Seletividade

Seletividade é a habilidade para avaliar o analito, na presença de componentes que podem estar presentes na análise, tais como: impurezas, produtos de degradação e componentes de matriz[64,65].

1.7.2. Linearidade

A linearidade de um procedimento analítico é a habilidade de se extrairem resultados de uma análise, que são, diretamente ou por meio de uma transformação matemática, proporcionais à concentração do analito em uma determinada amostra, dentro de um determinado intervalo[64].

1.7.3. Exatidão

Exatidão é a proximidade de um resultado adquirido pelo método em relação ao seu valor real[62,64,69].

A exatidão de um método pode ser determinada de quatro maneiras distintas: a) pela análise de uma amostra de concentração conhecida (material de

referência), comparando o resultado obtido com o valor nominal; b) através da comparação dos resultados obtidos pelo novo método com um pré-existente, que esteja estabelecido e considerado exato; c) através da recuperação de uma quantidade conhecida do analito, adicionada à matriz; d) através do método de adição de padrão, utilizada quando não é possível preparar uma amostra sem a presença do analito.

1.7.4. Precisão

A precisão é a avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas, de uma amostragem múltipla, de uma mesma amostra, sendo que esta pode ser classificada em três níveis[68]:

- Precisão intra-corrida (repetibilidade): é a concordância entre os resultados, dentro de um curto período de tempo, com o mesmo analista e a mesma instrumentação. A repetibilidade do método é verificada por, no mínimo, nove determinações contemplando o intervalo linear do método, ou seja, três concentrações (baixa, média e alta), com três réplicas cada, ou mínimo de seis determinações a 100% da concentração teste[68];
- Precisão inter-corridas (precisão intermediária): é a concordância entre os resultados do mesmo laboratório, mas obtidos em dias diferentes, com analistas diferentes e/ou com equipamentos diferentes. Para a sua determinação recomenda-se, no mínimo, dois dias diferentes, com analistas diferentes[68];
- Precisão inter-laboratorial (reprodutibilidade): é a avaliação da concordância entre os resultados obtidos em laboratórios diferentes. A reprodutibilidade é um parâmetro importante em estudos colaborativos, como ocorre geralmente em padronização de métodos analíticos, por exemplo para a inclusão em farmacopéias[68].

A precisão de um método analítico é expressa em porcentagem pelo desvio padrão relativo (RSD)[62,64,65] ou coeficiente de variação (CV%) de uma série de medidas[68].

1.7.5. Robustez

A robustez de um procedimento analítico é um parâmetro da validação que determina o efeito provocado por pequenas mudanças no método. Portanto, para este parâmetro, avalia-se a influência de pequenas variações nas condições cromatográficas de análise, indicando o grau de confiança no seu uso rotineiro[64,65].

A robustez pode ser determinada durante o desenvolvimento do procedimento analítico[64].

1.7.6. Limite de quantificação (LQ)

O limite de quantificação é a menor concentração de um analito numa amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis ao método analítico a ser desenvolvido[64-66].

De acordo com a ICH e a USP, o limite de quantificação pode ser expresso pela relação de 10:1 sinal/ruído[64,65]. Porém, o FDA afirma que este procedimento de determinação não é indicado, uma vez que o nível de ruído é diferente entre os detectores[66]. Desta forma, o método mais recomendado é o preparo de uma amostra de concentração conhecida, sucessivamente diluída e analisada, até que a determinação de sua concentração, pelo sinal instrumental, não esteja dentro do intervalo de variação permitido para o método.

1.7.7. Limite de detecção (LD)

O limite de detecção é a menor concentração detectável do analito, através do método proposto. De acordo com a ICH e a USP, o limite de detecção pode ser expresso pela relação de 3:1 sinal/ruído[64,65].

Objetivos

Está sem mulher,
está sem discurso,
está sem carinho,
já não pode beber,
já não pode fumar,
cuspir já não pode,
a noite esfriou,
o dia não veio,
o bonde não veio,
o riso não veio,
não veio a utopia
e tudo acabou
e tudo fugiu
e tudo mofou,
e agora, José?

Carlos Drummond de Andrade – José – Segunda estrofe

2. Objetivos

Objetivo Geral:

Realizar o desenvolvimento e a aplicação de métodos, por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), para extração e quantificação de monômeros, a partir de resinas acrílicas autopolimeráveis para reembasamento imediato e avaliação da liberação *in vitro* de metacrilatos.

Objetivos Específicos:

- Desenvolver, validar e aplicar métodos para extração, análise e quantificação de metacrilatos, em uma resina acrílica comercial (Tokuyama Rebase) autopolimerizável e em três resinas experimentais (Vipi Ltda. Materiais Odontológicos);
- Desenvolver e validar métodos por CLAE para avaliar a liberação de metacrilatos em saliva artificial.

Procedimento Experimental

E agora, José?
Sua doce palavra,
seu instante de febre,
sua gula e jejum,
sua biblioteca,
sua lavra de ouro,
seu terno de vidro,
sua incoerência,
seu ódio – e agora?

Carlos Drummond de Andrade – José – Terceira estrofe

3. Procedimento Experimental

3.1. Generalidades

Todos os experimentos analíticos foram realizados no Grupo de Síntese Orgânica e CLAE do Departamento de Química-UFSCar.

Foi utilizada uma empacotadora SHANDON® para o empacotamento das colunas cromatográficas.

Nas análises cromatográficas realizadas, utilizou-se um cromatógrafo líquido de alta eficiência SHIMADZU®, composto por duas bombas LC-10AD*vp*, um detector de ultravioleta de comprimento de onda variável SPD-10A*vp* e um auto-injetor SIL 10-AF. O equipamento estava acoplado a uma interface SPD-10A *vp* e os cromatogramas foram registrados através do *software* LC 10.

As medidas de absorção molecular, na região do UV-visível, foram realizadas utilizando-se um espectrofotômetro HP8452A, com uma cela de quartzo de 10 mm de caminho óptico.

A água utilizada no preparo das fases móveis foi obtida em um sistema MILLI-Q® (MILLIPORE).

Os solventes de grau HPLC (MALLINCKRODT, J. T. BAKER, TEDIA), utilizados nas análises, fornecidos pela empresa HEXIS. Os solventes utilizados no preparo das fases móveis foram filtrados, a vácuo, em um sistema MILLIPORE®, utilizando-se membranas de nylon PHENOMENEX® de 0,45 µm e posteriormente degaseificados em ultrasom COLE-PALMER® 8852.

Os demais reagentes químicos foram de diversas marcas: o monômero metacrilato de acetoacetoxietila (ACROS ORGANICS, 95%), a resina comercial TOKUYAMA REBASE II FAST (pó – lote 610 e líquido – lote 416, TOKUYAMA DENTAL CORPORATION, Japão), os monômeros metacrilato de cicloexila, metacrilato de etila, dimetacrilato de butila e as três resinas experimentais foram todos fornecidos pela empresa VIPI Indústria Comércio Exportação e Importação de Produtos Odontológicos Ltda (Pirassununga, SP).

Para a pesagem dos reagentes foi utilizada balança analítica AND modelo HR200 com precisão de ± 0,1 mg e uma balança semi-analítica MARTE® (BALANÇAS E EQUIPAMENTOS, Brazil) com precisão de 0,01 g.

As micropipetas utilizadas no preparo das amostras foram GILSON®. As amostras de extração dos monômeros foram centrifugadas utilizando-se uma

centrífuga JOUAN B4*i*/BR4*i* termostatizada. A homogeneização das amostras foi realizada em vórtex LabDancer (IKA).

Para a confecção do corpo-de-prova utilizou-se uma prensa hidráulica PM-2000 (TECHNO MÁQUINAS – Pirassununga, SP).

Para a extração dos monômeros foi utilizado um agitador magnético Stirrer/Hotplate (CORNING) e um micromotor elétrico LB-2000 (BELTEC) para obtenção das raspas das resinas.

Para a análise da liberação dos monômeros, em saliva artificial, foi utilizada uma estufa microbiológica (NOVA ÉTICA).

3.2. Preparo da coluna analítica

A Sílica ODS-Nucleosil® (5 µm, 100 Å) foi suspensa em 50 mL de MeOH, agitada em ultrassom durante 3 min e empacotada em uma coluna de aço inoxidável, (15,0 x 0,46 cm D.I.) sob pressão, de aproximadamente, 7.500 psi utilizando-se metanol como solvente.

Após esse procedimento, a coluna foi condicionada com MeOH, a uma vazão de 1,0 mL/min, por aproximadamente 12 h.

3.3. Confecção do corpo-de-prova

Com o intuito de se obter corpos-de-prova com as dimensões preconizadas na INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION SPECIFICATION 1567[70], foram utilizadas matrizes circulares, em aço inoxidável, com 50 mm de diâmetro e 2,0 ± 0,1 mm de profundidade, com tampa e sulco laterais, de forma a facilitar o escoamento do material.

Para a confecção dos corpos-de-prova, o material foi confeccionado seguindo-se as instruções dos respectivos fabricantes, sendo o pó pesado e o líquido mensurado com o auxílio de micropipetas. Uma vez estabelecida a proporção necessária de material, o pó e o líquido foram misturados em um frasco de vidro para resina, sendo manipulados durante 30 segundos com o auxílio de uma espátula de aço.

Em seguida, o frasco foi fechado, tendo-se aguardado o período de 1 minuto. O material foi então inserido no interior da matriz metálica, fechada e

posicionada na prensa hidráulica, mantendo-se a uma carga de 1,0 t à temperatura ambiente (25ºC).

Após aproximadamente 5 minutos, as matrizes foram resfriadas antes da remoção dos corpos-de-prova.

3.4. Determinação das condições de extração dos monômeros

Inicialmente, foram removidas as regiões periféricas dos corpos-de-prova, com a utilização de um fórceps odontológico. Após este procedimento, foram fragmentadas partes dos corpos-de-prova, com o auxílio de um martelo[42], enquanto que outras partes foram raspadas com o auxílio do micromotor elétrico[6]. A seguir, os fragmentos e raspas obtidos foram pesados, de forma a obter três amostras de 100 mg cada[6,42].

Em seguida, as amostras foram colocadas em um balão de fundo redondo de 25 mL e adicionou-se 2,0 mL de solvente. Os balões de fundo redondo foram envolvidos com papel alumínio, efetuando-se uma extração sob banho de gelo e agitação magnética.

Após a extração, adicionou-se mais 2,0 mL de solvente e transferiu-se todo o líquido para um tubo Falcon. A solução obtida foi centrifugada durante 10 min, a uma velocidade de 10000 rpm, a 20°C. Retirou-se uma alíquota de 200 µL do sobrenadante e adicionou-se 200 µL da fase móvel. A amostra obtida foi analisada por CLAE. Este procedimento foi realizado durante 6 dias consecutivos, com a preparação de 1 corpo-de-prova, por dia, tendo-se coletado 3 amostras de 100 mg de raspas da resina.

Foram usadas soluções padrão dos monômeros, de concentrações conhecidas, com o intuito de se encontrar as condições cromatográficas para a análise dos monômeros extraídos das resinas

Os monômeros usados como padrões foram: o metacrilato de acetoacetoxietila (AAEM) para a resina comercial TOKUYAMA REBASE II FAST e metacrilato de cicloexila (CHMA), dimetacrilato de 1,4 butanodiol (BDMA) e dimetacrilato de etanodiol (EDMA), para as resinas experimentais da empresa VIPI.

Após determinar as condições cromatográficas para separação dos metacrilatos das resinas comercial e experimental e após a otimização das condições de extração, os métodos cromatográficos foram validados e determinados

os parâmetros de linearidade, precisão e exatidão, limites de quantificação e detecção, estabilidade, recuperação e teste cego. Os conteúdos dos monômeros das resinas acrílicas foram mensurados, utilizando-se a equação de regressão linear obtida por meio de curva analítica.

3.5. Análise da liberação *in vitro* dos monômeros

Logo após a confecção, cada corpo-de-prova foi imerso individualmente em um recipiente de plástico fechado contendo 20 mL de saliva artificial, adquirida na farmácia de manipulação AMAZON (São Carlos, SP) mantida em uma estufa a 37 ºC.

Após os períodos de 1 h, 3 h, 5 h, 24 h, 3 dias, 7 dias, 14 dias e 30 dias[60], foram removidas alíquotas da solução de imersão, injetadas no sistema cromatográfico e os monômeros liberados foram identificados e quantificados. É importante salientar que, após a remoção das alíquotas, nos diferentes períodos de análise, a saliva artificial foi descartada e renovada para mimetizar o ambiente bucal.

Foram desenvolvidas condições cromatográficas de separação para a avaliação da liberação de monômeros, a partir das resinas em saliva artificial. O método desenvolvido foi validado, seguindo os mesmos parâmetros citados anteriormente.

3.6. Desenvolvimento dos métodos cromatográficos

Para os métodos analíticos, os padrões de calibração e controle de qualidade do método foram preparados em metanol e a precisão foi expressa pelo coeficiente de variação (CV%) das quintuplicatas, não sendo superior a 2%. A exatidão foi calculada pela razão da média das concentrações nominais, tendo sido expressa em percentagem, não sendo superior a uma variação de ± 5%[68].

Para o método bioanalítico, os padrões de calibração e controle de qualidade do método foram preparados em saliva artificial e a precisão também foi expressa pelo coeficiente de variação (CV%) das quintuplicatas, cujo limite de aceitação é 15%. A exatidão foi calculada pela razão da média das concentrações nominais e foi expressa em percentagem cujo limite de aceitação é de 15%, exceto para o limite de quantificação que pode ser até 20%.

3.6.1. Preparo das soluções padrões do AAEM em solvente

Para o desenvolvimento do método analítico para análise da extração do AAEM, foi preparada inicialmente uma solução estoque com concentração de 0,56 g/mL para o AAEM, através da diluição de 2,50 mL de AAEM em metanol, tendo-se obtido-se um volume final de 5,00 mL, em um balão volumétrico.

Desta maneira, as soluções padrão de calibração e as soluções padrão de controle de qualidade foram obtidas a partir da solução estoque, nas seguintes concentrações:

- Solução de trabalho para a calibração: 2,80; 5,60; 8,40; 9,60; 11,2; 12,6; 14,0 e 16,8 mg/mL;
- Para os controles de qualidade: 3,36; 6,72 e 13,4 mg/mL.

Os valores de concentração dos controles de qualidade do método foram calculados da seguinte forma:

1- O controle de qualidade de concentração mais baixa, em torno de 110 - 120%, em relação à menor concentração da curva analítica;

2- O controle de qualidade de concentração média, em torno de 40 - 60%, em relação à maior concentração da curva analítica;

3- O controle de qualidade de concentração alta, em torno de 75 - 95%, em relação à maior concentração da curva analítica.

3.6.2. Preparo das soluções de calibração e controle de qualidade para o AAEM em solvente

As soluções de calibração foram preparadas em triplicata, nas seguintes concentrações: 28,0; 56,0; 84,0; 96,0; 112; 126; 140 e 168µg/mL. Estas concentrações foram preparadas a partir de uma solução estoque de 0,56 g/mL, tendo-se retirado 25,0; 50,0; 75,0; 87,5; 100; 112; 125 e 150 µL, transferidas para um balão de 5,00 mL, obtendo-se assim as soluções de trabalho nas concentrações de 2,80; 5,60; 8,40; 9,60; 11,2; 12,6; 14,0; 16,8 mg/mL. A partir das soluções de trabalho, retirou-se 10,0 µL e colocou-se em um tubo de ensaio, completando com solvente, tendo-se obtido um volume final de 1,00 mL, para cada concentração.

As soluções de calibração para o controle de qualidade também foram preparadas a partir da mesma solução estoque de concentração de 0,56 g/mL, pipetando-se 30,0, 60,0 e 120 µL para a preparação das soluções de trabalho nas concentrações de 3,36, 6,72 e 13,4 mg/mL, respectivamente em um balão volumétrico de 5,00 mL. Em seguida, retirou-se 10,0 µL e colocou-se em um tubo de ensaio, completando com solvente, obtendo-se um volume final de 1,00 mL para cada concentração.

As condições cromatográficas utilizadas foram:

- Fase móvel CH_3CN/H_2O (35:65 v/v);
- Comprimento de onda para a detecção do AAEM foi λ = 230 nm;
- Volume de injeção foi 25 µL;
- Vazão de 1 mL/min;
- Tempo total de cada análise foi 10 minutos;
- Coluna analítica C_{18}-Nucleosil (15 x 0,46 cm d.i., 100 Å, 5µm).

3.6.3. Preparo das soluções padrões de AAEM em saliva artificial

Para o desenvolvimento do método analítico para análise da liberação do AAEM, foi preparada inicialmente uma solução estoque na concentração de 50,0 mg/mL para o AAEM, através da diluição de 446 µL de AAEM em metanol, obtendo-se um volume final de 10,0 mL em um balão volumétrico.

Desta maneira, as soluções padrão de calibração e as soluções padrão de controle de qualidade foram obtidas a partir da solução estoque, nas seguintes concentrações:

- Solução de trabalho para a calibração: 0,50; 1,00; 2,50; 5,00; 7,50; 9,00 e 10,0 mg/mL;
- Para os controles de qualidade: 1,20; 6,00 e 8,50 mg/mL.

3.6.4. Preparo das soluções de calibração e controle de qualidade para o AAEM em saliva artificial

As soluções de calibração foram preparadas em triplicata, nas seguintes concentrações: 5,00; 10,0; 25,0; 50,0; 75,0; 90,0; e 100µg/mL. Estas concentrações foram preparadas em saliva artificial, a partir de uma solução estoque

de 50,0 mg/mL, retirando-se 50,0; 100; 250; 500; 750; 900; e 1000 µL, transferidas para um balão de 5,00 mL, obtendo-se assim as soluções de trabalho nas concentrações de 2,80; 5,60; 8,40; 9,60; 11,2; 12,6; 14,0; 16,8 mg/mL. A partir das soluções de trabalho, retirou-se 10,0 µL e colocou-se em um tubo de ensaio, completando com saliva artificial até um volume final de 1,00 mL para cada concentração.

As soluções de calibração do controle de qualidade também foram preparadas a partir da mesma solução estoque de concentração de 50,0 mg/mL, pipetando-se 120; 600 e 850 µL para a preparação das soluções de trabalho nas concentrações de 1,20; 6,00 e 8,50 mg/mL, respectivamente em um balão volumétrico de 5,00 mL. Em seguida, retirou-se 10,0 µL e colocou-se em um tubo de ensaio, completando com saliva artificial e obtendo um volume final de 1,00 mL para cada concentração.

As condições cromatográficas foram as mesmas determinadas para o monômero preparado em metanol.

3.6.5. Preparo das soluções padrões de BDMA, CHMA e EDMA em solvente

Para o desenvolvimento do método analítico para análise da extração dos monômeros BDMA, CHMA e EDMA a partir das resinas experimentais, foi preparada inicialmente uma solução estoque de cada monômero (ver **Diagrama 4.2** página 51) nas concentrações de 250 mg/mL para o BDMA, 525 mg/mL para o CHMA e 300 mg/mL para EDMA, através da diluição de 571 µL, 488 µL e 1088 µL, respectivamente em metanol, obtendo-se um volume final de 2,00 mL para cada monômero.

Em seguida, preparou-se uma solução estoque, contendo os três monômeros. Para isso, pipetou-se 1000 µL da solução padrão de cada monômero e completou-se com metanol, obtendo-se assim um volume final de 5,00 mL.

A partir dessa solução estoque, contendo os três monômeros, com uma concentração final de 60,0 mg/mL para o EDMA, 50,0 mg/mL para o BDMA e 105 mg/mL para o CHMA, preparou-se as soluções de trabalho nas concentrações de:

- EDMA – 1,20; 1,32; 1,44; 1,56; 1,68; 1,92; 2,16; 2,40 e 3,00 mg/mL;
- BDMA – 1,00; 1,10; 1,20; 1,30; 1,40; 1,60; 1,80; 2,00 e 2,50 mg/mL;

- CHMA – 2,10; 2,31; 2,52; 2,73; 2,94; 3,36; 3,78; 4,20 e 5,25 mg/mL.

E para os controles de qualidade foram:

- EDMA – 1,38; 1,80 e 2,64 mg/mL;
- BDMA – 1,15; 1,50 e 2,20 mg/mL;
- CHMA – 2,41; 3,15 e 4,62 mg/mL.

3.6.6. Preparo das soluções de calibração e controle de qualidade para BDMA, CHMA e EDMA em solvente

As soluções de calibração foram preparadas em triplicatas, nas seguintes concentrações: 100; 110; 120; 130; 140; 160; 180; 200 e 250µg/mL para o BDMA, 210; 231; 252; 273; 294; 336; 378; 420 e 525µg/mL para o CHMA e 120; 132; 144; 156; 168; 192; 216; 240 e 300µg/mL para o EDMA. Estas concentrações foram preparadas a partir de uma solução estoque de cada monômero, nas concentrações de 250 mg/mL para o BDMA, 525 mg/mL para o CHMA e 300 mg/mL para EDMA, retirando-se 100; 110; 120; 130; 140; 160; 180; 200 e 250 µL, transferidas para um balão de 5,00 mL obtendo-se assim, as soluções de trabalho nas concentrações de 1,20; 1,32; 1,44; 1,56; 1,68; 1,92; 2,16; 2,40 e 3,00 mg/mL para o EDMA, 1,00; 1,10; 1,20; 1,30; 1,40; 1,60; 1,80; 2,00 e 2,50 mg/mL para o BDMA e 2,10; 2,31; 2,52; 2,73; 2,94; 3,36; 3,78; 4,20 e 5,25 mg/mL para o CHMA. Para a obtenção das soluções de calibração, retirou-se 100 µL, a partir das soluções de trabalho e colocando-se em um tubo de ensaio completando com solvente e obtendo-se um volume final de 1,00 mL para cada concentração.

As soluções de calibração do controle de qualidade também foram preparadas a partir da mesma solução estoque de concentração de 50,0 mg/mL, pipetando-se 115, 150 e 220 µL para a preparação das concentrações 1,38; 1,80 e 2,64 mg/mL para o EDMA, 1,15; 1,50 e 2,20 mg/mL para o BDMA e 2,41; 3,15 e 4,62 mg/mL para o CHMA, respectivamente, em um balão analítico de 5,00 mL. Em seguida, retirou-se 10,0 µL e colocou-se em um tubo de ensaio, completando com solvente, obtendo-se um volume final de 1,00 mL para cada concentração.

As condições cromatográficas foram:

- Fase móvel CH_3CN/H_2O (60:40 v/v);
- Comprimento de onda para a detecção dos monômeros foi λ = 230 nm;
- Vazão de 1 mL/min;
- Volume de injeção de 25 µL;
- Tempo total de cada análise de 15 minutos;
- Coluna analítica C_{18}-Nucleosil (15 x 0,46 cm d.i., 100 Å, 5µm)

3.6.7. Obtenção das curvas analíticas e confirmação das linearidades

As curvas analíticas foram obtidas através da regressão linear considerando a área da banda cromatográfica referente a cada concentração de cada monômero analisado.

Para a confirmação da linearidade no intervalo investigado, foram calculados o coeficiente de correlação (baseado no método dos mínimos quadrados) e o valor de F_{exp}, como descrito por ALMEIDA *et al*[71], foi comparado com o valor de F_{tab} no nível de confiança de 99%[72]. Sendo que os valores de F_{exp} foram menores do que o valor de F_{tab}, confirmando assim a homoscedasticidade.

Resultados e Discussões

Com a chave na mão
quer abrir a porta,
não existe porta;
quer morrer no mar,
mas o mar secou;
quer ir para Minas,
Minas não há mais.
José, e agora?

Carlos Drummond de Andrade – José – Quarta estrofe

4. Resultados e Discussões

4.1. As resinas acrílicas autopolimerizáveis e seus monômeros

Foram adquiridas, para este trabalho, uma resina acrílica autopolimerizável comercial Tokuyama Rebase Fast II (TKY) e três resinas experimentais (RE1, RE2 e RE3). Os monômeros que foram analisados nessas resinas foram: AAEM, BDMA, EDMA e CHMA. O monômero AAEM está presente apenas na resina TKY, enquanto que os outros três monômeros BDMA, EDMA e CHMA estão, em diferentes proporções, nas três resinas experimentais. A **Tabela 4.1** mostra a composição das resinas e a distribuição dos monômeros nas mesmas.

TABELA 4. 1. Composição das resinas acrílicas autopolimerizáveis.

Material	Sigla	Fabricante	Composição	
			pó	líquido
Tokuyama Rebase Fast II	TKY	Tokuyama Dental Corp., Tóquio, Japão.	PEMA + Peróxido de benzoíla	AAEM (59%) e NDMA* (39%)
Resina Experimental 1	RE1	Vipi Ind., Com., Exp. e Imp. Prod. Odont. Ltda, Pirassununga, SP, Brasil.	PEMA + Peróxido de benzoíla	EDMA (50%) e CHMA (50%)
Resina Experimental 2	RE2	Vipi Ind., Com., Exp. e Imp. Prod. Odont. Ltda, Pirassununga, SP, Brasil.	PEMA + Peróxido de benzoíla	BDMA (50%) e EDMA (50%)
Resina Experimental 3	RE3	Vipi Ind., Com., Exp. e Imp. Prod. Odont. Ltda, Pirassununga, SP, Brasil.	PEMA + Peróxido de benzoíla	BDMA (25%), EDMA (50%) e CHMA (25%)

* dimetacrilato de nonila

Inicialmente, foi realizada a análise por espectrofotômetro de ultravioleta de todos os monômeros selecionados, com o intuito de selecionar o

melhor comprimento de onda para a detecção. A **Figura 4.1** apresenta os espectros de UV obtidos.

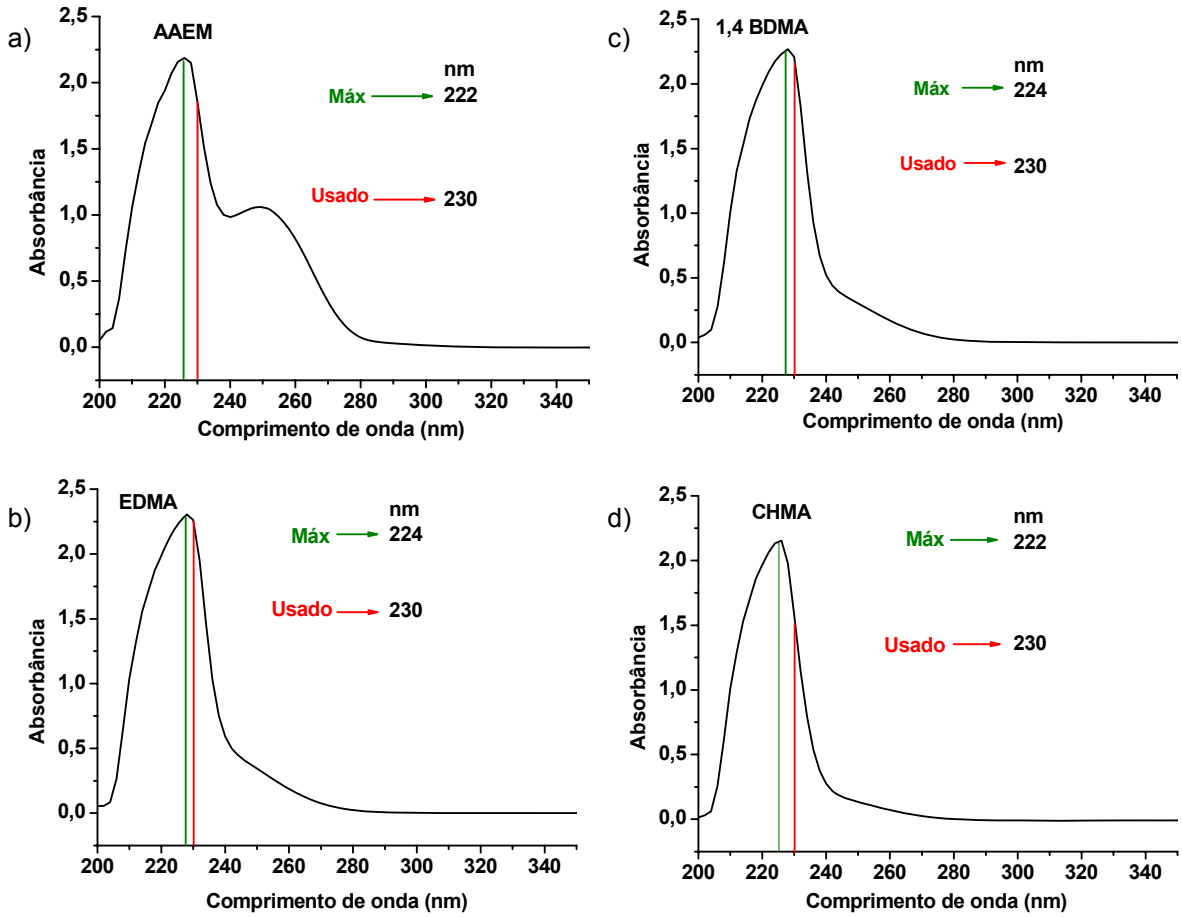


FIGURA 4. 1. Espectros de UV-Vis dos monômeros: a) AAEM; b) EDMA; c) BDMA; d) CHMA. (—) Comprimento de onda de máxima absorção; (—) Comprimento de onda utilizado.

Devido à similaridade estrutural dos monômeros (**Figura 4.2**) os espectros de UV-Vis são, em conseqüência, bastante semelhantes, com exceção do espectro do AAEM, por ser o único composto que apresenta o grupo dicetona.

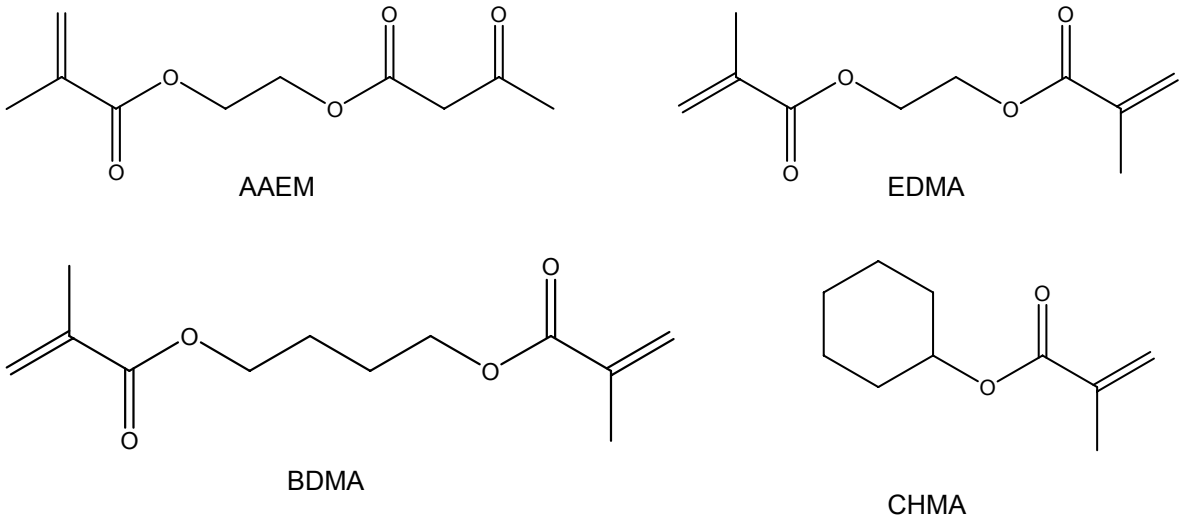


FIGURA 4. 2. Estrutura dos metacrilatos analisados.

Embora o $\lambda_{máx}$ de todos os compostos seja em torno de 223 nm, o comprimento de onda selecionado para as análises cromatográficas foi de 230 nm, evitando dessa forma a interferência da absorção dos solventes da fase móvel (região entre 200 a 220 nm).

4.2. Desenvolvimento do método e determinação de condições para a extração do AAEM a partir da resina acrílica comercial Tokuyama Rebase Fast II

A resina comercial utilizada para o tratamento de reembasamento imediato, Tokuyama Rebase Fast II, foi a escolhida para este estudo, pois é considerada, até ao presente momento, uma das melhores resinas tendo em consideração suas propriedades mecânicas e físicas.

Inicialmente, foram realizadas diversas análises a fim de estabelecer condições adequadas para o desenvolvimento do método cromatográfico. Desta forma, foi preparada uma solução contendo o padrão do monômero AAEM em dois diferentes solventes, mais utilizados em CLAE como modificadores orgânicos - acetonitrila (ACN) e metanol (MeOH). Com o uso desses dois solventes não se observaram diferenças significativas nos cromatogramas, desta maneira optou-se por utilizar o MeOH para o preparo das soluções padrão. A escolha foi feita baseada em diversos trabalhos da literatura que utilizam MeOH como solvente para extrair monômeros de resinas acrílicas[42,48,49,70].

Foram analisadas diferentes composições de fases móveis, a fim de se obter a retenção adequada para analise do monômero AAEM. As fases móveis

avaliadas foram: MeOH:H_2O (70:30 v/v), ACN:H_2O (60:40 v/v), ACN:H_2O (40:60 v/v) e ACN:H_2O (35:65 v/v). Esta última composição de fase móvel foi a selecionada, uma vez que o tempo de retenção do composto foi de 6,5 min (K = 4,4) - **Figura 4.3**.

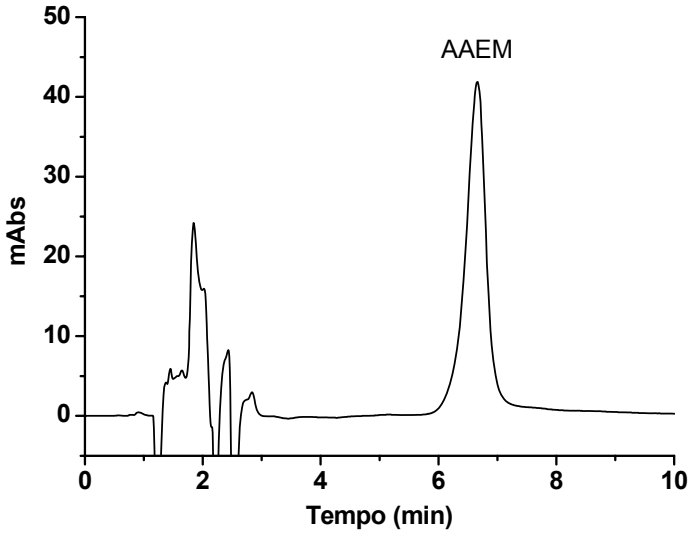


FIGURA 4. 3. Cromatograma da amostra de AAEM em metanol (168µg/mL). Condições cromatográficas: coluna analítica C_{18}-Nucleosil (15 x 0,46 cm d.i., 100 Å, 5µm), fase móvel ACN:H_2O (35:65 v/v); vazão 1,0 mL/min; volume de injeção 25 µL e λ = 230 nm.

Tendo-se selecionado a fase móvel para análise do monômero, foram investigadas as condições de extração do AAEM, a partir da resina TKY. Para isso, avaliaram-se alguns parâmetros, tais como: a forma da resina (fragmentos ou raspas), o solvente e o tempo de extração.

Após a confecção dos corpos de prova (seção 3.3.), retirou-se 100 mg de fragmentos e 100 mg de raspas da região central da resina. Foram realizados seis experimentos, consistindo de três extrações com os solventes MeOH, ACN e THF, a partir dos fragmentos e mais três a partir das raspas.

Os solventes ACN e THF formaram uma emulsão pela dissolução da resina e, portanto o solvente escolhido para a extração foi o metanol.

No que concerne ao formato da resina é possível constatar, pela comparação das intensidades das bandas, que para um mesmo tempo de extração, de 2 horas, foi possível extrair uma quantidade muito maior de AAEM a partir de raspas da resina que de fragmentos. Isto pode ser explicado devido à maior superfície de contato da resina na forma de raspas com o MeOH (solvente extrator).

A **Figura 4.4**, compara duas extrações com diferentes formas da resina. Além disso, é possível observar que outros compostos, além do AAEM, são extraídos a partir de raspas da resina.

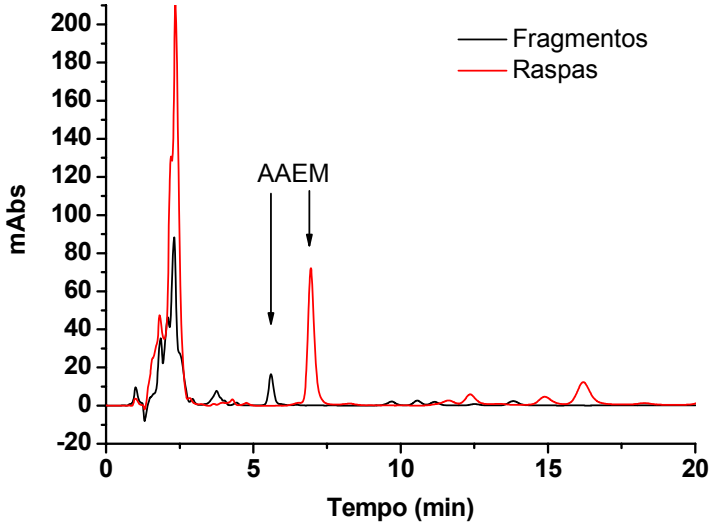


FIGURA 4. 4. Cromatogramas obtidos a partir da análise de amostras de fragmentos e de raspas da resina TKY, submetidas à extração por 2 horas em MeOH. Condições cromatográficas: coluna analítica C_{18}-Nucleosil (15 x 0,46 cm d.i., 100 Å, 5µm); fase móvel: (—) ACN:H_2O (40:60 v/v) e (—) ACN:H_2O (35:65 v/v); vazão 1,0 mL/min; volume de injeção 25 µL e λ = 230 nm.

De acordo com as recomendações da ISO[70], a extração do monômero deve ser realizada durante 72 ± 2 horas, com agitação magnética e em temperatura ambiente. Porém, atualmente existem diversos trabalhos que mostram que 2 horas é tempo suficiente para extrair a maior quantidade dos monômeros[42,48,49]. Portanto, as amostras foram extraídas com metanol, por 2 horas, seguido de adição de mais 2 mL de metanol e coletadas após um período de mais 2 horas. A **Figura 4.5** mostra o cromatograma comparativo dos diferentes tempos de extração.

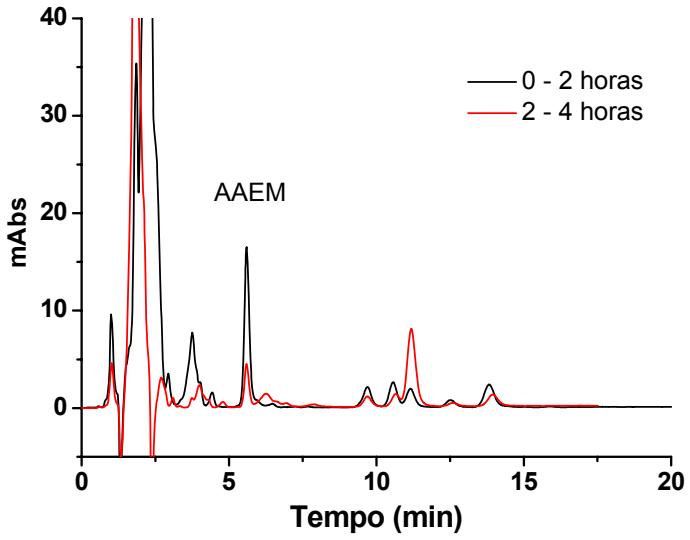


FIGURA 4. 5. Cromatogramas obtidos a partir da análise de amostras de fragmentos da resina TKY, submetidas à extração durante: (—) 0 - 2 horas e (—) 2 - 4 horas. Condições cromatográficas: coluna analítica C_{18}-Nucleosil (15 x 0,46 cm d.i., 100 Å, 5µm); fase móvel ACN:H_2O (40:60 v/v); vazão 1,0 mL/min; volume de injeção 25 µL e λ = 230 nm.

A comparação das intensidades das bandas do AAEM, nos dois cromatogramas, mostra que nas duas primeiras horas de extração obtém-se maior porcentagem do monômero do que na extração coletada subseqüentemente.

Como é possível observar nos cromatogramas de extração (**Figura 4.4** e **4.5**), após a eluição do AAEM, em aproximadamente 5 minutos, há outros compostos que foram extraídos; portanto após a eluição do monômero foi necessário fazer-se uma eluição gradiente em degrau para as análises posteriores.

Sendo assim, nos primeiros 15 min de análise, utilizou-se a fase móvel ACN:H_2O (35:65 v/v), eluída pela Bomba A, para análise do monômero. Em seguida, realizou-se uma eluição gradiente em degrau, de 15 a 25 min, utilizando-se a Bomba B com a fase móvel 100% de ACN, para a eluição de interferentes. Na última etapa da análise, de 25 a 30 min, foi necessário fazer o recondicionamento da coluna, durante 5 min, com a fase móvel ACN:H_2O (35:65 v/v), eluída pela Bomba A. As demais condições de análise foram: vazão 1,0 mL/min; volume de injeção 25 µL e λ = 230 nm.

Para os métodos de preparo de amostras, que envolvam extração, a recuperação deve ser avaliada, ao menos em três níveis de controle de qualidade do método. Isto pode ser feito através do uso de um padrão interno, adicionado à

amostra no início do processo de extração, ou através da curva analítica por adição de padrão.

Em se tratando, entretanto de monômeros residuais em polímero, a determinação dos níveis de recuperação, por estes dois métodos, fica dificultada, pois o padrão interno interfere na reação de polimerização.

Assim, para avaliar o processo de extração e também observar a variabilidade da reação de polimerização, foi realizado um experimento com as amostras preparadas em triplicata, a partir de seis corpos-de-prova que foram confeccionados em seis dias diferentes. Os resultados obtidos estão apresentados na **Tabela 4.2**.

TABELA 4. 2. Resultados obtidos a partir de amostras (raspas) de extrações do monômero AAEM realizadas durante 6 dias consecutivos.

Corpos-de-prova	Valores em área			
	Amostra 1	**Amostra 2**	**Amostra 3**	**CV%**
1	537707	474486	418571	12,5
2	640944	611751	647310	3,00
3	830910	818394	783814	3,00
4	631400	562539	595108	5,80
5	767323	644060	615388	11,9
6	737212	752453	729036	1,60

Os valores de absorbância obtidos têm, através da Lei de Lambert-Beer, uma relação direta com a concentração de uma substância,

$$A = \varepsilon bc,$$

onde A é a absorbância, ε é a absortividade molar, b é o caminho ótico e c é a concentração da substância.

Avaliando os resultados obtidos, pode-se observar que há uma grande variação na quantidade de AAEM extraído, mesmo para extrações realizadas a partir de um mesmo corpo-de-prova, como no primeiro dia, no qual essa variação foi de 12,5%.

Essa grande variação não está relacionada a erros sistemáticos no processo de extração, uma vez que as amostras foram retiradas de pontos distintos de um mesmo corpo-de-prova, ou mesmo na confecção do corpo-de-prova e

condições de preparo da amostra, mas está relacionada à própria reação de polimerização, que ocorre via radicalar e não é homogênea na resina.

4.3. Construção da curva analítica e validação do método para a quantificação de AAEM extraídos da resina TKY

A calibração foi feita por padrão externo, sendo que as soluções de calibração foram preparadas em triplicatas em metanol. Para avaliar a faixa de linearidade de calibração necessária, preparou-se soluções em concentrações, que tinham absorbâncias próximas dos menores e maiores valores obtidos no extrato de recuperação (**Tabela 4.2**).

Deste modo, o intervalo da curva analítica foi determinado em 28µg/mL a 168µg/mL.

O preparo das soluções foi realizado conforme descrito nas seções 3.6.1 e 3.6.2, podendo ser corretamente visualizado no **Diagrama 4.1**.

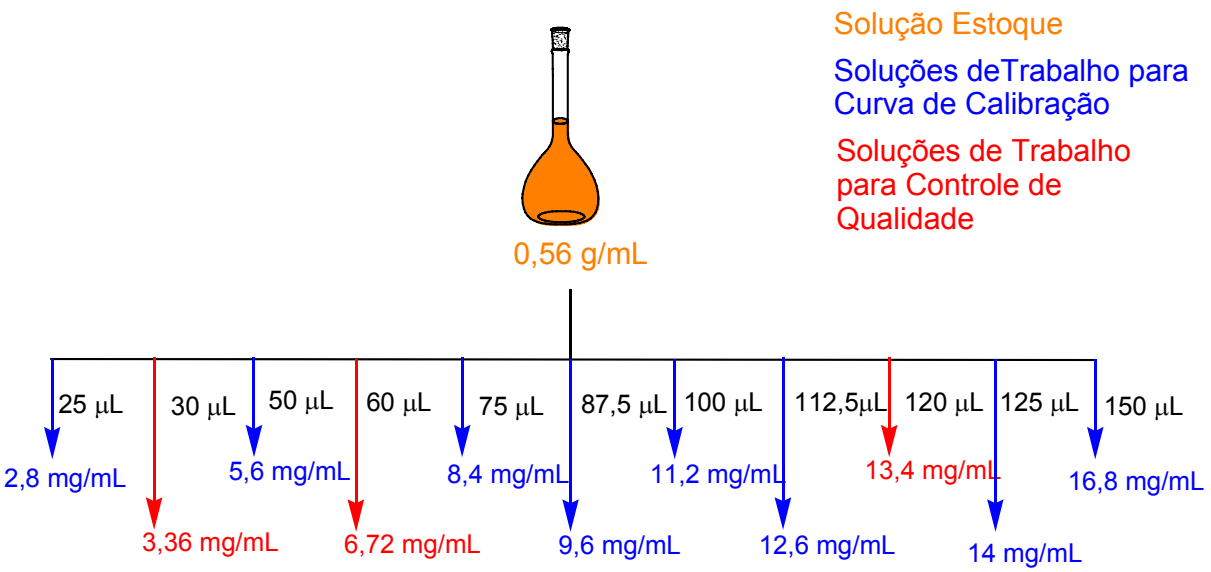


DIAGRAMA 4. 1. Diagrama de preparo das soluções de trabalho do AAEM em MeOH, para a curva analítica e controle de qualidade.

Desta forma, a curva analítica foi construída com 8 concentrações diferentes, sendo que as soluções de calibração e controle de qualidade foram preparadas, retirando-se 10 µL de suas respectivas soluções de trabalho. Para a confirmação da linearidade no intervalo investigado, foram calculados o coeficiente de correlação (baseado no método dos mínimos quadrados) e o valor de F_{exp}, como descrito por ALMEIDA *et al*[71], foi comparado com o valor de F_{tab} no nível de

confiança de 99%. O valor do coeficiente de correlação foi igual a 0,99948, enquanto que os valores de F_{exp} foram menores do que o valor de F_{tab}, confirmando assim a homoscedasticidade. As condições cromatográficas foram: fase móvel ACN:H_2O (35:65 v/v); vazão 1,0 mL/min; volume de injeção 25 µL, coluna analítica C_{18}-Nucleosil (15 x 0,46 cm d.i., 100 Å, 5µm) e λ = 230 nm. Um cromatograma de análise do padrão AAEM e a curva analítica podem ser visualizados na **Figura 4.6** e no **Gráfico 4.1**, respectivamente.

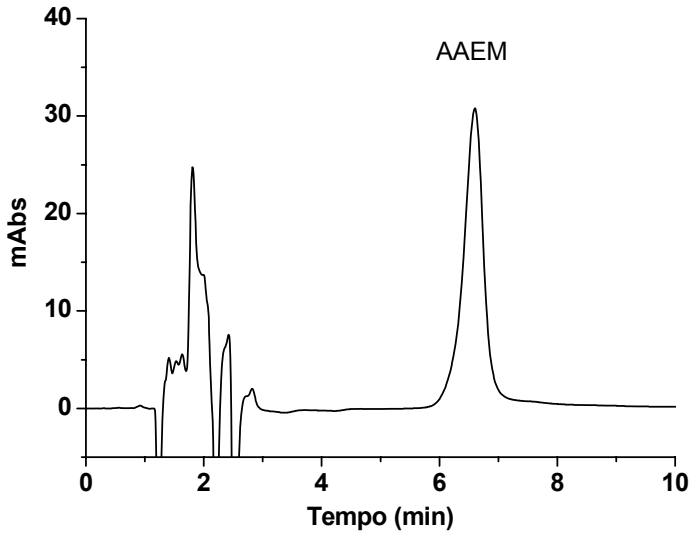


FIGURA 4. 6. Cromatograma da amostra de AAEM em metanol (112µg/mL). Condições cromatográficas: coluna analítica C_{18}-Nucleosil (15 x 0,46 cm d.i., 100 Å, 5µm), fase móvel ACN:H_2O (35:65 v/v); vazão 1,0 mL/min; volume de injeção 25 µL e λ = 230 nm.

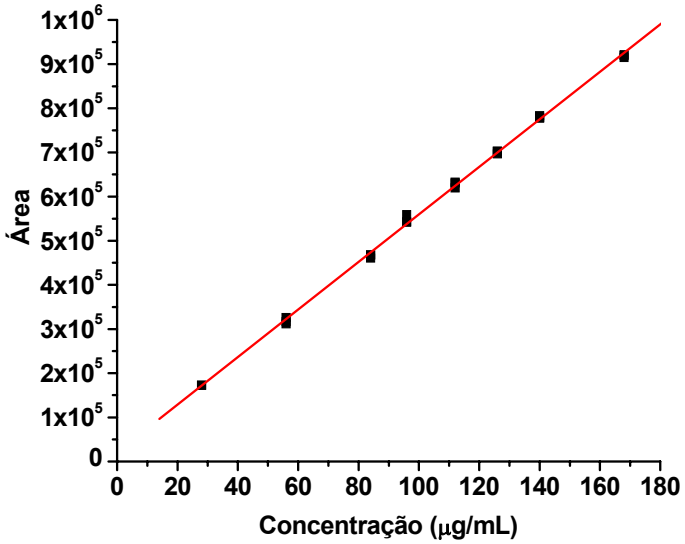


GRÁFICO 4. 1. Curva analítica obtida por padronização externa do AAEM em MeOH. Equação de regressão linear: y = 21059,23357 + 5385,3442x. Coeficiente de correlação, r = 0,99948. F_{exp} = 19,07.

A precisão e exatidão da curva analítica estão expressas na **Tabela 4.3** e estão em concordância com o que a ANVISA[68] preconiza para métodos analíticos, isto é valores de precisão e exatidão de 2% e ± 5%, respectivamente.

TABELA 4. 3. Precisão e exatidão obtidas para as soluções de calibração do AAEM.

Concentração (µg/mL)	CV (%)	Exatidão (%)
28	0,12	100
56	1,16	98,5
84	0,85	98,2
96	1,78	102
112	1,13	101
126	0,50	100
140	0,36	101
168	0,37	99,2

Para avaliar a precisão intermediária e a exatidão do método foram preparadas, em quintuplicata, as soluções de controle de qualidade do método, como descrito na seção 3.6.1. e mostrado no **Diagrama 4.1**. Foi determinado, também, o limite de quantificação e detecção para o método.

Os valores de precisão e exatidão intra e inter-dias estão apresentados na **Tabela 4.4**.

TABELA 4. 4. Precisão e exatidão intra e inter-dias obtidas para as soluções controles de qualidade do AAEM.

Concentração (µg/mL)	1º dia (n=5)		2º dia (n=5)		3º dia (n=5)	
	CV (%)	Exatidão (%)	CV (%)	Exatidão (%)	CV (%)	Exatidão (%)
33,6	0,690	95,7	1,24	96,2	1,50	101
67,2	0,890	95,2	0,600	100	1,81	102
134	0,890	97,5	0,620	103	0,770	101

Para avaliar a precisão e exatidão do método foi feito também o teste cego, que consiste na preparação de duas concentrações diferentes, por um

segundo analista e desconhecida pelo analista do método. As amostras foram preparadas em quintuplicatas. A **Tabela 4.5** mostra os valores obtidos.

TABELA 4. 5. Precisão e exatidão para as amostras de AAEM em MeOH no teste cego (n=5).

Concentração Experimental Média (µg/mL)	Concentração Teórica (µg/mL)	Exatidão(%)	CV(%)
38,6	39,2	98,5	1,97
136	134	102	1,14

O limite de quantificação foi determinado a partir de sucessivas diluições de uma amostra de concentração conhecida do AAEM (28µg/mL) e analisadas até encontrar o valor de 14,0 µg/mL, o qual não mais estava dentro do intervalo de variação permitido de exatidão pelo método, ± 5%.

O limite de detecção foi determinado da mesma forma, porém as diluições foram feitas até que se obtivesse uma relação de 3:1 sinal/ruído, sendo 0,700µg/mL o valor encontrado.

4.4. Quantificação de AAEM extraídos da resina TKY

Para a quantificação o AAEM extraído das raspas da resina TKY, foi adotado o mesmo procedimento utilizado para a determinação dos níveis de recuperação e variabilidade da reação de polimerização.

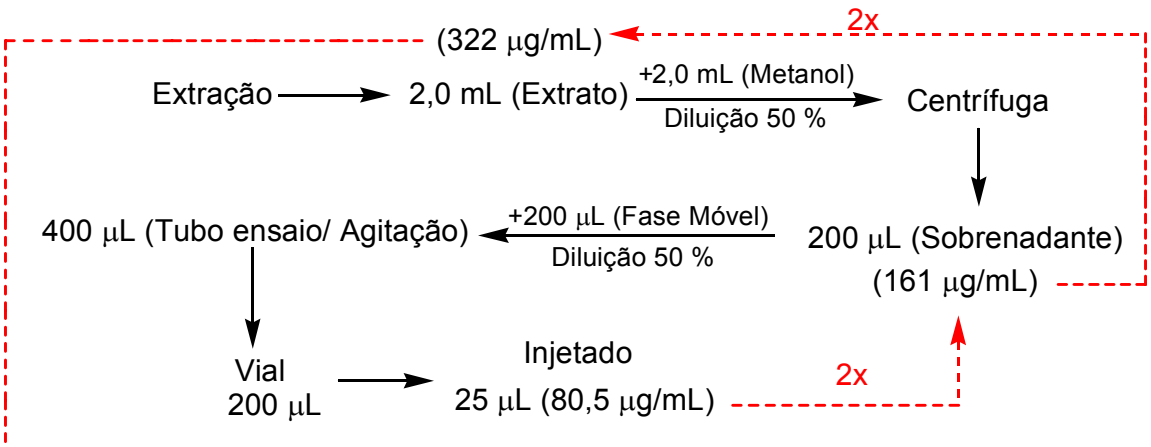
Os valores de CV% encontrados na quantificação do monômero reflete a variabilidade da reação de polimerização. Esta variação é intrínseca à própria reação de polimerização e pode ser considerada uma das desvantagens deste tipo de resina, pois não é possível prever a quantidade de monômero não polimerizado. Conseqüentemente, a eficiência da reação de polimerização e a qualidade do material podem ser comprometidas. Avaliando-se ainda os resultados apresentados na **Tabela 4.6,** pode-se concluir que a quantidade de AAEM não reagido no polímero é muito alta.

TABELA 4. 6. Resultados obtidos a partir de amostras (raspas) de extrações do monômero AAEM realizadas durante 6 dias consecutivos.

Corpos-de-prova	Concentração (µg/mL)				
	Amostra 1	**Amostra 2**	**Amostra 3**	**MÉDIA**	**CV (%)**
1	85,8	88,9	85,4	86,7	2,09
2	97,5	109	80,1	95,7	20,9
3	72,0	77,9	91,6	80,5	11,9
4	100	79,8	95,9	91,9	11,2
5	79,2	98,2	93,7	90,4	10,5
6	103	73,0	75,6	83,9	18,9

A título de explicação, se for considerado um valor médio de concentração, de qualquer um dos dias - por exemplo 80,5µg/mL, pode-se encontrar o valor de 97% de polimerização, ou seja, 3% de AAEM não foi convertido em polímero. Os cálculos feitos são apresentados a seguir (**Esquema 4.1**):

1) Determinação da massa de AAEM extraída de 100 mg de resina TKY



322μg/mL x 2,0 mL = 644 μg de AAEM extraídos a partir de 100 mg de resina

2) Cálculo da massa de AAEM presente em 100 mg de resina TKY

2 mL (d = 1,06 g/mL) - Líquido + 3,85 g - Pó

1,06 g/mL x 2 mL = 2,12 g do líquido

Em massa, tem-se:

2,12 g de líquido + 3,85 g de pó = 5,97 g de resina formada

Sabe-se que há 59 % de AAEM na composição do líquido, portanto:

59 % de 2,12 g equivale a 1,25 g de AAEM no líquido.

Desta forma, a porcentagem de AAEM em toda a massa da resina é :

$$\frac{1{,}25\ g}{5{,}97\ g} \times 100 = 21\ \%\ \text{de AAEM em toda resina}$$

Ou seja, em 100 mg de resina, temos 21 mg de AAEM

3) Cálculo da porcentagem de monômero não polimerizado de AAEM em 100 mg de resina TKY

$$\frac{644\ \mu g}{21\ mg} \times 100 = 3\ \%\ \text{de AAEM não polimerizado}$$

ESQUEMA 4. 1. Cálculo da porcentagem de AAEM não polimerizado. (---) Cálculo de volta a partir da concentração encontrada.

No item 1 do **Esquema 4.1** é calculada a massa de AAEM extraída de 100 mg de raspas da resina. Para isso, a partir do valor de 80,5μg/mL foi feito o

cálculo de volta, considerando a etapa de extração e de preparação da amostra, nas quais foram realizadas duas diluições, sendo a primeira no extrato adicionando 2,0 mL de metanol e a segunda, após a retirada de 200 µL de sobrenadante da centrifugação, que foi misturado com 200 µL de fase móvel. Portanto, a concentração do extrato foi de 322µg/mL.

Esta discussão é importante, pois ao analisar artigos na área de polímeros, como descrito por BARTOLONI *et al*[29], os autores encontraram grau de conversão em torno de 92% de resinas acrílicas termopolimerizáveis, utilizando a técnica de IV. Portanto, porcentagens de 97% de polimerização poderiam ser consideradas ótimas, pois não comprometem as propriedades físicas e mecânicas da resina, uma vez que só essas propriedades são levadas em consideração. Porém, em nenhum momento se levanta a questão do que pode causar, no ambiente bucal de um paciente, os 3% de monômero não polimerizado. Desta forma, apesar de ainda não haver estudos de citotoxicidade desse monômero, 80,5µg/mL é uma concentração que, se liberada no ambiente bucal, pode causar irritações, alergias e hipersensibilidade no paciente[16,22], bem como efeitos tóxicos nas células e alterações genéticas[17], como em casos já reportados para outros metacrilatos.

4.5. Desenvolvimento do método e determinação de condições de extração para o BDMA, EDMA e CHMA a partir das resinas acrílicas experimentais

O estudo das resinas experimentais está sendo feito em colaboração com a Faculdade de Odontologia de Araraquara (FOAr) - Unesp, onde inicialmente é realizado o estudo das propriedades mecânicas e físicas da resina. Após a realização destes testes é feita a quantificação por CLAE dos monômeros não polimerizados.

Como é mostrado na Tabela 4.1, são três as resinas experimentais, identificadas como RE1, RE2 e RE3, que apresentam diferenças entre si, apenas nas composições dos seus líquidos de preparo. A resina Tokuyama Rebase Fast II, serviu de parâmetro para o desenvolvimento das resinas experimentais, com base nos estudos das propriedades físicas e mecânicas da primeira.

A resina RE3 é a única, entre as três, que tem na sua composição os três monômeros, enquanto a RE1 tem os monômeros EDMA e CHMA e a RE2 tem os monômeros EDMA e BDMA.

Para a avaliação do percentual de monômero residual presente nestas resinas experimentais, optou-se pelo desenvolvimento de um único método cromatográfico, capaz de quantificar qualquer um dos três monômeros. Os cromatogramas dos monômeros individuais e da mistura dos três estão exemplificados na **Figura 4.7**.

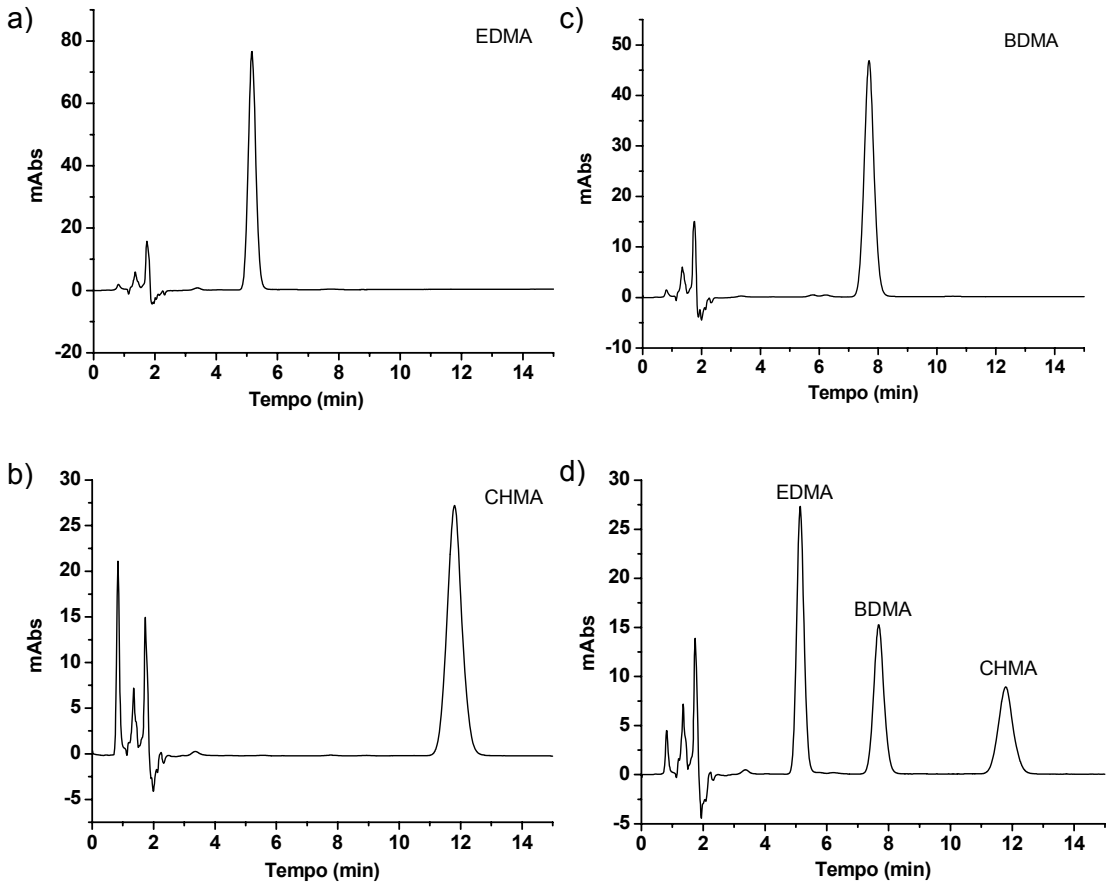


FIGURA 4. 7. Cromatogramas obtidos da amostra de (a) EDMA, (b) CHMA, (c) BDMA.e (d) EDMA, CHMA e BDMA preparadas em metanol. Condições cromatográficas: coluna analítica C_{18}-Nucleosil (15 x 0,46 cm d.i., 100 Å, 5µm); fase móvel ACN:H_2O (60:40 v/v); vazão 1,0 mL/min; volume de injeção 25 µL; λ = 230 nm e tempo de análise de 20 minutos.

Tal como para a resina TKY, foram realizadas análises a fim de determinar as condições de extração dos monômeros a partir da resina RE3, levando-se em consideração os mesmos parâmetros utilizados na primeira. A **Figura**

4.8 mostra os cromatogramas comparativos de extrações dos monômeros realizadas em MeOH e isopropanol.

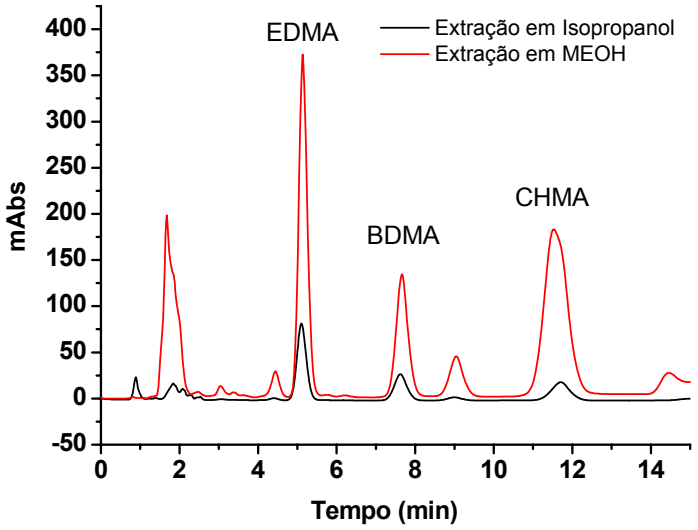


FIGURA 4. 8. Cromatogramas obtidos a partir da análise de amostras de raspas da resina RE3 submetidas a extração em (—) isopropanol e (—) metanol. Condições cromatográficas: coluna analítica C_{18}-Nucleosil (15 x 0,46 cm d.i., 100 Å, 5µm); fase móvel ACN:H_2O (60:40 v/v); vazão 1,0 mL/min; volume de injeção 25 µL; λ = 230 nm e tempo de análise de 20 min.

Ao analisar os cromatogramas inseridos na **Figura 4.8,** é possível concluir que o MeOH apresentou uma melhor condição de extração para os três monômeros. Sendo assim, o MeOH foi escolhido como solvente extrator.

O segundo parâmetro avaliado foi a forma da resina que se usou para a extração dos monômeros. A **Figura 4.9** mostra o cromatograma comparativo de extrações feitas de diferentes formas da resina RE3.

Uma vez que as raspas da resina proporcionam uma maior superfície de contato com o solvente extrator, esta foi a forma da qual se extraíram maiores concentrações dos monômeros, similarmente ao que foi observado na extração da resina TKY.

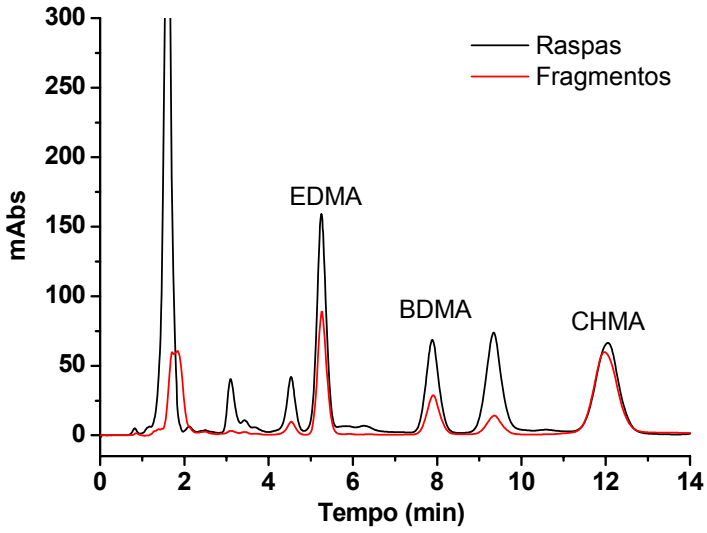


FIGURA 4. 9. Cromatogramas obtidos a partir da análise de amostras da resina RE3 submetidas a extração em (—) raspas e (—) fragmentos . Condições cromatográficas: coluna analítica C_{18}-Nucleosil (15 x 0,46 cm d.i., 100 Å, 5µm); fase móvel ACN:H_2O (60:40 v/v); vazão 1,0 mL/min; volume de injeção 25 µL; λ = 230 nm e tempo de análise de 20 min.

O tempo de extração foi também avaliado. E, como no caso da resina TKY, o tempo de 2 horas proporcionou a extração quase completa de cada um dos três monômeros da resina RE3, como mostrado na **Figura 4.10**.

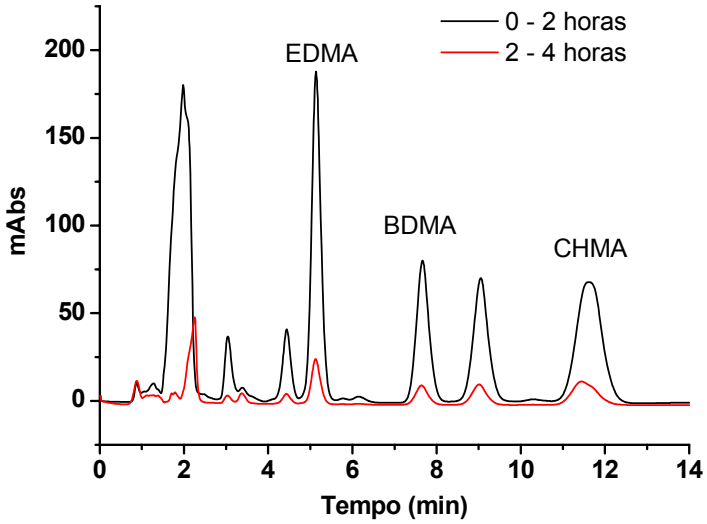


FIGURA 4. 10. Cromatogramas obtidos a partir da análise de amostras de extração de raspas da resina RE3 submetidas a extração em (—) 0 - 2 horas e (—) 0 - 4 horas. Condições cromatográficas: coluna analítica C_{18}-Nucleosil (15 x 0,46 cm d.i., 100 Å, 5µm); fase móvel ACN:H_2O (60:40 v/v); vazão 1,0 mL/min; volume de injeção 25 µL; λ = 230 nm e tempo de análise de 20 min.

Tendo sido avaliadas as condições de extração para os três monômeros da resina RE3, foram determinadas as variabilidades no preparo do corpo-de-prova e das extrações das amostras. Isso foi feito do mesmo modo para a polimerização e extração da resina TKY.

A **Tabela 4.7** mostra os valores de áreas obtidas, para cada um dos monômeros nas amostras avaliadas.

TABELA 4. 7. Resultados obtidos de extrações dos monômeros EDMA, BDMA e CHMA realizadas durante 6 dias consecutivos, a partir das amostras (raspas) da resina RE3

Corpos-de-prova	Valores em área			
EDMA	**Amostra 1**	**Amostra 2**	**Amostra 3**	**CV (%)**
1	2318368	2615108	2142314	10,1
2	3147503	2592440	2971801	9,80
3	2690712	2190255	1987495	15,8
4	3262732	2181835	2442942	21,5
5	2814231	2289167	1896721	19,7
6	3145288	3118301	2653991	9,30
BDMA	**Amostra 1**	**Amostra 2**	**Amostra 3**	**CV (%)**
1	1421576	1561099	1298235	9,20
2	1737894	1541309	1729543	6,70
3	1453535	1231430	1173453	11,5
4	1794505	1258165	1516744	17,6
5	1611718	1431901	1258069	12,3
6	1832316	1786740	1664895	4,90
CHMA	**Amostra 1**	**Amostra 2**	**Amostra 3**	**CV (%)**
1	2456666	2346561	2212742	5,20
2	2742508	2256466	2771019	11,2
3	2805428	2939276	2878948	2,30
4	3381835	2408887	2854909	16,9
5	3034175	2659228	2131671	17,4
6	3577197	3552036	3828350	4,20

Mais uma vez, foram obtidos altos CV% para as amostras de um mesmo corpo-de-prova evidenciando, tal como para a resina comercial, uma alta variabilidade no processo de polimerização.

Os resultados mostrados na **Tabela 4.7** serviram como parâmetro para se determinar as faixas de concentração das curvas analíticas para a quantificação dos três monômeros, nas três resinas experimentais. Os valores de máximo e mínimo, para cada monômero, estão destacados na tabela em vermelho e verde respectivamente.

4.6. Construção da curva analítica e validação do método para quantificação de EDMA, BDMA e CHMA extraídos das resinas experimentais.

As faixas de concentração determinadas foram de 120 a 300µg/mL para o EDMA, de 100 a 250µg/mL para o BDMA e de 210 a 525µg/mL para o CHMA. As soluções foram preparadas, como descritas nas seções 3.6.5 e 3.6.6 e podem ser melhor visualizadas no **Diagrama 4.2**.

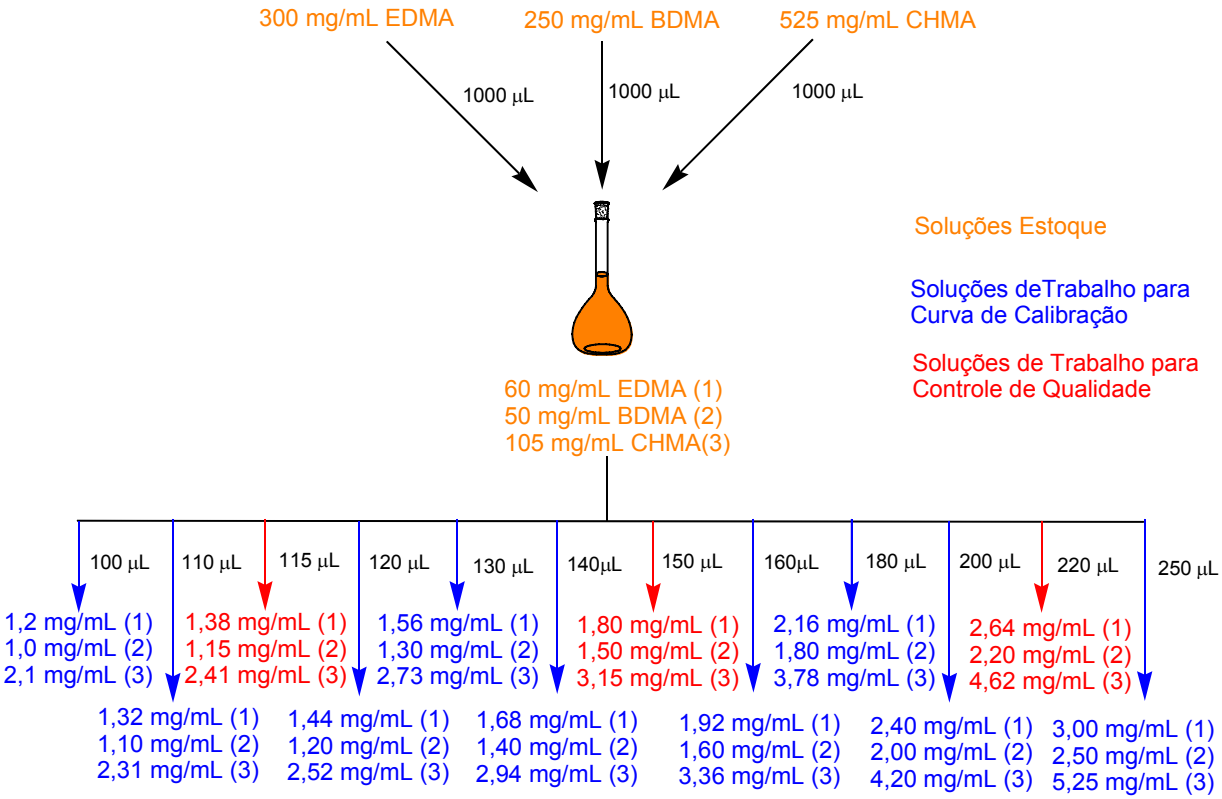


DIAGRAMA 4. 2. Diagrama de preparo das soluções de trabalho do EDMA, BDMA e CHMA em MeOH para a curva analítica e controle de qualidade

A curva analítica foi construída com nove concentrações, sendo que as soluções de calibração e controle de qualidade foram preparadas retirando-se 100 µL de suas respectivas soluções de trabalho. Assim como para a curva analítica

desenvolvida para o AAEM, foram calculados o coeficiente de correlação (baseado no método dos mínimos quadrados) e os valores de F_{exp}, os quais foram comparados com o valor de F_{tab}. Os valores de coeficiente de correlação foram iguais a 0,99834, 0,99866 e 0,99756 para o EDMA, BDMA e CHMA, respectivamente. Os valores de F_{exp} foram menores do que o valor de F_{tab}, confirmando, assim a homoscedasticidade das curvas analíticas para os três monômeros. As condições cromatográficas foram: coluna analítica C_{18}-Nucleosil (15 x 0,46 cm d.i., 100 Å, 5µm); fase móvel ACN:H_2O (60:40 v/v); vazão 1,0 mL/min; volume de injeção 25 µL e λ = 230 nm. É mostrado na **Figura 4.11,** um cromatograma da análise de uma solução de calibração.

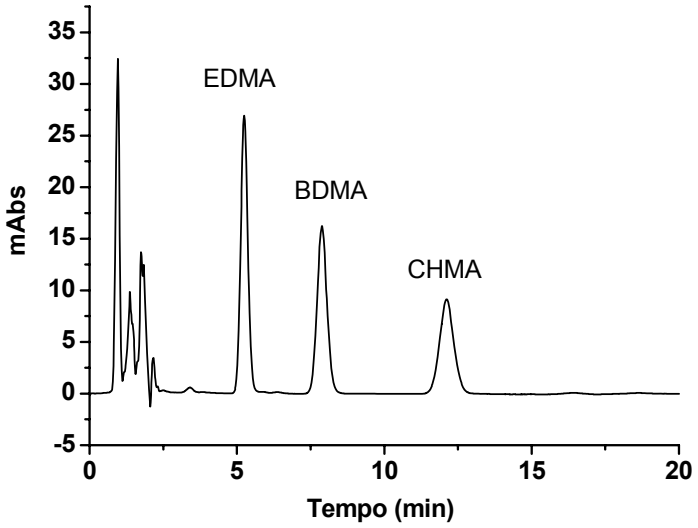


FIGURA 4. 11. Cromatograma da amostra de EDMA (120µg/mL), BDMA (100µg/mL) e CHMA (210µg/mL) em MeOH. Condições cromatográficas: coluna analítica C_{18}-Nucleosil (15 x 0,46 cm d.i., 100 Å, 5µm), fase móvel ACN:H_2O (60:40 v/v); vazão 1,0 mL/min; volume de injeção 25 µL; λ = 230 nm e tempo de análise de 20 min.

São mostradas, no **Gráfico 4.2**, as curvas analíticas que foram obtidas pela regressão linear.

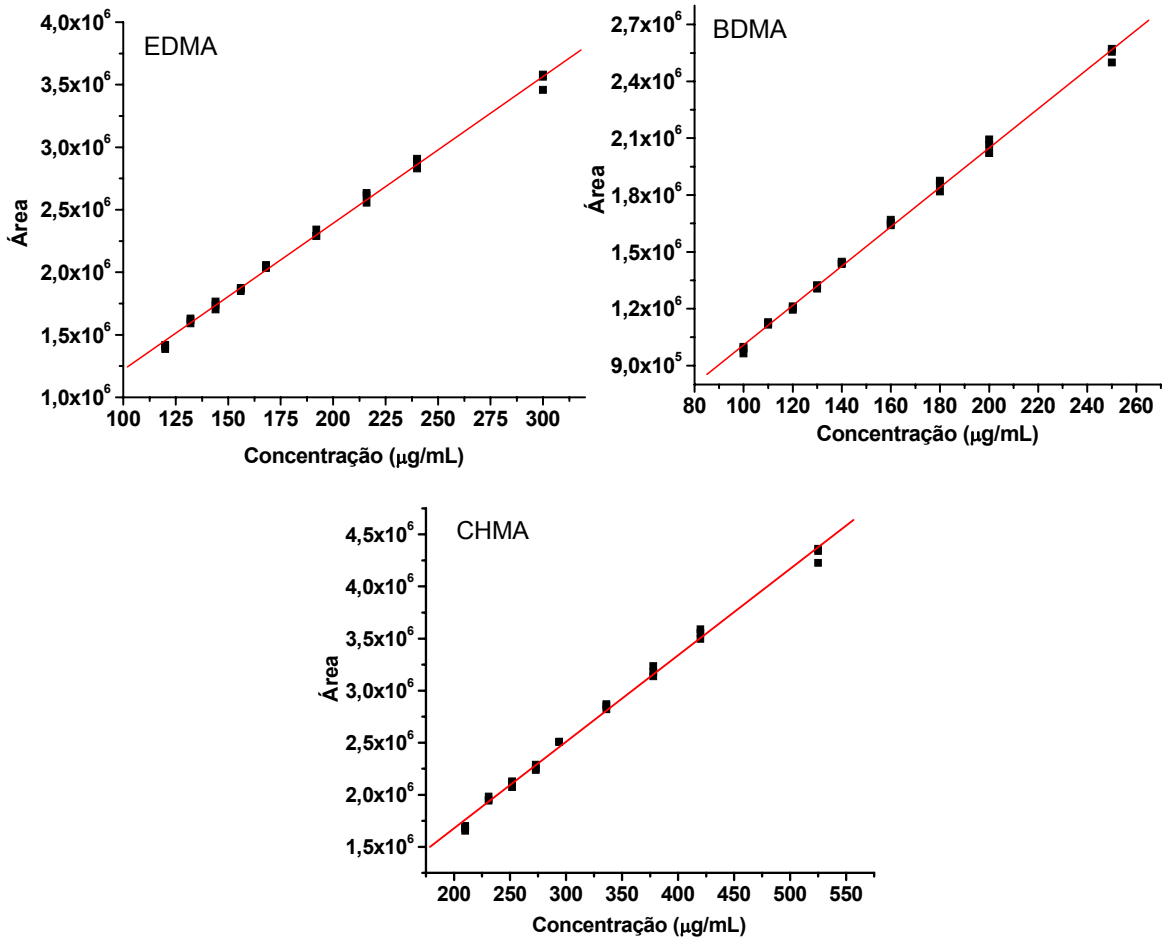


GRÁFICO 4. 2. Curva analítica obtida por padronização externa do EDMA, BDMA e CHMA em MeOH. Equações de regressão linear: y = 46427,8538 + 11730,46542x; y = -28831,63243 + 10383,12448x e y = 19042,16942 + 8299,17454x para o EDMA, BDMA e CHMA, respectivamente. Coeficiente de correlação r = 0,99834, r = 0,99866 e r = 0,99756 para o EDMA, BDMA e CHMA, respectivamente. F_{exp} = 16,08 (EDMA), F_{exp} = 4,49 (BDMA) e F_{exp} = 9,66 (CHMA)

A precisão e exatidão das Curvas analíticas para o EDMA, BDMA e CHMA, estão expressas na **Tabela 4.8**, levando-se em consideração os parâmetros estipulados pela ANVISA[68] para métodos analíticos. A precisão foi expressa como CV%, e a exatidão foi calculada pelo método de volta, não tendo ultrapassado 2% e ± 5%, respectivamente.

TABELA 4. 8. Precisão e exatidão obtidas para as soluções de calibração para os três monômeros, EDMA, BDMA e CHMA em MeOH.

	EDMA	
Concentração (µg/mL)	**CV (%)**	**Exatidão (%)**
120	1,17	96,5
132	1,19	101
144	1,80	100
156	0,72	99,3
168	0,60	101
192	1,28	100
216	1,57	101
240	1,38	100
300	1,87	99,1
	BDMA	
100	1,82	97,5
110	0,57	101
120	0,73	98,9
130	0,73	99,6
140	0,40	101
160	0,88	101
180	1,59	101
200	1,76	101
250	1,49	99,1
	CHMA	
210	1,39	95,2
231	1,05	101,2
252	1,44	99,8
273	1,20	98,9
294	0,10	102,0
336	0,91	101,4
378	1,57	100,9
420	1,34	101,2
525	1,68	98,5

A precisão intermediária e a exatidão do método foram avaliadas com as três soluções controle de qualidade do método preparadas em quintuplicata. As soluções foram preparadas como descrito na seção 3.6.5. e mostrado no **Diagrama 4.2**.

Os valores de precisão e exatidão intra e inter-dias para o EDMA, BDMA e CHMA estão demonstrados na **Tabela 4.9**.

TABELA 4. 9. Precisão e exatidão intra e inter-dias obtidas para as soluções controles de qualidade para os três monômeros, EDMA, BDMA e CHMA em MeOH.

EDMA						
Concentração (µg/mL)	**1º dia (n=5)**		**2º dia (n=5)**		**3º dia (n=5)**	
	CV (%)	**Exatidão (%)**	**CV (%)**	**Exatidão (%)**	**CV (%)**	**Exatidão (%)**
138	0,550	103	0,870	102,9	1,19	102
180	0,270	103	1,20	102,9	0,920	103
264	0,650	104	0,35	104,8	1,75	104
BDMA						
Concentração (µg/mL)	**1º dia (n=5)**		**2º dia (n=5)**		**3º dia (n=5)**	
	CV (%)	**Exatidão (%)**	**CV (%)**	**Exatidão (%)**	**CV (%)**	**Exatidão (%)**
115	0,340	102	1,54	102	1,84	103
150	0,950	102	1,30	102	1,46	101
220	0,690	105	1,58	105	1,71	103
CHMA						
Concentração (µg/mL)	**1º dia (n=5)**		**2º dia (n=5)**		**3º dia (n=5)**	
	CV (%)	**Exatidão (%)**	**CV (%)**	**Exatidão (%)**	**CV (%)**	**Exatidão (%)**
241	0,450	103	1,16	103	1,73	102
315	0,450	103	1,22	101	1,11	101
462	1,26	105	1,40	104	1,56	104

A precisão e exatidão do método também foram avaliadas através do teste cego, com a preparação das amostras em quintuplicatas. A **Tabela 4.10** mostra os valores encontrados para EDMA, BDMA e CHMA.

TABELA 4. 10. Precisão e exatidão obtidas no teste cego para soluções dos três monômeros preparados em MeOH.

Monômeros	Concentração Experimental Média (µg/mL)	Concentração Teórica (µg/mL)	Exatidão(%)	CV(%)
EDMA	156	150	104	1,36
	239	228	105	0,94
BDMA	131	125	105	1,92
	199	190	105	0,80
CHMA	275	262	105	0,490
	419	399	105	1,80

O limite de quantificação foi determinado a partir de sucessivas diluições de amostras individuais de concentrações conhecidas dos três monômeros. Foram considerados como limites de quantificação as concentrações que apresentaram exatidão superior ao critério de aceitação do método.

O limite de detecção foi determinado da mesma forma, porém as diluições foram feitas até que se obtivesse uma relação de 3:1 sinal/ruído.

A **Tabela 4.11** mostra os valores de limites de quantificação e detecção para os três monômeros.

TABELA 4. 11. Limites de quantificação e detecção para EDMA, BDMA e CHMA.

Monômeros	Limite de Quantificação (µg/mL)	Limite de Detecção (ng/mL)
EDMA	60,0	60,0
BDMA	50,0	50,0
CHMA	105	105

4.7. Quantificação de EDMA, BDMA e CHMA extraídos da resina RE3

Após a validação do método analítico, os monômeros residuais da resina RE3 foram quantificados. As amostras foram preparadas do modo descrito no procedimento experimental e de forma similar ao utilizado para a avaliação do processo de extração e polimerização.

A **Tabela 4.12** mostra os valores de concentração dos monômeros não-reagidos da RE3.

TABELA 4. 12. Resultados obtidos de extrações dos monômeros EDMA, BDMA e CHMA realizadas durante 6 dias consecutivos a partir de amostras (raspas) da resina RE3

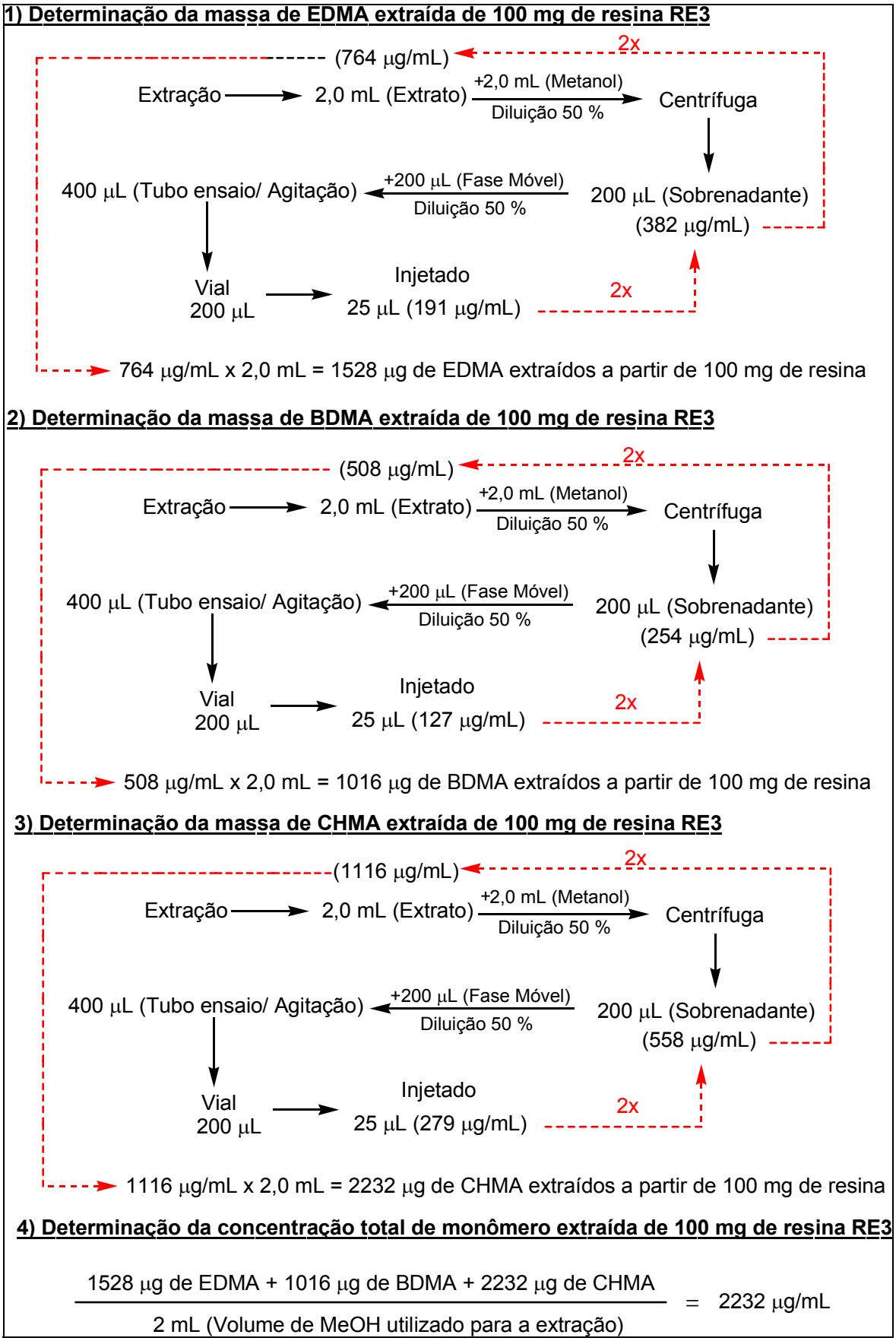
Corpos-de-prova	Concentração de EDMA (µg/mL)				
	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3	MÉDIA	CV (%)
1	194	219	178	197	10,5
2	264	217	249	244	10,0
3	225	182	165	191	16,2
4	274	182	204	220	22,0
5	236	191	157	195	20,5
6	264	262	222	249	9,50
Corpos-de-prova	**Concentração de BDMA (µg/mL)**				
	Amostra 1	**Amostra 2**	**Amostra 3**	**MÉDIA**	**CV (%)**
1	140	153	128	140	9,01
2	170	151	170	163	6,54
3	143	121	116	127	11,2
4	176	124	149	149	17,3
5	158	140	123	141	12,1
6	179	175	163	172	4,84
Corpos-de-prova	**Concentração de CHMA (µg/mL)**				
	Amostra 1	**Amostra 2**	**Amostra 3**	**MÉDIA**	**CV (%)**
1	294	280	264	279	9,01
2	328	270	332	310	6,54
3	336	352	345	344	11,2
4	405	288	342	345	17,3
5	363	318	254	312	12,1
6	429	426	459	438	4,84

Os valores de concentração para os 3 monômeros da resina RE3 foram muito superiores aos valores encontrados para o monômero da resina comercial TKY, pois nesta os valores encontrados não ultrapassaram - com raras exceções -, 100µg/mL, enquanto que os valores obtidos para os monômeros da resina RE3 foram, no mínimo, de 150µg/mL, com raras exceções, para o monômero

BDMA. Ao observarmos os valores encontrados, é possível notar que o monômero que teve menor polimerização foi o CHMA. Isto pode ser explicado, de acordo com a sua estrutura molecular, pois ele apresenta apenas uma dupla ligação, a qual é responsável pela sua reatividade.

Diferentemente do CHMA, o EDMA e o BDMA apresentaram uma melhor polimerização: as concentrações de monômeros isolados foram menores do que as encontradas para o CHMA. Mesmo assim, as concentrações ficam muito acima das encontradas para o monômero AAEM, utilizado na resina TKY. Estes valores podem ser calculados em acordo com o **Esquema 4.2** e considerando as menores concentrações médias para os monômeros: 191µg/mL (EDMA), 127µg/mL (BDMA) e 279µg/mL (CHMA), destacados na **Tabela 4.18**. A concentração total encontrada foi de aproximadamente 2 mg/mL de monômeros não polimerizados. Se considerarmos que isso poderia ser liberado, gradativamente, na boca de um usuário com prótese dentária, isto representa uma quantidade suficiente para causar reações alérgicas e irritações na mucosa bucal, pois segundo SCHWEIKL *et al* 1,5 mmol/L (195µg/mL) do monômero metacrilato de 2 – hidroxietila (HEMA) pode provocar danos celulares[17].

Sendo assim, essa resina experimental, apesar de oferecer boas características mecânicas e físicas, apresenta altas concentrações de monômeros não polimerizados.



ESQUEMA 4. 2. Cálculo da quantidade total de monômeros extraído da resina RE3. (---) Cálculo de volta a partir da concentração encontrada.

4.8. Quantificação de EDMA e CHMA extraídos da resina RE1

A resina RE1 é formada pela polimerização dos monômeros EDMA e CHMA. Para a quantificação destes monômeros, os corpos-de-prova foram preparados e os monômeros extraídos utilizando o mesmo procedimento feito para as resinas RE3 e TKY.

Pode-se observar na **Figura 4.12** um cromatograma da amostra extraída da resina RE1.

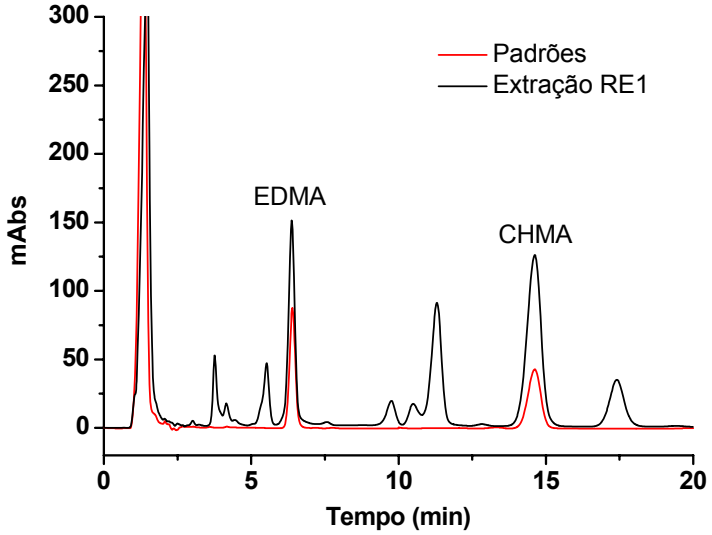


FIGURA 4. 12. Cromatogramas obtidos nas análises de: (—) amostra extraída da resina RE1 e (—) padrões EDMA e CHMA preparados em metanol. Condições cromatográficas: coluna analítica C_{18}-Nucleosil (15 x 0,46 cm d.i., 100 Å, 5µm); fase móvel ACN:H_2O (60:40 v/v); vazão 1,0 mL/min; volume de injeção 25 µL e λ = 230 nm.

Através da curva analítica do método foi possível quantificar os monômeros EDMA e CHMA extraídos da resina RE1. Os resultados são apresentados na **Tabela 4.13**.

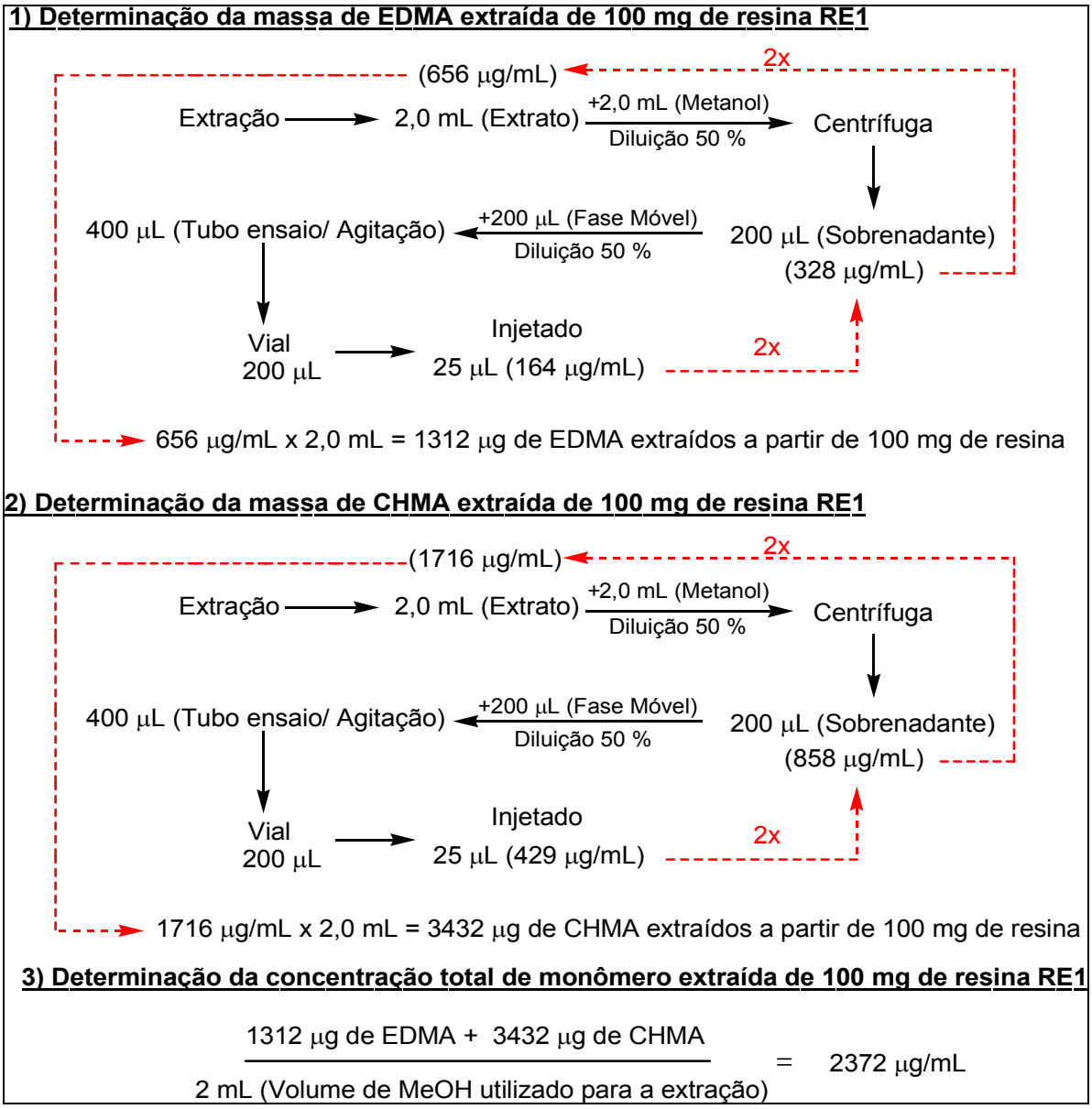
TABELA 4. 13. Resultados obtidos a partir de amostras (raspas) de extrações dos monômeros EDMA e CHMA realizadas durante 6 dias consecutivos, a partir da resina RE1

Corpos-de-prova	Concentração de EDMA (µg/mL)				
	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3	MÉDIA	CV (%)
1	179	166	147	164	9,80
2	221	173	178	191	13,8
3	233	151	180	188	22,1
4	191	198	197	195	1,93
5	242	187	185	205	15,8
6	205	188	188	193	5,06
Corpos-de-prova	**Concentração de CHMA (µg/mL)**				
	Amostra 1	**Amostra 2**	**Amostra 3**	**MÉDIA**	**CV (%)**
1	489	476	436	467	5,86
2	(568)	422	436	429	2,30
3	(561)	451	483	467	4,84
4	432	454	439	442	2,54
5	498	419	506	474	10,2
6	482	452	519	484	6,91

Os valores de concentração, marcados em vermelho na **Tabela 4.13**, são valores que ficaram fora do intervalo de linearidade da curva analítica, portanto não foram considerados.

As concentrações encontradas para o EDMA nessa resina foram um pouco menores do que as encontradas na resina RE3. Entretanto, as concentrações de CHMA foram superiores às observadas para resina RE3, inferindo-se que este monômero tem baixa capacidade de polimerização, nas condições de reação desenvolvidas para o preparo das resinas RE1 e RE3. As altas concentrações obtidas para esse monômero nas duas resinas sugerem que ele não contribui para a melhoria das características das resinas.

Através de cálculos mostrados no **Esquema 4.3** e considerando as médias das menores concentrações, obtêm-se o valor de 2372µg/mL de concentração total de monômeros não polimerizados. Esta concentração, para os dois monômeros na resina RE1, é superior ao valor encontrado para os três monômeros da resina RE3.



ESQUEMA 4. 3. Cálculo da quantidade total de monômeros extraído da resina RE1. (---) Cálculo de volta a partir das concentrações encontradas.

Além das altas concentrações de CHMA encontradas nas resinas RE1 e RE3, o odor deste monômero é forte e causa irritação olfativa. Assim sendo, ele deve ser excluído da composição final da resina experimental.

4.9. Quantificação de EDMA e BDMA extraídos da resina RE2

Dentre as três resinas experimentais analisadas, o monômero CHMA não está presente apenas na resina RE2. Assim, para a quantificação dos monômeros EDMA e BDMA, os corpos de prova foram preparados e os monômeros

extraídos como descrito para as resinas TKY, RE1 e RE3. Pode-se observar, na **Figura 4.13**, um cromatograma da extração dos monômeros, a partir da resina RE2.

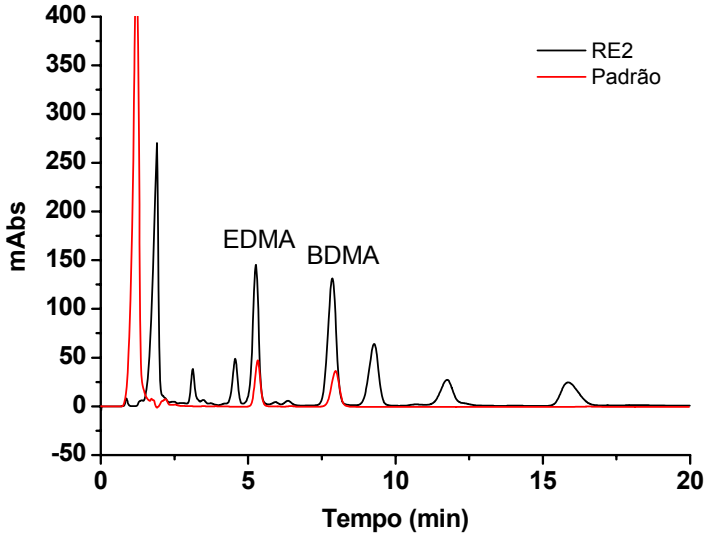


FIGURA 4. 13. Cromatogramas obtidos nas análises de: (—) amostra extraída da resina RE2 e (—) padrões EDMA e BDMA preparados em metanol. Condições cromatográficas: coluna analítica C_{18}-Nucleosil (15 x 0,46 cm d.i., 100 Å, 5µm); fase móvel ACN:H_2O (60:40 v/v); vazão 1,0 mL/min; volume de injeção 25 µL; λ = 230 nm e tempo de análise de 20 min.

A **Tabela 4.14** apresenta os valores encontrados para os dois monômeros EDMA e BDMA, respectivamente.

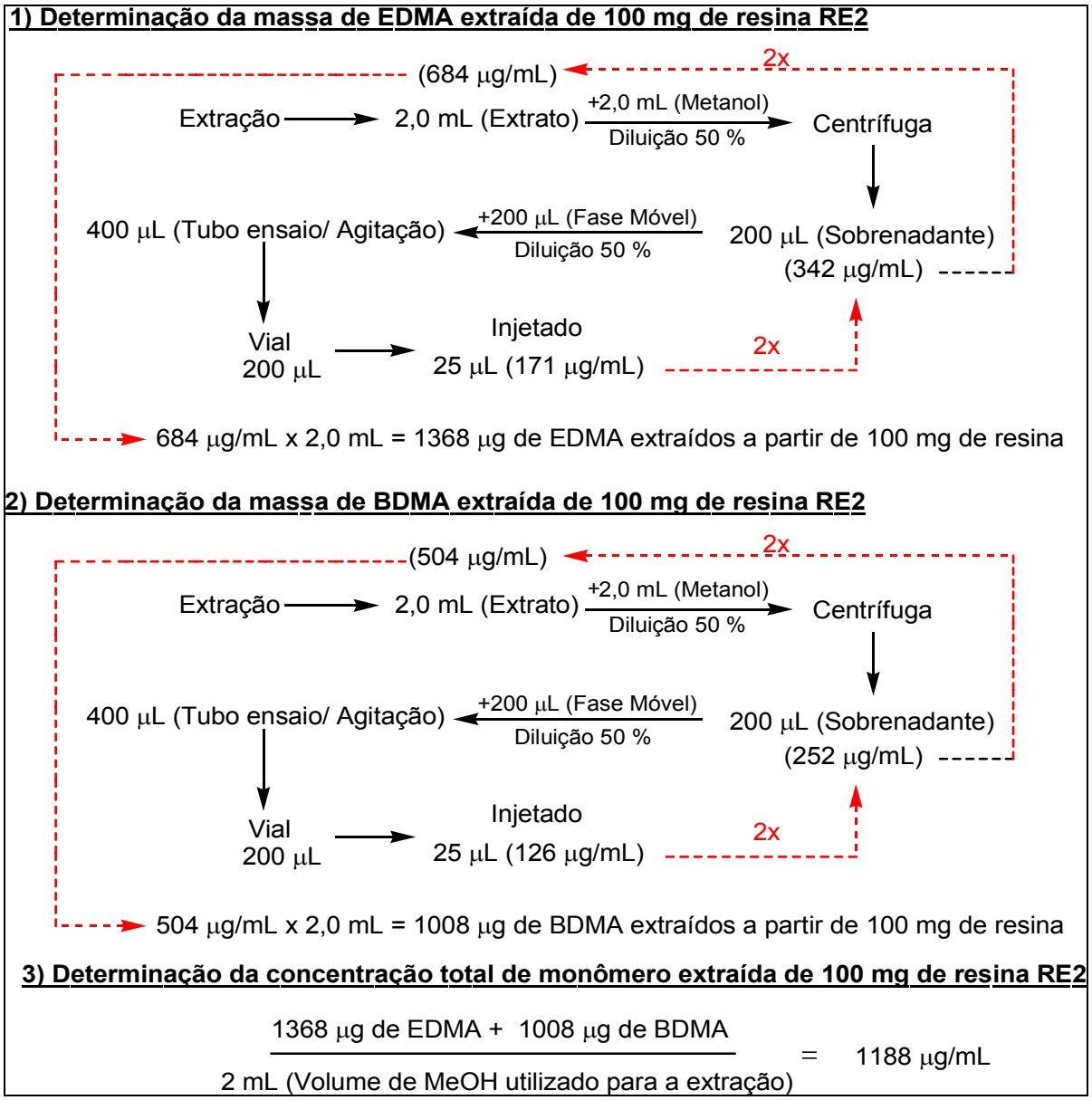
TABELA 4. 14. Resultados obtidos a partir de amostras (raspas) de extrações dos monômeros EDMA e BDMA realizadas durante 6 dias consecutivos, a partir da resina RE2

Corpos-de-prova	Concentração de EDMA (µg/mL)				
	Amostra 1	**Amostra 2**	**Amostra 3**	**MÉDIA**	**CV (%)**
1º dia	165	191	156	171	10,4
2º dia	225	273	(309)	249	13,5
3º dia	224	213	230	223	3,82
4º dia	261	297	280	280	6,36
5º dia	215	232	233	227	4,49
6º dia	273	231	223	243	10,7
Corpos-de-prova	**Concentração de BDMA (µg/mL)**				
	Amostra 1	**Amostra 2**	**Amostra 3**	**MÉDIA**	**CV (%)**
1º dia	248	233	219	233	6,30
2º dia	138	204	159	167	20,3
3º dia	218	243	235	232	5,53
4º dia	196	193	174	188	6,63
5º dia	112	138	128	126	10,6
6º dia	223	167	189	193	14,8

O valor de concentração, marcado em vermelho, na **Tabela 4.14**, não foi considerado, por não se encontrar dentro do intervalo de linearidade da curva analítica do método.

Os valores de concentração obtidos ainda são altos, quando comparados aos valores encontrados para o monômero da resina comercial TKY. Porém, através dos cálculos mostrados no **Esquema 4.4**, tal como para as resinas RE1 e RE3, e considerando-se as médias das menores concentrações obtidas, o valor de concentração obtido dos monômeros extraídos é de 1188µg/mL, valor este que é muito inferior aos conseguidos nas outras duas resinas experimentais.

Apesar de ser a melhor resina entre as três, em termos de quantidade de monômero não polimerizado, a resina RE2 precisa ser melhorada uma vez que a quantidade de monômero não polimerizado ainda é alta.



ESQUEMA 4. 4. Cálculo da quantidade total de monômeros extraído da resina RE2. (---) Cálculo de volta a partir das concentrações encontradas.

4.10. Desenvolvimento do método para análise da liberação do AAEM em saliva artificial, a partir da resina TKY

A análise da liberação do AAEM em saliva artificial foi realizada no sentido de se avaliar o quanto de monômero não polimerizado poderia ser liberado no ambiente bucal. Como já descrito anteriormente, o ideal é que as análises fossem realizadas em saliva natural, mas existem diversas implicações em se utilizar um fluido biológico. Não apenas devido às solicitações que devem ser feitas aos comitês de ética, mas também devido à própria análise cromatográfica que exige um pré-

tratamento da amostra, visto que qualquer macromolécula que possa estar presente na saliva natural poderá entupir o poro da coluna cromatográfica, causando uma perda da sua eficiência ou até mesmo a perda da coluna.

O que poderia ser feito, com o intuito de realizar análises desse tipo, seria utilizar colunas de meio de acesso restrito (RAM – Restricted Acces Media) que são colocadas antes da coluna analítica, fazendo com que as macromoléculas possam ser excluídas, assim o analito poderia ser analisado sem comprometer a coluna analítica, e permitindo realizar análises em saliva natural.

Desta forma, para evitar estas implicações, preferiu-se realizar as análises em saliva artificial que não contém macromoléculas como, por exemplo, proteínas e enzimas. Diferentemente da saliva natural, a primeira evita solicitações junto a comitês de ética e pode apresentar resultados próximos.

As condições de análise do AAEM, em saliva artificial, não foram diferentes das condições encontradas para o AAEM em solvente, como pode ser visualizado na **Figura 4.14**.

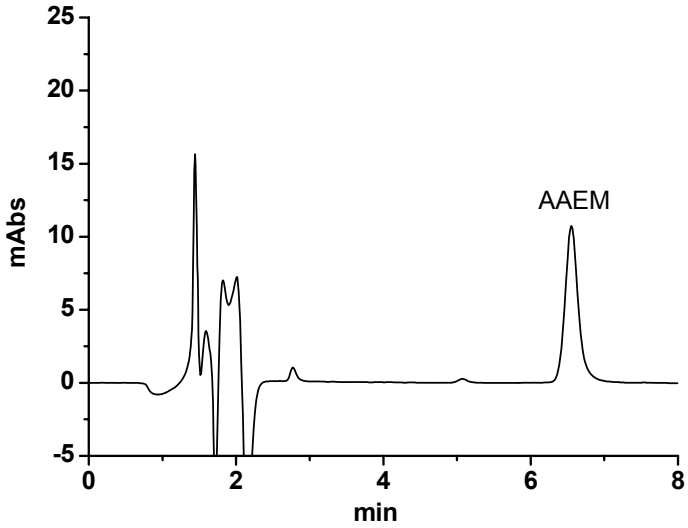


FIGURA 4. 14. Cromatograma obtido da amostra de AAEM (25µg/mL), preparada em saliva artificial. Condições cromatográficas: coluna analítica C_{18}-Nucleosil (15 x 0,46 cm d.i., 100 Å, 5µm); fase móvel ACN:H_2O (35:65 v/v); vazão 1,0 mL/min; volume de injeção 25 µL e λ = 230 nm.

O estudo foi planejado de modo a se determinar o tempo de liberação do AAEM da resina TKY, quando imersa em saliva artificial. Para este estudo, foram preparados seis corpos-de-prova com massa de aproximadamente 4,50 g, como está descrito na seção 3.3. Os corpos-de-prova preparados foram colocados em

recipientes plásticos e foram adicionados 20 mL de saliva artificial em cada um deles. .(**Figura 4.15**).

FIGURA 4. 15. Corpo-de-prova armazenado em recipiente plástico na estufa microbiológica.

Os recipientes foram mantidos em estufa microbiológica, com a temperatura controlada a 37°C e foram retiradas alíquotas de 200 µL nos seguintes intervalos de tempo: 1 h., 3 h., 5 h., 24 h., 72 h. e 168 h.. Após se terem retirado as alíquotas para análise, os corpos-de-prova foram lavados com água destilada e as referidas alíquotas foram colocadas de volta aos recipientes de plástico, com outros 20 mL de saliva artificial, como descrito no procedimento experimental. Os resultados das análises de liberação do AAEM, em saliva, podem ser visualizados na **Tabela 4.15**.

TABELA 4. 15. Resultados obtidos a partir da liberação do monômero AAEM da resina TKY durante os ciclos de 1, 3, 5, 24, 72 horas de imersão em saliva artificial.

Corpos-de-prova	Valores em área				
	1h	3hs	5hs	24hs	72hs
1	196428	193723	200558	91030	14942
2	193603	111521	150886	83099	61050
3	441065	338738	214527	244394	16007
4	332616	295047	227298	205506	12965
5	381042	215296	117974	130751	16724
6	359545	189385	155132	155676	18446

Os resultados de maior e menor área, mostrados na **Tabela 4.17** e destacados em vermelho e verde, respectivamente, serviram de guia para se determinar a faixa de linearidade necessária para a curva analítica.

4.11. Construção da curva analítica e validação do método para a quantificação de AAEM liberados em saliva artificial a partir da resina TKY

A calibração foi feita por padronização externa e as soluções de calibração foram preparadas em triplicata em saliva artificial conforme está descrito nas seções 3.6.3 e 3.6.4. O **Diagrama 4.3** ilustra como as soluções foram preparadas.

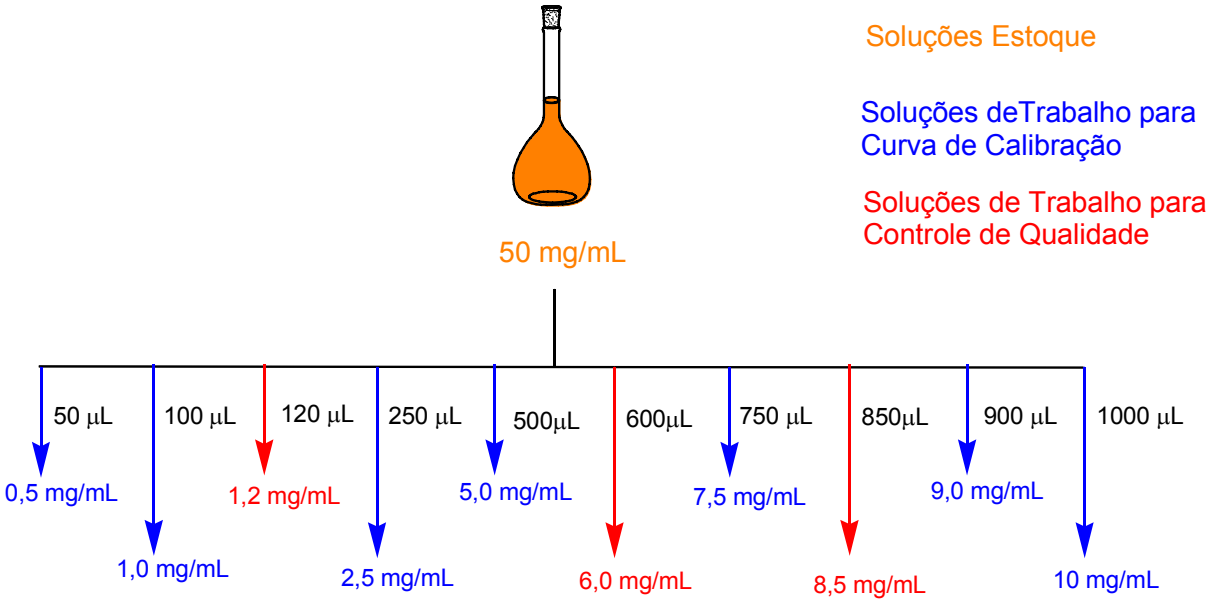


DIAGRAMA 4. 3. Diagrama de preparo das soluções de calibração e de controle de qualidade a partir das soluções de trabalho para AAEM em saliva artificial.

A curva analítica foi construída com sete concentrações, sendo que as soluções de calibração e controle de qualidade foram preparadas retirando-se 10 µL de suas respectivas soluções de trabalho. Similarmente, na curva analítica construída para o AAEM em MeOH, foram calculados o coeficiente de correlação e o valor de $F_{exp,}$ os quais foram comparados com o valor de F_{tab}. O valor de coeficiente de correlação foi de 0,99801 e o valor de F_{exp} foi menor do que o de F_{tab}, confirmando-se assim a homoscedasticidade da curva analítica. As condições cromatográficas foram: coluna analítica C_{18}-Nucleosil (15 x 0,46 cm d.i., 100 Å,

5µm); fase móvel ACN:H_2O (35:65 v/v); vazão 1,0 mL/min; volume de injeção 25 µL e λ = 230 nm. A **Figura 4.16** mostra um cromatograma de análise de uma solução com o padrão de AAEM.

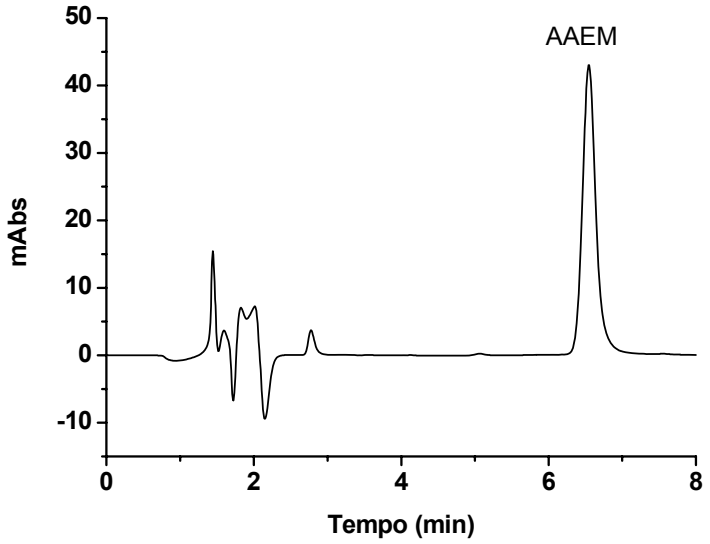


FIGURA 4. 16. Cromatograma de amostra AAEM padrão (100µg/mL) preparadas em saliva artificial. Condições cromatográficas: coluna analítica C_{18}-Nucleosil (15 x 0,46 cm d.i., 100 Å, 5µm); fase móvel ACN:H_2O (35:65 v/v); vazão 1,0 mL/min; volume de injeção 25 µL e λ = 230 nm.

As soluções de calibração foram preparadas em triplicatas e analisadas uma a uma, imediatamente após o preparo. Fez-se necessário este procedimento devido à instabilidade do padrão em saliva artificial. Esta instabilidade foi observada também para outros monômeros estudados anteriormente no grupo[73].

A curva analítica obtida está referenciada no **Gráfico 4.3**, e os valores de CV e exatidão da curva apresentados na **Tabela 4.16**.

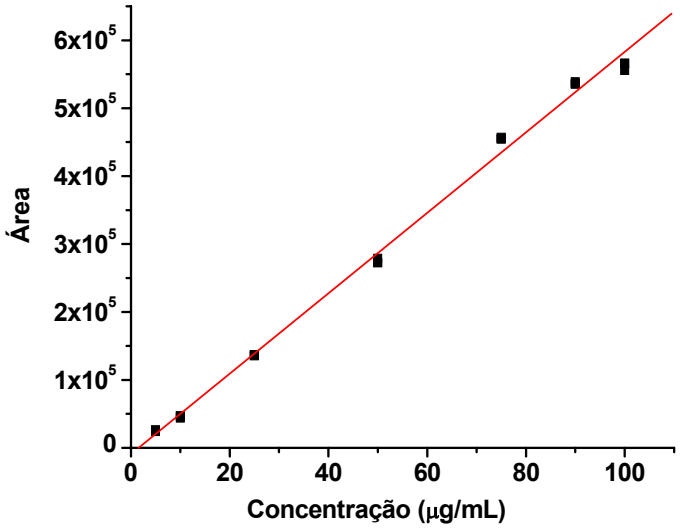


GRÁFICO 4. 3. Curva analítica obtida por padronização externa do AAEM em saliva artificial. Equação de regressão linear: y = -9416,88999 + 5922,23915x. Coeficiente de correlação, r =0,99801. F_{exp} = 18,54.

TABELA 4. 16. Precisão e exatidão obtidas para as concentrações da curva analítica do método.

Concentração (µg/mL)	CV (%)	Exatidão (%)
5,00	5,00	118
10,0	0,510	93,2
25,0	0,650	98,5
50,0	1,40	95,9
75,0	0,290	105
90,0	0,350	102
100	1,00	96,5

Os controles de qualidade do método foram preparados como está descrito no procedimento experimental representado no **Diagrama 4.3**.

Os controles foram utilizados para avaliar a precisão intermediária e exatidão do método (**Tabela 4.17**). Foram também determinados os limites de quantificação e detecção do método sendo 5,00 µg/mL e 0,200µg/mL, respectivamente.

TABELA 4. 17. Precisão e exatidão intra e inter-dias obtidas para os controles de qualidade para o AAEM em saliva artificial.

Concentração (µg/mL)	1º dia (n=5)		2º dia (n=5)		3º dia (n=5)	
	CV (%)	Exatidão (%)	CV (%)	Exatidão (%)	CV (%)	Exatidão (%)
12,0	1,10	111	1,55	110	2,57	111
60,0	2,70	114	4,57	105	4,74	91,2
85,0	2,94	110	2,95	103	2,29	99,5

O teste cego foi usado mais uma vez no sentido de se avaliar a exatidão do método. Os resultados obtidos estão apresentados na **Tabela 4.18**.

TABELA 4. 18. Precisão e exatidão para o teste cego do AAEM em saliva artificial.

Concentração Experimental Média (µg/mL)	Concentração Teórica (µg/mL)	Exatidão (%)	CV (%)
15,0	16,5	110	2,20
65,0	71,8	110	1,28

4.12. Quantificação de AAEM liberados em saliva artificial a partir da resina TKY

Para quantificação das concentrações de AAEM liberado em saliva artificial, a partir da resina TKY, foi utilizado o procedimento descrito anteriormente no tópico 4.10 (página 66).

Os resultados obtidos estão demonstrados na **Tabela 4.19**.

TABELA 4. 19. Resultados obtidos a partir da liberação do monômero AAEM da resina TKY durante os ciclos de 1, 3, 5, 24, 72 horas de imersão em saliva artificial.

Concentração de AAEM (µg/mL)						
Tempo de imersão em saliva artificial	Corpos de prova					
	1	2	3	4	5	6
1 HORA	15,8	26,0	43,3	38,2	47,8	63,8
3 HORAS	28,7	29,9	32,4	30,1	30,4	46,3
5 HORAS	15,6	19,3	22,3	25,5	19,5	33,4
24 HORAS	<LQ	11,9	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
72 HORAS	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ

Os valores encontrados variaram de 11,9µg/mL a 63,8µg/mL, sendo que as maiores concentrações foram liberadas nas primeiras 24 horas. Em 72 horas, as concentrações obtidas estavam todas abaixo do limite de quantificação - 5,00µg/mL; após uma semana não se observou a liberação do monômero.

As concentrações de AAEM liberadas são altas e com grandes variações para os diferentes corpos-de-prova, em um mesmo tempo. Vide as concentrações liberadas em 1 hora do corpo-de-prova 1 e o do corpo-de-prova 6. Estes resultados demonstram as diferenças do grau de polimerização em cada corpo-de-prova avaliado.

O corpo-de-prova 6 (ver **Tabela 4.19**) foi o que apresentou maior liberação do AAEM, com uma concentração média de 47,8µg/mL liberado nas 5 horas de ciclo de análise. Embora esse valor seja alto para a liberação no ambiente bucal, ele é baixo quando comparado à concentração média de 80,5µg/mL de AAEM extraído da resina (ver **Tabela 4.6**). Essa diferença de concentrações do AAEM extraído da resina com metanol e liberado para a saliva artificial deve-se provavelmente à degradação do monômero em meio aquoso.

Vários trabalhos na literatura reportam a degradação de metacrilatos em meio aquoso, formando por exemplo ácido metacrílico[7,31].

Conclusões

Se você gritasse,
se você gemesse,
se você tocasse
a valsa vienense,
se você dormisse,
se você cansasse,
se você morresse...
Mas você não morre,
você é duro, José!

Carlos Drummond de Andrade – José – Quinta estrofe

5. Conclusões

Com os resultados obtidos neste trabalho, podemos concluir que a exatidão e precisão dos métodos desenvolvidos foram plenamente eficazes para o processo de quantificação dos monômeros não polimerizados, a partir das resinas acrílicas autopolimerizáveis: Tokuyama Rebase II e para as três resinas experimentais da empresa Vipi (Pisassununga – SP).

Assim, com o referido processo de quantificação, foi possível obter valiosas informações relativas às resinas acrílicas analisadas, que somadas a outros tipos de resultados de testes - resistência, flexão, viscosidade etc., realizados na Faculdade de Odontologia de Araraquara, se tornar-se-ão em uma ferramenta valiosa e eficaz para a determinação objetiva da qualidade dessas resinas.

O destaque, a este propósito, vai para os valores encontrados para a resina TKY, já que foram os menores dentre todos os materiais analisados neste trabalho, demonstrando assim a razão da sua elevada importância no mercado. Contudo, mesmo apresentando a menor quantidade de monômero não polimerizado, entre as resinas que foram analisadas, o fato é que essa quantidade ainda é considerada alta, com um elevado índice de variação. Assim, pelo que foi anteriormente descrito, conclui-se que a resina TKY pode não ser apropriada em alguns casos, já que existe o risco de a quantidade de monômero não polimerizado liberado poder causar irritações e alergias na mucosa bucal do usuário.

Com o intuito de se chegar a uma resina para reembasamento imediato, de fabricação nacional, realizou-se uma triagem de três resinas experimentais, de acordo com os valores dos monômeros não polimerizados dessas mesmas resinas. Com base nos resultados obtidos foi possível selecionar a resina que apresentou a menor concentração total de monômeros, propícia para realizar as modificações em sua composição, de forma a se atingir o fim proposto. A obtenção de uma resina de reembasamento, de boa qualidade, poderá contribuir para a diminuição de gastos no tratamento e reabilitação oral, abrindo perspectivas para que a população de baixa renda possa optar por esse tratamento, visto que este é o setor da sociedade mais afetado por esse problema de saúde oral.

Resumidamente, pode-se afirmar que a redução de monômeros não polimerizados, em reações de polimerização de resinas acrílicas autopolimerizáveis,

para reembasamento imediato, está diretamente relacionada com a própria composição da resina e por isso é essencial que se desenvolvam novos materiais.

Por outro lado, convém referir que a redução desses monômeros pode ser realizada através de alguns tratamentos específicos, tomando como exemplo os resultados apresentados por URBAN *et al*[42,49].

De todo modo, tanto para a produção de novos materiais, como para os tratamentos desenvolvidos e descritos por URBAN *et al*[42,49], para diminuir os monômeros residuais é necessário introduzir métodos analíticos capazes de serem usados para quantificar os monômeros não polimerizados e assim avaliar a qualidade do material acrílico produzido. É exatamente nesse contexto que se inserem os métodos descritos nesta dissertação.

Referências Bibliográficas

Sozinho no escuro
qual bicho-do-mato,
sem teogonia,
sem parede nua
para se encostar,
sem cavalo preto
que fuja a galope,
você marcha, José!
José, para onde?

Carlos Drummond de Andrade – José – Última estrofe

6. Referências bibliográficas

1. Ministério da Saúde do Brasil - Secretaria de Atenção à Saúde Pública, *Condições da Saúde Bucal da População Brasileira 2002 - 2003 Resultados Principais*, 2004.

2. ARIMA, T.; MURATA, H. & HAMADA, T., "Properties of highly cross-linked autopolymerizing reline acrylic resins". *Journal of Prosthetic Dentistry*. **73**(1): 55, 1995.

3. PRICE, C.A., "The effect of cross-linking agents on the impact resistance of a linear poly(methyl methacrylate) denture-base polymer". *Journal of Dental Research*. **65**(7): 987, 1986.

4. ARIMA, T.; NIKAWA, H.; HAMADA, T. & HARSINI, "Composition and effect of denture base resin surface primers for reline acrylic resins". *Journal of Prosthetic Dentistry*. **75**(4): 457, 1996.

5. KUSY, R.P.; WHITLEY, J.Q. & KALACHANDRA, S., "Mechanical properties and interrelationships of poly(methyl methacrylate) following hydration over saturated salts". *Polymer*. **42**(6): 2585, 2000.

6. AUSTIN, A.T. & BASKER, R.M., "The level of residual monomer in acrylic denture base materials with particular reference to a modified method of analysis". *British Dental Journal*. **149**(10): 281, 1980.

7. BAKER, S.; BROOKS, S.C. & WALKER, D.M., "The release of residual monomeric methyl methacrylate from acrylic appliances in the human mouth: an assay for monomer in saliva". *Journal of Dental Research*. **67**(10): 1295, 1988.

8. VALLITTU, P.; MIETTINEN, V. & ALAKUIJALA, P., "Residual monomer content and its release into water from denture base materials". *Dental Materials*. **11**(5&6): 338, 1995.

9. LYGRE, H.; SOLHEIM, E.; GJERDET, N.R. & BERG, E., "Leaching of organic additives from dentures in vivo". *Acta Odontologica Scandinavica*. **51**(1): 45, 1993.

10. TSUCHIYA, H.; HOSHINO, Y.; TAJIMA, K. & TAKAGI, N., "Leaching and cytotoxicity of formaldehyde and methyl methacrylate from acrylic resin denture base materials". *Journal of Prosthetic Dentistry*. **71**(6): 618, 1994.

11. KODA, T.; TSUCHIYA, H.; YAMAUCHI, M.; HOSHINO, Y.; TAKAGI, N. & KAWANO, J., "High-performance liquid chromatographic estimation of eluates from denture base polymers". *Journal of Dentistry*. **17**(2): 84, 1989.

12. LYGRE, H.; KLEPP, K.N.; SOLHEIM, E. & GJERDET, N.R., "Leaching of additives and degradation products from cold-cured orthodontic resins". *Acta Odontologica Scandinavica*. **52**(3): 150, 1994.

13. LAMB, D.J.; ELLIS, B. & PRIESTLEY, D., "Loss into water of residual monomer from autopolymerizing dental acrylic resin". *Biomaterials*. **3**(3): 155, 1982.

14. JAFFER, F.; FINER, Y. & SANTERRE, J.P., "Interactions between resin monomers and commercial composite resins with human saliva derived esterases". *Biomaterials*. **23**(7): 1707, 2002.

15. HAGIO, M.; KAWAGUCHI, M.; MOTOKAWA, W. & MIYAZAKI, K., "Degradation of methacrylate monomers in human saliva". *Dental Materials*. **25**(2): 241, 2006.

16. BARCLAY, S.C.; FORSYTH, A.; FELIX, D.H. & WATSON, I.B., "Case report--hypersensitivity to denture materials". *British Dental Journal*. **187**(7): 350, 1999.

17. SCHWEIKL, H.; SPAGNUOLO, G. & SCHMALZ, G., "Genetic and cellular toxicology of dental resin monomers". *Journal of Dental Research*. **85**(10): 870, 2006.

18. KLEINSASSER, N.H.; SCHMID, K.; SASSEN, A.W.; HARREUS, U.A.; STAUDENMAIER, R.; FOLWACZNY, M.; GLAS, J. & REICHL, F.-X., "Cytotoxic and genotoxic effects of resin monomers in human salivary gland tissue and lymphocytes as assessed by the single cell microgel electrophoresis (Comet) assay". *Biomaterials*. **27**(9): 1762, 2006.

19. KEDJARUNE, U.; CHAROENWORALUK, N. & KOONTONGKAEW, S., "Release of methyl methacrylate from heat-cured and autopolymerized resins: cytotoxicity testing related to residual monomer". *Australian Dental Journal*. **44**(1): 25, 1999.

20. PELKA, M.; DANZL, C.; DISTLER, W. & PETSCHELT, A., "A new screening test for toxicity testing of dental materials". *Journal of Dentistry*. **28**(5): 341, 2000.

21. LAI, Y.L.; CHEN, Y.T.; LEE, S.Y.; SHIEH, T.M. & HUNG, S.L., "Cytotoxic effects of dental resin liquids on primary gingival fibroblasts and periodontal ligament cells in vitro". *Journal of Oral Rehabilitation*. **31**(12): 1165, 2004.

22. BOHNENKAMP, D.M., "Traumatic stomatitis following an intraoral denture reline: a clinical report". *Journal of Prosthetic Dentistry*. **76**(2): 113, 1996.

23. TOREN, K., "Asthma and methacrylates - gluing together the evidence". *Allergy*. **62**(6): 575, 2007.

24. FAVEN, C.; DEBACKER, M. & BARBRY, D., "Chemiluminescent reaction of benzoyl peroxide with amines". *Analytical Sciences*. **9**(3): 371, 1993.

25. VAZQUEZ, B.; ELVIRA, C.; SAN ROMAN, J. & LEVENFELD, B., "Reactivity of a polymerizable amine activator in the free radical copolymerization with methyl methacrylate and surface properties of copolymers". *Polymer*. **38**(17): 4365, 1997.

26. ACHILIAS, D.S. & SIDERIDOU, I.D., "Kinetics of the Benzoyl Peroxide/Amine Initiated Free-Radical Polymerization of Dental Dimethacrylate Monomers:

Experimental Studies and Mathematical Modeling for TEGDMA and Bis-EMA". *Macromolecules*. **37**(11): 4254, 2004.

27. LEE, S.-Y.; LAI, Y.-L. & HSU, T.-S., "Influence of polymerization conditions on monomer elution and microhardness of autopolymerized polymethyl methacrylate resin". *European Journal of Oral Sciences*. **110**(2): 179, 2002.

28. VALLITTU, P.K.; RUYTER, I.E. & BUYKUILMAZ, S., "Effect of polymerization temperature and time on the residual monomer content of denture base polymers". *European Journal of Oral Sciences*. **106**(1): 588, 1998.

29. BARTOLONI, J.A.; MURCHISON, D.F.; WOFFORD, D.T. & SARKAR, N.K., "Degree of conversion in denture base materials for varied polymerization techniques". *Journal of Oral Rehabilitation*. **27**(6): 488, 2000.

30. DOGAN, A.; BEK, B.; CEVIK, N.N. & USANMAZ, A., "The effect of preparation conditions of acrylic denture base materials on the level of residual monomer, mechanical properties and water absorption". *Journal of Dentistry*. **23**(5): 313, 1995.

31. CROUT, D.H.G.; CORKILL, J.A.; JAMES, M.L. & LING, R.S.M., "Methylmethacrylate metabolism in man. The hydrolysis of methylmethacrylate to methacrylic acid during total hip replacement". *Clinical Orthopaedics and Related Research*. **141**: 90, 1979.

32. GREIM, H.; AHLERS, J.; BIAS, R.; BROECKER, B.; HOLLANDER, H.; GELBKE, H.P.; JACOBI, S.; KLIMISCH, H.J.; MANGELSDORF, I. & ET AL., "Assessment of structurally related chemicals: toxicity and ecotoxicity of acrylic acid and acrylic acid alkyl esters (acrylates), methacrylic acid and methacrylic acid alkyl esters (methacrylates)". *Chemosphere*. **31**(2): 2637, 1995.

33. FINER, Y. & SANTERRE, J.P., "The influence of resin chemistry on a dental composite's biodegradation". *Journal of Biomedical Materials Research, Part A*. **69A**(2): 233, 2004.

34. MOSZNER, N.; SALZ, U. & ZIMMERMANN, J., "Chemical aspects of self-etching enamel-dentin adhesives: A systematic review". *Dental Materials*. **21**(10): 895, 2005.

35. FREIDIG, A.P.; VERHAAR, H.J.M. & HERMENS, J.L.M., "Quantitative structure-property relationships for the chemical reactivity of acrylates and methacrylates". *Environmental Toxicology and Chemistry*. **18**(6): 1133, 1999.

36. ARIMA, T.; HAMADA, T. & MCCABE, J.F., "The effects of cross-linking agents on some properties of HEMA-based resins". *Journal of Dental Research*. **74**(9): 1597, 1995.

37. SIDERIDOU, I.; TSERKI, V. & PAPANASTASIOU, G., "Effect of chemical structure on degree of conversion in light-cured dimethacrylate-based dental resins". *Biomaterials*. **23**(8): 1819, 2002.

38. ARIMA, T.; MURATA, H. & HAMADA, T., "The effects of crosslinking agents on the water sorption and solubility characteristics of denture base resin". *Journal of Oral Rehabilitation*. **23**(7): 476, 1996.

39. PFEIFFER, P. & ROSENBAUER, E.-U., "Residual methyl methacrylate monomer, water sorption, and water solubility of hypoallergenic denture base materials". *Journal of Prosthetic Dentistry*. **92**(1): 72, 2004.

40. ARIMA, T.; MURATA, H. & HAMADA, T., "Analysis of composition and structure of hard autopolymerizing reline resins". *Journal of Oral Rehabilitation*. **23**(5): 346, 1996.

41. ARAUJO, P.H.H.; SAYER, C.; POCO, J.G.R. & GIUDICI, R., "Techniques for reducing residual monomer content in polymers; A review". *Polymer Engineering and Science*. **42**(7): 1442, 2002.

42. URBAN VANESSA, M.; MACHADO ANA, L.; OLIVEIRA REGINA, V.; VERGANI CARLOS, E.; PAVARINA ANA, C. & CASS QUEZIA, B., "Residual monomer

of reline acrylic resins. Effect of water-bath and microwave post-polymerization treatments". *Dental Materials*. **23**(3): 363, 2007.

43. SHIM, J.S. & WATTS, D.C., "Residual monomer concentrations in denture-base acrylic resin after an additional, soft-liner, heat-cure cycle". *Dental Materials*. **15**(4): 296, 1999.

44. SZABO, G.; STAFFORD, G.D.; HUGGETT, R. & BROOKS, S.C., "The loss of residual monomer from denture base polymers coated with an ultraviolet light-activated polymer". *Dental Materials*. **3**(2): 64, 1987.

45. LUNG, C.Y.K. & DARVELL, B.W., "Minimization of the inevitable residual monomer in denture base acrylic". *Dental Materials*. **21**(12): 1119, 2005.

46. KODA, T.; TSUCHIYA, H.; YAMAUCHI, M.; OHTANI, S.; TAKAGI, N. & KAWANO, J., "Leachability of denture-base acrylic resins in artificial saliva". *Dental Materials*. **6**(1): 13, 1990.

47. LUNG, C.Y.K. & DARVELL, B.W., "Methyl methacrylate in poly(methyl methacrylate) - validation of direct injection gas chromatography". *Journal of Chromatography, A*. **1061**(1): 93, 2004.

48. URBAN, V.M.; CASS, Q.B.; OLIVEIRA, R.V.; GIAMPAOLO, E.T. & MACHADO, A.L., "Development and application of methods for determination of residual monomer in dental acrylic resins using high performance liquid chromatography". *Biomedical Chromatography*. **20**(4): 369, 2006.

49. URBAN, V.M. *Efeito de Diferentes Tratamentos Térmicos Sobre o Conteúdo de Monômero Residual de Resinas Acrílicas para Reembasamento*. Araraquara, Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese da Faculdade de Odontologia de Araraquara - Unesp, 2003. Dissertação de Mestrado, p 162.

50. SOFOU, A.; TSOUPI, I.; EMMANOUIL, J. & KARAYANNIS, M., "HPLC determination of residual monomers released from heat-cured acrylic resins". *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. **381**(7): 1336, 2005.

51. VILJANEN, E.K.; LANGER, S.; SKRIFVARS, M. & VALLITTU, P.K., "Analysis of residual monomers in dendritic methacrylate copolymers and composites by HPLC and headspace-GC/MS". *Dental Materials*. **22**(9): 845, 2006.

52. SCHENKELS, L.C.; VEERMAN, E.C. & NIEUW AMERONGEN, A.V., "Biochemical composition of human saliva in relation to other mucosal fluids". *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine*. **6**(2): 161, 1995.

53. HUMPHREY, S.P. & WILLIAMSON, R.T., "A review of saliva: normal composition, flow, and function". *Journal of Prosthetic Dentistry*. **85**(2): 162, 2001.

54. DODDS MICHAEL, W.J.; JOHNSON DORTHEA, A. & YEH, C.-K., "Health benefits of saliva: a review". *Journal of Dentistry*. **33**(3): 223, 2005.

55. REZNICK, A.Z.; SHEHADEH, N.; SHAFIR, Y. & NAGLER, R.M., "Free radicals related effects and antioxidants in saliva and serum of adolescents with Type 1 diabetes mellitus". *Archives of Oral Biology*. **51**(8): 640, 2006.

56. JOHANSSON, I.; LENANDER-LUMIKARI, M. & SAELLSTROM, A.K., "Saliva composition in Indian children with chronic protein-energy malnutrition". *Journal of Dental Research*. **73**(1): 11, 1994.

57. CIRIMELE, V.; VILLAIN, M.; MURA, P.; BERNARD, M. & KINTZ, P., "Oral fluid testing for cannabis: on-site OraLine IV s. a. t. device versus GC/MS". *Forensic Science International*. **161**(2-3): 180, 2006.

58. CONCHEIRO, M.; DE CASTRO, A.; QUINTELA, O.; CRUZ, A. & LOPEZ-RIVADULLA, M., "Development and validation of a method for the quantitation of D9tetrahydrocannabinol in oral fluid by liquid chromatography electrospray-mass-spectrometry". *Journal of Chromatography, B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*. **810**(2): 319, 2004.

59. HAMADA, T.; UETA, E.; KODAMA, H. & OSAKI, T., "The excretion of cophem antibiotics into saliva is inversely associated with their plasma protein-binding activities". *Journal of Oral Pathology & Medicine*. **31**(2): 109, 2002.

60. FUSAYAMA, T.; KATAYORI, T. & NOMOTO, S., "Corrosion of gold and amalgam placed in contact with each other". *Journal of Dental Research*. **42**(5): 1183, 1963.

61. ELLICKSON, K.M.; MEEKER, R.J.; GALLO, M.A.; BUCKLEY, B.T. & LIOY, P.J., "Oral bioavailability of lead and arsenic from a NIST standard reference soil material". *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. **40**(1): 128, 2001.

62. SHABIR, G.A., "Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis. Understanding the differences and similarities between validation requirements of the US Food and Drug Administration, the US Pharmacopeia and the International Conference on Harmonization". *Journal of Chromatography, A*. **987**(1-2): 57, 2003.

63. RIBANI, M.; BOTTOLI, C.B.G.; COLLINS, C.H.; JARDIM, I.C.S.F. & MELO, L.F.C., "Validation for chromatographic and electrophoretic methods". *Quimica Nova*. **27**(5): 771, 2004.

64. United States Pharmacopeia Convention; *US Pharmacopeia 30*, Validation of Compendial Procedures <1225>, 2007.

65. International Conference on Harmonization (ICH); *Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology*, Q2B, 2005.

66. United States Food and Drug Administration (US-FDA); *Reviewer Guidance, Validation of Chromatographic Methods*, 1994

67. Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO); *Orientações Sobre Validação de Métodos de Ensaios Químicos*, DOQ-CGCRE-008, 2003.

68. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA); *Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos, Resolução RE nº 899*, de 29/05/2003

69. Official Journal of the European Communities; *Performance Criteria, Other Requirements and Procedures for Analytical Methods*, 2002

70. International Organization for Standardization - ISO 1567; *DENTISTRY - DENTURE BASE POLYMERS*, 1998

71. ALMEIDA, A.M.; CASTEL-BRANCO, M.M. & FALCAO, A.C., "Linear regression for calibration lines revisited: weighting schemes for bioanalytical methods". *Journal of Chromatography, B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*. **774**(2): 215, 2002.

72. MORETTIN, P.A. & BUSSAB, W.O., *Estatística básica*. 5ª ed. 2002, São Paulo: Saraiva.

73. URBAN, V.M. *Efeito de tratamentos pós-polimerização sobre o peso molecular, o grau de conversão, a temperatura de transição vítrea e a liberação in vitro de monômero residual, plastificante e produtos de degradação de resinas acrílicas para reembasamento imediato*. Araraquara, Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese da Faculdade de Odontologia de Araraquara - Unesp, 2007. Tese de Doutorado, p 228.