



# Avaliação da citotoxicidade de quatro alginatos utilizados na Odontologia

*Evaluation of the cytotoxicity of four alginate used in Dentistry*

**Matheus Melo Pithon**

**Rogério Lacerda dos Santos**

Especialistas em Ortodontia pela Universidade Federal de Alfenas (Unifal)

Mestres em Ortodontia pela UFRJ

Doutorandos em Ortodontia pela UFRJ

**Fernanda Otaviano Martins**

Graduanda de Microbiologia e Imunologia pela UFRJ

**Maria Teresa Villela Romanos**

Doutora em Ciências (Microbiologia e Imunologia) pela UFRJ

Professora Adjunta da UFRJ

**Mônica Tirre de Souza Araújo**

Doutora em Ortodontia pela UFRJ

Professora Adjunta da UFRJ

## Resumo

O objetivo do presente trabalho foi avaliar a citotoxicidade de quatro diferentes alginatos de uso odontológico. Foram avaliados quatro alginatos divididos em quatro grupos: Jeltrate, Tropicalgin, Cavex Color change e Qualitygel. Corpos de prova foram imersos em meio Eagle por 2 min, onde então procedeu-se à remoção do sobrenadante e colocação em contato com fibroblastos L929. Após coloração, realizou-se contagem de células viáveis. Os resultados demonstraram diferenças estatísticas entre os grupos CC e C- e os demais. Todos os grupos experimentais apresentaram citotoxicidade.

**Palavras-chave:** citotoxicidade; materiais para moldagem odontológica; técnicas de cultura de células.

## Abstract

The objective of this study was to evaluate the cytotoxicity of four different dental alginate. The four alginate were divided into four groups: Jeltrate, Tropicalgin, Cavex Color change and Qualitygel. Bodies of evidence were immersed in Eagle medium for 2 min, and then it was removed the supernatant and placed in contact with L929 fibroblasts. After staining, viable cells were counted. The results showed differences between groups CC and C- and the others. All experimental groups showed cytotoxicity.

**Keywords:** cytotoxicity; dental impression materials; cell culture techniques.

## Introdução

A moldagem das arcadas dentárias é um procedimento de rotina na Odontologia, cujo modelo obtido é utilizado para confecção de próteses, aparelhos ortodônticos, placas miorelaxantes, estudo de caso na ausência do paciente no consultório dentre outras utilidades. Muitos materiais são empregados para tal procedimento, dentre esses cita-se as godivas, silicones, mercaptanas e alginatos.

O alginato, por sua vez, é o mais aceito e utilizado. Esse material é classificado como hidrocoloide irreversível, de fácil manipulação, boa capacidade de reprodução de detalhes, barato e confortável para o paciente (2).

É importante ser lembrado que alguns metais pesados e partículas de sílica presentes nos alginatos podem trazer algum risco de toxicidade para o profissional e/ou paciente, uma vez que nem sempre se consegue moldagens perfeitas, principalmente nas primeiras experiências dos alunos com o paciente, levando, muitas vezes, à repetição deste procedimento (17).

Dentre os metais pesados presente nos alginatos, figura o chumbo, cuja função seria aprimorar as propriedades elásticas do material, após a sua geleificação (3).

Basicamente a intoxicação com alginato pode se dar por inalação do pó pelo paciente e profissional, ingestão acidental pelo paciente e absorção pela mucosa oral em casos de repetidas moldagens (3, 4, 19).

Durante uma moldagem, o alginato entra em contato íntimo, por um tempo de cerca de 2 minutos, com a mucosa oral que é altamente vascularizada e possui grande potencial de absorção. Assim sendo, a repetição de moldagens consecutivas poderia causar certo grau de toxicidade para o paciente, dependendo da composição do material (3, 17).

Baseado nessas premissas, o presente trabalho tem como objetivo avaliar a citotoxicidade de quatro diferentes marcas de alginatos de uso corriqueiro na Odontologia.

## Material e Método

### Cultura de Células

A linhagem celular utilizada foi L929 obtido do *American Type Culture Collection* (ATCC, Rockville, MD) (fibroblasto de camundongo) cultivada em meio mínimo essencial de Eagle (MEM) (Cultilab, Campinas, São Paulo, Brasil) suplementado com 2 mM de L-glutamina (Sigma, St. Louis, Missouri, USA), 50

µg/ml de gentamicina (Schering Plough, Kenilworth, New Jersey, USA), 2,5 µg/ml de fungizona (Bristol-Myers-Squibb, New York, USA), 0,25 ml solução de bicarbonato de sódio (Merck, Darmstadt, Germany), 10 mM of HEPES (Sigma, St. Louis, Missouri, USA) e 10% de soro fetal bovino (SFB) (Cultilab, Campinas, São Paulo, Brasil) e mantida a 37° C em ambiente contendo 5% de CO<sub>2</sub>.

### Alginatos Avaliados

A amostra foi composta de quatro diferentes alginatos divididos em quatro grupos: Jeltrate (Dentsply, Petrópolis, Brasil, Lot 971244), Tropicalgin (Zhermack, Rovigo, Itália, Lot C302240), Cavex Color change (Cavex, Neerland, Lot 080715) e Qualitygel (Quality Dent, São José dos Campos, Lot 654338).

### Confecção dos Corpos de Prova

Para confecção dos corpos de prova, o material foi manipulado por 1 minuto utilizando-se cubeta de borracha e espátula plástica seguindo as recomendações dos fabricantes. Após correta homogeneização, o alginato foi inserido em anéis de silicone nas dimensões de 4 mm de diâmetro e 4 mm de altura, até sua completa geleificação.

### Controles

Para verificar a resposta celular frente aos extremos, outros três grupos foram inseridos, grupo CC (controle de célula), o qual as células não foram expostas a nenhum material, grupo C+ (controle positivo) constituído de um detergente celular Tween 80 (Polioxietileno-20-Sorbitan) e C- (controle negativo), solução de PBS (Phosphate-buffered saline).

## Ensaio de Citotoxicidade dos Materiais

Os materiais foram esterilizados previamente por exposição à luz U.V. (Labconco, Kansas, Missouri, USA), durante 1 hora. Em seguida, três amostras de cada material foram colocadas em placas de 24 poços contendo meio de cultura (MEM) (Cultilab, Campinas, São Paulo, Brasil). A cada 24h, o meio de cultura foi substituído por meio novo e os sobrenadantes coletados após 24, 48, 72 e 168 horas (7 dias), e avaliados quanto à toxicidade para as células L929. Os sobrenadantes foram colocados, em triplicata, em uma placa de 96 poços contendo monocamada confluenta de L929 e incubados por 24 horas a 37° C em ambiente contendo 5% de CO<sub>2</sub>. Terminado o tempo de incubação, o efeito na viabilidade celular foi determinado através da técnica *dye-uptake*, descrita por NEYNDORFF *et al.* (14), com pequenas modificações. Após 24 horas de incubação, foram adicionados 100 µl de vermelho neutro a 0,01% (Sigma, St. Louis, Missouri, USA), em meio de cultura, em cada poço das microplacas e estas foram incubadas a 37° C por 3 horas para penetração do corante nas células vivas. Passado esse período, após desprezar o corante, foram adicionados 100 µl de solução de formaldeído (Reagen) a 4% em PBS (NaCl 130 mM; KCl 2 mM; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2H<sub>2</sub>O 6 mM; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1mM, pH7,2) por 5 minutos, para promover a fixação das células às placas. Em seguida, para a extração do corante, foram adicionados 100 µl de uma solução de ácido acético (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil) a 1% com metanol (Reagen, Rio de Janeiro, Brasil) a 50%. Após 20 minutos, a leitura foi realizada em espectrofotômetro (BioTek, Winooski, Vermont, USA) em um comprimento de onda de 492nm ( $\lambda = 492 \text{ nm}$ ).

### Análise Estatística

As análises estatísticas foram realizadas com auxílio do programa SPSS 13.0 (SPSS Inc., Chicago, Illinois). Análise estatística descritiva incluindo média e desvio padrão foram calculados para os grupos avaliados. Os valores da quantidade de células viáveis foram submetidos à análise de variância (Anova) para determinar se havia diferenças estatísticas entre os grupos e, posteriormente, ao teste de Tukey.

### Resultados

Os resultados demonstraram diferenças estatísticas entre os grupos CC e C- com os demais (P < 0,05). Ausência de diferença estatística ocorreu entre os grupos Jeltrate, Tropicalgin e Qualitygel (P > 0,05) (Tabela I).

**Tabela I.** Média, desvio padrão, percentagem de células viáveis e análise estatística dos grupos avaliados

Grupos	Média - células viáveis (desvio padrão)	% Células Viáveis	Estatística
Jeltrate	334,8 (82,9)	26,3	A
Tropicalgin	345,7 (42,3)	27,1	A
Cavex Color change	559,6 (122,2)	43,9	B
Qualitygel	319,1 (52,4)	25	A
C+	67 (2,20)	5,26	C
C-	1111,5 (67,85)	87,31	D
CC	1273,75 (125,71)	100	D

Com relação à viabilidade celular, o grupo CC apresentou maior viabilidade seguido do grupo C-, Cavex Color Change, Tropicalgin, Jeltrate e Qualitygel, por sua vez o grupo com menor viabilidade celular foi o grupo C+.

## Discussão

Como mencionado anteriormente, o alginato é o material de moldagem mais aceito e utilizado na Odontologia. O pó de alginato contém vários componentes, com diferentes finalidades. Muitas substâncias como zinco, bário, cádmio, silicatos de chumbo e fluoretos são adicionados em algumas marcas comerciais com o objetivo de melhorar suas propriedades físicas e químicas, causando preocupação no que se refere à toxicidade desse material (6).

Segundo SYNDISKIS *et al.* (19), o alginato tem a capacidade de afetar a habilidade das células em se reproduzirem, isto é, a substância pode não ser tóxica o suficiente para matar as células, mas é tóxica para inibir o crescimento celular ou, em pequena escala, afetar a função celular normal. O significado clínico disso é que, enquanto um único contato pode não causar sintomas clínicos, contatos repetidos com o material, que alteram ou afetam a viabilidade das células, podem resultar em reação tóxica tardia ou alérgica. Dessa forma, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a citotoxicidade de quatro diferentes alginatos de uso odontológico em culturas de células.

A utilização de cultura de células vem sendo utilizada como parte de uma série de testes recomendados para avaliar o comportamento biológico dos mate-

riais a serem colocados em contato com tecidos humanos (9, 13, 15). Neste estudo, testes de citotoxicidade foram realizados para avaliar a citotoxicidade dos alginatos. Utilizou-se linhagem de célula L929 (fibroblastos de camundongos), bastante utilizada em diversos trabalhos, onde se pretende avaliar a citotoxicidade de materiais de uso odontológico (1, 8, 10, 12).

O método utilizado para avaliação da viabilidade celular foi com a utilização do vermelho neutro. O procedimento de análise do vermelho neutro é um ensaio de sobrevivência/viabilidade celular, baseado na capacidade das células viáveis de incorporar e combinar o vermelho neutro dentro dos lisossomos. Normalmente, é realizado em células aderentes. O vermelho neutro é um corante catiônico fraco, que penetra na membrana celular e se acumula intracelularmente nos lisossomos (pH lisossômico < pH citoplasmático), onde se combina com a parte aniônica da matriz lisossômica (11). As mudanças da superfície celular ou da membrana lisossômica sensível levam à fragilidade lisossômica e outras mudanças que se tornam gradativamente irreversíveis. Tais alterações ocorridas pela ação de xenobióticos resultam na diminuição da absorção e combinação do vermelho neutro. Assim, é possível distinguir células viáveis, danificadas ou mortas, o que é base do ensaio. A quantidade de corante incorporado às células é medida por espectometria e é diretamente proporcional ao número de células com membrana intacta.

Esse método foi utilizado primeiramente para avaliação de citotoxicidade de materiais de

uso ortodôntico por PITHON *et al.* (15), onde se comparou com o método de difusão de ágar, onde ambos mostraram-se aptos para avaliação citotóxica.

Os resultados do presente trabalho demonstraram citotoxicidade das quatro marcas de alginatos estudadas (Jeltrate, Tropicalgin, Cavex Color change e Qualitygel). No entanto o grupo Cavex Color change apresentou maior viabilidade celular que os outros três. Resultado esse importante por causa da necessidade de se conseguir materiais com menor toxicidade. Diferenças estatísticas foram encontradas entre os grupos experimentais com os controles de célula (CC) e o negativo (C-).

O grupo C+, como esperado, foi o grupo o qual apresentou menor viabilidade celular. Esse grupo utilizou o Tween, que é um surfactante não iônico, tóxico para as membranas biológicas (16), constituído por ésteres de ácidos graxos de polioxietileno sorbitol, que tem como características estimular a secreção de proteínas em microrganismos (18), além de alterar a morfologia e a superfície da parede celular (7).


Por sua vez o grupo Controle negativo constituiu-se de uma solução de PBS (Phosphate-buffered saline), reconhecidamente não tóxica às células, esse controle visou avaliar apenas a ação física sobre as células. Esse demonstrou baixa citotoxicidade, com ausência estatística com o grupo controle de célula, o qual nenhuma substância foi colocado em contato com as células.

O tempo de avaliação foi de 2 minutos, tempo esse baseado no tempo máximo que o alginato fica em contato com a mucosa oral durante o processo de moldagem recomendado pelos fa-

bricantes. Os corpos de prova ficaram em contato com o meio de cultura por esse período, após isso foi coletado o sobrenadante do meio de cultura, que foi então colocado em contato com as células. Os corpos de prova não foram colocados diretamente com as células uma vez que o contato mecânico desses com as células poderiam lesar as mesmas como sugerido por COSTA *et al.* (5).

Diante dos resultados observados, deve-se considerar que o sucesso na clínica odontológica não envolve somente o domínio da técnica, mas também requer a aplicação das normas de biossegurança e a preocupação com as consequências locais e sistêmicas dos materiais dentários utilizados para tal.

## Conclusão

Pode-se concluir com a realização desse trabalho que: todos os alginatos avaliados mostraram potencial tóxico as células e o Cavex Color change demonstrou resultados mais favoráveis que os demais sob o ponto de vista da citotoxicidade. 

## Referências Bibliográficas

1. ALCAIDE, M., SERRANO, M. C., PAGANI, R. *et al.* L929 fibroblast and Saos-2 osteoblast response to hydroxyapatite-beta-TCP/agarose biomaterial. *J. Biomed. Mater. Res. A*, Apr., 2008.
2. ANUSAVICE, K. J. *Phillips, materiais dentários*. 11ª ed., Guanabara Koogan, 2005.
3. BRAGA, A. S., BRAGA, S. R. S., CATIRSE, A. B. C. E. B. *et al.* Potencial tóxico dos alginatos para uso odontológico. *Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.*, v. 28, n. 2, p. 153-8, 2007.
4. BRAGA, A. S., CATIRSE, A. B. C. E. B., Vaz, L. G. *et al.* Quantitative analysis of potentially toxic metals in alginates for dental use. *Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.*, v. 26, n. 2, p. 125-30, 2005.
5. COSTA, C. A., EDWARDS, C. A., HANKS, C. T. Cytotoxic effects of cleansing solutions recommended for chemical lavage of pulp exposures. *Am. J. Dent.*, v. 14, n. 1, Feb., p. 25-30, 2001.
6. DE FREITAS, J. F. Potential toxicants in alginate powders. *Aust. Dent. J.*, v. 25, n. 4, Aug., p. 224-8, 1980.
7. DOMINGUES, F. C., QUEIROZ, J. A., CABRAL, J. M. *et al.* The influence of culture conditions on mycelial structure and cellulase production by *Trichoderma reesei* Rut C-30. *Enzyme Microb. Technol.*, v. 26, n. 5-6, Mar., p. 394-401, 2000.
8. DONADIO, M., JIANG, J., SAFAVI, K. E. *et al.* Cytotoxicity evaluation of Activ GP and Resilon cones *in vitro*. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.*, v. 106, n. 1, Jul., p. 76-9, 2008.
9. ESTRELA, C. *Metodologia científica: ensino e pesquisa em odontologia*. São Paulo: Artes Médicas, 2005.
10. FEIZZADEH, B., AFSHARI, J. T., RAKHSHANDEH, H. *et al.* Cytotoxic effect of saffron stigma aqueous extract on human transitional cell carcinoma and mouse fibroblast. *Urol J.*, v. 5, n. 3, Summer, p. 161-7, 2008.
11. GRIFFON, G., MARCHAL, C., MERLIN, J. L. *et al.* Radiosensitivity of multicellular tumour spheroids obtained from human ovarian cancers. *Eur. J. Cancer*, v. 31A, n. 1, p. 85-91, 1995.
12. JIN, C. Y., ZHU, B. S., WANG, X. F. *et al.* Cytotoxicity of titanium dioxide nanoparticles in mouse fibroblast cells. *Chem. Res. Toxicol.*, v. 21, n. 9, Sep., p. 1871-7, 2008.
13. JORGE, J. H., GIAMPAOLO, E. T., PAVARINA, A. C. Cytotoxicity of the dental materials. A literature review. *Rev. Odontol. Unesp*, v. 33, n. 2, p. 65-8, 2004.
14. 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, Jul./Aug., p. 485-90, 1990.
15. PITHON, M. M., DOS SANTOS, R. L., DE OLIVEIRA, M. V. *et al.* Metallic brackets bonded with resin-reinforced glass ionomer cements under different enamel conditions. *Angle Orthod.*, v. 76, n. 4, Jul., p. 700-4, 2006.
16. REGE, B. D., KAO, J. P., POLLI, J. E. Effects of nonionic surfactants on membrane transporters in Caco-2 cell monolayers. *Eur. J. Pharm. Sci.*, v. 16, n. 4-5, Sep., p. 237-46, 2002.
17. SAMUEL, S. W., MIRANDA, L. A., DUTRA, C. A. V. Potencial Tóxico dos Alginatos. *R. Fac. Odontol. Porto Alegre*, v. 36, n. 2, p. 14-6, 1995.
18. STUTZENBERGER, F. J. Interference of the detergent Tween 80 in protein assays. *Anal Biochem.*, v. 207, n. 2, Dec., p. 249-54, 1992.
19. SYDISKIS, R. J., GERHARDT, D. E. Cytotoxicity of impression materials. *J. Prosthet. Dent.*, v. 69, n. 4, Apr., p. 431-5, 1993.

Recebido em: 09/02/2009

Aprovado em: 11/03/2009

Matheus Melo Pithon

Av. Otávio Santos, 395, sala 705, Centro Odontomédico Dr. Altamirando da Costa Lima - Recreio

Vitória da Conquista/Bahia, Brasil - CEP 45020-750

E-mail: matheuspithon@bol.com.br