UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE ODONTOLOGIA

**AVALIAÇÃO COMPARATIVA DA CITOTOXICIDADE
IN VITRO DOS SOLVENTES UTILIZADOS NO
RETRATAMENTO ENDODÔNTICO**

KAZUMI ONAGA NAGAYAMA OYAMA

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, para obter o Título de Mestre, pelo Programa de Pós-Graduação em Odontologia.

Área de Concentração: Endodontia.

São Paulo

2003

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE ODONTOLOGIA

**AVALIAÇÃO COMPARATIVA DA CITOTOXICIDADE
IN VITRO DOS SOLVENTES UTILIZADOS NO
RETRATAMENTO ENDODÔNTICO**

KAZUMI ONAGA NAGAYAMA OYAMA

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, para obter o Título de Mestre, pelo Programa de Pós-Graduação em Odontologia.

Área de Concentração: Endodontia.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo dos Santos

São Paulo

2003

Data da Defesa: 04/06/03

Comissão Julgadora

Prof. Dr.(a) Marcelo dos Santos

Julgamento: Aprovada Assinatura: _____

Prof. Dr.(a) Celso Luiz Caldeira

Julgamento: Aprovada Assinatura: _____

Prof. Dr.(a) Maria Luiza Moraes Barreto de Chaves

Julgamento: Aprovada Assinatura: _____

Catálogo-na-Publicação
Serviço de Documentação Odontológica
Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

Oyama, Kazumi Onaga Nagayama

Avaliação comparativa da citotoxicidade *in vitro* dos solventes utilizados no retratamento endodôntico / Kazumi Onaga Nagayama Oyama ; orientador Marcelo dos Santos. -- São Paulo, 2003.

111p. : tab., fig. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Odontologia. Área de Concentração: Endodontia) -- Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

1. Endodontia – Solventes – Citotoxicidade – Avaliação comparativa

CDD 617.6342
BLACK D24

DEDICATÓRIA

*Dedico esta vitória, com muito carinho, a você **Silvio**, meu esposo, conselheiro e grande incentivador do meu desenvolvimento. Seu apoio foi fundamental para a minha conquista. Obrigada pela compreensão, amizade e por ter me mostrado o caminho nos momentos mais difíceis desta jornada.*

*Aos meus queridos pais **Takeo e Yukiko Onaga** por terem permitido a minha busca de conhecimentos mostrando-me que tudo é possível quando se tem dedicação e determinação.*

*Aos meus irmãos **Hiroshi, Kiyoshi e Suemi** por entenderem as minhas ausências, por incentivarem meus estudos e por compartilharem cada conquista da minha vida. Por perceberem as minhas angústias e preocupações e acima de tudo por estarem sempre presentes em todas as fases da minha caminhada pessoal, profissional e espiritual.*

Aos meus amados sobrinhos Ayumi, Rika, Mie, Tadashi, Miwa, Akemi, Takeyuki, Felipe, Takeyoshi e Tiemi um legado da minha persistência em apreender conhecimentos deixando como exemplo: que tudo é possível quando se têm objetivos na vida.

Às pessoas queridas que me alegraram pelo prazer de terem cruzado o meu caminho nesta vida. Meus sempre amigos: Adélia, Carlos Ken, Débora Coelho, D. Fátima, D. Sonia, Edson Imai, Eiji, Elza Imai, Evandro, Gisele, Hu, Jorali, Julio, Kana, Kazu, Manami, Maria Luiza, Matiko, Nori, Paulinha e Roseri ofereço a vocês o mérito deste trabalho.

*Ao Prof. Dr. **Marcelo dos Santos** por me oferecer a “grande oportunidade”
de desenvolvimento acadêmico. Agradeço, de coração, pois mostrou-me
que o sucesso, o progresso e o sabor da vitória são resultados de esforços
próprios. Valeu o aprendizado, a convivência, a liberdade para buscar
soluções e acima de tudo acreditar que sou merecedora daquilo que quero e
desejo ser.*

Agradecimento Especial

*À Profa. Dra. **Maria Luiza Moraes Barreto Chaves** em me confiar a “grande oportunidade” a fim de desenvolver a minha pesquisa. Por ter me acolhido e agraciado com sua amizade e seus conhecimentos inigualáveis.*

Tentar mostrar minha gratidão em palavras seria ousar por demais, contudo, não tentar, seria pecar por omissão.

Deixo para o futuro o fruto de dois anos de estudo. Muitas células foram cultivadas e sacrificadas. Foram dias e meses de laboratório. Lembro-me como se fosse hoje: você Professora Maria Luiza e sua equipe de trabalho: Marcela, Erica, Cristiane, Vanessa, Marconi, Hu, Luana, Jô, Prof. Renato, Aulice e Rodrigo orientando e observando os meus primeiros passos no laboratório onde me fizeram sentir orgulho de poder trabalhar naquele local e assim pude empenhar-me para a finalização deste trabalho. A todos vocês que participaram, presenciaram e incentivaram cada fase deste trabalho, minha imensa gratidão. Este mérito é de todos vocês.

*Ao meu amigo, Prof. **Evandro Luiz Siqueira**, meu eterno voto de gratidão pela oportunidade de condecorar-me com a sua confiança, amizade e sinceridade. Tudo isto é fruto do teu semeio e de ter acreditado no meu trabalho.*

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. João Humberto Antoniazzi, grande e iluminado ser em sabedoria, humildade e bondade. Agradeço a doação de seus ensinamentos, a paciência e a oportunidade em seu convívio.

Ao Prof. Dr. Antonio Carlos Bombana pelo carinho, pelo sorriso amigo, pela disposição e orientação nos corredores da disciplina, pela oportunidade de estágio em Endodontia no Curso de Reabilitação Oral. Minha enorme gratidão.

Ao Prof. Dr. Matsuyoshi Mori pela enorme oportunidade de estágio em Endodontia em seu curso de Reabilitação Oral, pela amizade e incentivo nesta minha jornada. Meu muito obrigado.

Ao Prof. Dr. Manuel Eduardo de Lima Machado pela oportunidade em acompanhar as atividades didáticas em Endodontia do curso noturno da FOUSP, minha gratidão.

Ao Prof. Dr. Celso Luiz Caldeira e às Profas. Dras. Manoela Domingues Martins e Márcia Martins Marques pelas preciosas sugestões e comentários melhorando o nível deste trabalho, meus agradecimentos.

Aos Professores da Disciplina de Endodontia: Prof. Dr. Giulio Gavini, Prf. Dr. José Luiz Lage-Marques, Prof. Dr. Abílio Albuquerque M. de Moura, Prof. Dr. Igor Prokopowitsck pela doação de seus conhecimentos durante todo o curso de mestrado.

À Ana Maria e Neuza pela paciência com que trataram e solucionaram as atividades de secretaria, mantendo me informada sobre todas as documentações necessárias durante o meu cumprimento de créditos deste curso. Aos Srs. Aldo e Luizinho pela prestação de serviços durante a confecção do material didático; à vocês meu carinho, minha gratidão.

Aos meus colegas e amigos de turma: Alexandre, Ana Lucia, Ângela, Calil, Cristiane, Daniel, Eduardo, Emerson, Luciano, Miguel, Reinaldo, Ricardo, Sonia e Vera pelo convívio, partilha de conhecimentos e incentivos para que o meu aprendizado e o trabalho de conclusão pudessem ser concretizados.

À Profa. Dra. Claudimara Lotfi pela doação de células congeladas NIH 3T3 para que o trabalho pudesse ser concretizado. Minha gratidão.

Aos meus amigos de consultório: Edison Haruki Tango, Fabio Trevisan, Sandra Yamazaki, Márcia Kamimura, Hu Li Yen, Marcelo Sado e Américo Kurita por estimularem meus estudos e por entenderem as minhas ausências. Compartilho esta vitória com vocês.

Aos meus amigos e colegas de trabalho que permitiram, apoiaram e orientaram a minha atividade didática: Prof. Dr. Marcelo dos Santos, Profa. Dra. Flor Luigina V. Santos, Profa. Patrícia Ferrari, Prof. Evandro Luiz Siqueira, Profa. Cristiane da Costa, Ana, Jussara, Rogério, Patrícia Hazoff e Rocio. Meu reconhecimento.

À Luzia, Cidinha e Solange pelos serviços prestados nas correções de referências bibliográficas, formatação do texto e realização de ficha catalográfica. À Rosana pela revisão e orientação na confecção de tabelas e gráficos. Meu muito obrigado.

À Profa. Jorali, minha amiga, meu reconhecimento pela doação de seus conhecimentos em língua portuguesa para que este trabalho pudesse ser concretizado.

À querida amiga Hu pela orientação e realização de análise estatística e aos amigos Carlos Ken e Sérgio pelo auxílio nas fotografias e impressão do texto. Muitíssimo obrigado.

SUMÁRIO

p.

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

LISTA DE SÍMBOLOS

RESUMO

1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO DA LITERATURA	4
3 PROPOSIÇÃO.....	24
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	25
4.1 Material.....	25
4.1.1 Linhagem celular	26
4.1.2 Grupos experimentais.....	28
4.1.3 Etapas experimentais	28
4.2 Métodos	29
4.2.1 Cultivo celular.....	29
4.2.2 Tratamentos.....	30
4.2.3 Determinação da viabilidade celular.....	31
4.3 Análise estatística	32
5 RESULTADOS	33

6 DISCUSSÃO.....	61
7 CONCLUSÕES.....	75
ANEXOS	76
REFERÊNCIAS.....	98
<i>SUMMARY</i>	

LISTA DE FIGURAS

- Figura 4.1 - Fotomicrografia de cultura de células de fibroblastos NIH 3T3, com filtro verde (aumento de 100X).....27
- Figura 4.2 - Fotomicrografia de cultura de células de fibroblastos NIH 3T3, sem filtro verde (aumento de 100X).....27
- Figura 4.3 - Área interna do fluxo laminar para o cultivo celular30
- Figura 4.4 - Fotomicrografia da câmara de Neubauer, somente as células em morte celular se apresentam coradas em azul e com limites irregulares. As demais se apresentam arredondadas, transparentes, com a membrana refringente e com limites nítidos (aumento de 200X).....32
- Figura 5.1 - Viabilidade celular quando da exposição aos solventes em diferentes concentrações para o período de 5 minutos. A concentração 0% corresponde ao grupo controle com número de células no momento do tratamento36

Figura 5.2 - Gráfico com as curvas dos valores correspondentes a porcentagem das células viáveis após a exposição de 5 minutos nas diferentes concentrações dos solventes estudados	37
Figura 5.3 - Viabilidade celular quando da exposição aos solventes nas concentrações de 0, 10 e 25% para o período de 10 minutos. A concentração 0% corresponde ao grupo controle com número de células no momento do tratamento	41
Figura 5.4 - Gráfico com as curvas dos valores correspondentes a porcentagem das células viáveis após a exposição de 10 minutos nas concentrações de 0, 10 e 25% dos solventes estudados.....	42
Figura 5.5 - Viabilidade celular quando da exposição aos solventes nas concentrações de 0, 10 e 25% para o período de 15 minutos. A concentração 0% corresponde ao grupo controle com número de células no momento do tratamento	46
Figura 5.6 - Gráfico com as curvas dos valores correspondentes a porcentagem das células viáveis após a exposição de 15 minutos nas concentrações de 0, 10 e 25% dos solventes estudados.....	47

- Figura 5.7 - Viabilidade celular quando da exposição direta ou indireta dos solventes sobre as células em cultura, nas concentrações de 0, 5 e 10% no período de 5 minutos. A concentração 0% corresponde ao grupo controle com número de células no momento do tratamento52
- Figura 5.8 - Gráfico com as curvas dos valores correspondentes a porcentagem das células viáveis após a exposição de 5 minutos nas concentrações de 0, 5 e 10% dos solventes estudados em contato direto e indireto53
- Figura 5.9- Gráfico que representa os valores da média $\pm$ desvio padrão do número de células viáveis dos solventes testados na concentração de 5% para o período de 5 minutos, os solventes foram previamente solubilizados em álcool absoluto58

LISTA DE TABELAS

Tabela 5.1 - Valores da média $\pm$ desvio padrão correspondentes ao número de células viáveis ($\times 10^4$) quando da exposição aos solventes testados em diferentes concentrações para o período de 5 minutos. n= número de poços com células, utilizados para o tratamento	34
Tabela 5.2 - Teste de comparação múltipla Tukey-Kramer, período de 5 minutos e concentração de 5%	38
Tabela 5.3 - Teste de comparação múltipla Tukey-Kramer, período de 5 minutos e concentração de 10%	38
Tabela 5.4 - Teste de comparação múltipla Tukey-Kramer, período de 5 minutos e concentração de 25%	39

Tabela 5.5 - Valores da média $\pm$ desvio padrão correspondentes ao número de células viáveis ($\times 10^4$) quando da exposição aos solventes testados, nas concentrações de 0, 10 e 25% para o período de 10 minutos. n= número de poços com células, utilizados para o tratamento	40
Tabela 5.6 - Teste de comparação múltipla Tukey-Kramer, período de 10 minutos e concentração de 10%	43
Tabela 5.7 - Teste de comparação múltipla Tukey-Kramer, período de 10 minutos e concentração de 25%	43
Tabela 5.8 - Valores da média $\pm$ desvio padrão correspondentes ao número de células viáveis ($\times 10^4$) quando da exposição aos solventes, nas concentrações de 0, 10 e 25% para o período de 15 minutos. n= número de poços com células, utilizados para o tratamento	44
Tabela 5.9 - Teste de comparação múltipla Tukey-Kramer, período de 15 minutos e concentração de 10%	48
Tabela 5.10 - Teste de comparação múltipla Tukey-Kramer, período de 15 minutos e concentração de 25%	48

Tabela 5.11 - Valores da média $\pm$ desvio padrão correspondentes ao número de células viáveis ($\times 10^4$) quando da exposição aos solventes, analisados em formas de contato direto e indireto, nas concentrações de 0, 5 e 10% para o período de 5 minutos. n= número de poços com células, utilizados para o tratamento....49

Tabela 5.12 - Teste de comparação múltipla Tukey-Kramer, período de 5 minutos e concentração de 5%. Formas de contato direto ou indireto sobre as células em cultura54

Tabela 5.13 - Teste de comparação múltipla Tukey-Kramer, período de 5 minutos e concentração de 10%. Formas de contato direto ou indireto sobre as células em cultura55

Tabela 5.14 - Valores da média $\pm$ desvio padrão correspondentes ao número de células viáveis ($\times 10^4$) quando da exposição aos solventes, na concentração de 5% para o período de 5 minutos, os solventes foram previamente solubilizados em álcool absoluto. n= número de poços com células, utilizados para o tratamento. O controle corresponde ao grupo com a mesma proporção de álcool absoluto utilizado para solubilizar os solventes57

Tabela 5.15 - Teste de comparação múltipla Tukey-Kramer, período de 5 minutos e concentração de 5%, solventes previamente solubilizados em álcool absoluto	59
Tabela 5.16 - Percentual de número de células viáveis quando da exposição aos solventes testados, em diferentes etapas experimentais, na concentração de 5% para o período de 5 minutos	60
Tabela AnA1 - Valores originais do número de células viáveis ($\times 10^4$) no experimento com concentrações de 0, 5, 10, 25, 50 e 100% do solvente óleo de laranja para o tempo de 5 minutos	77
Tabela AnA2 - Valores originais do número de células viáveis ($\times 10^4$) no experimento com concentrações de 0, 5, 10, 25, 50 e 100% do solvente eucaliptol para o tempo de 5 minutos	78
Tabela AnA3 - Valores originais do número de células viáveis ($\times 10^4$) no experimento com concentrações de 0, 5, 10, 25, 50 e 100% do solvente xilol para o tempo de 5 minutos	79
Tabela AnA4 - Valores originais do número de células viáveis ($\times 10^4$) no experimento com concentrações de 0, 5, 10, 25, 50 e 100% do solvente clorofórmio para o tempo de 5 minutos	80

Tabela AnA5 - Valores originais do número de células viáveis ($\times 10^4$) no experimento com concentrações de 0, 5, 10, 25, 50 e 100% do solvente halotano para o tempo de 5 minutos	81
Tabela AnB1 - Valores originais do número de células viáveis ($\times 10^4$) no experimento com concentrações de 0, 10 e 25% do solvente óleo de laranja para o tempo de 10 minutos	82
Tabela AnB2 - Valores originais do número de células viáveis ($\times 10^4$) no experimento com concentrações de 0, 10, 25% do solvente eucaliptol para o tempo de 10 minutos	83
Tabela AnB3 - Valores originais do número de células viáveis ($\times 10^4$) no experimento com concentrações de 0, 10, 25% do solvente xilol para o tempo de 10 minutos	84
Tabela AnB4 - Valores originais do número de células viáveis ($\times 10^4$) no experimento com concentrações de 0, 10, 25% do solvente clorofórmio para o tempo de 10 minutos	85
Tabela AnB5 - Valores originais do número de células viáveis ($\times 10^4$) no experimento com concentrações de 0, 10, 25% do solvente halotano para o tempo de 10 minutos	86

Tabela AnB6 - Valores originais do número de células viáveis ($\times 10^4$) no experimento com concentrações de 0, 10, 25% do solvente óleo de laranja para o tempo de 15 minutos	87
Tabela AnB7 - Valores originais do número de células viáveis ($\times 10^4$) no experimento com concentrações de 0, 10, 25% do solvente eucaliptol para o tempo de 15 minutos	88
Tabela AnB8 - Valores originais do número de células viáveis ($\times 10^4$) no experimento com concentrações de 0, 10, 25% do solvente xilol para o tempo de 15 minutos	89
Tabela AnB9 - Valores originais do número de células viáveis ($\times 10^4$) no experimento com concentrações de 0, 10, 25% do solvente clorofórmio para o tempo de 15 minutos	90
Tabela AnB10 - Valores originais do número de células viáveis ($\times 10^4$) no experimento com concentrações de 0, 10, 25% do solvente halotano para o tempo de 15 minutos	91

Tabela AnC1 - Valores originais do número de células viáveis ($\times 10^4$) no experimento com concentrações de 0, 5 e 10% do solvente óleo de laranja para o tempo de 5 minutos. Solvente em contato direto com as células de fibroblastos com auxílio de lamínula de vidro e solvente vertido sobre o DMEM92

Tabela AnC2 - Valores originais do número de células viáveis ($\times 10^4$) no experimento com concentrações de 0, 5 e 10% do solvente eucaliptol para o tempo de 5 minutos. Solvente em contato direto com as células de fibroblastos com auxílio de lamínula de vidro e solvente vertido sobre o DMEM93

Tabela AnC3 - Valores originais do número de células viáveis ($\times 10^4$) no experimento com concentrações de 0, 5 e 10% do solvente xilol para o tempo de 5 minutos. Solvente em contato direto com as células de fibroblastos com auxílio de lamínula de vidro e solvente vertido sobre o DMEM94

Tabela AnC4 - Valores originais do número de células viáveis ($\times 10^4$) no experimento com concentrações de 0, 5 e 10% do solvente clorofórmio para o tempo de 5 minutos. Solvente em contato direto com as células de fibroblastos com auxílio de lamínula de vidro e solvente vertido sobre o DMEM95

Tabela AnC5 - Valores originais do número de células viáveis ($\times 10^4$) no experimento com concentrações de 0, 5 e 10% do solvente halotano para o tempo de 5 minutos. Solvente em contato direto com as células de fibroblastos com auxílio de lamínula de vidro e solvente vertido sobre o DMEM96

Tabela AnD - Valores originais do número de células viáveis ($\times 10^4$) no experimento com concentrações de 5% dos solventes estudados para o tempo de 5 minutos. Solventes foram solubilizados previamente em álcool absoluto.....97

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

cm	Centímetros
d	contato direto
in	contato indireto
DMEM	Meio de cultura Eagle modificado por Dulbecco
DMSO	Di-metil Sulfóxido
FBS	Soro fetal bovino
mL	Mililitros
NIH	“National Institute of Health”
ns	não significante
PBS	Solução Balanceada de Fosfato
pH	Potencial hidrogeniônico
P/S	Penicilina/Estreptomicina
µL	Microlitros
p	probabilidade
s	significante

LISTA DE SÍMBOLOS

n	tamanho da amostra
%	sinal matemático que indica porcentagem
	sinal matemático que indica menor ou igual
°C	graus centígrado
CO ₂	dióxido de carbono

RESUMO

AVALIAÇÃO COMPARATIVA DA CITOTOXICIDADE *IN VITRO* DOS SOLVENTES UTILIZADOS NO RETRATAMENTO ENDODÔNTICO

O objetivo deste estudo foi comparar a citotoxicidade *in vitro* dos solventes utilizados em terapia de retratamento endodôntico: óleo de casca de laranja, eucaliptol, xilol, clorofórmio e halotano através da avaliação da citotoxicidade de cada solvente em diferentes concentrações finais e condições de contato com as células de fibroblastos de linhagem NIH 3T3. O experimento foi dividido em 4 etapas: etapa 1- os solventes foram misturados em meio de cultura (DMEM) nas concentrações finais de 0, 5, 10, 25, 50 e 100% e depositados sobre a cultura de células para o tempo de 5 minutos; etapa 2- os solventes foram misturados em meio de cultura nas concentrações finais de 0, 10 e 25% e depositados sobre a cultura de células para os tempos de 10 e 15 minutos; etapa 3a- os solventes foram depositados sobre as células de fibroblastos (contato direto) e acrescido de meio de cultura; etapa 3b- onde os fibroblastos receberam o meio de cultura e sobre este depositado os solventes testes (contato indireto) nas concentrações finais de 0, 5 e 10% para o tempo de 5 minutos; etapa 4- os solventes foram previamente solubilizados com o álcool absoluto na proporção de 1:1 e depois misturados

ao meio de cultura na concentração final de 5% para o tempo de 5 minutos. A avaliação foi realizada pela contagem celular através de método de exclusão de células coradas pelo azul Trypan. Os resultados obtidos nos permitiram concluir que todos os solventes testados são citotóxicos *in vitro*, sendo que o óleo de laranja foi o menos tóxico, ao permitir alguma viabilidade celular. Observou-se ainda que o preparo prévio dos solventes influenciou no percentual de células viáveis.

1 INTRODUÇÃO

O tratamento endodôntico busca a eliminação de microrganismos do sistema de canais radiculares e posterior obturação de modo a garantir a integridade dos tecidos periapicais. A terapia endodôntica convencional é eficaz em aproximadamente 90% dos casos; porém, por motivos diversos, a vantagem dos microrganismos às resistências orgânicas observadas pela lesão periapical decorrente de sua disseminação e invasão no periápice, em conjunto com a resposta sintomatológica, após tratamento endodôntico, caracterizam os primeiros vestígios de fracasso endodôntico e o re-tratamento torna-se necessário.

Uma vez determinado o insucesso endodôntico recorre-se ao retratamento conservador como a primeira alternativa escolhida pelos clínicos.

O retratamento endodôntico consiste na remoção do material existente dentro do conduto radicular, composto geralmente de um cimento obturador e um material semi-sólido, a guta-percha, seguida da re-instrumentação do canal e re-obturaço. Normalmente um procedimento tedioso e que consome muito tempo do profissional.

Diversas técnicas são sugeridas, para proporcionar a rapidez, a eficiência e a praticidade na manobra de desobturação. Exemplos: a utilização de instrumentos aquecidos, aparelhos ultrasônicos, uso de brocas Gates-Glidden e para todas essas técnicas o uso de um solvente parece ser extremamente válido como coadjuvante na remoção da guta percha.

O solvente orgânico atua sobre a guta percha promovendo solubilização, facilitando assim a remoção do material obturador. Dentre os solventes mais utilizados para essa finalidade podemos citar o clorofórmio e o eucaliptol, amplamente utilizados desde 1850. O primeiro é considerado muito eficaz, porém, de utilização bastante questionada, devido à necessidade de reposição constante. Por alguns anos o uso do clorofórmio esteve banido em seres humanos, por ser considerado uma substância citotóxica e com potencial carcinogênico. O segundo por sua vez, apesar de apresentar menores efeitos deletérios, parece não ser eficaz ao seu objetivo (Zakariasen *et al.*, 1990).

Outro solvente muito utilizado pelos profissionais é o xilol. Este, embora bastante eficaz, parece exercer alguns efeitos indesejáveis aos tecidos, como, por exemplo: irritação na mucosa por contato e por inalação ou ainda causar discrasias sanguíneas, convulsão, insônia, excitação e depressão do Sistema Nervoso Central, podendo levar à morte por depressão respiratória (Pécora *et al.*, 1993).

A avaliação da biocompatibilidade dessas substâncias é de extrema importância, uma vez que essas são aplicadas no interior do canal radicular e, desta forma, podem eventualmente atingir a região apical e apresentar um

possível efeito lesivo sobre as células vivas dessa região. A utilização de testes, *in vitro*, por meio de ensaios de viabilidade celular, constitui o primeiro passo para a avaliação da compatibilidade biológica de uma substância e pode fornecer elementos importantes para a análise da biocompatibilidade dos diferentes materiais.

Tentando minimizar a divergência entre a efetividade e a toxicidade dos solventes, algumas substâncias alternativas, como o halotano e o óleo de laranja, têm sido sugeridas ultimamente, o primeiro, um anestésico utilizado por inalação e o segundo usado em farmacologia para aromatizar e dar sabor. Ambos apresentando eficácia na solubilização de guta percha. Entretanto, não existem relatos quanto à sua toxicidade ou outras características relacionadas à citotoxicidade.

Diante do conhecimento atual sobre as toxicidades dos solventes de guta percha, sabe-se que os mais eficientes, como o clorofórmio e xilol, são os mais tóxicos. Cabe assim a busca continuada de uma solução ou produto capaz de solubilizar satisfatoriamente a mesma, minimizando seus efeitos indesejáveis. Por essa razão esse estudo buscou analisar a citotoxicidade de diversas substâncias utilizadas na clínica endodôntica com o objetivo de solubilizar a guta-percha.

2 REVISÃO DA LITERATURA

De acordo com Paiva & Antoniazzi (1988), o objetivo da terapia endodôntica é todo dirigido no sentido de se obter processo reparativo no menor intervalo de tempo após a intervenção praticada e que tenha seu fecho de forma normal, como se com ele nada tivesse acontecido e assim permitindo ao dente o retorno às suas tarefas específicas.

O sucesso do tratamento endodôntico é apreciado pelas informações obtidas através de exames clínicos acrescidos da análise da imagem radiográfica. Porém, cabe ao dentista a compreensão dos fundamentos gerais do processo reparador para permitir, através da correlação com os achados clínico-radiográficos, ajuizar-se sobre o bom e mau êxito do tratamento realizado e adotar medidas conseqüentes à superação de falhas e dificuldades ligadas à prática endodôntica (Paiva & Antoniazzi, 1988).

Diante do exposto, é uma tendência atual, tanto dos clínicos como dos pesquisadores, manterem a preocupação em acompanhar e estabelecer os níveis de sucesso alcançado em intervenções endodônticas realizadas, mesmo porque, esses dados poderão conduzir ao aprimoramento de novas propostas técnicas e terapêuticas.

Como pudemos rever na literatura, há quase meio século existe uma preocupação em controlar o tratamento endodôntico realizado. O clássico estudo realizado por Ingle, em 1962, mostrou o controle de 2 anos em 1229 tratamentos endodônticos realizados, chegando ao índice de 94.45% tidos como bem sucedidos e relatando que 63.46% dos fracassos estavam relacionados com a obturação do canal.

Mais tarde, Healing & Tamshe (1970) obtiveram 30% insucesso de dos tratamentos endodônticos realizados em 213 dentes de pacientes que procuraram atendimento na Escola de Medicina Dentária de Jerusalém, no período de 5 anos.

Kerekes & Tronstad (1979) realizaram controle clínico radiográfico dos 501 canais tratados pelos estudantes da Universidade de Oslo e relataram o índice de insucesso de 5%. Os resultados mostraram ainda que 61% do insucesso estavam relacionados com a falha de obturação com selamento apical inadequado.

Barbakow *et al.* (1980) estudaram 566 casos de canais radiculares tratados e obtiveram um índice de 12.6% de insucesso nos 555 canais obturados. Os autores alertaram que a taxa de insucesso foi ainda maior quando o limite da obturação foi inadequado.

Desta forma argüimos que a precaução no tratamento deve ser ponto fundamental para o êxito da terapia endodôntica. Se o retratamento for inevitável, vale ressaltar que é através de um estudo criterioso da situação clínica como um todo, que se definirá como e quando se fará a nova intervenção, quer seja a cirúrgica ou de retratamento convencional. O desejo

principal da reintervenção é ganhar acesso ao comprimento ideal de trabalho do canal radicular (Friedman & Stabholz, 1986; Stabholz & Friedman, 1988).

Preocupados com a grande ocorrência de casos de retratamento endodôntico em prática clínica e pouca abordagem desse assunto na literatura, alguns pesquisadores propuseram discutir os critérios para a seleção de caso e guias de plano de tratamento para retratamento endodôntico.

A persistência de sintomatologia pós-tratamento, como: sensibilidade à percussão, à temperatura e a presença de sinais clínicos da doença periapical como fístula, defeito periodontal e sinais radiográficos seriam fatores relacionados ao diagnóstico que após obtenção de informações das prováveis causas, facilitariam o traçado do plano de tratamento. E o profissional deveria alcançar um balanço para decidir qual seria a escolha de tratamento, evitando falhas desnecessárias devido à escolha errada na seleção do caso, ainda avaliar se existe cooperação do paciente e como está a habilidade profissional (Friedmann & Stabholtz, 1986; Stabholtz & Friedmann, 1988; Lovdahl, 1992).

Apesar de não ser o objetivo do trabalho, avaliar técnicas ou procedimentos cirúrgicos, é importante salientar que a cirurgia apical tem atuado com eficiência para a resolução dos insucessos endodônticos. Todavia, Luebke *et al.* (1964) advertiram haver uso abusivo desta prática que deveria ser reservada somente a casos especiais onde o retratamento for considerado de alto risco ou até impossível de ser realizado.

Quanto às manobras de desobturação, vimos que as técnicas de remoção de guta percha incluem o uso de instrumentos manuais, instrumentos aquecidos, sistemas rotatórios, aparelhos de ultra-som e solventes (Taintor *et al.*, 1983; Wilcox *et al.*, 1987; Stabholz & Friedman, 1988; Friedman *et al.*, 1990; Teplitsky *et al.*, 1992; Imura *et al.*, 1996; Ferreira *et al.*, 2001). Em muitos casos, o uso combinado de diferentes técnicas pode ser o mais eficiente método de economizar tempo (Wilcox *et al.*, 1987; Aun & Santos, 1989; Teplitsky *et al.*, 1992; Imura *et al.*, 1996; Gutmann *et al.*, 1997; Ferreira *et al.*, 2001; Betti & Bramante, 2001). Mas, a remoção em muitos casos é operação tediosa e consome tempo, especificamente em canais estreitos e curvos ou quando o material obturador está bem condensado.

Com desenvolvimento de novas gerações de instrumentos, vários relatos foram descritos confirmando as vantagens de instrumento em sistema rotatório de níquel-titânio, incluindo a manutenção da forma de canal sem formação de degrau ou *zip* e com preparo relativamente mais rápido com aparelhos rotatórios quando comparados às limas manuais.

Zakariasen *et al.*, em 1990, propuseram técnica de retratamento endodôntico eliminando a necessidade de clorofórmio como solvente de guta percha. Esta técnica constituía-se de um aquecimento do instrumento calcador elétrico de guta percha e solvente eucaliptol aquecido em conjunto ou isoladamente. Em adição, o ultra-som e as brocas Gattes-Glidden foram sugeridos como complementares úteis à limpeza do canal durante o re-

preparo do sistema de canais radiculares. Observaram que o eucaliptol quando aquecido tornava-se bastante eficaz.

Lu, em 1994, descreveu um método alternativo para a remoção de guta-percha em retratamento endodôntico, utilizando solvente halotano previamente ao emprego de um aparelho de sistema de obturação termoplastificada e afirmou ser uma técnica simples e que consumiu menos tempo que outros métodos comumente empregados.

Imura *et al.* (1996) verificaram a eficiência de remoção de guta percha utilizando canal Finder e instrumentação manual acrescido de solvente e observaram que a combinação da técnica conseguiu remover melhor o material obturador.

Hülsmann & Stotz, em 1997, avaliaram a capacidade de limpeza, eficácia e segurança de diferentes aparelhos para a remoção de guta percha em retratamento. Os autores observaram que houve redução de tempo quando foi associado lima tipo Hedstrom e solvente, apesar de aparelhos rotatórios terem demonstrado serem mais rápidos, a limpeza e a segurança do retratamento de canal foi melhor com instrumentos manuais em conjunto com solvente.

Ferreira *et al.*, em 2001, demonstraram a eficiência de remoção de guta percha comparando o sistema Profiles, limas flexofiles com clorofórmio, limas Hedstrom com clorofórmio e os resultados mostraram que o uso de solvente melhorou a eficiência de limpeza.

Betti & Bramante, em 2001, compararam Sistema Quantec SC e limas manuais com solvente quanto à eficiência de remoção de guta percha e o

tempo despendido durante o retratamento. Os resultados mostraram que o tempo consumido foi significativamente menor com Quantec SC. Quanto à eficiência de limpeza na parede do canal, as limas manuais com solvente apresentaram-se superiores. Os autores sugeriram a combinação de instrumentos rotatórios e limas manuais com solventes durante a desobturação do canal em procedimentos de retratamento endodôntico.

Com o intuito de prevenir injúria ao tecido periapical, autores relataram que a utilização de solventes deveria ser evitada na porção apical do canal radicular (Taintor *et al.*, 1983; Gilbert & Rice, 1987; Gutmann *et al.*, 1997). No entanto, a possibilidade de fratura de instrumento é a maior consideração a ser realizada, pois temos visto, clinicamente, fratura de instrumentos sem serem recuperados.

Diante da possibilidade de acidente no elemento dental durante o procedimento de retratamento endodôntico é prudente que nos milímetros apicais, especialmente em canais curvos, canais com material obturador bem condensado e antigo, o solvente possa ser utilizado para dissolver a guta-percha e o cimento obturador e assim diminuir os riscos de acidentes.

Muitos autores relatam a utilização de algum solvente de guta-percha, no procedimento de retratamento. Por isso, neste momento iremos focar sobre a efetividade de alguns solventes.

Della Nina *et al.* (1980) avaliaram a capacidade de solvência de eucaliptol, xilol, éter, clorofórmio, benzina, terebentina e acetona através da perda de peso dos cones de guta-percha, submetido à ação desses solventes nos períodos de 2, 10 e 30 minutos. Os autores concluíram que

dentre os solventes estudados o que mostrou maior capacidade solvente foi o xilol, sendo que após trinta minutos a guta-percha ficou tão amolecida que impediu a continuação do processo de avaliação.

Tamse *et al.*, em 1986, descreveram um método para comparar os solventes de guta percha e demonstraram que existem alterações de solubilização em diferentes marcas comerciais de guta percha, provavelmente devido à variação em sua composição, na quantidade de resina e cera. Os resultados mostraram que a guta percha DMS apresentou maior solubilidade que as outras marcas e o clorofórmio foi o solvente mais eficaz quando comparado ao xilol, endosolv E e óleo essencial de laranja. O endosolv E e o óleo essencial de laranja possuíram atividade solvente somente em algumas marcas comerciais de guta-percha. Os autores enfatizaram a necessidade de avaliar várias marcas comerciais de guta percha quando da realização de testes de solubilização utilizando solventes orgânicos.

Wennberg & Orstavik (1989) avaliaram a capacidade de alguns solventes em dissolver os cones de guta-percha. O xilol e eucaliptol foram comparados ao clorofórmio. O efeito solvente foi avaliado através da mensuração da profundidade de penetração de um pequeno marcador, de peso e formato fixo, dentro do disco de guta-percha coberta com solução teste. O efeito dos solventes foi analisado em períodos de 1, 2, 5, 10, 15 e 30 minutos e o resultado mostrou que o clorofórmio teve efeito marcadamente superior aos outros.

Oyama *et al.* (2003) verificaram a eficácia dos solventes xilol, eucaliptol, óleo da casca de laranja e halotano em dissolver os cones de guta percha através de perda de peso. O efeito solvente foi analisado para os tempos de 1, 5, 10 e 15 minutos. Os resultados mostraram que o xilol foi o mais eficaz para o tempo de 5 minutos, porém ao final dos tempos estudados o óleo da casca de laranja mostrou ser mais eficaz seguido por xilol, eucaliptol e halotano.

Como pudemos observar os solventes têm como objetivo facilitar a remoção do material obturador, através de solubilização deste, com o destaque especial para clorofórmio e xilol. No entanto, existe uma grande preocupação em relação aos efeitos deletérios relatados particularmente a estes dois solventes. Assim, no início da década de 90 ocorreu uma intensa busca a um solvente alternativo.

Verificando a necessidade de identificar um outro solvente de guta-percha que não estivesse listado como possível carcinogênico e que pudesse ser mais eficaz que o eucaliptol, Wourms *et al.* (1990) propuseram a avaliação de um solvente eficaz em dissolver a guta-percha. Para tanto, a solubilidade de guta percha com peso padronizado foi testado em 5 mL de cada solvente. Dos 32 tipos de solventes analisados os autores relataram que o halotano demonstrou qualidade de trabalho favorável, em relação aos demais utilizados até aquele momento.

Kaplowitz, em 1990, mencionou que a utilização do clorofórmio em seres humanos foi proibida pela FDA (*Foods and Drugs Administration*), desde 1976. Assim, o autor estudou os solventes: turpentina, óleo de

melaleuca, eucaliptol, óleo de pinha branca e óleo de agulha de pinha e os comparou ao clorofórmio, na tentativa de encontrar um alternativo aceitável para a solubilização da guta-percha. Concluiu que todos os solventes estudados dissolveram os corpos de prova em no mínimo 50% em 15 minutos a 37°C, enquanto que o clorofórmio e a turpentina os haviam dissolvido completamente.

Ladley *et al.* (1991), preocupados com o potencial carcinogênico do clorofórmio, direcionaram a pesquisa em encontrar um solvente alternativo. Para tanto, avaliaram o halotano, um anestésico comumente utilizado por inalação. Observaram que possui ação em dissolver a guta-percha e acrescentaram ser um produto não irritante, não inflamável e nem explosivo.

Hunter *et al.* (1991) procuraram produto alternativo ao clorofórmio e investigaram o halotano e o eucaliptol e concluíram que foram alternativos aceitáveis para a prática clínica.

Pécora *et al.* (1992), preocupados com os canais radiculares obturados com diferentes tipos de cimentos e na eventual necessidade de um retratamento de um canal que estivesse obturado somente com cimento de óxido de zinco e eugenol, propuseram um óleo essencial vegetal eficaz na desintegração desse cimento no interior do canal radicular. Sabe-se que, esse tipo de cimento não é solúvel em solventes químicos apropriados para a guta-percha, além de não apresentar colofônia, uma resina vegetal para proporcionar adesividade, plasticidade e resistência à solubilidade, na sua composição. O óleo, extraído do epicárpio do fruto da “laranjeira doce”-*Citrus aurantium* é de fácil obtenção, propiciaria uma rápida desobturação do canal

obturado somente com cimento de óxido de zinco. Os experimentos *in vitro* demonstraram que a desobturação de um canal radicular obturado com cimento de óxido de zinco e eugenol, com auxílio de alargador e clorofórmio, gastou em média 25 minutos e que a desobturação com o auxílio de um alargador e óleo de laranja gastou em média, 6 minutos. Já os experimentos *in vivo* mostraram que quando não foi possível realizar desobturação de um canal radicular tratado com cimento de óxido de zinco e eugenol com auxílio dos solventes comumente utilizados (éter, clorofórmio, xilol e eucaliptol), já o óleo de laranja promoveu a desobturação de maneira bastante aceitável.

Pécora *et al.* (1993) estudaram *in vitro* o tempo de amolecimento de cones de guta-percha através da ação de cinco solventes químicos: xilol, clorofórmio, turpentina, eucaliptol e óleo de laranja. Para isso utilizaram um aparelho que reproduziria a força de penetração de uma lima endodôntica. As raízes de dentes previamente obturadas e seccionadas constituíram o corpo de prova. Os autores observaram que o clorofórmio proporcionou maior rapidez de amolecimento sobre a guta-percha e o mais lento foi o eucaliptol. O óleo de laranja apresentou ação semelhante ao xilol. Relataram ainda que seu uso não apresenta efeitos deletérios à saúde, possui característica química de pouca solubilidade em água, porém solúvel em álcool, usado em farmacologia para aromatizar e dar sabor, tendo ainda ação expectorante.

Diante da controvérsia existente sobre a toxicidade de clorofórmio, os cirurgiões dentistas deveriam desejar uma técnica de retratamento

endodôntico que pudesse eliminar a utilização do clorofórmio e que ainda alcançasse um resultado eficaz e eficiente.

Spanó *et al.* (1995) estudaram a capacidade solvente dos óleos essenciais: eucaliptol, turpentina, óleo de laranja e suas respectivas associações sobre a guta percha, utilizando o clorofórmio como controle. Os autores tinham como objetivo encontrar um alternativo para esse solvente tóxico. Para tanto utilizaram um aparelho denominado Penetrômetro PVS, os dados obtidos foram anotados e os resultados mostraram que clorofórmio foi o melhor, seguido por óleo de laranja e associação óleo de laranja+turpentina.

Wilcox (1995) comparou a capacidade de halotano e clorofórmio em remover a guta-percha e o tempo necessário para retratar o canal radicular. Para esse experimento foram utilizados trinta dentes pré-molares inferiores, preparados, obturados e armazenados em umidade por catorze meses. Posteriormente foram retratados, utilizando-se em um grupo o solvente clorofórmio e no outro o halotano. Os resultados mostraram que não houve diferença significativa entre os solventes testados. Quanto à decisão sobre qual solvente utilizar para o retratamento a autora sugeriu um balanço entre uso prático eficiente de tempo e a necessidade de segurança.

Görduysus *et al.* (1997) avaliaram comparativamente a eficiência de solubilização de clorofórmio, xilol, eucaliptol, halotano, turpentina, acetona, álcool e óleo de melaleuca em um corpo de prova de guta-percha. A análise foi realizada através da perda de peso do corpo de prova nos períodos de 2, 24 e 48 horas. Os resultados revelaram que o halotano, clorofórmio e xilol

apresentaram efetividade maior e concluíram que o halotano pode ser um alternativo ao clorofórmio e xilol.

Uemura *et al.*, em 1997, avaliaram eucaliptol e d-limonene na capacidade de dissolver guta-percha, no intuito de investigar substitutos não carcinogênicos. Os autores relataram que ao realizar o estudo observaram a necessidade de reposição constante do clorofórmio, reforçando a necessidade de escolha para outros solventes analisados neste estudo.

Durante o levantamento dos solventes alternativos observamos também que houve a preocupação quanto ao efeito destes às estruturas do órgão dental.

Kaufman *et al.*, em 1997, estudaram o efeito de solventes de guta percha sobre os níveis de cálcio e fosfato em cortes de dentina humano. Para este estudo utilizaram dentes humanos intactos e frescos onde foram cortados e tratados com clorofórmio, xilol e endosolv E. O tratamento consistiu em embeber os espécimes de cada grupo durante 15 e 30 minutos em solução teste. Após esses intervalos os espécimes foram enxaguados, secos e preparados para análise de espectrometria dispersiva de energia de superfície. Os níveis de cálcio e fósforo foram anotados e as diferenças entre os grupos teste foram analisadas estatisticamente. As mudanças dos níveis de cálcio e fósforo foram mínimas e estatisticamente não significantes. Os resultados mostraram que todos os solventes estudados possuíram efeito similar sobre a estrutura de dentina e concluíram que o clínico deveria selecionar o solvente apropriado para o procedimento de retratamento de acordo com o seu julgamento.

Rotstein *et al.* (1999) avaliaram o efeito de solventes: clorofórmio, xilol, e halotano sobre a microdureza de esmalte e dentina e concluíram que todos causaram um efeito de amolecimento significativo em ambas estruturas e este amolecimento foi aparente após 5 minutos de tratamento.

Com a necessidade de determinar guias de recomendações adequadas para a indústria de higiene, pesquisa em espécies de animais de laboratório foi realizada para averiguar a toxicidade por inalação crônica ao vapor de clorofórmio.

Torkelson *et al.* (1976) determinaram a toxicidade de clorofórmio em animais de laboratório em única ou repetida exposição. A absorção de clorofórmio através da pele dos coelhos foi aparente, mas não excedeu ao dano agudo causado em prática. O clorofórmio líquido produziu injúria leve aos olhos de coelhos em uma semana. Exposição repetida de 1 hora ao longo de 5 dias da semana, durante 6 meses, com exposição ao vapor de 25 ppm (partícula por milhão) de clorofórmio resultou em efeito adverso em todos espécimes estudados: ratos, coelhos, porcos e cães. O efeito de 25 ppm foi leve e reversível. Com base nos dados experimentais e em relatos publicados com carbono tetracloreto, os autores sugeriram que profissionais com exposição repetida ou prolongada devem manter a concentração de exposição ao clorofórmio abaixo de 25 ppm.

Após a proibição do uso de clorofórmio em medicamentos e produtos cosméticos houve confusão com relação ao emprego desta substância na odontologia, por ser considerado não seguro. Assim, McDonald & Vire (1992) realizaram uma revisão sobre o papel do clorofórmio na odontologia e

descreveram uma investigação clínico-ocupacional com os possíveis efeitos deletérios do uso do clorofórmio no consultório. Os autores realizaram tratamento endodôntico utilizando clorofórmio e verificaram que não houve efeito lesivo à saúde tanto para o profissional quanto para o assistente. Além disso, os níveis de vapor no ar ficaram bem abaixo dos níveis recomendados pela Saúde Ocupacional e Administração de Segurança. Os autores concluíram que com uso cuidadoso e controlado, o clorofórmio pode ser adjunto útil na prática odontológica e que a *Food and Drug Administration* (FDA) não tinha jurisdição sobre o uso de clorofórmio na prática clínica e não provaram que o clorofórmio fosse realmente carcinogênico para humanos.

O método de avaliação biológica *in vitro* foi descrito inicialmente no século XIX, principalmente no campo de embriologia. Foi Harrison (1907) *apud* Freshney (2000) quem demonstrou a manutenção da função normal através de cultura de tubo medular do embrião do sapo. A partir daí, as técnicas de cultura celular se desenvolveram rapidamente.

Kawahara *et al.*, em 1968, conduziram trabalho de teste biológico de materiais odontológicos através de cultura de tecidos e relataram que os métodos *in vitro* permitiram um controle mais fácil e com maior precisão estatística. Relatou a impossibilidade de investigar continuamente a reação tecidual e celular dos materiais, utilizando técnica *in vivo*, além de mostrarem resultados com grandes desvios devido à existência de fatores desconhecidos. Advertiram que os resultados de pesquisas poderiam variar de acordo com o método utilizado, principalmente com relação ao preparo, estado físico, área e contato do material a ser testado. Mencionaram que a

citotoxicidade de alguns cimentos odontológicos estudados estavam relacionados à mudança de pH do meio de cultura para ácido. O principal fator causador de dano celular era a alta acidez por longo período. Ressaltaram ainda que o método *in vitro* tornou-se um método importante para padronização biológica de materiais odontológicos.

Browne & Tyas (1979) realizaram uma revisão sobre os tipos celulares, o estado físico dos materiais, o método para estabelecer o contato célula e material-teste e o critério de avaliação da citotoxicidade dos materiais restauradores. Os autores alertaram que não existe uma correlação adequada entre os resultados obtidos *in vivo* e *in vitro* e por isso os resultados deveriam ser interpretados com precaução. Ainda, os autores sugeriram o desenvolvimento de um sistema teste que permitisse a simulação clínica real e o estabelecimento da patogenia do dano celular após exposição aos materiais teste.

Existem três técnicas básicas *in vitro*: cultura de órgão, cultura tecidual e cultura celular. Neste momento enfocaremos a técnica de cultura celular.

A cultura *in vitro* foi introduzida como um método de estudar o comportamento de células animais sem a interferência de variações sistêmicas, como homeostase normal e estresse experimental, que poderia surgir no animal. Pode ser adaptado para determinar efeitos de curto e longo prazo além de propiciar condições laboratoriais estritas e ainda é reproduzível, rápido, barato e sem limitação ética (Spangberg & Conn, 1978; Browne, 1988; Freshney, 2000).

Testes de viabilidade são utilizados para medir a proporção de células viáveis seguido a um procedimento traumático potencial, tais como a desagregação primária, separação celular ou durante a fase de congelamento e descongelamento.

Pela literatura citada até o momento sobre os solventes alternativos, e das mais novas tendências conferimos, portanto, a necessidade de substâncias biocompatíveis. Diante disto, deve-se conseqüentemente realizar testes apropriados de citotoxicidade e adicionalmente interpretar corretamente estes testes e transportá-los às condições clínicas.

Grande gama de modelos experimentais foi utilizada, o que tornou pesquisa comparativa da literatura muito difícil. Diante desse fato, Spangberg & Pascon (1988) verificaram a importância do preparo dos materiais para expressar a citotoxicidade, durante uma avaliação *in vitro* de biomateriais, sob condições de cultura idênticas. O resultado mostrou que o preparo do material pode alterar significativamente o efeito citotóxico aparente de um material. Os autores concluíram que a comparação de resultados de experimentos *in vivo* e *in vitro* pode ser realizada somente quando as condições de cultura e materiais forem similares. A utilização de materiais teste através de preparo artificial não forneceu resposta apropriada; com relação a citotoxicidade geral, tais ajustes auxiliaram no estudo dos componentes dos materiais e do mecanismo de toxicidade.

A guta-percha tem sido o material mais amplamente utilizado como material obturador, por possuir baixa toxicidade e ser inerte. Porém, recentemente, as suas características têm sido alteradas com o propósito de

ativar as propriedades complementares, o que poderia potencializar outras reações teciduais ao novo material. Diante disso, Pascon & Spangberg (1990) propuseram um trabalho *in vitro* sobre a toxicidade de algumas marcas comerciais de guta-percha, através do teste de liberação de radiocrômio. A guta-percha, após ser dissolvida por clorofórmio ou aquecida, foi espalhada até cobrir o fundo do recipiente-teste e a seguir uma suspensão de células L929 foi adicionada ao recipiente. Após a incubação a 37°, por 4 e 24 horas, o radiocrômio extra celular no meio de cultura foi mensurado e calculado, em termos percentuais. A liberação espontânea de radiocrômio foi utilizada como controle e o resultado foi considerado dentro dos limites de normalidade em 4 ou 24 horas. Todas as guta-perchas dissolvidas em clorofórmio mostraram baixa toxicidade em 4 horas, porém, quando esta foi aquecida, houve diferença significativa em 4 horas; ambas foram tóxicas quando deixadas por 24 horas. Os materiais crus não foram tóxicos, mas o óxido de zinco e os íons de zinco mostraram marcada toxicidade. Todos os cones de guta-percha testados foram tóxicos ao longo período de observação e a toxicidade foi atribuída à infiltração de íons zinco dentro dos fluidos.

Barbosa *et al.* (1994) avaliaram o efeito citotóxico *in vitro* de solventes como o halotano e turpentina e os compararam com o do clorofórmio. Os autores utilizaram o método de liberação de radiocrômio em cultura de células, de fibroblastos de ratos, L929. Observaram que todos os solventes testados foram citotóxicos e causaram o mesmo nível de dano celular. Após 24 horas de evaporação no ar, o halotano e o clorofórmio não demonstraram

efeito citotóxico, porém o clorofórmio residual permaneceu por um certo período de tempo e a toxicidade da mistura foi real e o halotano não pareceu ser um solvente alternativo ideal.

Chang & Chou em 2001 avaliaram a citotoxicidade do halotano, em cultura de células fibroblásticas de gengiva humana, relacionando a dose de exposição, frequência e duração. Os materiais foram preparados pela dissolução de 1.0 g de guta-percha em 5 mL de halotano e conservados em frasco de vidro com tampa. O halotano foi diretamente diluído em meio de cultura, sendo a concentração final de 1:5, 1:10, 1:20, 1:40 e 1:80. Os autores concluíram que a baixa concentração e quantidade pequena de solvente podem minimizar o efeito citotóxico do tecido do hospedeiro. Ainda, os autores comentaram que o uso de halotano poderia impedir a cicatrização do tecido periapical e por isso, não deveria ser um solvente de escolha para amolecimento de guta-percha.

A forma de avaliação do ensaio, após o tratamento das células com os materiais testes, pode ser verificada através de: viabilidade, sobrevivência, metabolismo, transformação ou irritação celular. A maioria dos testes de viabilidade celular depende da ruptura da integridade de membrana, que é determinada pela pigmentação de células que são normalmente impermeáveis ao corante. Portanto, o seu efeito é direto, apesar de não ditar a sobrevivência final (Freshney, 2000).

Scelza *et al.* (2001) avaliaram efeito citotóxico de ácido cítrico a 10% e EDTA-T, substâncias químicas utilizadas em canal radicular. Foram analisadas em cultura de fibroblastos usando método de células coradas

com o azul Trypan. As soluções foram diluídas para 1, 0.1 e 0.01% em meio de cultura e aplicadas em cultura de células NIH 3T3. O crescimento celular em meio de cultura DMEM serviu como controle. Após 0, 6, 12 e 24 horas (viabilidade a curto prazo) e 1, 3, 5 e 7 dias (sobrevivência a longo prazo) as células foram contadas, usando hemocitômetro, sob auxílio de microscópio óptico de fase invertida. Nos testes de curto prazo, a viabilidade celular alcançou de 85 a 99% para todos os grupos experimentais, sem diferença estatística quando comparado ao grupo controle, exceto para o grupo tratado com EDTA-T 1%, que causou uma diminuição progressiva na viabilidade celular. Em testes de longo prazo, todas as culturas aumentaram do primeiro ao último período do experimento, não mostrando inibição de proliferação celular, exceto o grupo tratado com EDTA-T 1%, que preveniu totalmente o crescimento celular. Todas as diluições de ácido cítrico 10% foram mais biocompatíveis que EDTA-T. Culturas tratadas com ácido cítrico tiveram uma porcentagem maior de viabilidade em teste de curto prazo, e as células mantiveram sua capacidade de renovação própria.

No retratamento endodôntico, cujo procedimento recomendado é a remoção do material obturador presente dentro do canal radicular, o solvente é a substância mais amplamente utilizada, devido a seu fácil uso e sua média de sucesso clínico ser alta. No entanto, os efeitos citotóxicos e a possível difusão para os tecidos periapicais e sistêmicos, bem como os possíveis efeitos mutagênicos e carcinogênicos são aparentes.

Portanto, com enfoque na literatura e nas mais recentes tendências, torna-se estimulante procurar substâncias com ação solvente, para uso

durante o procedimento de retratamento endodôntico, e ao mesmo tempo observamos a necessidade de materiais biocompatíveis, que impõem a utilização de testes adequados, interpretação dos dados obtidos pelo teste e aplicação desses resultados às condições de uso clínico.

3 PROPOSIÇÃO

Este estudo propõe-se a comparar a ação citotóxica *in vitro* de alguns solventes utilizados em terapia de retratamento endodôntico: óleo da casca de laranja, eucaliptol, xilol, clorofórmio e halotano em diferentes situações de preparo (concentrações finais e tempo de contato) e diversas condições de contato sobre as células (direto ou indireto).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material

Álcool absoluto - Fórmula & Ação Farmácia de Manipulação- São Paulo, SP

Banho Maria – Plyscience, Illinois, EUA

Câmara de Neubauer

Capela de Fluxo laminar

Centrífuga – Forma Scientific Division, Ohio, EUA

Cronômetro

DMEM-Dulbelcco's modified Eagle Médium - Gibco, EUA

DMSO-di-metil sulfóxido - Gibco, EUA

FBS – soro fetal bovino – Gibco, EUA

Frascos plásticos para cultivo celular com 25 e 75 cm² de área cultivável

Frasco de plásticos *vials* para contagem de viabilidade celular - Eppendorf

Frasco de vidro âmbar para armazenar material teste

Incubadora com controle de temperatura e pressão – Forma Scientific, Ohio, EUA

Lamínula de vidro com 5 mm de diâmetro

Linhagem de fibroblastos de embriões de camundongos NIH-3T3 – cedida pelo Laboratório de Anatomia e Biologia Celular do ICB-USP

Microscópio invertido de fase – Nikon, Japão

Pipetador automático

Pipetas descartáveis de 2mL, 5mL, 10mL e 20mL

Placa de 24 poços de cultivo celular – Corning Incorporated, New York, EUA

Pontas para pipetas

Solução antibiótica P/S (penicilina/estreptomicina) - Gibco, EUA

Solução tampão de fosfato –PBS- Gibco, EUA

Solução de tripsina - Gibco, EUA

Tubos para congelamento de células

Solução de azul de Trypan a 0.4% - Gibco, EUA

Solventes - Óleo da casca de laranja, eucaliptol, xilol, clorofórmio – Fórmula & Ação Farmácia de Manipulação, São Paulo, SP

Solvente halotano – Cristália – Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda, SP, Brasil

4.1.1 Linhagem celular

Para este estudo foram utilizadas células NIH 3T3, fibroblastos originados de embriões de camundongos Swiss, linhagem celular contínua (Figuras 4.1 e 4.2), cedida pelo Laboratório de Biologia Celular e Anatomia Funcional do Departamento de Anatomia, ICB-USP.

Figura 4.1 - Fotomicrografia de cultura de células de fibroblastos NIH 3T3, com filtro verde (aumento de 100X)

Figura 4.2 - Fotomicrografia de células de fibroblastos NIH 3T3 em cultura, sem filtro (aumento de 100X)

4.1.2 Grupos experimentais

Como já citado anteriormente, foram testados alguns dos solventes utilizados durante o processo de retratamento endodôntico na desobturação do canal radicular. A ação destes solventes nas culturas celulares foi analisada quanto à viabilidade ou não das mesmas e para isto foram determinados os seguintes grupos experimentais:

Grupo 1 - Controle – células mantidas em meio de cultura, na ausência de qualquer tratamento;

Grupo 2 - Tratamento com Óleo da casca de laranja;

Grupo 3 - Tratamento com Eucaliptol;

Grupo 4 - Tratamento com Xilol;

Grupo 5 - Tratamento com Clorofórmio;

Grupo 6 - Tratamento com Halotano.

4.1.3 Etapas experimentais

Os solventes foram estudados em diferentes situações de preparo e contato com as células de fibroblastos e as etapas experimentais foram:

1. solvente com diluição final no meio de cultura de 0, 5, 15, 25, 50 e 100% para o tempo de 5 minutos.
2. solvente com diluição final no meio de cultura de 15 e 25% para o tempo de 10 e 15 minutos.
3. Solvente em contato direto com as células por meio de lamínula de vidro acrescido de DMEM e em contato indireto onde o DMEM foi

depositado sobre as células de fibroblastos e o solvente depositado sobre este meio na concentração final de 5% para o tempo de 5 minutos.

4. solvente solubilizado em álcool absoluto na proporção de 1:1 e diluído em DMEM com concentração final de 5% para o período de 5 minutos.

4.2 Métodos

4.2.1 Cultivo celular

As células foram descongeladas, em banho-maria, transferidas para placas de cultura apropriadas e mantidas em estufa de CO_2 (5%) a 37°C. As células foram cultivadas em meio de cultura DMEM (Gibco, USA) suplementado com P/S (Gibco, USA), contendo 10% de FBS (Gibco, USA). O crescimento celular foi acompanhado a cada 24 horas, com auxílio de microscópio de fase invertido e o meio de cultura trocado a cada dois dias. O subcultivo foi realizado ao se observar formação de uma monocamada celular com mais de 80% de confluência. Para a observação da viabilidade celular frente ao tratamento com os diferentes solventes, as células foram plaqueadas em número aproximado de 12×10^4 células/poço, em placas de cultivo contendo 24 poços, com uma área aproximada de 1,5 cm² cada. Todos os experimentos foram realizados em quadruplicata sob ambiente de fluxo laminar (Figura 4.3).

Figura 4.3 - Área interna do Fluxo laminar para cultivo celular

4.2.2 Tratamentos

Vinte e quatro horas antes do início dos tratamentos com os diferentes solventes, as células foram carenciadas de soro, sendo o meio de cultura substituído para DMEM contendo 0,5% de FBS. Os tratamentos foram realizados inicialmente avaliando o efeito de diferentes concentrações dos solventes no meio cultura, ou seja, realizando uma curva dose-resposta para cada um dos solventes. Posteriormente, avaliou-se o efeito de diferentes tempos de tratamento com os solventes sobre a viabilidade celular, curva tempo-resposta. Cada experimento foi repetido três vezes.

Considerando que os solventes a serem testados não apresentaram grande solubilidade aquosa, alguns experimentos foram realizados solubilizando os solventes previamente em álcool absoluto, apesar de na prática clínica não ser esta a conduta utilizada. Da mesma forma, os experimentos foram realizados em quadruplicata e um número mínimo de três experimentos realizados para cada situação em questão.

4.2.3 Determinação da viabilidade celular

A ação dos solventes sobre a viabilidade celular foi determinada pelo método de exclusão do Trypan Blue. Este método consiste no fato de que este corante não sendo lipofílico não consegue entrar normalmente nas células, o que passa a ocorrer caso haja a ruptura da membrana plasmática, um típico sinal que antecede a morte celular. Assim, somente as células em morte celular se apresentam coradas em azul e com limites irregulares. As demais se apresentam arredondadas, transparentes, com a membrana refringente e os com limites nítidos (Figura 4.4). A contagem de células foi determinada por amostragem, utilizando-se um hemocitrômetro ou Câmara de Neubauer e levado ao microscópio de luz.

O percentual de viabilidade celular foi calculado pela razão:

$$\text{n}^{\circ} \text{ de células viáveis} \times 100 / \text{n}^{\circ} \text{ total de células}$$

Figura 4.4 - Fotomicrografia da câmara de Neubauer, somente as células em morte celular se apresentam coradas em azul e com limites irregulares. As demais se apresentam arredondadas, transparentes, com a membrana refringente e com limites nítidos (aumento de 200x)

4.3 Análise estatística

Os dados obtidos foram comparados através de Análise de Variância (ANOVA), e quando foi significativa foi aplicado pós-teste (Tukey-Kramer), considerando significativas as diferenças entre grupos com $p \leq 0.05$.

5 RESULTADOS

Comparamos a reação celular de fibroblastos ao contato com os solventes de guta-percha, utilizados durante o retratamento endodôntico. Esta reação foi avaliada pela mensuração do número de células viáveis nas diferentes etapas experimentais e nos tempos estudados.

Etapa 1 – Solvente com diluição final no meio de cultura de 0, 5, 10, 25, 50 e 100% para o tempo de 5 minutos

Os valores da média $\pm$ desvio padrão estão descritos na Tabela 5.1 e no gráfico da Figura 5.1. As Tabelas de An.A1 à An.A5 mostram os valores originais correspondentes ao número de células viáveis ($\times 10^4$) nos diferentes grupos experimentais.

Antes da análise dos resultados, é importante ressaltar que no início do experimento, todos os poços apresentavam aproximadamente o mesmo número de células, sem diferenças significativas entre os grupos.

A análise de variância ANOVA mostrou que todos os solventes nas concentrações 0, 50 e 100% foi considerado não significativo.

Tabela 5.1 - Valores da média $\pm$ desvio padrão correspondentes ao número de células viáveis ($\times 10^4$) quando da exposição aos solventes testados em diferentes concentrações para o período de 5 minutos. n= número de poços com células, utilizados para o tratamento

Concentração Grupo	0	5	10	25	50	100
Óleo de laranja (n=12)	9.93 (± 1.85)	2.68 (± 0.88)	0.89 (± 0.63)	0.083 (± 0.16)	0	0
Eucaliptol (n=12)	10.46 (± 1.26)	0.14 (± 0.24)	0	0	0	0
Xilol (n=12)	9.58 (± 1.40)	2.79 (± 0.89)	1.5 (± 0.35)	0.91 (± 0.30)	0	0
Clorofórmio (n=12)	10.14 (± 0.93)	0.10 (± 0.16)	0	0	0	0
Halotano (n=12)	9.56 (± 0.90)	0	0	0	0	0

A Tabela 5.1 nos mostra que independente do tratamento usado a viabilidade celular foi menor, quanto maior a concentração do solvente, resultando em citotoxicidade marcante. Ao analisarmos os dados dos grupos eucaliptol, clorofórmio e halotano pode-se observar que mesmo em pequenas concentrações ainda assim estes solventes apresentaram alto índice de morte celular (Figura 5.1).

O ponto 0% de concentração correspondeu à contagem inicial das células viáveis no momento da aplicação do solvente. Como podemos

observar na Figura 5.1, os fibroblastos tratados com os solventes: eucaliptol, clorofórmio e halotano apresentaram poucas células viáveis, mesmo na menor concentração estudada. O óleo de laranja e o xilol mostraram células viáveis até a concentração de 25%. Acima desta concentração mostrou total morte celular em todos os grupos estudados.

Figura 5.1 - Viabilidade celular quando da exposição aos solventes em diferentes concentrações para o período de 5 minutos. A concentração 0% corresponde ao grupo controle com número de células no momento do tratamento

Figura 5.2 - Gráfico com as curvas dos valores correspondentes a porcentagem de células viáveis após a exposição de 5 minutos nas diferentes concentrações dos solventes estudados

A Figura 5.2 nos mostra que nas concentrações de 5 e 10% o eucaliptol, clorofórmio e halotano quando comparados ao óleo da casca de laranja e xilol apresentaram diferenças no percentual de células viáveis e estatisticamente significantes como podemos confirmar pela Tabela 5.2 e 5.3. O óleo de laranja e o xilol na concentração de 10% também apresentaram diferenças no percentual de células viáveis, porém estatisticamente não houve diferença significativa como podemos observar na Tabela 5.3.

O xilol apresentou a menor toxicidade a 25% quando comparado aos demais solventes e mostrou diferença estatisticamente significativa como mostra a Tabela 5.4.

Na concentração acima de 25% todos os solventes mostraram ser citotóxicos, levando a morte de todas as células.

Tabela 5.2 - Teste de comparação múltipla Tukey-Kramer, período de 5 minutos e concentração de 5%

comparação	diferença da média	q	Valor de p
Laranja vs eucaliptol	2.540	7.659	s P<0.01
Laranja vs xilol	-0.110	0.331	ns P>0.05
Laranja vs clorofórmio	2.580	7.780	s P<0.01
Laranja vs halotano	2.680	8.081	s P<0.01
Eucaliptol vs xilol	-2.650	7.991	s P<0.01
Eucaliptol vs clorofórmio	0.040	0.120	ns P>0.05
Eucaliptol vs halotano	0.140	0.422	ns P>0.05
Xilol vs clorofórmio	2.690	8.111	s P<0.01
Xilol vs halotano	2.790	8.413	s P<0.01
Clorofórmio vs halotano	0.100	0.301	ns P>0.05

s=significante e ns= não significante (Valor de q>4.654 significa o valor de p < 0.05)

Tabela 5.3 - Teste de comparação múltipla Tukey-Kramer, período de 5 minutos e concentração de 10%

comparação	diferença da média	q	Valor de p
Laranja vs eucaliptol	0.890	4.783	s P<0.05
Laranja vs xilol	-0.610	3.278	ns P>0.05
Laranja vs clorofórmio	0.890	4.783	s P<0.05
Laranja vs halotano	0.890	4.783	s P<0.05
Eucaliptol vs xilol	-1.500	8.061	s P<0.01
Eucaliptol vs clorofórmio	0.000	0.000	ns P>0.05
Eucaliptol vs halotano	0.000	0.000	ns P>0.05
Xilol vs clorofórmio	1.500	8.061	s P<0.01
Xilol vs halotano	1.500	8.061	s P<0.01
Clorofórmio vs halotano	0.000	0.000	ns P>0.05

s=significante e ns= não significante (Valor de q>4.654 significa o valor de p < 0.05)

Tabela 5.4 - Teste de comparação múltipla Tukey-Kramer, período de 5 minutos e concentração de 25%

comparação	diferença da média	q	Valor de p
Laranja vs eucaliptol	0.083	0.945	ns P>0.05
Laranja vs xilol	-0.827	9.420	s P<0.001
Laranja vs clorofórmio	0.083	0.945	ns P>0.05
Laranja vs halotano	0.083	0.945	ns P>0.05
Eucaliptol vs xilol	-0.910	10.366	s P<0.001
Eucaliptol vs clorofórmio	0.000	0.000	ns P>0.05
Eucaliptol vs halotano	0.000	0.000	ns P>0.05
Xilol vs clorofórmio	0.910	10.366	s P<0.001
Xilol vs halotano	0.910	10.366	s P<0.001
Clorofórmio vs halotano	0.000	0.000	ns P>0.05

s=significante e ns= não significante (Valor de q>4.654 significa o valor de p < 0.05)

Etapla 2 – Solvente com diluição final no meio de cultura de 0, 10, 25 para o tempo de 10 e 15 minutos

Etapla 2.a Tratamento no período de 10 minutos

Os valores da média $\pm$ desvio padrão estão descritos em número de células viáveis na Tabela 5.5 e na Figura 5.3. As Tabelas de An.B1 à An.B5 mostram os valores originais correspondentes ao número de células viáveis ($\times 10^4$) nos diferentes grupos experimentais.

Tabela 5.5 - Valores da média $\pm$ desvio padrão correspondentes ao número de células viáveis ($\times 10^4$) quando da exposição aos solventes testados, nas concentrações de 0, 10 e 25% para o período de 10 minutos. n= número de poços com células, utilizados para o tratamento

Concentração	0	10	25
Grupos			
Óleo da casca de laranja (n=12)	9.83 (± 0.19)	0.5 (± 0.51)	0.06 (± 0.06)
Eucaliptol (n=12)	9.39 (± 0.43)	0.02 (± 0.03)	0
Xilol (n=12)	10.3 (± 0.56)	1.3 (± 0.95)	0.46 (± 0.12)
Clorofórmio (n=12)	10.41 (± 0.43)	0	0
Halotano (n=12)	10 (± 0.69)	0	0

A Tabela 5.5 nos mostra que o tratamento das células nas concentrações de 10 e 25%, para o tempo de 10 minutos resultou em acentuada diminuição na média do número de células viáveis. Os dados dos grupos clorofórmio e halotano revelaram que mesmo para concentração de 10% ocorreu total morte celular.

Figura 5.3 - Viabilidade celular quando da exposição aos solventes nas concentrações de 0, 10 e 25% para o período de 10 minutos. A concentração 0% corresponde ao grupo controle com número de células no momento do tratamento

Figura 5.4 - Gráfico com as curvas dos valores correspondentes a porcentagem das células viáveis após a exposição de 10 minutos nas concentrações de 0, 10 e 25% dos solventes estudados

A Figura 5.4 mostra que na concentração de 10% os solventes xilol e óleo de laranja apresentaram diferenças no percentual de células em relação aos outros solventes, no entanto somente xilol mostrou diferença estatisticamente significativa em relação aos demais solventes como podemos observar pela Tabela 5.6, demonstrando assim, ser o menos citotóxico neste tempo e concentrações estudados. E na concentração de 25% o xilol mostrou diferença no percentual de células viáveis em comparação aos demais solventes e apresentou diferença estatisticamente significativa como podemos ver na Tabela 5.7.

Tabela 5.6 - Teste de comparação múltipla Tukey-Kramer, período de 10 minutos e concentração de 10%

comparação	diferença da média	q	Valor de p
Laranja vs eucaliptol	0.480	3.447	ns P>0.05
Laranja vs xilol	-0.800	5.745	s P<0.01
Laranja vs clorofórmio	0.500	3.591	ns P>0.05
Laranja vs halotano	0.500	3.591	ns P>0.05
Eucaliptol vs xilol	-1.280	9.192	s P<0.001
Eucaliptol vs clorofórmio	0.020	0.143	ns P>0.05
Eucaliptol vs halotano	0.020	0.143	ns P>0.05
Xilol vs clorofórmio	1.300	9.335	s P<0.001
Xilol vs halotano	1.300	9.335	s P<0.001
Clorofórmio vs halotano	0.000	0.000	ns P>0.05

s=significante e ns= não significante (Valor de q>3.993 significa o valor de p < 0.05)

Tabela 5.7 - Teste de comparação múltipla Tukey-Kramer, período de 10 minutos e concentração de 25%

comparação	diferença da média	q	Valor de p
Laranja vs eucaliptol	0.060	1.732	ns P>0.05
Laranja vs xilol	-0.400	11.547	s P<0.001
Laranja vs clorofórmio	0.060	1.732	ns P>0.05
Laranja vs halotano	0.060	1.732	ns P>0.05
Eucaliptol vs xilol	-0.460	13.279	s P<0.001
Eucaliptol vs clorofórmio	0.000	0.000	ns P>0.05
Eucaliptol vs halotano	0.000	0.000	ns P>0.05
Xilol vs clorofórmio	0.460	13.279	s P<0.001
Xilol vs halotano	0.460	13.279	s P<0.001
Clorofórmio vs halotano	0.000	0.000	ns P>0.05

s=significante e ns= não significante (Valor de q>4.654 significa o valor de p < 0.05)

Etapa 2.b Tratamento no período de 15 minutos

Os valores da média $\pm$ desvio padrão estão descritos em número de células viáveis na Tabela 5.8 e na Figura 5.5. As Tabelas de An.B6 à An.B10 mostram os valores originais correspondentes ao número de células viáveis ($\times 10^4$) nos diferentes grupos experimentais.

Tabela 5.8 - Valores da média $\pm$ desvio padrão correspondentes ao número de células viáveis ($\times 10^4$) quando da exposição aos solventes, nas concentrações de 10 e 25%, para o tempo de 15 minutos.
n= número de poços com células, utilizados para o tratamento

Concentração	0	10	25
Grupos			
Óleo de laranja	10.58	0.08	0.08
n=12	(± 1.12)	(± 0.07)	(± 0.09)
Eucaliptol	9.45	0	0
n=12	(± 0.28)		
Xilol	10.18	0.48	0.21
n=12	(± 0.37)	(± 0.12)	(± 0.07)
Clorofórmio	10.33	0	0
n=12	(± 1.04)		
Halotano	10.18	0	0
n=12	(± 0.46)		

A Tabela 5.8 apresenta os valores após a exposição aos solventes no período de 15 minutos, nas concentrações de 10 e 25%, onde podemos observar que os grupos tratados com eucaliptol, clorofórmio e halotano mostraram 100% de morte celular, em ambas as concentrações estudadas, demonstrando ser extremamente citotóxicos, como podemos observar na Figura 5.5.

Figura 5.5 - Viabilidade celular quando da exposição aos solventes nas concentrações de 0, 10 e 25% para o período de 15 minutos. A concentração 0% corresponde ao grupo controle com número de células no momento do tratamento

Figura 5.6 - Gráfico com as curvas dos valores correspondentes a porcentagem das células viáveis após a exposição de 15 minutos nas concentrações de 0, 10 e 25% dos solventes estudados

A Figura 5.6 nos mostra uma queda acentuada no percentual de viabilidade celular em todos os grupos experimentais, após 15 minutos de tratamento. Demonstrando extrema citotoxicidade celular nesse tempo e concentrações estudados.

Na concentração de 10% observamos que todos os solventes mostraram diferenças no percentual de número de células em relação ao solvente xilol como podemos observar na Figura 5.6. A Tabela 5.9 nos mostra que existe diferença estatisticamente significativa. Já na concentração de 25% o xilol e o óleo de laranja apresentaram percentual de células viáveis, porém somente o xilol mostrou diferença estatisticamente significativa como podemos observar pela Tabela 5.10. Demonstrando que o xilol foi menos citotóxico de todos os solventes estudados nesta concentração e tempo.

Tabela 5.9 - Teste de comparação múltipla Tukey-Kramer, período de 15 minutos e concentração de 10%

Comparação	diferença da média	q	Valor de p
Laranja vs eucaliptol	0.080	2.230	ns P>0.05
Laranja vs xilol	-0.400	11.151	s P<0.001
Laranja vs clorofórmio	0.080	2.230	ns P>0.05
Laranja vs halotano	0.080	2.230	ns P>0.05
Eucaliptol vs xilol	-0.480	13.382	s P<0.001
Eucaliptol vs clorofórmio	0.000	0.000	ns P>0.05
Eucaliptol vs halotano	0.000	0.000	ns P>0.05
Xilol vs clorofórmio	0.480	13.382	s P<0.001
Xilol vs halotano	0.480	13.382	s P<0.001
Clorofórmio vs halotano	0.000	0.000	ns P>0.05

s=significante e ns= não significante (Valor de q>4.654 significa o valor de p < 0.05)

Tabela 5.10 - Teste de comparação múltipla Tukey-Kramer, período de 15 minutos e concentração de 25%

Comparação	diferença da média	q	Valor de p
Laranja vs eucaliptol	0.080	2.717	ns P>0.05
Laranja vs xilol	-0.130	4.416	ns P>0.05
Laranja vs clorofórmio	0.080	2.717	ns P>0.05
Laranja vs halotano	0.080	2.717	ns P>0.05
Eucaliptol vs xilol	-0.210	7.133	s P<0.01
Eucaliptol vs clorofórmio	0.000	0.000	ns P>0.05
Eucaliptol vs halotano	0.000	0.000	ns P>0.05
Xilol vs clorofórmio	0.210	7.133	s P<0.01
Xilol vs halotano	0.210	7.133	s P<0.01
Clorofórmio vs halotano	0.000	0.000	ns P>0.05

s=significante e ns= não significante (Valor de q>4.654 significa o valor de p < 0.05)

Etapa 3 - Contato direto e indireto, com concentração final de 0, 5 e 10%, para o tempo de 5 minutos

Os valores da média $\pm$ desvio padrão estão descritos em número de células viáveis na Tabela 5.11 e na Figura 5.7. As Tabelas de An.C1 à An.C5 mostram os valores originais correspondentes ao número de células viáveis ($\times 10^4$) nos diferentes grupos experimentais.

Tabela 5.11 - Valores da média $\pm$ desvio padrão correspondentes ao número de células viáveis ($\times 10^4$) quando da exposição aos solventes testados, analisados em formas de contato direto e indireto, nas concentrações de 0, 5 e 10% para o período de 5 minutos. n= número de poços com células, utilizados para o tratamento

concentração	0		5		10	
grupos	contato direto	contato indireto	contato direto	contato indireto	contato direto	contato indireto
Óleo de laranja n=12	8.75 (± 0.69)	9.31 (± 0.41)	1.35 (± 0.24)	4.75 (± 0.78)	0.37 (± 0.2)	1.06 (± 0.16)
Eucaliptol n=12	8.75 (± 0.69)	9.31 (± 0.41)	0.12 (± 0.20)	0.41 (± 0.40)	0	0
Xilol n=12	8.75 (± 0.69)	9.31 (± 0.41)	0	3.81 (± 0.70)	0	1.70 (± 0.20)
Clorofórmio n=12	8.75 (± 0.69)	9.31 (± 0.41)	0	0.07 (± 0.16)	0	0
Halotano n=12	8.75 (± 0.69)	9.31 (± 0.41)	0	0.7 (± 0.58)	0	0

A Tabela 5.11 representa os valores da média $\pm$ desvio padrão quando os solventes foram colocados em contato direto e indireto com as células de fibroblastos e nos revelou que a forma de contato dos diferentes grupos experimentais alterou o número de células viáveis. Quando os solventes foram colocados em contato direto com as células ocorreu uma diminuição acentuada nas médias de número de células viáveis. Nos grupos tratados com xilol, clorofórmio e halotano ocorreram 100% de morte celular, em 5 minutos, independente da concentração utilizada. O óleo de laranja e o xilol mostraram ser menos citotóxicos em relação aos outros grupos quando o contato foi indireto.

A Figura 5.7 mostra o gráfico com os valores de média $\pm$ desvio padrão dos grupos com o tratamento sobre as células em formas de contato direto e indireto. Podemos observar que o óleo de laranja e o xilol apresentaram número de células viáveis maiores em relação aos demais grupos experimentais, quando o contato foi indireto.

Na concentração de 5% todos os solventes apresentaram células viáveis quando o contato foi indireto, porém quando o contato foi direto ocorreu queda drástica no número de células viáveis. Já na concentração de 10%, o óleo de laranja e o xilol mostraram células viáveis em relação aos demais grupos, quando o contato foi indireto como podemos observar na Tabela 5.11.

Quando o contato foi direto, somente óleo de laranja apresentou viabilidade celular, na concentração de 10%, embora não tenha mostrado

ser significantemente diferente dos demais solventes como podemos verificar pela Tabela 5.13.

Figura 5.7 -Viabilidade celular quando da exposição direta ou indireta dos solventes sobre as células em cultura, nas concentrações de 0, 5 e 10% no período de 5 minutos. A concentração 0% corresponde ao grupo controle com número de células no momento do tratamento

Figura 5.8 - Gráfico com as curvas dos valores correspondentes a percentagem das células viáveis após a exposição de 5 minutos nas concentrações de 0, 5 e 10% dos solventes estudados em contato direto e indireto

Ao observarmos a Figura 5.8 verificamos que o óleo de laranja, contato direto e indireto, e xilol, contato indireto, mostraram diferenças no percentual de células viáveis em relação aos demais solventes. E a análise dos dados apresentados nas Tabelas 5.12 e 5.13 revelou que a diferença foi estatisticamente significativa em relação aos demais solventes e entre eles também, quando a concentração foi de 5 %. Já na concentração de 10% e em contato indireto, o óleo de laranja e o xilol mostraram diferenças no percentual de células viáveis que também foram estatisticamente significantes. Portanto, observamos que quando a concentração foi 5%, o

óleo de laranja em contato indireto foi o menos citotóxicos de todos os grupos estudados, seguidos pelo xilol no contato indireto. Na concentração de 10% o menos citotóxico foi xilol em contato indireto seguido pelo óleo de laranja em contato indireto.

O eucaliptol, xilol, clorofórmio e halotano, em contato direto, mostraram ser muito citotóxicos.

Tabela 5.12 - Teste de comparação múltipla Tukey-Kramer, período de 5 minutos e concentração de 5%. Formas de contato direto ou indireto sobre as células em cultura

Comparação	diferença da média	q	Valor de p
Laranja d vs laranja in	-3.400	39.005	s P<0.001
Laranja d vs eucaliptol d	1.230	14.111	s P<0.001
Laranja d vs xilol d	1.350	15.487	s P<0.001
Laranja d vs clorofórmio d	1.350	15.487	s P<0.001
Laranja d vs halotano d	1.350	15.487	s P<0.001
Laranja in vs eucaliptol in	4.340	49.789	s P<0.001
Laranja in vs xilol in	0.940	10.784	s P<0.001
Laranja in vs clorofórmio in	4.680	53.689	s P<0.001
Laranja in vs halotano in	4.050	46.462	s P<0.001
Eucaliptol d vs eucalyptol in	-0.290	3.327	ns P>0.05
Eucaliptol d vs xilol d	0.120	1.377	ns P>0.05
Eucaliptol d vs clorofórmio d	0.120	1.377	ns P>0.05
Eucaliptol d vs halotano d	0.120	1.377	ns P>0.05
Eucaliptol in vs xilol in	-3.400	39.005	s P<0.001
Eucaliptol in vs clorofórmio in	0.340	3.900	ns P>0.05
Eucaliptol in vs halotano in	-0.290	3.327	ns P>0.05
Xilol d vs xilol in	-3.810	43.708	s P<0.001
Xilol d vs clorofórmio d	0.000	0.000	ns P>0.05
Xilol d vs halotano d	0.000	0.000	ns P>0.05
Xilol in vs clorofórmio in	3.740	42.905	s P<0.001
Xilol in vs halotano in	3.110	35.678	s P<0.001
Clorofórmio d vs clorofórmio in	-0.070	0.803	ns P>0.05
Clorofórmio d vs halotano d	0.000	0.000	ns P>0.05
Clorofórmio in vs halotano in	-0.630	7.227	s P<0.001
Halotano d vs halotano in	-0.700	8.030	s P<0.001

d=contato direto, in=contato indireto, s=significante e ns= não significante. (valor de q>5.096 significa que o valor de p< 0.05)

Tabela 5.13 - Teste de comparação múltipla Tukey-Kramer, período de 5 minutos e concentração de 10%. Formas de contato direto ou indireto sobre as células em cultura

Comparação	diferença da média	q	Valor de p
Laranja d vs laranja in	-0.690	7.916	s P<0.001
Laranja d vs eucaliptol d	0.370	4.245	ns P>0.05
Laranja d vs xilol d	0.370	4.245	ns P>0.05
Laranja d vs clorofórmio d	0.370	4.245	ns P>0.05
Laranja d vs halotano d	0.370	4.245	ns P>0.05
Laranja in vs eucaliptol in	1.060	12.160	s P<0.001
Laranja in vs xilol in	-0.640	7.342	s P<0.001
Laranja in vs clorofórmio in	1.060	12.160	s P<0.001
Laranja in vs halotano in	1.060	12.160	s P<0.001
Eucaliptol d vs eucalyptol in	0.000	0.000	ns P>0.05
Eucaliptol d vs xilol d	0.000	0.000	ns P>0.05
Eucaliptol d vs clorofórmio d	0.000	0.000	ns P>0.05
Eucaliptol d vs halotano d	0.000	0.000	ns P>0.05
Eucaliptol in vs xilol in	-1.700	19.502	s P<0.001
Eucaliptol in vs clorofórmio in	0.000	0.000	ns P>0.05
Eucaliptol in vs halotano in	0.000	0.000	ns P>0.05
Xilol d vs xilol in	-1.700	19.502	s P<0.001
Xilol d vs clorofórmio d	0.000	0.000	ns P>0.05
Xilol d vs halotano d	0.000	0.000	ns P>0.05
Xilol in vs clorofórmio in	1.700	19.502	s P<0.001
Xilol in vs halotano in	1.700	19.502	s P<0.001
Clorofórmio d vs clorofórmio in	0.000	0.000	ns P>0.05
Clorofórmio d vs halotano d	0.000	0.000	ns P>0.05
Clorofórmio in vs halotano in	0.000	0.000	ns P>0.05
Halotano d vs halotano in	0.000	0.000	ns P>0.05

d=contato direto, in=contato indireto, s=significante e ns= não significante (valor de q>5.096 significa que o valor de p< 0.05)

**Etapa 4 – Solvente / álcool (1:1), diluição final no meio de cultura de 5%,
para o tempo de 5 minutos**

Os solventes foram previamente solubilizados em álcool absoluto na proporção de 1:1, com concentração final de 5% em meio de cultura.

Com o intuito de avaliar se o preparo prévio da substância a ser testada, poderia promover alguma alteração na viabilidade celular, além da mensuração de número de células viáveis, com os solventes utilizados em retratamento endodôntico na forma como são utilizados na prática clínica, realizamos ainda a solubilização de todos os solventes em álcool absoluto para torná-los substâncias homogêneas e miscíveis em meio de cultura. As médias $\pm$ desvio padrão referentes a estas medidas estão representadas na Tabela 5.14 e na Figura 5.9.

Antes da análise dos resultados é importante salientar que o grupo controle corresponde ao grupo tratado com o álcool absoluto, que foi o veículo utilizado na preparação dos diferentes solventes.

A Tabela 5.14 nos mostra pequeno número de células viáveis nos grupos óleo de laranja e eucaliptol, enquanto o xilol, clorofórmio e halotano mostraram 100% de morte celular. No grupo controle pode-se observar que 77% de células estavam vitais, isto significa que o álcool absoluto, na proporção utilizada para solubilizar os solventes, pode manter as células viáveis e permitiu o estudo comparativo entre os solventes.

Tabela 5.14 - Valores da média $\pm$ desvio padrão correspondentes ao número de células viáveis ($\times 10^4$) quando da exposição aos solventes testados, na concentração de 5% para o período de 5 minutos, os solventes foram previamente solubilizados em álcool absoluto. n= número de poços com células, utilizados para o tratamento. Controle corresponde ao grupo com a mesma proporção de álcool absoluto utilizado para solubilizar os solventes

Concentração	
Grupos	5
Óleo de laranja	1.42
n=12	(± 0.06)
Eucaliptol	0.15
n=12	(± 0.12)
Xilol	0
n=12	
Clorofórmio	0
n=12	
Halotano	0
n=12	
Controle	6.8
n=12	(± 1.14)

Figura 5.9 - Gráfico que representa os valores da média $\pm$ desvio padrão do número de células viáveis dos solventes testados na concentração de 5% para o período de 5 minutos, os solventes foram previamente solubilizados em álcool absoluto

Pela Figura 5.9 podemos observar que os grupos experimentais apresentam diferenças na média de número de células viáveis em relação ao grupo controle. O eucaliptol, xilol, clorofórmio e halotano apresentaram diferenças estatisticamente significantes quando comparados ao óleo de laranja e todos os solventes estudados mostraram diferenças significantes em relação ao controle como podemos verificar na Tabela 5.15. O álcool absoluto foi menos citotóxico que os solventes estudados seguido pelo óleo de laranja e eucaliptol.

Tabela 5.15 - Teste de comparação múltipla Tukey-Kramer, período de 5 minutos e concentração de 5%, solventes previamente solubilizados em álcool absoluto

comparação	diferença da média	q	Valor de p
Laranja vs eucaliptol	1.270	9.388	s P<0.001
Laranja vs xilol	1.420	10.497	s P<0.001
Laranja vs clorofórmio	1.420	10.497	s P<0.001
Laranja vs halotano	1.420	10.497	s P<0.001
Laranja vs controle	-5.380	39.770	s P<0.001
Eucaliptol vs xilol	0.150	1.109	ns P>0.05
Eucaliptol vs clorofórmio	0.150	1.109	ns P>0.05
Eucaliptol vs halotano	0.150	1.109	ns P>0.05
Eucaliptol vs controle	-6.650	49.158	s P<0.001
Xilol vs clorofórmio	0.000	0.000	ns P>0.05
Xilol vs halotano	0.000	0.000	ns P>0.05
Xilol vs controle	-6.800	50.267	s P<0.001
Clorofórmio vs halotano	0.000	0.000	ns P>0.05
Clorofórmio vs controle	-6.800	50.267	s P<0.001
Halotano vs controle	-6.800	50.267	s P<0.001

s=significante e ns= não significante (valor de q>4.156 significa que o valor de p< 0.05)

A Tabela An.D mostra os valores originais correspondentes ao número de células viáveis ($\times 10^4$) no diferentes grupos experimentais.

A solubilização dos solventes em álcool absoluto provocou alteração no número de células viáveis e colocou em discussão a importância da forma como as substâncias são preparadas antes do estudo comparativo de citotoxicidade. Como podemos observar os resultados, quando os solventes foram preparados previamente, divergiram quando comparados aos dados da Tabela 5.1, na coluna onde mostrou a concentração de 5% dos solventes estudados. Sugerindo que o xilol foi menos citotóxico pelos dados da etapa

experimental 1 e o resultado após o preparo prévio, etapa experimental 4, nos mostrou que o óleo de laranja foi menos citotóxico.

Após a análise de todas as etapas experimentais pudemos verificar que a forma de contato e o preparo prévio dos solventes alteraram significativamente o número de células viáveis, como podemos ver na Tabela 5. 16.

Tabela 5.16 - Percentual de número de células viáveis quando da exposição aos solventes testados, em diferentes etapas experimentais, na concentração de 5% para o período de 5 minutos

Etapas Experimentais Grupos	1 adicionado ao meio de cultura	3a contato direto	3b contato indireto	4 solubilizado com álcool absoluto
Óleo da casca de laranja	26	15	51	16.3
Eucaliptol	1	1	4	0.37
Xilol	29	0	40	0
Clorofórmio	0	0	0	0
Halotano	0	0	8	0

A Tabela 5.16 mostra que a forma de contato e o preparo prévio do material puderam alterar acentuadamente o percentual de viabilidade celular em aproximadamente 50% como ocorreu com o óleo de laranja (etapa 1 vs etapa 3b) e em 40% com o xilol (etapa 3a vs etapa 3b). Sugerindo a importância do preparo do material antes dos testes de citotoxicidade.

6 DISCUSSÃO

O retratamento endodôntico consiste na realização de um novo tratamento, seja porque o anterior fracassou ou porque se deseja fazer um tratamento mais correto ou adequado, principalmente nos casos em que surgiu a necessidade dos elementos dentários servirem de suporte a trabalhos protéticos (Gilbert & Rice, 1987; Lopes *et al.*, 1999).

Apesar da endodontia contemporânea, respaldada no desenvolvimento científico e no aprimoramento técnico das manobras que lhe são próprias, vir alcançando altos índices de sucesso, recentemente tem aumentado consideravelmente o número de casos caracterizados por uma sintomatologia incompatível com a reparação tecidual, demonstrando falha do tratamento endodôntico realizado (Berger, 1998).

Neste sentido, alguns estudos têm mostrado que o retratamento do insucesso tornou-se necessário para preservação do dente. A manipulação bem sucedida desta etapa operatória depende de uma compreensão das diferenças existentes do tratamento inicial, diagnóstico e plano de tratamento bem traçado e domínio das técnicas dessa nova intervenção (Taintor *et al.*, 1983; Friedman & Stabholz, 1986; Stabholz & Friedman, 1988; Friedman *et*

al., 1990; Costa & Antoniazzi, 1992; Gutmann *et al.*, 1997; Lopes *et al.*, 1999).

Independentemente da técnica empregada durante a remoção do material obturador, o importante nesse momento é não criar iatrogenias que possam dificultar ou impedir a reinstrumentação do canal radicular. Contudo, é importante ressaltar que as alterações podem ocorrer devido à resistência que o material obturador como a guta-percha e o cimento exercem na penetração do instrumento para acessar as proximidades do forame apical do dente (Friedman *et al.*, 1990).

Tentando minimizar esses riscos, vários solventes orgânicos de guta percha foram testados e pesquisados. Entre os mais conhecidos ainda são o clorofórmio, xilol e o eucaliptol. O clorofórmio apresenta-se como um líquido pesado, transparente, incolor e de odor característico. É pouco solúvel na água e inteiramente miscível com o álcool. Altera-se pela luz e pelo ar. Atualmente, a utilização deste produto é bastante polêmica, devido a relatos de toxicidade e potencial carcinogênico (Torkelson *et al.*, 1976; Wilcox *et al.*, 1987; Wennberg & Orstavik, 1989; McDonald & Vire, 1992; Zakariasen *et al.*, 1990; Wourms *et al.*, 1990).

O xilol, por sua vez, apresenta-se como um líquido límpido, incolor, com odor semelhante ao benzeno. É insolúvel na água, porém solúvel em álcool e no benzeno. Podendo causar irritação à mucosa gástrica, convulsão, insônia, excitação e depressão do SNC por contato e inalação (The Condensed Chemical Dictionary, 1966; The Merck Index, 1989; Pécora *et al.*, 1993; Dorland's illustrated medical dictionary, 1994).

O eucaliptol apresenta-se como um líquido incolor e de odor aromático semelhante ao da cânfora. É insolúvel na água e inteiramente miscível com o álcool, exibe efeito antibacteriano e propriedades antiinflamatórias (The Condensed Chemical Dictionary, 1966; The Merck Index, 1989; Dorland's illustrated medical dictionary, 1994), não sendo um solvente de guta-percha tão eficaz quanto aos demais (Worms *et al.*, 1990; Hunter *et al.*, 1991; Pécora *et al.*, 1992; Görduysus *et al.*, 1997; Oyama *et al.*, 2003).

O óleo de laranja é pouco solúvel em água, porém o é em álcool, sendo utilizado em farmacologia para aromatizar e dar sabor (The Condensed Chemical Dictionary, 1966; The Merck Index, 1989; Dorland's illustrated medical dictionary, 1994). Mostrou ação solvente sobre a guta-percha (Pécora *et al.*, 1992; Pécora, *et al.*, 1993; Spanó *et al.*, 1995; Oyama *et al.*, 2002).

O halotano é um anestésico de uso veterinário, volátil, não inflamável e miscível em álcool (The Condensed Chemical Dictionary, 1966; The Merck Index, 1989; Dorland's illustrated medical dictionary, 1994; Worms *et al.*, 1990; Hunter *et al.*, 1991; Görduysus *et al.*, 1997). É uma substância que mostrou ser promissor como solvente por apresentar efetividade semelhante ao clorofórmio e xilol, entretanto não relataram estudos referentes à sua toxicidade (Hunter *et al.*, 1991; Wilcox, 1995; Görduysus *et al.*, 1997).

Existem muitos relatos quanto à efetividade dos solventes, porém a literatura é escassa quanto ao estudo de compatibilidade tecidual desses para o uso endodôntico. O autor Hansen, 2001, também compartilhou com a

idéia discutida. Em 1980, a FDI recomendou a reavaliação de testes de toxicidade quando da alteração na aplicação ou do uso de produtos aceitos previamente para outras finalidades.

Diante disso, a escolha do solvente deve também, ser realizada em concordância com requisito fundamental de um material biologicamente compatível, ou seja, ser bem tolerado pelos tecidos do periápice, não retardando ou impedindo a esperada reparação tecidual (Paiva & Antoniazzi, 1988; Santos, 1998).

A difusão das medicações através de tecido periapical pode ser um pouco diferente em meio de cultura de células. Sabemos, ainda que, a mesma é, sem dúvida, o meio mais sensível aos efeitos tóxicos das drogas, do que o tecido periapical. Embora, no corpo, as células fagocitárias, circulação linfática e sanguínea ajudariam a diluir e a eliminar a droga permitindo suporte para que as mesmas não sejam tão irritantes clinicamente, como em estudo de citotoxicidade (Vander Wall *et al.*, 1972).

Nas últimas três décadas, o sistema de cultura celular tem atraído atenção de grupo de pesquisadores procurando meios de quantificar efeitos tóxicos (Spangberg & Conn, 1973; Browne & Tyas, 1979; Murphy, 1988; Pascon & Spangberg, 1990; Barbosa *et al.*, 1994; Daniel, 1998; Santos, 1998; Malheiros, 2000; Scelza *et al.*, 2001). Entretanto, os testes têm sido desenvolvidos e modificados por interesses individuais, com o objetivo de encontrar caminhos para expressar potencial tóxico do material dentário. Provavelmente o maior segmento dos artigos vem do campo da Endodontia, onde o contato direto material-tecido faz parte do processo de tratamento.

Este fato tem levado a muitas questões não resolvidas sobre a citotoxicidade de material e a importância dos resultados comparativo com teste usual *in vitro* (Spangberg & Conn, 1978; Hensten-Pettersen, 1988; Schmalz, 1994).

Há de considerar que uma das maiores dificuldades com a avaliação de biomateriais *in vitro* é entender o teste e interpretar apropriadamente os resultados obtidos. Isto é essencial, pois esses tipos de experimentos têm suas limitações que deveriam ser consideradas (Schmaltz, 1988; Browne, 1988; Spangberg & Pascon, 1988; Schmalz, 1994).

A imensa maioria das drogas é freqüentemente solúvel em vários sistemas de líquidos, entretanto, sabemos que alguns materiais odontológicos possuem baixa solubilidade. Esta diferença maior representa um problema metodológico e torna necessário o ajuste técnico quando do estudo de citotoxicidade (Spangberg & Pascon, 1988).

Como vimos anteriormente, a maior objeção desses métodos de citotoxicidade é a eventual não existência de contato direto entre a célula e material teste e com isso a reação se processar de forma bastante lenta. Assim, a validade desses testes foi questionada. Este fato foi comprovado em nosso estudo, ao se comparar o percentual de viabilidade celular em diferentes etapas experimentais, apresentados na Tabela 5.16, quando da análise do percentual de células viáveis na etapa experimental 3a e 3b, observou-se que a real existência de contato do solvente-célula reduziu a vida celular nos diferentes grupos experimentais: 71% no grupo óleo de laranja, 75% no grupo eucaliptol, 100% no grupo xilol e halotano quando comparado ao tratamento das células em contato indireto.

No início a avaliação do dano celular era uma medida subjetiva e o critério para a morte não estava bem definido. Diante disso, Spangberg, em 1973, introduziu um método de contagem de células para avaliação do dano celular e a utilização de lamínula de vidro na câmara de cultura para promover contato direto do material com as células onde aproximava o procedimento de cultura *in vitro* a um resultado bastante confiável.

Com esse intuito, em nosso experimento, devido às substâncias estudadas apresentarem-se com densidades diferentes e com pequena solubilidade em meio de cultura, deparamos com a necessidade de pesquisar um método para tornar todas as substâncias solúveis em meio de cultura e procurar uma única substância que pudesse solubilizar todos os solventes ora estudados.

Uma revisão da literatura quanto à solubilização de materiais mostrou que substâncias como EDTA, polietilenoglicol ou álcool absoluto poderiam ser utilizados para solubilização de materiais para testes de citotoxicidade (Spangberg & Pascon, 1988). Os pesquisadores Kettering & Torabinejad (1988) utilizavam apenas álcool para solubilizar os materiais em seus experimentos.

Partindo de tais pesquisas, realizamos testes pilotos utilizando as substâncias acima mencionadas e observamos que o álcool absoluto mostrou resultados melhores e misturas homogêneas. Ainda, Freshney (2000) protocolou utilizar a menor proporção possível de álcool absoluto capaz de solubilizar os materiais a serem testados para que o mesmo permita estudo comparativo de citotoxicidade.

Por outro lado, alguns estudos mostravam a diluição dos materiais-teste aquosos em meio de cultura até observarem células vitais (Wennberg, 1976; Malheiros, 2000; Scelza *et al.*, 2001) e assim estas substâncias foram diluídas para poder realizar estudo comparativo em curto e longo prazo. No entanto, é do conhecimento de todos que qualquer material estudado mostraria não ser tóxico quando a diluição for extremamente alta, por isso, é importante a interpretação correta dos dados obtidos e a sua correlação na prática clínica.

A revisão de pesquisas desenvolvidas com relação aos estudos de toxicidade de materiais odontológicos inclui líquidos hidrofílicos e hidrofóbicos, semi-sólidos e sólidos. E os resultados, utilizando métodos de cultura celular para avaliar a biocompatibilidade têm demonstrado que qualquer material odontológico pode se mostrar tóxico ou não tóxico, dependendo das condições de teste. Por isso, o mesmo deve ser realizado em condição selecionada simulando situações reais de uso clínico (Hensten-Pettersen, 1988).

Spangberg & Pascon (1988) relataram que ao se utilizar soluções testes fluídas, a mistura com as células deve corresponder à relação de 1mL de suspensão celular para 1mL de solução teste e a mesma deveria ser normalmente preparada em meio de cultura. Acredita-se ainda, que ao se diluir uma substância, principalmente em um estudo comparativo, quanto maior o distanciamento da substância utilizada das condições de uso clínico, maiores as divergências de resultados, pois envolvem as alterações das características químicas e funcionais.

No início da parte experimental realizamos testes pilotos com os solventes nos períodos de longo prazo. No entanto observamos que não houve viabilidade celular após o período de 20 minutos. Assim, determinamos os períodos de 5, 10 e 15 minutos para o nosso experimento, tempos estes clinicamente compatíveis durante o retratamento endodôntico, onde se deseja a solubilização da guta-percha.

Na etapa experimental 1, avaliamos as concentrações de 0, 5, 10, 25, 50 e 100% para cada solvente com o objetivo de obter uma curva dose-resposta. O período de tratamento foi de 5 minutos. As concentrações foram obtidas misturando-se o solvente ao meio de cultura que correspondem à concentração final em meio de cultura, apesar de alguns estudos terem relacionado as diluições de 0,1; 0,01; 0,001, e até 0,0001%, quando das substâncias líquidas (Malheiros, 2000; Scelza *et al.*, 2001).

Nesta etapa procuramos avaliar a viabilidade celular com o aumento da concentração dos solventes. Pudemos constatar, através dos dados da Tabela 5.1, que as médias de número de células decresceram acentuadamente, independentemente do grupo experimental quando a concentração foi de 5%. Nas concentrações de 10, 25, 50 e 100% o eucaliptol, clorofórmio e halotano mostraram 100% de morte celular.

Os resultados revelaram que a 5% e 10% o óleo de laranja e o xilol apresentaram diferenças estatisticamente significantes quando comparados aos demais grupos (Tabelas 5.2 e 5.3). E a 25% todos os solventes mostraram diferenças significativas quanto ao número de células viáveis em

relação ao xilol, sendo este o menos citotóxico entre os solventes estudados nesta etapa da pesquisa (Tabela 5.4).

É importante salientar que o solvente utilizado, durante o procedimento de retratamento, apresenta-se com a concentração de 100% ou seja, sem a diluição, portanto, em função dos resultados apresentados todos os solventes testados mostraram ser extremamente citotóxico, com 100% de morte celular.

No entanto, quando do seu uso clínico, o solvente é depositado, geralmente, com o canal radicular umedecido com o hipoclorito de sódio, por isso acredita-se que ocorra diluição, porém, numa proporção menor.

Diante das condições citadas anteriormente e pelos resultados obtidos pôde-se dizer que os solventes em concentrações menores são menos citotóxicos, todavia, a sua efetividade pode ser comprometida.

Após o tratamento e realizada a contagem celular foi possível observar que ainda havia células viáveis nas concentrações de 10 e 25%. Diante disso, resolvemos aumentar o período de tratamento para verificar se existiria vida celular nos tempos de 10 e 15 minutos com o objetivo de obter uma curva tempo-resposta.

Nesta segunda etapa experimental a análise dos dados das Tabelas 5.5 e 5.8 nos revelou acentuada diminuição na média do número de células viáveis em todos os grupos experimentais. Comparando-se estatisticamente as diferenças entre as médias (Tabelas 5.6, 5.7, 5.9 e 5.10) notamos que o xilol apresentou diferença estatisticamente significativa quando comparados aos demais grupos nas concentrações de 10 e 25% para o tempo de 10 e 15

minutos em contato com as células em cultura. O xilol apresentou ser o menos citotóxico nestas concentrações e tempos estudados.

Na tentativa de esclarecer questões quanto à interferência na viabilidade celular, levando-se em conta a forma de contato do material-teste com as células em cultura, realizamos a terceira etapa experimental. Para a realização desta, utilizamos lamínula de vidro, de tamanho padrão, com 25 μ L da solvente teste e vertemos sobre as células em cultura e em seguida 475 μ L de DMEM foi depositado (contato direto). No contato indireto, a mesma quantidade de DMEM foi depositado diretamente sobre as células de fibroblastos e sobre este 25 μ L de solvente foi depositado. A concentração final foi de 5% e o tempo de 5 minutos. Os resultados dessa terceira etapa experimental mostraram que houve diferença significativa quanto ao número de células viáveis, de acordo com a forma de contato. O óleo de laranja revelou diferença extremamente significante nas concentrações de 5% e 10% na condição de contato indireto em comparação aos demais solventes, mostrando ser um solvente menos citotóxico. O xilol em contato indireto à 5 e 10% também apresentou diferença estatisticamente significante em relação a outros solventes, como podemos observar nas Tabelas 5.12 e 5.13.

A falta na literatura de uma forma padronizada estrita do material para o teste de citotoxicidade e ausência de considerações a este respeito tornou a avaliação final do teste duvidosa causando risco ao seu resultado. Constatamos que os autores Spangberg (1969); Kettering & Torabinejad (1988) compartilhavam da idéia defendida.

A comparação dos resultados experimentais *in vivo* e *in vitro* pode ser realizada quando as condições de cultura e preparo dos materiais forem similares. A utilização de materiais que permitem homogeneização através de preparo artificial, não oferece resposta apropriada com relação à toxicidade geral, pois tais preparos deveriam auxiliar no estudo comparativo dos mesmos.

Durante o experimento observamos que a homogeneização em álcool produziu uma suspensão bastante fina de partículas de material quando este foi misturado com o meio de cultura. Essa homogeneização promoveu um contato constante com as células e qualquer componente tóxico que poderia ser removido esteve em contato com as células pelo tempo suficiente para respondê-lo. Diluição equivalente de álcool absoluto no mesmo meio de cultura foi testado para averiguar se existia qualquer efeito deletério sobre a sobrevivência celular e observou-se pequena redução na viabilidade celular. Permitindo assim, a realização de um estudo comparativo dos solventes em condições similares de contato sobre as células em cultura, minimizando deste modo, a interferência de densidade e volatilidade das substâncias estudadas, visto que, todas apresentaram características semelhantes de miscibilidade em álcool absoluto (The Condensed Chemical Dictionary, 1966; The Merck Index, 1989; Dorland's illustrated medical dictionary, 1994)

O problema geral em todas as situações de teste foi estimar a concentração teste relevante. Testes de solubilização inicial foram realizados com álcool absoluto na proporção de 10, 20 e 50%, sendo este último aceitável com todos os solventes de guta-percha. O polietilenoglicol também

foi testado como agente solubilizante, porém foi menos eficaz em tornar as substâncias estudadas miscíveis em meio de cultura. Nesta quarta etapa experimental, os solventes foram solubilizados previamente com o álcool absoluto para torná-los miscíveis em meio de cultura (DMEM) e a concentração final foi de 5% .

Os resultados desta etapa experimental revelaram que todos os grupos se comportaram da maneira semelhante, com diferença estatisticamente significativa apenas para o grupo controle, representado pelo álcool absoluto diluído em meio de cultura na mesma proporção utilizado para solubilizar os solventes. O óleo de laranja apresentou diferença significativa em relação aos demais e foi o menos citotóxico, seguido por eucaliptol, como pudemos verificar pela Tabela 5.14 e Figura 5.19.

Diferentes técnicas foram relatadas e aplicadas para quantificar a viabilidade e/ou proliferação celular após a exposição *in vitro* dos materiais. Exemplos: contagem de células vitais, através da exclusão do corante, Daniel (1998), Freshney (2000); medição com a liberação de isótopo radioativo, Spangberg (1973), Spangberg & Al-Nazhan (1988); medição pela liberação de produtos celulares no meio de cultura, Meryon (1988), Tyas (1988); medição pela mudança na atividade celular e determinando a capacidade das células se dividirem (Helgeland & Leirskar, 1972); crescimento celular em filtro Millipore, Wennberg (1988); medição da densidade celular através de analisador foto-padrão microcomputadorizado, Kawahara (1988).

A maioria dos testes em cultura de células se fundamenta no colapso da integridade da membrana produzida pela ação de uma substância teste. No nosso experimento, o método de avaliação foi determinado pela inclusão de corante, azul Trypan, nas células normalmente impermeáveis. Este efeito é imediato e a contagem é simples e eficaz.

Células HeLa foram utilizadas em alguns trabalhos como de Spangberg, 1969; Kantz *et al.*, 1974. Já Santos, 1998, utilizou células fibroblásticas originárias do tecido pulpar e células de fibroblastos NIH 3T3 e fez observação que os 2 tipos celulares não apresentaram diferença na resposta de citotoxicidade. Baseado neste trabalho, as células NIH 3T3 foram utilizadas nesta pesquisa como uma linhagem celular relativamente de fácil obtenção, manipulação, perpetuação e por não envolvem aspectos éticos em pesquisa de animais e seres humanos.

Na busca da padronização dos procedimentos comparamos, neste estudo, os solventes quanto à citotoxicidade em concentrações variadas e próximas da situação mais compatível ao uso clínico.

Os resultados indicaram que o preparo do material foi extremamente importante quando da utilização da metodologia *in vitro* e salientamos a importância da sistematização no processo de análise através da padronização da pesquisa.

Por fim, todos os solventes testados demonstraram ser capazes de comprometer a viabilidade celular, nestas condições de estudo, mesmo em pequenas concentrações, somado ao fato que na literatura ainda não existem novos solventes com eficácia e toxicidade comprovadas, todos os

solventes estudados, neste trabalho, não devem atingir as proximidades do forame apical.

A escolha do solvente deve ser fundamentada pela eficácia e pela compatibilidade biológica, além de agregar os cuidados durante a aplicação destes dentro do canal radicular, como por exemplo: com o auxílio de seringa tipo Luer e cânula de calibre fino, e que o mesmo entre em contato com o material obturador a ser solubilizado. Vale ressaltar que a secagem do canal radicular antes da aplicação do solvente favorece a sua ação.

No presente trabalho o óleo de laranja mostrou ser o menos citotóxico, em todas as condições das etapas experimentais, razões pelas quais sugere o desenvolvimento de outros estudos em animais, com o propósito de estabelecer as reações teciduais *in vivo*, o que pode cooperar para a aplicação desse, com devida segurança na prática clínica.

7 CONCLUSÕES

Com base no estudo realizado e discutido, frente às diferentes condições experimentais, os dados deste trabalho nos permitem concluir que:

1. Todos os solventes estudados são citotóxicos independente da forma de preparo e tipo de contato com as células.
2. A porcentagem de viabilidade celular diminui significativamente quando a concentração do solvente é aumentada.
3. O tempo de tratamento influencia na citotoxicidade dos solventes, quanto maior o tempo, maior efeito citotóxico.
4. O xilol é menos citotóxico quando é adicionado diretamente ao meio de cultura, sem preparo prévio.
5. O óleo de laranja é menos citotóxico quando os solventes são solubilizados previamente em álcool absoluto.
6. O clorofórmio e halotano são solventes extremamente citotóxicos mesmo em mínimas concentrações e menor tempo estudado.
7. O eucaliptol também mostra efeito citotóxico, em qualquer situação experimental.

ANEXOS

ANEXO A - Etapa 1

Tabela An.A1 - Valores originais do número de células viáveis ($\times 10^4$) no experimento com concentrações de 0, 5, 10, 25, 50 e 100% do solvente óleo de laranja para o tempo de 5 minutos

concentração	0	5	10	25	50	100
células iniciais						
I 9.75	9.25	2.5	0.5	0.25	0	0
	9.25	2.75	0.75	0	0	0
	9	4.25	2	0	0	0
	7.75	2.5	0.25	0	0	0
II 11.08	10.5	1.5	0.25	0.5	0	0
	9.5	2.5	1.75	0	0	0
	8.25	3.5	0.75	0	0	0
	11.25	3.75	0.25	0	0	0
III 14.50	8.75	2.5	0.5	0	0	0
	9	2	0.75	0	0	0
	13.5	1.25	1.25	0	0	0
	13.25	3.25	1.75	0.25	0	0
Média 11.77	9.93	2.68	0.89	0.083	0	0
% (100%)	(84%)	(22%)	(7%)	0	0	0

Tabela An.A2 - Valores originais do número de células viáveis ($\times 10^4$) no experimento com concentrações de 0, 5, 10, 25, 50 e 100% do eucaliptol para o tempo de 5 minutos

concentração	0	5	10	25	50	100
células iniciais						
I 12.16	10.5	0	0	0	0	0
	9.5	0	0	0	0	0
	9.5	0	0	0	0	0
	10.5	0.25	0	0	0	0
II 12	10	0	0	0	0	0
	10.25	0	0	0	0	0
	10.25	0	0	0	0	0
	8.75	0	0	0	0	0
III 13.5	11.75	0.5	0	0	0	0
	12.5	0.75	0	0	0	0
	12.75	0.25	0	0	0	0
	9.25	0	0	0	0	0
Média 12.55	10.46	0.14	0	0	0	0
% (100%)	(83%)	(1%)	0	0	0	0

Tabela An.A3 - Valores originais do número de células viáveis ($\times 10^4$) no experimento com concentrações de 0, 5, 10, 25, 50 e 100% do solvente xilol para o tempo de 5 minutos

concentração						
células iniciais	0	5	10	25	50	100
I 13.83	11.75	0.75	1.25	1	0	0
	11.25	1.5	1.25	1	0	0
	8.25	2.75	1.25	1.25	0	0
	10.75	3	1.25	1.25	0	0
II 9.5	9	3.5	1.5	0.5	0	0
	9.25	3.75	2	0.75	0	0
	8	2.5	1.5	0.75	0	0
	8.25	2.75	1.25	0.25	0	0
III 13.33	7.75	3	1	1	0	0
	9.5	2.75	1.75	1.25	0	0
	11.25	3.5	2	1	0	0
	10	3.75	2	1	0	0
Média 12.22	9.58	2.79	1.5	0.91	0	0
% (100%)	(78%)	(22%)	(12%)	(7%)	0	0

Tabela An.A4 - Valores originais do número de células viáveis ($\times 10^4$) no experimento com concentrações de 0, 5, 10, 25, 50 e 100% do solvente clorofórmio para o tempo de 5 minutos

concentração						
células iniciais	0	5	10	25	50	100
I 10.75	9.75	0	0	0	0	0
	9.5	0.5	0	0	0	0
	10.25	0	0	0	0	0
	9	0	0	0	0	0
II 11.5	9.5	0	0	0	0	0
	9.25	0	0	0	0	0
	10.75	0	0	0	0	0
	11.25	0	0	0	0	0
III 13.75	11	0	0	0	0	0
	9	0.25	0	0	0	0
	11.75	0.25	0	0	0	0
	10.75	0.25	0	0	0	0
Média 12	10.14	0.10	0	0	0	0
% (100%)	(84%)	(0.83%)	0	0	0	0

Tabela An.A5 - Valores originais do número de células viáveis ($\times 10^4$) no experimento com concentrações de 0, 5, 10, 25, 50 e 100% do solvente halotano para o tempo de 5 minutos

concentração						
células iniciais	0	5	10	25	50	100
I 14.91	9	0	0	0	0	0
	8.25	0	0	0	0	0
	8	0	0	0	0	0
	10.5	0	0	0	0	0
II 10.66	9.25	0	0	0	0	0
	10.5	0	0	0	0	0
	9	0	0	0	0	0
	9.75	0	0	0	0	0
III 11.33	10.75	0	0	0	0	0
	10.5	0	0	0	0	0
	9.75	0	0	0	0	0
	9.5	0	0	0	0	0
Média 12.30	9.56	0	0	0	0	0
% (100%)	(77%)	0	0	0	0	0

ANEXO B – Etapa 2

Tabela An.B1 - Valores originais do número de células viáveis ($\times 10^4$) no experimento com concentrações de 0, 10 e 25% do solvente óleo de casca de laranja para o tempo de 10 minutos

concentração			
células iniciais	0	10	25
I 13.16	8	0.5	0
	12	0.5	0
	8	0.5	0
	10.5	0	0.25
II 12.75	10	0	0
	9.5	0	0
	10.5	0	0
	9.5	0.25	0
III 10	8	0	0
	11	1.5	0
	8.5	1.75	0.25
	12.5	1	0.25
Média 11.97 % (100%)	9.83 (82%)	0.5 (5%)	0.06 (0.50%)

Tabela An.B2 - Valores originais do número de células viáveis ($\times 10^4$) no experimento com concentrações de 0, 10 e 25% do solvente eucaliptol para o tempo de 10 minutos

concentração	0	10	25
células iniciais			
I 12.16	9	0.25	0
	9.75	0	0
	8.75	0	0
	11.75	0	0
II 11.5	9	0	0
	8.75	0	0
	9.75	0	0
	10.25	0	0
III 11	8.5	0	0
	8.75	0	0
	9	0	0
	9.5	0	0
Média 11.55	9.39	0.02	0
% (100%)	(81.3%)	(0.17%)	0

Tabela An.B3 - Valores originais do número de células viáveis ($\times 10^4$) no experimento com concentrações de 0, 10 e 25% do solvente xilol para o tempo de 10 minutos

concentração			
células iniciais	0	10	25
I 12.83	9.2	1.8	0.8
	10	2	0.6
	9.8	3.2	0.6
	14.8	2.6	0.4
II 10.83	11	0.8	0.4
	9.6	0.8	0.6
	9.6	0.6	0.4
	10	0.6	0.4
III 11	9.2	1	0.4
	10.2	0.6	0.4
	10.4	0.8	0.2
	9.8	0.8	0.4
Média 11.55	10.3	1.3	0.46
% (100%)	(89%)	(11%)	(3.98%)

Tabela An.B4 - Valores originais do número de células viáveis ($\times 10^4$) no experimento com concentrações de 0, 10 e 25% do solvente clorofórmio para o tempo de 10 minutos

concentração			
células iniciais	0	10	25
I 11.66	9.5	0	0
	7.25	0	0
	10	0	0
	13.25	0	0
II 11.33	8.25	0	0
	9.75	0	0
	11.5	0	0
	12	0	0
III 12	9.75	0	0
	10.5	0	0
	11.25	0	0
	12	0	0
Media 11.64	10.41	0	0
% (100%)	(89%)	0	0

Tabela An.B5 - Valores originais do número de células viáveis ($\times 10^4$) no experimento com concentrações de 0, 10 e 25% do solvente halotano para o tempo de 10 minutos

concentração			
células iniciais	0	10	25
I 11.5	8.6	0	0
	9	0	0
	9.2	0	0
	10	0	0
II 10.75	11.2	0	0
	10.2	0	0
	10.8	0	0
	9.2	0	0
III 11.75	10.8	0	0
	10.2	0	0
	10.2	0	0
	10.6	0	0
Média 11.33	10	0	0
% (100%)	(88%)	0	0

Tabela An.B6 - Valores originais do número de células viáveis ($\times 10^4$) no experimento com concentrações de 0, 10 e 25% do solvente óleo de casca de laranja para o tempo de 15 minutos

concentração			
células iniciais	0	10	25
I 13.16	13	0	0
	9.5	0.5	0
	7	0	0
	8.5	0	0.25
II 12.75	12	0	0
	11	0	0
	12.5	0	0
	11.5	0	0
III 10	8.5	0	0
	10.5	0	0
	11	0.5	0
	12	0	0.75
Média 11.97	10.58	0.08	0.08
% (100%)	(88%)	(0.6%)	(0.6%)

Tabela An.B7 - Valores originais do número de células viáveis ($\times 10^4$) no experimento com concentrações de 0, 10 e 25% do solvente eucaliptol para o tempo de 15 minutos

concentração			
células iniciais	0	10	25
I 12.16	9	0	0
	10	0	0
	9	0	0
	8.75	0	0
II 11.5	10	0	0
	9	0	0
	9.5	0	0
	9.25	0	0
III 11	9.25	0	0
	9.75	0	0
	9	0	0
	11	0	0
Média 11.55	9.45	0	0
% (100%)	(81.81%)	0	0

Tabela An.B8 - Valores originais do número de células viáveis ($\times 10^4$) no experimento com concentrações de 0, 10 e 25% do solvente xilol para o tempo de 15 minutos

concentração			
células iniciais	0	10	25
I 12.83	10.2	0.4	0.2
	11.4	0.4	0.2
	9.6	0.4	0
	9.6	0.2	0.2
II 10.83	10.8	0.4	0.2
	11.6	0.6	0.2
	9.4	0.8	0.4
	10.4	0.2	0.4
III 11	10.2	0.6	0.2
	10.6	0.6	0.2
	9.6	0.6	0.2
	8.8	0.6	0.2
Média 11.55	10.18	0.48	0.21
% (100%)	(88%)	(4.1%)	(1.8%)

Tabela An.B9 - Valores originais do número de células viáveis ($\times 10^4$) no experimento com concentrações de 0, 10 e 25% do solvente clorofórmio para o tempo de 15 minutos

concentração			
células iniciais	0	10	25
I 11.66	8.75	0	0
	8.75	0	0
	9.25	0	0
	9.75	0	0
II 11.33	9.75	0	0
	11	0	0
	12	0	0
	10.75	0	0
III 12	10	0	0
	10.75	0	0
	11.5	0	0
	11.75	0	0
Média 11.64	10.33	0	0
% (100%)	(88.7%)	0	0

Tabela An.B10 - Valores originais do número de células viáveis ($\times 10^4$) no experimento com concentrações de 0, 10 e 25% do solvente halotano para o tempo de 15 minutos

concentração			
células iniciais	0	10	25
I 11.5	9.2	0	0
	9.8	0	0
	9	0	0
	10.6	0	0
II 10.75	10	0	0
	11.4	0	0
	10.6	0	0
	10	0	0
III 11.75	9.8	0	0
	10.6	0	0
	11	0	0
	10.2	0	0
Média 11.33	10.18	0	0
% (100%)	(89.8%)	0	0

ANEXO C – Etapa 3

Tabela An.C1 - Valores originais do número de células viáveis ($\times 10^4$) no experimento com concentrações de 0, 5 e 10% do solvente óleo de casca de laranja para o tempo de 5 minutos. Solvente em contato direto com as células de fibroblastos com auxílio de lamínula de vidro e solvente vertido sobre o DMEM

concentração células iniciais (média)	0			5			10		
	I	II	III	I	II	III	I	II	III
(3a) 9.5 direto	8.75	8	8.5	1.6	1.4	1.2	0.25	0.25	0.5
	9.75	10	9.5	1	1.2	1.8	0.5	0.25	0.25
	8.5	8.75	9	1.2	1.4	1	0.25	0.75	0.25
	8	8.25	8	1.6	1.4	1.4	0.5	0.25	0.5
Média	8.75			1.35			0.37		
% (100%)	(92%)			(14%)			(3.8%)		
(3b) 10.25 indireto	9	9.5	9	6	5	5.5	1.2	1	1
	10	9.5	9.75	5.5	4.5	5	1.3	1.3	1
	9.5	9.25	9.75	3.5	5.5	4	0.75	0.95	1.25
	8.75	9	8.75	4	4	4.5	1	1	1
Média	9.31			4.75			1.06		
% (100%)	(90%)			(46%)			(10%)		

Tabela An.C2 - Valores originais do número de células viáveis ($\times 10^4$) no experimento com concentrações de 0, 5 e 10% do solvente eucaliptol para o tempo de 5 minutos. Solvente em contato direto com as células de fibroblastos com auxílio de lamínula de vidro e solvente vertido sobre o DMEM

concentração células iniciais (média)	0			5			10		
	I	II	III	I	II	III	I	II	III
(3a) 9.5 direto	8	8	8.5	0	0.25	0	0	0	0
	9.75	10	9.5	0	0	0	0	0	0
	8.5	8.75	9	0.5	0.25	0	0	0	0
	8	8.25	8	0	0	0.5	0	0	0
Média	8.75			0.12			0		
% (100%)	(92.1%)			(1%)			0		
(3b) 10.25 indireto	9	9.5	9	1.25	0.75	0.75	0	0	0
	10	9.5	9.75	0	0.25	0.75	0	0	0
	9.5	9.25	9.75	0.5	0.5	0	0	0	0
	8.75	9	8.75	0	0.25	0	0	0	0
Média	9.31			0.43			0		
% (100%)	(90%)			(4%)			0		

Tabela An.C3 - Valores originais do número de células viáveis ($\times 10^4$) no experimento com concentrações de 0, 5 e 10% do solvente xilol para o tempo de 5 minutos. Solvente em contato direto com as células de fibroblastos com auxílio de lamínula de vidro e solvente vertido sobre o DMEM

concentração	0			5			10		
	I	II	II	I	II	III	I	II	III
(3a) 9.5 direto	8	8	8.5	0	0	0	0	0	0
	9.75	10	9.5	0	0	0	0	0	0
	8.5	8.75	9	0	0	0	0	0	0
	8	8.25	8	0	0	0	0	0	0
Média	8.75			0			0		
% (100%)	(92%)			0			0		
(3b) 10.25 indireto	9	9.5	9	4	4.5	4	1.8	1.5	1.6
	10	9.5	9.75	5.25	4.5	4.25	1.9	1.75	1.9
	9.5	9.25	9.75	3	3.25	3.75	1.75	1.75	1.75
	8.75	9	8.75	3	3	3.25	1.25	1.95	1.45
Média	9.31			3.81			1.67		
% (100%)	(90%)			(37%)			(16%)		

Tabela An.C4 - Valores originais do número de células viáveis ($\times 10^4$) no experimento com concentrações de 0, 5 e 10% do solvente clorofórmio para o tempo de 5 minutos. Solvente em contato direto com as células de fibroblastos com auxílio de lamínula de vidro e solvente vertido sobre o DMEM

concentração células iniciais (média)	0			5			10		
	I	II	II	I	II	III	I	II	III
(3a) 9.5 direto	8	8	8.5	0	0	0	0	0	0
	9.75	10	9.5	0	0	0	0	0	0
	8.5	8.75	9	0	0	0	0	0	0
	8	8.25	8	0	0	0	0	0	0
Média	8.75			0			0		
% (100%)	(92%)			0			0		
(3b) 10.25 indireto	9	9.5	9	0.25	0	0	0	0	0
	10	9.5	9.75	0	0	0	0	0	0
	9.5	9.25	9.75	0	0.5	0	0	0	0
	8.75	9	8.75	0	0	0	0	0	0
Média	9.31			0.06			0		
% (100%)	(90%)			(0.58%)			0		

Tabela An.C5 - Valores originais do número de células viáveis ($\times 10^4$) no experimento com concentrações de 0, 5 e 10% do solvente halotano para o tempo de 5 minutos. Solvente em contato direto com as células de fibroblastos com auxílio de lamínula de vidro e solvente vertido sobre o DMEM

concentração	0			5			10		
	I	II	III	I	II	III	I	II	III
(3a) 9.5 direto	8	8	8.5	0	0	0	0	0	0
	9.75	10	9.5	0	0	0	0	0	0
	8.5	8.75	9	0	0	0	0	0	0
	8	8.25	8	0	0	0	0	0	0
Média	8.75			0			0		
% (100%)	(92%)			0			0		
(3b) 10.25 indireto	9	9.5	9	0.25	0.5	0.5	0	0	0
	10	9.5	9.75	2	1.75	1.0	0	0	0
	9.5	9.25	9.75	0.75	0.75	0.75	0	0	0
	8.75	9	8.75	0	0	0.75	0	0	0
Média	9.31			0.75			0		
% (100%)	(90%)			(7%)			0		

ANEXO D - Etapa 4

Tabela An.D - Valores originais do número de células viáveis ($\times 10^4$) no experimento com concentração de 5% dos solventes estudados para o tempo de 5 minutos. Solventes foram solubilizados previamente em álcool absoluto

solventes						
células iniciais	Controle (álcool absoluto)	óleo de laranja	eucaliptol	xilol	clorofórmio	halotano
I 8.91	7.2	1.4	0.2	0	0	0
	7.2	1.4	0.2	0	0	0
	5.3	1.4	0	0	0	0
	5.7	1.6	0.4	0	0	0
II 9	7.2	1.5	0.2	0	0	0
	8.7	1.4	0	0	0	0
	8.7	1.4	0.2	0	0	0
	7.2	1.4	0.2	0	0	0
II 8.25	5.5	1.4	0	0	0	0
	6.8	1.4	0.2	0	0	0
	5.9	1.4	0.2	0	0	0
	6.2	1.4	0	0	0	0
Média 8.72	6.8	0.43	0.016	0	0	0
% (100%)	(77%)	(16.3%)	(0.37%)	0	0	0

REFERÊNCIAS *

AUN, C. E.; Santos, M. Quantity of apical extruded material and efficiency of five different methods of removing gutta-percha and sealer from root canals- *in vitro* evaluation. **Rev Fac Odont FZL**, São Paulo, v. 1, n. 2, p. 63-73, jul-dez. 1989.

BARBAKOW, F. H.; CLEATON-JONES, P.; FRIEDMAN, D. An evaluation of 566 cases of root canal therapy in general dental practice 2. Postoperative observations. **J Endod**, Chicago, v. 6, n. 3, p. 485-489, Mar. 1980.

BARBOSA, S. V; BURKED, D. H.; SPANBERG, L. S. W. Cytotoxic effects of gutta-percha solvents. **J Endod**, Chicago, v. 20, n. 1, p. 6-8, Jan. 1994.

BERGER, C.R. **Endodontia**. São Paulo: Pancast, 1998. 723 p.

* De acordo com ABNT NBR-6023: 2000. Abreviatura de periódicos segundo Bases de Dados MEDLINE.

BETTI, L. V.; BRAMANTE, C. M. Quantec SC rotary instruments versus hand files for gutta-percha removal in root canal retreatment. **Int Endod J**, London, v. 34, n. 7, p. 514-519, Oct. 2001.

BROWNE, R. M. The *in vitro* assessment of the cytotoxicity of dental materials- does it have a role? **Int Endod J**, London, v. 21, n. 2, p. 50-58, Mar. 1988.

BROWNE, R. M.; TYAS, M. J. Biological testing of dental restorative materials *in vitro*- a review. **J Oral Rehabil**, Oxford, v. 6, n.4, p. 365-374, Oct. 1979.

CHANG, Y. C.; CHOU, M. Y. Cytotoxicity of halothane on the human gingival fibroblast cultures *in vitro*. **J Endod**, Chicago, v. 27, n. 2, p. 82-84, Feb. 2001.

COSTA, W. F.; ANTONIAZZI, J. H. Retratamento dos canais radiculares. *In* **Atualização na clínica odontológica**. São Paulo: Artes Médicas, 1992. 499 p.

DANIEL, R. L. D. P. **Análise comparativa da citotoxicidade in vitro do iodofórmio e hidróxido de cálcio empregando-se dois veículos diferentes**. 1998. 200f. Dissertação (Mestrado em Endodontia) – Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, São Paulo.

DELLA NINA, L.; ETHER, S.; OLIVEIRA, E.; PAULO, S. Avaliação das propriedades de solventes de gutta-percha. **Quintessencia**, Rio de Janeiro, v. 7, n. 9, p. 27-32, set. 1980.

DORHAND' S ILLUSTRATED MEDICAL DICTIONARY. Philadelphia: W. B. Sanders Co., 28th ed., 1994. 1940 p.

FEDERATION DENTAIRE INTERNATIONAL. Recommended standard practices for biological evaluation of dental materials. **Int Dent J**, London, v. 30, n. 2, p. 140-188, June 1980.

FERREIRA, J. J.; RHODES, J. S.; PITT FORD, T. R. The efficacy of gutta-percha removal using Profiles. **Int Endod J**, London, v. 34, n. 4, p. 267-274, June 2001.

FRESHNEY, R. I. **Culture of animal cells**: a manual of basic techniques. 4th ed. New York: Wiley-Liss, 2000. 577 p.

FRIEDMAN, S.; STABHOLTZ, A. Endodontic retreatment-case selection and technique. Part 1: criteria for case selection. **J Endod**, Chicago, v. 12, n. 1, p. 28-33, Jan. 1986.

FRIEDMAN, S.; STABHOLTZ, A.; TAMSE, A. Endodontic retreatment-case selection and technique. Part 3: retreatment techniques. **J Endod**, Chicago, v. 16, n. 11, p. 543-549, Nov. 1990.

GILBERT, B. O.; RICE, R. T. Re-treatment in endodontics. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**, St. Louis, v. 64, n. 3, p. 333-338, Jan. 1987.

GÖRDUYSUS, M. Ö.; TASMAN, F.; TUNCER, S.; ETIKAN, I. Solubilizing efficiency of different gutta-percha solvents: a comparative study. **J Nihon Univ Sch Dent**, Tokyo, v. 39, n. 3, p. 133-135, Sept. 1997.

GUTMANN, J. L.; DUMSHA, T. C.; LOVDAHL, P. E.; HOVLAND, E. J. Problem solving in **Endodontics** - prevention, identification, and management. St. Louis: Mosby, 1997. 365 p.

HANSEN, M. G. Relative efficiency of solvents used in endodontics. **J Endod**, Chicago, v. 24, n. 1, p. 38-40, Jan. 1998.

HEALING, B.; TAMSHE, A. Evaluation of the success of endodontically treated teeth. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**, St. Louis, v. 30, n. 4, p. 533-536, Oct. 1970.

HELGELAND, K.; LEIRSKAR, J. A further testing of the effect of dental materials on growth and adhesion of animal cells *in vitro*. **Scand J Dent Res**, Oslo, v. 80, n. 3, p. 206-212, May/June 1972.

HENSTEN-PETTERSEN, A. Comparison of the methods available for assessing cytotoxicity. **Int Endod J**, London, v. 21, n. 2, p. 89-99, Mar. 1988.

HUNTER, K. R.; DOBLECKI, W.; PELLEU, G. B. Halothane and eucalyptol as alternatives to chloroform for softening gutta-percha. **J Endod**, Chicago, v. 17, n. 7, p. 310-312, July 1991.

HÜSMANN, M.; STOTZ, S. Efficacy, cleaning ability and safety of different devices for gutta-percha removal in root canal retreatment. **Int End J**, London, v. 30, n. 4, p. 227-233, July 1997.

IMURA, N.; ZUOLO, M. L.; FERREIRA, M. O. F.; NOVO, N. F. Effectiveness of the canal finder and hand instrumentation in removal of gutta-percha root fillings during root canal retreatment. **Int Endod J**, London, v. 29, n. 6, p. 382-386, Nov. 1996.

INGLE, J. I. Exitos y fracasos en endodoncia. **Rev Asoc Odontol Argent**, Buenos Aires, v. 50, n. 2, p. 67-74, Feb. 1962.

KANTZ, W. E.; FERRILLO, P. J.; ZIMMERMANN, E. R. Cytotoxicity of three endodontic intracanal medicaments. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**, St. Louis, v. 38, n. 4, p. 600-604, Oct. 1974.

KAPLOWITZ, G. J. Evaluation of gutta-percha solvents. **J Endod**, Chicago, v. 16, n. 11, p. 539-540, Nov. 1990.

KAUFMAN, D.; MOR, C.; STABHOLTZ, A.; ROTSTEIN, I. Effect of gutta-percha solvents on calcium and phosphorus levels of cut human dentin. **J Endod**, Chicago, v. 23, n. 10, p. 614-615, Oct. 1997.

KAWAHARA, H.; YAMAGAMI, A.; NAKAMURA, M. Biological testing of dental materials by means of tissue culture. **Int Dent J**, London, v. 18, n. 2, p. 443-467, June 1968.

KAWAHARA, H.; IMAI, K.; KAWAHARA, D. Photo-pattern analysis and computation in the evaluation of the citotoxicity of dental materials *in vitro*. **Int Dent J**, London, v. 21, n. 2, p. 100-105, Marc. 1988.

KEREKES, K.; TRONSTAD, L. Long-term results of endodontic treatment performed with a standardized technique. **J Endod**, Chicago, v. 5, n. 3, p. 83-90, Mar. 1979.

KETTERING, J. D.; TORABINEJAD, M. Cytotoxicity of root canal sealers: a study using HeLa cells and fibroblasts. **Int Endod J**, London, v. 17, n. 2, p. 60-66, Apr. 1984.

LADLEY, R. W.; CAMPBELL, A. D.; HICKS, M. L.; LI, S. H. Effectiveness of halothane used with ultrasonic or hand instrumentation to remove gutta-percha from the root canal. **J Endod**, Chicago, v. 17, n. 5, p. 221-224, May 1991.

LOPES, H. P.; SIQUEIRA Jr., J. F. **Endodontia**- Biologia e técnicas. Rio de Janeiro: Medsi, 1999. 650 p.

LEIRSKAR, J.; HELGELAND, K. Mechanism of toxicity of dental materials. **Int Endod J**, London, v. 14, n. 1, p. 42-48, Jan. 1981.

LOVDAHL, P. E. Endodontic retreatment. **Dent Clin North Am**, Philadelphia, v. 36, n. 2, p. 473-490, Apr. 1992.

LU, D. P. Alternative method for removing gutta-percha from canals. **N Y State Dent J**, New York, v. 60, n. 5, p. 31-33, May 1994.

LUEBKE, R. G.; GLICK, D. H.; INGLE, J. I. Indications and contraindications for endodontic surgery. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**, St. Louis, v. 18, n. 1, p. 97-113, July 1964.

McDONALD, M. N.; VIRE, D. E. Chloroform in the endodontic operator. **J Endod**, Chicago, v. 18, n. 6, p. 301-303, June 1992.

MALHEIROS, C. F. **Avaliação comparativa da citotoxicidade in vitro de EDTA e ácido cítrico aplicados em fibroblastos cultivados**. 2000. 98 f. Dissertação (Mestrado em Endodontia) – Faculdade de Odontologia, Universidade de São Paulo, São Paulo.

MASILLAMONI, C. R. M.; KETTERING, J. D.; TORABINEJAD, M. The biocompatibility of some root canal medicaments and irrigants. **Int Endod J**, London, v. 14, n. 2, p. 115-120, May 1981.

MERYON, S. D. Quantitative enzyme spectroscopy in the assessment of cell damage *in vitro*. **Int Dent J**, London, v. 21, n. 2, p. 113-119, Marc. 1988.

MURPHY, W. M. The testing of endodontic materials *in vitro*. **Int Dent J**, London, v. 21, n. 2, p. 170-171, Marc. 1988.

OYAMA, K. O. N.; SIQUEIRA, E. L.; SANTOS, M. Action of different solvents on the gutta-percha cones. **ECLER Endod**, São Paulo, v. 1, n. 3, sept. 1999. Disponível em: http://ecler.bvs.Br/scielo.php?script=sci_issues&pid=1516-4055&lng=en&nrm=iso. Acesso em: 17 fev. 2003.

OYAMA, K. O. N.; SIQUEIRA, E. L.; SANTOS, M. *In vitro* study of solvent on the root canal retreatment. **Braz Dent J**, Ribeirão Preto, v. 13, n. 3, p. 208-211, set./dez.. 2002.

PAIVA, J. G.; ANTONIAZZI, J. H. **Endodontia**: bases para a prática clínica. 2^a. ed. São Paulo: Artes Médicas, 1988. 886 p.

PASCON, E. A.; SPANGBERG, L. S. W. *In vitro* cytotoxicity of root canal filling materials: 1. Gutta-percha. **J Endod**, Chicago, v. 16, n. 9, p. 429-433, Sept. 1990.

PÉCORA, J. D.; SPANÓ, J. C. E.; BARBIN, E. L. *In vitro* study on softening of gutta-percha cones in endodontic retreatment. **Braz Dent J**, Ribeirão Preto, v. 4, n. 1, p. 43-47, jan./jul. 1993.

PÉCORA, J. D.; COSTA, W. F.; SANTOS FILHO, D.; SARTI, S. J. Apresentação de um óleo essencial obtido de citrus aurantium, eficaz na desintegração do cimento de óxido de zinco-eugenol do interior do canal radicular. **Odonto**, São Bernardo do Campo, v. 1, n. 5, p. 130-132, jan./fev. 1992.

ROTSTEIN, I.; COHENCA, N.; TEPEROVICH, E.; MOSHONOV, J.; MOR, C.; ROMAN, I.; GEDALIA, I. Effect of chloroform, xylene, and halothane on enamel and dentin microhardness of human teeth. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**, St. Louis, v. 87, n. 3, p. 366-368, Mar. 1999.

SANTOS, E. M. **Análise da citotoxicidade in vitro de fármacos utilizados na terapia endodôntica de dentes decíduos. Estudo comparativo da ação da pasta Guedes-Pinto, formocresol, glutaraldeído e ácido fosfórico sobre cultura de fibroblastos.** 1998. 153 f. Dissertação (Mestrado em Patologia Bucal). Faculdade de Odontologia, Universidade de São Paulo, São Paulo.

SCELZA, M. F. Z.; DANIEL, R. L. D P.; SANTOS, E. M.; JAEGER, M. M. M. Cytotoxic effects of 10% citric acid and EDTA-T used as root canal irrigants: an *in vitro* analysis. **J Endod**, Chicago, v. 27, n. 12, p. 741-743, Dec. 2001.

SCHMALTZ, G. Agar overlay method. **Int Dent J**, London, v. 21, n. 2, p. 59-66, Marc. 1988.

SCHMALTZ, G. Use of cell cultures for toxicity testing of dental materials- advantages and limitations. **J Dent**, v. 22, Suppl 2, S6-S11. 1994

SPANGBERG, L. Biological effects of root canal filling materials. 3. Effect of Tween 80 on human cells. **Odontol Revy**, Lund, v. 20, n. 3, p. 283-287, 1969.

SPANGBERG, L. Biological effects of root canal filling materials. 4. Effect *in vitro* of solubilised root canal filling materials on HeLa cells. **Odontol Revy**, Lund, v. 20, n. 3, p. 289-299, 1969.

SPANGBERG, L.; AL-NAZHAN, S. A. The radiochromium release method for evaluation of cytotoxicity *in vitro*. **Int Endod J**, London, v. 21, n. 2, p. 72-78, Mar. 1988.

SPANGBERG, L. ; CONN, F. Correlation of *in vivo* and *in vitro* screening tests. **J Endod**, Chicago, v. 4, n. 10, p. 296-299, Oct. 1978.

SPANGBERG, L.; CONN, F. Kinetic and quantitative evaluation of material cytotoxicity *in vitro*. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**, St. Louis, v. 35, n. 3, p. 389-401, Mar. 1973.

SPANGBERG, L.; LANGE LAND, K. Biologic effects of dental materials. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**, St. Louis, v. 35, n. 3, p. 403-414, Mar. 1973.

SPANGBERG, L.; PASCON, E. A. The importance of material preparation for the expression of cytotoxicity during *in vitro* evaluation of biomaterials. **J Endod**, Chicago, v. 14, n. 5, p. 247-250, May 1988.

SPANÓ, J. C. E.; BARBIN, E. L.; BONINI, A.; PÉCORA, J. D. Eficácia dos óleos essenciais na desobturação dos canais radiculares. **Robrac**, Goiânia, v. 5, n. 14, p. 25-28, mar. 1995.

STABHOLZ, A.;FRIEDMAN, S. Endodontic retreatment-case selection and technique. Part 2: treatment planning for retreatment. **J Endod**, Chicago, v.14, n. 12, p. 607-614, Dec. 1988.

TAINTOR, J. F.; INGLE, J. I.; FAHID, A. Retreatment versus further treatment. **Clin Prev Dent**, Philadelphia, v. 5, n. 5, p. 8-14, Sept./Oct. 1983.

TAMSE, A.; UNGER, U.; METZGER, Z.; ROSENBERG, M. Gutta-percha solvents-a comparative study. **J Endod**, Chicago, v. 12, n. 8, p. 337-339, Aug. 1986.

TEPLITSKY, P. E.; RAYNER, D.; CHIN, I.; MARKOWSKY, R. Gutta-percha removal utilizing GTX instrumentation. **J Can Dent Assoc**, Ottawa, v. 58, n. 1, p. 53-58, Jan. 1992.

THE CONDENSED CHEMICAL DICTIONARY. 6th ed. New York: Reinhold Publishing Corporation, 1966. 1256 p.

THE MERCK INDEX an encyclopedia of chemicals , drugs, and biologicals. 11st , Centennial Edition, New Jersey: Merck & Co. 1989.

TORKELSON, T. R.; OYEN, F.; ROWE, V. K. The toxicity of chloroform as determined by single and repeated expose of laboratory animals. **Am Ind Hyg Assoc J**, Chicago , v. 37, n. 12, p. 697-705, Dec. 1976.

TYAS, M. J. Quantitative enzyme cytochemistry in the *in vitro* biocompatibility testing of dental materials. **Int Endod J**, London, v. 21, n. 2, p. 106-112, Mar. 1988.

UEMURA, M.; HATA, G.; TODA, T.; WEINE, F. S. Effectiveness of eucalyptol and *d*-limonene as gutta-percha solvents. **J Endod**, Chicago, v. 23, n. 12, p. 739-747, Dec. 1997.

VANDER WALL, G. L.; DOWSON, J.; SHIPMAN Jr., C.; ARBOR, A. Antibacterial efficacy and cytotoxicity of three endodontic drugs. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**, St. Louis, v. 33, n. 2, p. 230-234, Feb. 1972.

WENNBERG, A. An *in vitro* method for toxicity evaluation of water-soluble substances. **Acta Odont Scand**, v. 34, n. 1, p. 33-41, Jan. 1976.

WENNBERG, A. *In vitro* assessment of the biocompatibility of dental materials-the Millipore filter method. **Int Endod J**, London, v. 21, n. 2, p. 67-71, Mar. 1988.

WENNBERG, A.; ORSTAVIK, D. Evaluation of alternatives solvents to chloroform in endodontic practice. **Endod Dent Traumatol**, Copenhagen, v. 5, n. 5, p. 234-237, Oct. 1989.

WILCOX, L. R. Endodontic retreatment with halothane versus chloroform solvent. **J Endod**, Chicago. v. 21, n. 6, p. 305-307, June 1995.

WILCOX, L. R.; KRELL, K. V.; MADISON, S.; RITTMAN, B. Endodontic retreatment: evaluation of gutta-percha and sealer removal and canal reinstrumentation. **J Endod**, Chicago. v. 13, n. 9, p. 453-457, Sept. 1987.

WOURMS, D. J.; CAMPBELL, A. D.; HICKS, L.; PELLEU, G. B. Alternative solvents to chloroform for gutta-percha. **J Endod**, Chicago v. 16, n. 5, p. 224-226, May 1990.

ZAKARIASEN, K. L.; BRAYTON, S. M. COLLINSON, D. M. Efficient and effective root canal retreatment without chloroform. **J Can Dent Assoc**, Ottawa, v. 56, n. 6, p. 509-512, June 1990.

SUMMARY

COMPARATIVE EVALUATION *IN VITRO* OF SOLVENTS CITOTOXICITY USED IN ENDODONTIC RETREATMENT

The aim of this study was to compare *in vitro* solvents used in endodontic retreatment therapy: orange oil, eucalyptol, xylene, chloroform and halothane through cytotoxicity evaluation of each solvent in different final concentration and contact conditions to NIH 3T3 fibroblasts cells lines. The experiment was divided in four stages: stage 1- the solvents were mixed in culture medium (DMEM) in final concentrations of 0, 5, 10, 25, 50 and 100% placed on the cells in culture for periods of 5 minutes; stage 2- the solvents were mixed in culture medium in finals concentrations of 0, 10 and 25% placed on the cells in culture for periods of 10 and 15 minutes; stage 3a- the solvents were placed on the fibroblasts cells (direct contact) and added culture medium; stage 3b- the fibroblasts cells get first culture medium and after that solvents were placed (indirect contact), in bouth the finals concentrations were 0, 5 and 10% for periods of 5 minutes; stage 4- solvents were previously solubilized in absolut alcohol in 1:1 proportion and mixed in culture medium in 5% final concentration for periods of 5 minutes. The evaluation were achieved by cellular counting through dyed exclusion method-Trypan blue.

The results showed that all solvents were toxic *in vitro*, and orange oil was less toxic and it allowed some cellular viability. And we could observe that a previous solvents preparation influenced in the viable cells percentage.

AUTORIZAÇÃO

Autorizo a reprodução e/ou divulgação total ou parcial da presente obra, por qualquer meio convencional ou eletrônico, desde que citada a fonte e comunicada, ao autor, a referência em que consta a citação.

Kazumi Onaga Nagayama Oyama

Assinatura

Instituição / Departamento: Faculdade de
Odontologia – Departamento de Dentística –
Disciplina de Endodontia

Local e data: São Paulo, março de 2003

Endereço: Av. Professor Lineu Prestes, 2227 –
Cidade Universitária – São Paulo - SP

E-mail: kazumioyama@usp.br