**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU**

RAQUEL ZANIN MIDENA

**Análise da reação do tecido subcutâneo de ratos à
implantação de pastas de hidróxido de cálcio associadas a
diferentes substâncias**

**BAURU
2011**

RAQUEL ZANIN MIDENA

Análise da reação do tecido subcutâneo de ratos à implantação de pastas de hidróxido de cálcio associadas a diferentes substâncias

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Odontológicas Aplicadas, área de concentração Endodontia.

Orientador: Prof. Dr. Roberto Brandão Garcia

Versão corrigida

BAURU
2011

M584a Midena, Raquel Zanin
Análise da reação do tecido subcutâneo de ratos à
implantação de pastas de hidróxido de cálcio
associadas a diferentes substâncias/ Raquel Zanin
Midena – Bauru, 2011.
124p. : il. ; 31cm.

Dissertação (Mestrado) – Faculdade de
Odontologia de Bauru. Universidade de São Paulo

Orientador: Prof. Dr. Roberto Brandão Garcia

Nota: A versão original desta dissertação encontra-se disponível no Serviço de Biblioteca e Documentação da Faculdade de Odontologia de Bauru - FOB/USP

Autorizo, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação/tese, por processos fotocopiadores e outros meios eletrônicos.

Assinatura: _____

Data: ____/____/____

Data de aprovação pela Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa
em Animais da Faculdade de Odontologia de Bauru – USP:
Comitê de Ética da FOB-USP
Protocolo nº: 023/2009
Data: 19/08/2009

Dados Curriculares

Raquel Zanin Midená

<i>Nascimento</i>	<i>09 de maio de 1986 Jaú - SP</i>
<i>Filiação</i>	<i>Natal Sebastião Midená e Elza Maria Zanin Midená</i>
<i>2005-2008</i>	<i>Graduação em Odontologia na Universidade do Sagrado Coração, Bauru – SP</i>
<i>2009-2009</i>	<i>Atualização Simplificação do tratamento endodôntico: Instrumentação Rotatória APCD - Bauru</i>
<i>2010-2010</i>	<i>Atualização em Endodontia- Enfoque em molares APCD - Bauru</i>
<i>2009-2011</i>	<i>Curso de Pós-Graduação em Endodontia, nível de mestrado, na faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo</i>
<i>Associações</i>	<i>Associação Paulista de Cirurgiões Dentistas - Regional Bauru Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica - SBPqO</i>

Dedicatória

Dedicatória

Aos meus pais Natal e Elza e às minhas irmãs Renata e Juliana que são minhas maiores alegrias. Por tudo que aprendi com vocês, por estarem sempre ao meu lado me incentivando a crescer cada vez mais e estendendo a mão sempre que preciso. A vocês dedico esse trabalho, pois sem o apoio que me deram, em todos os sentidos, não chegaria até aqui. Agradeço a Deus todos os dias pela família maravilhosa que me deu. Obrigada por tudo que fazem por mim. Amo vocês incondicionalmente!

Ao meu namorado Camilo que com toda sua paciência, me ajudou, me entendeu nos momentos de maior angústia e por me incentivar a não desistir. Obrigada pelo amor que tem por mim, pela dedicação, pelo carinho, por sempre me ouvir, me apoiar e estar ao meu lado nessa etapa da minha vida. Te amo!

À minha avó materna, Josefa, por sempre se preocupar comigo, por estar sempre disposta a me ajudar, pelo amor que tem por mim. Por sempre me colocar em suas orações pedindo sempre o melhor e agradecendo a cada conquista. Obrigada por estar sempre perto. A senhora é muito importante na minha vida!

Aos meus avós paternos, Sérgio e Conceição pelo carinho que sempre tiveram comigo e pelas palavras de incentivo. Muito obrigada por tudo!

*À toda a **minha família**, que sempre estiveram presentes, de algum modo, em todos os momentos da minha vida. Deus não poderia ter me dado presente maior que ter vocês sempre ao meu lado. Vocês são essenciais na minha vida!*

À vocês dedico este trabalho realizado com muito amor e dedicação!

Agradecimientos

Agradecimento Especial

À Deus pela vida abençoada que me deste, pela família maravilhosa que tenho, pelo meu namorado, meus amigos, por minha saúde, enfim pela benção de ter tudo que me faz feliz. Agradeço pelas pessoas que colocou em meu caminho, que foram fundamentais na minha vida pessoal e formação profissional. Obrigada por sempre estar ao meu lado, me guiando e protegendo. Muito obrigada Senhor!

*"O Senhor é meu pastor, nada me faltará."
Salmo 23*

Agradecimento Especial

Ao meu orientador, Prof. Dr. Roberto Brandão Garcia, pela oportunidade de realizar o curso de Mestrado no departamento de Endodontia, pela confiança em mim depositada, pela paciência e orientação. Obrigada por ser sempre tão solícito, educado e atencioso. O senhor é um exemplo de amor e dedicação ao que faz. Sou muito feliz por ter sido sua orientada.

Meu sincero respeito e gratidão!

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Marco Antonio Hungaro, pelo incentivo e confiança em mim depositada desde a graduação. Obrigada pelo incentivo, pelos ensinamentos, por sempre estar disposto a ajudar. Obrigada pela ajuda no desenvolvimento e também na análise estatística desse trabalho. Serei eternamente grata por tudo o que o senhor fez por mim. Muito obrigada!

Aos professores da disciplina de Endodontia da Faculdade de Odontologia de Bauru, Prof. Dr. Floris Monteiro Bramante, Prof. Dr.IVALDO Gomes de Moraes, Prof. Dr. Norberti Bernardinelli, Prof^ª. Dra. Flávia Bombarda Andrade, pela convivência durante o curso de Mestrado, pelos ensinamentos repassados, pela oportunidade de crescimento profissional e pessoal. Tudo o que vivenciei nesse período levarei para sempre comigo. Obrigada!

Aos professores da Universidade Sagrado Coração, da disciplina de Endodontia Prof. Dr. José Carlos Yamashita e Prof. Dr. Sylvio de Campos Fraga.

Ao Professor da disciplina de cirurgia Prof. Dr. Roberto Yoshio Kawakami, pelos ensinamentos durante a graduação, pela amizade e pelo incentivo. Obrigada!

Ao amigo Prof. Ms. Rodrigo Ricci Vivan, pelo incentivo e confiança que sempre teve por mim. Obrigada pela amizade e por sempre estar disposto a ajudar. Você foi uma das pessoas que mais contribuíram para que eu realizasse o curso de Mestrado. Serei eternamente grata a tudo que fez por mim. Obrigada pelas conversas e por todos os ensinamentos. Você é uma pessoa iluminada e foi essencial para meu aprendizado! Obrigada por tudo.

Aos professores do Centrinho Prof. Dr. Celso Kenji Nishiyama e Prof^a Dra. Fernanda Gomes de Moraes, pelos ensinamentos, pela convivência, amizade e pelo apoio.

Ao Prof. Dr. Paulo Henrique Weckwerth, pela doação do fitoterápico usado nesse trabalho, pela disposição e pelos ensinamentos passados.

Ao Prof. Dr. Gerson Francisco de Assis, do departamento de histologia, por permitir que parte dessa pesquisa fosse realizada nesse departamento. Obrigada também pela orientação na análise dos resultados.

Aos meus colegas de mestrado *Aldo, Bruno, Clarissa, Elaine, Marcelo, Marina, Paloma e Thais*. Obrigada pela amizade durante o curso, aprendi muito com cada um de vocês. Obrigada pelos bons momentos de convivência, pelas conversas e risadas. Compartilhamos muitos momentos bons que ficarão guardados para sempre comigo.

Agradeço ainda ao *Bruno*, a *Marina* e a *Paloma*, pelas horas passadas no biotério durante a fase de cirurgia dos animais, obrigada pela prontidão e disposição em ajudar.

Agradeço também ao colega de doutorado *Ronald*, por tudo que aprendi com você e por todas as vezes que não hesitou em ajudar. Obrigada pela convivência, pelos conselhos e pela amizade.

As amigas *Amanda Maliza, Vanessa Perão, Melissa Sasaki*, e *Adriana Paetano*. Agradeço a vocês por toda a ajuda e amizade desde a época da faculdade. Cada uma de vocês tem um pouco de participação nesse trabalho. Obrigada por tudo.

Aos amigos do Centrinho, *Eliza, Patricia, Dayane, Janaina, Marcela, Andrea, Renata, Denise, Stella, Amanda, Milena, José (Pepe) e Tulio*. Obrigada pela convivência, pela compreensão e pela amizade.

À amiga Mirian Galvão Bueno, pela amizade que construímos durante o tempo do mestrado. Obrigada por dividir comigo não só o apartamento, mas também todos os momentos vividos nesse período.

Foi um presente ter te conhecido, Obrigada pelos conselhos, pelos puxões de orelha, pelas conversas e risadas.

À Bruna Moron e à Elaine Consolmagno pelo carinho que têm por mim, obrigada por estarem sempre por perto e pela amizade.

Agradeço a Deus por ter colocado vocês na minha vida. Com vocês meus dias em Bauru foram mais felizes.

À Gabriela Cristina de Oliveira, por dividir comigo a etapa final desse trabalho. Obrigada pelas conversas, por me ouvir nos momentos mais difíceis e obrigada principalmente pela amizade.

À amiga Cristiana Gambarini, pelas palavras de incentivo, por torcer por mim e estar sempre ao meu lado. Ao Gabriel João Pedro, pela confiança e conselhos. Obrigada pela amizade de vocês que, para mim, é muito importante.

Às funcionárias do departamento de Endodontia, Suely e Dona Neide pela convivência harmoniosa e pela disposição em sempre ajudar. Ao Edimauro de Andrade, obrigada por toda a ajuda durante o desenvolvimento dos trabalhos, pelos ensinamentos e pelas horas passadas no microscópio.

Às biólogas do departamento de Histologia, Tânia Mary Pestari, Daniele Santi Peolin e Patrícia de Sá M. Germini, por toda a ajuda durante a realização dos procedimentos histotécnicos, por sempre estarem dispostas a ajudar. Obrigada pelos conselhos e pelos ensinamentos.

Aos funcionários do Biotério da Faculdade de odontologia de Bauru, Luiz Carlos, Erasmo e Richard, pela disponibilidade, ajuda, total atenção durante a realização dos procedimentos e pelo cuidado com os animais utilizados nesse estudo.

Muito obrigada a todos!

Agradecimentos Institucionais

Agradecimentos Institucionais

À Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo na pessoa do seu Diretor, Prof. Dr. José Carlos Pereira.

À Comissão de Pós graduação, na pessoa do Prof. Dr. Paulo César Rodrigues Conti.

Ao Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Endodontia, Prof. Dr. Roberto Brandão.

Ao Programa de Apoio a Pós-Graduação (PROAP) pela ajuda com a disponibilização dos materiais utilizados nesse trabalho.

Aos funcionários da Biblioteca e da Pós-Graduação pelo auxílio cedendo parte do material necessário para a realização da parte experimental da pesquisa.

À CAPES pelo apoio financeiro para a elaboração e concretização desse trabalho.

*"O começo da sabedoria é encontrado
na dúvida; duvidando começamos a
questionar, e procurando podemos
achar a verdade."*

(Pierre Abelard)

RESUMO

O presente estudo teve como objetivo avaliar e comparar, morfológicamente, a resposta do tecido subcutâneo de ratos frente ao de hidróxido de cálcio associado a diferentes substâncias, sendo elas: clorexidina 0,2% em propilenoglicol, clorexidina 0,4% em propilenoglicol, *Casearia sylvestris* Sw (Guaçatonga) em propilenoglicol e propilenoglicol (que serviu como grupo controle). Para isso, foram utilizados 72 ratos Wistar. As pastas foram preparadas e colocadas em tubos de polietileno, que foram implantados no tecido subcutâneo do dorso de cada animal. Os períodos experimentais foram de 7, 14 e 30 dias após o procedimento cirúrgico, quando então, os animais foram mortos. As amostras coletadas passaram por processamento histotécnico e foram feitos cortes de 5µm de espessura e coloração com Hematoxilina e Eosina (H.E.). A avaliação das respostas do tecido conjuntivo em contato com as pastas testadas foi realizada de forma descritiva e quantitativa subjetiva. Os dados obtidos após análise quantitativa foram submetidos ao teste estatístico de Kruskal-Wallis e Dunn com nível de significância $p < 0,05$. Os resultados mostraram que a clorexidina 0,4%, de modo geral, se mostrou mais irritante que os demais grupos. O extrato de *Casearia sylvestris* Sw apresentou comportamento satisfatório em relação à intensidade da reação inflamatória, igualando-se aos grupos 1 e 4. Com base na metodologia aplicada, foi possível concluir que aos 30 dias todos os grupos mostraram não interferir no processo de reparo e que todas as substâncias experimentais (clorexidina a 0,4%, a 0,2% e o extrato de *Casearia sylvestris* Sw) podem ser associadas ao hidróxido de cálcio.

Palavras-chave: Hidróxido de cálcio. Clorexidina. Fitoterapia.

ABSTRACT

Analysis of the reaction of rat subcutaneous tissue to the implantation of calcium hydroxide pastes associated with different substances

This study aimed to evaluate the response of rat subcutaneous tissue against calcium hydroxide associated with different substances: chlorhexidine 0.2% in propylene glycol, 0.4% chlorhexidine in propylene glycol, *Casearia sylvestris* (guaçatonga) in propylene glycol and propylene glycol (control group). The pastes were prepared and placed in polyethylene tubes, which were implanted in the dorsum of each animal (N=18). The experimental periods were 7, 14 and 30 days after surgery, at which time the animals were killed. The samples were histologically processed and stained with hematoxylin and eosin. The evaluation of the responses of connective tissue in contact with the pastes was performed using descriptive and quantitative analyses. The data obtained after the quantitative analysis were subjected to statistical test of Kruskal-Wallis and Dunn with significance level $p < 0.05$. In overall, chlorhexidine 0.4%/calcium hydroxide showed the more intense inflammatory reaction in comparison to the other groups. The extract of *Casearia sylvestris* showed satisfactory performance in relation to the intensity of the inflammatory reaction, similar to groups 1 and 4. Based on the methodology, it was concluded that at 30 days all the materials do not to interfere with the repair process and that all experimental substances (chlorhexidine 0.4%, 0.2% and the extract of *Casearia sylvestris*) can be associated with calcium hydroxide.

Key words: Calcium Hydroxide. Chlorhexidine. Phytotherapy.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Folhas de *Casearia sylvestris* (FONTE:YAMASHITA, C. I., 2006) 63
- Figura 2 - (A)Tricotomia.(B) Anti-sepsia com Povidine.(C) Incisão.(D) Inserção do tubo com auxílio de um trocarte. (E)Sutura com fio de seda 4-0.(F) Localização dos tubos implantados. 67
- Figura 3 - Remoção da peça com tecido cutâneo e subcutâneo 69
- Figura 4 - (A) Grupo 1 - Remanescente de pasta experimental (●); macrófago (↑) e célula gigante (↓). (B) Grupo 2 – Tecido fibrocelular (★); infiltrado macrofágico e áreas sugestivas de material implantado (●). (C) Grupo 3 – Tecido conjuntivo neoformado com presença de macrófagos e células gigantes(↑) e áreas sugestivas de restos de material implantado. (D) Grupo 4 – Tecido conjuntivo com áreas sugestivas de restos de material implantado (●), células gigantes multinucleadas (↓) e macrófagos (↑). 77
- Figura 5 - (A) Grupo 1 – Resquícios de material implantado (●) e presença marcante de macrófagos (↑) e células gigantes (↓). (B) Grupo 2 – Tecido fibrocelular (★), áreas sugestivas de material implantado (●) e células gigantes (↓). (C) Grupo 3 – Tecido conjuntivo denso, com áreas de maturação (★), presença de macrófagos e células gigantes (↓) e restos de material implantado (●). (D) Grupo 4 – Presença de tecido fibrocelular (★) e restos de material implantado envoltos por células gigantes (↓). 81
-

Figura 6– (A) Grupo 1 – Tecido fibrocelular (★),discreto infiltrado macrofágico (↑) e restos de material implantado (●). (B) Grupo 2 – Presença de tecido fibrocelular (★), células gigantes (↓) e restos de material implantado (●). (C): Grupo 3 – Tecido fibrocelular (★) e restos de material implantado(●) (D) Grupo 4- Tecido fibrocelular (★), células gigantes (↓) envolvendo áreas sugestivas de resto de material implantado (●).

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1 - Representação gráfica das diferenças estatísticas encontradas entre os grupos para reação inflamatória no período de 14 dias. Letras iguais representam ausência de diferença estatística. 88
- Gráfico 2 - Representação gráfica das diferenças estatísticas encontradas entre os grupos para reação inflamatória no período de 30 dias. Letras iguais representam ausência de diferença estatística. 88
- Gráfico 3 - Representação gráfica das diferenças estatísticas encontradas entre os materiais para formação de tecido fibrocelular no período de 14 dias. Letras iguais representam ausência de diferença estatística. 89
-

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 - Distribuição dos grupos, associações e períodos experimentais 65
- Tabela 2 - Mediana, valores máximo e mínimo dos escores obtidos da análise reação inflamatória nos três períodos experimentais. Letras minúsculas iguais nas colunas representam ausência de diferença estatística entre grupos em cada período e letras maiúsculas iguais representam ausência de diferença estatística entre períodos em cada grupo. 87
- Tabela 3 - Mediana, valores máximo e mínimo dos escores obtidos da análise da formação de tecido fibrocelular nos três períodos experimentais. Letras minúsculas iguais nas colunas representam ausência de diferença estatística entre os grupos em cada período e letras maiúsculas iguais representam ausência de diferença estatística entre períodos em cada grupo. 89
-

LISTA DE ABREVIATURA, SIGLAS E SÍMBOLOS

Ca(OH) ₂	Hidróxido de Cálcio
pH	Potencial hidrogeniônico
PMCC	Paramonoclorofenol canforado
CLX	Clorexidina
OZE	Óxido de Zinco e Eugenol
+	Mais
mm	Milímetro
nº	Número
CDC	Cimento dentina canal
EDTA	Ácido etileno diaminotetracético
PMC	Paramonoclofeno
H.E.	Hematoxilina e eosina
vs	versus
MTA	Mineral Tiroxide Aggregate
<	Menor
>	Maior
%	Por cento
°C	graus Celsius
mL	Mililitro
CO ₂	Dióxido de carbono
mg	Miligrama
PVC	Cloreto de Polivinila
HTC	Hepatoma tissue culture
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DL50	Dose letal
α	Alfa
β	Beta
BHI	Infusão de cérebro e coração
dL	decilitro
Ltda	Sociedade limitada

g	grama
P.A.	Pró análise
P	Nível de significância
ADA	American Dental Association
Sw	Swart

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	25
2	REVISÃO DE LITERATURA	31
	2.1 Hidróxido de Cálcio	33
	2.2 Digluconato de Clorexidina	42
	2.3 Associação do Ca(OH)_2 com Digluconato de Clorexidina	47
	2.4 <i>Casearia sylvestris</i> SW	51
3	PROPOSIÇÃO	57
4	MATERIAL E MÉTODOS	61
	4.1 Extrato de <i>Casearia sylvestris</i> Sw	63
	4.2 Soluções de Clorexidina	64
	4.3 Animais	64
	4.4 Tubos de Polietileno	64
	4.5 Preparo das Pastas	65
	4.6 Anestesia dos Animais	65
	4.7 Grupos Experimentais	65
	4.8 Procedimentos Cirúrgicos	66
	4.9 Morte dos Animais e Obtenção das Peças	69
	4.10 Processamento Laboratorial	69
	4.11 Forma de Análise dos Resultados	70
	4.11.1 Microscopia descritiva	70
	4.11.2 Microscopia Quantitativa	70
	4.11.3 Análise Estatística	71
5	RESULTADOS	73
	5.1 Microscopia Descritiva	75
	5.2 Microscopia Quantitativa	87
6	DISCUSSÃO	91
	6.1 Metodologia	93
	6.2 Materiais	96
	6.3 Resultados	98
7	CONCLUSÕES	103
	REFERÊNCIAS	107
	ANEXOS	121

1 Introdução

1 INTRODUÇÃO

Na vigência da necrose pulpar, todo o sistema de canais radiculares se apresenta contaminado por microorganismos aeróbios e anaeróbios, que se alojam em áreas inacessíveis como o interior dos canalículos dentinários, na superfície apical e também nas lesões periapicais (TRONSTAD; KRESHTOOL; BARNETT, 1990; CLEGG, *et al.*, 2006; HAAPASALO, *et al.*, 2007), o que dificulta sua eliminação apenas pela combinação da instrumentação e irrigação com soluções antimicrobianas (BYSTROM; CLAEISSON; SUNDQVIST, 1985; ZAMANY; SAFAVI; SPANGBERG, 2003). Desse modo se faz necessário o emprego de um medicamento intracanal após o preparo biomecânico para dar continuidade ao processo de anti-sepsia, podendo-se utilizar, para isso, o período entre sessões. (BYSTROM; CLAEISSON; SUNDQVIST, 1985; ; NAIR, *et al.*, 2005; BARBIN *et al.*, 2008).

De acordo com SIQUEIRA; UZEDA(1998), o uso da medicação intracanal se faz necessária para eliminar as bactérias presentes no canal radicular, prevenir a proliferação de microorganismos entre sessões além de atuar como barreira mecânica para evitar a re-infecção do canal radicular. Para SILVA(2007), um medicamento ideal é aquele que reúna propriedades antibacterianas, antiinflamatórias e induzam a formação de tecido mineralizado, de modo que sua ação promova um efeito benéfico aos tecidos vivos da região periapical, já que deles dependem o reparo.

A substância que mais se encaixa nessa descrição é o hidróxido de cálcio (Ca(OH)_2). A primeira referência para o seu uso tem sido atribuída a Nygren, que em 1838, o utilizou para o tratamento de fístula de origem dentária, enquanto que Codman, em 1851, foi o primeiro a empregá-lo na preservação do tecido pulpar (FAVA; SAUNDERS, 1999). Herman sugeriu, em 1920, o uso do hidróxido de cálcio para o tratamento da polpa dental (FAVA; SAUNDERS, 1999). Desde então tem sido muito estudada e é amplamente empregada na Odontologia, devido às suas propriedades: antibacteriana, anti-exudativa, indução da formação de tecido mineralizado, biocompatibilidade e dissolução de tecidos necróticos (HEITHERSAY, 1970; HASSELGREN; OLSSON; CVEK, 1988; SEUX, *et al.*, 1991; GEORGOPOULOU; KONTAKIOTIS; NAKOU, 1993; NELSON-FILHO, 1999; LEONARDO, *et al.*, 2000; TANOMARU, *et al.*, 2003; MANZUR, *et al.*, 2007;).

Para NELSON-FILHO, *et al.*(2002), o hidróxido de cálcio deveria ser o medicamento de escolha para ser utilizado como medicação intracanal em casos de polpa necrótica e lesão periapical.

A ação alcalinizante dessa substância ocorre em função de seu pH, que proporciona inibição microbiana por meio de ação enzimática irreversível (ESTRELA, *et al.*, 1995; CALDWELL, 1995). O cálcio tem função na remoção de gás carbônico que constitui fonte respiratória de bactérias anaeróbias (KONTAKIOTIS; NAKOU; GEORGOPOULOU, 1995). Outro fator importante para seu emprego está relacionado à inibição do lipopolissacarídeo, que constitui em um componente agressor presente na membrana externa de bactérias Gram-negativas (SAFAVI; NICHOLS, 1993; SAFAVI; NICHOLS, 1994; TANOMARU, *et al.*, 2003). Além disso, o cálcio proveniente dessa dissociação tem papel importante na formação de tecido mineralizado (SEUX, *et al.*, 1991).

Apesar de suas características, várias substâncias têm sido associadas ao hidróxido de cálcio para tentar melhorar algumas de suas propriedades como viscosidade, radiopacidade, escoamento, espectro de ação antimicrobiana e velocidade de dissociação iônica (BASRANI; GHANEM; TJADERHANE, 2004). Embora tenha um pH bastante alcalino, em torno de 12,6, no interior da massa dentinária cai para 8,5 (NERWICH; FIGDOR; MESSER, 1993; ESTRELA, *et al.*, 1995). Frente a essa situação, alguns tipos de bactérias se mostram resistentes à sua ação quando no interior dos canais radiculares.

O *Enterococcus faecalis* é um coco Gram-positivo presente principalmente em casos de fracasso endodôntico e tem mostrado ser resistente a essa substância (SUNDQVIST, *et al.*, 1998; ROCAS; SIQUEIRA; SANTOS, 2004). O pH ideal para ser eliminado deve ser de 11,5, sendo que até 11 só retarda seu crescimento (MCHUGH, *et al.*, 2004).

Devido a isso, a associação de substâncias anti-sépticas ao hidróxido de cálcio vem sendo aplicadas, para suprir sua deficiência em agir frente a esses microorganismos.

Uma substância muito estudada e utilizada até os dias de hoje é o paramonoclorofenol canforado (PMCC). Sua associação ao hidróxido de cálcio tem sido proposta por LEONARDO, *et al.*(2003) que mostrou que o PMCC tem boa penetrabilidade na dentina, quando associado ao hidróxido de cálcio, além dessa combinação induzir a formação de paramonoclorofenolato, substância responsável pelo controle da liberação da medicação no

interior dos canais radiculares, aumentando seu tempo de ação e melhorando suas propriedades, o que favorece no processo de reparo.

Porém, o digluconato de clorexidina (CLX) tem mostrado vantagens sobre o PMCC quando associado ao hidróxido de cálcio. SOARES, *et al.*(2007) observaram maior efeito antimicrobiano residual nas pastas de hidróxido de cálcio adicionadas ao digluconato de clorexidina a 2% quando comparadas com as acrescidas de PMCC.

O digluconato de clorexidina é um bisguanídeo que apresenta espectro de ação contra bactérias Gram-positivas, Gram-negativas, aeróbios, anaeróbios, leveduras e fungos (HELING, *et al.*, 1992; VAHDATY; PITT FORD; WILSON, 1993; JEANSONNE; WHITE, 1994; SCHAFER; BOSSMANN, 2001; VIANNA, *et al.*, 2004; ITO, *et al.*, 2011). Avaliando a ação *in vitro* da associação do hidróxido de cálcio à clorexidina e da associação do hidróxido de cálcio com água destilada, usando dentes extraídos contaminados com *Enterococcus faecalis*, EVANS, *et al.* (2004) verificaram significativamente menor quantidade de unidades formadoras de colônia quando se empregou a pasta associada à clorexidina líquida e gel. No entanto a clorexidina utilizada isoladamente tem acarretado danos ao DNA em leucócitos e células da mucosa oral (GRASSI, *et al.*, 2007), sendo que a associação de hidróxido de cálcio à clorexidina aumenta a produção de oxigênio reativo (BARBIN, *et al.*, 2008), que pode implicar em maior agressão tecidual e inclusive associado a vários tipos de câncer (WARIS; AHSAN, 2006). Além disso, a associação da CLX com o hipoclorito de sódio geram *para*-cloroanilina, uma amina aromática, que tem se mostrado tóxica para humanos. A associação de clorexidina em baixa concentração ao hidróxido de cálcio parece não formar a *para*-cloroanilina, porém mais estudos devem ser feitos para evitar uma falsa noção da inexistência desse sub-produto (BARBIN,*et al.* 2008).

Em vista dessas deficiências, a procura por medicamentos alternativos vem crescendo, na intenção do controle de doenças (BERNARDO, *et al.*, 1990). Uma alternativa natural utilizada em endodontia é a Própolis por possuir propriedades bactericida, analgésica, antiviral, anti-carcinogênica, antiinflamatória (MANARA, 1999). É uma resina produzida pelas abelhas a partir de flores, folhas e casca de árvores (BERNARDO,*et al.* 1990). Sua composição química varia conforme a região que foi coletada, porém seus principais componentes são os flavonóides, ácidos prenilados derivados do cinâmico e outros ácidos cafeoilquínicos (MIORIN, *et al.*, 2003).

A busca de fitoterápicos para uso na Medicina e Odontologia é bastante intensa, inclusive sendo empregados como curativo intracanal (GENTIL, *et al.*, 2006). Um dos fitoterápicos atualmente estudados é a *Casearia sylvestris* Swart (Sw) popularmente conhecida como Guaçatonga. É uma planta originária da América Latina, encontrada desde o México até a Argentina. No Brasil é encontrada em abundância, sendo uma espécie muito comum no estado de São Paulo (TESKE; TRENTINI, 1997). O extrato desta planta tem apresentado ação anti-inflamatória (ESTEVES, *et al.*, 2005) e ação antimicrobiana (SCHNEIDER, *et al.*, 2006).

São arbustos ou árvores medindo aproximadamente 10 metros de altura, podendo chegar a 20 metros, com casca rugosa e ramos alargados. Suas folhas são inequiláteras, elípticas, agudas no ápice e arredondadas na base, medindo até 14 cm de comprimento e 3 cm de largura (CORREA, 1984). Possui ação cicatrizante, anti-séptica, antimicrobiana e fungicida, justificando a marcante porcentagem de óleo essencial. Possui também, ação antiúlcera, que reduz o volume de ácido clorídrico produzido, é diurética e ativa a circulação periférica, estimulando o metabolismo cutâneo e conseqüente tonificação local. A presença dos taninos forma um revestimento protetor na pele e nas mucosas dificultando infecções (TESKE; TRENTINI, 2001).

Em relação à sua constituição química, encontramos óleo essencial (terpenos e triterpenos), saponinas, ácidos graxos, taninos, antocianosídeo, resinas e flavonóides (TESKE; TRENTINI, 2001). Alguns componentes químicos em especial podem ter ação direta sobre o *E. Faecalis*, como taninos, flavonóides e óleos essenciais.

Com a incessante busca de um material para ser associado ao hidróxido de cálcio, e o uso freqüente dos fitoterápicos na Odontologia, torna-se oportuno e imprescindível a realização da presente pesquisa sobre a *Casearia sylvestris* Sw (guaçatonga) e a clorexidina associados ao hidróxido de cálcio, para avaliar suas propriedades biológicas, como curativo intracanal e seu possível efeito sobre o processo de reparo, considerando que algumas de suas propriedades físico-químicas, já foram pesquisadas, e os resultados já estão disponíveis na literatura.

2 Revisão da Literatura

2 REVISÃO DA LITERATURA

A revisão da literatura é apresentada de forma cronológica, contendo estudos relevantes para o desenvolvimento deste trabalho.

2.1 – HIDRÓXIDO DE CÁLCIO

HOLLAND, *et al.* (1971) avaliaram o comportamento do tecido subcutâneo de ratos, quando em contato com alguns materiais obturadores de canal radicular, manipulados utilizando duas proporções diferentes de pó e líquido. Os materiais testados foram o óxido de zinco eugenol (OZE), piocidina com sulfa, composto de Wach, cimento de Rickert, pasta alfa canal, cloropercha e hidróxido de cálcio. Os materiais foram manipulados e implantados por períodos de 5, 10 e 30 dias. Os resultados mostraram a presença de inflamação aguda e diferentes intensidades para os períodos iniciais. Na fase final, o processo inflamatório apresentava características de cronificação com presença de fibrosamento ao redor do material implantado. Dentre os materiais testados, o cimento de Rickert e o hidróxido de cálcio mostraram o melhor comportamento biológico.

LEONARDO; HOLLAND (1974) analisaram clínica e histologicamente, o comportamento do hidróxido de cálcio em contato direto com os tecidos periapicais. Para isso utilizaram dentes humanos, onde antes da obturação com cimento de Rickert, o coto pulpoperiodontal foi protegido com um tampão de Ca(OH)_2 . Após os períodos de 24h e 48 horas, foi realizado exame pós-operatório para determinar a presença de dor através de anamnese e percussão. O material para análise histológica era constituído de 25 dentes extraídos e 12 porções apicais extraídas por meio de apicectomia, em períodos que variam de 1 até 90 dias. Todas as peças analisadas apresentaram vitalidade do coto periodontal e a inflamação decrescia com o passar do tempo desaparecendo por completo entre 30 e 60 dias. Com isso os autores mostraram que o Ca(OH)_2 preserva a vitalidade do coto periodontal e permite a deposição cementária.

HOLLAND, *et al.* (1977) verificaram a morfologia do tecido apical após obturação com Ca(OH)_2 . Para isso utilizaram dentes livres de cárie de pacientes entre 20 e 40 anos de idade. A polpa foi extirpada a 1mm do ápice radiográfico, porém os canais não foram instrumentados para evitar que raspas de dentina ficassem em contato com o coto periodontal remanescente. Os canais foram preenchidos com pasta de Ca(OH)_2 , selados e restaurados com

amálgama. Após a extração dos dentes e processamento das peças para exame microscópico, os autores observaram aos 7 e 15 dias algumas células inflamatórias crônicas, que decresceram em número até desaparecerem no período de 30 dias e com reparo completo ao final de 180 dias. Para as peças que sofreram coloração de Von Kossa, aos 2 e 7 dias, os autores observaram grânulos positivos à Von Kossa, birrefringentes à luz polarizada, logo abaixo da zona de necrose, seguida de uma camada de granulações mais finas. Aos 15 dias a camada de granulações mais grosseiras apresentava as mesmas características enquanto que a camada de granulações mais finas apresentava-se mais intensa. Aos 30 e 180 dias, foi possível observar uma compacta camada positiva ao Von Kossa com diferentes espessuras no forame apical e no coto periodontal. O estudo mostrou que o Ca(OH)_2 como material obturador, matem a vitalidade do coto periodontal e induz o fechamento apical por meio de deposição de tecido mineralizado.

HOLLAND, *et al.* (1978), analisaram o reparo tecidual após pulpotomia em dentes de cães, protegendo o remanescente pulpar com Dycal e MPC, manipulados em diferentes proporções, e Ca(OH)_2 com água destilada como controle. Após um período de 30 dias, verificaram que o grupo controle Ca(OH)_2 + água destilada, apresentou maior número de casos com formação de tecido mineralizado com ausência de células inflamatórias.

HOLLAND, *et al.* (1979a), investigaram a influência da sobre-obturação e da re-obturação no reparo periapical. Para isso utilizaram dentes de cães, os quais foram instrumentados e alargados até um instrumento K número 40. Parte desses dentes foram sobre-obturados com pasta de hidróxido de cálcio com iodofórmio. Trinta dias depois, metade desses dentes foi novamente obturada, porém acima do limite apical. Os canais que não foram obturados foram considerados como grupo controle. Noventa dias depois do primeiro tratamento, a análise histológica mostrou resultados mais favoráveis no grupo que sofreu nova obturação. A sobre obturação provoca a reabsorção de hidróxido de cálcio e um ingresso de tecido periapical no interior dos canais radiculares.

HOLLAND, *et al.* (1979b), avaliaram o comportamento de Ca(OH)_2 no reparo do periodonto apical de dentes de cães que foram mantidos abertos durante dois ou três meses para a indução de lesão periapical. Após esse período, metade dos dentes foi instrumentada até uma lima tipo K número 60, 1 mm além do ápice radiográfico. Após a instrumentação, os canais foram preenchidos com 4 materiais diferentes: OZE, Calvital, Ca(OH)_2 + água destilada e Ca(OH)_2 + PMCC. A outra metade, após a instrumentação realizada a 1mm aquém

do ápice, recebeu tratamento prévio durante 3 dias com paramonoclorofenol + furacin. Na segunda sessão, os canais foram instrumentados até uma lima K número 60 a 1mm além do ápice e receberam um curativo de corticosteróide antibiótico por uma semana. Somente então, na terceira sessão receberam as mesmas drogas do grupo que não sofreu este tratamento prévio. Decorrido um período de seis meses, os autores perceberam um melhor reparo quando foram utilizados os medicamentos à base de Ca(OH)_2 . Todos os grupos que receberam tratamento prévio, exceto o grupo do OZE, demonstraram um melhor reparo, quando comparados com os grupos que não receberam esse tratamento, além disso, esse estudo mostrou que o hidróxido de cálcio estimulou a cura da região periapical e pode ser melhorada com a adição de certas substâncias.

HOLLAND, *et al.* (1980) examinaram os tecidos periapicais de 40 dentes de macacos adultos, que foram submetidos à pulpectomia e obturação dos canais com pasta de Ca(OH)_2 . Um grupo de 20 dentes foi preparado até o instrumento K nº 40 à 1 mm aquém do ápice radiográfico, e os outros 20 preparados até o instrumento K nº 40 à 1 mm além do ápice radiográfico. Após um período de 90 dias, observaram no grupo em que a instrumentação ficou aquém do ápice radiográfico, que a maioria dos dentes apresentou um selamento biológico total, com deposição de tecido duro, morfológicamente semelhante ao cimento, já o ligamento periodontal mostrava-se com características de normalidade. No grupo em que houve a sobre instrumentação, apenas cinco casos mostraram um selamento biológico total com ausência de inflamação.

HOLLAND; SOUZA(1985), compararam a capacidade de indução de selamento biológico apical em dentes de cães e de macacos dos cimentos Sealapex, Kerr Pulp Canal Sealer e a pasta de Ca(OH)_2 com água destilada. Após seis meses os animais foram sacrificados e submetidos a análise histológica. Os autores concluíram que o Sealapex e o Ca(OH)_2 induzem o selamento biológico pela deposição de cimento atingindo 70% dos casos quando contidos próximo ao limite CDC (canal dentina cimento).

HOLLAND, *et al.* (1986) realizaram um estudo para comparar o Ca(OH)_2 e o Endogel em pulpotomia de dentes de cães para proteção do tecido remanescente, por um período de seis meses. Os espécimes com Ca(OH)_2 demonstraram no geral, uma ponte de tecido duro completa de espessura variável, o tecido subjacente estava isento de células inflamatórias, e quando presentes, eram em número desprezível. Para o grupo com o Endogel, a maioria

apresentou polpa radicular necrótica e em alguns casos, o reflexo da destruição pulpar se fazia presente nos tecidos periapicais, com presença de infiltrado inflamatório crônico.

LEAL; HOLLAND; ESBERARD (1986) realizaram um estudo para observar a formação de grânulos de carbonato de cálcio após pulpotomia em dentes de cães, por um período de sete dias sob irrigação com água de Ca(OH)_2 concentrada e Tergentol. Os casos irrigados com água de Ca(OH)_2 , as polpas apresentaram áreas de necrose de espessura variável, com variado número de granulações birrefringentes à luz polarizada e positivas à técnica de Von Kossa. Essas granulações se encontravam entre a área de necrose e o tecido vivo remanescente. O grupo controle em que se utilizou o Tergentol, as polpas exibiam um infiltrado inflamatório crônico em alguns casos mais intensos que quando utilizada a água de Ca(OH)_2 , e em nenhum caso se observou a presença de granulações positivas a Von Kossa.

MAURICIO, *et al.* (1986) realizaram um estudo histomorfológico do tecido conjuntivo de ratos frente à implantação de tubos de dentina contendo: hidróxido de cálcio + polietileno glicol, hidróxido de cálcio + Lipiodol e hidróxido de cálcio + PMCC. Para isso, utilizaram 36 ratos que foram divididos em 3 grupos de acordo com a pasta empregada. Após períodos de 30, 60, 90 e 120 dias, os animais foram mortos e as peças removidas foram processadas para avaliação histológica. Foi possível observar que todas as misturas se comportaram de maneira irritante ao tecido conjuntivo do rato, possibilitando, no entanto, a formação de uma cápsula em colagenização no decorrer dos períodos. De todas as misturas testadas, o hidróxido de cálcio associado ao polietileno glicol se mostrou menos irritante.

OZATA, *et al.* (1987) avaliaram o efeito do Ca(OH)_2 e do formocresol quando usados em pulpotomia de dentes decíduos de carneiros, por períodos experimentais de 7, 14, 30, 60, 120 e 180 dias. Houve formação de tecido duro nos dois tratamentos, porém para o grupo tratado com Ca(OH)_2 os períodos foram mais curtos.

PASCON; PAIVA; LANGELAND (1987) compararam a biocompatibilidade do Endogel com a do Ca(OH)_2 , utilizando 3 métodos de avaliação: teste da citotoxicidade *in vitro* com células L929 marcadas com Cr51, implantes em subcutâneo de cobaias e a aplicação desses medicamentos em polpas de dentes de macacos que tiveram o teto da câmara pulpar removido. No teste da citotoxicidade *in vitro*, tanto Endogel como o Ca(OH)_2 foram considerados tóxicos. Nos implantes realizados no subcutâneo de cobaias, o Endogel promoveu reação inflamatória severa em todos os períodos experimentais, o Ca(OH)_2 induziu

uma reação inflamatória moderada aos 7 dias e discreta aos 14 e 60 dias. Em contato com o tecido pulpar de macacos, ocorreu a ausência de ponte de tecido duro junto as paredes da dentina, e aos 180 e 250 dias, uma ponte incompleta e irregular de tecido duro. O Ca(OH)_2 apresentou a partir dos 90 dias a formação de uma ponte incompleta de tecido duro, em volta de rasps de dentina. Os resultados mostraram que o Endogel promove reação inflamatória e restringe a neoformação de tecido conjuntivo.

ZMENER; GUGLIELMOTTI; CABRINI (1988) compararam quantitativamente a resposta tecidual frente aos cimentos Sealapex e CRCS quando implantados em subcutâneo de ratos por 7, 30 e 90 dias. Foram utilizados tubos de silicone com 10mm de comprimento por 1mm de diâmetro. Tubos vazios foram usados como controle. A avaliação quantitativa da resposta tecidual demonstrou aos 7 dias, resposta inflamatória similar para os dois cimentos, com algumas áreas de necrose e presença de macrófagos e células gigantes em contato com o material e, em geral, uma proliferação fibroblástica formando uma fina camada de tecido conjuntivo neoformado. Aos 30 dias o Sealapex apresentava tecido granulomatoso invaginando para o lúmen do tubo, com presença de macrófagos e células gigantes, enquanto para o CRCS, a reação inflamatória apresentava-se em menor intensidade que aos 7 dias. Já aos 90 dias, persistia um tecido granulomatoso ao redor do Sealapex, com a formação de uma cápsula fibrosa, enquanto que para o CRCS, permaneciam ainda, células de infiltrado inflamatório agudo e alguns linfócitos. Os autores concluíram que o reparo do tecido ao redor do CRCS foi melhor que para o Sealapex, mesmo no período de 90 dias.

SOUZA; HOLLAND; MENEZES (1991) estudaram a reação tecidual do OZE, previamente mantido em contato com o Ca(OH)_2 . Para isso, utilizaram tubos de dentina confeccionados a partir de dentes humanos estocados, que tiveram seus canais instrumentados até um alargador nº40 e foram divididos em 5 grupos: 1- Ca(OH)_2 + água destilada, 2 – preenchimento com OZE à 1mm aquém da extremidade de menor diâmetro, 3 – preenchimento com OZE à 1mm aquém da extremidade de menor diâmetro e permanência por 24 horas em estufa antes do implante, 4 – preenchimento com OZE à 1mm aquém da extremidade de menor diâmetro e permanência em pasta de Ca(OH)_2 por 24h, seguida de lavagem com água destilada antes do implante, 5 – preenchimento com OZE à 1mm aquém da extremidade de menor diâmetro e colocação de pasta de Ca(OH)_2 neste espaço deixado antes da implantação. Os tubos foram implantados no subcutâneo de ratos por um período experimental de 7, 30 e 90 dias. Os resultados mostraram que quando se utilizou o Ca(OH)_2 puro ou associado ao OZE, observou-se a presença de mineralização ou um tecido conjuntivo

bem organizado. O mesmo não ocorreu ao OZE puro, onde só houve invaginação de tecido conjuntivo nos períodos mais longos, com intenso infiltrado inflamatório crônico.

SEUX, *et al.* (1991), utilizando cultura de células de polpa dental humana, avaliaram a resposta das mesmas ao contato com o cimento à base de hidróxido de cálcio Dycal. Verificaram a produção de cristais de carbonato de cálcio (calcita) e, em função deste precipitado, uma alteração na distribuição das fibras, principalmente de fibronectina, demonstrando alta afinidade ao carbonato de cálcio (calcita), e reorganizando-se em camadas ao redor desses cristais. Também foi relatada a produção, por parte das células, de colágeno tipo I e mais fibronectina por volta da quarta semana. Os autores afirmaram que os achados suportam a teoria de que os cristais de calcita produzidos, em função da reação entre o cálcio, liberado pela dissociação do cimento de hidróxido de cálcio, e os carbonatos presentes no meio de cultura, induzem o rearranjo e a produção de novas fibras de fibronectina e colágeno do tipo I, fato que representa o passo inicial para o processo de formação de uma barreira mineralizada.

SIMON; BHAT; FRANCIS (1995), analisaram o pH e a liberação de íons cálcio proporcionado pelo hidróxido de cálcio quando manipulado com água destilada, soro fisiológico, propilenoglicol e paramonoclorofenol canforado, como veículos. Para isso, utilizaram dentes extraídos que tiveram seus canais preparados e preenchidos com as pastas do estudo. A superfície externa dos dentes foi impermeabilizada e os dentes foram imersos em 10 ml de solução fisiológica. A leitura foi efetuada após 1, 2, 3, 4, 5, 7, 14 e 30 dias. Com relação ao pH, verificaram maiores valores para o grupo do paramonoclorofenol canforado e água destilada e menores para o soro fisiológico e propilenoglicol. Estes foram estatisticamente menores em relação ao paramonoclorofenol canforado. Concluíram que o propilenoglicol possui qualidades mais desejáveis, devendo ser o veículo de escolha para agregar ao hidróxido de cálcio.

PERILLO, *et al.* (1998), avaliaram radiográfica e histologicamente polpas de pré-molares humanos submetidos à pulpotomia e capeadas com pastas de hidroxiapatita + soro fisiológico, hidroxiapatita + glicerina e $\text{Ca}(\text{OH})_2$ + soro fisiológico. Comparando os resultados, verificaram que o $\text{Ca}(\text{OH})_2$ permitiu a deposição de tecido duro mineralizado em todos os espécimes, fato que não ocorreu em nenhum caso com a hidroxiapatita.

PANZARINI, *et al.* (1998), realizaram uma análise histológica e histomicrobiológica de dentes de cães com lesão periapical induzidas, frente a influência de algumas substâncias utilizadas como curativo de demora e material obturador. Utilizaram incisivos e pré-molares, totalizando 72 canais. Depois de induzida a lesão, o tratamento foi realizado em 4 sessões. Na primeira, os canais foram instrumentados até lima K nº 40 no limite CDC, após o preparo foram preenchidos com EDTA por 3 minutos, com a utilização de Tricresol-formalina em 36 canais e paramonoclorofenol (PMC) + furacin nos 36 canais restantes. Numa segunda sessão, foi realizado o desbridamento foraminal até o instrumento K nº 25, e os canais foram preenchidos com pasta de Ca(OH)_2 + água destilada, extravasando propositalmente para a região periapical. Em uma terceira sessão, realizou-se a troca de pasta de Ca(OH)_2 . Na última sessão, os canais foram obturados com OZE ou Sealapex. Decorridos 180 dias, as peças foram obtidas e preparadas para análise microscópica, coradas pela Hematoxilina e eosina (H.E.) e Brown e Brenn. Os resultados demonstraram que o curativo Tricresol-formalina foi mais eficiente que o PMC-furacin, independente do material obturador empregado. O cimento Sealapex proporcionou melhores resultados que o cimento de OZE e a pasta de Ca(OH)_2 . A interação material obturador vs curativo de demora possibilitou ordenar de melhor para pior, os seguintes grupos: 1-PMC-furacin + Ca(OH)_2 + Sealapex e Tricresol-formalina + Ca(OH)_2 + Sealapex; 2- Tricresol-formalina + Ca(OH)_2 + OZE; 3- Tricresol-formalina + Ca(OH)_2 ; 4- PMC-furacin + Ca(OH)_2 e PMC-furacin + Ca(OH)_2 + OZE.

HOLLAND, *et al.* (1999) avaliaram a reação do tecido subcutâneo de rato, quando recebeu implantes de tubos de dentina preenchidos com agregado tiróximo mineral (MTA) e Ca(OH)_2 . O comprimento dos tubos era de 7mm e a parede externa foi desgastada para que atingisse 0,5mm de espessura. Os tubos foram então preenchidos com os dois medicamentos em estudo, e implantados bilateralmente na região dorsal de 40 ratos. Como controle foi implantado tubos de dentina vazios em 12 ratos adicionais. Os animais foram mortos aos 7 e 30 dias e as peças processadas para coloração de Von Kossa para cálcio e para H.E. O grupo controle aos 7 dias, demonstrou uma população celular representada por fibroblastos e células inflamatórias crônicas. Aos 30 dias, houve uma invaginação de tecido conjuntivo, com algumas células inflamatórias, para o interior do tubo, enquanto que a porção externa exibiu uma fina cápsula fibrosa, com um infiltrado inflamatório crônico brando. Para o grupo em que se utilizou o Ca(OH)_2 , aos 7 dias, um grande número de granulações grosseiras, birrefringentes à luz polarizada, puderam ser observadas. Essas granulações eram positivas para coloração Von Kossa, e estavam localizadas próximo à abertura do tubo. Ao redor dessa área, o tecido

conjuntivo apresentava uma inflamação crônica variando de branda a moderada, com algumas células gigantes. O quadro encontrado para os espécimes com 30 dias, era semelhante ao período anterior, com o conjuntivo exibindo-se mais fibroso. Para o MTA, os mesmo achados foram encontrados, tanto aos 7 dias como aos 30 dias, quando comparados com o $\text{Ca}(\text{OH})_2$. Os autores concluíram que poderia haver uma similaridade no mecanismo de ação das duas drogas empregadas.

NELSON FILHO, *et al.* (1999), avaliaram a resposta inflamatória do tecido conjuntivo de ratos em respostas a pastas de hidróxido de cálcio acrescidas ou não ao de PMC e PMCC. Para isso, utilizaram 120 camundongos isogênicos que foram divididos em 24 animais por grupo. As pastas utilizadas foram: Calen, Calen PMC, Calen PMCC e Calasept. As pastas foram injetadas no tecido conjuntivo subcutâneo ventral do lado direito e esquerdo de cada animal. Os animais foram sacrificados após os períodos de 6, 12 e 24 horas e 2, 3, 5, 7 e 15 dias e as peças obtidas foram processadas para coloração com H.E.. Foi observado: Congestão vascular, edema, hemorragia, infiltrado de células inflamatórias, lesão tecidual e reparo tecidual. Esses eventos foram classificados como: ausente (0), leve (1), moderado (2) ou intenso (3), de acordo com um critério qualitativo subjetivo. Como resultado, os autores puderam verificar que as pastas induziram uma reação inflamatória em todos os períodos de observação, embora a intensidade, a duração e a extensão eram variadas. A pasta Calen foi a pasta menos irritante, seguida pelo Calen PMCC, Calen PMC e Calasept, demonstrando um infiltrado inflamatório crônico e reparo em diferentes graus em todos os grupos a partir de 15 dias.

HOLLAND, *et al.* (2001) realizaram um estudo a fim de avaliar a reação do tecido subcutâneo de ratos após implante de tubos de dentina preenchidos com MTA, cimento Portland e hidróxido de cálcio. Foram utilizados 40 animais que receberam dois implantes na região dorsal, contendo um mesmo tipo de material. Para controle foram implantados tubos vazios em 10 ratos. Os tubos de dentina foram confeccionados com dentina humana. Os canais foram alargados até um instrumento nº 35, com sobreinstrumentação de 2mm. Os tubos tinham comprimento de 7 mm e a espessura era de 0,5mm. Os tubos foram irrigados com EDTA e hipoclorito de sódio e autoclavados. Os períodos experimentais foram de 7 e 30 dias e após esses períodos os animais foram sacrificados, e os tubos de dentina foram removidos das amostras e estas foram submetidas a processamento histotécnico. Algumas amostras não descalcificadas foram preparadas para análise histológica em luz polarizada e técnica de Von Kossa para tecidos mineralizados. Os resultados foram similares para os três materiais

estudados. Próximo às aberturas dos tubos foram observadas granulações Von Kossa positivas, birrefringentes à luz polarizada. Junto dessas granulações foi observado um tecido irregular na forma de uma ponte, também Von Kossa positivo. As paredes de dentina do interior dos tubos exibiram uma estrutura altamente birrefringente à luz polarizada, formando uma camada em diferentes profundidades. Diante do que foi observado, os autores concluíram que é possível que os mecanismos de ação dos materiais estudados sejam similares entre si.

VOSOUGHHOSSEINI, *et al.* (2008), avaliaram a resposta do tecido subcutâneo de ratos frente a implantação de tubos de polietileno preenchidos com MTA branco e cinza. Para isso utilizaram 50 ratos Wistar. Como grupo controle foi utilizado tubos de polietileno vazios. Os períodos experimentais foram 7, 15, 30, 60 e 90 dias. Após esse período os animais foram sacrificados, as peças foram preparadas histologicamente, coradas por H.E. e observados sob microscópio de luz. A reação inflamatória foi caracterizada como 0, nenhum (ausência de células inflamatórias); 1, leve (infiltração de células inflamatórias <25 células); 2, moderada (infiltração de células inflamatórias entre 25-125 células) e 3, intensa (infiltração de células inflamatórias >125 células). Após a análise estatística pelo teste de Kruskal-Wallis, foi possível observar que ambos os tipos de MTA provocaram reação inflamatória intensa aos 7 dias, com diferença significativa para o grupo controle. Porém a partir dos 15 dias, não houve diferença estatística para nenhum dos grupos.

GARCIA, *et al.* (2008), realizaram um estudo em subcutâneo de ratos para comparar o comportamento tecidual de duas composições de pasta intracanal, sendo elas: Ca(OH)_2 + óleo de *Ricinus communis* e Ca(OH)_2 + propilenoglicol. Foram utilizados nove ratos, onde cada animal recebeu 4 implantes de tubos de polietileno, sendo 2 escapulares 2 pélvicos. Cada par de tubo era preenchido por um tipo de pasta, então cada rato recebeu as duas preparações. O grupo controle foi definido pela lateral do tubo. Após os períodos de 7, 21 e 42 dias os animais foram sacrificados e as peças obtidas passaram por processamento histológico. As análises das amostras foram realizadas com base nas respostas teciduais estimuladas pelas pastas testadas, comparando-as entre si e ao controle. Os eventos analisados foram: infiltrado inflamatório (células polimorfonucleares e células mononucleares), capacidade de celularidade e vascularização (fibroblastos e vasos sanguíneos) e atividade macrofágica (fagócito mononuclear ou macrófago e células gigantes inflamatórias). Com a análise morfológica, ambas as pastas apresentaram índice de inflamação intenso aos sete dias, persistindo até os 21 dias. Aos 42 dias a reação tecidual foi moderada. O grupo controle apresentou reação moderada à discreta. Eles concluíram que ambas as pastas se apresentaram

irritantes ao tecido conjuntivo, permitindo colagenização progressiva da cápsula junto à abertura tubular. A pasta feita com óleo de *Ricinus communis* (pasta A) apresentou potencial irritativo estatisticamente menor que a pasta B.

2.2 Digluconato de Clorexidina

PAUNIO; KNUTTILA; MIELITYNEN (1978) investigaram o efeito do gluconato de clorexidina sobre a formação do tecido conjuntivo. O tecido de granulação foi produzido através da inserção de esponjas esterilizadas inseridas no tecido subcutâneo de ratos. Essas esponjas foram impregnadas com 0,45% de NaCL, que serviu como grupo controle, ou com clorexidina 0,2%, (grupo teste). As esponjas foram removidas após os períodos de 3, 5, 7, 10, 14, 19 e 23 dias. O conteúdo de hidroxiprolina, hexosaminas, DNA e RNA foi estimado a partir das esponjas. Como resultados, observaram que a clorexidina promove atraso na formação do tecido de granulação.

KNUUTTILA; SÖDERLING (1981) avaliaram o efeito de diferentes concentrações de clorexidina na viabilidade celular e liberação de enzimas lisossomais, durante a ação fagocitária de macrófagos de ratos. Após a remoção e tratamento, os macrófagos foram colocados em placas de Petri por 2 horas a 37°C, num ambiente com 100% de umidade, e foram tratados com diferentes concentrações de clorexidina por 2 minutos. Depois dos procedimentos laboratoriais, as células foram contadas e identificadas. A determinação da velocidade da hidrólise dos substratos foi mensurada e expressa em mol de produtos da hidrólise formada por minuto. A liberação de enzimas citoplasmáticas tanto das células que estavam fagocitando, quanto das que não estavam em atividade fagocitária, cresceu de acordo com o aumento da concentração de clorexidina. Os resultados confirmaram a citotoxicidade da clorexidina em concentrações de 0,005-0,01%.

BLENKHARN (1987) realizou um estudo comparativo da citotoxicidade da noxitiolina e clorexidina. Foram utilizadas células em vários graus de diferenciação neoplásica, como células epiteliais “like”, derivadas de carcinoma de laringe humana. As soluções estudadas permaneciam em contato com as células por um período de 1, 5, 10, 20, 30 e 60 minutos, tendo como controle negativo solução salina 0,85%. As leituras eram realizadas com 1 e 18 horas após a exposição às soluções. O grupo controle negativo não demonstrou citotoxicidade após 60 minutos de exposição. Para a solução de noxitiolina 1 %,

houve granulação tóxica e vacuolação aos 10 minutos. As células controles não neoplásicas não evidenciaram citotoxicidade após 60 minutos para a noxitiolina. A clorexidina 0,05% mostrou uma menor citotoxicidade aos 60 minutos, quando comparada com a noxitiolina, tanto para células neoplásicas, quanto para as células controle não neoplásicas.

PUCHER; DANIEL (1992) realizaram um estudo para avaliar o efeito citotóxico da clorexidina na cavidade oral (gengiva e ligamento periodontal) e em fibroblastos da pele. Foi avaliada a viabilidade celular, crescimento, concentração de colágeno gel e a síntese total de proteínas. Os resultados mostraram que para os fibroblastos, a severidade dos efeitos era proporcional a concentração da clorexidina (0,002%, 0,005% e 0,12%). Houve alteração de morfologia até a perda de células em altas concentrações. Quanto ao crescimento e viabilidade, as células tratadas com clorexidina 0,12% não proliferaram. Mesmo em concentrações mais baixas (0,002%) ocorreu uma redução de 90% do número de células após o tratamento. A síntese de proteínas para cada tipo celular em colágeno gel foi inibida pela clorexidina em todas as concentrações testadas. Na concentração de 0,002% a redução foi de 10 % em todas as células. As dosagens mais altas testadas reduziram em 30% e 50% a síntese de proteína quando comparados com o grupo controle. Os resultados sugerem um cuidado no uso direto da clorexidina sobre tecido conjuntivo, devido à toxicidade demonstrada neste trabalho.

YESILSOY, *et al.* (1995), compararam o efeito bactericida e tóxico de diferentes soluções irrigadoras usadas no tratamento de canal radicular. Os autores testaram o hipoclorito de sódio à 2,5% e à 0,5%, Peridex (gluconato de clorexidina 0,12%), álcool 11,6% e Therasol. Como controle positivo, utilizaram o hipoclorito de sódio 5,25% e como controle negativo o soro fisiológico. Os microorganismos utilizados foram Gram positivos aeróbios e anaeróbios e Gram negativos anaeróbios e realizaram experimentos *in vitro* e *in vivo*. Para o teste *in vitro*, realizou-se o teste do disco de papel para determinar a susceptibilidade de cada microorganismo para os agentes testados. Os halos de inibição eram medidos com 24 horas para o aeróbio e com 7 dias para os anaeróbios empregados no estudo. O estudo *in vivo*, era constituído de injeção de 0,1mL de cada solução testada, no tecido subcutâneo de porco da Índia. Os medicamentos permaneceram por um período de 2 horas, 2 e 14 dias, quando os animais foram mortos e as peças preparadas laboratorialmente para coloração com H.E. Os resultados mostraram que o grupo controle positivo, foi efetivo contra todos os microorganismos empregados, enquanto o controle negativo não demonstrou nenhum halo de inibição. O álcool mostrou-se ineficiente contra todos os microorganismos, com exceção ao

S.mutans, aeróbio Gram-positivo. Quanto ao hipoclorito de sódio, à medida que se diminuía a concentração, proporcionalmente se diminuía a efetividade de medicamento. Os três produtos periodontais, Peridex, gluconato de clorexidina 0,12% e Therasol, demonstraram halos de inibição semelhantes ao grupo controle positivo. No teste de toxicidade, no período de 2 horas, todos os materiais apresentaram uma inflamação ausente ou moderada. Após dois dias em contato com as drogas, a inflamação atingiu grau severo para quase todos os medicamentos, com exceção para o álcool e soro fisiológico que demonstraram uma ausência de inflamação. Com duas semanas, as concentrações mais altas de hipoclorito de sódio (2,5% e 5,25%) e a clorexidina, apresentaram uma reação inflamatória tipo corpo estranho, enquanto as demais demonstraram uma ausência de inflamação.

SEGURA, *et al.* (1999), avaliaram a influência do gluconato de clorexidina 0,12% na adesão de macrófagos à superfície plástica comparada com o hipoclorito de sódio 5,25%. Foram utilizados para o experimento, macrófagos da região peritoneal de ratos *Wistar*, que foram removidos e tratados laboratorialmente. As células adquiridas eram contadas e a viabilidade celular comprovada por meio de azul de Tripan. Os períodos usados para o teste foram aos 5, 15 e 30 minutos de incubação a 37°C em uma atmosfera úmida com 5% de CO₂. Os resultados mostraram que o gluconato de clorexidina 0,12% inibiu a capacidade de aderência dos macrófagos em todos os períodos analisados, porém sempre com menores valores que o hipoclorito de sódio 5,25%. Levando em conta que a aderência macrofágica é o primeiro passo no processo de fagocitose, e na apresentação de antígeno por macrófagos, as duas soluções podem inibir a função macrofágica e modular as respostas inflamatórias, nos tecidos periapicais inflamados.

KOMOROWSKI, *et al.* (2000), avaliaram a substantividade e atividade anti-séptica residual da CLX a 0,2% aplicada por períodos de 5 minutos e de 7 dias na dentina bovina. Para isso foi utilizado meio de cultura líquida e avaliação espectrofotométrica da turvação pelo desenvolvimento microbiano. O indicador biológico foi o *Enterococcus faecalis*. Os canais foram instrumentados e a dentina foi inundada com meio de cultura para que penetrasse nos túbulos com o auxílio de ultrassom. Após essa etapa, os canais foram secos e preenchidos com a medicação a ser testada (CLX a 0,2%, hipoclorito de sódio a 5,25% e solução salina estéril). Após os períodos experimentais, os canais foram secos e preenchidos com a suspensão do indicador biológico em meio de cultura e incubados por 21 dias. As amostras de dentina foram retiradas do canal e inoculadas em meio de cultura para a análise.

Foi constatado que somente a CLX a 0,2% aplicada na dentina por 7 dias foi eficaz em reduzir significativamente o crescimento do *Enterococcus faecalis*.

RIBEIRO (2002) realizou um estudo onde avaliou as reações, imediata e tardia do tecido subcutâneo de ratos, quando em contato com a pasta de hidróxido de cálcio e o digluconato de clorexidina a 2%. Para determinar a intensidade da reação inflamatória imediata, foi empregado o teste edemogênico, utilizando 40 ratos divididos em grupos iguais para as substâncias testadas, nos períodos experimentais de 1, 3, 6 e 24 horas. Cada animal recebeu 0,2mL/100mg de peso corporal do corante de azul de Evans a 1% na veia lateral da cauda e, logo em seguida, foram injetadas as substâncias testadas no dorso do animal, na proporção de 0,2mL. Após os períodos experimentais, os animais foram sacrificados, as peças removidas e analisadas as densidades ópticas no espectrofotômetro. Já para a determinação da reação tardia, foi feita a implantação de tubos de PVC contendo as substâncias testadas. Foram utilizados 36 ratos divididos em grupos de 7, 14 e 30 dias. Decorridos estes períodos, os animais foram sacrificados e as peças removidas para análise microscópica. Os resultados mostraram que na reação imediata, o digluconato de clorexidina a 2% foi mais irritante em todos os períodos experimentais, quando comparado ao hidróxido de cálcio. Na reação tardia, as duas substâncias demonstraram ser semelhantes, não interferindo no processo de reparo, permitindo aos 14 dias a formação de um tecido de granulação em franco processo evolutivo de maturação.

ZEHNDER (2006) apresentou uma revisão da literatura sobre soluções irrigantes utilizadas na terapêutica endodôntica. A clorexidina é o anti-séptico mais potente da sua família química (bisguanidas). Tem sido utilizada nas concentrações de 0,1 a 0,2% no controle da placa bacteriana e até 2,0% na Endodontia. É muito eficaz frente ao *Enterococcus faecalis* e é indicada para ser utilizada em casos de retratamentos. Contra bactérias anaeróbias, a clorexidina apresenta-se menos efetiva que o hipoclorito de sódio, no entanto, essa diferença praticamente desaparece em testes em bactérias facultativas.

GRASSI, *et al.* (2007), avaliaram a capacidade de genotóxica da clorexidina em causar, em termos de danos DNA, modificações em leucócitos, fígado, rim, e bexiga urinária. Foram utilizados 10 ratos Wistar, que foram divididos em 2 grupos. O grupo experimental foi tratado com 3mL de gluconato de clorexidina a 0,12% por gavagem uma vez ao dia durante 8 dias. Após esse período, foi observado que houve um aumento no dano ao DNA nos leucócitos e células do rim no grupo tratado com clorexidina, sendo essas células um alvo

para danos ao DNA pela exposição oral ao digluconato de clorexidina como detectado pelo teste de células individualizadas.

FARIA, *et al.* (2007), avaliaram a caracterização *in vivo*, de lesões induzidas pela injeção de clorexidina (0,125%, 0,25%, 0,5% e 1,0%) na pata de camundongos em períodos de tempo determinados, sendo eles: 24 e 48 horas e 7 e 14 dias. A avaliação *in vitro* se deu pelo modo de morte celular, por apoptose e ou necrose e pelo estresse celular causado pela exposição de cultura de fibroblastos L929 a exposição às concentrações de clorexidina por 24 horas. A injeção da clorexidina no espaço subplantar da pata traseira, induziu efeito tóxicos severos, evidenciado por necrose da epiderme, derme e tecido subcutâneo com resposta inflamatória reacional, principalmente nas concentrações maiores. Nas culturas de fibroblastos, a clorexidina induziu apoptose nas menores concentrações e necrose nas concentrações maiores, além do aumento da expressão de proteínas, que é um indicador de estresse celular. De acordo com os resultados, esses dados sugerem que a clorexidina pode ter um efeito desfavorável na resolução da periodontite apical.

GOMES-FILHO, *et al.* (2008), compararam a reação do tecido subcutâneo de ratos frente à solução salina a 0,9%, hipoclorito de sódio a 2,5% e a 5,25% gluconato de clorexidina 2,0% em solução ou gel. Para isso utilizaram 24 ratos que tiveram seu dorso marcado com 6 círculos com 2 mm de distância entre cada marcação. Utilizando uma seringa, foi injetado 1 mL de cada solução no dorso do animal em 5 círculos. Como controle, no sexto círculo, nenhuma solução foi injetada. As avaliações foram realizadas após os períodos de 2 e 48 horas, 14 e 30 dias. Após esse período, os animais foram sacrificados e as peças obtidas foram coradas por H.E. e após análise estatística pode-se observar que no grupo controle, a reação inflamatória era pouca ou nenhuma. A solução salina, a clorexidina e a solução de hipoclorito de sódio 2,5% mostraram ser biocompatíveis. Dentre os materiais testados, o hipoclorito a 5,25% foi o irrigante mais tóxico, pois o número de células inflamatórias permaneceu elevado em 14 e 30 dias. O grupo tratado com o gel de clorexidina apresentou resposta moderada aos 14 dias, que diminuiu aos 30, sendo considerado semelhante aos grupos controle, a solução salina 0,9%, a solução de clorexidina 2,0% e ao hipoclorito de sódio 2,5% neste período.

FARIA, *et al.* (2009), testaram a hipótese de que a clorexidina pode induzir a morte celular em cultura de fibroblastos L929, via estresse do retículo endoplasmático, por meio de microscopia de luz e de varredura, quantificação de apoptose e necrose por citometria de

fluxo e avaliação da expressão proteína 78kDa e através da visualização do retículo endoplasmático e do citoesqueleto através de fluorescência. Após essas avaliações, foi possível verificar que a clorexidina provoca o acúmulo de proteínas no retículo endoplasmático, o que provoca sobrecarga, resultando em estresse e morte celular, tanto por necrose, quanto por apoptose. Porém os autores salientam que essa resposta não significa necessariamente que o esforço gerado no retículo endoplasmático seja a única maneira pela qual a clorexidina mate os fibroblastos L929, mas que esse esforço é uma meta importante ou um indicador de morte celular induzida por esta droga.

2.3 Associação do Ca(OH)_2 com Digluconato de Clorexidina

EVANS, *et al.* (2003) avaliaram a eficácia de pasta de hidróxido de cálcio associada a clorexidina a 2% como um medicamento intracanal em dentes bovinos contaminados com *Enterococcus faecalis*. Para esse estudo eles utilizaram vinte e quatro incisivos bovinos, que foram preparados com um cilindro padronizado e a dentina foi infectada com *Enterococcus faecalis*. Foram divididos em dois grupos de dez dentes cada (grupo A e grupo B). O grupo A foi preenchido com pasta de hidróxido de cálcio com água estéril e o grupo B com pasta de hidróxido de cálcio associado à clorexidina a 2%. Após uma semana foi coletada uma porção da dentina, que foi suspensa em uma solução e espalhada em infusão de Agar, depois da incubação as unidades de colônia formada foram enumeradas. Foi determinada a quantidade de bactéria por miligrama na dentina. Com isso, eles concluíram que a pasta de hidróxido de cálcio com clorexidina a 2% foi significativamente mais eficiente na morte dos *E. faecalis* nos túbulos dentinários que a pasta de hidróxido de cálcio com água estéril.

BASRANI, *et al.* (2004), investigaram o pH, a capacidade de umectação, o tempo de trabalho, a radiopacidade e a viscosidade de algumas medicações intracanaís: gel de digluconato de clorexidina a 2%, gel de digluconato de clorexidina a 0,2%, gel de Ca(OH)_2 a 40% misturado com digluconato de clorexidina a 0,2%, gel de Ca(OH)_2 a 40 % e gel controle. Os autores observaram que a medicação intracanal contendo a associação do Ca(OH)_2 com o digluconato de clorexidina a 0,2% manteve os mesmos níveis de pH, tempo de trabalho e radiopacidade do gel de Ca(OH)_2 isolado. Entretanto, a umectação e a viscosidade da mistura foram elevadas. Os autores concluíram que todas as medicações intracanaís testadas apresentaram propriedades físico-químicas satisfatórias para serem utilizadas na terapêutica endodôntica.

HERNANDEZ, *et al.* (2005), compararam a porcentagem de células em apoptose e o perfil do ciclo celular de fibroblastos e macrófagos quando expostos ao ProRoot (MTA) associado a clorexidina 0,12% e ao ProRoot associado a água estéril. Para isso foi utilizado fibroblastos gengivais e macrófagos de ratos. Após o preparo das misturas, as células foram expostas por 24 horas ao MTA que foram colocadas sobre uma membrana semipermeável para evitar contato direto com as células. Para a avaliação do efeito do cimento sobre as células, foi utilizado o iodeto de propídio para coloração e análise por citometria de fluxo. Os resultados mostraram que as amostras que continham a associação do MTA com a clorexidina induziu a apoptose de macrófagos e fibroblastos. Porém, quando se analisou o grupo onde a associação se fez com água estéril, não foi observado nenhuma mudança na proporção de células em apoptose. Pela análise, observou-se que a exposição ao MTA/CLX diminuiu o porcentual de fibroblastos e dos macrófagos, em comparação a outra mistura. Com isso os autores verificaram que a substituição da água estéril pela clorexidina na associação ao MTA, aumenta a sua citotoxicidade.

ERCAN; DALLI; DULGERGIL (2006) compararam, em um estudo *in vitro*, a eficácia da clorexidina gel e pasta de hidróxido de cálcio com clorexidina contra o *Enterococcus faecalis* e *Candida albicans*. Para realizar o estudo eles utilizaram oitenta dentes anteriores superiores humanos recentemente extraídos. Foi removida a coroa e cada canal foi instrumentado até o diâmetro 50 usando uma técnica clássica. O canal radicular foi irrigado com EDTA para remover a *Smear layer* e em seguida, os canais foram infetados com *E. faecalis* e *C. albicans*. Subseqüentemente, os canais foram divididos em 4 grupos de tratamento: grupo 1 foi tratado com pó de hidróxido de cálcio em água destilada, grupo 2 foi tratado com pó de hidróxido de cálcio em clorexidina a 2%, grupo 3 foi tratado com clorexidina gel e grupo 4 com solução salina 0,9% estéril servindo como grupo controle. As amostras microbiológicas foram feitas depois de 7, 15 e 30 dias. Depois da incubação, porções de dentina foram obtidas de cada canal radicular e examinada microbiologicamente. Os resultados mostraram que a clorexidina gel a 2% foi significativamente mais efetiva que o hidróxido de cálcio com clorexidina a 2%, hidróxido de cálcio e grupo controle. Com isso, puderam concluir que nas condições do trabalho a clorexidina gel 2% é efetiva na eliminação do *E. faecalis* e *C. albicans* do sistema de canais radiculares.

SEMENOFF; SEMENOFF SEGUNDO; DE FIGUEIREDO (2008), analisaram a resposta do tecido bucal de ratos frente à solução de clorexidina 2%, hidróxido de cálcio e a associação de ambos. Para esse estudo eles utilizaram trinta ratos machos nos quais foram

implantados quatro tubos de polietileno contendo um tipo de material. Para a colocação dos implantes, foram usados os quatro quadrantes da cavidade bucal de cada rato e os tubos foram implantados no tecido submucoso de cada região. Após os intervalos de tempo de 7, 15 e 30 dias, cada animal era escolhido aleatoriamente e sacrificado. Após a morte dos animais e obtenção das peças, foi realizado processamento histotécnico e as lâminas foram coradas por H.E. As lâminas obtidas foram analisadas quantitativamente observando a presença de células inflamatórias, fibroses e formação de abscessos. Para os eventos celulares, os escores foram considerados os seguintes: 0 – células inflamatórias ausentes ou encontradas apenas dentro dos vasos sanguíneos; 1- células inflamatórias pouco presentes ou em grupos pequenos; 2 – células inflamatórias próximo a extremidade do tubo, ou presente em grande número, configurando severidade. Tecido fibroso: 0 – ausente; 1 – formação de uma fina camada envolvendo o material; 2 – camada espessa. Quanto à formação de abscessos, os escores foram: 0 – ausente; 1 -o abscesso era limitado a proximidade do tubo e 2 – o abscesso atingiu áreas mais distantes. Após as análises, os resultados obtidos dos eventos inflamatórios e a classificação da gravidade mostraram que houve diferença estatística significativa entre os materiais testados, no entanto todos os materiais apresentaram diminuição da gravidade em relação a intervalos de tempos mais longos.

SILVA, *et al.* (2008), avaliaram a influência da associação do $\text{Ca}(\text{OH})_2$ (pasta Calen) com a clorexidina 0,4% no desenvolvimento do fenótipo osteogênico *in vitro*. Foram utilizadas culturas de células osteogênicas da calvária de rato e com isso avaliaram os seguintes aspectos: morfologia e viabilidade celular, atividade da fosfatase alcalina, teor total de proteína, imunolocalização de sialoproteína óssea e formação de nódulos mineralizados. Os resultados mostraram que a associação entre a pasta Calen e a clorexidina 0,4% não afetou o desenvolvimento do fenótipo osteogênico. Não foram observadas alterações em termos de forma e viabilidade celular, atividade da fosfatase alcalina, e no total da quantidade de osso e a formação de nódulos entre os grupos Calen, Calen clorexidina e controle. Com isso, os autores concluem que a estratégia de combinar o hidróxido de cálcio e a clorexidina promove um desejável efeito antibacteriano sinérgico durante o tratamento endodôntico *in vivo* e, além disso, não afeta significativamente a biologia das células osteoblásticas.

BARBIN, *et al.* (2008), avaliaram a associação da clorexidina a 0,2% ao hidróxido de cálcio na intenção de determinar se a *para*-cloroanilina e espécies de oxigênio reativo são geradas na clorexidina isoladamente ou após ser misturada ao hidróxido de cálcio em diferentes períodos de tempo. Foi realizado o teste de espectrometria de massas para

determinar a presença de *para*-cloroanilina nas amostras de clorexidina 0,2% e na associação dessa substância ao hidróxido de cálcio. As amostras foram analisadas imediatamente após o preparon os períodos de 7 e 14 dias. Durante os intervalos do experimento, as amostras foram mantidas a 36,5°C a umidade relativa de 95%. A *para*-cloroanilina foi detectada na solução de clorexidina a 0,2% isolada no período de 14 dias. Da associação dessa substância ao hidróxido de cálcio, foi constatado liberação de oxigênio reativo em todos os momentos, porém não foi observado traços de clorexidina a essa mistura, o que mostra uma degradação imediata da clorexidina.

SILVA, *et al.*(2009), avaliaram a resposta tecidual de camundongos isogênicos após implantação de tubos de polietileno contendo pastas de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ associadas a CHX. Foram utilizados 70 camundongos que foram divididos aleatoriamente em oito grupos. Os animais receberam implantes de tubos de polietileno contendo: Grupos I, II e III - pasta Calen misturado com 0,4% CHX para 7, 21 e 63 dias, respectivamente, os Grupos IV, V e VI - pasta UltraCal misturado com 2% para 7, 21 e 63 dias, respectivamente; e Grupos VII e VIII: tubo vazio para 7 e 21 dias, respectivamente. Após esses períodos os animais foram sacrificados e as peças obtidas passaram por processamento histológico. Foi feita análise descritiva e utilizado um sistema de escores de quatro pontuações, levando em consideração os seguintes critérios para a análise qualitativa e quantitativa do tecido em torno do material implantado: formação de fibras colágenas, a espessura dos tecidos e infiltrado inflamatório. Após a análise das amostras e testes estatísticos, os autores concluíram que a pasta Calen misturada com 0,4% de CHX permitiu uma resposta adequada do tecido, enquanto que a pasta UltraCal misturado com 2% de CHX apresentou resultados insatisfatórios.

MORI, *et al.* (2009), avaliaram a capacidade de difusão das pastas de hidróxido de cálcio com diferentes veículos pelos túbulos dentinários. Para isso utilizaram 60 dentes humanos extraídos que tiveram suas coroas removidas. Os canais foram instrumentados e os dentes foram divididos em 4 grupos de acordo com o veículo empregado ao hidróxido de cálcio: água destilada, propilenoglicol, clorexidina 0,4% e clorexidina 2,0%. Após o preenchimento dos canais com as pastas, os dentes foram selados e colocados em frascos contendo água deionizada. Após os períodos de 1, 2, 7, 15, 30, 45 e 60 dias, foi realizada a mensuração do pH da água para determinar a difusão do hidróxido de cálcio através dos túbulos dentinários. Os resultados mostraram que todas as pastas apresentaram capacidade de difusão semelhante, porém os grupos que utilizou a água destilada e o grupo da clorexidina 2,0% apresentaram melhores resultados que em relação aos outros dois grupos.

ITO, *et al.*, (2011) investigaram a microbiota dos canais radiculares de dentes decíduos com periodontite apical *in vivo* e os efeitos antimicrobianos da pasta de Ca(OH)_2 associado a CLX 1%. Para isso eles utilizaram 30 canais radiculares de dentes decíduos com periodontite apical. Esses canais foram preenchidos com a substância em teste por 14 dias e as amostras foram submetidas ao processo de cultura microbiológico para a detecção de bactérias no interior dos canais radiculares. Após o período experimental, o número de microrganismos diminuiu e os autores concluíram que a utilização de pasta de Ca(OH)_2 associada a clorexidina é eficaz na redução do número de bactérias do interior dos canais radiculares quando aplicados como curativo de demora.

2.3 *Casearia sylvestris* Sw (Guaçatonga)

SILVA, F.; ALMEIDA; SOUSA (2004) avaliaram o potencial irritativo da própolis, da *Casearia sylvestris* e do Otosporin. Para isso, foram utilizados 28 ratos machos. Os animais foram anestesiados e, em seguida, receberam a injeção do corante azul de Evans (2%) por via intravenosa na veia caudal. Quatro pontos predeterminados da região dorsal de cada animal foram depilados e foram injetados 0,1mL das substâncias teste. Os animais foram mortos em meia, uma, três e seis horas após a injeção das substâncias. Cada pedaço de tecido onde houve contato com a solução testada foi colocado em frascos contendo formamida, que foram incubados a 45°C por 72 horas. Após esse período, as amostras foram filtradas e submetidas à análise em espectrofotômetro. No período de três horas, foram observados os maiores valores de corante extraído, caracterizando, assim, o pico do processo inflamatório. A própolis foi a substância que apresentou menor potencial irritativo, seguido pela *Casearia sylvestris*.

MAISTRO; CARVALHO; MANTOVANI (2004) avaliaram os efeitos genotóxicos do extrato etanólico de *Casearia sylvestris* frente à cultura de células HTC (hepatoma tissue culture) de *Rattus norvegicus* e em células V79 de hamster chinês em cultura, utilizando o teste cometa. Para a avaliação genotóxica, as células foram testadas com três concentrações diferentes (0,5, 1 e 2 mg/mL) de extratos preparados a partir de 25mg/mL em solução aquosa. O controle positivo foi ciclofosfamida para as células HTC e metilmetanosulfonato para as células V79. A duração do tratamento foi de 2 horas. Os resultados mostraram que o extrato de *Casearia sylvestris* não apresentou efeitos genotóxicos e não induziu danos ao DNA.

SASSIOTO, *et al.* (2004), realizaram um estudo onde avaliaram o efeito do decoto 5% de *Casearia sylvestris* no reparo de defeito femoral preenchido com matriz óssea bovina desvitalizada. Para sua realização, utilizaram vinte e quatro ratos *Wistar*, machos e adultos que foram distribuídos aleatoriamente em dois grupos de 12 animais. Em cada animal, foi feito defeitos femorais biliaterais, com 2 mm de diâmetro. Esses foram produzidos na diáfise femoral e preenchidos com matriz óssea bovina desvitalizada. O grupo experimental recebeu 1mL de decoto 5% de *Casearia sylvestris*, por gavagem, durante o período de seguimento. O grupo controle foi água destilada. Após os períodos de 10, 20 e 30 dias, os animais foram sacrificados e o tecido ósseo da região do enxerto foi submetido a processamento histológico e corado por H.E.. Após análise estatística, os resultados mostraram menor neoformação óssea nos animais do grupo experimento em todos os períodos. Com isso puderam concluir que o decoto de *Casearia sylvestris* promove atraso na cronologia do processo de reparação óssea em defeitos preenchidos com matriz óssea bovina desvitalizada, em ratos.

ESTEVES, *et al.* (2005), avaliaram as atividades antiúlcera e antiinflamatória do óleo essencial das folhas de *Casearia sylvestris*. Para essa avaliação adotaram os seguintes critérios: edema da pata do rato, teste de tecido granulomatoso, permeabilidade vascular, teste de contorção, indução de estresse de úlcera gástrica e avaliação da secreção gástrica. O rendimento total do óleo essencial da *Casearia sylvestris* foi de 2,5% com DL50 de 1.100 mg/kg em camundongos. Com os resultados obtidos nesse estudo, os autores puderam concluir que o óleo essencial da *Casearia sylvestris* possui atividade antiúlcera e antiinflamatória.

NAPOLITANO, *et al.* (2005), investigaram o efeito dos extratos hexânicos e etanólico de três espécies vegetais na produção de óxido nítrico por macrófagos J774 LPS/IFN – ativado com base no uso tradicional. O efeito do extrato bruto foi determinado pelo teste de azul detiazolil para medir a viabilidade celular. Extrato do tronco de *Serjania lethalis* e o extrato de folhas de *Cupania vernalis* inibiram significativamente a produção de óxido nítrico, enquanto os estratos de *Casearia sylvestris* var. *lingua* se mostraram inativos ou apresentaram baixa atividade na produção de óxido nítrico, ou eram muito citotóxicos. Os estratos etanólicos obtidos da casca e das folhas de *Serjania lethalis* e *Cupania vernalis* respectivamente quase completou ou inibiu a produção de óxido nítrico por macrófagos J774. Diante dos resultados, os autores concluíram que os estratos selecionados são potenciais fontes de compostos ativos que podem ser usados contra agentes anti-inflamatórios.

SCHNEIDER, *et al.*(2006), determinaram a composição química do óleo volátil da *Casearia sylvestris* e sua atividade antibacteriana utilizando o método da bioautografia onde vários microorganismos foram testados. Para análise cromatográfica o óleo extraído foi submetido à análise com cromatógrafo gasoso. Foi possível identificar 90% dos constituintes presentes. O constituinte marjoritário determinado foi o α -cariofilen (27,5%), seguido do biciclogermacreno (24,2%). O óleo apresentou atividade antibacteriana para todos os microorganismos testados, inclusive para o *Enterococcus faecalis*. O óleo da planta tem forte poder medicinal, sendo um possível instrumento para a medicina alternativa.

MATTOS, *et al.*(2007), avaliaram as propriedades antinociceptivas da *Casearia sylvestris* em vários modelos de comportamento relacionado à dor em camundongos. O extrato hidroalcoólico bruto da planta inibiu a resposta nociceptiva induzida por ovalbumina ou ácido acético. O efeito antinociceptivo significativo no teste da placa quente foi detectado após administração maior da dose do extrato. Quando realizado teste do ácido acético, o efeito nociceptivo da *Casearia sylvestris* foi impedido por um tratamento com naxolina, que é um antagonista não seletivo de receptores opióides, o que indica que o sistema opióide endógeno está envolvido em seu mecanismo de ação analgésica. Os autores sugerem que há um potencial terapêutico benéfico no tratamento de condições associadas a dor inflamatória.

WECKWERTH, *et al.*(2008), realizaram um estudo para comparar a atividade antimicrobiana de extratos alcoólicos e aquosos da *Casearia sylvestris* Sw com a atividade antimicrobiana da amoxicilina, azitromicina, vancomicina, penicilina, clindamicina, cloranfenicol e da clorexidina frente a 50 linhagens de *E. faecalis* isolados da cavidade oral. Os testes foram realizados pelo método de difusão das drogas a partir de discos impregnados com as substâncias sobre a superfície de placas de Agar Mueller-Hinton. A droga de melhor eficiência foi amoxicilina com 100% das linhagens sensíveis, estatisticamente significativo quando comparadas às outras drogas. A droga de menor eficiência foi a clindamicina com 94% de linhagens resistentes. Dos extratos obtidos da planta, o extrato propilenoglicólico mostrou melhor eficiência, inibindo 34 (68%) estirpes. A clorexidina inibiu 100% das estirpes.

SIQUINELLI (2008) avaliou o poder antimicrobiano *in vitro* da *Casearia sylvestris* Sw, propilenoglicol e da clorexidina associadas com pasta de hidróxido de cálcio frente a 40 linhagens de *Enterococcus faecalis* isolados da cavidade oral de pacientes atendidos na Clínica de Endodontia da Universidade do Sagrado Coração. Após a ativação das estirpes foi

preparado uma suspensão em salina estéril correspondente a escala 1 de Mac Farland. As linhagens microbianas foram colocadas em contato direto com a pasta de Ca(OH)_2 + propilenoglicol puro; Ca(OH)_2 + solução de clorexidina a 1% em propilenoglicol e Ca(OH)_2 + extrato propilenoglicólico de guaçatonga através de cones de papel contaminados durante 3 minutos e foram cobertos pelas diferentes pastas nas variáveis de tempo de 6, 24, 48 e 72 horas e finalmente com 7 dias, a atividade antimicrobiana foi avaliada. Após o período de incubação, os cones foram removidos das pastas e foram colocadas em caldo Letheen e incubadas a 37°C por 48 horas. Posteriormente, 0,1mL do caldo Letheen foram transferidos para os tubos contendo caldo de infusão de cérebro e coração (BHI) que foram incubados na mesma temperatura e tempo, sendo observado a turvação do meio. Após este período, placas de *M-Enterococcus* ágar foram semeadas com todos os tubos do caldo BHI em seus respectivos tempos e pastas para análise de crescimento colonial. Todas as linhagens foram inibidas em todas as variáveis de tempo e pastas propostas. Concluiu-se que o acréscimo de substâncias ao hidróxido de cálcio não interferiu em sua ação antimicrobiana quando do contato direto.

GÜNTZEL (2008) avaliou as atividades antioxidante, antimicrobiana e a toxicidade dos extratos etanólico e aquoso das folhas de *Casearia sylvestris*, além da descrição dos constituintes de seu óleo essencial e sua atividade antimicrobiana. Quando se avaliou a atividade antioxidante, obtiveram-se inibições do radical livre estudado para os extratos etanólicos e aquoso das folhas onde demonstrou ter um potencial superior de atividade antioxidante que o padrão testado. Para a atividade antimicrobiana, foi encontrada valores de concentração inibitória mínima para o extrato etanólico, enquanto que para o aquoso não. Para o teste de toxicidade, o extrato etanólico apresentou toxicidade moderada a *A. salina*. De seu óleo essencial, 97,3% de seus contituíntes foram identificados por cromatografia gasosa e espectrometria de massas, tendo como constituintes o β -elemento e o α -humuleno. A avaliação antimicrobiana do óleo essencial, apresentou atividade bactericida para *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermides*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* Já para fungos a atividade foi menor.

DUARTE, *et al.* (2009), realizaram um estudo com o objetivo de avaliar a liberação de íons cálcio e hidroxila de pastas de hidróxido de cálcio associadas a diferentes substâncias. Para isso os autores utilizaram 40 dentes de acrílico com canais simulados que foram divididos em quatro grupos de acordo com a substância associada ao hidróxido de cálcio: clorexidina em duas formulações (1% solução e 2% gel), extrato de *Casearia sylvestris* Sw e

propilenoglicol (controle). Após o preenchimento com as pastas a porção coronária foi selada e os dentes imersos em 10mL de água deionizada. Após o período de 10 minutos, 24 horas, 48 horas e 7 dias, os dentes eram trocados de frasco e mediu-se o cálcio liberado por meio de espectrofotometria de absorção atômica no frasco anterior. A leitura do pH foi efetuada empregando o pHmetro. Os dados (mg/dL) obtidos foram comparados estatisticamente pelo teste de Anova e Tukey. Todas as pastas apresentaram comportamento semelhante em termos de pH e liberação de íons cálcio nos períodos analisados.

3 Proposição

3 PROPOSIÇÃO

Avaliar a reação do tecido subcutâneo de ratos, frente à implantação de pastas de hidróxido de cálcio, contidas em tubos de polietileno, associadas a diferentes substâncias:

- Ca(OH)_2 + CHX à 0,2% em propilenoglicol
- Ca(OH)_2 + CHX à 0,4% em propilenoglicol
- Ca(OH)_2 + extrato de *Casearia sylvestris* Sw em propilenoglicol
- Ca(OH)_2 + propilenoglicol (controle)

4 Material e Métodos

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 EXTRATO DE *Casearia sylvestris* Sw EM PROPILENOGLICOL

O extrato de *Casearia sylvestris* Sw utilizado nesse estudo foi obtido do laboratório farmacêutico Max Pharma (Com. e MP de insumos Farmac. LTDA), de São Paulo capital (ANEXO – A) produzido de acordo com a farmacopéia brasileira.

As folhas de *Casearia sylvestris* Sw (Figura 1) foram submetidas ao processo de dessecação anatômico até peso constante, em estufa de ar circulante, sob temperatura controlada e triturada em moinho de facas antes de serem usados na preparação do extrato.

O produto triturado foi submetido à maceração para obtenção do extrato em propilenoglicol, onde a proporção de pó da planta foi de 25 gramas para cada 200 mL de solução extratora (propilenoglicol). Essa solução extratora permaneceu em contato com o pó por 8 dias, sob agitação esporádica, em frasco de vidro âmbar para evitar uma possível interferência da luz e sob temperatura ambiente aproximada de 25°C.

Figura 1 – Folhas de *Casearia sylvestris* (FONTE:(YAMASHITA, 2006))

4.2 SOLUÇÕES DE CLOREXIDINA

Foram utilizadas formulações manipuladas de soluções de clorexidina, em duas concentrações, pela Pharmácia Específica.

- Solução de clorexidina 0,2 %

Digluconato de clorexidina..... 0,2%

Propilenoglicol qsp..... 10 mL

- Solução de clorexidina 0,4%

Digluconato de clorexidina..... 0,4%

Propilenoglicol qsp..... 10 mL

4.3 ANIMAIS

Foram utilizados 72 ratos machos da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*), adultos, com peso entre 250 e 300 gramas, provenientes do Biotério da Faculdade de Odontologia de Bauru – USP, mantidos em gaiolas plásticas coletivas, higienizadas, colocadas em ambiente arejado e iluminado naturalmente, recebendo água *ad libitum* e alimentação constituída de ração comercial balanceada. Previamente ao início do experimento o projeto de pesquisa foi submetido à apreciação do Comitê de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais (CEEPA – Protocolo nº 023/2009) e aprovado em 19/08/2009. (Anexo B)

4.4 TUBOS DE POLIETILENO

Foram utilizados 144 tubos de polietileno (Embramed Ind. Com. Ltda. – São Paulo – SP – Brasil) com 1,5mm de diâmetro interno, 2,0mm de diâmetro externo e 10,0mm de comprimento, esterilizados com óxido de etileno (ACESSIL. Central de Esterilização Com. Ind. Ltda – Campinas – SP – Brasil).

4.5 PREPARO DAS PASTAS

As pastas foram preparadas sobre uma placa de vidro estéril, utilizando 3,0g de hidróxido de cálcio P.A. (Merck, Darmstadt – Germany) para cada 1,75mL de solução de clorexidina a 0,2% em propilenoglicol, 1,75 mL de clorexidina a 0,4% em propilenoglicol, 1,75mL de extrato de *Casearia sylvestris* Sw em propilenoglicol e 1,75mL de propilenoglicol.

4.6 ANESTESIA DOS ANIMAIS

Os animais foram anestesiados com a associação de cloridrato de Ketamina, (solução anestésica) Dopalen® (Sespo Ind. e Comércio Ltda. Div. Vetbrands Saúde Animal, Jacareí-SP-Brasil) e cloridrato de Xilazina (sedativo, analgésico, relaxante muscular) Anasedan®(Sespo Ind. e Comércio Ltda. Div. Vetbrands Saúde Animal, Jacareí-SP-Brasil). Essas substâncias foram empregadas na proporção de um para um e na concentração de 0,1mL de solução para cada 100 gramas de peso do animal.

4.7 GRUPOS EXPERIMENTAIS

Os 72 ratos foram divididos em 4 grupos de 6 animais para cada período experimental, de 7, 14 e 30 dias (tabela 1). Cada rato recebeu dois implantes (implantes A e B), contendo um mesmo tipo de material.

Tabela 1 – Distribuição dos grupos, associações e períodos experimentais

Grupos		Período		
		7 dias	14 dias	30 dias
1	Ca(OH) ₂ + CHX 0,2 % em propilenoglicol	6	6	6
2	Ca(OH) ₂ + CHX 0,4 % em propilenoglicol	6	6	6
3	Ca(OH) ₂ + <i>Casearia sylvestris</i> Sw (guaçatonga) em propilenoglicol	6	6	6
4	Ca(OH) ₂ + Propilenoglicol	6	6	6

4.8 PROCEDIMENTOS CIRÚRGICOS

Para a realização do procedimento, os animais foram pesados e anestesiados com injeção intramuscular com associação de Dopalen[®] e Anasedan[®], na face posterior da coxa trazeira. Após anestesia, foi realizada a tricotomia da região dorsal dos animais (figura 2-A) e a anti-sepsia com álcool iodado a 1% (Rioquímica Indústria Farmacêutica Ltda., São José do Rio Preto-SP-Brasil) (figura 2-B).

As pastas foram manipuladas e introduzidas no interior dos tubos de polietileno, estéreis, com auxílio de uma espátula de inserção e um calcador endodôntico, preenchendo toda a extensão do tubo.

Foi realizada uma incisão longitudinal na região mediana do dorso de cada animal, com lâmina de bisturi número 15 (Eletromed - Comércio de Materiais Médicos Cirúrgicos, Manaus-Amazônia-Brasil) (figura 2-C). Em seguida, cada tubo de polietileno, preenchido com uma das pastas, foi colocado na cânula de um Trocarte, que foi introduzido no espaço aberto até atingir uma profundidade de 18 mm no tecido subcutâneo, completando a divulsão dos tecidos (figura 2-D). Foi tomado cuidado extremo para não perfurar ou dilacerar os tecidos. Desse modo foram implantados dois tubos, de cada grupo, sendo um para o lado esquerdo e outro para o lado direito do dorso de cada animal (figura 2-F). Os implantes foram cuidadosamente depositados perpendiculares à linha de incisão, para evitar a sua expulsão e diminuir a mobilidade. As incisões foram suturadas com fio de seda 4.0 (Ethicon - Johnson&Johnson, Produtos Profissionais Ltda., São José dos Campos-SP-Brasil) (figura 2-E) e para distinguir os animais, foram feitas marcações nas orelhas, com o auxílio de um alicate Ainsworth (Duflex – SSWhite – Rio de Janeiro – Brasil).

Os animais foram colocados em gaiolas individuais e foram observados diariamente para verificação do comportamento com a finalidade de evitar ocorrências que poderiam comprometer o experimento.

Figura 2: A- tricotomia; B – anti-sepsia com Povidine; C – Incisão; D – inserção do tubo com auxílio de um trocarte; E – sutura com fio de seda 4-0; F – localização dos tubos implantados;

4.9 MORTE DOS ANIMAIS E OBTENÇÃO DAS PEÇAS

Decorrido os períodos experimentais os animais foram anestesiados e foit realizada tricotomia em sua região dorsal, que foi limpa com gazes úmidas e mortos, em seguida, com uma dose excessiva de cloridrato de ketamina (anestésico) injetada no coração. Logo em seguida, os corpos de prova foram localizados por palpação e a área de implante dissecada, abrangendo suficiente tecido normal circunjacente (Figrua 3). As peças de tecido, contendo os tubos, foram distendidos em papel cartão e fixadas em solução de formol a 10% tamponado, em frascos unitários, com identificação do animal, grupos e períodos experimentais correspondentes.

Figura 3 – Remoção da peça com tecido cutâneo e subcutâneo

4.10 PROCESSAMENTO LABORATORIAL

As peças permaneceram em solução de formol a 10% (Merck KgaA – Germany) por sete dias. Posteriormente foram recortadas para a remoção do excesso de tecido e lavadas em água corrente por 24 horas. Os tubos de polietileno foram removidos com auxilio de lâmina de bisturi nº 11. Após essa etapa, as peças foram submetidas a processamento histotécnico. As amostras foram incluídas em Histotéc (parafina + resina - Merck KGaA, Darmistadt – Alemanha) e cortadas no micrótomo (Leica – Jung RM2045 – Leica Instruments GmbH D-6907 – Alemanha) de modo semi-seriado, com 5µm de espessura. Os cortes foram feitos no sentido longitudinal do tubo, com o objetivo de coletar numa mesma lâmina as duas extremidades do mesmo. As lâminas foram coradas pela técnica da Hematoxilina e Eosina.

4.11 FORMA DE ANÁLISE DE RESULTADOS

A avaliação das respostas do tecido conjuntivo em contato com as pastas testadas foi realizada de forma descritiva e quantitativa.

4.11.1 MICROSCOPIA DESCRITIVA

A descrição corrente dos fenômenos microscópicos foi desenvolvida no tecido neoformado adjacente às extremidades dos tubos implantados, utilizando um microscópio óptico (Leitz Aristoplan – Germany).

4.11.2 MICROSCOPIA QUANTITATIVA

Para a realização dessa análise foram estabelecidos dois critérios: reação inflamatória e formação de tecido fibrocelular, que corresponde à atividade reparadora. Para avaliação da resposta inflamatória, foi analisada a superfície do tecido, em contato com o material implantado, e essa superfície foi dividida em dez campos, conforme VASOUGHOSSEINI (2008) sendo observada duas lâminas por espécie, totalizando 20 campos observados, atribuindo valores que correspondem a ausência ou presença de células inflamatórias (leve, moderada e intensa). A análise foi feita em microscópio óptico com aumento de 40x.

Para a avaliação da formação de tecido fibrocelular, foi feita uma análise subjetiva baseada na ausência e presença de tecido fibrocelular (discreta, moderada e intensa).

Resposta inflamatória

- 0 – Ausência de células inflamatórias
- 1 – Leve (infiltração de células inflamatórias <25 células)
- 2 – Moderada (infiltração de células inflamatórias entre 25-125 células)
- 3 – Intensa (infiltração de células inflamatórias >125 células)

Tecido fibrocelular

0 – Ausência de formação de tecido fibrocelular. Mas há formação de fibras colágenas;

1 – Formação discreta de tecido fibrocelular. Pequenas áreas de fibras colágenas esparsas;

2 – Formação moderada de tecido fibrocelular. Grandes áreas de fibras colágenas distribuídas irregularmente;

3 – Formação intensa de tecido fibrocelular. Predominância de fibras colágenas, assumindo aspecto de cápsula fibrosa.

4.11.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a comparação entre material e período de implantação foi aplicado o teste de Kruskal Wallis seguidos pelo teste de Dunn para comparações múltiplas entre os grupos dentro dos períodos e entre estes, para cada um dos critérios avaliados. Foi adotado $p < 0,05$ como nível de significância.

5 Resultados

5 RESULTADOS

5.1 MICROSCOPIA DESCRITIVA

5.1.1 PERÍODO 07 DIAS:

Grupo 1 – Ca(OH)_2 + Clorexidina 0,2% em propilenoglicol

Presença de estrutura amorfa com aspecto eosinofílico compatível com necrose de coagulação. Essa estrutura, na maioria dos espécimes, estava disposta como uma faixa, estendendo-se de uma extremidade a outra da luz do tubo, em conjunto com imagens sugestivas de remanescentes da pasta experimental, tais imagens exibiam aspecto amorfo e eosinofílico. Em contato com as estruturas descritas, havia tecido de granulação de aspecto frouxo, contendo proeminente infiltrado inflamatório crônico predominantemente macrofágico com presença moderada de células gigantes mononucleadas, sugerindo reação inflamatória tipo corpo estranho (Figura 4.A).

Grupo 2 – Ca(OH)_2 + Clorexidina 0,4% em propilenoglicol

Neoformação de tecido conjuntivo que se apresentou bem celularizado, cuja população celular era composta por fibroblastos, fibrócitos, células macrofágicas e pequenas áreas de tecido maduro assumindo característica fibrocelular. O infiltrado inflamatório macrofágico envolvia áreas de aspecto eosinofílico compatíveis com resto de material testado (Figura 4.B).

Grupo 3 – Ca(OH)_2 + Extrato de Casearia sylvestris em propilenoglicol

Tecido conjuntivo neoformado denso bem celularizado disposto em forma de faixa, exibindo na área mais interna, em contato com a pasta implantada, material amorfo, homogêneo, hialino, de coloração eosinofílica compatível com restos de pasta implantada e em contato com este material havia infiltrado de macrófagos mono e multinucleados (Figura 4.C).

Grupo 4 – Ca(OH)_2 + propilenoglicol

Tecido conjuntivo neoformado de aspecto denso, com células macrofágicas mononucleadas e também multinucleadas esparsas. No interior desse tecido surgiram pequenas formações de estrutura homogênea, hialina, acelular e eosinofílica, sugerindo resquícios de material implantado (Figura 4.D)

PERÍODO DE 7 DIAS

Figura 4.A: Grupo 1 –Remanescente de pasta experimental (●); macrófago (↑) e célula gigante (↓);

Figura 4.B: Grupo 2 – Tecido fibrocelular (★); infiltrado macrofágico e áreas sugestivas de material implantado (●);

Figura 4.C: Grupo 3 – Tecido conjuntivo neoformado com presença de macrófagos e células gigantes (↑) e áreas sugestivas de restos de material implantado;

Figura 4.D:Grupo 4 – Tecido conjuntivo com áreas sugestivas de restos de material implantado (●), células gigantes multinucleadas (↓) e macrófagos (↑).

5.1.2 PERÍODO 14 DIAS

Grupo 1 – $\text{Ca}(\text{OH})_2$ + Clorexidina 0,2% em propilenoglicol

Estrutura eosinofílica, amorfa sugerindo resquícios de material implantado e em contato com a mesma, havia infiltrado inflamatório crônico com predominância macrofágica e presença marcante de células gigantes multinucleadas, compatível com reação inflamatória do tipo corpo estranho (Figura 5.A).

Grupo 2 – $\text{Ca}(\text{OH})_2$ + Clorexidina 0,4% em propilenoglicol

Faixa espessa de tecido conjuntivo denso com áreas de maturação, exibindo tecido do tipo fibrocelular, tendo de permeio moderado infiltrado de macrófagos e células gigantes multinucleadas esparsas e focos de material com aspecto variando entre eosinofílico e basofílico, sugerindo restos de material implantado (Figura 5.B).

*Grupo 3 – $\text{Ca}(\text{OH})_2$ + Extrato de *Casearia sylvestris* em propilenoglicol*

Formação de um tecido conjuntivo denso, exibindo infiltrado macrofágico mono e multinuclear e na periferia, voltada para a luz do tubo, formações eosinofílicas sugerindo restos de pasta implantada. Mais abaixo, o tecido neoformado exibia características de maturação, caracterizado por pequenas áreas de tecido fibrocelular, que surgiram em outros espécimes de forma acentuada (Figura 5.C).

Grupo 4 – $\text{Ca}(\text{OH})_2$ + propilenoglicol

Tecido conjuntivo denso, tendo na porção periférica, voltada para o tubo implantado, imagens eosinofílicas sugerindo restos de material implantado. Nesse tecido havia infiltrado macrofágico mono e multinuclear e áreas de maturação, manifestando-se como tecido do tipo fibrocelular (Figura 5.D).

PERÍODO DE 14 DIAS

Figura 5.A: Grupo 1 – Resquícios de material implantado (●) e presença marcante de macrófagos (↑) e células gigantes (↓).

Figura 5.B: Grupo 2 – Tecido fibrocelular (★), áreas sugestivas de material implantado (●) e células gigantes (↓).

Figura 5.C: Grupo 3 – Tecido conjuntivo denso, com áreas de maturação (★), presença de macrófagos e células gigantes (↓) e restos de material implantado (●).

Figura 5.D: Grupo 4 – Presença de tecido fibrocelular (★) e restos de material implantado envolvidos por células gigantes (↓).

5.1.3 PERÍODO 30 DIAS

Grupo 1 – Ca(OH)_2 + Clorexidina 0,2% em propilenoglicol

Tecido conjuntivo em ativo processo de maturação, exibindo a presença marcante de estrutura fibrocelular e discreto infiltrado inflamatório macrofágico. Na superfície deste tecido, voltada para a luz do tubo, havia depósito de material de aspecto óra eosinofílico óra basofílico, sugerindo resquícios de material implantado (Figura 6.A).

Grupo 2 – Ca(OH)_2 + Clorexidina 0,4% em propilenoglicol

Formação de um tecido conjuntivo, que se apresentou em sua maior parte amadurecido, caracterizado pela presença marcante de tecido fibrocelular, conferindo-lhe aspecto de tecido fibroso, com presença de macrófagos e células gigantes esparsas. Em contato com esse tecido, que envolvia a extremidade do tubo, havia formações nodulares de tamanhos variados de aspecto homogêneo e eosinofílico, sugerindo restos de material implantado (Figura 6.B)

*Grupo 3 – Ca(OH)_2 + Extrato de *Casearia sylvestris* Sw em propilenoglicol*

Faixa de tecido conjuntivo denso do tipo fibrocelular, assumindo característica de cápsula fibrosa. Na superfície voltada para o material implantado observou-se a formação de uma estrutura caracterizada por um conglomerado de nódulos levemente basofílicos e acelulares, sugerindo restos de material implantado (Figura 6.C).

Grupo 4 – Ca(OH)_2 + propilenoglicol

Formação de um tecido conjuntivo denso, apresentando-se como uma faixa de pouca espessura do tipo fibrocelular. Voltado para a luz do tubo havia conglomerados de imagens basofílicas, sugerindo restos de material implantado. A presença de células macrofágicas mono e multinucleadas era esparsa, localizando-se na periferia da faixa tecidual (Figura 6.D).

PERÍODO DE 30 DIAS

Figura 6.A: Grupo 1 – Tecido fibrocelular (★), discreto infiltrado macrofágico (↑) e restos de material implantado (●).

Figura 6.B: Grupo 2 – Presença de tecido fibrocelular (★), células gigantes (↓) e restos de material implantado (●).

Figura 6.C: Grupo 3 – Tecido fibrocelular (★) e restos de material implantado (●)

Figura 6.D: Grupo 4 - Tecido fibrocelular (★), células gigantes (↓) envolvendo áreas sugestivas de resto de material implantado (●).

5.2 MICROSCOPIA QUANTITATIVA

5.2.1 REAÇÃO INFLAMATÓRIA

Os valores e comparações estatísticas referentes à intensidade da resposta inflamatória entre grupos em cada período experimental, e entre os períodos para cada grupo, estão apresentados na tabela 2. No período de 7 dias não ocorreu diferença estatística significativa entre as pastas testadas ($P > 0,05$), todavia nos períodos de 14 e 30 dias foram encontradas diferenças estatísticas entre os diferentes grupos (Gráficos 1 e 2). Na comparação entre os períodos todos os grupos apresentaram diferença estatística significativa. Os menores valores de inflamação foram encontrados aos 30 dias em todas as pastas testadas.

Tabela 2: mediana, valores máximo e mínimo dos escores obtidos da análise reação inflamatória nos três períodos experimentais. Letras minúsculas iguais nas colunas representam ausência de diferença estatística entre grupos em cada período e letras maiúsculas iguais representam ausência de diferença estatística entre períodos em cada grupo.

	7 dias	14 dias	30 dias
Grupo 1	1,27(0,95-1,45) ^{aA}	1,0(0,86-1,25) ^{adAB}	0,07(0,0-0,2) ^{aB}
Grupo 2	1,4(0,85-1,25) ^{aA}	1,57(1,25-1,9) ^{bA}	0,65(0,4-0,85) ^{bB}
Grupo 3	1,05(0,95-1,7) ^{aA}	0,82(0,35-1) ^{acAB}	0,12(0,0-0,6) ^{aB}
Grupo 4	1,05(0,95-1,7) ^{aA}	1,17(1,1-1,5) ^{dbA}	0,3(0,1-0,45) ^{abB}

Significante para $P < 0,05$

Gráfico 1 : Representação gráfica das diferenças estatísticas encontradas entre os grupos para reação inflamatória no período de 14 dias. Letras iguais representam ausência de diferença estatística.

Gráfico 2 : Representação gráfica das diferenças estatísticas encontradas entre os grupos para reação inflamatória no período de 30 dias. Letras iguais representam ausência de diferença estatística.

5.2.2 FORMAÇÃO DE TECIDO FIBROCELULAR

Os valores e comparações estatísticas referentes à intensidade da formação de tecido fibrocelular, entre os grupos em cada período experimental e entre períodos experimentais para cada grupo, estão apresentados na tabela 3. No período de 7 e 30 dias a comparação estatística entre os grupos não mostrou diferença significativa ($P > 0,05$). No período de 14 dias foram encontradas diferenças estatísticas entre os grupos. Na comparação individual

entre os períodos experimentais, todos os grupos apresentaram diferença estatística significativa, exceto para o grupo 1 entre 7 e 14 dias. Os maiores valores de formação de tecido fibrocelular foram encontrados aos 30 dias em todos os grupos.

Tabela 3: mediana, valores máximo e mínimo dos escores obtidos da análise da formação de tecido fibrocelular nos três períodos experimentais. Letras minúsculas iguais nas colunas representam ausência de diferença estatística entre os grupos em cada período e letras maiúsculas iguais representam ausência de diferença estatística entre períodos em cada grupo.

	7 dias	14 dias	30 dias
Grupo 1	0.0 (0.0-1.0) ^{aA}	0.0(0.0-1.0) ^{aA}	2.5(2.0-3.0) ^{aB}
Grupo 2	0.5(0.0-1.0) ^{aA}	1.5(1.0-2.0) ^{bAB}	2.5(2.0-3.0) ^{aB}
Grupo 3	0.0(0.0-0.0) ^{aA}	1.5(1.0-2.0) ^{bAB}	2.0(2.0-3.0) ^{aB}
Grupo 4	1.0(0.0-1.0) ^{aA}	2.0(1.0-2.0) ^{bAB}	3.0(2.0-3.0) ^{aB}

Significante para $P < 0,05$

Gráfico3 : Representação gráfica das diferenças estatísticas encontradas entre os materiais para formação de tecido fibrocelular no período de 14 dias. Letras iguais representam ausência de diferença estatística.

6 Discussão

6 DISCUSSÃO

6.1 DA METODOLOGIA

Para avaliação biológica de um material odontológico, existem vários tipos de estudos experimentais que são utilizados, como por exemplo: citotoxicidade em cultura de células (PASCON, PAIVA E LANGELAND, 1987), implantação de material em tecido ósseo (MORETTON, 2000), dentes de cães (HOLLAND,*et al.*, 1978; HOLLAND,*et al.*, 1979; HOLLAND,*et al.*, 1985; HOLLAND,*et al.*, 1986; LEAL. HOLLAND; ESBERARD, 1986), dentes de macaco (HOLLAND,*et al.*, 1980), dentes de carneiro (OZATA,*et al.*, 1987), subcutâneo de ratos (SOUZA; HOLLAND; MENEZES, 1991; HOLLAND, *et al.*, 1999; VASOUGHOSSEINI,*et al.*, 2008; GARCIA,*et al.*, 2008; GOMES-FILHO,*et al.*, 2009) e cobaias (PASCON; PAIVA; LANGELAND, 1987).

Neste trabalho foi utilizado o rato da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*) como modelo animal experimental, já que é um dos modelos animais mais comumente utilizado em pesquisas. Possuem um metabolismo acelerado e, com isso, é possível obter resultados em um curto período de tempo, além de representar bem o metabolismo dos mamíferos. A reprodução do rato em laboratório é controlada e permite a eliminação de fatores individuais como deficiência imune ou estarem afetados por alguma doença, além da facilidade de obtenção do número de amostras necessárias (MORETTON,*et al.*, 2000; RODRÍGUEZ SOSA, 2004). COSTA, *et al* (2001), citam outras vantagens na sua utilização, como: necessidade de pequena área de manutenção, facilidade de higienização dessa área, possibilidade de trabalho em vários animais em um curto período de tempo, baixo custo, entre outras.

Para este estudo, foram selecionados ratos machos, devido às variações hormonais das fêmeas, o que poderia interferir nos resultados. Os animais tiveram origem do Biotério da Faculdade de Odontologia de Bauru – USP e foram padronizados quanto à saúde, idade e peso corporal.

Para o acondicionamento dos materiais testados foi utilizado, neste trabalho, os tubos de polietileno por ser um material biocompatível, como mostrou TORNECK (1966). Em seu estudo, pôde verificar que quando implantou tubos de polietileno no subcutâneo de ratos, houve a formação de uma cápsula fibrosa ao redor da área do implante, rica em fibroblastos e

fibras colágenas, sem presença de inflamação, o que indicava a aceitabilidade dos tecidos para esse material. Além de ser comprovado que o uso dos tubos de polietileno em pesquisas apresenta resultados satisfatórios como um modelo metodológico (HOLLAND,*et al.*, 1971; SEMENOFF; SEMENOFF SEGUNDO; FIGUEREDO, 2008; VOSOUGHHOSSEINI,*et al.*, 2008; SILVA,*et al.*, 2009).

Os tubos de polietileno ainda simulam a condição clínica de um canal radicular, pois mantém uma pequena área de material em contato com o tecido conjuntivo, além de fornecer uma área padronizada para análise dos resultados (ZMENER; GUGLIELMOTTI; CABRINI,1988). Esse método está de acordo com as especificações da ADA (1982) que o indica para os testes de biocompatibilidade dos materiais. A FDI indica este teste para avaliar a toxicidade in vivo dos materiais quando se deseja um contato prolongado com os tecidos subcutâneos (STANFORD, 1980).

Uma das desvantagens na utilização do uso dos tubos de polietileno é a sua movimentação no interior dos tecidos nos períodos iniciais, podendo aumentar a reação inflamatória local, porém por observar a neoformação de tecido conjuntivo envolvendo o tubo, pode-se dizer que esta reação é insignificante.

Cada animal recebeu dois tubos de polietileno contendo um mesmo tipo de material. Foi dada preferência para esse tipo de implantação para evitar possíveis interferências na resposta tecidual de uma pasta em relação à outra. Além disso, nenhuma das extremidades dos tubos foi vedada, para evitar uma possível interferência de resultados entre o material utilizado para a vedação e a pasta, além de obter com isso duas áreas possíveis de avaliação.

Para o preparo das pastas, foi tomado como parâmetro a proporção dos componentes da pasta Calen, amplamente estudada e recomendada para uso clínico. A referida pasta apresenta em sua composição 2,5g de hidróxido de cálcio, 0,5g de óxido de zinco, 0,05g de colofônia e 1,75 mL de polietilenoglicol 400. (LEONARDO; LEONARDO, 2009). Em nosso estudo, utilizamos 3,0g de hidróxido de cálcio para 1,75 mL de veículo, mantendo a consistência semelhante da pasta Calen.

Os tubos foram implantados com o auxílio de um trocarte, pois facilita a inserção do tubo no interior do tecido subcutâneo do rato, ocasionando menor trauma para os tecidos. Esse método tem sido proposto por (POSHADLEY; HARRISON, 1966). Porém, foi possível observar assim como BORTOLUZZI(2005), que pode ocorrer uma inconstância na posição

do tubo quanto ao tipo de tecido onde ele é depositado, isto é, o implante pode abranger tecido adiposo. Outra observação que ocorreu com certa frequência, foi o extravasamento de pasta para o tecido adjacente dificultando o procedimento de avaliação.

Para a anestesia dos animais, foi utilizada a associação do anestésico cloridrato de Ketamina e cloridrato de Xilazinacom dosagem determinada pelo peso do animal, resultando num efeito anestésico por um período aproximado de 40 minutos, especificamente em animais com metabolismo intenso como os ratos. O uso da Ketamina, anestésico geral na anestesia de animais de laboratório, faz-se em combinação como relaxante muscular Xilazina, sedativo e analgésico que atua no sistema nervoso central induzindo o relaxamento muscular (CONSEJO CANADIENSE DE PROTECCIÓN DE LOS ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN)

Para os períodos experimentais, a ADA sugere que podem variar entre 7-10, 21-35 e 60-80. Foi observado que na literatura não existe um consenso entre os autores quanto aos períodos de avaliação. HOLLAND,*et al.*, 1971, HOLLAND, *et al.*, 1999 e HOLLAND,*et al.*, 2001, utilizaram períodos experimentais de 7 e 30 dias, já SOUZA; HOLLAND; MENEZES (1991), utilizaram períodos de 7, 30 e 90 dias. NELSON-FILHO, *et al.*, (1999) utilizaram os períodos de 6, 12 e 24 horas e 2, 3, 5, 7 e 15 dias para avaliar a resposta inflamatória do tecido conjuntivo de ratos. Outros trabalhos utilizaram períodos variando entre 5 e 180 dias (HOLLAND,*et al.*, 1977; GARCIA,*et al.*, 2008; SEMENOFF; SEMENOFF SEGUNDO; FIGUEREDO, 2008; SILVA,*et al.*, 2009). No presente trabalho optamos por utilizar um período experimental de 7, 14 e 30 dias, por se tratar da avaliação de pastas de hidróxido de cálcio, pois está permanece em contato com os tecidos periapicais temporariamente. Em vista disso, não achamos necessária a utilização de um período maior que 30 dias, pois de acordo com (MORETTON, *et al.*, 2000), um mês de vida para o rato equivale há um ano para o humano.

Após a morte dos animais, o tecido na área do implante foi removido juntamente com o tubo e distendido em papel cartão para o processo de fixação em solução de formol a 10% e assim como RIBERIRO (2002), a remoção do tubo foi realizada após a fixação das peças e submetida ao processamento histotécnico.

Foram feitos corte semi-seriados de 5µm, como é recomendado pela ADA (1972), em sentido longitudinal do tubo implantado, abrangendo as duas extremidades da cápsula formada. Foram obtidas duas lâminas para cada espécime, contendo 4 cortes em cada uma.

Os espécimes foram avaliados de forma descritiva e quantitativa dentro de dois critérios: reação inflamatória e formação de tecido fibrocelular. Para a avaliação da resposta inflamatória seguimos o exemplo de VOSOUGHHOSSEINI, *et al.*, (2008) comentado em materiais e métodos. Para a avaliação do tecido fibrocelular levou-se em consideração a ausência ou formação desse tecido conforme os parâmetros estabelecidos em material e métodos. A formação do tecido fibrocelular compreende o desenvolvimento do processo de reparo, que culmina com seu amadurecimento, formando uma cápsula fibrosa que envolve o material inacessível para a reação reabsortiva.

6.2 DOS MATERIAIS EMPREGADOS

O curativo ideal para dentes com necrose pulpar, deve apresentar atividade antibacteriana e, se possível ser biocompatível, a fim de favorecer o reparo e não provocar irritação adicional aos tecidos periapicais. Embora o hidróxido de cálcio seja um material classificado como biocompatível (HOLLAND, *et al.*, 1971; NELSON-FILHO, *et al.*, 1999), as substâncias adicionadas a ele, no sentido de melhorar suas propriedades antimicrobianas podem provocar alterações na reação tecidual (SILVA, 2007).

Na terapêutica endodôntica, o digluconato de clorexidina vem sendo utilizado nas concentrações de 0,2% a 2,0% (ZEHNDER, 2006). AGERBAEK; MELSEN; ROLLA(1975), já mostravam que o digluconato de clorexidina tem ação antimicrobiana em concentrações reduzidas de 0,006%, embora sua efetividade diminua conforme sua concentração. Isso mostra que não há um consenso entre a escolha da concentração de clorexidina utilizada tanto como solução irrigadora, quanto para medicação intracanal. (KOMOROWSKI, *et al.*, 2000) mostrou a eficiência antimicrobiana do digluconato de clorexidina a 0,2%. FARIA, *et al.*, (2007) verificou que o digluconato de clorexidina em concentrações maiores que 2,5% promoveu necrose tecidual e citotoxicidade. Na concentração de 2,0%, pode causar irritação na pele o que caracteriza seu potencial irritativo (ZEHENDER, 2006).

Em vista disso, optou-se por utilizar neste trabalho as concentrações de digluconato de clorexidina à 0,2% e 0,4% para ser associada ao hidróxido de cálcio, uma vez que essas concentrações já foram utilizadas na literatura e foi confirmado seu potencial antimicrobiano e de toxicidade em células.

Outra substância utilizada neste estudo para ser uma opção de associação ao hidróxido de cálcio foi o extrato de *Casearia sylvestris* Sw em propilenoglicol. A *Casearia sylvestris*, mais popularmente conhecida como Guaçatonga, planta originária da América Latina, possui ação cicatrizante, anti-septica, antiúlcera, diurética, antimicrobiana e fungicida. É muito rica em óleos essenciais, que justificam seu emprego como cicatrizante, antimicrobiano e fungicida. (TESKE; TRENTINI, 1997).

O potencial irritativo do extrato de *Casearia sylvestris* é semelhante ao da própolis e melhor que o do Otosporin (SILVA; ALMEIDA; SOUZA; 2004). Seu extrato é eficaz contra o *Enterococcus faecalis* (SCHIEDER, *et al.*, 2006; WECKWERTH, *et al.*, 2008). Quando associado ao hidróxido de cálcio, mostrou não sofrer interferência na sua ação frente a microorganismos isolados da cavidade oral e também não mostrou interferência na liberação de íons cálcio e hidroxila (SIQUINELLI, 2008; DUARTE, *et al.*, 2009). Diante desses achados da literatura, e da escassez de trabalhos biológicos utilizando o extrato de *Casearia sylvestris*, foi proposta a avaliação de seu efeito associada ao hidróxido de cálcio em subcutâneo de ratos.

O propilenoglicol é um álcool dihidrico e tem sido usado como veículo e solvente farmacêutico em diversos produtos. O uso do propilenoglicol como um veículo para as pastas de hidróxido de cálcio tem sido investigado e mostrou induzir uma liberação mais favorável de íons cálcio e hidroxila de pastas de hidróxido de cálcio, quando em comparação com outros veículos, incluindo a água destilada (SIMON; BHAT; FRANCIS, 1995). Além disso, em um estudo realizado por CRUZ, *et al.* (2002), foi verificado que o propilenoglicol é capaz de levar corante pelos túbulos dentinários e pelo sistema de canais radiculares mais rapidamente e com mais eficácia que a água destilada, o que confirma seu potencial para ser utilizado como veículo para medicamento intracanal. De acordo com WECKWERTH, *et al.*, (2008), o extrato da *Casearia sylvestris* Sw apresenta melhor ação antimicrobiana quando é obtida a partir da sua maceração em propilenoglicol. Em vista disso, o propilenoglicol foi utilizado para o preparo do extrato de *Casearia sylvestris* e também como solvente para o digluconato de clorexidina 0,2% e 0,4%, como no estudo de DUARTE, *et al.* (2009). O grupo controle (Ca(OH)_2 + propilenoglicol) foi escolhido por ter sua reação conhecida.

6.3 DOS RESULTADOS

Aos 7 dias, a reação inflamatória caracterizada por infiltrado macrofágico predominante, com células gigantes multinucleadas, sugerindo a formação de um granuloma do tipo corpo estranho (FARIA, *et al.*, 2007; NELSON-FILHO, *et al.*, 1999; SILVA, *et al.*, 2009), apresentou, entre todos os grupos experimentais, intensidade semelhante e as diferenças entre os valores foram insignificantes, corroborando com os resultados de outros autores (GARCIA, *et al.*, 2008; SILVA, *et al.*, 2009). A presença do infiltrado inflamatório é plenamente justificada pela ação alcalina do hidróxido de cálcio, que provoca necrose de coagulação e consequentemente reação inflamatória (NELSON-FILHO, *et al.*, 1999). De acordo com os escores adotados neste estudo, a intensidade da reação inflamatória nesse período foi caracterizada como leve a moderada, sendo a mesma mais evidente, apesar de não significativa, nos grupos de associação com a clorexidina 0,4% e 0,2%. Os achados para este período de 7 dias, são contrários aos de SILVA, *et al.*, (2009), que na avaliação da reação inflamatória frente à pasta Calen com clorexidina 0,4%, encontrou escores, que variavam de moderado a intenso, porém seu padrão de avaliação foi diferente do utilizado no presente trabalho, o que pode justificar essa diferença de resultados.

Para o período de 14 dias, os valores da intensidade da reação inflamatória, para todos os grupos, apresentaram diferenças significantes. O grupo 2, contendo clorexidina a 0,4%, apresentou o maior escore sendo classificada, ainda, como leve a moderada. Dos materiais testados, o grupo 3 (extrato de *Casearia sylvestris* Swem propilenoglicol) foi o que se mostrou menos irritante que os demais, o que contraria o estudo de NAPOLITANO, *et al.*, (2004), cujos resultados demonstraram grande citotoxicidade para o extrato de *Casearia sylvestris*. A característica do infiltrado inflamatório, nesse período, era definida, ainda, pela presença marcante de células gigantes e macrófagos, entretanto, nos grupos 2, 3 e 4 detectou-se o início de alguma organização tecidual, representada por tecido de aspecto fibrocelular.

Aos 30 dias, ocorreu a diminuição da intensidade da resposta inflamatória em todos os grupos, porém no grupo 2 (clorexidina a 0,4%), a reação continuava elevada em comparação aos demais grupos, estabelecendo diferenciação significativa entre os grupos 1, 2 e 4. Tal diferenciação pode estar vinculada ao poder de agressão celular da clorexidina. SILVA, *et al.*, (2009) obteve resultados condizentes com tal afirmativa, pois o aumento de percentual de clorexidina, associado ao hidróxido de cálcio, provocou proporcionalmente elevação da intensidade da reação inflamatória.

Com referência aos períodos experimentais, houve um decréscimo acentuado, em geral, da intensidade da reação inflamatória dos períodos iniciais para o período final. Vale ressaltar que nos grupos 1 (clorexidina a 0,2%) e 3 (extrato de *Casearia sylvestris* Sw em propilenoglicol) a diminuição da intensidade do infiltrado inflamatório foi gradativa até os 30 dias. Com relação aos grupos 2 (clorexidina a 0,4%) e 4 (propilenoglicol), a diminuição da intensidade inflamatória não foi gradativa, diminuindo abruptamente seus valores aos 30 dias. Os baixos valores da resposta inflamatória aos 30 dias indicam diminuição da agressão citotóxica das pastas experimentais, permitindo o estabelecimento do tecido fibrocelular.

A presença de tecido do tipo fibrocelular sinaliza o início do processo de reparo, que neste caso deverá caracterizar, com o decorrer do tempo, uma cápsula fibrosa, rica em fibras colágenas, envolvendo a substância biocompatível que não pode ser reabsorvida.

Aos 7 dias a formação do tecido fibrocelular entre os quatro grupos variou de ausente a discreto, não demonstrando diferença significativa entre eles. A ausência ou mesmo a presença discreta daquele tecido, nesse período experimental, pode ser justificada plenamente. A reação inflamatória nesse período inibe a ação de fibroblastos, intoxicando-os e dificultando a produção de colágeno (CONSOLARO, 2009).

Aos 14 dias, houve aumento na produção de tecido fibrocelular nos grupos 2, 3 e 4, exceto no grupo 1, com diferença significativa entre os demais. Há que considerar, neste período, uma incoerência que não teve respaldo na literatura. Tal incoerência está vinculada à constatação de tecido fibrocelular nos grupos 2 e 4 e aumento de intensidade da reação inflamatória, respectivamente 1,57 e 1,17, em relação ao período de 7 dias, conforme tabela 2. A ocorrência desse fato pode estar relacionada à subjetividade da quantificação do infiltrado inflamatório.

No período de 30 dias, a formação de tecido fibrocelular, não demonstrou diferença estatística entre os grupos estudados e a produção desse tecido foi classificada de moderada a intensa. A presença concomitante de infiltrado inflamatório macrofágico mono e multinuclear podem estar vinculados a presença de restos de material implantado (HOLLAND, *et al.*, 1971; OZATA, *et al.*, 1987; PASCON; PAIVA e LANGELAND, 1987; HOLLAND, *et al.*, 1999; NELSON-FILHO, *et al.*, 1999; RIBEIRO, 2002). É importante reafirmar que a produção de tecido fibrocelular caracteriza o fenômeno reparatório em andamento à custa da diminuição da agressão citotóxica dos componentes das pastas estudadas.

Analisando os períodos experimentais, foi possível observar que houve formação gradativa de tecido fibrocelular, dos períodos iniciais para o período final, exceto para o grupo 1, cuja formação para os períodos de 7 e 14 dias foi detectada de ausente para discreta, sendo estatisticamente diferente para o período de 30 dias. Para os demais grupos (2, 3 e 4) a formação de tecido fibrocelular, se deu de forma gradativa, ocorrendo diferença significativa somente entre os períodos de 7 e 30 dias.

Entre as soluções associadas ao hidróxido de cálcio, a clorexidina a 0,4% (grupo 2) se mostrou mais irritante que o grupo controle (grupo 4) e que o grupo da *Casearia sylvestris* Sw (grupo 3). De acordo com alguns autores, a clorexidina quando em concentrações iguais ou inferiores a 0,25% é menos agressiva, exibe reações inflamatórias mais brandas, não gera necrose tecidual e nem edema persistente, porém em nosso estudo, foi possível observar uma faixa amorfa na região de contato com o material, sugestiva de necrose de coagulação e que isso, provavelmente seja encontrada devido à ação alcalina do hidróxido de cálcio. Em concentrações maiores que 0,5%, quando isolada, a clorexidina produz necrose tecidual e o processo inflamatório é mais intenso, retardando o processo de reparo (FARIA, *et al.*, 2007; ZEHNDER, 2006; YESILSOY, *et al.*, 1995).

A clorexidina demonstra citotoxicidade em relação aos fibroblastos e macrófagos o que acaba atrapalhando a adesão macrofágica, que tem fundamental importância no mecanismo da reação inflamatória, além de alterar a apresentação de antígenos (PUNCHER e DANIEL, 1992; KNUUTILA e SÖRDELING 1981; SEGURA, *et al.*, 1999.)

No presente trabalho, aos 30 dias, a diminuição do infiltrado inflamatório propiciou o desenvolvimento acentuado do tecido fibrocelular para todos os grupos, apesar de que no grupo 2 (clorexidina a 0,4%) o valor da intensidade da reação inflamatória foi o mais alto a partir dos 14 dias.

Para o grupo 3, que continha o extrato de *Casearia sylvestris* como veículo, a redução do infiltrado inflamatório ocorreu, provavelmente, devido a seu potencial antiinflamatório originário se seus óleos essenciais (TESKE e TRENTINI, 1997; ESTEVES, *et al.*, 2005) e, além disso, o extrato da referida planta não apresenta efeito genotóxico (MAISTRO; CARVALHO; MANTOVANI, 2004). Tal redução ficou compatível com os valores do grupo 1 (clorexidina a 0,2%), para o critério da reação inflamatória.

Com referência ao fenômeno reparatório, tendo como critério o tecido fibrocelular, o grupo 3 apresentou o menor valor aos 30 dias, mas a diferença entre todos os valores dos outros grupos foi insignificante.

Tomando por base as considerações acima e de acordo com a metodologia aplicada, foi possível observar que todas as pastas empregadas demonstraram ter um comportamento biológico aceitável.

7 Conclusão

7 CONCLUSÕES

Com base na metodologia aplicada e nos resultados obtidos concluímos que:

- Todas as substâncias experimentais (clorexidina a 0,2%, a 0,4% e o extrato de *Casearia sylvestris*) podem ser associadas ao hidróxido de cálcio.
- Aos 30 dias todos os grupos demonstraram formação de tecido fibrocelular, caracterizando atividade reparadora, embora o grupo da clorexidina 0,4% tenha se mostrado mais irritante que os demais grupos.

Referências

REFERÊNCIAS

Agerbaek N, Melsen B, Rolla G. Application of chlorhexidine by oral irrigation systems. *Scand J Dent Res*. 1975;83(5):284-7.

American Dental Standards/American Dental Association. Document nº 41 for recommended standard practices for biological evaluation of dental materials. New York, ANSI/ADA, 1982

Barbin L, Saquy P, Guedes D, Sousa-Neto M, Estrela C, Pécora J. Determination of para-chloroaniline and reactive oxygen species in chlorhexidine and chlorhexidine associated with calcium hydroxide. *J Endod*. 2008;34(12):1508-14.

Basrani B, Ghanem A, Tjaderhane L. Physical and chemical properties of chlorhexidine and calcium hydroxide-containing medications. *J Endod*. 2004;30(6):413-7.

Bernardo CLE, IAFS Colavitti C, Garcia C. Própolis - cicatrizante e antibiótico natural. *Rev Bras Enferm*. 1990;43(1, 2, 3/4):101-6.

Blenkharn JJ. The differential cytotoxicity of antiseptic agents. *J Pharm Pharmacol*. 1987;39(6):477-9.

Bortoluzzi EA. **Avaliação do tecido subcutâneo de ratos à implantação dos cimentos MTA e Portland brancos acrescidos de radiopacificadores**. 2005. 175 p. (Mestrado) - Universidade de São Paulo, Bauru.

Bystrom A, Claesson R, Sundqvist G. The antibacterial effect of camphorated paramonochlorophenol, camphorated phenol and calcium hydroxide in the treatment of infected root canals. *Endod Dent Traumatol*. 1985;1(5):170-5.

Caldwell DR. Microbial physiology and metabolism. Oxford: Wm. C. Brown Publishers; 1995.

Clegg MS, Vertucci FJ, Walker C, Belanger M, Britto LR. The effect of exposure to irrigant solutions on apical dentin biofilms in vitro. *J Endod*. 2006;32(5):434-7.

Codman WW. Ossification of the pulp of a tooth. Newsletter IV.90 apoud Fava LRG, Saunders WP. Calcium hydroxide pastes: classification and clinical indications. *Int Endod J*. 1999; 32:257-82

Correa MP. Dicionário de plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas. Rio de Janeiro: Nacional; 1984.

Costa CAS, Hebling J, Souza PPC. Testes de biocompatibilidade dos materiais odontológicos. In: Estrela C, *Metodologia científica: ciência, ensino e pesquisa*. São Paulo: Artes médicas 2001. p231-71

Cruz EV, Kota K, Huque J, Iwaku M, Hoshino E. Penetration of propylene glycol into dentine. *Int Endod J*. 2002;35(4):330-6.

Duarte M, Miden R, Zeferino M, Vivan R, Weckwerth P, Dos Santos F, et al. Evaluation of pH and calcium ion release of calcium hydroxide pastes containing different substances. *J Endod*. 2009;35(9):1274-7.

Ercan E, Dalli M, Dulgergil CT. In vitro assessment of the effectiveness of chlorhexidine gel and calcium hydroxide paste with chlorhexidine against *Enterococcus faecalis* and *Candida albicans*. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2006;102(2):e27-31.

Esteves I, Souza I, Rodrigues M, Cardoso L, Santos L, Sertie J, et al. Gastric antiulcer and anti-inflammatory activities of the essential oil from *Casearia sylvestris* Sw. *J Ethnopharmacol*. 2005;101(1-3):191-6.

Estrela C, Sydney G, Pesce H, Felipe Júnior O. Dentinal diffusion of hydroxyl ions of various calcium hydroxide pastes. *Braz Dent J*. 1995;6(1):5-9.

Evans MD, Baumgartner, JC, Khemaleelakul, S, Xia, T. Efficacy of calcium hydroxide: chlorhexidine paste as intracanal medication in bovine dentin. *J Endod*. 2003; 29(5):338-9

Faria G, Cardoso CR, Larson RE, Silva JS, Rossi MA. Chlorhexidine-induced apoptosis or necrosis in L929 fibroblasts: A role for endoplasmic reticulum stress. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2009;234(2):256-65.

Faria G, Celes MR, De Rossi A, Silva LA, Silva JS, Rossi MA. Evaluation of chlorhexidine toxicity injected in the paw of mice and added to cultured L929 fibroblasts. *J Endod*. 2007;33(6):715-22.

Fava LR, Saunders WP. Calcium hydroxide pastes: classification and clinical indications *Int Endod J*. 1999 Aug;32(4):257-82

Garcia LFR, Lia RCC, Lopes RA, Oliveira DA, Pires-de-Souza FC, Santos HSL. Análise morfológica e morfométrica do tecido subcutâneo de ratos submetidos à ação de pasta de hidróxido de cálcio e óleo de *Ricinus communis*. *Cienc Odontol Bras*. 2008;11(3):47-54.

- Gentil M, Pereira JV, Sousa YT, Pietro R, Neto MD, Vansan LP, et al. In vitro evaluation of the antibacterial activity of *Arctium lappa* as a phytotherapeutic agent used in intracanal dressings. *Phytother Res*. 2006;20(3):184-6.
- Georgopoulou M, Kontakiotis E, Nakou M. In vitro evaluation of the effectiveness of calcium hydroxide and paramonochlorophenol on anaerobic bacteria from the root canal. *Endod Dent Traumatol*. 1993;9(6):249-53.
- Gomes-Filho JE, Aurelio KG, Costa MM, Bernabe PF. Comparison of the biocompatibility of different root canal irrigants. *J Appl Oral Sci*. 2008;16(2):137-44.
- Grassi T, Camargo E, Salvadori D, Marques M, Ribeiro D. DNA damage in multiple organs after exposure to chlorhexidine in Wistar rats. *Int J Hyg Environ Health*. 2007;210(2):163-7.
- Güntzel ARdC. **Avaliação das atividades farmacológicas de extratos de *Casearia sylvestris* Sw.** 2008. p. (Mestrado) - Centro Universitário UNIVATES, Lageado.
- Haapasalo M, Qian W, Portenier I, Waltimo T. Effects of dentin on the antimicrobial properties of endodontic medicaments. *J Endod*. 2007;33(8):917-25.
- Hasselgren G, Olsson B, Cvek M. Effects of calcium hydroxide and sodium hypochlorite on the dissolution of necrotic porcine muscle tissue. *J Endod*. 1988;14(3):125-7.
- Heithersay GS. Periapical repair following conservative endodontic therapy. *Aust Dent J*. 1970;15(6):511-8.
- Heling I, Steinberg D, Kenig S, Gavrilovich I, Sela MN, Friedman M. Efficacy of a sustained-release device containing chlorhexidine and Ca(OH)₂ in preventing secondary infection of dentinal tubules. *Int Endod J*. 1992;25(1):20-4.
- Herman BW. Calcium hydroxide als mitten zum behandeln und füllen von xanthwurzelkanälen. *Med Diss*. 1920;29:50 apoud Fava LRG, Saunders WP. Calcium hydroxide pastes: classification and clinical indications. *Int Endod J*. 1999; 32:257-82
- Hernandez EP, Botero TM, Mantellini MG, McDonald NJ, Nor JE. Effect of ProRoot MTA mixed with chlorhexidine on apoptosis and cell cycle of fibroblasts and macrophages in vitro. *Int Endod J*. 2005;38(2):137-43.

Holland R, de Mello W, Nery MJ, Bernabe PF, de Souza V. Reaction of human periapical tissue to pulp extirpation and immediate root canal filling with calcium hydroxide. *J Endod.* 1977;3(2):63-7.

Holland R, de Souza V. Ability of a new calcium hydroxide root canal filling material to induce hard tissue formation. *J Endod.* 1985;11(12):535-43.

Holland R, de Souza V, de Mello W, Nery MJ, Bernabé PF, Otoboni Filho JA. Healing process after pulpotomy and covering with calcium hydroxide, Dycal or MPC. Histological study in dog teeth. *Rev Fac Odontol Aracatuba.* 1978;7(2):185-91.

Holland R, de Souza V, Nery MJ, Faraco Júnior IM, Bernabé PF, Otoboni Filho JA, et al. Reaction of rat connective tissue to implanted dentin tube filled with mineral trioxide aggregate, Portland cement or calcium hydroxide. *Braz Dent J.* 2001;12(1):3-8.

Holland R, de Souza V, Nery MJ, Otoboni Filho JA, Bernabé PF, Dezan Júnior E. Reaction of rat connective tissue to implanted dentin tubes filled with mineral trioxide aggregate or calcium hydroxide. *J Endod.* 1999;25(3):161-6.

Holland R, Mello W, Souza V, Nery MJ, Bernabé PFE, Otoboni Filho JA. O Endogel no tratamento conservador da polpa. *Rev. Bras. Odont.;* 1986. p. 14-8.

Holland R, Nery MJ, de Mello W, de Souza V, Bernabe PF, Otoboni Filho JA. Root canal treatment with calcium hydroxide. I. Effect of overfilling and refilling. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1979a;47(1):87-92.

Holland R, Souza V, Holland JR, Nery MJ. Estudo histológico do comportamento do tecido conjuntivo subcutâneo do rato ao implante de alguns materiais obturadores de canal radicular: influência da proporção pó-líquido. *Rev Assoc Paul Cir Dent.* 1971;25(3):101-10.

Holland R, Souza V, Nery MJ, Bernabe PF, Mello W, Otoboni Filho JA. Apical hard-tissue deposition in adult teeth of monkeys with use of calcium hydroxide. *Aust Dent J.* 1980;25(4):189-92.

Holland R, Souza V, Nery MJ, Mello W, Bernabé PFE, Otoboni filho JA. A histological study of the effect of calcium hydroxide in treatment of pulpless teth of dogs. *J. Brit. Endod Soc;* 1979b. p. 15-23.

Ito IY, Junior FM, Paula-Silva FW, Da Silva LA, Leonardo MR, Nelson-Filho P. Microbial culture and checkerboard DNA-DNA hybridization assessment of bacteria in root canals of

primary teeth pre- and post-endodontic therapy with a calcium hydroxide/chlorhexidine paste. *Int J Paediatr Dent*. 2011.

Jeanson MJ, White RR. A comparison of 2.0% chlorhexidine gluconate and 5.25% sodium hypochlorite as antimicrobial endodontic irrigants. *J Endod*. 1994;20(6):276-8.

Knuuttila M, Söderling E. Effect of chlorhexidine on the release of lysosomal enzymes from cultured macrophages. *Acta Odontol Scand*. 1981;39(5):285-9.

Komorowski R, Grad H, Wu XY, Friedman S. Antimicrobial substantivity of chlorhexidine-treated bovine root dentin. *J Endod*. 2000;26(6):315-7.

Kontakiotis E, Nakou M, Georgopoulou M. In vitro study of the indirect action of calcium hydroxide on the anaerobic flora of the root canal. *Int Endod J*. 1995;28(6):285-9.

Leal JM, Holland R, Esberard RM. Ação da água de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ concentrada sobre o tecido pulpar, após pulpotomia: Estudo histológico. *Rev Assoc Paul Cir Dent*. 1986;40(5):372-76.

Leonardo MR, da Silva LA, Tanomaru Filho M, Bonifacio KC, Ito IY. In vitro evaluation of antimicrobial activity of sealers and pastes used in endodontics. *J Endod*. 2000;26(7):391-4.

Leonardo MR, Holland R. Healing process after vital pulp extirpation and immediate root canal filling with $\text{Ca}(\text{OH})_2$: histological study in human teeth. *Rev Fac Odont Araçatuba*. 1974;3(2):159-69.

Leonardo MR, Leonardo RdT. *Endodontia: Conceitos biológicos e Recursos tecnológicos*. São Paulo: Artes medicas; 2009.

Leonardo MR, Salgado AA, da Silva LA, Tanomaru Filho M. Apical and periapical repair of dogs' teeth with periapical lesions after endodontic treatment with different root canal sealers. *Pesqui Odontol Bras*. 2003;17(1):69-74.

Lindhe J, Heyden G, Svanberg G, Loe H, Schiott CR. Effect of local applications of chlorhexidine on the oral mucosa of the hamster. *J Periodontal Res*. 1970;5(3):177-82.

Maistro EL, Carvalho JC, Mantovani MS. Evaluation of the genotoxic potential of the *Casearia sylvestris* extract on HTC and V79 cells by the comet assay. *Toxicol In Vitro*. 2004;18(3):337-42.

Manara LRB. Utilização da própolis em Odontologia. Rev Fac Odontol Bauru. 1999;7(3/4):15-20.

Manzur A, Gonzalez AM, Pozos A, Silva-Herzog D, Friedman S. Bacterial quantification in teeth with apical periodontitis related to instrumentation and different intracanal medications: a randomized clinical trial. J Endod. 2007;33(2):114-8.

Mattos E, Frederico M, Colle T, de Pieri D, Peters R, Piovezan A. Evaluation of antinociceptive activity of *Casearia sylvestris* and possible mechanism of action. J Ethnopharmacol. 2007;112(1):1-6.

Mauricio CV, Lia RcC, Leonardo MR, Benatti Neto C. Estudo histomorfológico do tecido conjuntivo subcutâneo do rato ao implante de pastas à base de hidróxido de cálcio, contidas em tubos de dentina humana. Rev Odont UNESP. 1986;15/16:16.

McHugh CP, Zhang P, Michalek S, Eleazer PD. pH required to kill *Enterococcus faecalis* in vitro. J Endod. 2004;30(4):218-9.

Miorin PL, Levy Junior NC, Custodio AR, Bretz WA, Marcucci MC. Antibacterial activity of honey and propolis from *Apis mellifera* and *Tetragonisca angustula* against *Staphylococcus aureus*. J Appl Microbiol. 2003;95(5):913-20.

Moretton TR, Brown CE, Jr., Legan JJ, Kafrawy AH. Tissue reactions after subcutaneous and intraosseous implantation of mineral trioxide aggregate and ethoxybenzoic acid cement. J Biomed Mater Res. 2000;52(3):528-33.

Mori GG, Ferreira FC, Batista FR, Godoy AM, Nunes DC. Evaluation of the diffusion capacity of calcium hydroxide pastes through the dentinal tubules. Braz Oral Res. 2009;23(2):113-8.

Nair PN, Henry S, Cano V, Vera J. Microbial status of apical root canal system of human mandibular first molars with primary apical periodontitis after "one-visit" endodontic treatment. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2005;99(2):231-52.

Napolitano D, Mineo J, de Souza M, de Paula J, Espindola L, Espindola F. Down-modulation of nitric oxide production in murine macrophages treated with crude plant extracts from the Brazilian Cerrado. J Ethnopharmacol. 2005;99(1):37-41.

Nelson-Filho P, Leonardo MR, Silva LA, Assed S. Radiographic evaluation of the effect of endotoxin (LPS) plus calcium hydroxide on apical and periapical tissues of dogs. *J Endod.* 2002;28(10):694-6.

Nelson Filho P, Silva L, Leonardo M, Utrilla L, Figueiredo F. Connective tissue responses to calcium hydroxide-based root canal medicaments. *Int Endod J.* 1999;32(4):303-11.

Nerwich A, Figdor D, Messer HH. pH changes in root dentin over a 4-week period following root canal dressing with calcium hydroxide. *J Endod.* 1993;19(6):302-6.

Nygren J. Radgivare angaend basta sattet att varda ah bevara tandernas fuskhet.Osv. Stockholm. apoud Fava LRG, Saunders WP. Calcium hydroxide pastes: classification and clinical indications. *Int Endod J.* 1999; 32:257-82

Ozata F, Pişkin B, Erdilek N, Aktener O, Tuncer AV. Comparison of calcium hydroxide and formocresol pulpotomies in primary teeth in lambs: preliminary study. *J Endod.* 1987;13(7):328-35.

Panzarini SR, Souza V, Holland R, Dezan JR. Tratamento de dentes com lesão periapical crônica. Influência de diferentes tipos de curativo de demora e do material obturador de canal radicular. *Rev Odont UNESP.* 1998;27(2):509-26.

Pascon EA, Paiva JG, Langeland K. Bocompatibilidade do Endogel. *Rev Bras Odont.* 1987;44(2):10-20.

Paunio KU, Knuttila M, Mielitynen H. The effect of chlorhexidine gluconate on the formation of experimental granulation tissue. *J Periodontol.* 1978;49(2):92-5.

Perillo MFL, Lima JEO, Costa CAS, Vono BG. Análise histopatológica de polpas de pré-molares humanos submetidos a pulpotomia e capeados com hidroxiapatita, hidroxiapatita + glicerina e hidróxido de cálcio. *Rev Fac Odont Bauru.* 1998;6(1):41-6.

Poshadley AG, Harrison J. Rat connective tissue response to pontic materials. *J Prosthet Dent.* 1966;16:110-8.

Pucher JJ, Daniel JC. The effects of chlorhexidine digluconate on human fibroblasts in vitro. *J Periodontol.* 1992;63(6):526-32.

Ribeiro GG. Avaliação da reação do tecido subcutâneo de ratos ao digluconato de clorexidina a 2% e à pasta de hidróxido de cálcio. Análises edemogênica e microscópica óptica. Faculdade de Odontologia de Bauru - Bauru: Dissertação de Mestrado; 2002. p. 88.

Rocas IN, Siqueira JF, Jr., Santos KR. Association of *Enterococcus faecalis* with different forms of periradicular diseases. J Endod. 2004;30(5):315-20.

Rodríguez Sosa SA. **Reação histopatológica do tecido conjuntivo do dorso de ratos irradiado com laser de CO2 ou de Er:YAG.** 2004. 99 p. (Mestrado) - UNESP, Araraquara.

Safavi K, Nichols F. Effect of calcium hydroxide on bacterial lipopolysaccharide. J Endod. 1993;19(2):76-8.

Safavi KE, Nichols FC. Alteration of biological properties of bacterial lipopolysaccharide by calcium hydroxide treatment. J Endod. 1994;20(3):127-9.

Sassioto MCP, Cardoso Filho N, Facco GG, Sodré ST, Neves N, Purisco SU, et al. Efeito da *Casearia sylvestris* no reparo ósseo com matriz óssea bovina desvitalizada em ratos. Acta Cirurgica Brasileira. 2004;19(6):637-41.

Schafer E, Bossmann K. Antimicrobial efficacy of chloroxylonol and chlorhexidine in the treatment of infected root canals. Am J Dent. 2001;14(4):233-7.

Schneider NFZ, Moura NF, Colpo T, Flach A. Composição química e atividade antimicrobiana do óleo volátil de *Casearia sylvestris* Swart. Revista Brasileira de Farmácia. 2006;87(4):112-4.

Segura JJ, Jiménez-Rubio A, Guerrero JM, Calvo JR. Comparative effects of two endodontic irrigants, chlorhexidine digluconate and sodium hypochlorite, on macrophage adhesion to plastic surfaces. J Endod. 1999;25(4):243-6.

Semenoff T, Semenoff Segundo A, de Figueiredo J. Biocompatibility of different intracanal medications in rat bucal submucosa tissue. J Appl Oral Sci. 2008;16(1):12-7.

Seux D, Couble ML, Hartmann DJ, Gauthier JP, Magloire H. Odontoblasti-like cytodifferentiation of human dental pulp cells *in vitro* in the presence of a calcium hydroxide-containing cement. Archs oral Biol. 1991;36(2):117-28.

Silva F, Almeida J, Sousa S. Natural medicaments in endodontics -- a comparative study of the anti-inflammatory action. *Braz Oral Res.* 2004;18(2):174-9.

Silva R, Leonardo M, da Silva L, de Castro L, Rosa A, de Oliveira P. Effects of the association between a calcium hydroxide paste and 0.4% chlorhexidine on the development of the osteogenic phenotype in vitro. *J Endod.* 2008;34(12):1485-9.

Silva RA, Assed S, Nelson-Filho P, Silva LA, Consolaro A. Subcutaneous tissue response of isogenic mice to calcium hydroxide-based pastes with chlorhexidine. *Braz Dent J.* 2009;20(2):99-106.

Silva R. **Hidróxido de cálcio associado à clorexidna - Estudo em cultura de células (RAW 264.7 e cultura primária de células da linhagem osteoblástica) e em tecido subcutâneo de camundongos. Avaliação da atividade antimicrobiana.** 2007. 92 p. Doutorado - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

Simon ST, Bhat KS, Francis R. Effect of four vehicles on the pH of calcium hydroxide and the release of calcium ion. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 1995;80(4):459-64.

Siqueira JF, Jr., de Uzeda M. Influence of different vehicles on the antibacterial effects of calcium hydroxide. *J Endod.* 1998;24(10):663-5.

Siquinelli NB. Comparação da atividade antimicrobiana in vitro da pasta de hidróxido de cálcio associada com infusão de *Casearia sylvestris* Swart (guaçatonga) e clorexidina frente a linhagens de *Enterococcus faecalis* isolados da cavidade oral Bauru: Monografia - Universidade do Sagrado Coração -; 2008. p. 26.

Soares JA, Leonardo MR, Tanomaru Filho M, Silva LA, Ito IY. Residual antibacterial activity of chlorhexidine digluconate and camphorated p-monochlorophenol in calcium hydroxide-based root canal dressings. *Braz Dent J.* 2007;18(1):8-15.

Souza V, Holland R, Menezes MR. Comportamento biológico do cimento de óxido de zinco e eugenol após contato com o hidróxido de cálcio: estudo histológico em tecido subcutâneo de ratos. *Rev Bras Odont.* 1991;48(1):2-10.

Stanford JW. Recommended standard practices for biological evaluation of dental materials. *Int Endod J.* 1980;30(2):140-88

Sundqvist G, Figdor D, Persson S, Sjogren U. Microbiologic analysis of teeth with failed endodontic treatment and the outcome of conservative re-treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 1998;85(1):86-93.

- Tanomaru JM, Leonardo MR, Tanomaru Filho M, Bonetti Filho I, Silva LA. Effect of different irrigation solutions and calcium hydroxide on bacterial LPS. *Int Endod J*. 2003;36(11):733-9.
- Teske M, Trentini AMM. *Compêndio de Fitoterapia*. 3ª ed ed. Colombo, Paraná: Herbarium Laboratório Botânico; 1997.
- Torneck CD. Reaction of rat connective tissue to polyethylene tube implants. I. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1966;21(3):379-87.
- Tronstad L, Kreshtool D, Barnett F. Microbiological monitoring and results of treatment of extraradicular endodontic infection. *Endod Dent Traumatol*. 1990;6(3):129-36.
- Vahdaty A, Pitt Ford TR, Wilson RF. Efficacy of chlorhexidine in disinfecting dentinal tubules in vitro. *Endod Dent Traumatol*. 1993;9(6):243-8.
- Vianna ME, Gomes BP, Berber VB, Zaia AA, Ferraz CC, de Souza-Filho FJ. In vitro evaluation of the antimicrobial activity of chlorhexidine and sodium hypochlorite. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2004;97(1):79-84.
- Vosoughhosseini S, Lotfi M, Shahi S, Baloo H, Mesgariabbasi M, Saghiri MA, et al. Influence of white versus gray mineral trioxide aggregate on inflammatory cells. *J Endod*. 2008;34(6):715-7.
- Waris G, Ahsan H. Reactive oxygen species: role in the development of cancer and various chronic conditions. *J Carcinog*. 2006;5:14.
- Weckwerth PH, Santos Fd, Duarte MAH, Vivan RR, Weckwerth ACVB. Comparação da atividade antimicrobiana *in vitro* de diferentes antibióticos e extratos hidroalcoólicos de infusão de *Casearia sylvestris* Swart (Guaçatonga) frente a linhagens de *Enterococcus faecalis* isolados da cavidade oral. *Salusvita*. 2008;27(2):119-34.
- Yamashita CI. **Estudo sobre os constituintes inorgânicos presentes em diferentes espécies da planta medicinal do gênero Casearia coletadas em regiões distintas da Mata Atlântica, SP**. 2006. 130 p. (Mestrado) - Universidade de São Paulo, São Paulo.
- Yesilsoy C, Whitaker E, Cleveland D, Phillips E, Trope M. Antimicrobial and toxic effects of established and potential root canal irrigants. *J Endod*. 1995;21(10):513-5.

Zamany A, Safavi K, Spangberg LS. The effect of chlorhexidine as an endodontic disinfectant. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2003;96(5):578-81.

Zehnder M. Root canal irrigants. *J Endod.* 2006;32(5):389-98.

Zmener O, Guglielmotti MB, Cabrini RL. Biocompatibility of two calcium hydroxide-based endodontic sealers: a quantitative study in the subcutaneous connective tissue of the rat. *J Endod.* 1988;14(5):229-35.

Anexos

ANEXO A – Certificado de análise do extrato glicólico de Guaçatonga
(*Casearia sylvestris* Sw)

Ext. *Guaçatonga*

CERTIFICADO DE ANÁLISE

18 JUN. 2010

EXTRATO GLICÓLICO DE GUAÇATONGA

LOTE: 02600505101
LOTE INTERNO: 8516
FABRICAÇÃO: 05/05/2010
VALIDADE: 05/05/2012
PROCEDENCIA EXTRATO: NACIONAL
PARTE USADA: Folhas
ORIGEM PLANTA: BRASIL
NOME CIENTIFICO: *Casearia sylvestris*

TESTES	ESPECIFICAÇÕES	RESULTADOS
Odor	Característico	De acordo
Cor	Castanho a castanho escuro	De acordo
Aspecto	Líquido de média viscosidade	De acordo
pH (20°C +/- 4°C)	5,0 ± 2,0	4,8
Densidade (20°C +/- 4°C)	1,000 ± 0,050	1,024
Concentração (Droga Veículo Extrator)	20,0% (p/v)	De acordo
Solubilidade (Solúvel)	Solúvel em bases aquosas*	De acordo

*Pode ocorrer turbidez e precipitação, sem alterar suas características. Neste caso, homogeneizar o produto antes do uso.

Referência: Farmacopeia Brasileira 4 Ed., Livro do Fabricante

Conservação: Em recipientes hermeticamente fechados ao abrigo da luz e calor.

Alteração de cor pode ocorrer devido se tratar de produto natural.

Obs: Referente ao produto, caso as análises não estejam descritas na farmacopeia, considerar as análises específicas para líquidos.

CONFIRMAMOS QUE OS DADOS ACIMA ESTÃO EM CONFORMIDADE COM
AQUELES RECEBIDOS DO NOSSO FORNECEDOR

MAX PHARMA COM. E IMP. DE INSUMOS FARMAC. LTDA.
Rua Atica nº 150 - Brooklin Pta - São Paulo - SP cep: 04634-040
Telefone/Fax: (11) 5031-0296

ANEXO B - Aprovação Comitê de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais

Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia de Bauru
Al. Dr. Octávio Pinheiro Brisolla, 9-75 – Bauru-SP – CEP 17012-901 – C.P. 73
PABX (0XX14)3235-8000 – FAX (0XX14)3223-4679

Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais
Fone: (14)3235-8356
e-mail: mferrari@fob.usp.br

CEEPA-Proc. Nº 023/2009

Bauru, 19 de agosto de 2009.

Senhor Professor,

O projeto de pesquisa encaminhado a esta Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais, denominado *"Análise da reação do tecido subcutâneo de ratos à implantação de pastas de hidróxido de cálcio associadas a diferentes substâncias"*, de autoria de Raquel Zanin Midena foi enviado ao relator para avaliação.

O parecer do Relator **aprova**ndo o projeto foi aceito *"ad referendum"* desta Comissão, considerando que não existem infrações éticas.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Luís Antônio de Assis Taveira

Vice-Presidente da Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais

Prof. Dr. Roberto Brandão Garcia

Docente do Departamento de Dentística, Endodontia e Materiais Dentários