

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

**ALANE SONALLY BENÍCIO DO NASCIMENTO**

**PROPRIEDADES BIOLÓGICAS DAS LIGADURAS ELASTOMÉRICAS DE USO  
ORTODÔNTICO**

**PATOS-PB  
2014**

**ALANE SONALLY BENÍCIO DO NASCIMENTO**

**PROPRIEDADES BIOLÓGICAS DAS LIGADURAS ELASTOMÉRICAS DE USO  
ORTODÔNTICO**

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**

**ALANE SONALLY BENÍCIO DO NASCIMENTO**

**PROPRIEDADES BIOLÓGICAS DAS LIGADURAS ELASTOMÉRICAS DE USO  
ORTODÔNTICO**

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.<sup>a</sup> Dra. Maria Carolina Bandeira Macena – 1º Membro  
Universidade Federal de Campina Grande – UFCG

---

Prof.<sup>a</sup> Me. Elizandra Silva da Penha – 2º Membro  
Universidade Federal de Campina Grande – UFCG

## **DEDICO**

**À Deus**, o responsável por todas as minhas vitórias e por me erguer a cada dificuldade, permitindo aumentar minha fé, mostrando o caminho certo a seguir com seu imenso amor e dedicação em todos os momentos dessa longa jornada.

**À minha mãe**, Maria Salete Pires, mulher guerreira e forte, cujas características me fizeram de exemplo para levar a vida com coragem e firmeza para enfrentar todos obstáculos e a quem eu devo tudo que sou hoje, graças a seu constante esforço dia a dia.

**À meu pai**, Antônio Benício do Nascimento, que sempre me mostrou o lado leve da vida com sua paciência e perseverança e acima de tudo a tratar os problemas sempre com um sorriso no rosto e cabeça erguida, obrigado por tudo !

**À minha irmã**, Sonyara Benício do Nascimento, companheira e amiga, a qual pude compartilhar todos os momentos para que pudéssemos crescer e aprender juntas o valor da vida, obrigado por confiar em mim e me mostrar que sou capaz.

**Ao meu noivo**, Ney Marques, pelo incentivo de todos os dias e por me ajudar todas as vezes que precisei, sempre me dando amor e carinho em todos os momentos.

## **AGRADECIMENTO ESPECIAL**

**Ao meu orientador,** Professor Dr. Rogério Lacerda dos Santos, por todo o apoio e confiança, se mostrando um profissional brilhante, o qual irei me espelhar em toda a minha carreira profissional e por estar sempre presente em toda a orientação, me incentivando a dar o melhor de mim, meu eterno obrigado !

## AGRADECIMENTOS

À **Deus**, além de dedicar este trabalho a ele, quero agradecer por ser tão maravilhoso em minha vida e me permitir chegar até aqui, à ele toda honra e toda glória !

À **toda a minha família**, que torceu para o meu sucesso, fornecendo palavras de apoio sempre que precisei.

Às **minhas “BAC’s”, Rayssa Mendes, Brisa Garcia, Luênia Lisboa, Layanne Soyara e Lucélia Figueiredo e o agregado Vicente Jadson**, que mais que amigos foram irmãos durante todo esse tempo.

À **todos os professores**, que mais que formadores, foram uma segunda família, sempre acolhendo e aconselhando em todas as dificuldades e ensinando o amor à Odontologia, em especial **Rachel Rodrigues, Maria Carolina Bandeira Macena, Elizandra Silva da Penha, Rodrigo Rodrigues, Faldryene Sousa Queiroz, Tássia Cristina de Almeida Pinto Sarmiento, Rosana Rosendo e Jocianelle Nunes**.

Às **companheiras de apartamento, Rayssa, Luênia, Hortência, Marina e Karina**, pessoas especiais que ficarão guardadas no meu coração.

À **minha dupla da clínica, Layanne Soyara**, onde aprendemos juntas a enfrentar os obstáculos do dia a dia.

À **todos os colegas da graduação**, que embora houvesse adversidades, havia a união nas horas das dificuldades.

À **todos os meus amigos**, que me deram confiança em todos os momentos desde o momento do vestibular até a formatura.

À **todos os funcionários**, que de maneira direta ou indireta ajudou nesse crescimento acadêmico, em especial os funcionários da clínica **Neuma, Diana, Pollyana, Patrícia e Damião, Francisco e Antônio**.

*“ Vou perseguir tudo aquilo que Deus já escolheu pra mim, vou persistir, e mesmo nas marcas daquela dor do que ficou, vou me lembrar e realizar o sonho mais lindo que Deus sonhou. Em meu lugar estar na espera de um novo que vai chegar, vou persistir, continuar a esperar e crer. E mesmo quando a visão se turva e o coração só chora, mas na alma, há certeza da vitória.”*

*Padre Fábio de Melo*

## RESUMO

Efeitos biológicos causados pelos diversos componentes ortodônticos, especialmente as ligaduras elastoméricas, causam interesse para a realização de estudos de citotoxicidade, uma vez que, reações alérgicas às proteínas do látex têm sido constantemente documentadas. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar a citotoxicidade entre ligaduras elastoméricas ortodônticas de poliuretano e látex-free. Sete ligaduras elastoméricas de cor preta de diferentes fabricantes (3 não-látex, 3 de poliuretano e 1 látex) foram divididos em sete grupos de 10 elásticos cada: Grupo UK (não-látex, 3M Unitek), Grupo TP (não-látex, TP Orthodontics), Grupo AO (não-látex, American Orthodontics), Grupo O (poliuretano, OrthoSource), Grupo M (Poliuretano, Morelli), Grupo TD (Poliuretano, Tecnident) e Grupo TC (látex - Controle, TP Orthodontics). O ensaio de citotoxicidade foi realizado utilizando culturas de células (linhagem celular L-929, fibroblastos de camundongo) que foram submetidos ao teste de viabilidade celular com vermelho neutro ("dye-uptake") em 1, 2, 3, 7 e 28 dias. Análise de variância one-way (ANOVA) seguido pelo teste post hoc de Tukey foram utilizados ( $p < 0,05$ ). Os resultados não mostraram diferenças estatisticamente significativas entre os Grupos UK, TP e AO em todos os tempos experimentais ( $p > 0,05$ ). Houve uma diferença estatística ( $p < 0,05$ ) entre a viabilidade celular dos Grupos UK, TP e AO com os Grupos O, M, TD e TC em 1, 2, 3 e 7 dias. Não houve diferença estatisticamente ( $p > 0,05$ ) entre os Grupos O, M e TD em todos os tempos experimentais. Pode concluir-se que as ligaduras elásticas não-látex da Unitek, TP Orthodontics, e American Orthodontics apresentaram maior viabilidade celular em comparação com as outras ligaduras.

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

## ABSTRACT

Biological effects caused by various orthodontic components, especially elastomeric ligatures, cause interest for conducting studies on cytotoxicity, since, allergy caused by latex proteins has been well documented. Thus, the aim of this study is to evaluate cytotoxicity between polyurethane and non-latex orthodontic elastomeric ligatures. Seven elastomeric ligatures of black-coloured from different manufactures (3 non-latex, 3 polyurethane and 1 latex) were divided into 7 groups of 10 elastics each: Group UK (nonlatex, 3M Unitek), Group TP (nonlatex, TP Orthodontics), Group AO (nonlatex, American Orthodontics), Group O (Polyurethane, OrthoSource), Group M (Polyurethane, Morelli), Group TD (Polyurethane, Tecnident) and Group TC (latex - Control, TP Orthodontics). 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 1-way analysis followed by the Tukey post hoc test were employed ( $p < .05$ ). The results showed no statistically significant differences between Groups UK, TP and AO in all experimental times ( $p > .05$ ). There was a statistically differences ( $p < .05$ ) between the viability cell of Groups UK, TP and AO with the Groups O, M, TD and TC at 1, 2, 3 and 7 days. There was no statistically differences ( $p > .05$ ) between the groups O, M and TD at in all experimental times. It can be concluded that the nonlatex elastomeric ligatures of Unitek, TP Orthodontics, and American Orthodontics showed higher cell viability compared to others ligatures.

Keywords: Cytotoxicity. Cell culture. Elastomers.

## 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 = 50  $\mu\text{m}$ .....31

FIGURA 2 - Porcentagem da viabilidade dos elásticos em cadeia testados obtida por espectrofotometria.....31

## LISTA DE TABELAS

**TABELA 1** - Grupos experimentais e de controle usados para os ensaios.....29

**TABELA 2** - Descrição estatística da densidade óptica dos elásticos em cadeia do 1° ao 28°  
dia.....30

## 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 AO	Grupo American Orthodontics
Grupo M	Grupo Morelli
Grupo O	Grupo Orthosource
Grupo TD	Grupo Tecident
Grupo TP	Grupo TP Orthodontics
Grupo TC	Grupo Controle-TP Orthodontics
Grupo UK	Grupo Unitek
HEPES	Ácido 4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic
L929	Linhagem celular – fibroblasto de camundongo
MEM	Meio Mínimo Essencial
mg/ml	Miligramas por mililitro
Mili-Q	Sistema de Purificação de Água fornecido pela Millipore Corporation
mmol	Milimol
Mm	Milimolar
µg/ml	Microgramas 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 <sub>2</sub> SiO] <sub>n</sub>	Fórmula que representa o esqueleto Inorgânico do silicone, onde R é o grupo orgânico seguido do silício e oxigênio.
μ	micrômetro

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>16</b>
<b>2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....</b>	<b>19</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>23</b>
<b>3 ARTIGO.....</b>	<b>28</b>
<b>4 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>35</b>
<b>APÊNDICE A.....</b>	<b>36</b>
<b>APÊNDICE B.....</b>	<b>37</b>
<b>ANEXO A.....</b>	<b>40</b>
<b>ANEXO B.....</b>	<b>47</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A capacidade de desempenho de um material, associada a uma resposta apropriada do hospedeiro, em uma situação específica, é definida como biocompatibilidade, no entanto uma reação adversa deste material é chamada de Toxicidade, que pode ser avaliada através de testes *in vitro*, experimentos em animais ou estudos clínicos em humanos (SCHMALZ, 1994; POLYZOIS & HENSTEN-PETTERSEN, 1994).

Além disso, as propriedades físicas, mecânicas e biológicas são fatores que determinam a escolha dos materiais na Ortodontia (TOMS, 1988). Os componentes de aparelhos ortodônticos durante muitos anos vêm sendo objeto de estudo, visando melhorar suas propriedades mecânicas como a resistência do cimento ortodôntico, diminuição do atrito do fio e aumentar a força de elásticos (PITHON *et al.*, 2011). Contudo, os efeitos biológicos causados por esses componentes tem despertado interesse para estudos voltados para a biocompatibilidade dos componentes ortodônticos, especialmente as ligaduras elastoméricas que são amplamente utilizadas e possui uma extensa concentração de proteínas do látex, que possui uma prevalência de alergia de 3 a 17% (TURJANMAA *et al.*, 1996).

Como uma alternativa para promover a amarração do arco aos bráquetes, as ligaduras elásticas representam itens essenciais na prática ortodôntica, facilitando o trabalho do profissional devido á rápida e fácil adaptação e serem bastante confortáveis para os pacientes, além de favorecerem sua motivação por estarem disponíveis em uma variedade de cores (TALOUMIS *et al.*, 1997).

Existem dois tipos de elásticos ortodônticos, conforme o material de fabricação: os de borracha e os sintéticos. Os elásticos de borracha ou látex são alcançados a partir da extração vegetal, acompanhado por um processo de fabricação que atinge o produto final, são bastante utilizados como auxiliares em aparelhos extras bucais, máscaras faciais, além da aplicação como elásticos intermaxilares para correção da relação anteroposterior, da linha média e da intercuspidação, e devido seu baixo custo e grande versatilidade, são amplamente utilizados na Ortodontia (CABRERA, 2003).

Os elásticos sintéticos ou elastoméricos, também chamados de plásticos, são fabricados por meio de transformações químicas do carvão, petróleo e alguns álcoois vegetais. Tem ampla aplicação na substituição às ligaduras metálicas para fixação dos arcos aos bráquetes, bem como na retração e fechamento de espaços por meio dos elásticos sintéticos do tipo corrente (LORIATO *et al.*, 2006).

Com o propósito de diminuir o risco de reações alérgicas provocadas por elásticos ortodônticos com o látex, têm sido lançados no mercado diferentes tipos e composições de elastômeros, tais como o poliuretano e elásticos de silicone (DOS SANTOS *et al.*, 2012). De tal modo que, para auxiliar na movimentação dos dentes intra-arcos a utilização de elásticos sintéticos excede o uso dos elásticos de borracha natural (GENOVA *et al.*, 1985).

Os elásticos de poliuretanos são polímeros termoplásticos processados por moldagem, por injeção e por sinterização (MORTON, 1995), produzidos por uma reação química entre o di-isocianato e um poliol (WONG, 1976). Estes elásticos após as reações químicas de polimerização aparecem como massas amorfas, cujas cadeias poliméricas têm forças de tração relativamente fracas entre eles e ligações químicas localizadas aleatoriamente ao longo dessas cadeias. Mas por um processo de vulcanização que consiste na união entre cadeias laterais através de ligações covalentes cruzadas, levam a formação de estruturas tridimensionais que convertem um produto flexível em um material altamente resistente e mais elástico, resultando no aumento de suas propriedades mecânicas (MORTON, 1995).

O principal fator de risco para o uso de elásticos intra-orais seria que substâncias fossem liberadas e ingeridas pelo paciente ao longo do tempo, podendo causar doenças devido ao acúmulo de substâncias tóxicas (SCHMALZ, 1994). Sabe-se que o látex não é totalmente biocompatível, pois podem causar reações alérgicas, (TURJANMAA *et al.*, 1996) interagir com os alimentos (CAREY *et al.*, 1995) e medicamentos (TOWSE *et al.*, 1995). No entanto, o potencial de hipersensibilidade pode não estar relacionado com o potencial de citotoxicidade, ou seja, o material pode ser alergênico, mas não citotóxico, embora o contrário possa ser verdadeiro (SANTOS *et al.*, 2009).

A alergia causada por proteínas do látex tem sido bem documentada (PALOSUO *et al.*, 2002), incluindo reações de hipersensibilidade imediata (WAKELIN & WHITE, 1999). Entre as reações alérgicas causadas por elásticos ortodônticos estão o inchaço, estomatites, lesões orais eritematosas (EVERETT & HICE, 1974), reações respiratórias e até mesmo choque anafilático a forma mais grave de alergia (TOMAZIC *et al.*, 1992).

Assim, fibroblastos de camundongo L929 (MIRANDA *et al.*, 2009), demonstraram resposta semelhante a fibroblastos gengivais humanos primários e, portanto, é um modelo apropriado *in vitro* para o ensaio de toxicidade (D'ANTO *et al.*, 2011; YEAP *et al.*, 2012). Tomados em conjunto, estes resultados estão alinhados com a noção de que a citotoxicidade de elásticos ortodônticos podem influenciar o seu desempenho clínico (NEIBURGER, 1991) em relação à biocompatibilidade do tecido.

Os materiais e dispositivos médicos são submetidos a uma avaliação biológica, por motivos que buscam estabelecer a constituição do material, para que os resultados dos testes biológicos possam ser vinculados à formulação específica do material e para determinar a presença e a natureza de quaisquer produtos químicos (incluindo processos contaminantes, resíduos e substâncias lixiviáveis do próprio material) que podem ser liberados e atingir o corpo humano (WALLIN & ARSCOTT, 1998).

Conforme a International Standard Organization (ISO 10993) 1992, os primeiros testes para avaliar a biocompatibilidade do material são os ensaios *in vitro* que confirmada sua não toxicidade progridem para animais de laboratório. A maioria dos testes *in vitro* consiste na avaliação das alterações celulares causadas pela incorporação de corantes vitais ou a inibição da formação da colônia de células a partir do contato, seja este direto ou indireto com uma cultura de células (ROGERO *et al.*, 2000). Através da espectrofotometria faz-se a medição da intensidade óptica de corantes vitais incorporados pela cultura de células, diferenciando assim as células vivas das danificadas ou mortas (PITHON *et al.*, 2008).

Estudos *in vitro* são aplicados, principalmente para avaliar a citotoxicidade (lesão em células) e a genotoxicidade (lesão em cromossomos ou aberrações cromossômicas), pois estes apresentam como vantagens em relação aos experimentos em animais e estudos clínicos em humanos, condições de experimento controladas, sensibilidade, baixo custo, rapidez e ausência de problemas éticos (SCHMALZ, 1994).

Poucos materiais dentários, ou talvez nenhum, são totalmente inertes do ponto de vista fisiológico. Eles contêm uma variedade de componentes com potencialidades tóxicas ou irritantes (PHILLIPS, 1993).

Para ser utilizado na cavidade oral, o material deve ser atóxico, não absorvível pelo sistema circulatório e não causar danos aos tecidos orais, por isso à importância dos testes biológicos (PITHON, 2012). Nesta linha, o objetivo do presente estudo *in vitro* foi o de testar a citotoxicidade de ligaduras elastoméricas ortodônticas de poliuretano e látex-free de diferentes fabricantes.

#### 4 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Efeitos adversos em situações clínicas podem ser causados pelos diversos materiais e acessórios usados na odontologia e os mecanismos pelos quais isso ocorre não são ainda totalmente elucidados. A composição dos materiais, suas propriedades alergênicas e irritantes e seus efeitos tóxicos são essenciais para avaliação das etiologias dos sintomas clínicos a fim de se obter um diagnóstico correto (GRIMSDOTTIR *et al.*, 1992).

Os primeiros elásticos utilizados na Ortodontia tiveram início no século XX por Angle e Case e eram derivados da borracha natural. Porém, apresentavam limitações como a absorção de líquidos e a fragilidade das suas ligações químicas e com isso levou ao estudo de algumas alternativas que promovessem melhorias nas suas propriedades (MATA & CHEVITARESE, 1997). Com o advento da vulcanização, inventado em 1839 por Charles Goodyear, as características da borracha natural foram melhoradas em relação à resistência e capacidade elástica, aumentando seu uso na Ortodontia (MILES & BRISTON, 1965; MORTON, 1995).

O processo da vulcanização do látex envolve uma mistura do látex com estabilizadores e agentes químicos da vulcanização, aquecidos a uma temperatura de aproximadamente 70°C. Esses estabilizadores e agentes vulcanizadores de ligações cruzadas tais como o óxido de zinco, aceleradores de reações e enxofre são adicionados à borracha natural durante o aquecimento. Desta forma, este processo acrescenta componentes potencialmente tóxicos (PERRELLA & GASPARI, 2002).

Quanto à neurotoxicidade de elásticos ortodônticos com e sem látex, observou-se que como os elásticos com látex sofreram incorporação de zinco em sua composição, durante o processo de vulcanização, assim estes se apresentam citotóxicos em relação aos elásticos sem látex pela liberação de zinco (HANSON & LOBNER, 2004).

Apesar de o zinco ser conhecido por ser neurotóxico, (LOBNER & ASRARI, 2003) estudos mostram que a quantidade liberada por elásticos ortodônticos não mostram nenhuma evidência de dano (HANSON & LOBNER, 2004). Com o intuito de produzir látex com propriedades mecânicas superiores, aumentando a sua resistência e elasticidade são adicionados anti-ozônio e agentes antioxidantes (WEISS & HIRSHMAN, 1992).

Conservantes, tais como enxofre e óxido de zinco, bem como antioxidantes, como o di-tio-hidratos de carbono, N-nitrosodibutilamina, e N-nitrosopiperidine são todos conhecidos por serem substâncias citotóxicas presentes no látex de borracha natural (HWANG & CHAJY, 2003).

O estudo das borrachas sintéticas, mais precisamente denominadas elastômeros sintéticos se deu pela constante busca por materiais que apresentassem características elásticas com propriedades mecânicas melhores que as da borracha natural e seus derivados (MORTON, 1995). Assim, os elásticos sintéticos mais utilizados na Ortodontia são os polímeros à base de poliuretano, entre eles as ligaduras elásticas e os elásticos em cadeia (STEVENSON, 1994; MORTON, 1995).

O grau de tecnologia empregada, o aprimoramento da técnica da produção e da qualidade das matérias-primas utilizadas durante a fabricação do material determina a qualidade das ligaduras elásticas (MORTON, 1995).

Assim, diferentes processos de fabricação e composições podem conduzir a algum grau de citotoxicidade. Neste sentido, elásticos látex-free têm sido lançados no mercado, demonstrando melhor desempenho biológico em comparação aos elásticos de poliuretano, devido apresentar baixa capacidade de induzir a lise celular (SANTOS *et al.*, 2012).

Foi evidenciado por autores em um experimento que (HANSON & LOBNER, 2004) a ocorrência de lise celular foi superior a 50% para os elásticos de látex em comparação com os não látex, embora, os dois tipos de elásticos foram considerados viáveis para o uso clínico. De modo a prevenir os efeitos cumulativos, causados pela liberação dos componentes citotóxicos no organismo, sugere-se que seja evitado elásticos com a viabilidade celular inferior a 50% (SCHMALZ, 1994).

A exposição do elastômero em água acarreta um enfraquecimento das forças intermoleculares e, conseqüentemente, uma degradação química. De modo que, tal condição pode influenciar as propriedades biológicas destes materiais, como a viabilidade celular (HUGET *et al.*, 1990). Por outro lado, o pH não demonstrou influência significativa sobre a decadência vigor e citotoxicidade em casos dos elásticos convencionais e de poliuretano (SANTOS *et al.*, 2013).

Com o objetivo de aumentar a aceitação dos pacientes, os fabricantes desenvolvem estes produtos em uma variedade de cores, o que motiva a uma questão: se a pigmentação afeta a estrutura (BRANTLEY & ELIADES, 2001) e a biocompatibilidade (HOLMES *et al.*, 1993) do produto. Entretanto ainda não se têm informações em relação ao processo de pigmentação e a composição destes materiais, por ser segredo industrial (BRANTLEY & ELIADES, 2001).

Segundo Holmes *et al.*, 1993, quanto aos efeitos citotóxicos de corantes usados na fabricação de ligaduras elásticas intra-orais, estes exibem uma baixa toxicidade, sendo esta inofensiva clinicamente.

Associado com os testes que avaliam as propriedades físicas, os testes de biocompatibilidade são um passo essencial na aceitação dos materiais (POLYZOIS & HENSTEN-PETTERSEN, 1994; GRIMSDOTTIR *et al.*, 1992). Uma vez que um resultado negativo indicará que o material estará livre de produtos prejudiciais ou que sua quantidade é insuficiente para causar efeitos agudos em células isoladas do corpo. Por outro lado, uma resposta positiva pode ser um sinal de que o material contém uma ou mais substâncias que podem ser liberadas em contato com a água e apresentar alguma importância clínica. O teste de citotoxicidade *in vitro* é o primeiro passo para análise do material em estudo, por isso não se pode afirmar que o material é biocompatível, apesar do valor do teste (WALLIN & ARSCOTT, 1998).

Dependendo da concentração e do tempo de exposição, *in vivo* os elásticos podem desencadear um efeito citotóxico a partir de um irritante primário desenvolvendo reações que podem variar de um eritema a necroses, dependendo da toxicidade (GRIMSDOTTIR *et al.*, 1992).

Os efeitos citotóxicos locais podem ser causados por quantidades suficientes de produtos de corrosão que são liberados por alguns dos materiais ortodônticos, assim como ao se criarem mais locais para acúmulos de placa, os efeitos do material podem contribuir para gengivite local relacionada a uma origem não tóxica (GRIMSDOTTIR *et al.*, 1992), de tal modo que os danos teciduais locais causados pelos produtos de corrosão não possam ser distinguidos de uma gengivite de origem bacteriana

Assim, técnicas utilizando culturas de células podem ser usadas para avaliar efeitos citotóxicos locais de materiais sólidos (SCHMALZ, 1994).

. O pó presente no revestimento das ligaduras ortodônticas funciona como um veículo para muitos tipos de proteínas que são responsáveis pela alergia causada pelo látex natural (DOS SANTOS *et al.*, 2012).

Geralmente as ligaduras elastoméricas são colocadas sem desinfecção prévia ou esterilização e com o aparecimento de medidas mais rígidas do risco biológico, esta conduta clínica tem sido questionada (DAVIES, 1998). A partir da necessidade clínica foi estabelecido que as ligaduras elastoméricas deveriam ser inertes ao ambiente bucal e possíveis de serem esterelizadas sem alterar suas características elásticas e pigmentação (PITHON *et al.*, 2013).

O uso de óxido de etileno, radiação ultravioleta e raios gama não alterou a citotoxicidade elastomérica, mas álcool 70%, glutaraldeído a 2%, autoclave ou o microondas aumentou a citotoxicidade (PITHON *et al.*, 2010).

Por causar mínima deterioração e menor tempo de esterelização, o ácido peracético (PAA) tem sido sugerido para elásticos ortodônticos em comparação ao glutaraldeído (FRASER *et al.*, 1984), pois o PAA não produz substâncias tóxicas ou mutagênicas que são subprodutos da reação com materiais (GEHR *et al.*, 2002), liberando apenas produtos de decomposição que são o ácido acético, peróxido de hidrogênio, oxigênio e água (MONARCA *et al.*, 2002).

Segundo PITHON *et al.*, 2013, para não resultar em efeitos citotóxicos o tempo de esterelização das ligaduras elastoméricas com PAA deve ser de 1 hora, uma vez que se ultrapassar desse tempo o efeito adverso sobre a viabilidade celular é maior, assim como uma re-esterilização que pode liberar uma maior concentração de componentes bioativos que prejudicam a viabilidade de células fibroblásticas.

Quando há redução da população de células superior a 10% o produto químico é considerado como tóxico (CERETTA, 2008). Em pacientes com hiperplasia gengival e / ou potenciais problemas periodontais os elastômeros utilizados devem ter a menor citotóxicidade ou de preferência utilizar ligaduras metálicas (SANTOS *et al.*, 2011).

Além disso, a forma como se armazena o látex pode levar a alterações na sua composição devido a sua sensibilidade ao ozônio ou outros sistemas geradores de radicais livres, tais como a luz solar, que enfraquece a cadeia de polímero de látex (WEISS & HIRSHMAN, 1992).

Não causar dano à polpa e aos tecidos moles, não conter substâncias tóxicas que, ao serem liberadas, se difundam e sejam absorvidas pelo sistema circulatório, causando problemas de ordem sistêmica, não possuir agentes com potencialidade sensibilizante que induzissem ao aparecimento de respostas alérgicas e não apresentar potencial carcinogênico são as características ideais para um material utilizado na cavidade oral (PHILLIPS, 1993).

## REFERÊNCIAS

- BRANTLEY, W.A., ELIADES, T. Orthodontic Materials. **Thieme Stuttgart**. New York, 1<sup>o</sup> Ed., p. 174-187, 2001.
- CABRERA, M.C. Elásticos em ortodontia: comportamento e aplicação clínica. **R. Dental Press Ortod. Ortop. Facial**. Maringá, v. 8, n.1, p. 115 -119, jan/fev, 2003.
- CAREY, A.B., CORNISH, K., SCHRANK, P., WARD, B., SIMON, R. Cross-reactivity of alternate plant sources of latex in subjects with systemic IgE-mediated sensitivity to *Hevea brasiliensis* latex. **Ann. Allergy Asthma Immunol**. New York, v.74, n.4, p.317-320, Apr, 1995.
- CERETTA, R.A. Evaluating the effectiveness of peracetic acid sterilization of dental equipment. **Master's thesis**. Universidade do Extremo Sul Catarinense, Criciúma, v.26, n.2, p.117-122, Jun, 2008.
- D'ANTO, V., SPAGNUOLO, G., SCHWEIKL, H., RENGO, S., AMBROSIO, L., MARTINA, R., et al. "Effect of N-acetyl cysteine on orthodontic primers cytotoxicity". **Dent. Mater**. Oxford, v.27, n.8, p.180-186, Jun, 2011.
- DAVIES, C. Orthodontic products update. Cross infection control and elastomeric module delivery systems. **Br J Orthod**. London, v. 25, n.4, p.301-303, Nov, 1998.
- DOS SANTOS, R. L.; PITHON, M. M.; FREIRE, P.P.D.M.; ROMANOS, M.T.V. In Vitro Study of Cytotoxicity of Orthodontic Elastomeric Ligatures. **Mat. Res**. São Carlos, v. 15, n.4, p. 657-661, July/Aug, 2012.
- DOS SANTOS, R.L., PITHON, M.M., MARTINS, F.O., ROMANOS, M.T.V. Cytotoxicity of separation orthodontic elastics. **Dental Press J. Orthod**. Maringá, v.17, n.4, p.110-114, July-Aug, 2012.
- EINOT, I., GABRIEL, K. R. "A study of powers of several methods of multiple comparisons". **J. Am. Stat. Assoc**. Washigton, v.70, n.7, p.574 – 583, Oct., 1975.
- EVERETT, F.G., HICE, T.L. Contact stomatitis resulting from the use of orthodontic rubber elastics: report of case. **J. Am. Dent. Assoc**. Chicago, v.88, n.5, p.1030-1031, May, 1974.
- FRASER, J.A.L., GODFREE, A.F., JONES, F. Use of peracetic acid in operational sewage sludge disposal to pasture. **Water Sci. Technol**. Finland, v.17, n.4-5, p.451-466, Mar, 1984.
- GEHR, R., COCHRANE, D., FRENCH, M. Peracetic acid as a disinfectant for municipal wastewaters: encouraging performance results from physicochemical as well as biological effluents. **Proceedings of the Disinfection Conference**. St. Petersburg, n.17, p.182-198, Feb, 2002.
- GENOVA, D.C.D., McINNES-LEDOUX, P., WEINBERG, R., SHAYE, R. Force degradation of orthodontic elastomeric chains – a product study. **Am. J. Orthod. Dentofac. Orthop**. St. Louis, v.87, n.5, p.377-384, May, 1985.

GRIMSDOTTIR, M.R., HENSTEN-PETTERSEN, A., KULLMANN, A. Cytotoxicity effect of orthodontic appliances. **Am. J. Orthod. Dentofac. Orthop.** St Louis, v.14, n.1, p. 47-53, 1992.

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, July, 2004.

HOLMES, J., BARKER, M.K., TUNCAY, O.C. Cytotoxicity of orthodontics elastics. **Am. J. Orthod. Dentofac. Orthop.** St. Louis, v. 104, n.2, p. 188-191, Aug, 1993.

HUGET, E.F., PATRIK, K.S., NUNEZ, L.J. Observations on the elastic behavior of synthetic orthodontic elastomer. **J. Dent. Res.** Michigan, v.69, n.2, p.496-501, Feb, 1990.

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.19, p.379-386, Oct, 2003.

ISO 10993-5, **Biological Evaluation of Medical Devices.** Part 5. Test for In Vitro Cytotoxicity, 1992.

LOBNER, D., ASRARI, M. Neurotoxicity of dental amalgam is mediated by zinc. **J. Dent. Res.** Michigan, v.82, n.3, p.243-246, Mar, 2003.

LORIATO, L. B., MACHADO, A. W., PACHECO, W. Considerações clínicas e biomecânicas de elásticos em Ortodontia. **R. Clin. Ortod. Dental Press**, Maringá, v. 5, n. 1, p. 44-57, Feb-Mar, 2006.

MATTA, E. N. R.; CHEVITARESE, O. Avaliação laboratorial da força liberada por elásticos plásticos. **Rev SBO.** Rio de Janeiro, v. 3, n. 4, p. 131-36, Ago. 1997.

MILES, D.C., BRISTON, J.H. Polymer technology. **Temple Press Books.** London, p.444, 1965.

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.6, p.22-26, Apr, 2009.

MONARCA, S., RICHARDSON, S.D., FERETTI, D., GROTTOLO, M., THRUSTON, A.D., JR., ZANI, C. Mutagenicity and disinfection by-products in surface drinking water disinfected with peracetic acid. **Env. Tox. Chem.** United States, v. 21, n.2, p.309-318, Feb, 2002.

MORTON, M. Rubber Technology. **Chapman & Hall.** London, 3<sup>ed.</sup>, p.638, 1995.

NEIBURGER, E. J. "A case of possible latex allergy". **J. Clin. Orthod.** Boulder, v.25, n.2, p.559-560, Feb. 1991.

NEYNDORFF, H. C., BARTEL, D. L., TUFARO, F., LEVY, J. G. "Development of a model to demonstrate photosensitizer-mediated viral inactivation in blood". **Transfusion.** Arlington, v.30, n.4, p.485-490, Jun, 1990.

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

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

PHILLIPS, R.W. **Materiais Dentários**, 9ª. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1993, p. 35-38.

PITHON, M.M. Cytotoxicity of orthodontic materials – The search for the perfect orthodontic material. **Dental Press J. Orthod.** Maringá, v.17, n.4, p.2-3, July-Aug, 2012.

PITHON, M.M., SANTOS, R. L., RUELLAS, A. C. O., NOJIMA, L.I., SANT'ANNA, E.F. In vitro evaluation of fluoride release of orthodontic bonding adhesives. **Orthod: Art Practice Dentof.** Chicago, v. 12, n.4, p. 290-295, Dec, 2011.

PITHON, M.M., SANTOS, R.L., JUDICE, R.L.P., ASSUNCAO, P.S., RESTLE, L. Evaluation of the cytotoxicity of elastomeric ligatures after sterilisation with 0.25% peracetic acid. **Aust. Orthod. J.** Australia, v. 29, n. 2, p.139-144, Nov, 2013.

PITHON, M.M., SANTOS, R.L., MARTINS, F.O., ROMANOS, M.T., ARAÚJO, M.T. Cytotoxicity of orthodontic elastic chain bands after sterilization by different methods. **Orthod. Waves.** Netherlands, v.69, p.151-155, May, 2010.

PITHON, M.M., SANTOS, R.L., RUELLAS, A.C.O., FIDALGO, T.K., ROMANOS, M.T.V., MENDES, G.S. Citotoxicidade in vitro de elásticos ortodônticos: comparação entre duas metodologias. **Ver. Saúde Com.** Rio de Janeiro, v.4, n.1, p.19-26, Jun, 2008.

POLYZOIS, G., HENSTEN-PETTERSEN, A. An assessment of the physical properties and biocompatibility of three silicone elastomers. **J. Prosth. Dent.** New York, v. 71, n. 5, p. 500-504, May, 1994.

ROGERO, S.O., SOUZABAZZI, A., IKEDA, T.I., CRUZ, A.S., FERNANDES, K.C., HIGA, O.Z. Citotoxicidade in vitro das membranas de hidrogel reticuladas por radiação ionizante. **Ver. Inst. Adolfo Lutz.** São Paulo, v.59, n.1/2, p.1-5, Maio, 2000.

SANTOS, R. L., PITHON, M.M, Romanos, M.T.V. The effect of different pH levels on conventional vs. super-force chain elastics. **Mat. Res.** São Carlos, v. 16, n.1, p.1-6, Nov, 2013.

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.4, n.2, p.326-329, Apr. 2009.

SANTOS, R.L., PITHON, M.M., PEREIRA, A.R.B., ROMANOS, M.T.V. Evaluation of the cytotoxicity of polyurethane and non-latex orthodontic chain elastics. **Matéria.** Rio de Janeiro, v.17, n. 1, p. 939 – 945, Feb, 2012.

SANTOS, R.L., PITHON, M.M., ROMANOS, M.T. The influence of pH levels on mechanical and biological properties of nonlatex and latex elastics. **Angle Orthod.** Appleton, v.82, n.4, p.709-714, Jul, 2011.

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, February, 1994.

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.

STEVENSON, S.J., KUSY, P.R. Force application and decay characteristics of untreated and treated polyurethane elastomeric chains. **Angle Orthod.** Appleton, v. 64, n.6, p.455-467, Apr. 1994.

TALOUMIS, J.L., SMITH, T.M., HONDRUM, S.O., LORTON, L. Force decay and deformation of orthodontic elastomeric ligatures. **Am. J. Orthod. Dentofac. Orthop.** St. Louis, v. 11, n.1, p. 1-11, Jan. 1997.

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.

TOMS, A.P. The corrosion of orthodontic wire. **Eur. J. Orthod.** Oxford, v.10, n.2, p.87-97, May, 1988.

TOWSE, A., O'BRIEN, M., TWAROG, F.J., BRAIMON, J., MOSES, A.C. Local reaction secondary to insulin injection. A potential role for latex antigens in insulin vials and syringes. **Diab. Care.** v.18, n.8, p.1195-1197, Aug, 1995.

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

WALLIN, R.F., ARSCOTT, E.F. **A practical guide to ISO 10993-5: Cytotoxicity.** Medical Device & Diagnostic Industry Magazine. Apr, v.20, p.96-98, 1998.

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., HIRSHMAN, C.A. Latex allergy. **Can. J. Anaesth.** Toronto, v.39, n.6, p.528-532, Jul, 1992.

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

WONG, A.K. Orthodontic elastic materials. **Angle Orthod.** Appleton, v.46, n.2, p.196-205, Apr, 1976.

YEAP, S. K., OMAR, A. R., ALI, A. M., HO, W. Y., BEH, B. K., ALITHEEN, N. B. "Immunomodulatory Effect of Rhabdophora korthalsii on Natural Killer Cell Cytotoxicity".

**Evid. Based Comple.t Alter. Med.** Rockville Pike, vol. 2012, Article ID 786487, 7 pages, 2012. doi: 10.1155/2012/786487.

**Citotoxicity of nonlatex elastomeric ligatures of orthodontic use**

Rogério Lacerda-Santos<sup>1</sup>, Alane Sonally Benício do Nascimento<sup>1</sup>, Allana Roberta Bandeira Pereira<sup>1</sup>, Paulyana Priscilla de Melo Freire<sup>1</sup>, Matheus Melo Pithon<sup>2</sup>, Maria Teresa Villela Romanos<sup>3</sup>

<sup>1</sup> 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](mailto:lacerdaorto@hotmail.com) or [lacerdaorto@gmail.com](mailto:lacerdaorto@gmail.com)

<sup>2</sup> 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](mailto:matheuspithon@gmail.com)

<sup>3</sup> 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](mailto:teresaromanos@micro.ufrj.br)

**ABSTRACT**

The aim of this study is to evaluate cytotoxicity between polyurethane and non-latex orthodontic elastomeric ligatures. Seven elastomeric ligatures of black-coloured from different manufactures (3 non-latex, 3 polyurethane and 1 latex) were divided into 7 groups of 10 elastics each: Group UK (nonlatex, 3M Unitek), Group TP (nonlatex, TP Orthodontics), Group AO (nonlatex, American Orthodontics), Group O (Polyurethane, OrthoSource), Group M (Polyurethane, Morelli), Group TD (Polyurethane, Tecnident) and Group TC (latex - Control, TP Orthodontics). 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 1-way analysis followed by the Tukey post hoc test were employed ( $p < .05$ ). The results showed no statistically significant differences between Groups UK, TP and AO in all experimental times ( $p > .05$ ). There was a statistically differences ( $p < .05$ ) between the viability cell of Groups UK, TP and AO with the Groups O, M, TD and TC at 1, 2, 3 and 7 days. There was no statistically differences ( $p > .05$ ) between the groups O, M and TD at in all experimental times. It can be concluded that the nonlatex elastomeric ligatures of Unitek, TP Orthodontics, and American Orthodontics showed higher cell viability compared to others ligatures.

**Keywords:** Cytotoxicity, Elastomers, Cell culture.

**1. INTRODUCTION**

The latex because of its applicability in the health area has been the subject of many studies [1-5]. In dentistry, specifically in orthodontics, elastomers are used to supply force to move the teeth, are commonly used in orthodontic treatment [6].

However, the protein content of latex is a known allergen. Studies [3-4,7] have reported a prevalence of latex sensitization of 4% [7] to 17% [3,4] of the general population was reported to be positive to the natural rubber allergy by serologic testing with latex immunoglobulin E antibodies [7].

Because latex allergy is prevalent of among occupationally exposed groups and patients, the need of alternatives, as elastomers of polyurethane and nonlatex, is increasing.

But little is known if polyurethane and nonlatex elastics if are inert to oral mucosal cells [1-6]. For other side, L929 mouse fibroblasts [8], have been shown to behave similarly to primary human gingival fibroblasts and, therefore, are a suitable in-vitro model to the toxicity test [9-12]. Taken in conjunction, these findings are aligned with the notion that the orthodontic elastics citotoxicity may influence their clinical performance [4,13] with regard to tissue biocompatibility. In this line, the objective of the present in vitro study was to test the cytotoxicity of polyurethane and nonlatex orthodontic elastomeric ligatures of different manufactures.

## 2. MATERIAL AND METHODS

Esta Black-coloured orthodontic elastomeric ligatures from 6 different manufacturers were selected for cytotoxicity study, being: three of nonlatex, three containing polyurethane and one of latex (Table 1). The samples were divided into 7 groups of 10 elastics each: Group UK (nonlatex, 3M Unitek, Monrovia, California, USA), Group TP (nonlatex, TP Orthodontics, Lodi, California, USA), Group AO (nonlatex, 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) and Group TC (latex - Control, TP Orthodontics, Lodi, California, USA).

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

Groups	Trademark	Main Composition	Colour	Reference number
UK	Unitek	Nonlatex	Black	406-882
TP	TP Orthodontics	Nonlatex	Black	383-927
AO	American O.	Nonlatex	Black	854-273
O	OrthoSource	Polyurethane	Black	0-0424-161
M	Morelli	Polyurethane	Black	60-06-110
TD	Tecnident	Polyurethane	Black	407-001
TC	TP Orthodontics	latex natural	Black	361-092
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 [14-15].

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 [16], 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 ligatures.

### 2.1 Dye-uptake

Volumes of 100 µl 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 µl of Eagles' minimum essential medium (MEM) obtained following incubation in the different types of elastomeric ligatures 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 µl 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 µl of 4 per cent formaldehyde solution in PBS (130 mmol of NaCl; 2 mmol of KCl; 6 mmol of Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2 H<sub>2</sub>O; 1

mmol of  $K_2HPO_4$  1 mmol; pH 7.2) were added to each well to promote cell attachment to the plate. After 5 minutes, 100  $\mu$ 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 [17] for evaluation and standardization.

For ranking the citotoxicity, a post hoc comparison was performed [18-19]. 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

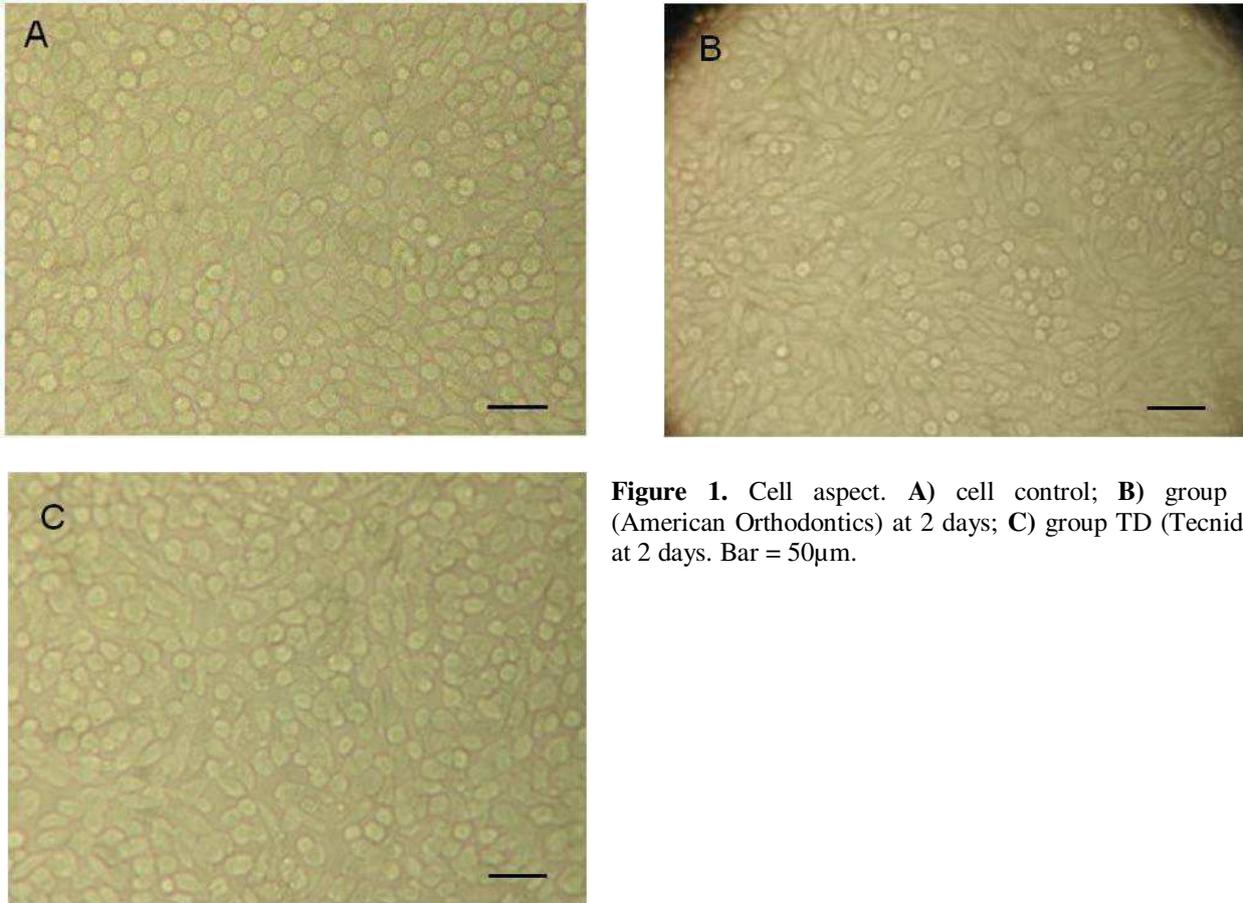
There were a statistically significant difference ( $p=.00$ ) between the viability of the cells in Group CC (Figure 1A) and all other groups at 1, 2, 3, 7 and 28 days. Nor were there any statistically significant differences ( $p>.05$ ) between the viability of the cells in Groups UK, TP and AO (Figure 1B) or between Groups O, M and TD (Figure 1C) at 1, 2, 3, 7 and 28 days (Table 2 and Figure 2). The Group TC showed statistical difference with Groups M, TD at 1 day, Groups O, M at 2 and 7 days, and with Groups O, M, TD at 3 days ( $p<0.05$ ). There were decrease viable cells at 1 and 2 days of all the Groups compared to the other experimental times (Table 2 and Figure 2). However, with 28 days the elastomeric ligatures evaluated showed similar cell viability.

**Table 2.** Descriptive statistics for optical density of elastomeric ligatures at 1 to 28 days.

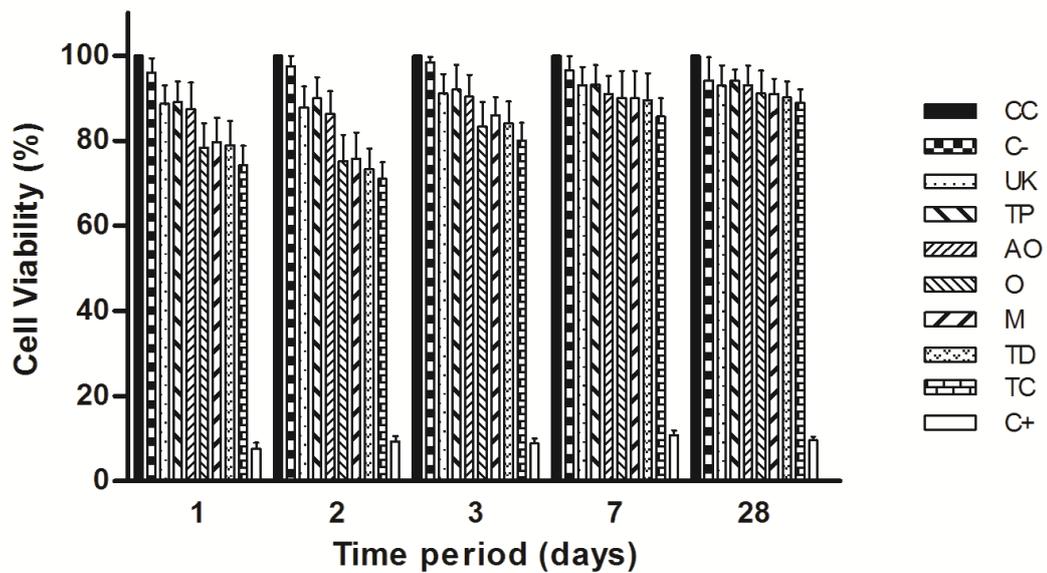
G	Time (1 day)			Time (2 days)			Time (3 days)			Time (7 days)			Time (28 days)		
	M	SD	VC (%)	M	SD	VC (%)	M	SD	VC (%)	M	SD	VC (%)	M	SD	VC (%)
CC	.930 <sup>a</sup>	.035	100.0	.905 <sup>a</sup>	.044	100.0	.816 <sup>a</sup>	.049	100.0	.695 <sup>a</sup>	.041	100.0	.817 <sup>a</sup>	.047	100.0
C-	.892	.037	96.0	.882	.042	97.5	.802	.040	98.4	.670	.027	96.5	.768	.042	94.1
C+	.071	.008	7.70	.084	.011	9.30	.071	.009	8.80	.075	.009	10.8	.078	.010	9.60
UK	.824 <sup>b</sup>	.039	88.7	.795 <sup>b</sup>	.033	87.9	.743 <sup>b</sup>	.037	91.1	.646 <sup>b</sup>	.045	93.0	.758 <sup>b</sup>	.046	93.9
TP	.828 <sup>b</sup>	.030	89.1	.814 <sup>b</sup>	.043	90.0	.750 <sup>b</sup>	.036	92.0	.647 <sup>b</sup>	.029	93.2	.768 <sup>b</sup>	.032	94.1
AO	.813 <sup>b</sup>	.047	87.5	.781 <sup>b</sup>	.040	86.3	.736 <sup>b</sup>	.027	90.3	.632 <sup>bc</sup>	.034	91.0	.759 <sup>bc</sup>	.044	93.0
O	.728 <sup>cd</sup>	.046	77.3	.714 <sup>c</sup>	.044	75.2	.680 <sup>c</sup>	.038	83.4	.626 <sup>c</sup>	.032	90.1	.744 <sup>bc</sup>	.038	91.1
M	.740 <sup>c</sup>	.030	79.6	.685 <sup>c</sup>	.036	75.8	.700 <sup>c</sup>	.042	85.9	.625 <sup>c</sup>	.045	90.0	.743 <sup>bc</sup>	.048	91.0
TD	.744 <sup>c</sup>	.038	79.0	.663 <sup>cd</sup>	.035	73.3	.686 <sup>c</sup>	.043	84.1	.622 <sup>cd</sup>	.039	89.5	.736 <sup>bc</sup>	.037	90.2
TC	.698 <sup>d</sup>	.030	74.2	.642 <sup>d</sup>	.026	71.0	.645 <sup>d</sup>	.027	79.1	.602 <sup>d</sup>	.028	86.7	.726 <sup>c</sup>	.020	89.0

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.

At 24 hours the percentage of viable cells varied between 89.1 per cent in Group TP non-latex elastomeric ligatures, to 74.2 per cent in Group TC latex elastomeric ligatures. These percentages of viable cells decreased slightly over the following 24 hours in all Groups. Then, there was an increased continued in all Groups between Days 3 and 28 (Table 2 and Figure 2).



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



**Figure 2.** Percentage viability of tested elastomeric ligatures obtained by spectrophotometry.

#### 4. DISCUSSION

Although cytotoxicity and allergies to dental latex materials were mostly reported for latex gloves [20-21]. Current studies [1,15] has shown the biological behavior of orthodontic elastomeric ligatures through of cytotoxicity test because orthodontic elastics are kept in the closed space of the oral cavity for several days.

The cell culture model used in the present study was the monolayer [22]. This model was used together with the dye-uptake technique [18] 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 [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 [17].

Although latex rubber has shown biocompatibility as a dental material, many cytotoxic factors have been reported. Conservants such as sulphur and zinc oxide as well as antioxidants such as di-thio-carbohydrates, N-nitrosodibutylamine, and N-nitrosopiperidine are all known to be cytotoxic substances [5].

The most serious consequence of natural rubber latex allergy commonly takes place during the mucosal absorption of natural rubber latex proteins during intraoperative medical or dental procedures when health care workers or others already sensitized become patients [25]. This latex allergy occurs because natural latex contains many kinds of proteins, and the glove's powder coating functions as a carrier of those latex proteins.

As an alternative to latex, front the reports of latex allergy [26] and their cytotoxic character in literature [16-17], this study evaluated the cytotoxicity of polyurethane and nonlatex Orthodontic elastomeric ligatures of different manufactures.

We have assessed the Unitek, TP Orthodontics and American Orthodontics, nonlatex elastomeric ligatures and it was observed that this material induced a lesser amount of cell lysis compared the polyurethane elastomeric ligatures. The great [15] 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.

The latex ligature tested in this study demonstrated the lowest values of cell viability in all experimental times, result of the release of latex proteins and stabilising substances with cytotoxic potential [1], although a similar performance was demonstrated between the latex ligature and polyurethane ligatures. Polyurethane elastomeric ligatures from OrthoSource, Morelli, and Tecident, 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 a possible of polyurethane degradation and release of cytotoxic components, which was shown on days 1 and 2, and decreased on days 3, 7 and 28. However, all elastomeric ligatures were found to be biocompatible after the 3<sup>rd</sup> experimental day. Study [27] that examined whether the dyes used in manufacturing colored latex bands could have any toxic effects, showed that these colourants exhibited low toxicity, clinically, however, this effect is harmless, confirming the findings of this study.

However, there have been a few reports about the cytotoxicity of nonlatex elastics. Byproducts produced during the condensation procedure of polymerization have been reported to be cytotoxic [28]. However, these byproducts decrease in cytotoxicity after 1 hour and have a very low cytotoxic effect on intraoral soft tissues [29]. The safety biocompatibility of nonlatex elastics has been well proved through the use of mouth guards in dentistry [30]. In this study, all elastomeric ligatures evaluated showed cell viability, over of 70% in all experimental periods, that allowing affirm the high viability of the evaluated materials.

The materials described by the manufacturer as nonlatex have linear or cross-linked polymer composition, which are thermoplastic or thermoset materials. In this study, the nonlatex elastomeric ligatures presented better performance compared to the announced-polyurethane ligatures, suggesting that the process of industrialization and/or the presence of stabilizing substances noncytotoxic in the composition these nonlatex elastics, are responsible for different behavior these elastics, despite being reported by manufacturers the atoxicity of polyurethane materials. However, the tested elastomers have been shown to be a safe alternative for clinical use in individuals already sensitized or in potential to contact with rubber latex.

#### 5. CONCLUSION

It can be concluded that, the nonlatex ligatures of Unitek, TP Orthodontics and American Orthodontics trademark induced a lesser amount of cell lysis compared to Orthosource, Morelli and Tecident polyurethane ligatures. The latex elastomeric ligature caused the greatest amount of cell lysis, however, all ligatures were clinically biocompatible, starting from the 7th day.

## 6. BIBLIOGRAPHY

- [1] PITHON, M. M., SANTOS, R. L., JUDICE, R. L. P., ASSUNCAO, P. S. E., RESTLE, L. Evaluation of the cytotoxicity of elastomeric ligatures after sterilisation with 0.25% peracetic acid. *Aust Orthod J.* v.29, n.2, p.139-144, Nov. 2013.
- [2] WAKELIN, S. H., WHITE, I. R. "Natural rubber latex allergy". *Clin Exp Dermatol.* v.24, n. 13, p.245-248, Sept. 1999.
- [3] TOMAZIC, V. J., WITHROW, T. J., FISHER, B. R., DILLARD, S. F. "Latex-associated allergies and anaphylactic reactions". *Clin Immunol Immunopathol.* v.64, n.31, p.89-97, Oct. 1992.
- [4] TURJANMAA, K., ALENIUS, H., MAKINEN-KILJUNEN, S., REUNALA, T., PALOSUO, T. "Natural rubber latex allergy". *Allergy.* v.51, n.35, p.593-602, Dec. 1996.
- [5] FIDDLER, W., PENSABENE, J., SPHON, J., ANDRZEJEWSKI, D. "Nitrosamines in rubber bands used for orthodontic purposes". *Food Chem Toxicol.* v.30, n.22, p.325-326, Aug. 1992.
- [6] HWANG, C. J., CHA, J. Y. "Mechanical and biological comparison of latex and silicone rubber bands". *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* v.124, n.19, p.379-386, Apr. 2003.
- [7] MAKINEN-KILJUNEN, S. "Banana allergy in patients with immediatetype sensitivity to natural latex: characterization of cross-reacting antibodies and allergens". *Allergy Clin Immunol.* v.93, n.8, p.990-6, Sept. 1994.
- [8] 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.* v.20, n.6, p.22-26, Apr. 2009.
- [9] D'ANTO, V., SPAGNUOLO, G., SCHWEIKL, H., RENGO, S., AMBROSIO, L., MARTINA, R., et al. "Effect of N-acetyl cysteine on orthodontic primers cytotoxicity". *Dent Mater.* v.27, n.8, p.180-186, Jun. 2011.
- [10] HAFEZ, H. S., SELIM, E. M., KAMEL, E. I. D., TAWFIK, W. A., AL-ASHKAR, E. A., MOSTAFA, Y. A. "Cytotoxicity, genotoxicity, and metal release in patients with fixed orthodontic appliances: A longitudinal in-vivo study". *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* v.140, n.20, p.298-308, Oct. 2011.
- [11] LIMBERGER, K. M., WESTPHALEN, G. H., MENEZES, L. M., MEDINA-SILVA, R. "Cytotoxicity of orthodontic materials assessed by survival tests in *Saccharomyces cerevisiae*". *Dent Mater.* v.27, n.10, p.81-86, Febr. 2011.
- [12] YEAP, S. K., OMAR, A. R., ALI, A. M., HO, W. Y., BEH, B. K., ALITHEEN, N. B. "Immunomodulatory Effect of *Rhaphidophora korthalsii* on Natural Killer Cell Cytotoxicity". *Evid Based Complement Alternat Med.* 2012:786487. 2012
- [13] NEIBURGER, E. J. "A case of possible latex allergy". *J Clin Orthod.* v.25, n.2, p.559-560, Feb. 1991.
- [14] REMATOSO, L., SANTOS, R. L., CUNHA, T. M. A., PITHON, M. M., MARTINS, F. O., ROMANOS, M. T. V., TANAKA, O. M. In vitro cytotoxicity of self-curing acrylic resins of different colors. *Dental Press J Orthod.* v. 19, n.4, p. 66-70, Jul-Aug. 2014.
- [15] DOS SANTOS, R. L., PITHON, M. M., FREIRE, P. P. D. M., ROMANOS, M. T. V., DOS SANTOS, R. L. In Vitro Study of Cytotoxicity of Orthodontic Elastomeric Ligatures. *Mater Res.* v.15, n.4, p.657-661, May. 2012.
- [16] NEYNDORFF, H. C., BARTEL, D. L., TUFARO, F., LEVY, J. G. "Development of a model to demonstrate photosensitizer-mediated viral inactivation in blood". *Transfusion.* v.30, n.4, p.485-490, Jun. 1990.
- [17] ISO 10993-5, Biological Evaluation of Medical Devices. Part 5. Test for In Vitro Cytotoxicity, 2009.
- [18] EINOT, I., GABRIEL, K. R. "A study of powers of several methods of multiple comparisons". *J Am Stat Assoc.* v.70, n.7, p.574 – 583, Oct. 1975.
- [19] WELSCH, R. E. "Stepwise multiple comparison procedures". *J Am Stat Assoc.* v.72, n.8, p. 354-359, Dec. 1977.
- [20] NATTRASS, C., IRELAND, A. J., LOVELL, C. R. "Latex allergy in an orthognathic patient and implications for clinical management". *Br J Oral Maxillofac Surg.* v.7, n.4, p.11-3, Nov. 1999.
- [21] NACEY, J. N., DELAHUNT, B. "Toxicity study of first and second generation hydrogel coated latex urinary catheters". *Br J Urol.* v. 67, n. 6, p.314-6, Apr. 1991.
- [22] TOMAKIDI, P., KOKE, U., KERN, R., ERDINGER, L., KRUGER, H., KOHL, A., 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.4, p.2-19, Feb. 2000.
- [23] SANTOS, R. L., PITHON, M. M., ROMANOS, M. T. V. The effect of different pH levels on conventional vs. super-force chain elastics. *Mater Res.* v.15, n.6, p.1-6, Sep. 2012.
- [24] SANTOS, R. L., PITHON, M. M., PEREIRA, A. R. B., ROMANOS, M. T. V. Evaluation of the cytotoxicity of polyurethane and non-latex orthodontic chain elastics. *Materia.* v.17, n.1, p.939-945, Jan. 2012.

- [25] SUSSMAN, G. L., BEEZHOLD, D. H., LISS, G. "Latex allergy: historical perspective". *Methods*. v.27, n.6, p.3-9, Febr. 2002.
- [26] SNYDER, H. A., SETTLE, S. "The rise in latex allergy: implications for the dentist". *J Am Dent Assoc*. v.125, n.8, p.1089-1097, Oct.1994
- [27] HOLMES, J., BARKER, M. K., WALLEY, E. K., TUNCAY, O. C. "Cytotoxicity of orthodontic elastics". *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. v.104, n.4, p.188-191, Jun.1993.
- [28] CIAPETTI, G., GRANCHI, D., STEA, S. "Cytotoxicity testing of materials with limited in vivo exposure is affected by the duration of cell-material contact". *J Biomed Mater Res*. v.15, n.4, p.485-90, Nov. 1998.
- [29] POLYZOIS, G. L., HENSTEN-PETTERSEN, A. "An assessment of the physical properties and biocompatibility of three silicone elastomers". *J Prosthet Dent*. v.71, n.8, p.500-4, Dec. 1994.
- [30] CHAUVEL-LEBRET, D. J., PELLEN-MUSSI, P. "Evaluation of the in vitro biocompatibility of various elastomers". *Biomaterials*. v. 20, n.6, p.291-9, Feb. 1991.

#### **4 CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Pode-se concluir que as ligaduras latex-free da marca Unitek, TP Orthodontics e American Orthodontics induziram uma menor quantidade de lise celular comparado com as ligaduras de poliuretano das marcas Orthosource, Morelli e Tecnident. A ligadura elastomérica de látex causou a maior quantidade de lise celular, no entanto, todas as ligaduras eram clinicamente biocompatível, a partir do 7º dia.

**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) disponibilização no endereço

<http://www.sm2000.coppe.ufrj.br/formatacao.pt.html>

## APÊNDICE B – METODOLOGIA DA PESQUISA

Ligaduras elastoméricas ortodônticas (tipo modular) de cor preta de seis fabricantes diferentes foram selecionadas para o estudo de citotoxicidade, sendo três látex-free, três contendo poliuretano e 1 de látex (Tabela 1). As amostras foram divididas em 7 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) e Grupo TC (látex, TP Orthodontics, Lodi, Califórnia, EUA).

Todas as amostras teriam datas de fabricação recentes, deveriam ser do mesmo lote de produção e vir em embalagens plásticas seladas. O revestimento superficial de pó das ligaduras elásticas foi removido através da lavagem de todos os elásticos durante 15 segundos com água corrente deionizada, usando um sistema de purificação de água Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, EUA) e foi seco superficialmente com papel absorvente. Antes do ensaio, todas as ligaduras elásticas foram esterilizadas por exposição à luz ultravioleta (Labconco, Kansas, Missouri, EUA) durante 30 minutos (SANTOS *et al*, 2009).

O modelo de cultura celular utilizado foi o de monocamada contendo células da linhagem L-929 (tipo americano Culture Collection - ATCC, Rockville, MD, EUA), mantidas em meio essencial mínimo de Eagle (Cultilab, Campinas, Brasil), através da adição de 0,03 mg / ml de glutamina, 50 µg / ml de gamicine, 2,5 mg / ml de fungizona, solução de bicarbonato de sódio a 0,25%, 10 mM de HEPES, e 10% de soro fetal bovino em meio de crescimento. Em seguida, o meio de cultura celular foi incubado a 37 ° C durante 48 horas.

Para verificar a resposta das células em situações extremas, três grupos foram incluídos no estudo: Grupo CC (controle de células), que consiste em células L-929 não-expostas aos sobrenadantes das ligaduras elásticas; Grupo C + (controle positivo), consistindo de Tween 80 (polioxietileno-20-sorbitano, Sigma, St. Louis, Missouri, EUA); Grupo C-(controle negativo), que consiste de solução (PBS) salina tamponada com fosfato (Tabela 1). Os controles positivos e negativos foram incubados em meio de manutenção MEM (meio essencial mínimo de Eagle) por 1, 2, 3, 7 e 28 dias e os eluídos extraídos foram adicionados às células da linhagem L-929 incubadas em meio de crescimento.

A citotoxicidade destes elásticos ortodônticos foi determinada por meio da técnica de absorção de corante (NEYNDORFF *et al*, 1990), que se baseia na absorção de vermelho neutro

por células vivas. Como essas ligaduras elastoméricas são geralmente mantidas na cavidade bucal por até 4 semanas, uma vez que pacientes usando aparelhos fixos costumam visitar o ortodontista uma vez por mês, os períodos de tempo: 1, 2, 3, 7 e 28 dias serão avaliados neste estudo. Estes períodos experimentais representaram a manutenção do tempo em condições de cultura de células antes da remoção das ligaduras.

**Tabela 1.** Os grupos experimentais e de controle usados para os ensaios.

<b>Grupos</b>	<b>Marca</b>	<b>Composição Principal</b>	<b>Cor</b>	<b>Lote</b>
<b>UK</b>	Unitek	Látex-free	Preto	406-882
<b>TP</b>	TP Orthodontics	Látex-free	Preto	383-927
<b>AO</b>	American O.	Látex-free	Preto	854-273
<b>O</b>	OrthoSource	Poliuretano	Preto	0-0424-161
<b>M</b>	Morelli	Poliuretano	Preto	60-06-110
<b>TD</b>	Tecnident	Poliuretano	Preto	407-001
<b>TC</b>	TP Orthodontics	Látex natural	Preto	361-092
<b>C+</b>	Tween 80 (Polioxietileno-20-sorbitan, Sigma, St. Louis, Missouri, USA)			
<b>C-</b>	Solução PBS (solução salina tamponada com fosfato, Cultilab, Campinas, SP, Brazil)			
<b>CC</b>	Controle de células ( linhagem de células L-929, ATCC, Rockville, MD, USA)			

Volumes de 100 µl de células L-929 foram distribuídas em triplicatas para cada amostra testada em microplacas de 96 poços. Após 48 horas, o meio de crescimento foi substituído por 100 µl de meio mínimo essencial (MEM) de Eagle obtido após incubação nos diferentes tipos de ligaduras elásticas em 1, 2, 3, 7 e 28 dias. O meio essencial mínimo de Eagle foi utilizado porque é o mesmo tipo de substância utilizada para a manutenção das células, portanto, não influencia os resultados.

Após 24 horas de incubação, 100 µl de 0,01 % de corante vermelho neutro (Sigma, St. Louis, Missouri, EUA) foi adicionado a cada poço em microplacas e incubadas durante 3 horas a 37 ° C. Após este período de tempo, 100 ml de solução de formaldeído a 4 % em PBS (130 mmol de NaCl, 2 mmol de KCl, 6 mmol de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2 H<sub>2</sub>O; 1 mmol de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1 mmol; pH 7,2) foram adicionados a cada poço para promover a fixação das células à placa. Depois de 5 minutos, 100 µl de ácido acético a 1% e 50% de metanol foram adicionados a fim de remover o corante não captado 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. Devido às ligaduras elásticas poderem estar na cavidade oral durante até 4 semanas, a viabilidade celular foi determinada após exposição ao meio MEM em que os elásticos foram incubados por 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 ranquear a citotoxicidade, uma comparação post hoc foi realizada (EINOT & GABRIEL,, 1975;WELSCH, R. E., 1977). Os cálculos estatísticos foram realizados com análise de variância (ANOVA) seguida do teste post-hoc de Tukey. Valores de *P* inferiores a 0,05 foram considerados como indicativos de diferenças significativas.

## ANEXO A – DESCRIÇÃO DO ESTILO DE FORMATAÇÃO DA REVISTA MATÉRIA



Revista Matéria, v. X, n. Y, pp. PP – PP, 20xx  
<http://www.materia.coppe.ufrj.br/sarra/artigos/artigo10XXX>

### 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.<sup>I</sup>, \*AUTOR, T.<sup>II</sup>

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

<sup>I</sup> Laboratório de Hidrogênio - Labh2 – PEMM/COPPE/UFRJ CP: 68505 – 21941-972, Rio de Janeiro, RJ.  
 e-mail: [materia@labh2.coppe.ufrj.br](mailto:materia@labh2.coppe.ufrj.br)

<sup>II</sup> Endereço dos Outros Autores 1 e 2 – Ilha do Fundão, Rio de Janeiro, RJ  
 e-mail: [outro.autor1@outros.autores.com](mailto:outro.autor1@outros.autores.com) ; [outro.autor2@outros.autores.com](mailto: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.

### Description of used Styles MSWORD in the Revista Matéria

#### 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.

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

## 1 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:

1. Introdução;
2. Materiais e Métodos;
3. Resultados e Discussão;
4. Conclusão;

5. Agradecimentos;
6. Bibliografia;
7. Anexo.

## 2 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.

### 2.1 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

## 3 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.

### 3.1 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

### 3.2 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.

## 4 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.

### 4.1 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.

## 5 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.

## 6 AGRADECIMENTOS

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

## 7 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:

## 7.1 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.

## 7.2 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.

## 7.3 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.

## 7.4 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.

## 7.5 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., IIKAWA, F., MOTISUKE, P., *et al.*, “Photorelectance characterization of  $\delta$ -doped p-GaAs”, In: *International Conference on Modulation Spectroscopy*, 1286-32, San Diego, California, USA, 19-21 March 1990.

## 7.6 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.

## 7.7 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.

## 7.8 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.

### **7.9 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.

### **7.10 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

## ANEXO B CARTA DE ACEITAÇÃO

De: **Rogério Lacerda** (lacerdaorto@hotmail.com)  
Enviada: terça-feira, 25 de novembro de 2014 19:27:39  
Para: sonally.s@hotmail.com (sonally.s@hotmail.com)

Date: Wed, 22 Oct 2014 15:11:14 -0200  
From: materia@labh2.coppe.ufrj.br  
To: lacerdaorto@hotmail.com; lacerdaorto@gmail.com  
Subject: Artigo -2332 - Matéria

Prezados autores,

O seu artigo {-2332- *Cytotoxicity of nonlatex elastomeric ligatures of orthodontic use*} foi aprovado e será publicado futuramente em uma edição da Revista Matéria, no ano de 2015.

Por gentileza, acesse o site da Revista (<http://www.materia.coppe.ufrj.br>) vá na seção "Submissão de artigos">"Confirmação de Autoria e Direitos de Publicação", preencha o formulário e nos encaminhe, seguindo as instruções ao final do texto.

Agradecemos mais uma vez o interesse dos autores na Revista Matéria e aproveitamos a oportunidade para encorajá-los a nos enviar novos trabalhos para apreciação. Sintam-se à vontade para nos contatar em caso de eventuais dúvidas e maiores informações.

Cordialmente,

Apoio Editorial  
Revista Matéria

att.,  
Monique

**REVISTAMATÉRIA** **Monique Araújo Santos**  
Editoria da revista Matéria  
Tel.: +55 (21) 3938-8791  
[materia@labh2.coppe.ufrj.br](mailto:materia@labh2.coppe.ufrj.br)