MARÍLIA RODRIGUES MOREIRA

**LIBERAÇÃO DE BISFENOL A DE SISTEMAS ADESIVOS RESINOSOS
ORTODÔNTICOS POR MEIO DE CROMATOGRAFIA GASOSA
ESTUDO *IN VITRO* E *IN VIVO***

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de
Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para
obtenção do título de Doutor em Ciências.
Programa: Odontopediatria.
Área de Concentração: Odontopediatria.

ORIENTADORA: PROF^A. DR^A. MÍRIAN AIKO N. MATSUMOTO

Ribeirão Preto
2015

AUTORIZAÇÃO PARA REPRODUÇÃO

Autorizo a reprodução e/ou divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

Moreira, Marília Rodrigues

Liberação de Bisfenol A de Sistemas Adesivos Resinosos Ortodônticos por meio de Cromatografia Gasosa - Estudo *In vitro* e *In vivo*. Ribeirão Preto, 2015.

63p.: il.; 30cm

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto/USP.

Área de Concentração: Odontopediatria.

Orientadora: Matsumoto, Mirian Aiko Nakane

1. Disruptores endócrinos;
2. Ortodontia, Materiais dentários;
3. compósitos.

Moreira MR. Liberação de Bisfenol A de Sistemas Adesivos Resinosos Ortodônticos por meio de Cromatografia Gasosa - Estudo *In vitro* e *In vivo*.

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de
Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Doutor em Ciências. Área de
Concentração: Odontopediatria.

Data da defesa: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. _____

Julgamento _____ Assinatura _____

Prof. Dr. _____

Julgamento _____ Assinatura _____

Prof. Dr. _____

Julgamento _____ Assinatura _____

Prof. Dr. _____

Julgamento _____ Assinatura _____

Prof. Dr. _____

Julgamento _____ Assinatura _____

DADOS CURRICULARES

MARÍLIA RODRIGUES MOREIRA

Nascimento	19 de Agosto de 1974 – Araguari, Minas Gerais
Filiação	Edvaldo Moreira Maria Eleuza Rodrigues Moreira
1993 – 1997	Curso de Graduação em Odontologia Universidade Federal de Uberlândia
2004 – 2006	Curso de Pós-Graduação (Mestrado) em Odontologia Universidade Federal de Uberlândia
2012 – 2015	Curso de Pós-Graduação (Doutorado) em Odontologia Área de concentração: Odontopediatria Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto - USP

DEDICO ESTE TRABALHO,

*A Deus, ao meu pai Edvaldo aos meus irmãos
Rafael, Ana e Fernanda, ao meu filho João
Victor, e ao meu namorado Leonardo, que
juntos aos meus sobrinhos, são as razões da
minha vida.*

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

A minha vontade de ensinar antecedeu a vontade de ser dentista. Na verdade eu nunca quis ser dentista, e sim Odontopediatra. Já entrei na faculdade com esse objetivo. Esperei ansiosamente até chegar a essa disciplina. Demorou, mas chegou. E a espera valeu a pena. A partir dali eu tinha meus modelos de vida e de profissão, e aqueles docentes foram capazes de me encantar e me inspirar para sempre. Aproveitei cada segundo, na graduação e especialização. Literalmente “colei” neles e até hoje os tenho como exemplos!! Fica aqui registrado meu agradecimento a cada um deles que fizeram parte da minha vida acadêmica e profissional: **Profª. Dra. Myrian Stella de Paiva Novaes; Profª. Dra. Fátima Ioko Mochidome; Profª. Ms Rosymeire Lustoza Vanderlei; Profª. Dra. Fabiana Sodré de Oliveira; Profª. Lúcia Sodré de Oliveira e Prof. Luiz Mário Guimarães Gonçalves.**

Além dos meus exemplos locais, a vida se encarregou de me agregar outras inspirações, muitas dos livros, e outras do mundo real, com possibilidade de interação. O **Prof. Dr. Paulo Nelson Filho** é um dos mestres brilhantes que cercaram-me. E então eu agreguei mais exemplos a serem seguidos! Assim como a **Profª. Dra. Alexandra Mussolino Queiroz**. Eu me sinto muito honrada em ter convivido com vocês!!! Realizei um sonho!!

Em meio ao inesperado, a vida me apresentou mais um de meus exemplos, a **Profª. Dra. Miriam Aiko Nakane Matsumoto**. Fiquei apavorada com a sensação de não poder oferecer o quanto ela merecia. Mas estive certa, o tempo todo, de que fui presenteada por DEUS por essa convivência. Eu aprendi tanto!! Aprendi de ortodontia, de docência, de competência, profissionalismo, humildade e, principalmente, de doçura. Eu não tenho palavras para agradecer esse presente. Sou outra pessoa após essa temporada na “ortodontia”. Hoje sou uma profissional mais completa e consigo ver meu paciente de forma mais integralizada, sem dissociar nenhuma informação importante. Que exemplo eu agreguei pra minha vida!!!!

Em meio ao desespero e à uma ciência que seria essencial no meu trabalho, a química, fui bater de porta em porta para conseguir alguém que pudesse me ajudar. DEUS mais uma vez abriu uma porta, mágica, maravilhosa, de gente do bem. Doce, simpática, atenciosa e competente ao extremo, chegou na minha vida a **Profª. Dra. Maria Eugênia Costa Queiroz**. Professora,

torcerei eternamente pelo seu sucesso e de sua equipe! Vocês merecem! Fazem pesquisas incansáveis, trabalham sem hora pra terminar e estão sempre dispostos a acolher pessoas, de uma forma, com uma bondade, que eu espero poder fazer um dia...

É assim, a mestre que quero ser! Uma união de todos os meus exemplos! Desejo a graça de, se possível, ser ao menos um pouquinho do que cada um deles é! Quem sabe assim, terei a oportunidade de fazer a diferença na vida dos meus alunos.

Meus professores exemplos, presenteio vocês com o melhor presente que posso dar... minhas orações. Que Deus abençoe vocês imensamente!

Obrigada! Por tudo! Sempre!

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, que sonhou com este momento muito antes de mim. Obrigada pelo dom da vida e pelas pessoas maravilhosas que fazem parte dessa jornada comigo.

Ao meu amado pai, **Edvaldo**, que foi minha fortaleza nesses anos e em toda minha vida!! Minha mãe, **Maria Eleuza**, me acompanhou de longe...lá do céu! E eu senti a sua proteção!! Vocês são os meus primeiros exemplos! Mais uma etapa na minha vida está sendo concluída, mais um sonho realizado, graças a vocês.

Aos meus irmãos, **Ana, Rafael e Fernanda**, por estarem ao meu lado em todos os momentos. Cada um se desdobrou em me ajudar! A minha jornada sem vocês não teria o mínimo sentido!

Ao meu eterno bebezinho, **João Vítor Aguiar Moreira**, razão da minha vida. Obrigada por me apoiar em todos os momentos, por ser companheiro e aguentar todas as limitações que tivemos nesses anos.

Ao meu grande amor **Leonardo Gontijo Matos**, obrigada por toda ajuda (essencial) na execução desse trabalho, apoio constante e por todo amor. Só o amor é paciente, motivador, carinhoso, compreensivo. Você foi meu melhor presente desse doutorado! Te admiro tanto! Como pessoa e como profissional competente, habilidoso e criterioso! Meus dias foram mais coloridos com você por perto! Te quero para toda vida!!!

Não tenho palavras para agradecer a valiosa ajuda dos alunos de mestrado, da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras da USP, **Israel Donizeti de Souza e Tamires Amabile Valim Brigante**. Vocês são, na minha concepção, o que podemos chamar de “anjos” (pessoas do bem, dispostas, competentes e envolvidos com o projeto de outras pessoas). Sem vocês nada disso teria sido possível. Vocês têm a minha admiração e torcida eterna!

Aos meus amigos do coração (Zelma Lopes, Juliana Faquin, William Júnior, Mirna Scalon e Ana Carla Cassiano) que me toleraram em meio a tantas angústias, sem poder sair, sem poder gastar e entenderam a minha ausência em tantas coisas. Agradeço imensamente por todas as orações, palavras de apoio e por se fazerem sempre tão presentes na distância.

Um agradecimento especial à amiga **Profª. Dra. Letícia de Souza Castro Filice** da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Uberlândia, pela ajuda com a parte da análise estatística.

A USP me deu muitos presentes. Além dos já mencionados, ganhei uma família pra lá de especial. Moramos juntas e dividimos muitas alegrias, tristezas, desafios, conselhos e lições maravilhosas de vida!! Como eu aprendi!!! Com cada uma!!! Me sinto muito honrada em ter vocês na minha vida. Pessoas do bem, da categoria "anjos". **Daniela Barroso, Mariele Zilo e Aline**, obrigada por terem dividido suas vidas comigo! Junto com a **Fernanda Ribeiro e a Késsia Mesquita**, vocês sempre serão a minha família de RP.

Gabriela Cristina Santin, não há uma só pessoa importante em minha vida que não tenha ouvido falar de você!!! A alegria em pessoa, em qualquer circunstância!! Por eu ser assim também, me identifiquei totalmente!!! Mas, além disso, sua competência, sua disponibilidade em ajudar as pessoas, e seu coração enorme, me fazem ter muito orgulho em ser sua "irmã" de RP. Não tenho palavras pra agradecer tudo o que você fez por mim!!!

Aos professores do Departamento de Clínica Infantil, da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, **Profª. Dra. Sada Assed (*in memoriam*)**, **Profª. Dra. Léa Assed Bezerra da Silva**, **Profª. Dra. Aldevina Campos de Freitas**, **Prof. Dr. Paulo Nelson Filho**, **Profª. Dra. Alexandra Mussolino de Queiroz**, **Profª. Dra. Raquel Assed Bezerra Segato**, **Profª. Dra. Kranya Victória Dias Serrano**, **Profª. Dra. Maria Cristina Borsatto**, **Profª. Dra. Mirian Aiko Nakane Matsumoto**, **Prof. José Tarcísio Lima Ferreira**, **Prof. Dr. Adílson Thomazinho**, **Profª. Dra. Bernadete Sasso Stuaní**, **Profª. Dra. Maria Conceição Pereira Saraiva**, **Prof. Dr. Fábio Lourenço Romano**, **Profª. Dra. Andiará de Rossi** e **Prof. Dr. Fabrício Kitazono de Carvalho**.

Aos funcionários do Departamento de Clínica Infantil, da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, **Micheli Cristina Leite Rovanholo**, **Filomena Leli Placciti**, **Francisco Wanderley Garcia de Paula e Silva**, **Carolia Paes Torres Mantovani**, **Marco Antonio dos Santos**, **Nilza Letícia Magalhães**, **Fátima Aparecida Rizoli**, **Fátima Aparecida Jacinto Daniel**, **Renata Aparecida Fernandes e Matheus Morelli Zanela**, além de **Benedita Viana Rodrigues** da Clínica de Pacientes Especiais, e a **Rosemary Alves**, secretária da Ortodontia, pela ajuda, paciência e dedicação.

Aos pós-graduandos do Programa de Pós-Graduação em Odontopediatria da FORP-USP, pelo companheirismo constante e convivência agradável.

Às funcionárias da Seção de Pós-graduação da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo **Isabel Cristina Galino Sola**, **Regiane Cristina Moi Sacilloto e Mari Possani Carmessano** pela atenção e por estarem sempre à disposição.

À Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, na pessoa do atual diretor **Prof. Dr. Valdemar Mallet da Rocha Barros** e da vice-diretora **Profa. Dra. Léa Assed Bezerra da Silva**.

À coordenação do Curso de Pós-Graduação em Odontopediatria da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, na pessoa da Coordenadora **Profa. Dra. Léa Assed Bezerra da Silva** e da vice-coordenadora **Profa. Dra. Raquel Assed Bezerra Segato**.

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), pelo suporte financeiro através da bolsa concedida.

E por fim, agradeço à **Odontologia**. Ciência pela qual sou apaixonada e à qual dedicarei os próximos anos de minha vida. Obrigada pelos sorrisos, expressão mais sincera da humanidade.

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

1 INTRODUÇÃO	14
2 PROPOSIÇÃO	21
3 MATERIAL E MÉTODO	23
3.1 Padrões analíticos e reagentes	24
3.2 Preparo de amostra	24
3.3 Liberação de Bisfenol A <i>in vitro</i>	25
3.4 Liberação de Bisfenol <i>in vivo</i>	26
3.4.1 Seleção da Amostra	27
3.4.2 Coleta das Amostras	27
3.4.3 Análise da Urina	28
3.4.4 Análise da Saliva	29
3.5 Condições cromatográficas	29
4. RESULTADOS	32
5. DISCUSSÃO	38
6. CONCLUSÃO	48
6.1. No estudo <i>in vitro</i>	49
6.2. No estudo <i>in vivo</i>	49
REFERÊNCIAS	50
ANEXOS	59

Moreira MR. **Liberação de Bisfenol A de sistemas adesivos resinosos ortodônticos por meio de cromatografia gasosa- Estudo *in vitro* e *in vivo*.** [tese]. Ribeirão Preto: FORP-USP, 2015.

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar a liberação de Bisfenol A (BPA) de sistemas adesivos resinosos ortodônticos *in vitro* e *in vivo*. No estudo *in vitro* foram testadas 5 marcas comerciais de sistemas adesivos resinosos ortodônticos (Eagle Spectrum, Enlight, Light Bond, Mono Lok II e Transbond XT). Por meio da simulação de exposição intraoral, os corpos de prova foram imersos numa solução água/etanol e a liberação de BPA foi medida nos tempos de 30 minutos, 24 horas, 1 dia, 1 semana e 1 mês. No estudo *in vivo* utilizou-se amostra composta por 20 pacientes com indicação para tratamento ortodôntico com aparelhos fixos. Foram coletadas amostras de saliva em 5 tempos: antes, 30 minutos, 24 horas, 1 dia, 1 semana e 1 mês após a colagem dos bráquetes e as de urina em 4 tempos: antes, 1 dia, 1 semana e 1 mês após a colagem. Todos os compósitos avaliados liberaram pequena quantidade de BPA, sendo que o compósito Enlight-ORMCO^R foi o que apresentou maior liberação, 1020 ng/g no tempo de 1 mês. Os maiores níveis de BPA na saliva, foram encontrados no tempo de 30 minutos (1,0445 ng/mL) e na urina, 24 horas (5,035 ng/mL) após a colagem dos bráquetes. Mesmo que as quantidades de BPA liberadas fossem pequenas, houve diferença significativa quando esses valores foram comparados com os níveis iniciais, sugerindo aumento da quantidade de BPA no organismo com a colagem dos bráquetes ortodônticos. Como a literatura especializada têm destacado os potenciais tóxicos do BPA e têm sugerido alterações celulares com “baixas doses”, mais estudos são necessários para se chegar a um consenso no sentido de propiciar segurança no uso desses materiais.

Palavras-chave: Disruptores endócrinos, Ortodontia, Materiais dentários, Compósitos.

Moreira MR. **Release of bisphenol A resinous orthodontic adhesives by gas chromatography. *In vitro* and *In vivo* study.** [tese]. Ribeirão Preto: FORP-USP, 2015.

ABSTRACT

The purpose of this study was measure the release of Bisphenol A (BPA) from the orthodontic resinous adhesive systems *in vitro* and *in vivo*. The study was divided into two stages: At *in vitro* study, five trademarks of Resinous Adhesive Systems (Eagle Spectrum, Enlight, Light Bond, Mono Lok II and Transbond XT) was tested. The samples were immersed in a water/ethanol solution simulating the intraoral exposition and the release of BPA was measured at times of 30 minutes, 24 hours, 1 day, 1 week and 1 month. At *in vivo* study, 20 patients with indication to fixed orthodontic appliances were used. Samples of saliva and urine were collected in these patients at previously determined time. To the saliva, it was collected 5 times (before bonding the orthodontic brackets and 30 minutes, 24 hours, 1 day, 1 week and 1 month after this procedure); to the urine, it was collected 4 times (before, 1 day, 1 week, 1 month, after bonding the orthodontic brackets). All the tested resinous adhesives released a small quantity of BPA, with peak at 1 month, with Enlight resinous presenting the highest level (1020 ng/g). The peak level in saliva (130445 ng/ml) and urine (5.035 ng/ml) were found in 30 minutes and 24 hours after the bonding of fixed appliances, respectively. However the quantities of released BPA are small which validate the security of the procedure., A significant difference was observed when these values were compared to the initial levels, suggesting a correlation of the increase of the quantity of BPA in the body and the bonding of the orthodontic appliances. As several studies have reported, the probable toxic effect of BPA and cellular changes in "low doses", more studies are necessary to reach a consensus. to provide security in the use of such materials.

Key-words: Endocrine disruptors, Orthodontics dental materials, Composite Resin.

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

Durante o tratamento ortodôntico com aparelhos fixos, a etapa de colagem dos bráquetes é de grande importância para o resultado final, uma vez que dela depende o movimento dentário desejado (Carvalho et al., 2013; Froes-Salgad e Francci, 2009). Os avanços na Odontologia permitiram a implantação de diversas modificações na colagem ortodôntica. Inicialmente, todos os dentes eram bandados e os acessórios soldados diretamente nesses dispositivos. Posteriormente, os bráquetes metálicos eram colados apenas com materiais resinosos quimicamente ativados, também chamados de autopolimerizáveis (Anusavice, 2005). Com o advento da fotopolimerização, materiais fotoativados passaram a ser utilizados para a colagem de bráquetes. O desenvolvimento odontológico tem impulsionado inúmeras pesquisas com o intuito de analisar diferentes materiais adesivos que possam ser utilizados na fixação de bráquetes ortodônticos ao esmalte dentário. Além disso, é de fundamental importância que o material apresente uma união efetiva à superfície dentária, resistindo às forças mastigatórias e ortodônticas constantemente aplicadas. No entanto, é necessário que seja de fácil remoção, sem causar danos ao esmalte (Carvalho et al., 2013; Zanini et al., 1997).

Vários foram os avanços que contribuíram para o aperfeiçoamento da técnica de colagem de acessórios ortodônticos, como a introdução do condicionamento ácido do esmalte por Buonocore em 1955, e sua associação com compósitos à base de Bisfenol A glicidil metacrilato (Bis-GMA). Esses fatores fizeram com que a técnica de colagem direta no esmalte dentário passasse a ser o método de escolha para a instalação do aparelho ortodôntico (Anand et al. 2014, Graf e Jacobi 2000; Ianni Filho et al., 2004). O Bis-GMA é o principal monômero

utilizado nos adesivos e compósitos ortodônticos (Papakonstantinou et al. 2013; Floyd e Dickens 2006), sendo o Bisfenol A o principal componente desse monômero.

O Bisfenol A (2,2'-bis[4-hidroxifenil]propano), também conhecido como BPA, é uma substância química sintética que se apresenta como um sólido branco em temperatura ambiente, solúvel em solventes orgânicos e insolúvel em água. Tem sido muito utilizada para produção de resina epóxica e plásticos policarbonatados, sendo empregado na fabricação de vários produtos, incluindo garrafas, embalagens de alimentos, mamadeiras, brinquedos, detergentes, pesticidas, automóveis e materiais odontológicos resinosos, como compósitos e selantes de fossas e fissuras (Kotyk e Wiltshire, 2013; Kloukos et al. 2013 a). Mais de 2 milhões de toneladas dessa substância são produzidas por ano. (Fleisch 2010; Chen e Suh, 2013; Kotyk e Wiltshire, 2013) Devido ao aumento no número de produtos à base de resinas epóxicas e plásticos policarbonatados, a exposição humana ao Bisfenol A tem aumentado rapidamente (Sobolewski et al. 2014; Kang et al., 2006; Lang et al., 2008).

A matriz resinosa fluida contendo monômero é polimerizada e convertida em um polímero rígido por meio de reação química ou fotopolimerização. O Bisfenol A não polimerizado pode ser liberado do selante ou do compósito, por meio do desgaste promovido pela mastigação ou degradado quimicamente ou mecanicamente, sendo absorvido sistemicamente pelo paciente. Pode ser encontrado no sangue, urina (2.6 ng/ml), leite materno (1,3 ng/ml) e em outros órgãos e tecidos humanos (Lakind 2008, Völkel et al., 2002; Joskow et al., 2006; Kang et al., 2006; Azarpazhooh e Main, 2008). Estudos mais recentes mostraram que a difusão sistêmica de substâncias liberadas pelos materiais resinosos acontece

por três vias principais: inalação de partículas voláteis, ingestão de compostos pelo trato gastro-intestinal e difusão para polpa através da dentina (Kloukos et al. 2013 b).

O Bisfenol A tem sido extensivamente estudado por ser um dos mais comuns disruptores endócrinos ambientais, com potencial de atuar no organismo como um desregulador endócrino, modificando todo o sistema hormonal (Okada 2008; Von Saal e Hugues 2005; Gao et al, 2015). A ação estrogênica dos polímeros acontece devido a uma ligação competitiva das moléculas poliméricas semelhantes ao estrógeno, tal como o Bisfenol A, aos receptores hormonais naturais (Sobolewski et al., 2014). A exposição do organismo a essa substância química sintética pode resultar em alguns efeitos adversos, principalmente por sua ação estrogênica e pelo seu potencial tóxico agudo para os organismos aquáticos. O meio ambiente, por meio da água, do ar e do solo, pode ser uma fonte de exposição ao Bisfenol A, porém, a fonte primária de exposição humana são os alimentos. Seu consumo humano diário é menor que 1 µg/kg, o que pode levar a efeitos destrutivos adversos no sistema endócrino, especialmente no desenvolvimento fetal (Frye et al., 2012; Diamanti-Kandarakis et al., 2009; Kang et al., 2006). Além disso, pode ocasionar inúmeros fenômenos biológicos, podendo induzir alterações celulares mesmo em níveis muito baixos.

Em estudos com animais, observou-se que está associado a diversos mecanismos e processos fisiológicos, dentre os quais a puberdade precoce em fêmeas e a feminilização em machos (Cummings et al., 2013 ;Timms et al., 2005), alto risco de causar o câncer de mama(Soto, 2010), e o de próstata (Sasco, 2001, Ho et al. 2006; Prins et al. 2008), redução da quantidade de espermatozóides em adultos (Vom Saal e Hugues, 2005), abortos espontâneos (Sugiura-Ogasawara et al., 2005), infertilidade (Toyama et al., 2004), indução do influxo de cálcio, o qual

leva à liberação de prolactina (Palanza et al., 2002), desenvolvimento de hiperglicemia, tolerância à insulina e diabetes (Moriyama et al., 2002), ovários policísticos (Akin et al., 2014), doença cardiovascular (Lang et al., 2008), concentração anormal de enzimas do fígado (Bindhumol et al., 2003; Lang et al., 2008), interrupção da função das células β -pancreáticas (Roper et al., 2008), disfunção na produção do hormônio da tireóide (Moriyama et al., 2002), elevação de oxigênio reativo (Ooe et al., 2005) implicadas no mecanismo de estresse oxidativo e alterações comportamentais em crianças (Quesada et al., 2002; Wolstenholme et al., 2011), efeito sobre obesidade (Delfosse et al., 2012; Nadal, 2013), sistema reprodutivo e sexual (Li et al., 2010; Soto e Sonnenschein, 2010), desenvolvimento fetal e infantil (Shelby, 2008), sistema dopamino sinérgico (Jones e Miller, 2008; De Coster e Larebeke, 2012).

Pesquisas sobre os efeitos da exposição precoce de fetos e crianças ao BPA têm evidenciado que as células e tecidos estão especialmente susceptíveis às alterações hormonais, na criança em fase de desenvolvimento, afetando o funcionamento da placenta durante a gestação e causando problemas no feto em formação no útero (Le et al., 2008). Esta substância também pode ser o fator de amadurecimento sexual precoce (Howdeshell et al., 1999), assim como a exposição pré-natal de crianças pode ser associada com hiperatividade, ansiedade e depressão durante a infância (Braun et al., 2012).

Embora a “United States Environmental Protection Agency’s (EPA)” e a Autoridade Europeia de Segurança Alimentar recomendem uma dose máxima de 50 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$, estudos em animais indicam que exposição a baixas doses (0,025-2,5 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{dia}$) podem, após um certo tempo, provocar efeitos adversos sobre a reprodução, carcinogênese e outros efeitos (Munoz-de-toro et al., 2005). Sobolewski

et al., (2014), observaram proliferação de glândulas mamárias em macacos e alterações comportamentais em roedores, com doses de 40 ug|kd|dia. Wozniak et al., (2005) observaram, que níveis de BPA de 0,23 partes por trilhão, podem provocar alterações em nível celular.

Surpreendentemente, estudos recentes utilizando avançada tecnologia têm evidenciado que até mesmo níveis muito pequenos de BPA podem ser prejudiciais (Melzer et al., 2011). Estudos moleculares revelaram inúmeras vias pelas quais o BPA estimula a resposta celular às mais baixas doses (Hugo et al., 2008). Wozniak et al. (2005), afirmaram que doses menores e regulares podem ser mais prejudiciais do que doses elevadas. VomSaal e Hugues (2008) propuseram uma nova avaliação do risco para o BPA com base nos seus estudos, onde foi observado que num nível bem abaixo ao de 50 ug aconteciam mudanças nas funções biológicas de células cultivadas e mesmo em organismos vivos. Esses autores insistem que há um “efeito por baixa dose” associado ao BPA.

Apesar de inúmeros trabalhos da área médica enfatizarem os efeitos adversos do uso de materiais que liberam BPA no organismo (Sobolewski et al. 2014; Hines EP et al. 2014, De Coster and van Larebeke, 2012; Rubin et al., 2001; Takai et al., 2001; Al-Hiyasat e Darmani, 2006; Della Seta et al., 2006; Lang et al., 2008), poucos estudos têm sido realizados, na Odontologia, a esse respeito. Em detrimento da grande aceitação e difusão do uso de materiais resinosos na atualidade, alguns autores avaliaram a presença de Bisfenol A na saliva, na urina e no sangue de pacientes, após a aplicação desses materiais na cavidade bucal (Kloukos et al., 2013; Han et al., 2012; Kingman et al., 2012; Eramo et al., 2010; Völkel et al., 2005; Joskow ET al., 2006; Michelsen et al., 2012; Tarumi et al., 2000; Fung et al., 2000). Esses autores salientaram que, embora o Bisfenol A seja conjugado e excretado rápida e eficientemente pelo organismo humano, e a quantidade dessa substância presente nos selantes resulte em baixos níveis de

exposição, a dose mínima necessária para produzir efeitos adversos no ser humano ainda não foi definitivamente estabelecida. Outro fator preocupante, é que as pesquisas têm mostrado efeitos prejudiciais em animais, com quantidades muito pequenas de exposição a essa substância química. (Sobolewski et al. 2014; Goldberg et al. 2014; Chen e Suh, 2013; Gioiosa et al., 2013)

Entretanto, as discussões quanto à necessidade de proibir o uso de BPA na produção de materiais ainda são contraditórias. Quitmeyer e Roberts (2007) expõem e discutem o impacto que as grandes empresas e todos aqueles com interesse na produção e uso de BPA exercem sobre os órgãos fiscalizadores. As pesquisas realizadas por cientistas independentes, que mostram os malefícios da exposição humana ao BPA, são questionadas por aqueles que trabalham para a indústria e tem interesse em manter o uso de BPA na produção de plásticos.

Kloukos et al., (2013) fizeram uma revisão sistemática com a finalidade de investigar a liberação de Bisfenol A por sistemas adesivos resinosos e bráquetes de policarbonato e constataram poucos estudos *in vivo* nesta área. Além disso, consideraram impossível fazer uma comparação quantitativa entre os estudos em função da variedade das condições experimentais.

Considerando todos os aspectos acima relacionados e em função da necessidade de maior conhecimento sobre o mecanismo de ação e efeitos adversos dessa substância química no organismo humano, recomenda-se mais pesquisas sobre o assunto, sobretudo relacionadas à Odontologia.

*P*ROPOSIÇÃO

2. PROPOSIÇÃO

Pelo exposto, os objetivos do presente estudo foram determinar por meio de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas, a quantidade de BPA liberada:

- 2.1 por 5 sistemas adesivos resinosos ortodônticos, após um processo de envelhecimento artificial do material (Estudo *in vitro*);
- 2.2 na saliva e urina de pacientes, antes e após a colagem de bráquetes ortodônticos. (Estudo *in vivo*).

MATERIAL E MÉTODO

3. MATERIAL E MÉTODO

3.1. Padrões analíticos e reagentes

Para os procedimentos laboratoriais foram utilizados os padrões analíticos Bisfenol A (BPA), Bisfenol-d16 (BPA-d16; padrão interno, PI), reagente derivatizante N-O-Bis-(trimetilsilil)-trifluoroacetamida com 1% de trimetilclorosilano (BSTFA + TMCS), enzima glicuronidase (β -glicuronidase tipo H-2 de *Helix pomatia*, ≥ 85000 unidades.mL⁻¹ para a glicuronidase e ≥ 7500 unidades.mL⁻¹ para a sulfatase), metanol e éter metil-terc-butílico (MTBE) que foram adquiridos de Sigma-Aldrich (São Paulo, SP, Brasil). Etanol, ácido acético e acetato de sódio foram fornecidos pela J.T Baker (Phillipsburg, NJ, USA), e o ácido ascórbico foi adquirido da Synth (São Paulo, Brasil). A água utilizada para o preparo das soluções foi purificada pelo sistema Milli-Q, Millipore (São Paulo, Brasil).

As soluções estoque de BPA e BPA-d16, preparadas em metanol na concentração de 1 μ g.mL⁻¹, foram armazenadas em freezer e utilizadas no preparo das soluções padrão diluídas.

Foram utilizados frascos de vidro em todas as etapas de coleta e preparo das amostras.

3.2. Preparo de amostra

As análises de Bisfenol A foram realizadas pelo Laboratório de Cromatografia do Departamento de Química da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, sob responsabilidade da Prof. Dra. Maria Eugênia Queiroz Nassur. As quantificações de BPA nas diferentes matrizes (resina, adesivo, urina e saliva) foram realizadas de acordo com a legislação de validação analítica da Agência Nacional de Vigilância Sanitária

(ANVISA) - RESOLUÇÃO RDC Nº 27, DE 17 de maio de 2012. Foi construída uma curva analítica, em seis concentrações diferentes, para cada matriz estudada. Cada ponto da curva foi determinado em quintuplicata, enquanto que, as amostras foram determinadas em triplicata.

3.3. Liberação de Bisfenol A *in vitro*

Foi avaliada a liberação de Bisfenol A de 5 compósitos ortodônticos e seus respectivos adesivos que são comumente utilizados para colagem de bráquetes ortodônticos (Tabela 1):

- MonoLok II Light Activated Bonding System: Rocky Mountain Orthodontics, USA
- Eagle Spectrum: American Orthodontics, Sheboygan, USA
- Transbond XT: 3M Unitek, Monrovia, CA, USA
- Enlight:Ormco Corp, Orange, Calif, USA
- Light Bond: Reliance Orthodontic, Linois, USA

Tabela 1. Especificações dos sistemas adesivos resinosos avaliados no estudo *in vitro*.

	Transbond XT	Monolok ²	Light Bond	Eagle	Enlight
Composição	Sílica Bis-GMA Silano N- dimetilbenzocaína Hexa-fluor-fosfato	Compósito baseado no Bis- GMA com pequenas partículas de vidro e um fotosensível sistema de catalização	Fused Silica Urethane Dimethacrylate Triethyleneglyco l Dimethacrylate		Uncured Methacrylate Ester Monomers Sílica Ativadores Conservadores
Composição Adesivo	Trietilenoglicol- dimetracrilato Bis-GMA	Resina fluida à base de Bis-GMA e um fotosensível sistema de catalização	Biphenyl Dimethacrylate Hydroxyethyl methacrylate Acetone		Alcool etílico Dimethacrylate Resins Barium Aluminoborosilica te Glass Fumed Sílica (Silicon Dioxide) Sodium Hexafluorosilicate
Fabricante	3M Unitek ^R	Rocky Mountain ^R	Reliance ^R	American Orthodontics ^R	Ormco ^R
Lote	1323200750	K2601-1	131812	B 41282	4571779

Para este estudo, foram confeccionados corpos de prova para cada compósito estudado, seguindo as instruções do fabricante. Os diferentes materiais foram introduzidos em matrizes de teflon com dimensões de 3mm de altura por 5mm de diâmetro, construídas na Oficina de Precisão do Campus da USP de Ribeirão Preto e polimerizados de acordo com as especificações dos fabricantes. Foram confeccionados 4 corpos de prova para cada material testado.

Os corpos de prova foram pesados individualmente, em balança eletrônica de precisão (BG 4000-Gehaka Ltda, São Paulo, Brasil) e submersos, em diferentes frascos, com 4 mL de uma solução etanol/água (75:25 v/v) e mantidos a 37 °C. Alíquotas de 1 mL das soluções, que continham os corpos de prova, foram coletadas 30 minutos, 24 horas, 1 semana e 1 mês após a imersão dos corpos de prova na referida solução. No caso dos adesivos pipetou-se alíquotas de 100 µL da solução alcoólica e após a adição de 20 µL do padrão interno (BPA-d16, 1 µg mL⁻¹), as soluções foram secas sob sistema de vácuo a 45 °C. Em seguida, a amostra foi derivatizada.

O procedimento de derivatização consistiu na adição de 50 µL do reagente BSTFA + TMCS ao resíduo seco, 30s de agitação em vortex e permanência por 30 min. em banho termostatizado a 37 °C. Posteriormente, 1 µL da solução derivatizada foi injetada no sistema cromatográfico.

3.4. Liberação de Bisfenol *in vivo*

Após a aprovação do projeto pelo Comitê de Ética em Pesquisa envolvendo Seres Humanos, da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (CAAE: 348059.9.0000.5419 -ANEXO A), foi obtido o consentimento livre e esclarecido dos pacientes ou responsáveis por cada indivíduo

participante da pesquisa (ANEXO B). Após anamnese e exame clínico, os pacientes selecionados deveriam apresentar boa saúde geral e não ter feito restaurações em resinas compostas e/ou selantes nos últimos três meses. Além disso, foram excluídos os indivíduos fumantes e que exercessem ocupações que poderiam estar ligadas à exposição ao Bisfenol A.

3.4.1. Seleção da Amostra

Foram selecionados 20 pacientes de 12 a 25 anos de idade (média de 12,3 anos), de ambos os gêneros, sendo 14 do sexo masculino e 6 do sexo feminino, com dentição permanente completa, sem cárie e/ou doença periodontal prévia, não fumantes e que iriam iniciar tratamento com aparelho ortodôntico fixo na Clínica de Especialização de Ortodontia da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto-USP.

3.4.2. Coleta das Amostras

Antes da colagem dos bráquetes ortodônticos, foi coletado 5 mL de urina e 1 mL de saliva não estimulada, em tubos de vidro, para análise da quantidade de Bisfenol A pré-existente.

Os 20 pacientes selecionados receberam aparelhos ortodônticos compostos de bráquetes metálicos convencionais (ABZIL, Sorocaba, SP, BR), que foram colados em 20 dentes, 10 superiores e 10 inferiores. Todos os bráquetes foram colados com adesivo ortodôntico fotopolimerizável (Sistema Transbond XT; 3M Unitek, Monrovia, CA, USA), seguindo as instruções do fabricante. Antes da colagem, procedeu-se à profilaxia dos dentes utilizando taça de borracha e pasta profilática com pedra pomes e água. O condicionamento do esmalte foi efetuado

com ácido fosfórico a 37 % por 15 segundos.(Dentsply, Petrópolis, RJ, Brasil) e após a lavagem do mesmo, foi aplicado o adesivo do sistema Transbond XT, seguido de fotopolimerização. Na sequência, foi feita a colagem dos bráquetes e fotopolimerização por 40 segundos por meio de aparelho fotopolimerizador XL 3000 (DMC, Plantation, FL, USA) com potência de $450\text{mW}/\text{cm}^2$.

Trinta minutos após a colagem dos bráquetes ortodônticos, todos os pacientes foram encaminhados para nova coleta de 1 mL de saliva não estimulada, em tubos de vidro.

Vinte e quatro horas, 1 semana e 1 mês após a colagem dos bráquetes foram efetuadas novas coletas de 1 mL de saliva não estimulada e de 5 mL de urina, sempre em tubos de vidro.

3.4.3. Análise da Urina

Após a ingestão oral do Bisfenol A, o mesmo é absorvido pelo sistema gastrointestinal e sofre uma primeira passagem pelo fígado e parede intestinal. Essa primeira passagem biotransforma o BPA em BPA-glicuronídeo ou BPA sulfato (Dekant e Volkel, 2008). Com o objetivo de liberar o Bisfenol da sua forma conjugada (BPA-glicuronídeo e BPA-sulfato) e monitorar a concentração total de BPA, as amostras de urina foram submetidas a tratamento enzimático (Kim et al., 2003; Liu et al., 2005; Ouchi et al., 2002). Este tratamento consistiu na mistura de 1,00 mL de urina com 1 mL de tampão acetato de sódio ($0,1\text{ mol.L}^{-1}$, pH 5 contendo 0,1% m/v de ácido ascórbico) e 20 μL da solução diluída da enzima (em solução salina NaCl 0,2% (m/v) gelada recém preparada; 10000 unidades. mL^{-1} para a glicuronidase e 937 unidades. mL^{-1} para a sulfatase). A mistura foi mantida a 37°C por 4 horas. Ao final deste período, adicionou-se 20 μL de PI ($1\text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$) e iniciou-se

a extração líquido-líquido, técnica esta já bem estabelecida pela literatura (Kang et al., 2011; Kim et al., 2014). A extração foi realizada com duas alíquotas de 1 mL de MTBE seguido de vortex por 30s e centrifugação (5000 rpm, 15 °C por 5 min.). O sobrenadante foi coletado e seco sob vácuo. Em seguida, o resíduo foi derivatizado conforme procedimento citado no item 3.2.

3.4.4. Análise da Saliva

As amostras de saliva foram tratadas de maneira similar às amostras de urina, com exceção ao tratamento enzimático, que não foi necessário neste caso. Adicionou-se 40 µL de PI a 1 mL de saliva e realizou-se o procedimento de extração líquido-líquido e derivatização conforme procedimento citado no item 3.4.3.

3.5. Condições cromatográficas

As análises de Bisfenol foram realizadas num sistema de cromatografia gasosa (Shimadzu; 2010) acoplado ao espectrômetro de massas (QP 2010 Plus, Shimadzu). Para as separações cromatográficas foi utilizada a coluna analítica NST-05MS (5% fenildimetilpolissiloxano; 30m x 0,25mm x 0,25µm). A temperatura da coluna foi mantida a 180 °C por 3 min.. Em seguida foi aumentada constantemente (20 °C/min) até 240 °C e mantida nesta temperatura por 4 min.; posteriormente, aumentou-se até 300 °C e mantida por 2 min. As temperaturas do injetor, fonte de íons e interface foram setadas em 280 °C, 230 °C e 250 °C, respectivamente. O tempo de corte do solvente foi de 3 min. O volume de injeção da amostra foi de 1 µL (modo split 1:3). Utilizou-se Helio como gás de arraste a um fluxo de 1 mL/min. e ionização por impacto eletrônico (70 eV).

Os dados foram adquiridos no modo SIM, no qual se utilizou um fragmento para a quantificação e outro fragmento para confirmação, tanto para o analito, quanto para o PI, conforme reportado na Tabela 2.

Tabela 2. Fragmentos utilizados para a quantificação e confirmação e tempo de retenção (tr) do BPA e BPA-d16 silanizados.

Analito	Íon de quantificação (<i>m/z</i>)	Íon de confirmação (<i>m/z</i>)	tr (min)
BPA	357	372	8.27
BPA-d16 (PI)	368	386	8.19

Análise Estatística

Os resultados dos exames de urina e saliva, com respostas obtidas em ng.mL^{-1} , foram submetidos ao teste para verificação da normalidade dos dados (teste de Shapiro-Wilk), apresentando distribuição normal. Para a verificação da homogeneidade das variâncias, realizou-se o teste de Levene. Assim, os resultados dos exames de urina e saliva, foram descritos com os valores de média e desvio-padrão e a diferença entre os tempos foi verificada por análise de variância (ANOVA) a um critério e pós-teste de Tukey para diferenciação da média ($p < 0,05$). Os dados foram analisados por meio do programa estatístico Bioestat 5.3 e o nível de significância adotado foi de 5%.

Fluxograma do estudo in vitro

Fluxograma do estudo in vivo

*R*ESULTADOS

4. RESULTADOS

Na análise cromatográfica dos dados do estudo *in vitro*, foi possível observar a liberação de BPA por todos os compósitos estudados e em todos os tempos avaliados. O compósito com maior liberação de BPA, nos 4 tempos, foi o Enlight (Ormco Corp, Orange, Calif, USA), com liberação máxima de 1020 ng.g⁻¹ para o tempo de 1 mês (tabela 3). Na sequência, observamos liberação de BPA em ordem decrescente, também no tempo de 1 mês, para os seguintes compósitos: Eagle Spectrum (American Orthodontic, Sheboygan, USA), Transbond XT (Unitek, Monróvia, CA, USA), Mono-Lok II (Rocky Mountain Orthodontics, USA) e Light Bond (Reliance Orthodontic, Illinois, USA) (Figuras 1-6).

Tabela 3. Concentração BPA (ng.g⁻¹ de material) eluído dos compósitos e adesivos em diferentes tempos de imersão em solução alcoólica etanol/água (75:25 v/v); (n=3)

Tempo de exposição	Transbond XT- 3M		Mono-Lok II-RMO		Eagle Spectrum-AO		Enlight-Ormco		Light Bond-Reliance	
	Conc. Média ng.g ⁻¹	Desvio Padrão	Conc. Média ng.g ⁻¹	Desvio Padrão	Conc. Média ng.g ⁻¹	Desvio Padrão	Conc. Média ng.g ⁻¹	Desvio Padrão	Conc. Média ng.g ⁻¹	Desvio Padrão
30 min	28	1	9	0	38	2	48	2	10	0
24 horas	55	2	82	4	167	4	252	4	22	2
1 sem.	143	9	72	3	295	9	415	29	31	1
1 mês	324	18	147	20	608	47	1020	50	65	1
Adesivo	671	60	1235	165	109	4	108	8	389	41

Figura 1. Liberação de BPA pelos compósitos (ng.g⁻¹) x tempo.

Figura 2. Concentração de BPA eluído dos compósitos após 30 min de imersão em solução alcoólica etanol/água (75:25v/v).

Figura 3. Concentração de BPA eluído dos compósitos, após 24 hs de imersão em solução alcoólica etanol/água (75:25v/v).

Figura 4. Concentração de BPA eluído dos compósitos, após 1 semana de imersão em solução alcoólica etanol/água (75:25v/v).

Figura 5. Concentração de BPA eluído dos compósitos, após 1 mês de imersão em solução alcoólica etanol/água (75:25v/v).

Figura 6. Concentração de BPA eluído dos adesivos após imersão em solução alcoólica etanol/água.

A análise cromatográfica dos dados do estudo *in vivo* mostrou que todas as amostras de saliva e urina iniciais continham alguma quantidade de BPA, e a análise descritiva é apresentada nas tabelas 4 e 5. As amostras de saliva, coletadas 30 minutos após a colagem dos bráquetes, mostraram aumento significativo no BPA em comparação com as amostras iniciais ($p < 0,05$) (Tabela 4). No entanto, as amostras coletadas 24 horas, 1 semana e 1 mês após a colagem, apresentaram níveis semelhantes aos das amostras iniciais. A média de concentração de BPA na saliva inicial foi de 0,565; 1,0445 (após 30 minutos), 0,6425 (24 hs), 0,7595 (1 semana) e 0,6145 (1 mês). A liberação de BPA no tempo 30 minutos foi significativamente maior quando comparada aos demais tempos: iniciais, 24 horas, 1 semana e 1 mês ($p < 0.05$). (Tabela 4)

Tabela 4. Análise descritiva da concentração de BPA na saliva de acordo com o tempo (n=20).

TEMPO	Concentração de BPA		
	Mínimo	Máximo	Média (DP)
Antes	0,49	0,73	0,565 (0,06) ^a
Após 30 minutos	0,74	1,82	1,0445 (0,28) ^b
Após um dia	0,50	1,34	0,6425 (0,21) ^a
Após uma semana	0,50	1,52	0,7595 (0,33) ^a
Após um mês	0,49	1,23	0,6145 (0,16) ^a

DP – Desvio padrão

Teste de análise de variância e Tukey

*- Letras diferentes representam significância estatística ($p < 0,05$)

Na análise da urina, a média da concentração de BPA inicial foi de 2,17 ng.ml⁻¹. Vinte e quatro horas após a colagem dos bráquetes, a concentração aumentou significativamente (5,035 ng.ml⁻¹), voltando a reduzir nos tempos seguintes. Houve diferença estatística significativa quando comparadas as taxas de liberação do tempo inicial com as de 24 horas e uma semana, e quando comparadas as taxas de 24 horas com as de um mês ($p < 0,05$) (Tabela 5).

Tabela 5. Análise descritiva da concentração de BPA na urina de acordo com o tempo (n=20).

TEMPO	Concentração de BPA		
	Mínimo	Máximo	Média (DP)*
Antes	0,90	3,80	2,17 (0,93) ^a
Após 24 horas	1,20	10,7	5,035 (2,47) ^b
Após uma semana	1,50	9,60	4,22 (2,07) ^{bc}
Após um mês	1,20	8,20	3,05 (1,61) ^{ac}

DP – Desvio padrão

Teste de análise de variância e Tukey

*- Letras diferentes representam significância estatística (p<0,05)

Figura 7. Concentração total de BPA na saliva antes e após a colagem. **Figura 8.** Concentração total de BPA na urina antes e após a colagem.

*D*ISSCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

A vida moderna do ser humano está constantemente associada à exposição ao Bisfenol A liberado por materiais constituídos de plástico policarbonato e resinas epóxi, contaminando o organismo humano. Esta substância, quando ingerida ou em contato direto com a pele pode afetar todo o sistema hormonal, uma vez que, seu mecanismo de ação é semelhante ao do estrogênio. Mesmo em níveis baixos, o Bisfenol A pode afetar a saúde humana, gerando problemas no desenvolvimento de órgãos reprodutores, desenvolvimento de hiperglicemia e diabetes, doença cardiovascular, concentração anormal de enzimas do fígado e até mesmo serem fatores de risco para o surgimento de células cancerígenas.

Torna-se importante salientar que o contato precoce ou em fase de crescimento com o Bisfenol A têm sido considerado crítico, pois, as células e o organismo em desenvolvimento são mais susceptíveis aos seus efeitos. O profissional na área de Odontologia submete seu paciente ao contato constante com materiais que possuem BPA em sua composição, dentre os quais estão as resinas, selantes, adesivos, e bráquetes ortodônticos, dentre outros. Enquanto os órgãos públicos de saúde não tomam medidas contra a fabricação desses produtos, contrariando as empresas e os interessados no uso e fabricação do BPA, considera-se importante ter e oferecer conhecimento a respeito dos efeitos colaterais desta substância.

A Ortodontia mantém íntima correlação com os polímeros. Várias são as aplicações, como os poliuretanos usados na manufatura de ligaduras elastoméricas, fios à base de poliamida e bráquetes estéticos à base de policarbonatos, entretanto, as maiores discussões estão focadas nos compósitos utilizados para colagem dos bráquetes (Eliades et al., 2007). Os sistemas adesivos resinosos ortodônticos,

particularmente, têm sido usados há mais de 40 anos com sucesso no processo de colagem. Essa multifacetada aplicação dos polímeros na Ortodontia tem introduzido inovação, praticidade e estética na especialidade (Kloukos 2013). Os compósitos odontológicos são compostos de resinas orgânicas e alguns outros componentes como solventes e partículas inorgânicas de carga, dependendo do tipo de produto. As resinas orgânicas são formuladas com uma variedade de mistura de monômeros, sendo o mais importante, o Bis GMA. Outros monômeros (Bis EMA, Bis DMA, TEGDMA e HEMA) são incluídos para modificar a viscosidade, manuseio e outras propriedades (Chen e Suh 2013). As bases dos compósitos odontológicos não são BPA puro. As fontes de BPA liberadas dos materiais odontológicos incluem traços de BPA pela impureza dos derivados de BPA e pela degradação/hidrólise das restaurações. A quantidade de BPA, pela impureza dos BPA derivados, é usualmente baixa e não detectável. A hidrólise está associada aos policarbonatos e Bis-DMA, que possuem ligação do tipo éter. O Bis-GMA sofre apenas degradação, já que possui ligação do tipo Éter (Chen e Suh 2013; Fleisch et al., 2010). Muitos compósitos utilizados na Odontologia são compostos de derivados do BPA e têm atraído a atenção dos pesquisadores por serem fontes adicionais de exposição humana. O BPA utilizado na manufatura de algumas resinas e bráquetes de policarbonato tem sido associado com a indução de efeitos hormonais, incluindo alterações de glândulas mamárias em camundongos, puberdade precoce em fêmeas e feminilização em machos (Chen e Suh 2013). A investigação em humanos mostrou que a entrada sistêmica do componente químico liberado pelos materiais resinosos acontece por 3 vias principais: inalação de partículas voláteis, ingestão de compostos pelo trato gastrointestinal e difusão para polpa através da dentina (Kloukos et al., 2013). Em Ortodontia, as condições mais perigosas que podem levar

à ingestão sistemática de partículas químicas são através dos bráquetes, que permanecem na cavidade bucal por aproximadamente 2 anos, e as contenções linguais, que também ficam por tempo bastante longo (kloukos, 2013). Os compósitos usados na colagem dos bráquetes na superfície do esmalte dentário estão expostos na cavidade oral apenas através da margem periférica dos bráquetes com uma espessura aproximada de 150 a 250 μm (Eliades 1995). Nesse caso, os estímulos funcionais são mínimos e o subsequente efeito de envelhecimento é menor. Entretanto, o mesmo material utilizado para a colagem de contenções linguais, exibe uma situação drasticamente diferente, pois, apresenta maior espessura e grande parte da superfície fica exposta às condições intra-orais, predispondo à polimerização incompleta. Além disso, a localização das contenções facilitam o acúmulo de placa e, conseqüentemente, maior atividade enzimática, em particular à esterase salivar. Alguns trabalhos foram feitos com materiais ortodônticos (Gioka et al., 2005; Eliades et al., 2007; Eliades et al., 2011; Sunitha et al., 2011; Kloukos et al., 2013; Kotyk e Wiltshire, 2013; Chen e Suh, 2013; Goldberg et al., 2014) , mas levantamentos criteriosos da quantidade de Bisfenol A liberado por sistemas adesivos resinosos ortodônticos *in vivo* são escassos.

No presente trabalho avaliou-se a liberação do Bisfenol A *in vitro* e *in vivo*. No estudo *in vitro*, os corpos de prova de cada um dos sistemas adesivos resinosos ortodônticos estudados foram submersos numa solução alcoólica etanol/água (75:25 v/v) e mantidos à temperatura em 37° C. Tal protocolo foi utilizado baseado no fato de que o mesmo simula uma condição de degradação e envelhecimento, reproduzindo condição semelhante à cavidade oral (Eliades et al., 1995; Eliades et al., 2007). Alguns trabalhos nessa mesma linha utilizaram solução salina (Gioka et al., 2005), álcool absoluto (Eliades et al., 2007; Sunitha et al., 2011), água destilada

(Eliades et al., 2011) ou saliva artificial (Kotyk e Wiltshire, 2013). Essa variedade de soluções e diferentes métodos analíticos dificultam as comparações, e alguns trabalhos recentes têm sugerido uma padronização nas pesquisas (Kloukos et al., 2013). A análise química efetuada por meio da espectrometria de massas acoplada à cromatografia gasosa é bastante precisa para esse tipo de investigação (Viljanen et al., 2006; Manabe et al., 2000).

A liberação de BPA pelos compósitos ortodônticos pode ocorrer em dois diferentes tempos: durante ou próximo a sua inserção, em função da incompleta polimerização e mais tarde, em função da degradação do material. No ambiente intra-oral, estes materiais são expostos às alterações térmicas extremas, ao desgaste mecânico, às alterações de pH, e à degradação de enzimas salivares e bacterianas, que podem causar liberação de BPA. Alguns estudos com compósitos ortodônticos (Gioka et al., 2005; Eliades et al., 2007), que não investigaram abrasão mecânica ou variações de temperatura, não observaram qualquer liberação de BPA ou atividade estrogênica. Por outro lado, a polimerização incompleta dos sistemas adesivos foi indicada por liberar BPA (Sunitha et al., 2011).

Nas condições do presente estudo utilizando metodologia bem acurada, como já relatado anteriormente, observou-se a liberação de BPA em todas as marcas avaliadas e em todos os tempos estudados. O compósito Enlight foi o que mais liberou BPA nos diferentes tempos, com média de 433,75 ng/g, atingindo 1020 ng/g em um mês, indicando uma liberação média diária de 34 ng/g/dia. A quantidade de liberação foi crescente para todos os produtos estudados, sendo seu pico no tempo de 1 mês. Considerou-se prudente avaliar também a quantidade de BPA presente nos adesivos, mesmo que, apenas uma pequena camada seja utilizada no procedimento, muitas vezes essa camada fica exposta no dente, fora das margens

recobertas pelo bráquete. O adesivo que apresentou a maior quantidade de BPA foi o do Monolok II com 1235 ng/g. A quantidade de BPA liberada pelos adesivos do Transbond XT-3M Unitek, Mono-Lok II-RMO e Light Bond-Reliance foi maior que dos próprios compósitos.

No entanto, Eliades et al. (2007) ao testarem 2 compósitos ortodônticos, um de polimerização química e outro, fotoativado, não detectaram liberação de BPA. No referido trabalho, os compósitos foram associados aos bráquetes, imersos em álcool absoluto e em solução analisada, aos 1, 7, 21 e 35 dias, utilizando cromatografia líquida de alta performance. Entretanto, também, em estudo *in vitro*, Eliades et al. (2011) avaliaram contenções associadas ao Transbond XT e encontraram liberação de BPA em todos os tempos estudados (10, 20 e 30 dias), sendo que a maior liberação, de 2,9 µg/L, ocorreu com um mês de imersão em água destilada, corroborando os resultados do presente trabalho, no qual o compósito Transbond XT também apresentou maior liberação de BPA (324 ng.g⁻¹) aos 30 dias após a imersão em solução de etanol/água (75:25 v/v). Sunitha et al., (2011) avaliaram a liberação de BPA da resina Transbond XT com diferentes distâncias de fotopolimerização e nos tempos de 1, 7, 21 e 35 dias imersos em álcool absoluto e constataram que quanto maior a distância luz-compósito, maior a liberação da substância. Kotyk e Wiltshire (2013), avaliaram discos de Transbond XT imersos em saliva artificial, em 4 tempos: 24 hs, 3, 7 e 14 dias. Não houve liberação no primeiro dia, 7 e 14, mas 2,75 µg/g foi encontrado no terceiro dia. Alguns autores avaliaram a liberação de BPA em resinas restauradoras e, mesmo considerando que essas resinas são utilizadas em circunstâncias diferentes, pois, ficam expostas ao meio bucal e são usadas em maiores quantidades, os resultados de liberação de BPA são semelhantes aos do presente estudo (Kingman et al., 2012; Calafat et al., 2005;

Joskow et al., 2006). Manabe et al. (2000) encontraram 6,4 µg/g para a resina Silux Plus (3M) não polimerizada e 91,4 ng/g no material polimerizado e imerso por 24 hs em solução salina e para a resina Concise (3M), 15,44 µg/g e 19,8ng/g nas mesmas condições anteriores. Para o adesivo Clearfil Photo Bond, os autores encontraram 18,54 µg/g.

No estudo *in vivo*, após a colagem de bráquetes ortodônticos, utilizando um compósito considerado padrão ouro para essa finalidade, o Transbond XT, quantificou-se o BPA na urina e saliva dos pacientes, antes e após a colagem dos bráquetes ortodônticos. O estudo com humanos traz algumas limitações, e uma delas é estabelecer o tamanho da amostra. Para isso baseou-se no estudo de Kang et al., (2011) que quantificou o BPA na urina e saliva de 22 pacientes que se submeteram à colagem de um retentor lingual.

O BPA é um produto químico não persistente e a principal via de excreção é a urina. Em função disso, os níveis urinário e salivar foram medidos para avaliar a exposição do corpo humano ao BPA, sendo que sua quantificação na saliva reflete a liberação que acontece em função de uma incompleta polimerização, e a quantificação na urina reflete o que foi absorvido e, conseqüentemente, será excretado. A análise pode subestimar essa liberação já que existem outras vias de excreção menores, como a sudorese e respiração, que são muito difíceis de se medir (Dekant e Volkel, 2008). A eliminação completa ocorre em 42 horas, mas vestígios de BPA podem estar ligados aos órgãos humanos (Tsukioka et al., 2004; Volkel et al., 2005). No entanto, os resultados obtidos no presente estudo, não comprovam essa afirmação, uma vez que, o nível de BPA na urina elevou significativamente com a colagem dos bráquetes ortodônticos, sobretudo, após 24hs, porém, após uma semana, as taxas mesmo que menores, se mantiveram significativas. Somente após 30 dias, o nível de BPA urinário atinge valores

próximos aos iniciais. Esse fato evidencia a importância de se considerar os efeitos dos materiais odontológicos atualmente utilizados sobre o organismo humano.

O conteúdo de BPA em materiais odontológicos modernos é muito baixo e essa informação ficou comprovada no presente estudo *in vitro*, porém, estudos quantitativos *in vivo* ainda são escassos. Estudos epidemiológicos têm detectado BPA na urina de 91% dos canadenses entre 6 a 79 anos de idade (Bushnik et al., 2010), 93% dos norte-americanos com 6 anos ou mais (Calafat et al., 2008) e 99% dos alemães entre 3 e 14 anos de idade (Becker et al., 2009). Estudo realizado em residentes dos EUA entre 2003-2004 evidenciou que mais de 95% da população tinha níveis detectáveis de BPA na urina, com valores em torno de 2,6 a 2,9 microgramas por litro. (NHANES, 2009). O limite de detecção relatado em NHANES foi de 0,4 ng / L.

A alta frequência de detecção e a rapidez com que o BPA é metabolizado, sugerem uma exposição contínua de várias fontes e quantidades substanciais de BPA (Stahlhut et al., 2009; Taylor et al., 2011). No presente estudo foi encontrado níveis de BPA em praticamente todas as amostras iniciais, sendo para saliva de 0,5 a 0,73 ng/ml; com média de 0.565, e para a urina de 0,9 a 3,8 ng/ml, com média de 2.17 ng/ml. Estes dados sugerem, realmente, uma exposição contínua à substância estudada. O aumento das taxas de BPA nos tempos iniciais da pesquisa, 30 min. para saliva e 24 hs para urina, sugere uma correlação significativa com a colagem dos bráquetes. Outros autores também encontraram essa correlação (Kang et al., 2011; Kingman et al., 2012; Han et al., 2012). Os níveis salivares e urinários diminuíram com o tempo, assim como foi encontrado em outros estudos (Pulgar et al., 2000; Tarumi et al., 2000; Kang et al., 2011; Kingman et al., 2012; Han et al., 2012). Portanto, o aumento na concentração de BPA logo após a colagem dos bráquetes configura, provavelmente, um evento agudo. Presumivelmente, nos momentos iniciais, pós fotopolimerização, o monômero não

polimerizado é dispersado na saliva, o que representa pouca probabilidade de exposição crônica.

Han et al., (2012) estudaram a liberação de BPA por resinas/selantes dentais em crianças coreanas e perceberam, a presença de BPA em todas as amostras e, posteriormente, correlação positiva do BPA com a presença de restaurações/selantes. Outros estudos realizados *in vivo* também correlacionaram níveis salivares de BPA com a aplicação de selantes, mesmo considerando que esses níveis foram temporários (Olea et al., 1996; Sasaki et al., 2005; Joskov et al., 2006; Zimmerman-Dows et al., 2010; Kingman et al., 2012; Han et al., 2012; Chung et al., 2012; Kloukos et al., 2013).

Os níveis salivar e urinário de BPA detectados neste estudo poderiam ser irrelevantes, se não fossem os relatos de Vom Saal e Hugues (2008) de que doses menores e regulares de BPA podem ser mais prejudiciais à saúde do que doses elevadas, pois, a quantidade liberada no presente estudo, tanto *in vitro* como *in vivo*, foi bem menor do que a dose limite recomendada. Outro aspecto é que não se deve considerar apenas a liberação dos materiais odontológicos isoladamente, mas a somatória de todas as fontes a que estamos submetidos diariamente. O desejável seria não contribuir para o acúmulo de BPA no organismo, principalmente em indivíduos jovens, que são notadamente mais susceptíveis. A maioria dos pacientes ortodônticos são adolescentes, logo, a exposição de seus organismos em crescimento e em desenvolvimento ao BPA, pode ser mais perigosa do que a exposição aos adultos (Kotyk e Wiltshire, 2013).

Torna - se importante salientar que o estudo tem algumas limitações, sobretudo, no que se refere ao controle da amostra quanto ao contato dos pacientes com fontes que liberam o Bisfenol A, como, utilizar galões de água de plásticos, tomar líquidos em copos plásticos, armazenar alimentos em recipientes de plásticos e várias outras fontes e hábitos individuais difíceis de se controlar. Por essa razão,

foram coletadas amostras de saliva e urina dos pacientes, antes da colagem dos bráquetes para que se tivesse uma referência inicial. Como a literatura especializada têm destacado os potenciais tóxicos do BPA e têm sugerido alterações celulares com “baixas doses”, estudos adicionais são necessários para se melhorar a compreensão sobre como o BPA é absorvido pelo corpo, para se obter informações mais precisas sobre a taxa de eliminação desses compostos e seus efeitos adversos sobre organismo humano, propiciando mais segurança no uso desses materiais.

*C*ONCLUSÃO

6. CONCLUSÃO

Considerando as condições específicas deste estudo e os resultados obtidos pôde-se concluir:

6.1. No estudo *in vitro*

- o BPA foi liberado por todos os sistemas adesivos resinosos ortodônticos estudados. As quantidades liberadas foram abaixo das doses de referência para ingestão diária
- o compósito que apresentou maior liberação de BPA foi o Enlight (Ormco Corp, Orange, Calif, USA)
- a liberação máxima de BPA ocorreu no tempo 30 dias, para todos os compósitos

6.2. No estudo *in vivo*

- o procedimento de colagem de bráquetes ortodônticos resultou em aumento da quantidade de BPA na saliva e urina. As quantidades liberadas foram abaixo da dose de referência para ingestão diária
- a liberação de BPA na saliva foi maior 30 minutos após a colagem dos bráquetes ortodônticos. Nos tempos subsequentes, os níveis salivares retornaram aos valores iniciais.
- a liberação de BPA na urina atingiu seu pico, 24 horas após a colagem, reduzindo após 1 semana, porém, ainda mantendo dosagem significativa. Aos 30 dias, retornou aos valores iniciais

*R*EFERÊNCIAS

- Akın L, Kendirci M, Narin F, Kurtoglu S, Saraymen R, Kondolot M, Koçak S, Elmalı F. The endocrine disruptor bisphenol A may play a role in the aetiopathogenesis of polycystic ovary syndrome in adolescent girls. *Acta Paediatr*. 2014 Dec 3; 1-7.
- Al-Hiyasat A, Darmani H. In vivo effects of BIS-GMA-a component of dental composite-on male mouse reproduction and fertility. *J Biomed Mater Res A*. 2006 Jul; 78(1):66-72.
- Alonso-Magdalena P, Morimoto S, Rípoli C, Fuentes E, Nadal A. The estrogenic effect of bisphenol A disrupts the pancreatic β -cell function in vivo and induces insulin resistance. *Environ Health Perspect*. 2006 Jan; 114(1):106-12.
- Anand M K, Majumder K, Venkateswaran S, Krishnaswamy N R. Comparison of shear bond strength of orthodontic brackets bonded using two different hydrophilic primers: An *in vitro* study. *Indian J Dent Res*. 2014; 25:191-6.
- Anusavice KJ. *Materiais Dentários*. 11.ed. Rio de Janeiro:Elsevier; 2005.
- Azarpazhooh A, Main PA. Is there a risk of harm or toxicity in the placement of pit and fissure sealant materials? A systematic review. *J Can Dent Assoc*. 2008 Mar; 74(2):179-83.
- Becker K, Goßen T, Seiwert M, et al. GerES IV: phthalate metabolites and bisphenol A in urine of German children. *Int J Hyg Envir Heal*. 2009; 212:685–692.
- Bindhumol V, Chitra KC, Mathur PP. Bisphenol A induces reactive oxygen species generation in the liver of male rats. *Toxicology*. 2003 Jun 30; 188(2-3):117-24.
- Braun JM, Kalkbrenner AE, Calafat AM, et al. Impact of early-life bisphenol A exposure on behavior and executive function in children. *Pediatrics*. 2012;128(5):873–882.
- Buonocore MG. A simple method of increasing the adhesion of acrylic filling material to enamel surface. *J Dent Res*. 1955 Dec; 34(6):849-53.
- Bushnik T, Haines D, Levallois P, Levesque J, Van Oostdam J, Viau C. Canadian population lead and bisphenol A concentrations in the Canadian population. *Health Rep*. 2010; 21:7–18.
- Calafat AM, Kuklennyik Z, Reidy JA, Caudill SP, Ekong J, Needham LL. Urinary concentrations of bisphenol A and 4-nonylphenol in a human reference population. *Environ Health Perspect*. 2005; 113:391–395.
- Calafat AM, Ye X, Wong L-Y, Reidy JA, Needham LL. Exposure of the U.S. population to bisphenol A and 4- tertiary-octylphenol: 2003–2004. *Environ Health Perspect*. 2008; 116:39–44.
- Carvalho KR, Carvalho MRA, Bandéca MC, Tavares RRJ, Firoozmand LM. Sistemas adesivos na Ortodontia. O que há de novo? *Ortodontia SPO*. 2013. 46(4): 409 - 14.
- Chen L, Suh B. Bisphenol A in Dental Materials: A review. *JSM Dent*. 2013. 1-1004.

Cummings JA, Clinton SM, Perry AN, Akil H, Becker J.B. Male rats that differ in novelty exploration demonstrate distinct patterns of sexual behavior. *Behav Neurosci*. 2013; 127: 47.

De Coster S, van Larebeke N. Endocrine-disrupting chemicals: associated disorders and mechanisms of action. *J Environ Public Health*. 2012. doi:10.1155/2012/713696

Dekant W, Volkel W. Human exposure to bisphenol A by biomonitoring: methods, results and assessment of environmental exposures. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2008; 228:114-34.

Delfosse V, Grimaldi M, Pons JL, Boulahtouf A, le Maire A, Cavailles V, et al. Structural and mechanistic insights into bisphenols action provide guidelines for risk assessment and discovery of bisphenol A substitutes. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2012; 109(37):14930–5.

Della Seta D, Minder I, Belloni V, Aloisi AM, Dessi-Fulgheri F, Farabollini F. Pubertal exposure to estrogenic chemicals affects behavior in juvenile and adult male rats. *Horm Behav*. 2006 Aug; 50(2):301-7.

Diamanti-Kandarakis E, Bourguignon JP, Giudice LC, Hauser R, Prins GS, Soto AM, et al. Endocrine-disrupting chemicals: an endocrine society scientific statement. *Endocr Rev*. 2009; 30: 293–342.

Eliades T, Gioni V, Kletsas D, Athanasiou A, Eliades G. Oestrogenicity of orthodontic adhesive resins. *Eur J Orthod*. 2007;29:404–407.

Eliades T, Hiskia A, Eliades G, Athanasiou AE. Assessment of bisphenol-A release from orthodontic adhesives. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 2007; 131: 72-75.

Eliades T, Voutsas D, Sifakakis I, Makou M, Katsaros C. Release of bisphenol-A from a light-cured adhesive bonded to lingual fixed retainers. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 2011; 139: 192-195.

Eliades T. Degree of double bond conversion and residual monomer concentration in light-cured and chemically-cured orthodontic adhesive resins bonded to ceramic and stainless steel brackets. [M.S. thesis.] Columbus, Ohio: The Ohio State University, 1995.

Eramo S, Urbani G, Sfasciotti GL, Brugnoletti O, Bossù M, Polimeni A. Estrogenicity of bisphenol A released from sealants and composites: a review of the literature. *Ann Stomatol (Roma)*. 2010 Jul;1(3-4):14-21.

European Food Safety Authority. Scientific opinion on bisphenol A: Evaluation of a study investigating its neurodevelopmental toxicity, review of recent scientific literature on its toxicity and advice on the Danish risk assessment of bisphenol A. [acesso em: 02 Fev, 2015]. Disponível em: <http://www.efsa.europa.eu/en/scdocs/scdoc/1829.htm>.

Fleisch AF, Sheffield PÉ, Chinn C, Edelstein BL, Landrigan PJ. Bisphenol A and related compounds in dental materials. *Pediatrics*. 2010; 126:760-768.

Floyd CJE, Dickens SH. Network structure of Bis-GMA and UDMA-based resin systems. *Dent Mater*. 2006 Dec 10; 22(12): 1143-9.

Fróes-Salgado NR, Francci C. Colagem de braquetes em Ortodontia: uma revisão. *Perspect. Oral Sci.* 2009; 1(1): 16-20.

Frye C, Bo E, Calamandrei G, Calzà L, Dessì-Fulgheri F, Fernández M, et al. Endocrine disruptors: a review of some sources, effects, and mechanisms of actions on behaviour and neuroendocrine systems. *J Neuroendocrinol.* 2012; 24:144–159.

Fung EY, Ewoldsen NO, St Germain HA Jr, Marx DB, Miaw CL, Siew C, et al. Pharmacokinetics of bisphenol A released from a dental sealant. *J Am Dent Assoc.* 2000; 131: 51-58.

Gao H, Yang B, Li N, Feng L, Shi X, Zhao W, Liu S. Bisphenol A and Hormone-Associated Cancers: Current Progress and Perspectives. *Medicine (Baltimore).* 2015 Jan; 94(1): e211.

Gioiosa L, Parmigiani S, vom Saal FS, Palanza P. The effects of bisphenol A on emotional behavior depend upon the timing of exposure, age and gender in mice. *Horm Behav.* 2013; 63:598–605.

Gioka C, Bourauel C, Hiskia A, Kletsas D, Eliades T, Eliades G. Light-cured or chemically cured orthodontic adhesive resins: A selection based on the degree of cure, monomer leaching, and cytotoxicity. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2005; 127:413–419.

Goldberg M, Dimitrova-Nakov S, Schmalz G. BPA from dental resin material: Where are we going with restorative and preventive dental biomaterials? *Clin Oral Invest.* 2014 18: 347-349.

Graf I, Jacobi BE. Bond strength of various fluoride-releasing orthodontic bonding systems - Experimental study. *J Orofac Orthop.* 2000. May; 61(3):191-8.

Han DH, Kim MJ, Jun EJ, Kim JB. Salivary Bisphenol-A Levels due to Dental Sealant/Resin: A Case-Control Study in Korean Children. *J Korean Med Sci.* Sep 2012; 27(9): 1098–1104.

Hines EP, Mendola P, vonEhrenstein OS, Ye X, Calafat AM, Fenton SE. Concentrations of Environmental Phenols and Parabens in Milk, Urine and Serum of Lactating North Carolina Women. *Reprod Toxicol.* 2014 Nov 22; pii: S0890-6238(14)

Ho SM, Tang WY, et al. Developmental exposure to estradiol and bisphenol A increases susceptibility to prostate carcinogenesis and epigenetically regulates phosphodiesterase type 4 variant 4. *Cancer Res.* 2006; 66 (11):5624–5632.

Howdeshell KL, Hotchkiss AK, Thayer KA, Vandenberg JG, vom Saal FS. Exposure to bisphenol A advances puberty. *Nature* 1999; 401: 763-4.
<http://www.efsa.europa.eu/en/scdocs/scdoc/1829.htm>.

Hugo ER, Brandebourg TD, Woo JG, Loftus J, Alexander JW, Ben-Jonathan N. Bisphenol A at environmentally relevant doses inhibits adiponectin release from human adipose tissue explants and adipocytes. *Environ Health Perspect* 2008; 116: 1642-7.

Ianni Filho D, Silva TBC, Simplício AHM, Loffredo LCM. Avaliação in vitro da força de adesão de materiais de colagem em Ortodontia: ensaios mecânicos de cisalhamento. *Rev Dental Press Ortod Ortop Facial*. 2004. Jan.- Fev.; 9(1):39-48.

Jones DC, Miller GW. The effects of environmental neurotoxicants on the dopaminergic system: A possible role in drug addiction. *Biochem Pharmacol*. 2008; 76: 569-581.

Joskow R, Barr DB, Barr JR, Calafat AM, Needham LL, Rubin C. Exposure to bisphenol A from bis-glycidyl dimethacrylate-based dental sealants. *J Am Dent Assoc*. 2006; 137: 353-362.

Kang JH, Kondo F, Katayama Y. Human exposure to bisphenol A. *Toxicology*. 2006 Sep 21; 26(2-3):79-89.

Kang YG, Kim JY, J. Kim, Won PJ, Nam JH. Release of bisphenol A from resin composite used to bond orthodontic lingual retainers. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 2011; 140:779-789.

Kim EJ, Lee BC, Chung H, Lee JP. Association between urinary levels of bisphenol-A and estrogen metabolism in Korean adults. *Total Environment*. 2014 Jul; 1401-7.

Kim YH, Kim CS, Park S, Han SY, Pyo MY, Yang M. Gender differences in the levels of bisphenol A metabolites in urine. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2003; 312: 441-448.

Kingman A, Hyman J, Masten SA, Jayaram B, Smith C, Eichmiller F, et al. Bisphenol A and other compounds in human saliva and urine associated with the placement of composite restorations. *J Am Dent Assoc*. 2012; 143: 1292-302.

Kloukos D, Pandis N, Eliades T. Bisphenol-A and residual monomer leaching from orthodontic adhesive resins and polycarbonate brackets: a systematic review. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 2013; 143: 104-112...

Kotyk MW, Wiltshire WA. An investigation into bisphenol A leaching from orthodontic materials. *Angle Orthodontist*. 2013. Out. 123-128.

Kouklos D, Pandis N, Eliades T. In vivo bisphenol-A release from dental pit and fissure sealants: A systematic review. *Journal of dentistry*. 2013

Lakind JS, Naiman DQ. Bisphenol A (BPA) daily intakes in the United States: Estimates from the 2003–2004 NHANES urinary BPA data. *J. of Exp. Sci. and Env. Epid*. 2008; 18:608–615.

Lang IA, Galloway TS, Scarlett A. Association of urinary bisphenol A concentration with medical disorders and laboratory abnormalities in adults. *J Am Dent Assoc*. 2008 Sep; 300(11):1303-10.

Le HH, Carlson EM, Chua JP, Belcher SM. Bisphenol A is released from polycarbonate drinking bottles and mimics the neurotoxic actions of estrogen in developing cerebellar neurons. *Toxicol Lett* 2008; 176: 149-56.

- Li D, Zhou Z, Qing D, He Y, Wu T, Miao M, et al. Occupational exposure to bisphenol-A (BPA) and the risk of self-reported male sexual dysfunction. *Hum Reprod.* 2010; 25: 519-527.
- Liu Z, Wolff MS, Moline J. Analysis of environmental biomarkers in urine using an electrochemical detector. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2005; 819:155-159.
- Manabe A, Kaneko S, Numazawa S, Itoh K, Inoue M, Hisamitsu H, et al. Detection of bisphenol-A in dental materials by gas chromatography-mass spectrometry. *Dent Mater J.* 2000; 19: 75-86.
- Melzer D, Harries L, Cipelli R, Henley W, Money C, McCormack P, Young A, Guralnik J, Ferrucci L, Bandinelli S, Corsi AM, Galloway T. Bisphenol A exposure is associated with in vivo estrogenic gene expression in adults. *Environ Health Perspect.* 2011 Dec;119(12):1788-93.
- Michelsen VB, Kopperud HBM, Lygre GB, Björkman L, E. Jensen, IR, Kleven, et al. Detection and quantification of monomers in unstimulated whole saliva after treatment with resin-based composite fillings in vivo. *Eur. J. Oral Sci.* 2012. 120: 89-95.
- Moriyama K, Tagami T, Akamizu T, Usui T, Saijo M, Kanamoto N, Hataya Y, Shimatsu A, Kuzuya H, Nakao K. Thyroid hormone action is disrupted by bisphenol A as an antagonist. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002 Nov; 87(11):5185-90.
- Muñoz-de-Toro M, Markey CM, Wadia PR, Luque EH, Rubin BS, Sonnenschein C, et al. Perinatal exposure to bisphenol-A alters peripubertal mammary gland development in mice. *Endocrinology.* 2005; 146: 4138-4147.
- Nadal A. Obesity: Fat from plastics? Linking bisphenol A exposure and obesity. *Nat Rev Endocrinol.* 2013; 9: 9-10.
- Okada H, Tokunaga T, Liu X, Takayanagi S, Matsushima A, Shimohigashi Y. Direct evidence revealing structural elements essential for the high binding ability of bisphenol A to human estrogen-related receptor-gamma. *Environ Health Perspect.* 2008; 116: 32-38.
- Olea N, Pulgar R, Pérez P, Olea-Serrano F, Rivas A, Novillo-Fertrell A, et al. Estrogenicity of resin-based composites and sealants used in dentistry. *Environ Health Perspect.* 1996; 104: 298-305.
- Ooe H, Tkahiro T, Iguchi-Ariga SMM, Ariga H. Induction of reactive oxygen species by bisphenol A and abrogation of bisphenol A induced cell injury by DJ-I. *Toxicol Sci.* 2005 Nov; 88(1):114-26.
- Ouchi K, Watanabe S. Measurement of bisphenol A in human urine using liquid chromatography with multi-channel coulometric electrochemical detection. *Journal of Chromatography B.* 2002; 780:365-370.

Palanza P, Howdeshell KL, Parmigiani S, vom Saad FS. Exposure to a low dose of bisphenol A during fetal life or in adulthood alters maternal behavior in mice. *Environ Health Perspect.* 2002 Jun;110 Suppl 3:415-22.

Papakonstantinou AF, Eliades T, Cellesi F, Watts DC, Silikas N. Evaluation of UDMA's potential as a substitute for Bis-GMA in orthodontic adhesives. *Dent Mater.* 2013 Aug 17; 29 (8): 898-905.

Prins GS, Tang WY, et al. Perinatal exposure to oestradiol and bisphenol A alters the prostate epigenome and increases susceptibility to carcinogenesis. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2008;102 (2):134–138.

Pulgar R, Olea-Serrano MF, Novillo-Fertrell A, Rivas A, Pazos P, Pedraza V, Navajas JM, Olea N. Determination of bisphenol A and related aromatic compounds released from bis-GMA-based composites and sealants by high performance liquid chromatography. *Environ Health Perspect.* 2000; 108:21–27.

Quesada I, Fuentes E, Viso-León MC, Soria B, Rípoli C, Nadal A. Low doses of the endocrine disruptor bisphenol A and the native hormone 17 β -estradiol rapidly activate transcription factor. CREB. *FASEB J.* 2002 Oct; 16(12):1671-3.

Quitmeyer A, Roberts R. 2007. Babies, Bottles and Bisphenol A: The story of a scientist mother. *PLos Biology*, Vol.5, No7. FDA Unimpressed By Low Dose Claims. 1999. *Endocrine/Estrogen Letter*. Vol. 5, No. 10 (106).

Ropero AB, Alonso-Magdalena P, García-García E, Rípoli C, Fuentes E, Nadal A. Bisphenol A disruption of the endocrine pancreas and blood glucose homeostasis. *Int J Androl.* 2008 Apr; 31(2):194-200.

Rubin BS, Murray MK, Damassa DA, King JC, Soto AM. Perinatal exposure to low doses of bisphenol A affects body weight, patterns of estrous cyclicity, and plasma LH levels. *Environ Health Perspect.* 2001 Jul; 109(7):675-80.

Sasaki N, Okuda K, Kato T, Kakishima H, Okuma H, Abe K, Tachino H, Tachida K, Kubono K. Salivary bisphenol-A levels detected by ELISA after restoration with composite resin. *J Mater Sci Mater Med.* 2005; 16:297–300.

Sasco AJ. Epidemiology of breast cancer: an environmental disease? *APMIS.* 2001; 109(5):321-32.

Scientific opinion on bisphenol A: evaluation of a study investigating its neurodevelopmental toxicity, review of recent scientific literature on its toxicity and advice on the Danish risk assessment of bisphenol A. European Food Safety Authority [acesso em 23 set 2010] Disponível em: <http://www.efsa.europa.eu/en/scdocs/scdoc/1829.htm>.

Shelby MD. NTP-CERHR monograph on the potential human reproductive and developmental effects of bisphenol A. NTP CERHR MON. 2008; 22: vii-ix.

Sobolewski M, Conrad K, Allen JL, Weston H, Martin K, Lawrence BP, Cory-Slechta DA. Sex-specific enhanced behavioral toxicity induced by maternal exposure to a mixture of low dose endocrine-disrupting chemicals. *Neurotoxicology.* 2014 Oct 22; 45C:121-130.

Soto AM, Sonnenschein C. Environmental causes of cancer: endocrine disruptors as carcinogens. *Nat Rev Endocrinol*. 2010; 6(7):363–70.

Stahlhut RW, Welshons WV, Swan SH. Bisphenol A data in NHANES suggest longer than expected half-life, substantial nonfood exposure, or both. *Environ Health Perspect*. 2009; 117:784–789.

Sugiura-Ogasawara M, Ozaki Y, Sonta S, Makino T, Suzumori K (2005) Exposure to bisphenol A is associated with recurrent miscarriage. *Hum Reprod* 20: 2325–2329.

Sunitha C, Kailasam V, Padmanabhan S, Chitharanjan AB. Bisphenol A release from an orthodontic adhesive and its correlation with the degree of conversion on varying light- curing tip distances. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 2011; 140: 239–244.

Takai Y, Tsutsumi O, Ikezuki Y, Kamei Y, Osuga Y, Yano T, Taketan Y. Preimplantation exposure to bisphenol A advances postnatal development. *Reprod Toxicol*. 2001 Jan-Feb; 15(1):71-4.

Tarumi H, Imazato S, Narimatsu M, Matsuo M, Ebisu S. Estrogenicity of fissure sealants and adhesive resins determined by reporter gene assay. *J Dent Res*. 2000; 79:1838–1843.

Taylor JA, Vom Saal FS, Welshons WV, et al. Similarity of bisphenol A pharmacokinetics in rhesus monkeys and mice: relevance for human exposure. *Environ Health PERSPECT*. 2011; 119:422–430.

Timms BG, Howdeshell KL, Barton L, Bradley S, Richter CA, vom Saal FS. Estrogenic chemicals in plastic and oral contraceptives disrupt development of the fetal mouse prostate and urethra. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2005 May; 102(19):7014-9.

Toyama Y, Suzuki-Toyota F, Maekawa M, Ito C, Toshimori K (2004) Adverse effects of bisphenol A to spermiogenesis in mice and rats. *Arch Histol Cytol* 67: 373–381.

Tsukioka T, Terasawa J, Sato S, Hatayama Y, Makino T, Nakazawa H. Development of analytical method for determining trace amounts of BPA in urine samples and estimation of exposure to BPA. *J Environ Chem*. 2004; 14:57-63.

U.S. Environmental Protection Agency. Integrated risk information system. Reference dose for chronic oral exposure (RfD): Bisphenol A. 1993. [acesso em: 20 Mar 2012]. Disponível em: http://cfpub.epa.gov/ncea/iris/index.cfm?fuseaction=iris.showQuickView&substance_nmbr=0356.

Viljanen EK, Langer S, Skrifvars M, Vallittu PK. Analysis of residual monomers in dendritic methacrylate copolymers and composites by HPLC and headspace-GC/MS. *Dent Mater*. 2006; 22:845–851.

Völkel W, Bittner N, Dekant W. Quantitation of bisphenol A and bisphenol A glucuronide in biological samples by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Drug Metab Dispos*. 2005; 33:1748-57.

Völkel W, Colnot T, Csanády GA, Filser JG, Dekant W. Metabolism and kinetics of bisphenol A in humans at low doses following oral administration. *Chem Res Toxicol*. 2002 Oct; 15(10):1281-7.

Vom Saal FS, Hughes C. An extensive new literature concerning low-dose effects of bisphenol A shows the need for a new risk assessment. *Environ Health Perspect* 2008;113: 926-33.

Wolstenholme JT, Rissman EF, Connelly JJ. The role of Bisphenol A in shaping the brain, epigenome and behavior. *Horm Behav*. 2011 Mar;59(3):296-305.

Wozniak AL, Bulayeva NN, Watson CS. Xenoestrogens at picomolar to nanomolar concentrations trigger membrane estrogen receptor-alpha-mediated Ca²⁺ fluxes and prolactin release in GH3/B6 pituitary tumor cells. *Environ Health Perspect* 2005; 113: 431-9.

Zanini, LKI; Prietsch, JR; Coneição, EN; Manfredi, DAB. Avaliação da resistência da união ao esmalte de bráquetes ortodônticos colados com diferentes materiais adesivos. *Rev. Fac. Odontol. Porto Alegre*. 1997. Jul; v. 38, n. 1, p. 16-19.

Zimmerman-Downs JM, Shuman D, Stull SC, Ratzlaff RE. Bisphenol A blood and saliva levels prior to and after dental sealant placement in adults. *J Dent Hyg*. 2010; 84: 145-150.

ANEXO A

FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO
PRETO/ FORP/ USP

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação da liberação de Bisfenol A de resinas ortodônticas: Estudo in vitro e in vivo

Pesquisador: Marília Rodrigues Moreira

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 34805914.9.0000.5419

Instituição Proponente: Universidade de São Paulo

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 898.305

Data da Relatoria: 14/12/2014

Apresentação do Projeto:

O projeto está apresentado de forma correta, cumpre todas as normativas estabelecidas pelo CEP da FORP/USP e pela CONEP.

Objetivo da Pesquisa:

O objetivo desse trabalho é quantificar a liberação de Bisfenol A de resinas ortodônticas in vitro e posteriormente medir a liberação em participantes ortodônticos (na saliva e urina), imediatamente, um dia, uma semana e um mês após a instalação dos aparelhos. A determinação do conteúdo de bisfenol A nas resinas, urina e saliva dos pacientes, será realizada no Laboratório de Química Orgânica do Departamento de Física e Química da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP, por meio do método de análise por espectrometria de massas.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os pesquisadores informaram risco mínimo, somente desconforto com a coleta de saliva e urina.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Os pesquisadores adequaram o protocolo conforme todas as solicitações do CEP da FORP/USP.

Endereço: Avenida do Café s/nº

Bairro: Monte Alegre

CEP: 14.040-904

UF: SP

Município: RIBEIRÃO PRETO

Telefone: (16)3602-0251

Fax: (16)3602-4102

E-mail: cep@forp.usp.br

FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO
PRETO/ FORP/ USP

Continuação do Parecer: 898.305

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Adequados.

Recomendações:

Não há.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Protocolo aprovado. Os relatórios (parciais/final) deverão ser encaminhados, utilizando-se da opção "Enviar Notificação" (descrita no Manual "Submeter Notificação", disponível na Central de Suporte – canto superior direito do portal www.saude.gov.br/plataformabrasil).

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Aprovado "ad referendum" do CEP.

RIBEIRAO PRETO, 04 de Dezembro de 2014

Assinado por:
Simone Cecilio Hallak Regalo
(Coordenador)

Endereço: Avenida do Café s/nº

Bairro: Monte Alegre

CEP: 14.040-904

UF: SP

Município: RIBEIRAO PRETO

Telefone: (16)3602-0251

Fax: (16)3602-4102

E-mail: cep@forp.usp.br

Anexo B

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Nós, Profa. Dra. Mírian Aiko Nakane Matsumoto e Marília Rodrigues Moreira convidamos você _____, a participar da pesquisa "Avaliação da liberação de Bisfenol A de resinas ortodônticas: estudo *in vitro* e *in vivo*". Esta pesquisa tem como objetivo avaliar a liberação de uma substância pelo material utilizado para colar os bráquetes nos dentes. Trata-se de um estudo laboratorial e clínico, com coleta de material biológico (saliva e urina) e dados de participantes com indicação para tratamento com aparelhos fixos. Serão incluídos no estudo 20 participantes, que possuam apenas dentes permanentes na boca, que iniciarão tratamento com aparelhos fixos, com bráquetes colados em todos os dentes com resina TRANSBOND XT- 3M (material utilizado para colar os bráquetes nos dentes). Serão coletados saliva e urina nos seguintes momentos:

Antes da colagem dos bráquetes ortodônticos: Saliva e Urina
30 minutos após a colagem dos bráquetes ortodônticos : Saliva
Um dia após a colagem dos bráquetes ortodônticos: Saliva e Urina
Uma semana após a colagem dos bráquetes ortodônticos: Saliva e Urina
Um mês após a colagem dos bráquetes ortodônticos: Saliva e Urina

Após a coleta o material será encaminhado ao laboratório de Química da USP-RP e será descartado após a análise.

Os riscos e os benefícios que podem ocorrer durante a realização da pesquisa serão os mesmos que poderiam ocorrer em decorrência do tratamento ortodôntico normal, ou seja, a pesquisa não vai interferir com o tratamento ortodôntico.

Todos os dados relacionados com você serão confidenciais e sua identidade será mantida em sigilo. A divulgação dos resultados será realizada, preservando a sua identidade, sem divulgação de nomes ou imagens que permitam sua identificação.

A sua participação não é obrigatória, e você poderá desistir a qualquer momento, retirando o seu consentimento. A não participação neste projeto de pesquisa não trará nenhum prejuízo em sua relação com o pesquisador ou com a Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – USP.

Você receberá uma via deste termo, com o endereço e telefone do pesquisador e da secretaria do comitê de ética em Pesquisa da FORP/USP. Caso tenha alguma dúvida você poderá entrar em contato.

Nome da Secretária do CEP: Marcela Scatolin Calache

Endereço e telefone do CEP: Av. do Café s/N - Telefone: 16-3315-0493

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO

Profa. Dra. Mírian Aiko Nakane Matsumoto CPF: 059.580.618-69
Telefone: (16) 3315-3995
Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto –
Departamento de Clínica Infantil

Marília Rodrigues Moreira CPF: 030.088.026-05
Telefones: (16) 3315- 4099, 3315-3995
Celular: (34) 9106-5658
Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto –
Departamento de Clínica Infantil

Haverá assistência financeira relativa a transporte e alimentação aos participantes da pesquisa.

Declaro que entendi os objetivos, riscos e benefícios de minha participação na pesquisa e concordo em participar.

Sujeito da pesquisa e/ou responsável

RG:

Telefone:

Endereço: