

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE SAÚDE E TECNOLOGIA RURAL
UNIDADE ACADÊMICA DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
BACHARELADO EM ODONTOLOGIA**

ALLANA ROBERTA BANDEIRA PEREIRA

**AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DE ELÁSTICOS EM CADEIA DE
POLIURETANO E LÁTEX-FREE**

**PATOS-PB
2014**

ALLANA ROBERTA BANDEIRA PEREIRA

**AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DE ELÁSTICOS EM CADEIA DE
POLIURETANO E LÁTEX-FREE**

Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) apresentado à Coordenação do Curso de Odontologia da Universidade Federal de Campina Grande – UFCG, como parte dos requisitos para obtenção do título de Bacharel em Odontologia.

Orientador: Prof. Dr. Rogério Lacerda dos Santos

**PATOS-PB
2014**

ALLANA ROBERTA BANDEIRA PEREIRA

**AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DE ELÁSTICOS EM CADEIA DE
POLIURETANO E LÁTEX-FREE**

Trabalho de Conclusão de Curso (TCC)
apresentado à Coordenação do Curso
de Odontologia da Universidade Federal
de Campina Grande – UFCG, como
parte dos requisitos para obtenção do
título de Bacharel em Odontologia.

Aprovado em __/__/____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Rogério Lacerda dos Santos – Orientador
Universidade Federal de Campina Grande – UFCG

Prof.^a Dra. Maria Carolina Bandeira Macena – 1º Membro
Universidade Federal de Campina Grande – UFCG

Prof.^a Me. Elizandra Silva da Penha – 2º Membro
Universidade Federal de Campina Grande – UFCG

DEDICO

À **Deus**, por cada oportunidade que me concedeu, pelo seu imenso amor e misericórdia para comigo. Se hoje posso viver essa conquista, foi porque Ele me amou primeiro e colocou pessoas abençoadas para o meu cuidado.

À minha mãe tão amada, **Cezarina de Sousa Bandeira Pereira**, cujo amor e incentivo, me deram forças para lutar pelos meus ideais e cujos joelhos sempre dobrados me mantiveram de pé, meu eterno amor e gratidão por sempre tê-la ao meu lado ainda que distante.

Ao meu incomparável pai, **Antonio Pereira Bandeira**, presente que o Pai celestial escolheu para mim, sabendo que seu exemplo de vida seria minha constante inspiração, devo a você a formação do meu caráter, a minha força e formação profissional, que recebi de maneira tão doce e amorosa, esta conquista é sua!

À minha irmãzinha linda, **Cecília** que trouxe cor a minha vida e alegria aos meus dias, obrigada por ser minha porção de doçura na vida!

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Ao meu orientador, Professor **Dr. Rogério Lacerda dos Santos**, pela confiança em mim depositada, pelo imenso aprendizado e incentivo à pesquisa e infável dedicação e sabedoria.

AGRADECIMENTOS

Ao **Prof. Dr. Marco Antônio Dias da Silva** e a **Profª Dra. Andresa Costa Pereira**, agradeço à Deus por ter colocado pessoas como vocês, meus exemplos de profissionalismo, para me ensinar não só Histologia e Anatomia, mas sobre as coisas que a vida também nos ensina.

À **Profª Dra. Ana Carolina Lyra de Albuquerque**, sempre com seu sorriso no rosto e disposição a ajudar, agradeço a oportunidade e incentivo à iniciação científica, e pelas soluções imediatas via “whatsapp”. Sempre a guardarei no coração!

À todos os **Professores**, pela acolhida e cada ensinamento transmitido. Obrigada por transmitir de modo tão brilhante o fascínio que é a Odontologia.

Ao meu namorado **Aristóteles**, por sempre me encorajar nos estudos, na pesquisa, por me amar, respeitar e pelo seu cuidado e inesgotável paciência!

Aos meus Avós, **Francisco, Severino e Maria** por me acolherem nessa jornada!

Às minhas queridas “Tias-mães” **Socorro e Neuma**, obrigada por todo incentivo e apoio nesses longos cinco anos que me afastei, vocês foram e sempre serão peças fundamentais ao equilíbrio da nossa família. Amo vocês!

À minha Tia **Iracy**, que me adotou como filha e me emprestou seu lar e seu colo durante toda minha graduação. Devo muito a você que com sua paciência e riquíssima simplicidade sempre me incentivou a continuar.

À minha prima-irmã, **Fernanda**, a minha eterna “magona”, essa conquista também é sua! Obrigada por demonstrar ao longo desse tempo uma amizade plena e sincera. “Em todo tempo ama o amigo; e na angústia nasce um irmão (Pv 17.17)”.

À **Isolda** por sua parceria em momentos bons e principalmente nos ruins e a **família Ferreira** que me acolheu como filha, agradeço muito e de coração por fazerem por mim o que a distância impediu que meus pais o fizessem. A saudade e gratidão serão eternas.

As minhas eternas “parceiras do 303”, sem vocês não seria a mesma coisa, partilhamos muitas lágrimas, risos e histórias, brigamos, brincamos e crescemos...Sempre guardarei com carinho cada uma de vocês **Deize e Pryscilla**. Amo vocês!

À minha querida amiga **Marcella Monnara**, por todas as risadas e pelo prazer de sua presença! Você é um presente que a odontologia me deu e vou levar pra sempre...

Aos meus grandes amigos de graduação, por todos os momentos de alegria e muitas vezes de tensão que partilhamos, os quais nos fizeram uma grande família, não citarei cada um de vocês e o que representam por uma questão espacial, o que não é problema para o meu coração, onde cada um tem um lugar especial.

Quero deixar aqui as minhas palavras de gratidão a todos que de alguma forma me ajudaram e que, por uma falha minha, não foram citados. Este trabalho envolveu muitas pessoas, e sem esta interação nada teria sido concluído.

“Sem sonhos, as perdas se tornam insuportáveis, as pedras do caminho se tornam montanhas, os fracassos se transformam em golpes fatais. Mas, se você tiver grandes sonhos... seus erros produzirão crescimento, seus desafios produzirão oportunidades, seus medos produzirão coragem.”

Augusto Cury

RESUMO

Reações alérgicas às proteínas do látex têm sido constantemente documentadas. Diante disso, estudos sobre o comportamento biológico de elásticos livres de látex, são necessários. O objetivo deste trabalho foi avaliar a citotoxicidade de elásticos em cadeia da cor prata de poliuretano e látex-free. Elásticos ortodônticos em cadeia da cor prata de nove diferentes fabricantes (três látex-free e seis de poliuretano) foram divididos em 9 grupos de 10 elásticos cada: Grupo UK (Látex-free, 3M Unitek), Grupo TP (Látex-free, TP Orthodontics), Grupo AO (Látex-free, American Orthodontics), Grupo O (Poliuretano, OrthoSource), Grupo M (Poliuretano, Morelli), Grupo TD (Poliuretano, Tecnident), Grupo UD (Poliuretano, Uniden), Grupo AZ (Poliuretano, Abzil) e Grupo AK (Poliuretano, Aditek). Para o ensaio de citotoxicidade utilizou-se cultura de células (linhagem de células L929, fibroblastos de camundongo), que foram submetidas ao teste de viabilidade celular com o corante vital vermelho neutro (“dye-uptake”) nos intervalos de 1, 2, 3, 7 e 28 dias. Os cálculos estatísticos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e posteriormente ao teste Tukey ($p < 0.05$). Os resultados não mostraram diferenças estatísticas significantes entre os Grupos UK, TP, e AO em todos os tempos experimentais ($p > 0.05$), exceto entre os Grupos UK e TP com 28 dias ($p < 0.05$). Observou-se diferenças estatísticas significantes ($p < 0.05$) entre a viabilidade celular nos Grupos O e TD com os Grupos M, AZ, AK nos dias 1 e 2. Os elásticos de poliuretano mostraram diminuição na viabilidade celular nas primeiras 48 horas, com aumento no 3º e 7º dia, e semelhante viabilidade celular aos elásticos látex-free com 28 dias. Pode-se concluir que elásticos em cadeia látex-free demonstraram viabilidade celular superior. As marcas OrthoSource e Tecnident mostraram menor viabilidade celular nas primeiras 48 horas.

Palavras-chave: Citotoxicidade. Cultura de células. Elastômeros. Ortodônticos.

ABSTRACT

Allergy caused by latex proteins has been well documented. Thus, the study of non-latex materials, is necessary. The aim of this study is to evaluate the cytotoxicity of silver-coloured orthodontic chain elastics, of polyurethane and latex-free. Nine chain elastics from different manufactures (3 latex-free and 6 polyurethane) were divided into 9 groups of 10 elastics each: Group UK (Latex-free, 3M Unitek), Group TP (Látex-free, TP Orthodontics), Group AO (Látex-free, American Orthodontics), Group O (Polyurethane, OrthoSource), Group M (Polyurethane, Morelli), Group TD (Polyurethane, Tecnident), Group UD (Polyurethane, Uniden), Group AZ (Polyurethane, Abzil) and Group AK (Polyurethane, Aditek). The cytotoxicity essay was performed using cell cultures (L-929 line cells, mouse fibroblast) that were submitted to the cell viability test with neutral red (“dye-uptake”) at 1, 2, 3, 7 and 28 days. Analysis of variance (ANOVA) with multiple comparisons and Tukey’s test were employed ($p < .05$). The results showed no statistically significant differences between Groups UK, TP and AO in all experimental times ($p > .05$), except between the Groups UK and TP at 28 days ($p < .05$). There was significant statistically difference ($p < .05$) between the viability of the cells in the Groups O and TD with the Groups M, AZ, AK at 1 and 2 days. The polyurethane elastics showed lower cell viability in the first 48 hours, with increase on 3rd and 7th day, and viability similar to latex-free elastics at 28 days. It can be concluded that the latex-free chain elastic showed higher cell viability. The OrthoSource and Tecnident trademark showed lower cell viability the initial 48 hours.

Keywords: Cell culture. Cytotoxicity. Elastomers. Orthodontics.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- FIGURA 1 - Aspecto celular A: controle de células. B: Grupo AO (American Orthodontics) com 2 dias. C: grupo TD (Tecnident) com 2 dias. Bar = 50µm..... 30
- FIGURA 2 - Porcentagem da viabilidade dos elásticos em cadeia testados obtida por espectrofotometria..... 30

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Grupos experimentais e de controle usados para os ensaios.... 28

TABELA 2 - Descrição estatística da densidade óptica dos elásticos em cadeia do
1° ao 28° dia..... 29

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADA	Associação Dentária Americana
ANOVA	Teste estatístico ANOVA
ANSI/	Do inglês American National Standards Institute
ATCC	Do inglês American Type Culture Collection
Bar	Barra de escala
CC	Grupo controle de células
C-	Grupo controle negativo
C+	Grupo controle positivo
g/mol	Gramas por mol
Grupo AK	Grupo Aditek
Grupo AO	Grupo American Orthodontics
Grupo AZ	Grupo Abzil
Grupo M	Grupo Morelli
Grupo O	Grupo Orthosource
Grupo TD	Grupo Tecnident
Grupo TP	Grupo TP Orthodontics
Grupo UD	Grupo Uniden
Grupo UK	Grupo Unitek
HEPES	Ácido 4-(2-Hydroxyetyl)-1-piperazineethanesulfonic
L929	Linhagem celular- fibroblasto de camundongo
MEM	Meio Mínimo Essencial
mg/ml	Miligrama por mililitro
Milli-Q	Sistema de Purificação de Água fornecido pela Millipore Corporation
mmol	Milimol
Mm	Milimolar
ug/ml	Micrograma por mililitro
μl	Microlitro
ml	Mililitro
nm	Nanômetro
OD	Do inglês Optical Density

PBS	Phosphate-buffered saline
pH	potencial Hidrogeniônico
Tukey	Teste estatístico de Tukey
U.V	Do inglês Ultraviolet

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Por cento
°C	Grau centígrado
$[R_2SiO]_n$	Fórmula que representa o esqueleto inorgânico do silicone, onde R é o grupo orgânico seguido do silício e oxigênio
μ	micrômetro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	16
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	18
REFERÊNCIAS.....	22
3 ARTIGO.....	27
4 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	35
APÊNDICE A.....	36
APÊNDICE B.....	37
ANEXO A.....	40

1 INTRODUÇÃO

Atualmente, pesquisas sobre a citotoxicidade de materiais ortodônticos têm sido cada vez mais realizadas, no intuito de avaliar o comportamento biológico dos diferentes tipos de materiais que mantêm íntimo contato com a mucosa oral e poderiam ter algum efeito citotóxico nos pacientes que fazem uso de aparelho ortodôntico (SANTOS, 2010; GONÇALVES, 2013).

Entre os materiais ortodônticos, os elásticos intrabucais têm sido difundidos e utilizados desde 1960, a partir de então surgiu a preocupação sobre o potencial citotóxico do látex, material presente na composição de grande parte dos elásticos ortodônticos (WAKELIN et al., 1999; PALOSUO et al., 2002; PITHON et al., 2010; BARATIERI et al., 2012). Os materiais elastoméricos fabricados a partir do látex têm importante função na mecânica ortodôntica, sendo usados desde a separação de elementos dentários previamente à bandagem, até para tracionamento de dentes mal posicionados e correção de diastemas (MARTINS et al., 2006). Estão disponíveis em diversas cores, têm fácil manuseio, boa aceitação e conforto ao paciente (KOCHENBORGER et al., 2011).

Contudo, tamanha inquietação quanto ao uso desses elásticos está no risco de liberação de substâncias tóxicas e sua conseqüente ingestão pelos pacientes, que sofreriam efeito nocivo cumulativo (PITHON, et al., 2010). Diante disso, elásticos alternativos livres de látex como os elásticos de poliuretano e silicone têm sido lançados no mercado como materiais com propriedades físicas e mecânicas semelhantes ao látex, além de maior compatibilidade biológica com os tecidos bucais e menor risco de reações alérgicas, como estomatites, reações respiratórias, e mesmo choque anafilático, a forma mais grave de alergia (TOMAZIC et al., 1992; TURJANMAA et al., 1996).

Entretanto, ainda pouco se sabe se ligaduras ortodônticas isentas de látex são citotóxicas para as células da mucosa bucal (PALOSUO et al., 2002; HWHANG et al., 2003; PEREIRA, 2012). Para a avaliação do potencial citotóxico desses materiais, linhagens de fibroblastos de camundongo L929 têm sido empregadas, pois demonstram comportamento semelhante à de fibroblastos gengivais humanos, e, portanto, constituem modelo *in vitro* apropriado para estudos sobre citotoxicidade de materiais de uso intraoral em pacientes ortodônticos (SCHMALZ, 1994;

SCHEDLE et al., 1995; MIRANDA et al., 2009; LESSA et al., 2010; D'ANTO et al., 2011; YEAP et al., 2012).

O sucesso na terapia ortodôntica sobrepuja o conhecimento da técnica e a busca pela oclusão ideal, isso porque, não considerar os padrões de biossegurança pode gerar repercussões negativas em nível sistêmico em longo prazo (PITHON, 2010). Dessa forma, a citotoxicidade dos elásticos ortodônticos em cadeia a partir da avaliação da viabilidade celular em cultura de células de fibroblastos L929 deve ser avaliada a fim de analisar o comportamento biológico destes materiais.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

O uso de elásticos ortodônticos iniciou-se ao fim do século XIX, e já, desde o início do século XX, diversos pesquisadores se dedicavam ao estudo de suas propriedades físicas e mecânicas (HENRIQUES et al., 2003; LORIATO et al., 2006). Contudo, atualmente o comportamento biológico dos materiais de uso odontológico, também tem sido alvo de pesquisas sobre biocompatibilidade e citotoxicidade (PITHON et al., 2011). Entende-se por biocompatibilidade como a capacidade de um material em desenvolver a função para o qual foi designado, sem causar danos aos tecidos a ele exposto (COSTA, 2005). A citotoxicidade de materiais ortodônticos também tem sido avaliada, no intuito de observar o comportamento biológico dos diferentes tipos de materiais que mantêm íntimo contato com a mucosa oral e poderiam ter algum efeito citotóxico cumulativo nos pacientes ortodônticos (SANTOS et al., 2010).

Os elásticos em cadeia tem grande aplicabilidade clínica podendo ser usados para retração de caninos, fechamento de diastemas, na correção de giroversões, no fechamento de espaços generalizados e na substituição do fio metálico pela ligadura, podendo ser divididos em dois tipos, baseando-se em seu método de fabricação: os de borracha natural (látex) e os sintéticos (poliuretano e silicone) (HENRIQUES et al., 2003; LORIATO et al., 2006).

Os elásticos de borracha natural são obtidos a partir da extração vegetal e posterior processamento. Em sua forma primitiva, o látex é uma substância leitosa obtida principalmente da seringueira *Hevea brasilienses*, árvore típica da Amazônia (WIGG et al., 1997; VERDOLIN et al., 2003). Após a obtenção do líquido do látex é feita a adição de conservantes, como a amônia, e durante seu processamento diversas substâncias são adicionadas, no intuito de alcançar suas propriedades finais ideais para uso clínico (SANTOS, 2010). Após esse processo, o produto final da borracha passa pela vulcanização, através de uniões sulfúricas por aquecimento, contendo 93 a 95% de poli-isopreno e até 3% de proteína por peso. De acordo com a planta, a região e a época do ano em que a borracha é colhida, seu peso molecular pode variar e diante disso para se garantir a excelência das propriedades, o látex usado na fabricação de elásticos ortodônticos é sempre o mais puro e de maior peso molecular (WIGG et al., 1997). De acordo com seu modo de armazenamento, o látex pode sofrer alterações em sua composição, por ser este um

material sensível ao ozônio e outros geradores de radicais livres como a luz solar e radiação ultravioleta, que enfraquece sua cadeia polimérica sendo sua maior limitação. Para solucionar tal problema, agentes antiozônio e antioxidantes são adicionados ao látex durante a fabricação dos elásticos ortodônticos, o que garante um material com propriedades mecânicas superiores (WIGG et al., 1997; SANTOS, 2010).

Entretanto, o látex natural não está na categoria dos materiais considerados seguros, visto que suas proteínas podem causar até mesmo reações de hipersensibilidade imediata correspondendo a 3% dos casos (PERRELLA & GASPARI, 2002; MENEZES et al., 2009). Dentre as reações alérgicas conhecidas, estão as estomatites, reações respiratórias, e mesmo choque anafilático, a forma mais grave de alergia, e estudos demonstram que a ocorrência de alergia ao látex pode chegar a 17% (TOMAZIC et al., 1992; ALENIUS et al., 1995; TURJANMAA et al., 1996). Conde-Salazar et al. (1993) avaliaram durante um período de dez anos, sete mil pacientes, destes, quatro mil oitocentos e sessenta foram submetidos ao teste alérgico, totalizando a porcentagem de 14,7% de reações positivas aos aditivos da borracha. A grande preocupação quanto ao uso desses elásticos na odontologia e mais precisamente na ortodontia, está no risco de liberação de substâncias tóxicas e sua consequente ingestão pelos pacientes, que sofreriam efeito nocivo cumulativo (PITHON et al., 2010).

Diante disso, elásticos alternativos livres de látex como os de poliuretano e silicone têm sido lançados no mercado como materiais com propriedades físicas e mecânicas semelhantes ao látex, além de maior compatibilidade biológica com os tecidos (TOMAZIC et al., 1992; TURJANMAA et al., 1996).

Os elásticos ortodônticos látex-free, são obtidos a partir do processamento químico do carvão, do petróleo e de alguns óleos vegetais (MARTINS et al., 2006). Estes elásticos começaram a ser produzidos a partir da década de vinte, após a primeira guerra mundial como material alternativo à borracha natural escassa na época. A partir da década de sessenta seu uso se difundiu na ortodontia, sendo sua composição interna dependente da tecnologia e qualidade da matéria prima empregada (HENRIQUES et al., 2003; ARAUJO & URSI, 2006; LORIATO et al., 2006; KOCHENBORGER et al., 2011).

Como exemplo de material sintético, o silicone, que é um polímero quimicamente descrito por $[R_2SiO]_n$ foi descoberto por Hyde, a partir da adição de

pequenas quantidades de sólidos alcalinos aos ciclos. A borracha de silicone tem uma cadeia polimérica formada por silício e oxigênio, com peso molecular entre 300.000 a 700.000 g/mols (PIRES & FERRARI, 2010).

Wurtz, em 1849, divulgou um material inovador o qual denominou uretana, produto da reação química entre um grupo isocianato e outra substância com o grupo hidroxila, no entanto, somente na década de 40 do século seguinte, o alemão Otto Bayer, lançou sua patente, quando enfim o poliuretano passou a ter aplicabilidade comercial (CANGEMI et al., 2009).

O poliuretano, como é conhecido e comercializado nos dias atuais, apresenta resistência às altas temperaturas e à abrasão e longo tempo de vida útil. Estima-se que seu emprego ultrapasse 5.000 produtos entre artigos médicos, industriais e farmacêuticos, ocupando a sexta posição entre os polímeros mais comercializados do mundo, sendo a aplicação mais recente e estudada a de biomaterial (CANGEMI et al., 2009; PIRES & FERRARI, 2010).

Os elásticos ortodônticos de materiais alternativos estão disponíveis em ampla gama de cores e para diferentes funções, como fechamentos de diastemas, para movimentação de elementos em grupo e fixação do arco aos bráquetes. Embora alguns autores afirmem serem suas propriedades mecânicas inferiores aos de elásticos de látex, o avanço tecnológico no desenvolvimento dos materiais odontológicos têm possibilitado a fabricação de elásticos látex-free com propriedades físicas e mecânicas semelhantes ao látex, além de maior compatibilidade biológica com os tecidos bucais, menor risco de reações alérgicas, custo acessível, facilidade de uso, e possibilidade de incorporação de fluoretos que minimizam a desmineralização dentária (TOMAZIC et al., 1992; STORIE et al., 1994; TURJANMAA et al., 1996).

Vários trabalhos têm investigado a biocompatibilidade e potencial citotóxico dos elásticos ortodônticos de ambos os materiais (poliuretano e látex-free), com diferentes linhagens de células e metodologias (EINOT & GABRIEL, 1975; WELSCH, 1977; WEISS & HIRSHMAN, 1992; SCHMALZ, 1994; ROGERO et al., 2003; JORGE et al., 2004; SILVEIRA et al., 2004; KAO et al., 2007; PÉRTILE, 2007; VANNET & HANSSENS, 2007; PITHON et al., 2008; MENEZES et al., 2009; SANTOS et al., 2009; SANTOS et al., 2010).

Como a biocompatibilidade é definida como a capacidade de um material em promover uma resposta biológica adequada para o fim a que se destina, reações

adversas que causem dano ao hospedeiro podem ser definidas como toxicidade (LIMA et al., 2003). Para se usar materiais biocompatíveis, portanto, faz-se necessário a realização de testes de citotoxicidade e biocompatibilidade.

O conselho de materiais dentários da *American Dental Association* (Associação Dentária Americana - ADA) recomenda a padronização e regulamentação dos testes de citotoxicidade, dividindo-os em três grupos: nível I (teste primário), nível II (teste secundário) e nível III (teste pré-clínico). O que corresponde as análises de citotoxicidade e potencial irritante, toxicidade tecidual local e ao teste de aplicação por meio da observância das reações teciduais após a utilização do material estudado em seres humanos respectivamente, e ainda em seu documento ANSI/ADA (*American National Standards Institute/American Dental Association*) tipo 5 trata da padronização dos materiais utilizados em ortodontia (SILVEIRA et al., 2004; MENEZES et al., 2009).

Os testes de nível I podem ser feitos tanto *in vitro* quanto *in vivo*, e são considerados relativamente simples, reproduzíveis, efetivos e controlados (SCHMALZ, 1994; JORGE et al., 2004). Nos testes *in vitro* as propriedades dos materiais são avaliadas diretamente em cultura de células, a exemplo da linhagem de fibroblastos L929, que reagem aos efeitos dos produtos analisados semelhantemente aos fibroblastos gengivais humanos, e, portanto, constituem modelo apropriado para estudos sobre citotoxicidade de materiais de uso intraoral em pacientes ortodônticos (SCHMALZ, 1994; SCHEDLE et al., 1995; SILVEIRA et al., 2004; PÉRTILE, 2007; MIRANDA et al., 2009; LESSA et al., 2010; SANTOS et al., 2010; D'ANTO et al., 2011; YEAP et al., 2012).

Assim pode-se dizer que os testes de cultura em linhagem de células para avaliação de citotoxicidade de materiais odontológicos são maneiras válidas, simples, eficazes e reproduzíveis para se compreender o comportamento biológico desses materiais, para maior segurança de seu uso clínico (MORIS, 2005; SANTOS, 2010).

REFERÊNCIAS

- ALENIUS, H.; KALKKINEN, N.; LUKKA, M.; REUNALA, T.; TURJANMAA, K.; MÄKINEN-KILJUNEN S., et al. Prohevein from the rubber tree (*Hevea brasiliensis*) is a major latex allergen. **Clin Exp Allergy**. Oxford, v.25, n.7, p.659-665, Jul, 1995.
- ARAUJO, F.B.C.; URSI, W.J.S. Estudo da degradação da força gerada por elásticos ortodônticos sintéticos. **R Dental Press Ortodon Ortop Facial**. Maringá, v.11, n.6, p.52-61, Nov-Dec, 2006.
- BARATIERI, C.; MATTOS, C.T.; ALVES JR, M.; LAU, T.C.L.; NOJIMA, L.I.; SOUZA, M.M.G., et al. *In situ* Evaluation of Orthodontic Elastomeric Chains. **Braz. Dent. J.** Ribeirão Preto, v.23, n.4, p.394-398, Jul- Aug, 2012.
- CANGEMI, J.M.; SANTOS, A.M.; NETO, S.C. Poliuretano: de travesseiros a preservativos, um polímero versátil. **Quím Nova Esc.** São Paulo, v.31, n.3, p.159-164, Aug, 2009.
- CONDE-SALAZAR, L.; DEL-RÍO, E.; GUIMARAENS, D.; GONZÁLES, D.A. Type IV allergy to rubber additives: a 10-year study of 686 cases. **J. Am Acad Dermatol.** Schaumburg, v.29, n.2, p.176-180, Aug, 1993.
- COSTA, C.A.S.; SOUZA, P.P.C. **Testes de citotoxicidade em cultura de células.** In: Estrela C, Metodologia científica – ensino e pesquisa em odontologia. São Paulo: Artes Médicas; p.146-160, 2005.
- D'ANTO, V.; SPAGNUOLO, G.; SCHWEIKL, H.; RENGO S.; AMBROSIO, L.; MARTINA, R., et al. Effect of N-acetyl cysteine on orthodontic primers cytotoxicity. **Dental Mater.** Oxford, v.27, n.2, p.180-186, Feb, 2011.
- DOS SANTOS, R.L., PITHON, M.M., MARTINS, F.O., *et al.*, "Evaluation of cytotoxicity and degree of conversion of glass ionomer cements reinforced with resin", **Eur J of Orthod.** London, v.33, n.6, p.251-256, Apr, 2011.
- EINOT, I., GABRIEL, K.R. A study of powers of several methods of multiple comparisons. **J Am Stat Assoc.** Washington, v.70, n.7, p.574-583, Oct, 1975.
- FRANZ, A., KONIG, F., SKOLKA, A., *et al.*, "Cytotoxicity of resin composites as a function of interface area", **Dental Mater.** Oxford, v.23, n.11, p.1438-1446, Nov, 2007.
- FIDDLER, W., PENSABENE, J., SPHON, J., *et al.*, "Nitrosamines in rubber bands used for orthodontic purposes", **Food Chem Toxicol.** Oxford, v.30, n.4, p.325-326, Apr, 1992.
- HAFEZ, H.S., SELIM, E.M., KAMEL, E.I.D., "Cytotoxicity, genotoxicity, and metal release in patients with fixed orthodontic appliances: A longitudinal in-vivo study", **Am J Orthod Dentofacial Orthop.** St. Louis, v.140, n.3, p.298-308, Sep, 2011.

HANSON, M., LOBNER, D., "In vitro neuronal cytotoxicity of latex and non-latex orthodontic elastics", **Am J Orthod Dentofacial Orthop.** St. Louis, v.126, n.1, p.65-70, Jul, 2004.

HENRIQUES, J.F.C.; HAYASAKI, S.M.; HENRIQUES, R.P. Elásticos ortodônticos: como selecioná-los e utilizá-los de maneira eficaz. **J. bras. ortodon. ortop. facial.** Curitiba, v.8, n.48, p.471-475, Nov-Dec, 2003.

HOLMES, J., BARKER, M.K., WALLEY, E.K., "Cytotoxicity of orthodontic elastics". **Am J Orthod Dentofacial Orthop.** St. Louis, v.104, n.2, p.188-191, Aug, 1993.

HWANG, C.J.; CHA, J.Y. Mechanical and biological comparison of latex and silicone rubber bands. **Am J Orthod Dentofacial Orthop.** St. Louis, v.124, n.4, p.379-386, Oct, 2003.

GONÇALVES, T.S. **Avaliação in vitro e in vivo da citotoxicidade e da genotoxicidade da solda de prata e da soldagem a laser utilizadas em orthodontia.** Porto Alegre. Tese de Doutorado em odontologia (Ortodontia) – Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul- PUCRS, p.45, 2013.

ISO 10993-5, Biological evaluation of medical devices. Part 5. Test for *in vitro* cytotoxicity, 2009.

JORGE, J.H.; GLAMPAOLO, E.T.; PAVARINA, A.C. Citotoxicidade dos materiais dentários. Revisão de literatura. **Rev. odontol. UNESP.** Araraquara, v.33, n.2, p.65-68, Apr-Jun, 2004.

KAO, C.T.; DING, S.J.; HE, H.; CHOU, M.Y.; HUANG, T.H. Cytotoxicity of orthodontic wire corroded in fluoride solution in vitro. **Angle Orthod.** Appleton, v.77, n.2, p.349-354, Mar, 2007.

KOCHENBORGER, C.; SILVA, D.L.; MARCHIORO, E.M.; VARGAS D.A.; HAHN L. Avaliação das tensões liberadas por elásticos ortodônticos em cadeia: estudo *in vitro*. **Dental Press J Orthod.** Maringá, v.16, n.6, p.93-99, Nov- Dec, 2011.

LESSA, F.C.R.; ARANHA, A.M.F.; HEBLING, J. Cytotoxic effects of white-TA and MTA-bio cements on odontoblast-like cells (MDPC-23). **Braz. Dent. J.** Ribeirão Preto, v.21, n.1, p.24-31, Jan, 2010.

LIMA, A.P.A.F.; VASCONCELOS, F.M.N.; BEATRICE, L.C.S. Biocompatibilidade dos materiais restauradores estéticos em pacientes infantis e adolescentes. **Int J Dent.** Recife, v.2, n.2, p.279-285, Jul-Dec, 2003.

LIMBERGER, K.M., WESTPHALEN, G.H., MENEZES, L.M., *et al.*, "Cytotoxicity of orthodontic materials assessed by survival tests in *Saccharomyces cerevisiae*", **Dental Mater.** Oxford, v.27, n.5, p.81-86, May, 2011.

LORIATO, L.B.; MACHADO, A.W.; PACHECO, W. Considerações clínicas e biomecânicas de elásticos em ortodontia. **Rev. clín. ortodon. Dental Press.** Maringá, v.5, n.1, p.44-57, Feb-Mar, 2006.

MARTINS, M.M.; MENDES, A.M.; CÔRTE, M.L.N.P.R.; GOLDNER, M.T.A. Elásticos ortodônticos em cadeia: revisão de literatura e aplicações clínicas. **Rev. clín. ortodon. Dental Press**. Maringá, v.5, n.5, p.71-78, Oct-Nov, 2006.

MARTINS, M.M.; MENDES, A.M.; ALMEIDA, M.A.O.; GOLDNER, M.T.A.; RAMOS, V.F. GUIMARÃES, S.S. Estudo comparativo entre as diferentes cores de ligaduras elásticas. **Rev. clín. ortodon. Dental Press**. Maringá, v.11, n.4, p.81-90, Jul-Aug, 2006.

MENEZES, L.M.; FREITAS, M.P.M.; GONÇALVES, T.S. Biocompatibilidade dos materiais em ortodontia: mito ou realidade? **Revista R Dental Press Ortodon Ortop Facial**. Maringá, v.14, n.2, p.144-157, Mar-Apr, 2009.

MIRANDA, R.B.; FIDEL, S.R.; BOLLER, M.A. L929 cell response to root perforation repair cements: an in vitro cytotoxicity assay. **Braz. Dent. J.** Ribeirão Preto, v.20, n.1, p.22-26, Apr, 2009.

MORIS, A. **Estudo *in vitro* da degradação da força de elásticos ortodônticos de látex sob condições dinâmicas** [Monografia]. Sorocaba. Escola de Aperfeiçoamento Profissional da APCD – Regional Sorocaba, p.91, 2005.

NEYNDORFF, H.C., BARTEL, D.L., TUFARO, F., *et al.*, "Development of a model to demonstrate photosensitizer-mediated viral inactivation in blood", **Transfusion**. Arlington, v.30, n.6, p.485–490, Jul-Aug, 1990.

NEIBURGER, E.J., "A case of possible latex allergy", **J. Clin Orthod**. Boulder, v.25, n.9, p.559–560, Sep, 1991.

PALOSUO, T.; ALENIUS, H.; TURJANMAA, K. Quantitation of latex allergens. **Methods**. San Diego, v.27, n.1, p.52-58, May, 2002.

PERRELA, F.W.; GASPARI, A.A. Natural rubber látex protein reduction with an emphasis on enzyme treatment. **Methods**. San Diego, v.27, n.1, p.77-86, May, 2002.

PEREIRA, F.A. **Avaliação *in vitro* e *in vivo* da biocompatibilidade de um fio ortodôntico a base de resina polimérica reforçada com fibra de vidro**. Niterói. Dissertação de Mestrado (Clínica Odontológica) – Universidade Federal Fluminense – Programa de Pós-Graduação em Odontologia, p.74, 2012.

PÉRTILE, R.A.N. **Estudo *in vitro* da interação da linhagem de fibroblastos L929 com membranas de celulose bacteriana para aplicações em engenharia de tecidos**. Florianópolis. Dissertação de Mestrado (Engenharia Química) – Universidade Federal de Santa Catarina – Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, p.79, 2007.

PIRES, J.; FERRARI, V.C.G.M. **Influência das diferentes cargas nas propriedades do elastômero de silicone (PDMS)**. São José dos Campos. Trabalho de Graduação (Engenharia de Materiais) - Universidade do Vale do Paraíba - Faculdade de Engenharias, Arquitetura e Urbanismo - FEAU, p.19, 2010.

PITHON, M.M.; SANTOS, R.L.; RUELLAS, A.C.O.; SANT'ANNA, E.F.; ROMANOS, M.T.V.; MENDES, G.S. Avaliação *in vitro* da citotoxicidade de elásticos ortodônticos intermaxilares. **Rev. odonto ciênc.** Porto Alegre, v.23, n.3, p.287-290, Jul-Sep, 2008.

PITHON, M.M., SANTOS, R.L., MARTINS, F.O., "Evaluation of cytotoxicity and degree of conversion of orthodontic adhesives over different time periods", **J Mater Res.** São Carlos, v.13, n.2, p.165–169, Apr-Jun, 2010.

PITHON, M.M. **Avaliação da citotoxicidade de elásticos e adesivos ortodônticos.** Rio de Janeiro. Tese de Doutorado em odontologia (Ortodontia) - Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ/Faculdade de Odontologia, p.53, 2010.

PITHON, M.M.; SANTANA, D.A.; SANTOS, R.L.; SOUZA, R.A.; FREITAS, L.M.A.; ROMANOS, M.T.V. Avaliação *in vitro* da citotoxicidade de bráquetes ortodônticos cerâmicos com e sem canaleta metálica. **Rev. Odontol. Univ. São Paulo.** São Paulo, v.23, n.3, p.223-227, Sep-Dec, 2011.

ROGERO, S.O.; LUGÃO, A.B.; IKEDA, T.I.; CRUZ, A.S. Teste *in vitro* de citotoxicidade: Estudo comparativo entre duas metodologias. **J Mater Res.** São Carlos, v.6, n.3, p.317-320, Apr, 2003.

SANTOS, R.L.; PITHON, M.M.; MENDES, G.S.; ROMANOS, M.T.V.; RUELLAS, A.C.O. Cytotoxicity of intermaxillary orthodontic elastics of different colors: an *in vitro* study. **J Appl Oral Sci.** Bauru, v.17, n.4, p.326–329, Jul-Aug, 2009.

SANTOS, R.L. **Citotoxicidade de elásticos ortodônticos.** Rio de Janeiro. Tese de Doutorado em odontologia (Ortodontia) – Universidade do Brasil – UFRJ/Faculdade de Odontologia, p.49, 2010.

SANTOS, R.L.; PITHON, M.M.; MARTINS, F.O.; ROMANOS, M.T.V.; RUELLAS, A.C.O. Evaluation of the cytotoxicity of latex and non-latex orthodontic separating elastics. **Orthod Craniofac Res.** Malden, v.13, n.1, p. 28–33, Feb, 2010.

SANTOS, R.L.; PITHON, M.M.; MARTINS, F.O.; ROMANOS, M.T.V.; RUELLAS, A.C.O. Citotoxicity of latex and non-latex orthodontic elastomeric ligatures on L929 mouse fibroblasts. **Braz. Dent. J.** Ribeirão Preto, v.21, n.3, p.205-210, May-Jun, 2010.

SCHEDULE, A.; SAMORAPOOMPICHIT, P.; RAUSCH-FAN, X. H.; FRANZ, A.; FÜREDER, W.; SPERR W.R., et al. Response of L-929 fibroblasts, human gingival fibroblasts, and human tissue mast cells to various metal cations. **J Dent Res.** Michigan, v.74, n.8, p.1513-1520, Aug, 1995.

SCHMALZ, G. Use of cell cultures for toxicity testing of dental materials-advantages and limitations. **J Dent.** Cardiff, v.22, n.2, p.6-11, Feb, 1994.

SILVEIRA, V.A.S.; PEREIRA, A.C.; AMADEI, S.U. Aspecto interdisciplinar na pesquisa da biocompatibilidade dos materiais dentários. **Rev. bras. biociênc.** Taubaté, v.10, n.4, p.209-213, Out-Dec, 2004.

SNYDER, H.A., SETTLE, S., "The rise in latex allergy: implications for the dentist", **J Am Dent Assoc.** Chicago, v.125, n.8, p. 1089–1097, Aug, 1994.

STORIE, D.J.; REGENNITTER F.; VON FRAUNHOFER, J.A. Characteristics of a fluoride-releasing elastomeric chain. **Angle Orthod.** Appleton, v.64, n.3, p.199-209, Jun, 1994.

TOMAKIDI, P., KOKE, U., KERN, R., *et al*, "Assessment of acute cyto-and genotoxicity of corrosion eluates obtained from orthodontic materials using monolayer cultures of immortalized human gingival keratinocytes", **J Orofac Orthop.** v. 61, n.1, p.2–19, Feb, 2000.

TOMAZIC, V.J.; WITHROW, T.J.; FISHER, B.R., DILLARD, S.F. Latex-associated allergies and anaphylactic reactions. **Clin Immunol Immunopathol.** Orlando, v.64, n.2, p.89-97, Aug, 1992.

TURJANMAA, K.; ALENIUS, H.; MAKINEN-KILJUNEN, S.; REUNALA, T.; PALOSUO, T. Natural rubber latex allergy. **Allergy.** Utrecht, v.51, n.35, p.593-602, Dec, 1996.

VANNET, V.B.M.; HANSSENS, J.L. Cytotoxicity of two bonding adhesives assessed by three-dimensional cell culture. **Angle Orthod.** Appleton, v.77, n.4, p.716-722, Jul, 2007.

VERDOLIN, B.A.; BOAS, W.W.V.; GOMES, R.S. Alergia ao látex: Diagnóstico accidental após procedimento urológico. Relato de caso. **Rev. Bras. Anesthesiol.** Botafogo, v.53, n.4, p.496-500, Jul-Aug, 2003.

WAKELIN, S.H.; WHITE, I.R. Natural rubber latex allergy. **Clin Exp Dermatol.** Oxford, v.24, n.13, p.245-248, Sep, 1999.

WEISS, M.E.; HIRSHAMAN, C.A. Latex Allergy. **Can J Anaesth.** Toronto, v.39, n.6, p.528-536, Jul, 1992.

WELSCH, R.E. Stepwise multiple comparison procedures. **J Am Stat Assoc.** Washington, v.72, n.8, p.354–359, Dec, 1977.

WIGG, M.D.; MENEZES, L.M.; QUINTÃO, C.C.A.; MOREIRA, T.C.; CHEVITARESE, O. Elásticos extra-orais: avaliação da citotoxicidade. **RGO - Rev Gaúcha Odontol.** Porto Alegre, v.1, n.2, p.151-157, May-Dec, 1997.

YEAP, S.K.; OMAR, A.R.; ALI, A.M.; HO, W.Y.; BEH, B.K.; ALITHEEN, N.B. Immunomodulatory effect of raphidophora korthalsii on natural killer cell cytotoxicity. **Evid Based Complement Alternat Med.** Rockville Pike, vol. 2012, Article ID 786487, 7 pages, 2012. doi:10.1155/2012/786487.

3 ARTIGO



ISSN 1517-7076

 Revista Matéria, v. 17, n. 1, pp. 939 – 945, 2012
<http://www.materia.coppe.ufrj.br/sarra/artigos/artigo11466>

Evaluation of the cytotoxicity of polyurethane and non-latex orthodontic chain elastics

 SANTOS, R.L.^I, PITHON, M.M.^{II}, PEREIRA, A.R.B.^I, ROMANOS, M.T.V.^{III}
^I Department of Orthodontics, Federal University of Campina Grande – UFCG, Av. dos Universitários, s/n, Rodovia Patos/Teixeira, Km1, Santa Cecília, Cep: 58700-970, Patos, Paraíba, Brazil.

 e-mail: lacerdaorto@hotmail.com ; lacerdaorto@bol.com.br
^{II} Department of Orthodontics, State University of Southwest Bahia - UESB, Rua José Moreira Sobrinho, S/N, Jequiezinho, Cep: 45206-190, Jequié, Bahia, Brazil.

 e-mail: matheuspithon@gmail.com
^{III} Department of Virology, Federal University of Rio de Janeiro - UFRJ, Av. Professor Rodolpho Paulo Rocco, 325, Ilha do Fundão, Cep: 21944-970, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil.

 e-mail: teresaromanos@micro.ufrj.br

ABSTRACT

Allergy caused by latex proteins has been well documented. Thus, the study of non-latex materials, is necessary. The aim of this study is to evaluate the cytotoxicity of silver-coloured orthodontic chain elastics, of polyurethane and latex-free. Nine chain elastics from different manufactures (3 latex-free and 6 polyurethane) were divided into 9 groups of 10 elastics each: Group UK (Latex-free, 3M Unitek), Group TP (Látex-free, TP Orthodontics), Group AO (Látex-free, American Orthodontics), Group O (Polyurethane, OrthoSource), Group M (Polyurethane, Morelli), Group TD (Polyurethane, Tecnident), Group UD (Polyurethane, Uniden), Group AZ (Polyurethane, Abzil) and Group AK (Polyurethane, Aditek). The cytotoxicity essay was performed using cell cultures (L-929 line cells, mouse fibroblast) that were submitted to the cell viability test with neutral red (“dye-uptake”) at 1, 2, 3, 7 and 28 days. Analysis of variance (ANOVA) with multiple comparisons and Tukey’s test were employed ($p < .05$). The results showed no statistically significant differences between Groups UK, TP and AO in all experimental times ($p > .05$), except between the Groups UK and TP at 28 days ($p < .05$). There was significant statistically difference ($p < .05$) between the viability of the cells in the Groups O and TD with the Groups M, AZ, AK at 1 and 2 days. The polyurethane elastics showed lower cell viability in the first 48 hours, with increase on 3rd and 7th day, and viability similar to latex-free elastics at 28 days. It can be concluded that the latex-free chain elastic showed higher cell viability. The OrthoSource and Tecnident trademark showed lower cell viability the initial 48 hours.

Keywords: Cytotoxicity, Elastomers, Cell culture, Orthodontics.

1 INTRODUCTION

Latex has been extensively used in orthodontics since the advent of the specialty, however, the protein content of latex is a known allergen [1, 2]. As alternative to latex, chain elastics of types different as polyurethane and latex-free has been manufactured, in order to decrease the risk of allergic reactions caused by latex orthodontic elastics, as swelling and stomatitis, erythematous oral lesions, respiratory reactions, and even anaphylactic shock, the most severe form of allergy [3, 4], can be cited.

But little is known if polyurethane and latex-free orthodontic ligatures are cytotoxic to oral mucosal cells [1-6]. Cell lines [7], such as L929 mouse fibroblasts [8], have been shown to behave similarly to primary human gingival fibroblasts and, therefore, are a suitable in-vitro model to test the toxicity [9-12] of products used intra-orally during orthodontic treatment [13-15]. In order of evaluate the biological behavior of these materials in cell culture, the Objective of the present in vitro study was to test the cytotoxicity of polyurethane and latex-free Orthodontic elastomeric chains of different manufactures.

2 MATERIAL AND METHODS

Silver-coloured orthodontic chain elastics (medium) from 9 different manufacturers were selected for cytotoxicity study, being three of latex-free and six containing polyurethane (Table 1). The samples were divided into 9 groups of 10 elastics each: Group UK (Latex-free, 3M Unitek, Monrovia, California, USA), Group TP (Latex-free, TP Orthodontics, Lodi, California, USA), Group AO (Latex-free, American Orthodontics, Sheboygan, Wisconsin, USA), Group O (Polyurethane, OrthoSource, North Hollywood, CA, USA), Group M (Polyurethane, Morelli, Sorocaba, São Paulo, Brazil), Group TD (Polyurethane, Tecnident, São Carlos, São Paulo, Brazil), Group UD (Polyurethane, Uniden, Sorocaba, São Paulo, Brazil), Group AZ (Polyurethane, Abzil, São José do Rio Preto, São Paulo, Brazil) and Group AK (Polyurethane, Aditek, Cravinhos, São Paulo, Brazil).

Table 1: Experimental and control groups used for the assays.

Groups	Trademark	Main Composition	Colour	Reference number
UK	Unitek	Latex-free	Silver	406-669
TP	TP Orthodontics	Latex-free	Silver	389-061
AO	American Orthodontics	Latex-free	Silver	854-299
O	OrthoSource	Polyurethane	Silver	0-0434-420
M	Morelli	Polyurethane	Silver	60-05-217
TD	Tecnident	Polyurethane	Silver	402-001
UD	Uniden	Polyurethane	Silver	000-1495
AZ	Abzil	Polyurethane	Silver	467-816
AK	Aditek	Polyurethane	Silver	0080185
C+	Tween 80 (Polyoxyethylene-20-sorbitan, Sigma, St. Louis, Missouri, USA)			
C-	PBS solution (phosphate-buffered saline, Cultilab, Campinas, SP, Brazil)			
CC	cell control (L-929 line cells, ATCC, Rockville, MD, USA)			

All samples had recent manufacturing dates, were from the same production lot and came in sealed plastic packages. The superficial powder coating of the elastomeric ligatures was removed, in which, all elastics were washed for 15 seconds with current deionized water by using a Milli-Q purification system (Millipore, Bedford, MA, USA) and dried lightly with absorbent paper. Before testing all elastomeric ligatures were sterilized by exposure to ultraviolet light (Labconco, Kansas, Missouri, USA) for 30 minutes [16-17].

The cell culture model used was the monolayer containing L-929 line cells (American Type Culture Collection - ATCC, Rockville, MD, USA) maintained in Eagles' minimum essential medium (Cultilab, Campinas, Brazil) by adding 0.03 mg/ml of glutamine, 50 µg/ml of garamicine, 2.5 mg/ml of fungizone, 0.25% sodium bicarbonate solution, 10 mM of HEPES, and 10% bovine fetal serum for growth medium. Next, the cell culture medium was incubated at 37°C for 48 hours.

To verify the cell response in extreme situations, three additional groups were included in the study: Group CC (cell control), consisting of L-929 cells not exposed to supernatants from the elastomeric ligatures; Group C+ (positive control), consisting of Tween 80 (Polyoxyethylene-20-sorbitan, Sigma, St. Louis, Missouri, USA); Group C- (negative control), consisting of phosphate-buffered saline (PBS) solution (Table 1). The positive and negative controls were incubated in MEM maintenance medium (Eagles' minimum essential medium) for 1, 2, 3, 7 and 28 days and the extracted elutes were added to L-929 line cells incubated in the growth medium.

The cytotoxicity of these orthodontic elastics was determined through the dye-uptake technique [18], which is based on the neutral red absorption by living cells. How these chain elastics are usually maintained in the oral cavity for up to 4 weeks, since patients wearing fixed appliances usually visit the orthodontist once a month, the periods of time: 1, 2, 3, 7, and 28 days were evaluated in this study. These experimental periods represent the time maintenance under cell culture conditions before removal of the chain elastics.

2.1 Dye-uptake

Volumes of 100 μ l of L-929 cells were distributed in triplicate for each specimen tested into 96-well microplates. After 48 hours, the growth medium was replaced with 100 μ l of Eagles' minimum essential medium (MEM) obtained following incubation in the different types of chain elastics at 1, 2, 3, 7 and 28 days. Eagles' minimum essential medium was employed because it is the same type of material used for cell maintenance, thus not influencing the results.

After 24 hours of incubation, 100 μ l of 0.01 per cent neutral red dye (Sigma, St. Louis, Missouri, USA) was added to each well in the microplates and incubated for 3 hours at 37 °C. Following this period of time, 100 μ l of 4 per cent formaldehyde solution in PBS (130 mmol of NaCl; 2 mmol of KCl; 6 mmol of Na₂HPO₄ 2 H₂O; 1 mmol of K₂HPO₄ 1 mmol; pH 7.2) were added to each well to promote cell attachment to the plate. After 5 minutes, 100 μ l of 1 per cent acetic acid and 50 per cent methanol were added in order to remove the dye not taken up by the cells. After 20 minutes, a spectrophotometer (BioTek, Winooski, Vermont) set at a wavelength of 492 nm was used to determine the dye taken up by the cells. Because elastomeric ligatures can be in the oral cavity for up to 4 weeks, cell viability was determined after exposure to MEM in which the elastics had been incubated for 1, 2, 3, 7 and 28 days. The cytotoxicity of the materials was determined according to ISO 10993-5 [19] for evaluation and standardization.

For ranking the citotoxicity, a post hoc comparison was performed [20, 21]. Statistical calculations were performed with 1-way analysis of variance (ANOVA) followed by the Tukey post hoc test. *P* values less than .05 were considered to indicate significant differences. Each culture well was considered an individual sample.

3 RESULTS

There were statistically significant differences ($p=.00$) between the viability of the cells of Group CC (Figure 1A) and all other groups at 1, 2, 3, 7 and 28 days. Nor were there any statistically significant differences ($p>.05$) between the viability of the cells in Groups UK, TP and AO in all experimental times, except between the Groups UK and TP at 28 days ($p<.05$) (Table 2 and Figure 2).

Table 2: Descriptive statistics for optical density of chain elastics at 1 to 28 days.

G	Time (1 day)			Time (2 days)			Time (3 days)			Time (7 days)			Time (28 days)		
	M	SD	VC (%)	M	SD	VC (%)	M	SD	VC (%)	M	SD	VC (%)	M	SD	VC (%)
CC	.842 ^a	.030	100.0	.890 ^a	.029	100.0	.616 ^a	.025	100.0	.915 ^a	.030	100.0	.519 ^a	.028	100.0
C-	.814	.031	96.7	.862	.022	96.9	.599	.029	97.4	.873	.031	95.5	.499	.022	96.3
C+	.066	.008	7.90	.086	.010	9.70	.060	.009	9.80	.086	.008	9.50	.055	.009	10.6
UK	.691 ^{bc}	.030	82.1	.723 ^b	.030	81.3	.550 ^b	.023	89.4	.841 ^{bc}	.032	92.0	.488 ^b	.027	94.2
TP	.682 ^{bc}	.034	81.0	.732 ^b	.031	82.3	.557 ^b	.028	90.5	.839 ^{bc}	.030	91.8	.473 ^c	.024	91.3
AO	.711 ^c	.037	84.5	.738 ^b	.027	83.0	.550 ^b	.024	89.4	.855 ^b	.036	93.5	.477 ^{bc}	.024	92.0
O	.597 ^f	.031	71.0	.614 ^c	.024	69.1	.488 ^{cc}	.027	79.3	.810 ^{cdg}	.032	88.6	.467 ^c	.020	90.0
M	.651 ^{dg}	.033	77.4	.661 ^d	.036	74.3	.523 ^{df}	.027	85.0	.814 ^{cdg}	.032	89.0	.474 ^c	.028	91.4
TD	.614 ^{ct}	.026	73.0	.605 ^c	.020	68.0	.517 ^{dt}	.029	84.0	.824 ^{bccf}	.036	90.1	.465 ^c	.029	89.6
UD	.639 ^{sg}	.028	75.9	.666 ^{dc}	.024	74.9	.535 ^{db}	.027	87.0	.798 ^{de}	.028	87.3	.467 ^c	.022	90.0
AZ	.663 ^{sg}	.031	78.8	.712 ^{dt}	.028	80.0	.524 ^{dt}	.027	85.1	.808 ^{dt}	.031	88.4	.465 ^c	.026	89.7
AK	.676 ^{sg}	.034	80.3	.687 ^{dct}	.032	77.2	.511 ^{ct}	.020	83.0	.786 ^{de}	.033	86.0	.472 ^c	.028	91.0

N=10. Analysis of variance ANOVA and Tukey's test were employed ($p<.05$). Values followed by same letters are not significantly different ($p>.05$) for the same time. G: Groups. M: Mean. SD: standard deviation. VC: Viable Cells.

There was statistically difference ($p<.05$) between the viability of the cells in Groups O and TD with the Groups M, UD, AZ, AK at 1 and 2 days, except between the Groups TD and UD at 1 day ($p<.05$). The polyurethane elastics showed lower cell viability in the first 48 hours, with increase on 3rd and 7th day, and viability similar to latex-free elastics in 28 days (Table 2 and Figure 2).

With 48 hours the percentage of viable cells varied between 83.0 per cent in Group AO (Figure 1B) latex-free chain elastic, to 68.0 per cent in Group TD (Figure 1C) polyurethane chain elastics.

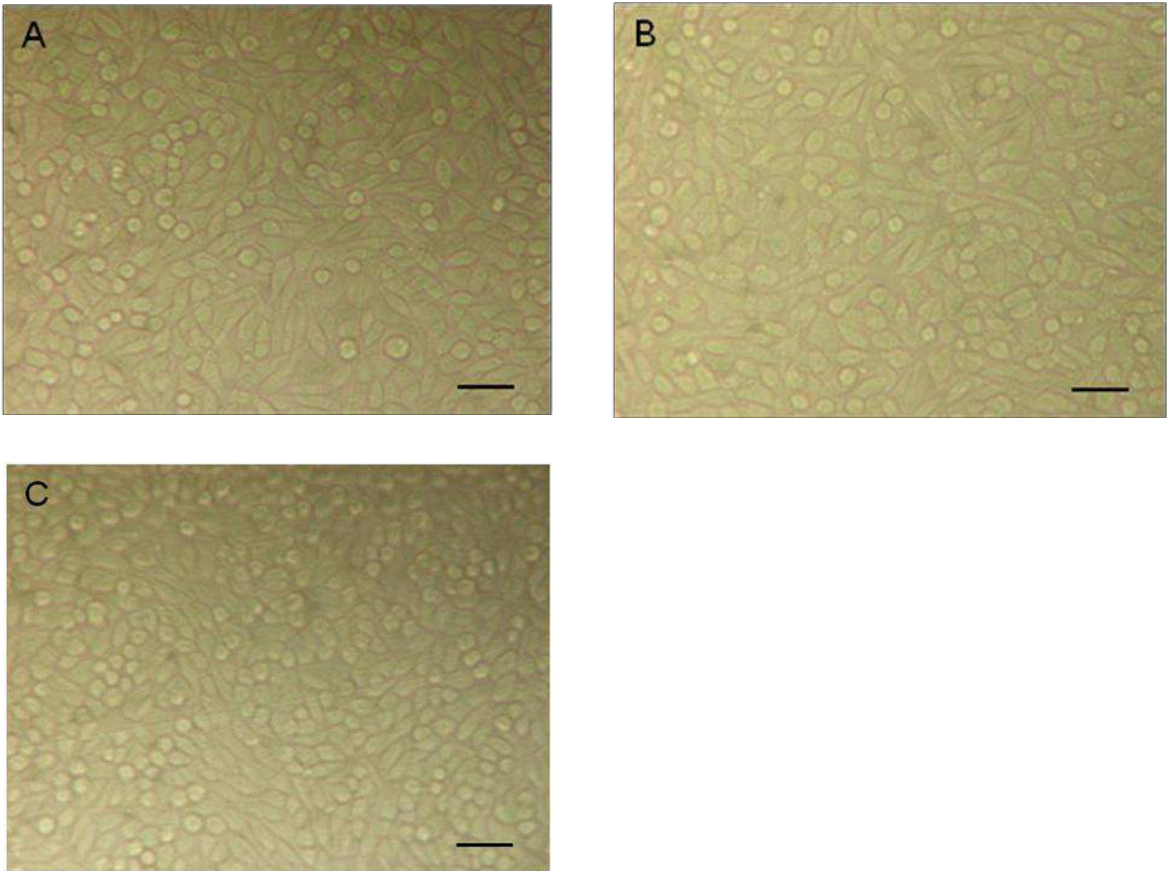


Figure 1: Cell aspect. **A)** cell control; **B)** group AO (American Orthodontics) at 2 days; **C)** group TD (Tecident) at 2 days. Bar = 50µm.

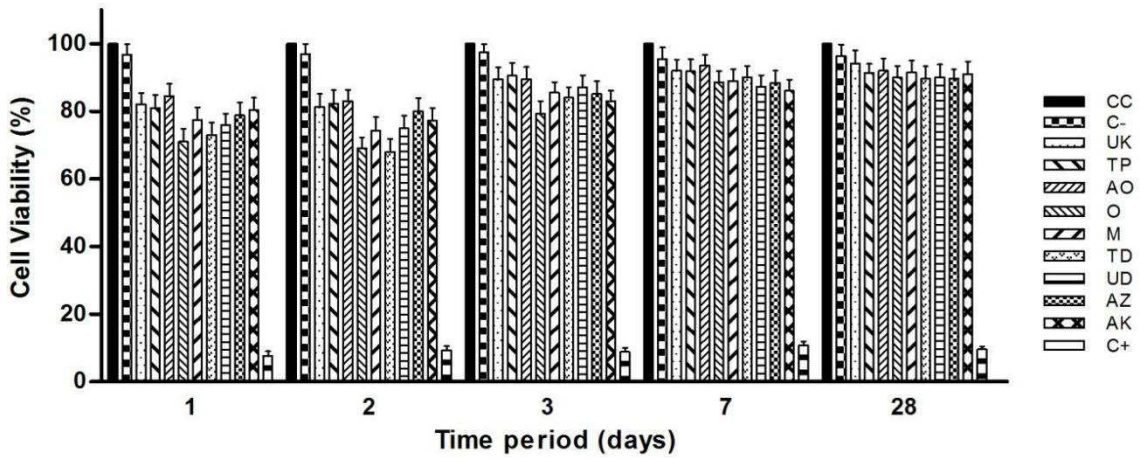


Figure 2: Percentage viability of tested chain elastics obtained by spectrophotometry.

4 DISCUSSION

The use of monolayer cell culture in the present study was based on other studies [17, 22]. This model was used together with the dye-uptake technique [18] because the cytotoxicity of the materials can be determined by spectrophotometry.

Spectrophotometric assay allows rapid and reliable evidence for cell viability to be obtained based on the use of vital stain incorporated by viable cells [16, 17]. In this study, we used neutral red dye as it is largely employed for identification of L-929 cell viability [23, 24]. Dead or damaged cells cannot incorporate vital stain, thus not being recognized on optical reading. Therefore, spectrophotometry does not allow dead cells to be distinguished from the damaged ones [23].

L-929 mouse fibroblasts were used because they have results comparable to primary human gingival fibroblasts [13, 14], but one cannot interpret the cell culture [12] results as a human response.

The percentage of viable cells was obtained by comparing the mean optical density (OD) in the control group (cells with no contact with chain elastics) to that obtained from supernatants of cell cultures that had been in contact with chain elastics [17, 23].

As sterilization is a prerequisite for cytotoxicity essays, ultraviolet radiation [16, 17] was used in this study for 30 minutes for each elastic surface. It was observed that all elastics exhibited the same colour aspect following sterilization with UV light.

Because natural latex rubber has been increasingly used as dental material, many cytotoxicity issues have been reported as well [5]. Conservants such as sulphur and zinc oxide as well as antioxidants such as dithio-carbohydrates, N-nitrosodibutylamine, and N-nitrosopiperidine are all known to be cytotoxic substances [6]. The colourants used in the fabrication of coloured latex exhibit low toxicity [25]. What makes her effect to be clinically inoffensive.

As an alternative to latex, front the reports of latex allergy in the literature [26, 27], this study evaluated the cytotoxicity of non-latex materials, as the polyurethane and latex-free orthodontic chain elastics.

Allergy to natural latex occurs because of the presence of many types of proteins, and the powder covering the orthodontic elastics works as a transporter for these proteins. Therefore, the development of non-latex elastics has become increasingly important for clinical usage.

We have assessed Unitek, TP Orthodontics and American Orthodontics, latex-free chain elastics and it was observed that these elastomers induced a lesser amount of cell lysis compared to others polyurethane chain elastics. As the powder covering the chain elastics of all manufacturers was removed before performing the *in vitro* studies, it was not possible to know whether this powder would have any effect. The powder was removed in order to standardize the samples as composition and quantity of powder present in the chain elastics could interfere with the results.

Evidence of this cytotoxic feature was shown following exposition of the chain elastics to cell culture medium. Chain elastics from OrthoSource, Morelli, Tecnident, Uniden, Abzil and Aditek trademarks induced a greater amount of cell lysis at 24 and 48 hours, suggesting a greater release of toxic ingredients at 48 hours, due to release of cytotoxic components, which was shown on days 1 and 2, and decreased on days 3, 7 and 28. However, all chain elastics were found to be biocompatible after the 3rd experimental day.

The latex-free chain elastics presented better performance compared to the polyurethane elastics, suggesting that different processes in the manufacture and materials with different compositions leads to different cytotoxic characteristics of these, despite being reported by manufacturers atoxicity these materials. Latex-free chain elastics showed low capacity of inducing cell lysis regardless of the evaluated time.

The great danger is that potentially cytotoxic intra-oral elastics could release substances that might be ingested by the patient over time, thus causing diseases resulting from a cumulative effect [15].

The chain elastics evaluated in this study showed over 68% cell viability regardless of the experimental period of time. Elastomers of latex and non-latex evaluated in previous study [28] demonstrated that the occurrence of cell lysis was above 50% for latex elastics compared to non-latex ones. However, the authors considered both types of elastics viable for clinical use. Therefore, it is suggested that elastics with cell viability less than 50% should be avoided in order to prevent cumulative effects of the cytotoxic component releasing, into the organism [15].

There seems to be an important relationship between the processes of manufacture these chain elastics and their cytotoxic character. Currently, there is a shortage of clinical studies demonstrating the cytotoxicity of elastomers of orthodontic use. However, as these materials are widely used in clinical orthodontics, care regarding the cytotoxicity of orthodontic chain elastics should be taken, mainly with regard to elastics as they have a very close contact with gingiva.

5 CONCLUSION

Within the limits of this in vitro study, the latex-free chain elastics from Unitek, TP Orthodontics and American Orthodontics trademark induced a lesser amount of cell lysis compared to polyurethane chain elastics. However, chain elastics, of latex-free and polyurethane of all manufacturers were considered suitable for clinical use.

6 BIBLIOGRAPHY

- [1] PALOSUO, T., ALENIUS, H., TURJANMAA, K., "Quantitation of latex allergens", *Methods.*, v. 27, n. 1, pp. 52 – 58, May 2002.
- [2] WAKELIN, S.H., WHITE, I.R., "Natural rubber latex allergy", *Clinical and Experimental Dermatology*, v. 24, n. 13, pp. 245–248, September 1999.
- [3] TOMAZIC, V.J., WITHROW, T.J., FISHER, B.R., *et al.*, "Latex-associated allergies and anaphylactic reactions", *Clinical Immunology and Immunopathology*, v. 64, n. 2, pp. 89–97, August 1992.
- [4] TURJANMAA, K., ALENIUS, H., MAKINEN-KILJUNEN, S., *et al.*, "Natural rubber latex allergy", *Allergy*, v. 51, n. 35, pp. 593–602, December 1996.
- [5] FIDDLER, W., PENSABENE, J., SPHON, J., *et al.*, "Nitrosamines in rubber bands used for orthodontic purposes", *Food and Chemical Toxicology*, v. 30, n. 4, pp. 325–326, April 1992.
- [6] HWANG, C.J., CHA, J.Y. "Mechanical and biological comparison of latex and silicone rubber bands", *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics*, v. 124, n. 4, pp. 379–386, October 2003.
- [7] LESSA, F.C.R., ARANHA, A.M.F., HEBLING, J., "Cytotoxic effects of white-TA and MTA-bio cements on odontoblast-like cells (MDPC-23)", *Brazilian Dental Journal*, v. 21, n. 1, pp. 24–31, January 2010.
- [8] MIRANDA, R.B., FIDEL, S.R., BOLLER, M.A., "L929 cell response to root perforation repair cements: an in vitro cytotoxicity assay", *Brazilian Dental Journal*, v. 20, n. 1, pp. 22–26, April 2009.
- [9] D'ANTO, V., SPAGNUOLO, G., SCHWEIKL, H., *et al.*, "Effect of N-acetyl cysteine on orthodontic primers cytotoxicity", *Dental Materials*, v. 27, n. 2, pp. 180–186, February 2011.
- [10] HAFEZ, H.S., SELIM, E.M., KAMEL, E.I.D., "Cytotoxicity, genotoxicity, and metal release in patients with fixed orthodontic appliances: A longitudinal in-vivo study", *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics*, v. 140, n. 3, pp. 298–308, September 2011.
- [11] LIMBERGER, K.M., WESTPHALEN, G.H., MENEZES, L.M., *et al.*, "Cytotoxicity of orthodontic materials assessed by survival tests in *Saccharomyces cerevisiae*", *Dental Materials*, v. 27, n. 5, pp. 81–86, May 2011.
- [12] YEAP, S.K., OMAR, A.R., ALI, A.M., *et al.*, "Immunomodulatory effect of rhabdiphora korthalsii on natural killer cell cytotoxicity", *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, v. 2012, article ID 786487.
- [13] SCHEDULE, A., SAMORAPOOMPICHIT, P., RAUSCH-FAN, X. H., *et al.*, "Response of L-929 fibroblasts, human gingival fibroblasts, and human tissue mast cells to various metal cations", *Journal Dental Resarch*, v. 74, n. 8, pp. 1513–1520, August 1995.
- [14] FRANZ, A., KONIG, F., SKOLKA, A., *et al.*, "Cytotoxicity of resin composites as a function of interface area", *Dental Materials*, v. 23, n. 11, pp. 1438–1446, November 2007.
- [15] SCHMALZ, G. "Use of cell cultures for toxicity testing of dental materials-advantages and limitations", *Journal of Dentistry*, v. 22, n. 2, pp. 6–11, February 1994.

- [16] SANTOS, R.L., PITHON, M.M., MENDES, G.S., *et al.*, "Cytotoxicity of intermaxillary orthodontic elastics of different colors: an in vitro study", *Journal of Applied Oral Science*, v. 17, n. 4, pp. 326–329, July/August 2009.
- [17] SANTOS, R.L., PITHON, M.M., MARTINS, F.O., *et al.*, "Evaluation of the cytotoxicity of latex and non-latex orthodontic separating elastics", *Orthodontic & Craniofacial Research*, v. 13, n. 1, pp. 28–33, February 2010.
- [18] NEYNDORFF, H.C., BARTEL, D.L., TUFARO, F., *et al.*, "Development of a model to demonstrate photosensitizer-mediated viral inactivation in blood", *Transfusion*, v. 30, n. 6, pp. 485–490, July/August 1990.
- [19] ISO 10993-5, Biological evaluation of medical devices. Part 5. Test for In Vitro Cytotoxicity, 2009.
- [20] EINOT, I., GABRIEL, K.R. "A study of powers of several methods of multiple comparisons", *Journal of American Statistical Association*, v. 70, n. 7, pp. 574 – 583, October 1975.
- [21] WELSCH, R.E. "Stepwise multiple comparison procedures", *Journal of American Statistical Association*, v. 72, n. 8, pp. 354–359, December 1977.
- [22] TOMAKIDI, P., KOKE, U., KERN, R., *et al.*, "Assessment of acute cyto-and genotoxicity of corrosion eluates obtained from orthodontic materials using monolayer cultures of immortalized human gingival keratinocytes", *Journal Orofacial Orthopedics*, v. 61, n. 1, pp. 2–19, February 2000.
- [23] DOS SANTOS, R.L., PITHON, M.M., MARTINS, F.O., *et al.*, "Evaluation of cytotoxicity and degree of conversion of glass ionomer cements reinforced with resin", *European Journal of Orthodontics*, v. 33, n. 6, pp. 251–256, April 2011.
- [24] PITHON, M.M., SANTOS, R.L., MARTINS, F.O., "Evaluation of cytotoxicity and degree of conversion of orthodontic adhesives over different time periods", *Materials Research*. v. 13, n. 2, pp. 165–169, April/June 2010.
- [25] HOLMES, J., BARKER, M.K., WALLEY, E.K., "Cytotoxicity of orthodontic elastics", *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics*, v. 104, n. 2, pp. 188–191, August 1993.
- [26] SNYDER, H.A., SETTLE, S., "The rise in latex allergy: implications for the dentist", *Journal of the American Dental Association*, v. 125, n. 8, pp. 1089–1097, August 1994.
- [27] NEIBURGER, E.J., "A case of possible latex allergy", *Journal of Clinic Orthodontics*, v. 25, n. 9, pp. 559–560, September 1991.
- [28] HANSON, M., LOBNER, D., "In vitro neuronal cytotoxicity of latex and non-latex orthodontic elastics", *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics*, v. 126, n. 1, pp. 65–70, July 2004.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Dentro dos limites de um estudo *in vitro*, pôde-se concluir com esta pesquisa, que os elásticos em cadeia látex-free demonstraram desempenho superior aos de poliuretano, diante da menor indução de lise celular observada nas marcas Unitek, TP Orthodontics e American Orthodontics. Contudo, os elásticos em cadeia de ambos os materiais e de todos os fabricantes pesquisados foram considerados apropriados para uso clínico.

APÊNDICE A – NORMAS DE FORMATAÇÃO DE TEXTO DA REVISTA MATÉRIA

As normas de formatação de texto para submissão de artigos científicos à Revista Matéria são descritos em modelo anexo (ANEXO A) disponibilizado no endereço <http://www.materia.coppe.ufrj.br/sarra/artigos/artigo10XXX>.

APÊNDICE B – METODOLOGIA DA PESQUISA

Para o estudo de citotoxicidade foram selecionados elásticos ortodônticos em cadeia da cor prata de nove diferentes fabricantes, sendo três látex-free e seis de poliuretano (Tabela 1). As amostras foram divididas em 9 grupos de 10 elásticos cada: Grupo UK (látex-free, 3M Unitek, Monrovia, Califórnia, EUA), Grupo TP (látex-free, TP Orthodontics, Lodi, Califórnia, EUA), Grupo AO (látex-free, American Orthodontics, Sheboygan, Wisconsin, EUA), Grupo O (poliuretano, OrthoSource, North Hollywood, CA, EUA), Grupo M (poliuretano, Morelli, Sorocaba, São Paulo, Brasil), Grupo TD (Poliuretano, Tecnident, São Carlos, São Paulo, Brasil), Grupo UD (Poliuretano, Uniden, Sorocaba, São Paulo, Brasil), Grupo AZ (Poliuretano, Abzil, São José do Rio Preto, São Paulo, Brasil) e Grupo AK (Poliuretano, Aditek, Cravinhos, São Paulo, Brasil).

Todas as amostras deveriam ter datas de fabricação recente, ser do mesmo lote de fabricação e vir em embalagens plásticas seladas. O revestimento superficial em pó das ligaduras elásticas foi removido, e os elásticos foram lavados durante 15 segundos com água corrente deionizada usando o sistema de purificação de água Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, EUA) e em seguida secas ligeiramente com papel absorvente. Antes do ensaio, todas as ligaduras elásticas foram esterilizadas por exposição à luz ultravioleta (Labconco, Kansas, Missouri, EUA) durante 30 minutos.

O modelo de cultura celular utilizado foi o de monocamada contendo linhagem de células L929 (fibroblastos de camundongo) obtido do American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, EUA), mantidas em meio mínimo essencial de Eagle (MEM) (Cultilab, Campinas, Brasil), suplementado com 0,03 mg/ml de glutamina, 50 µg/ml de gamicina, 2,5 mg/ml de fungizona, 0,25ml solução de bicarbonato de sódio, 10 mM de HEPES, e 10% de soro fetal bovino adicionado ao meio suplementado. Em seguida, o meio de cultura celular foi incubado a 37 °C durante 48 horas.

Para verificar a resposta celular frente aos extremos, outros três grupos foram incluídos no estudo: Grupo CC (controle celular), consistindo em células L929 não expostas ao sobrenadante das ligaduras elásticas; Grupo C+ (controle positivo), constituído de detergente Tween 80 (Polioxietileno-20-Sorbitan, Sigma, St. Louis, Missouri, EUA); Grupo C- (controle negativo), constituído de solução salina tamponada com fosfato (PBS) (Tabela 1). Os controles positivos e negativos foram

incubados em meio mínimo essencial de Eagle (MEM) por 1, 2, 3, 7 e 28 dias e os eluídos extraídos foram adicionados à linhagem celular L929 onde serão incubadas em meio de crescimento.

A citotoxicidade dos elásticos ortodônticos foi determinada por meio da técnica “dye-uptake”, que se baseia na absorção de corante vermelho neutro por células vivas. Como esses elásticos em cadeia são geralmente mantidos na cavidade bucal por até 4 semanas, uma vez que pacientes que fazem uso de aparelhos ortodônticos fixos costumam visitar o ortodontista uma vez por mês, os períodos de tempo: 1, 2, 3, 7 e 28 dias foram avaliados neste estudo. Estes períodos experimentais representaram a manutenção do tempo sob condições de cultura de células antes da remoção dos elásticos em cadeia.

Tabela 1: Grupos experimentais e de controle usados para os ensaios.

Grupos	Marca	Composição	Cor	Lote
UK	Unitek	Látex-free	Prata	406-669
TP	TP Orthodontics	Látex-free	Prata	389-061
AO	American Orthodontics	Látex-free	Prata	854-299
O	OrthoSource	Poliuretano	Prata	0-0434-420
M	Morelli	Poliuretano	Prata	60-05-217
TD	Tecnident	Poliuretano	Prata	402-001
UD	Uniden	Poliuretano	Prata	000-1495
AZ	Abzil	Poliuretano	Prata	467-816
AK	Aditek	Poliuretano	Prata	0080185
C+	Tween 80 (Polioxietileno-20-Sorbitan, Sigma, St. Louis, Missouri, EUA)			
C-	Solução PBS (solução salina tamponada com fosfato, Cultilab, Campinas, SP, Brasil)			
CC	Controle de Células (linhagem de células L929, ATCC, Rockville, MD, EUA)			

Dye-uptake

Volumes de 100 µl de células L929 foram distribuídos em triplicata para cada amostra testada em microplaca de 96 poços. Após 48 horas, o meio de crescimento foi substituído por 100 µl de meio mínimo essencial de Eagle (MEM) obtido após incubação em diferentes tipos de elásticos em cadeia de 1, 2, 3, 7 e 28 dias. O meio mínimo essencial de Eagle foi utilizado por ser esse, o mesmo tipo de material utilizado para a manutenção de células, portanto não influenciou os resultados.

Após 24 horas de incubação, foram adicionados 100 µl de vermelho neutro a 0,01% (Sigma, St. Louis, Missouri, EUA) em cada poço das microplacas e estas, foram incubadas durante 3 horas a 37 °C. Após este período de tempo, 100 ml de solução de formaldeído a 4% em PBS (NaCl 130 mM, KCL 2 mM, Na₂HPO₄ 2 H₂O 6mM, K₂HPO₄ 1mM, pH7,2) foram adicionados a cada poço para promover a fixação das células às placas. Depois de 5 minutos, 100µl de ácido acético a 1% com metanol a 50% foram adicionados a fim de remover o corante não absorvido pelas células. Após 20 minutos, um espectrofotômetro (BioTek, Winooski, Vermont), fixado em um comprimento de onda de 492 nm, foi utilizado para determinar o corante absorvido pelas células. Por permanecerem na cavidade oral por até 4 semanas, a viabilidade celular foi determinada após exposição em MEM em que os elásticos tivessem sido incubados durante os intervalos de 1, 2, 3, 7 e 28 dias. A citotoxicidade dos materiais foi determinada de acordo com a norma ISO 10993-5 para a avaliação e padronização.

Para determinar o grau de citotoxicidade, uma comparação post hoc foi realizada. Os cálculos estatísticos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e posteriormente ao teste Tukey. Valores de P inferiores a 0,05 foram considerados significativos. Cada poço de cultura foi considerado uma amostra individual.

ANEXO A – DESCRIÇÃO DO ESTILO DE FORMATAÇÃO DA REVISTA MATÉRIA

Descrição dos estilos MSWORD usados na Revista Matéria

(Atenção: apenas a primeira letra da primeira palavra do título deve ser maiúscula, a das outras palavras deve ser minúscula, exceto em nomes próprios)

*AUTOR, S.^I, *AUTOR, T.^{II}

(Atenção: as referências de autor encontradas nos campos com *, ilustram que essas possuem o mesmo padrão da referência de autor da bibliografia)

^I Laboratório de Hidrogênio - Labh2 – PEMM/COPPE/UFRJ CP: 68505 – 21941-972, Rio de Janeiro, RJ.
e-mail: materia@labh2.coppe.ufrj.br

^{II} Endereço dos Outros Autores 1 e 2 – Ilha do Fundão, Rio de Janeiro, RJ
e-mail: outro.autor1@outros.autores.com ; outro.autor2@outros.autores.com
(é necessário o e-mail de todos os autores)

RESUMO

A descrição seguinte detalha os estilos de formatação de texto usados no arquivo modelo da Revista Matéria (Arquivo_Modelo.dot), devendo ser usado em arquivos do MSWord, versão 6.0 ou mais recentes.

No resumo sugere-se um número entre 200 e 300 palavras no total, evitando-se utilizar palavras repetitivas, deverá dar uma idéia geral do assunto tratado, metodologia, principais resultados e conclusões.

Usar formato de parágrafo justificado para todo o texto e letras tamanho 10. Esta seção de “resumo” deverá existir apenas para artigos em português ou espanhol.

Palavras chaves: MSWORD, estilos de diagramação, Revista Matéria.

1. Description of used Styles MSWORD in the Revista Matéria

2. ABSTRACT

This text describes all styles present in template “Arquivo_Modelo.dot”, to be used with MSWord 6.0 or newer. This document begins with a general description of the format followed by a description of each style. A number between 200 and 300 words in the total for the abstract is suggested, preventing itself to use repetitive words.

3. **Keywords:** MSWORD, format styles, revista Matéria.

INTRODUÇÃO

A introdução deverá apresentar o tema do trabalho realizado, justificando o interesse baseado na literatura. Ele deverá ainda apresentar os objetivos do artigo.

Utilizar preferencialmente como estrutura geral a seguinte seqüência:

5. Introdução;
6. Materiais e Métodos;
7. Resultados e Discussão;
8. Conclusão;
9. Agradecimentos;
10. Bibliografia;
11. Anexo.

MATERIAIS E MÉTODOS

Esta seção deverá descrever todos os materiais, procedimentos e métodos usados na parte experimental ou teórica do trabalho.

Um ou mais anexos podem ser usados para descrever detalhes do arranjo experimental, de fabricação ou desenvolvimentos matemáticos usados no decorrer do trabalho.

Alguns artigos podem incluir uma revisão bibliográfica entre a introdução e os materiais e métodos.

Paginação

Todo o texto deverá ser escrito em uma coluna com letras tamanho 10, tipo Arial, negrito e maiúscula, para título e subtítulos em minúscula, e todo o corpo de texto em Times New Roman.

A Tabela 1 mostra as dimensões das margens e também o modelo preferencial de apresentação de tabelas.

Tabela 1: Dimensões das páginas para todo o texto

Nome	Dimensão
Papel A4	210 x 297 mm
Margem superior	2,5 cm
Margem inferior	2,5 cm
Margem esquerda	3,0 cm
Margem direita	2,5 cm
Cabeçalho	1,25 cm
Rodapé	1,25 cm

RESULTADOS

Esta seção deverá apresentar todos os resultados obtidos com as informações necessárias para se verificar com segurança os valores medidos e correspondente significância. Muito embora os resultados possam ser apresentados juntos com a discussão do seu significado, é sugerido que uma profunda discussão, baseada em informações da literatura seja apresentada em uma seção separada.

Cuidar para que na apresentação de todos os resultados experimentais tenha uma análise estatística, incluindo desvio padrão das medidas e barras de erro nos gráficos.

Um ou mais anexos podem ser usados para mostrar detalhes dos resultados analisados que venham a tornar a seção sobrecarregada.

Modelos de Formatação no MSWord

Os estilos da Tabela 2 são os usuais para formatação dos artigos publicados na Revista Matéria.

Tabela 2: Resumo dos Formatos de cada Estilo

Estilo	Fonte	Tam.	Bold	Maius / minus	Espaço Anterior	Espaço Posterior	Próximo estilo	Parágrafo
Autores	Times New Roman	10pt	-	-	6pt	6pt	autores	Centrado
Bibliografia	Times New Roman	10pt	-	-	12pt	0pt	bibliografia	Esquerda, indentação de 1,27cm
Endereço	Times New Roman	10pt	-	-	6pt	6pt	endereço	Centrado
Equação	Times New Roman	10pt	-	-	12pt	12pt	equação	Tabulado
Figura e Figura + Bold	Times New Roman	10pt	-	-	12pt	24pt	figura e figura + bold	Centrado
Título 1 ou Heading 1	Times New Roman	10pt	Sim	Todos	18pt	6pt	normal	Esquerda, indentação de 0cm
Título 2 ou Heading 2	Times New Roman	10pt	Sim	Capital	18pt	6pt	normal	Esquerda, indentação de 0cm
Título 3 ou Heading 3	Times New Roman	10pt	-	Capital	18pt	6pt	normal	Esquerda, indentação de 0cm
Keyword	Times New Roman	10pt	Sim	-	6pt	0	Key word	Esquerda, indentação de 0cm, tab 0 e 2
Linha	Times New Roman	2pt	-	-	6pt	0	linha	Justificado
Normal	Times New Roman	10pt	-	-	0pt	0	normal	Justificado
Palavra chave	Times New Roman	10pt	Sim	-	6pt	0	Key word	Esquerda, indentação de 0cm, tab 0 e 2
Resumo	Arial	10pt	Sim	Todos	18pt	6pt	Texto	Esquerda, indentação de 0cm
Resumo_2	Arial	10pt	Sim	Todos	18pt	6pt	Texto	Esquerda, indentação de 0cm
Tabela C	Times New Roman	10pt	-	-	0pt	0pt	normal	Centrado
Texto, Texto + Bold, Texto + <i>Itálico</i>	Times New Roman	10pt	-	-	0pt	0pt	Texto, Texto + Bold, Texto +	Justificado
Texto Tabela	Times New Roman	10pt	-	-	18pt	6pt	texto tabela	Centrado
Título	Times New Roman	14pt	Sim	-	6pt	6pt	Título	Centrado
Título Inglês	Times New Roman	14pt	Sim	-	6pt	6pt	Resumo_2	Centrado

Figuras

As figuras são apresentadas na revista *Matéria* com o título em negrito e a legenda posicionada após ela. Uma linha em branco poderá ser adicionada antes ou depois do objeto figura caso ela não possua limites suficientes nas bordas para garantir espaçamento do texto.



Figura 1: Logomarca da Revista.

DISCUSSÃO

Esta é a seção adequada do artigo para se adicionar conteúdo científico, pela análise dos resultados apresentados com o devido suporte da literatura e pelo modelamento e simulação de comportamentos e condições específicas.

Equação

Este estilo é usado para alinhar o objeto MS Equation e o seu respectivo número. Seu estilo é baseado no estilo “Texto”, com a diferença que ele apresenta uma dupla tabulação: a primeira para o objeto MS Equation, ajustada para a margem esquerda, e a segunda para a numeração de equação, ajustada para a margem direita. A tabulação é realizada por meio de uma tabela sem bordas e sem preenchimentos. O espaçamento entre linhas é simples; o espaço antes e depois é de 12 pt. É possível introduzir espaço entre parágrafos do mesmo estilo. Cada parágrafo seqüente possui o mesmo estilo.

A seguir é fornecido um exemplo de utilização para equações.

$$y = ax + b \tag{1}$$

Para inserir duas equações seguidas, pode-se copiar a tabela e colar na próxima linha ou posicionar o cursor no final da tabela (do lado de fora do limite direito) e digitar enter (nova linha), e uma nova linha da tabela será adicionada com o mesmo formato.

Todas as equações deverão ser numeradas sequencialmente.

CONCLUSÕES

As conclusões deverão ser concisas e representar os aspectos mais importantes encontrados durante o desenvolvimento do trabalho reportado. Elas devem tentar apontar os avanços científicos e/ou tecnológicos e/ou teóricos efetivamente realizados.

AGRADECIMENTOS

Nesta seção podem ser dados os créditos aos suportes recebidos no trabalho.

BIBLIOGRAFIA

A Revista Matéria utiliza referências numeradas: as citações dos trabalhos devem ser indicadas no texto pelo(s) sobrenome(s) do(s) autor(es) seguido(s) pelo número da referência entre colchetes, quando o(s) sobrenome(s) fizer(em) parte da frase. Caso contrário, apenas pelo número entre colchetes. Exemplos:

- Para artigo com autor único: “... IESAN [2] mostraram que ...” ou “... foi mostrado [2] que...”
- Para artigo com dois autores: “...IESAN e ABRAHAM [1] encontraram que ...” ou “... foi encontrado [1] ...”
- Para artigo com mais de dois autores: ABRAHAM *et al.* [1] calcularam ...” ou “... foi calculado [1] ...”
- Para tema relativo a mais de um artigo “... o problema de radiação térmica foi tratado [8, 9] de acordo com ...”

A lista de referências, ao final do artigo, deve fornecer ao leitor as informações precisas para facilitar qualquer consulta. Para citações feitas no corpo do texto, a expressão *et al.* é usada para todos os artigos que possuírem mais de dois autores.

Diversas informações devem ser dadas de acordo com o tipo de publicação, como veremos a seguir, sendo que algumas delas devem ser em **negrito**.

Além do(s) nome(s) do(s) autor(es), as informações que devem figurar são:

Citações de livros

título (itálico)
edição (1ª, 2ª, ect.)
local
editora
ano da publicação

Exemplo:

- [1] ABRAHAM, R., MARSDEN, J.E., RATIU, T., *Manifolds, tensor analysis and applications*, 2 ed., New York, Springer-Verlag, 1988.

Citação de Artigos em Periódicos

título do artigo, entre aspas
nome do periódico (sem abreviações e em itálico)
volume
número
páginas inicial e final do artigo, após a abreviatura pp.
mês e ano da publicação

Exemplo:

- [2] IESAN, D., “Existence theorems in the theory of mixtures”, *Journal of Elasticity*, v. 42, n. 2, pp. 145-163, Feb. 1996.

Citação de Relatórios de Pesquisa

título (itálico)
In: identificação da procedência do relatório (só use “In” quando o relatório tiver mais de um trabalho)
ano da publicação

Exemplo:

- [3] GARRET, D.A., *The microscopic detection of corrosion in aluminum aircraft structures with thermal neutron beams and film imaging methods*, In: Report NBSIR 79-1434, National Bureau of Standards, Washington, D.C., 1977.

Citação de Artigo em Anais

título do artigo, entre aspas
In: *anais do congresso ...* (iniciais em maiúsculo e em itálico)
volume
páginas inicial e final do artigo, após a abreviatura pp.
local
mês e ano da publicação

Exemplo:

- [4] GURTIN, M.E., “On the nonlinear theory of elasticity”, In: *Proceedings of the International Symposium on Continuum Mechanics and Partial Differential Equations: Contemporary Developments in Continuum Mechanics and Partial Differential Equations*, pp. 237-253, Rio de Janeiro, Aug. 1977.

Citação de Artigo em Congresso sem Publicação em Anais

título do artigo, entre aspas
nome do congresso (iniciais em maiúsculo e em itálico)
 número do artigo
 local
 mês e ano da publicação

Exemplo:

- [5] BERNUSSI, A.A., IKAWA, F., MOTISUKE, P., *et al.*, “Photorefectance characterization of δ -doped p-GaAs”, In: *International Conference on Modulation Spectroscopy*, 1286-32, San Diego, California, USA, 19-21 March 1990.

Citação de Artigo em livro (série)

título do artigo, entre aspas
 In: *título do livro* (iniciais em maiúsculo e em itálico)
 volume
título da série (itálico)
 editora
 páginas inicial e final do artigo, após a abreviatura pp.
 ano da publicação

Exemplo:

- [6] COWIN, S.C., “Adaptive anisotropy: An example in living bone”, In: *Non-Classical Continuum Mechanics*, v. 122, *London Mathematical Society Lecture Note Series*, Cambridge University Press, pp. 174-186, 1987.

Citação de Capítulo de Livro:

título do capítulo, entre aspas
 In: editor do livro, editor ou editores
título do livro (iniciais em maiúsculo e em itálico)
 edição
 capítulo
 local
 editora
 ano da publicação

Exemplo:

- [7] EDWARDS, D.K. “Thermal radiation measurements”, In: Eckert, E.R.G., Goldstein, R.J. (eds), *Measurements in Heat Transfer*, 2 ed., chapter 10, New York, USA, Hemisphere Publishing Corporation, 1976.

Citação de Tese

título (itálico)
 grau M.Sc./ D.Sc.
 instituição
 local
 ano da defesa

Exemplo:

- [8] PAES JUNIOR, H.R., *Influência da espessura da camada intrínseca e energia do fóton na degradação de células solares de silício amorfo hidrogenado*, Tese de D.Sc., COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil, 1994.

Citação de Referências de Páginas na Internet:

nome do website
endereço eletrônico completo da informação citada
data de consulta

Exemplo:

[9] REVISTA MATÉRIA, <http://www.materia.coppe.ufrj.br>. Acessado em setembro de 2004.

Para informações adicionais, consultar as publicações citadas abaixo:

ANÔNIMO (1989), NB-66: *Referências Bibliográficas*. Rio de Janeiro, ABNT - Associação Brasileira de Normas Técnicas.

CAMARINHA, M., BRAYNER, S. (1993), Manual de normas técnicas de editoração: teses, monografias, artigos, papers. 2 ed., Rio de Janeiro, Editora UFRJ.