

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA

MABEL PHILIPPS RAMOS
CIRURGIÃ - DENTISTA

**BIOCOMPATIBILIDADE DE SOLVENTES UTILIZADOS
NO RETRATAMENTO ENDODÔNTICO
- Estudo Experimental em Ratos -**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba, da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção de grau de Mestre em Radiologia Odontológica

200107477

PIRACICABA - SP
2000

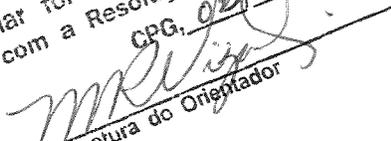
UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA

MABEL PHILIPPS RAMOS
CIRURGIÃ - DENTISTA

**BIOCOMPATIBILIDADE DE SOLVENTES UTILIZADOS
NO RETRATAMENTO ENDODÔNTICO
- Estudo Experimental em Ratos -**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba, da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção de grau de Mestre em Radiologia Odontológica

Este exemplar foi devidamente corrigido,
de acordo com a Resolução CCPG-036/83
CPG, 02/03/001

Assinatura do Orientador

Orientador: Prof. Dr. Mário Roberto Vizioli

Banca Examinadora:
Prof. Dr. Mário Roberto Vizioli
Prof. Dr. Davi Ribero Tames
Prof. Dr. Solange Maria de Almeida

PIRACICABA - SP
2000

N.º CHAMADA:
 T/ UNICAMP
 R147b

V. _____ Ex. _____
 TOMBO BC/ 44853
 PROC. 16.392/01

C D

PREC. R\$ 11,00
 DATA 20/05/01
 N.º CPD _____

CM-00155190-4

Ficha Catalográfica

R147b Ramos, Mabel Philipps.
 Biocompatibilidade de solventes utilizados no retratamento endodôntico. Estudo experimental em ratos. / Mabel Philipps Ram -- Piracicaba, SP : [s.n.], 2000.
 viii, 82f. : il.

Orientador : Prof. Dr. Mário Roberto Vizioli.
 Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Biocompatibilidade. 2. Solventes. 3. Óleo essencial. I. Vizioli, Mário Roberto. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.

Ficha catalográfica elaborada pela Bibliotecária Marilene Girello CRB/8-6159, da Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Piracicaba - UNICAMP.



FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Tese de MESTRADO, em sessão pública realizada em 13 de Dezembro de 2000, considerou a candidata MABEL PHILLIPS RAMOS aprovada.

1. Prof. Dr. MARIO ROBERTO VIZIOLI

2. Prof. Dr. DAVID RIVERO TAMES

3. Profa. Dra. SOLANGE MARIA DE ALMEIDA

Dedico este trabalho

Aos meus pais, Pedro Francisco Philipps (in memoriam) e Maria Leonor S. Philipps, pessoas íntegras e trabalhadoras, a quem devo minha formação moral e profissional.

Ao Flávio e nossas filhas Marcela e Carolina, pelo apoio e compreensão durante minhas frequentes ausências.

AGRADECIMENTOS

O meu reconhecimento às pessoas que, através do seu apoio, possibilitaram-me a concretização deste estudo:

Ao Prof. Dr. Mário Roberto Vizioli, meu orientador, que me transmitiu serenidade, paciência e conhecimento.

À Faculdade de Odontologia de Piracicaba, nas pessoas do Diretor Prof. Dr. Antônio Wilsom Sallum e do Diretor associado Prof. Dr. Frab Norberto Boscolo, pela acolhida e atenção.

À Profa. Dra. Solange Maria de Almeida, pela coordenação do Programa de Pós-Graduação em Radiologia Odontológica

Às funcionárias da Radiologia, Raquel e Gislaine pela ajuda e simpatia.

Ao Curso de Odontologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade do Vale do Itajaí (UNIVALI) por ter me permitido esta oportunidade.

Aos doutores Juarez Philippi e David Rivero Tames, professores e pesquisadores do Curso de Odontologia da UNIVALI, pela colaboração na realização deste trabalho.

Ao pessoal técnico do Laboratório de Pesquisa do Curso de Odontologia da UNIVALI, em especial à Maria, Beatriz e Verônica, pela eficiente colaboração.

Aos professores Doutores da Faculdade de Odontologia de Piracicaba (FOP), Francisco de Souza Filho (Endodontia) e Pedro Duarte Novaes (Morfologia) e ao Doutorando João Gomes Filho (Endodontia) pela importante contribuição na elaboração deste trabalho.

A Ivani, técnica do laboratório de Histologia da FOP, pela confecção dos cortes histológicos, a etapa mais importante e delicada deste trabalho, meu profundo reconhecimento.

Aos meus colegas da Disciplina de Endodontia da UNIVALI, pela amizade e solidariedade às minhas funções durante o período deste trabalho, em especial ao Ricardo e ao Nivaldo, minha dupla no Apoio à Pesquisa, colegas também de Mestrado.

Aos meus colegas de mestrado, professores da UNIVALI, pelo carinho e convivência agradável. Em especial à Denise Arliane Camargo cuja amizade nasceu com este curso e se estende além do ambiente de trabalho.

Ao Flávio, Christian e Ivan pela ajuda técnica na montagem desta dissertação.

A todos os amigos do Curso de Odontologia da UNIVALI, funcionários, alunos e professores, pelo apoio, incentivo e amizade.

SUMÁRIO

LISTAS DE ILUSTRAÇÕES	1
RESUMO.....	2
ABSTRACT.....	3
1. INTRODUÇÃO	4
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	7
2.1 SOLVENTES.....	7
2.1.1 EFETIVIDADE.....	8
2.1.2 BIOCOMPATIBILIDADE.....	9
2.1.2.1 Métodos de estudo da biocompatibilidade	11
2.1.2.2 Estudos de biocompatibilidade.....	15
2.2 INFLAMAÇÃO E REPARAÇÃO TECIDUAL	26
3. PROPOSIÇÃO	30
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	31
4.1 SELEÇÃO DOS ANIMAIS	31
4.2 SUBSTÂNCIAS-TESTE	31
4.3 TUBOS DE POLIETILENO	31
4.4 IMPLANTAÇÃO	32
4.5 SACRIFÍCIO DOS ANIMAIS	35
4.6 REMOÇÃO DAS PEÇAS.....	35
4.7 INCLUSÃO EM GLICOL METACRILATO	36
4.8 PREPARO HISTOLÓGICO.....	37
4.9 ANÁLISE DA LÂMINAS	38
5. RESULTADOS	40
5.1 DESCRIÇÃO MORFOLÓGICA:	40
6. DISCUSSÃO	64
7. CONCLUSÃO.....	74
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	75

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 – Desenho esquemático do corpo de prova a ser implantado	32
FIGURA 2 – Desenho esquemático do dorso do rato mostrando as regiões de implantação dos corpos de prova.....	34
FIGURA 3 – Implantação dos corpos de prova. A, incisões no dorso do animal seguindo alinhamento médio. B, divulsão do tecido. C, implantação do tubo com o trocart. D, imagem do tubo implantado.....	34
FIGURA 4 – A, incisões realizadas até a camada muscular. Rebatimento do retalho. Localização do tubo. B, remoção da amostra.....	36
FIGURA 5 – Desenho esquemático do tubo e dos campos de análise selecionados	39
FIGURA 6 – Formação capsular sobre a parede externa do tubo. Aumento: 400x.....	40
FIGURA 7 – (E) Exsudato; Células inflamatórias; + células desintegradas	41

LISTA DE PRANCHAS

PRANCHA 1 – Tempo de observação de 4 dias	44
PRANCHA 2 – Tempo de observação de 4 dias – Campo I e II	45
PRANCHA 3 – Tempo de observação de 7 dias	49
PRANCHA 4 – Tempo de observação de 7 dias – Campo I	50
PRANCHA 5 – Tempo de observação de 7 dias – Campo II	51
PRANCHA 6 – Tempo de observação de 11 dias	55
PRANCHA 7 – Tempo de observação de 11 dias – Campo I	56
PRANCHA 8 – Tempo de observação de 11 dias – Campo II	57
PRANCHA 9 – Tempo de observação de 15 dias	61
PRANCHA 10 – Tempo de observação de 15 dias – Campo I	62
PRANCHA 11 – Tempo de observação de 15 dias – Campo II	63

RESUMO

O retratamento é a primeira opção para os casos de insucesso da terapia endodôntica. Para que possa ser realizado, é preciso remover o material obturador pré-existente no canal radicular. O uso de solventes facilita este procedimento, além de evitar a ocorrência de acidentes. Um dos requisitos desejáveis é de não serem agressivos aos tecidos periapicais. Sendo assim, a proposta deste estudo foi de avaliar o potencial irritante destes solventes e comparar seus efeitos sobre o tecido subcutâneo de ratos. Para isto, 12 animais foram utilizados, recebendo quatro tubos de polietileno. Três preenchidos com Fibrinol embebido em cada uma das substâncias-teste, ou seja, clorofórmio, eucaliptol e óleo de laranja e um tubo preenchido apenas com Fibrinol que serviu de controle. Os animais foram sacrificados após 4, 7, 11 e 15 dias, com remoção dos tecidos dorsais que continham os tubos. Após processamento laboratorial das peças incluídas em glicol metacrilato, foram realizados cortes de 3 μm de espessura, corados com hematoxilina e eosina e analisados em microscopia óptica. Os resultados obtidos demonstraram que o óleo de laranja foi o solvente menos irritante. Subjetivamente não foi encontrada diferença entre o poder irritante do eucaliptol e do clorofórmio. Sendo assim, acreditamos que o óleo de laranja possa ser a alternativa mais adequada para a desintegração do material obturador durante o retratamento endodôntico.

Palavras chaves: Retratamento Endodôntico; Solventes; Biocompatibilidade

ABSTRACT

Re-treatment is the first option in case of failure of the endodontic therapy. To enable this process, it is essential to remove the pre-existing filling material of the root canal. The use of solvents facilitates this procedure and helps to avoid accidents. One of the properties required from these solvents is non-aggression to periapical tissues. The aim of this study is, therefore, to evaluate the harmful potential of these solvents and compare their effect on subcutaneous tissue of rats. Twelve rats were used to carry out the experiment. Four polyethylene tubes were implanted in each animal, and these tubes were filled with Fibrinol imbided in one of the test-substances, which were chloroform, eucalyptol, and orange oil. The fourth tube was filled only with Fibrinol and was used as a control. Animals were killed 4, 7, 11 and 15 days after implant procedures, and dorsal tissues contained in the implants were removed. After laboratory processing of the specimens, which were immersed in metacrylate glycol, three 3 μm -wide sections were made. These sections were stained with hematoxylin and eosin, and analyzed through microscopy. The results showed that the least harmful solvent was the orange oil. Subjectively, no difference was found between the harmful potential of eucalyptol and chloroform. We therefore believe that the orange oil may be the most appropriate alternative for disintegration of filling material during endodontic re-treatment.

Key words: endodontic re-treatment; solvents; biocompatibility.

1. INTRODUÇÃO

Com o aprimoramento técnico e científico, a Endodontia tornou-se mais exigente ao avaliar a qualidade de um tratamento endodôntico. Consequentemente, houve um aumento de casos indicados para retratamento, constituindo-se numa rotina na prática clínica.

A presença de sinais e/ou sintomas clínicos de inflamação, a não promoção do reparo da patologia perirradicular existente e o aparecimento de novas lesões determina o insucesso do tratamento endodôntico. Tratamentos endodônticos inadequados, associados ou não a sintomas clínicos, são ainda considerados como insucessos (ANTONIAZZI & COSTA, 1992).

Diante destes fracassos, a conduta clínica mais indicada é o retratamento endodôntico, considerado como o de primeira escolha frente à outras propostas, como a cirurgia apical ou extração (WALTON & TORABINEJAD, 1997). Este fato permite afirmar que o retratamento tem um importante papel na moderna prática endodôntica, pois possibilita a manutenção do elemento dental, preservando assim, a saúde bucal e geral do paciente.

Para que o retratamento possa ser realizado, é preciso remover o material existente no canal radicular. O material obturador mais utilizado são os cones de guta-percha associados a cimento ou apenas cimento endodôntico. Uma das vantagens da guta-percha é que pode ser dissolvida por solvente apropriado quando, por qualquer razão, o canal tiver que ser desobstruído. Quando o material

de preenchimento é apenas o cimento de óxido de zinco e eugenol, um dos mais utilizados, a tarefa de esvaziamento se torna bastante difícil pela alta resistência à penetração dos instrumentos endodônticos oferecida pelo material (PAIVA & ANTONIAZZI, 1988; PÉCORA et al., 1992; IMURA & ZUOLO, 1998) .

A associação de instrumentos endodônticos a solventes facilita a remoção do material obturador, permitindo sua desintegração e reduzindo assim riscos de perfuração, retificação ou alteração da forma original do canal devido à pressão exercida pelos instrumentos.

O clorofórmio é considerado o solvente mais rápido e eficaz na desintegração do material obturador (FRIEDMAN et al., 1990; KAPLOWITZ et al., 1991; PÉCORA et al., 1993; SPANÓ et al., 1995). No entanto, possíveis efeitos nocivos são atribuídos a esta substância, sendo banido o seu uso pela FDA (United States Food and Drug Administration) em 1976, por ser uma substância potencialmente tóxica e carcinogênica, limitando assim o seu uso na prática endodôntica (FRIEDMAN et al., 1990; ZAKARIASEN et al., 1990; KAPLOWITZ, 1991; PÉCORA et al., 1993; BARBOSA et al., 1994; SPANÓ et al.; 1995).

Este fato levou autores a buscar um solvente que unisse as qualidades do clorofórmio à biocompatibilidade (KAPLOWITZ, 1991; GÖRDUYSUS et al., 1997) especialmente os óleos essenciais (KAPLOWITZ,1991; PÉCORA et al., 1993; SPANÓ et al., 1995; SILVA, 1996). Entre os óleos propostos como solventes de guta-percha, encontram-se o eucaliptol e o óleo de laranja.

Autores como PÉCORA et al. (1993); SPANÓ et al. (1995); IMURA &

ZUOLO (1998) citam que o óleo de laranja e de eucalipto são desprovidos de efeitos prejudiciais, sugerindo a substituição do clorofórmio por estes óleos, baseando-se no fato de serem utilizados farmacologicamente em fragrâncias, sabores e possuírem ação expectorante .

UEMURA et al. (1997) relataram que não existe chance do eucaliptol ser uma substância cancerígena e que este pode ser utilizado com segurança, enquanto FRIEDMAN et al. (1990) o consideram como o solvente menos irritante aos tecidos.

No entanto, há evidências limitadas na literatura que suportem estas conclusões. Sendo assim, a proposta deste estudo foi avaliar o potencial irritante dos solventes, testando seus efeitos sobre o tecido subcutâneo de ratos.

Ressaltando-se o fato de que o óleo de laranja é mais eficiente que o eucaliptol na dissolução do material obturador e que o clorofórmio é considerado uma substância potencialmente carcinogênica, os resultados desta pesquisa poderão confirmar se realmente este não apresenta efeitos prejudiciais aos tecidos vivos, conseguindo-se dessa maneira, utilizá-lo com eficiência e segurança no retratamento endodôntico.

Aromaterapia, Perfumaria, além de ser matéria-prima para outros compostos (BRUNETON, 1991). São considerados também, portadores de algumas propriedades antissépticas frente à bactérias patogênicas variadas, fungos e leveduras (PATTNAIK et al., 1996).

2.1.1 EFETIVIDADE

O tempo dispensado durante a remoção do material obturador no retratamento, levou vários autores a avaliar a efetividade de diversos solventes, na tentativa de achar uma substância que tornasse mais rápido e menos desgastante este procedimento, além de buscar uma alternativa para o clorofórmio, considerado pela FDA uma substância potencialmente cancerígena.

Uma das alternativas propostas para substituir o clorofórmio é a utilização do óleo essencial de eucalipto (eucaliptol) e o de laranja.

O óleo de laranja é considerado mais lento na desintegração da guta percha quando comparado ao clorofórmio, embora possa ser utilizado com sucesso (PÉCORA et al., 1993; SILVA, 1996; TANOMURU FILHO et al., 1997).

SPANÓ et al. (1995) obtiveram resultados semelhantes ao clorofórmio quando associaram o óleo de laranja à terebintina.

Quando utilizaram o cimento de óxido de zinco e eugenol como material obturador, sem associação com cones de guta percha, PÉCORA et al. (1992) observaram resultados superiores do óleo de laranja na desintegração deste

cimento, quando comparado ao clorofórmio, enquanto RAMOS (1997) não observou diferença estatisticamente significativa entre os dois solventes.

Em relação ao eucaliptol, estudos demonstraram ser este o menos eficiente na dissolução da guta percha (KAPLOWITZ, 1991; PÉCORA et al., 1993; SPANÓ et al. 1995; SILVA, 1996; GÖRDUYSUS et al, 1997; TANOMURU FILHO et al., 1997; BUENO & VALDRIGHI, 2000) e também na desintegração do cimento de óxido de zinco e eugenol (PÉCORA et al.,1992; RAMOS, 1997).

2.1.2 BIOCOMPATIBILIDADE

Tendo em vista que medicamentos utilizados no interior do canal radicular possam entrar em contato com tecido vivo, é desejável que a reação com este tecido não seja deletéria ao metabolismo das células que o compõem. Em ocasiões onde essas drogas não são compatíveis com a resposta celular, o sucesso do tratamento é muitas vezes retardado, e algumas vezes não é realizado devidamente, pelo poder reduzido de regeneração da área sujeita à injúria química (TORNEK, 1961). Segundo AUTIAN (1973), a toxicidade é considerada o efeito da injúria de um agente químico ou físico sobre um tecido vivo. Neste caso, é fundamental que materiais empregados em Endodontia sejam compatíveis aos tecidos conjuntivos, a fim de se evitar possíveis respostas adversas (GUTTUSO, 1963).

O auxílio de um solvente na remoção do material obturador, durante o retratamento, facilita em muito o trabalho do profissional. Sua utilização, porém, deve ser cuidadosa, pois muitos são considerados tóxicos, podendo prejudicar o

periodonto apical (JOHNSON & BEATTY, 1988; ANTONIAZZI & COSTA, 1992; WALTON & TORABINEJAD, 1997). A preocupação com os tecidos periapicais fez com que muitas drogas utilizadas em procedimentos endodônticos fossem investigadas quanto à sua compatibilidade biológica. Neste sentido, foram avaliadas as soluções irrigadoras e medicamentos intracanaís (TORNECK, 1961; BHAT & WALVEKAR, 1975) e materiais obturadores (GUTTUSO, 1963; FRIEND & BROWNE, 1968; MORSE et al., 1981, 1984; OLSSON et al., 1981; MORSE et al., 1984; ORSTAVIC & MIJÖR, 1988 ; MITTAL & CHANDRA, 1996).

CHUTICH et al. (1998) afirmam que os solventes podem ser usados no retratamento endodôntico apresentando risco desprezível ao paciente. Os autores investigaram a quantidade de solvente que pode extravasar aos tecidos periapicais e se seu uso pode ser considerado arriscado ao paciente. Os resultados indicaram que o volume residual do solvente que é extravasado além do forame apical durante o retratamento é muito menor que a dose tóxica permissível. Esta é publicada anualmente através da "Threshold Limit Values and Biological Exposure Indices" na "American Conference of Governmental Industrial Hygienics". O clorofórmio é considerado agente de risco quando presente em níveis excedentes a 49 mg/m³. Este valor representa a exposição máxima permissível por inalação, ingestão ou contato direto.

Entretanto, quando de forma imprudente, acontece o contato direto de materiais considerados potencialmente irritantes com o tecido conjuntivo periapical, tem-se como resultado a produção de dor, associada a edema e necrose. Esta lesão, causada pela injúria química, reduz o potencial regenerativo das área prejudicando o reparo e a função (MITTAL & CHANDRA, 1996).

2.1.2.1 Métodos de estudo da biocompatibilidade

Os métodos de avaliação da biocompatibilidade de materiais podem ser através da utilização de dentes de animais (PASCON et al., 1991), de tecido subcutâneo de coelhos (FRIEND & BROWNE, 1968; GROSSMAN & EDWARD, 1982), tecido subcutâneo de ratos (RAPPAPORT et al., 1964; MORSE et al., 1981; OLSSON et al., 1981; KALLUS & EKLUND, 1983; ORSTAVIC & MIJÖR, 1988; DAMBRÓS, 1999; PASSOLD & TEIXEIRA, 1999) e cultura de células (RAPPAPORT et al., 1964; SPANGBERG & LANGELAND, 1973; BARBOSA et al., 1994).

A implantação de corpos de prova de materiais odontológicos em tecido subcutâneo de animais de laboratório e a análise histopatológica dos efeitos produzidos, constituem as bases de um novo método que tem ganho a confiança de inúmeros pesquisadores.

Segundo GUTTUSO (1963), é o método mais rigoroso e largamente utilizado, o qual permite uma interpretação com menor número de variáveis. A resposta inflamatória é um fenômeno característico comum para todo o tecido conjuntivo. Mudanças celular e vascular no processo inflamatório variam pouco de tecido para tecido ou de animal para animal entre altas espécies.

Os ratos são animais ideais para uso em laboratório pois, conforme Ingle & Griffith (1949) tem declarado, "ratos são menos susceptíveis à infecção pós-operatória que muitos outros animais" (MITTAL & CHANDRA, 1996).

Um dos métodos para avaliação da biocompatibilidade de materiais endodônticos em tecido subcutâneo de ratos utiliza a implantação de tubos de polietileno contendo o material a ser avaliado. Esta técnica é baseada em estudos desenvolvidos por TORNECK, que em 1966, investigou a influência de um espaço

não preenchido do canal radicular e de outros fatores locais que poderiam influenciar no reparo dos tecidos periapicais. Nesse estudo foram utilizados tubos de polietileno vazios de comprimentos e diâmetros variados, que foram implantados cirurgicamente no tecido subcutâneo dorsal de 12 ratos, por um período de sessenta dias. O implante com o tecido adjacente foi removido e realizado o processamento histológico. Os tubos foram envolvidos por um tecido capsular conjuntivo normal. Com exceção das extremidades abertas dos tubos, fibras colágenas estavam dispostas paralelamente no longo eixo do implante com espessura variável. Segundo o autor, esta variação na espessura da cápsula de tecido conjuntivo é dependente do grau de deslocamento do implante no tecido e/ou do processo de cura do tecido agredido pelo procedimento cirúrgico. O tecido conjuntivo da cápsula estava livre de inflamação, exceção feita à presença ocasional de plasmócitos, o que não foi comum a todos os implante. Nenhum dos espécimes demonstrou a presença de resposta inflamatória aguda. A ausência desta inflamação no tecido conjuntivo encapsulando os tubos, indicou a aceitabilidade do material. O mesmo fato foi confirmado por outros autores como FRIEND & BROWNE (1968) ; PHILLIPS (1967); MAKKES et al. (1977); OLSSON, (1981); COSTA JÚNIOR (1997).

Nesse estudo TORNECK demonstrou a invaginação de tecido para o interior dos tubos de diâmetro maior (1,14 mm e 1,40 mm) com presença de inflamação de natureza crônica. Esta inflamação com predomínio de linfócitos e macrófagos e raros plasmócitos ficou restrita ao tecido invaginado, com pouca extensão para fora do tubo nas áreas correspondentes às extremidades do implante. Em todas as espécimes, um fluido seroso foi observado preenchendo o tubo e, possivelmente, este tenha atuado como irritante local, limitando a reação inflamatória basicamente ao lúmen do tubo implantado.

SOUZA FILHO et al. (1996) avaliaram a influência do diâmetro do forame apical e do nível da obturação dos canais no crescimento de tecido conjuntivo intracanal e no processo de reparação tecidual após tratamento endodôntico. No grupo controle, quatro canais foram preparados e deixados vazios, sem obturação. Os autores observaram que nestes canais, supostamente sem contaminação, a inflamação periapical foi evidente, com ausência de invaginação de tecido para o interior do lúmen do canal. No grupo experimental onde os canais foram obturados, foi observada invaginação de tecido para o interior do canal, com característica fibrosa e livre de inflamação.

Tubos de polietileno ou teflon foram utilizados, após os trabalhos de TORNECK (1961, 1966), como veículos de transporte de medicamentos endodônticos e cimentos obturadores no tecido conjuntivo de animais onde, então, a reação local foi avaliada.

A ADA (American Dental Association), em 1972, publicou normas para a realização de testes biológicos de materiais dentários. O material teste, bem como um controle positivo e negativo, devem ser inseridos separadamente, de maneira a evitar-se indução de ar dentro do tubo de polietileno de composição conhecida e adequada. O tubo deve ter aproximadamente 10,0 mm de comprimento e 1,5 mm de diâmetro. Devem ser implantados assepticamente em incisões sob a pele do animal e inseridos nos tecidos pelo menos a 1,0 cm da linha de incisão. Um número suficiente de animais deve ser incluído para se ter, no mínimo, três implantes de cada substância-teste por intervalo de tempo estudado. As espécimes de tecido são então examinadas por métodos histopatológicos. Um número suficiente de cortes em micrótomo, apropriadamente orientados, são produzidos para que se obtenha

uma interpretação tridimensional e segura.

FRIEND & BROWNE (1968) investigaram a irritação do tecido subcutâneo de coelhos a alguns materiais obturadores. Os materiais testados foram acondicionados no interior de tubos de polietileno. Os autores concluíram que este método tem maior semelhança com a situação clínica, pois simula o canal radicular. O método também permitiu a implantação de materiais recentemente preparados e a difusão lenta dos componentes no interior dos tecidos. A padronização da área de contato entre tecido/material foi outra vantagem.

Para a avaliação de materiais semilíquidos, GUTTUSO (1963) propôs o uso de pontas de papel absorvente embebidas no material e implantadas no tecido subcutâneo de ratos. No entanto, concluiu não ser um bom veículo para o estudo de líquidos, já que nenhuma conclusão pode ser tirada, pois os resultados demonstraram uma resposta similar das pontas de papel impregnadas com a substância-teste e as pontas de papel-controle.

Em 1994, OKAMOTO et al. testaram a reação de alvéolos de ratos ao serem preenchidos com Fibrinol (esponja de plasma bovino). Os autores concluíram que por ter sido o Fibrinol completamente absorvido após 9 dias, diminuiu a possível reação do tipo corpo estranho, porém, a presença do respectivo material no alvéolo provocou retardo no processo de cura, quando comparado com animais-controle.

Com o objetivo de avaliar a reação tissular do subcutâneo de rato ao ácido lipotecóico proveniente de bactérias Gram-positivas (*Streptococcus faecalis*), COSTA JÚNIOR (1997) utilizou tubos de teflon preenchidos com Fibrinol para que houvesse a retenção da substância-teste no interior do tubo e que a mesma ficasse em contato com o tecido a ser observado por mais tempo. No tubo controle, onde foi

utilizado somente o Fibrinol, o autor observou a invasão do tecido conjuntivo para o interior do lúmen do tubo, o que não aconteceu no grupo experimental. Sugeriu então, que o ácido lipotécóico atua como substância tóxica direta, impedindo a proliferação celular e crescimento do tecido conjuntivo para o interior do lúmen do tubo. Concluiu ser esta uma das razões que justificam a toxicidade do ácido lipotécóico ao tecido. O Fibrinol mostrou ser absorvível e não desencadeou reações inflamatórias do tipo crônico ou de corpo estranho, demonstrando ser um método eficiente para estes casos.

2.1.2.2 Estudos de biocompatibilidade

Muitos estudos são propostos com o objetivo de encontrar-se um solvente orgânico eficiente na dissolução da guta-percha durante a desobturação do canal radicular. Embora muitos solventes clinicamente efetivos sejam descritos como não irritantes, poucos trabalhos têm sido realizados para substanciar tais conclusões.

É relatado que o clorofórmio produz efeitos adversos à saúde e seria um risco em potencial para o paciente e o profissional. O clorofórmio é irritante devido à sua toxicidade local e sistêmica. Se escapa do sistema de canal radicular durante a terapia endodôntica, pode causar prejuízo aos tecidos perirradiculares, primeiramente porque é capaz de solubilizar lipídios e assim destruir membranas celulares. Sistemicamente o clorofórmio é hepatotóxico e nefrotóxico. Portanto, seria conveniente eliminar seu uso na prática endodôntica quando possível (ZAKARIASEN et al., 1990).

Por muitos anos, o clorofórmio tem sido usado em endodontia. Bowman, em 1833, propôs o uso da guta-percha como material obturador de canal radicular e, desde então, o clorofórmio foi preconizado como excelente solvente deste novo material. Callahan (1894) preconizou uma técnica de obturação que utilizava gutapercha dissolvida em clorofórmio, conhecida como cloropercha (PÉCORA et al., 1993).

Embora o clorofórmio historicamente tenha sido o solvente de escolha, ele tem sido relacionado como possível agente cancerígeno e seu uso clínico tem sido questionado (KAPLOWITZ, 1991; PÉCORA et al., 1993; SPANÓ et al., 1995).

RAPPAPORT et al. (1964) realizaram um estudo para determinar a reação aos tecidos, a toxicidade celular e as propriedades bactericidas de 10 cimentos obturadores, entre eles, a cloropercha. Os métodos para testar a biocompatibilidade foram realizados através da implantação subcutânea de cilindros do material obturador no tecido conjuntivo de ratos e estudos de cultura celular. Os resultados demonstraram que até 12 dias após, a resposta inflamatória da cloropercha foi severa, mas diminuiu com o tempo em que o implante permaneceu no tecido.

SPANGBERG & LANGELAND (1973) avaliaram a citotoxicidade de 12 materiais obturadores *in vitro*, em cultura de tecido, utilizando um método que permitiu um contato íntimo entre o material e as células, possibilitando a quantificação da toxicidade. Os resultados demonstraram que todos os materiais testados foram altamente tóxicos quando recém preparados. Após 24 horas, os autores observaram que a cloropercha foi o material menos tóxico do estudo,

atribuindo este resultado à rápida evaporação do clorofórmio.

Wolfson e Seltzer (1975), conforme MORSE (1981), demonstraram que o clorofórmio (0,5 mg) presente no material obturador Kloropercha NO (conforme Nygaard-Ostby, ou seja, pó de óxido de zinco (48,9%), guta-percha (19.6%), resina canadense (17.0%) e resina colofônia (14,0%), é irritante ao tecido subcutâneo dorsal de ratos. Contudo, MORSE afirma que os autores não compararam a marca Kloropercha NO a nenhuma outra e esta contém resina em sua composição.

OLSSON et al. (1981) utilizaram o método de implantação de tubos de teflon contendo três materiais endodônticos, entre eles a cloropercha (Kloropercha NO), no interior de tecido subcutâneo de ratos, para testar a biocompatibilidade e classificar os materiais em níveis de toxicidade. Observaram a ocorrência e localização de tecido necrótico e fibroso, células inflamatórias agudas e crônicas, presença de macrófagos, células gigantes de corpo estranho e alterações vasculares. A reação dos tecidos foi graduada em leve, moderada e severa. Após 14 dias, tecido necrosado e numerosos neutrófilos desintegrados foram encontrados na região em contato com os três materiais. Adjacente a esta área, um infiltrado de neutrófilos, linfócitos, células plasmáticas, macrófagos e células gigantes foram observadas. A severidade da reação variou amplamente dentro de cada grupo. Os autores concluíram que o método de implantação foi prático para avaliar a qualidade dos materiais endodônticos, mas um *ranking* de biocompatibilidade só seria possível para materiais com considerável diferença de toxicidade.

ORSTAVIK & MIJÖR (1988) avaliaram a resposta de materiais endodônticos, entre eles a cloropercha (kloropercha NO), no tecido conjuntivo subcutâneo de ratos através da implantação de tubos de polietileno preenchidos com o material, correlacionando a resposta dos tecido aos elementos liberados

pelos implantes através da microanálise em raios X. Após 14 e 90 dias, a área do tecido contendo o implante foi excisada e preparada para o processamento histológico com inclusão em parafina e coloração com HE. As reações dos tecidos foram significativamente diferentes em intensidade, extensão e características celulares. A Kloropercha NO demonstrou uma reação moderada (presença de macrófagos e/ou células plasmáticas) inicialmente, mas persistiu por um período maior. A análise aos raios X revelou componentes dos materiais na cápsula conjuntiva para a maioria dos materiais investigados. A Kloropercha NO, dispersou partículas muito grandes para a fagocitose mononuclear. Este fato, segundo os autores se deve ao alto conteúdo de óxido de zinco neste material. Os autores concluíram que a metodologia é adequada para a avaliação dos implantes de materiais endodônticos.

PASCON & SPANGBERG (1990) avaliaram a toxicidade de diferentes marcas comerciais de cones de guta-percha usando um teste de liberação de radiocromo e teste *in vitro* sob células L929 incubadas, por um período de 4 e 24 horas. Os cones de guta-percha foram dissolvidos em clorofórmio ou aquecidos. Todas as pontas de guta-percha dissolvidas em clorofórmio mostraram baixa toxicidade em 4 horas. Ambas as pontas, dissolvidas e aquecidas, foram tóxicas em 24 horas. Quando o clorofórmio residual foi testado isoladamente, um aumento de toxicidade não foi observado. A toxicidade das pontas de guta-percha foi atribuída a liberação de íons de zinco, proveniente do óxido de zinco, o qual é o maior componente das pontas de guta-percha.

PASCON et al. (1991) desenvolveram métodos e critérios para testar a biocompatibilidade de materiais endodônticos. Cento e vinte e um dentes de bugios foram preparados e obturados, aproximadamente 1,0 mm aquém do forame apical,

com diferentes materiais obturadores: AH26, Pulp Canal Sealer e Kloroperka NO. Foram observados pequenos e longos intervalos de tempo. Numa observação a curto prazo (1 a 7 dias) a cloropercha causou uma leve reação, no entanto num período de 2 a 3 anos, demonstrou uma reação severa. Os autores concluíram que uma correlação direta dos resultados deste estudo com futuros testes de implantes do material não pode ser estabelecida e não é possível classificar materiais com reações intermediárias.

BARBOSA et al. (1994) avaliaram a citotoxicidade dos solventes de gutapercha: halotano, óleo de terebintina e clorofórmio. Os materiais-teste foram preparados com 2,5 g de gutapercha dissolvidas em 5 ml de cada um dos solventes e acrescentados a cultura de células fibroblásticas de ratos (L929). A avaliação foi realizada através do método de liberação de rádio-cromo. Nas primeiras horas, os três materiais mostraram alta citotoxicidade. Após 24 horas de evaporação no ar, somente a terebintina ainda demonstrou alta citotoxicidade. Nos experimentos onde a evaporação dos solventes foi inibida por PBS (*free phosphate-buffers* salina), a toxicidade da terebintina era ainda alta após 7 dias em contraste com o clorofórmio e o halotano. Como o clorofórmio e o halotano são altamente voláteis, os autores acreditam ser esta a provável causa da não permanência dos efeitos tóxicos após vinte e quatro horas de evaporação. Os autores afirmaram, que os três materiais avaliados apresentaram desvantagens biológicas similares e acreditam que, a qualquer momento, o retratamento possa ser executado sem o uso de tais solventes orgânicos.

De acordo com o The Merck Index, o clorofórmio pode causar, por inalação, intensa hipotensão, depressão respiratória e cardíaca, podendo levar a óbito. É listado ainda como carcinogênico, neurotóxico e agressor ambiental. Seu

uso foi banido pela FDA (U.S. Food and Drug Administration) em humanos, em 1976, e ainda em cosméticos, drogas e embalagens alimentares (PÉCORA et al., 1993; SPANÓ et al., 1995). O Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos da América demonstrou que o clorofórmio é um indutor potencial de câncer de fígado e de tumores renais em ratos.

Colocando em dúvida a posição da FDA, MCDONALD & VIRE (1992) avaliaram as alterações do estado de saúde de uma equipe odontológica que utilizou o clorofórmio durante o retratamento endodôntico. Os autores concluíram que o clorofórmio não é tóxico nas condições de uso endodôntico, com o que concordam MARGELOS et al. (1997), que estimaram a quantidade de vapores de clorofórmio à qual estão expostos os profissionais e os pacientes durante a dissolução de cones de guta-percha, medindo sua concentração no meio ambiente. Frascos contendo clorofórmio foram colocados na unidade odontológica. Três minutos depois de abertos, a quantidade de clorofórmio no ar foi medida através de um sistema de detecção de gás. Amostras de ar foram obtidas ao nível de zona de inalação de aproximadamente 50 cm sobre a mesa, durante 8 minutos. O estudo resultou em valores baixos (de 2 a 8 ppm). Segundo os autores, o nível de 50 ppm tem sido imposto como limite para um período de exposição de 10 minutos. De acordo com os resultados deste estudo, os autores concluíram que a exposição ao clorofórmio é mínima.

Apesar da proibição do uso do clorofórmio ter sido questionada pelos autores citados anteriormente, há uma tendência na endodontia atual de evitar técnicas que envolvam o clorofórmio. Sendo assim, tem sido sugerido o uso de solventes alternativos como os óleos essenciais, tais como o eucaliptol e o óleo de laranja, que unem as qualidades já encontradas no clorofórmio à biocompatibilidade,

embora hajam provas limitadas na literatura para suportar esta conclusão.

A idéia de produto natural leva algumas pessoas a acreditarem que, por ser natural, não tenha qualquer contra-indicação ou efeitos tóxicos. Casos de intoxicação com óleos essenciais de certas espécies foram registrados. Estudos mais conclusivos sobre a toxicidade crônica das essências são muito esparsos. Não se tem estudado seus possíveis efeitos secundários, nem tão pouco se há ausência de efeitos carcinogênicos ou teratogênicos.

Por outro lado, a toxicidade aguda é melhor conhecida. Por exemplo, o óleo de eucalipto (*Eucalyptus globulus*), demonstrou não ser tóxico, irritante ou fototóxico, quando usado externamente (TISSERAND & BALACS, 1996). Entretanto, este óleo puro é tóxico e não pode ser usado internamente, salvo se for diluído. O óleo essencial de eucalipto é utilizado farmacêuticamente com a finalidade de promover sabor, aroma e melhorar o apetite (LAVABRE, 1992; PÉCORA et al., 1992). Possui ainda ação antibacteriana, sendo considerado pouco irritante aos tecidos (FRIEDMAN et al., 1990; ZAKARIASEN et al., 1990) além de seu uso seguro na história como inalante (ZAKARIASEN et al., 1990). Por estes motivos, estes autores sugerem que o eucaliptol possa ser uma alternativa como solvente no retratamento, pois não tem os efeitos adversos atribuídos ao clorofórmio.

Coolidge, em 1932, demonstrou resposta inflamatória aguda do eugenol e do eucaliptol selados individualmente e não diluídos por 21 dias em canais radiculares de dentes de cachorros. O eucaliptol e o eugenol produziram extensas infiltrações de leucócitos e osteoclastos (TORNECK, 1961).

TORNECK (1961) avaliou a reação tecidual provocada por várias drogas antissépticas utilizadas na terapia endodôntica através da implantação de tubos de

polietileno no dorso de hamsters. Segundo o autor, a magnitude das reações teciduais frente às substâncias utilizadas na terapia endodôntica são influenciadas por sete fatores: (1) tipo, concentração e apresentação física da droga; (2) quantidade ou volume da droga utilizada; (3) a forma como a droga é levada ao canal; (4) o tamanho do forame apical; (5) condições microscópicas do periodonto; (6) o tempo que a droga fica em contato com os tecidos periodontais e (7) a susceptibilidade do hospedeiro à injúria.

MORSE et al. (1981) testaram a possível toxicidade do eucaliptol, comparando-a com o clorofórmio, eugenol e água destilada como controle, em tecido subcutâneo de ratos. Cada uma das substâncias-teste, numa dosagem de 0,05 ml, foi injetada no tecido subcutâneo numa área demarcada. Após 6 horas, os animais foram sacrificados e os tecidos foram processados usando-se a técnica histológica de rotina. A avaliação deu-se em relação ao grau de inflamação através da quantificação do número de células inflamatórias, ou seja, menos de 25 células - grau 1 (nenhuma inflamação), de 25 a 124 - grau 2 (suave inflamação), 125 ou mais - grau 3 (moderada ou severa inflamação, incluindo necrose). Os resultados mostraram que o eugenol causou uma resposta inflamatória bem mais intensa que as outras substâncias. Nenhuma diferença significativa foi observada entre o clorofórmio e o eucaliptol, que demonstraram um efeito local suave. Os autores atribuem este efeito do eucaliptol por ser de uso difundido como rubefaciente, descongestionante e supressor da tosse, sendo assim desprovido de efeitos prejudiciais. Os resultados de relativa não irritabilidade do clorofórmio foram de conformidade com SPANGBERG & LANGELAND (1973), que demonstraram que no tecido subcutâneo do rato, por ser o clorofórmio rapidamente evaporado, permite uma resposta inflamatória relativamente suave.

GROSSMAN & EDWARD (1982) testaram 26 óleos essenciais, entre eles o eucaliptol e o óleo essencial de laranja, com o objetivo de obter um substituto para o eugenol considerado altamente irritante. O eugenol foi usado como controle positivo e solução salina como controle negativo. O teste foi realizado com uma injeção intradérmica de 0,05 ml de cada substância teste na superfície dorsal de coelhos. Os animais foram sacrificados após 7 dias. O exame microscópico graduou a reação observada nos tecidos em suave (presença de poucas células inflamatórias que caracterizam as fases aguda e crônica), moderada (presença de células inflamatórias agudas e crônicas em maior número) e severa (presença das características citadas anteriormente, acompanhadas pela perda de estrutura celular e necrose). O eugenol produziu necrose de células em um grande número de testes, sendo considerada como uma reação severa. Apesar do eucaliptol ter demonstrado uma reação moderada, a diferença de reação dos tecidos quando comparado ao eugenol, não foi estatisticamente significativa. O óleo essencial de laranja demonstrou uma reação considerada severa em todos os testes.

MORSE et al. (1984) realizou uma análise comparativa entre o cimento de óxido de zinco e eugenol (ZOE), cloropercha, eucapercha (guta-percha plastificada em eucaliptol) e xilopercha injetando 0,05 ml de cada material em áreas circunscritas de 10 mm de diâmetro no tecido subcutâneo dorsal de ratos. Após 6 horas, a análise dos tecidos demonstrou que a xilopercha provocou uma reação inflamatória significativamente mais intensa que qualquer dos outros materiais. A reação dos tecidos ao clorofórmio e ao eucaliptol na forma de cloropercha e eucapercha mostrou ser mínima. Segundo os autores, este resultado se deve a rápida evaporação do clorofórmio, como relataram SPANGBERG & LANGELAND (1973) e do eucaliptol possuir baixa toxicidade, confirmada pelos autores em 1981.

PÉCORA et al. (1992) relataram ter utilizado o óleo de laranja, como solvente do material obturador, durante 11 anos. Neste estudo, os autores descreveram a excelente capacidade solvente do óleo testado porém, comentários sobre qualquer efeito prejudicial do mesmo aos tecidos vivos não foram feitos.

No ano seguinte, PÉCORA et al. afirmaram ser o óleo de laranja uma substância que não apresenta efeitos nocivos à saúde, baseando-se apenas no fato deste ser utilizado em farmacologia para aromatizar e dar sabor, tendo ainda ação expectorante.

Esta lacuna levou autores a avaliar os efeitos do óleo de laranja no tecido vivo, na busca de obter-se um solvente que seja efetivo e ao mesmo tempo biocompatível.

DAMBRÓS (1999) avaliou, *in vivo*, o potencial irritativo do óleo de laranja e do eucaliptol comparados ao soro fisiológico (controle). Numa primeira etapa foram utilizados 30 camundongos da raça Swiss, divididos em 3 grupos de 10 animais, que receberam na pata traseira uma injeção subcutânea de 0,05 ml da substância-teste. Em seguida, foram realizadas medidas do edema provocado pela inoculação das substâncias com um paquímetro especial, nos tempos de 1, 3, 5 e 7 dias. Numa segunda etapa, o procedimento de inoculação das substâncias foi o mesmo, no entanto, o tecido foi analisado histologicamente. Os resultados demonstraram que tanto o óleo de laranja quanto o eucaliptol causaram inflamação e alteração tecidual, porém o eucaliptol foi o mais irritante.

Estas conclusões foram confirmadas, no mesmo ano, por PASSOLD & TEIXEIRA que avaliaram a biocompatibilidade e a composição química dos óleos essenciais de laranja e eucalipto. Para testar a biocompatibilidade foi utilizado o

método de exsudação de corantes vitais. Doze ratos receberam injeção intradérmica de 100 microlitros dos óleos em estudo, além dos controles positivo (histamina) e negativo (soro fisiológico). Observaram que ambos os óleos causaram irritação ao tecido vivo. O óleo de laranja, em média, apresentou o mesmo grau de agressividade da histamina, enquanto o de eucalipto foi duas vezes mais agressivo. Quimicamente, observaram que os óleos são constituídos por diferentes componentes. O principal componente do óleo de laranja é o limoneno e do eucalipto é o 1,8-cineol. Como os óleos de composição distinta apresentaram o potencial de injúria aos tecidos, parece pouco provável que um componente isoladamente, possa ser responsabilizado pelo fenômeno. As autoras sugerem que os terpenos em geral são agressivos aos tecidos vivos.

ELEGBEDE (1986) demonstrou que o d-limoneno (monoterpeno), principal componente do óleo de laranja, quando administrado através da dieta, é capaz de prevenir carcinoma mamário induzido em ratos. Da mesma forma o óleo de laranja somado à dieta é capaz de inibir a formação de adenoma pulmonar (WATTENBERG & COCCIA, 1991) e estomacal (WATTENBERG et al., 1995). CROWELL (1999) fez estudos sobre a administração de monoterpenos na dieta, concluindo que este age por mecanismos múltiplos na quimioprevenção e quimioterapia de câncer.

RAMADAN (1996) estudou o valor terapêutico do óleo de laranja como um agente antifúngico tópico. Concluiu que este exerce efeito sobre uma variedade de infecções dermatológicas apresentando apenas uma suave irritação no tecido quando utilizado na forma pura.

2.2 INFLAMAÇÃO E REPARAÇÃO TECIDUAL

A inflamação é um processo dinâmico de grande importância biológica que ocorre no tecido conjuntivo, em resposta a um agente agressor, seja este de natureza física, química ou biológica (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 1999).

O caráter fundamental da resposta inflamatória é quase sempre o mesmo, e independente do agente lesivo ou do local de sua ocorrência; consiste em uma série de adaptações teciduais, que envolvem principalmente os vasos sanguíneos, os componentes líquidos e celulares do sangue bem como o tecido conjuntivo. É uma reação que se inicia no momento da agressão e só termina com a reparação ou cura da lesão.

De acordo com COTRAN et al. (1996); TROWBRIDGE & EMLING (1996), a reação de defesa a determinado agente agressor inicia-se com a resposta vascular. As reações vasculares caracterizadas pela vasodilatação e pelo aumento da permeabilidade conduzem à exsudação plasmática e à transmigração celular. A exsudação plasmática forma inicialmente o edema ou exsudato inflamatório, que contribui para diluir ou neutralizar as substâncias tóxicas ou líticas, que advém do estímulo injuriante. A transmigração celular surge devido o aparecimento, no campo inflamatório, dos agentes quimiotáticos para leucócitos, resultando num complexo sincronismo de reações biológicas, as quais visam a eliminação do agente flogógeno e conseqüentemente a cura. Quando a defesa celular estimula o processo, ocorre a remoção do agente agressor e dos restos celulares. Não ocorrendo perda tecidual, haverá restauração total. Mas, caso ocorra uma perda considerável de estrutura tecidual, esta será substituída por um tecido cicatricial, que geralmente impede o desenvolvimento funcional.

A reparação tecidual, deve constituir o estágio final de uma inflamação que atingiu sua finalidade biológica, isto é, restabelecer a normalidade da estrutura atingida.

As áreas de conjuntivo, destruídas por inflamação ou por lesão traumática, são preenchidas novamente pela proliferação do conjuntivo adjacente. Algumas vezes, até mesmo em 24 horas após a agressão, os fibroblastos e as células endoteliais começam a proliferar e a formar, em 3 a 5 dias, tecido de granulação, que é o marco da inflamação em processo de cura. O tecido de granulação se caracteriza pela proliferação de novos vasos sanguíneos e de fibroblastos (COTRAN et al., 1996).

VIZIOLI (1971) realizou um estudo sobre a organização macromolecular do tecido de granulação, induzido por esponjas implantadas subcutaneamente em ratos. Após a implantação das esponjas, os ratos foram sacrificados 3, 5, 7, 10, 13, 16, 21 e 28 dias. Os resultados mostraram que a formação do tecido de granulação inicia-se entre o 3° e o 4° dia pós-implantação, através de células fibrogenéticas e totipotentes originárias da cápsula fibrosa reacional, com subsequente proliferação desses elementos celulares até por volta de 15 a 20 dias, quando então a fase proliferativa termina e estabelece-se a organização e maturação do tecido. O tecido de granulação invadiu completamente todos os espaços da esponja por volta de 15 dias, sendo que a fase mais ativa da proliferação persistiu até por volta de 20 dias de evolução, particularmente no período compreendido entre 10 e 20 dias, quando os vasos neoformados iniciam a sua função de nutrição completamente, conforme demonstrado pela observação de hemáceas no seu interior.

A multiplicação de fibroblastos, que caracteriza morfologicamente o reparo da lesão, é estimulada por substâncias liberadas pelas plaquetas e

macrófagos. São células predominantes do tecido de granulação, tem a importante função de produzir matriz extracelular caracterizando a formação do tecido de granulação. Secretam inicialmente colágeno imaturo, capaz de possibilitar um suporte estrutural vital aos frágeis capilares recém-formados (RUBIN & FARBER, 1990). À medida que o tecido de granulação vai sendo reabsorvido, os fibroblastos desaparecem e mais colágeno é observado (STERNBERG, 1997). Com o aumento progressivo dessas fibras há, conseqüentemente, diminuição de células e vasos sangüíneos. Os fibroblastos também produzem a maioria das glicosaminoglicanas (mucopolissacarídeos ácidos) do tecido de granulação, que permitem a agregação do colágeno em feixes.

A síntese de colágeno e seu posterior desenvolvimento foi bastante estudada em tecidos de granulação, tanto aqueles obtidos por meio de implantação de corpos estranhos, como por meio de injúrias produzidas com a finalidade de se obter subsídios para a melhor compreensão dos mecanismos de cura.

Segundo VIZIOLI (1971,1973), a síntese de colágeno é detectável a partir de 4 a 7 dias de desenvolvimento, dependendo do tipo de material utilizado na produção do granuloma. A partir desse tempo a atividade fibroblástica aumenta progressivamente, atingindo o máximo entre 15 a 31 dias de desenvolvimento. Após três semanas de evolução, o tecido de granulação está organizado e o colágeno está agregado em forma de feixes.

TROWBRIDGE & EMLING (1996) afirmam que os fibroblastos não funcionam bem se há presença de bactérias, produtos tóxicos e deficiência de oxigênio. Estes fatores podem interferir no reparo atuando na velocidade de síntese de colágeno durante o processo de formação do tecido de granulação.

Segundo HEUGHAM & HUNT (1975), a tensão do oxigênio tissular, o estado hemodinâmico do organismo e a ação de toxinas cumprem um papel preponderante na biossíntese do tecido de granulação, ora acelerando-a, ora retardando-a. De acordo com FAHEY et al. (1991), defeitos de reparo podem ser resultado do metabolismo alterado de colágeno.

3. PROPOSIÇÃO

Levando-se em consideração a importância que o aspecto biológico exige na escolha de um solvente a ser utilizado no retratamento endodôntico e as restritas informações existentes na literatura a esse respeito, este estudo se propôs a:

- Avaliar o potencial irritante dos solventes eucaliptol, clorofórmio e óleo de laranja;
- Estabelecer uma comparação entre o poder irritante dos diferentes solventes testados.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 SELEÇÃO DOS ANIMAIS

Foram utilizados para esta pesquisa, doze ratos albinus-Wistar (*Rattus norvegicus*), adultos, pesando entre 250 e 330 gramas, provenientes do biotério da Universidade do Vale do Itajaí – UNIVALI, mantidos em gaiolas, recebendo água *ad-libitum* e alimentação constituída de ração balanceada padrão.

4.2 SUBSTÂNCIAS-TESTE

Foram utilizados os seguintes solventes: clorofórmio (Laboratório de Farmácia da UNIVALI), eucaliptol (SS WHITE) e óleo de laranja (VISNATURE).

4.3 TUBOS DE POLIETILENO

Tubos de polietileno medindo 7,0 mm de comprimento por 1,5 mm de diâmetro interno e 2,0 mm de diâmetro externo foram esterilizados em autoclave e utilizados como receptores das substâncias-teste.

Para que houvesse a retenção do solvente no interior do tubo e que o mesmo ficasse em contato com o tecido a ser observado por mais tempo, foi

utilizada esponja de plasma bovino – Fibrinol (LABORATÓRIO BALDACCI S.A. – São Paulo) – a qual foi adaptada no interior do tubo sem que se deixasse excesso (FIG. 1). Esta metodologia foi baseada no trabalho de COSTA JÚNIOR (1997).

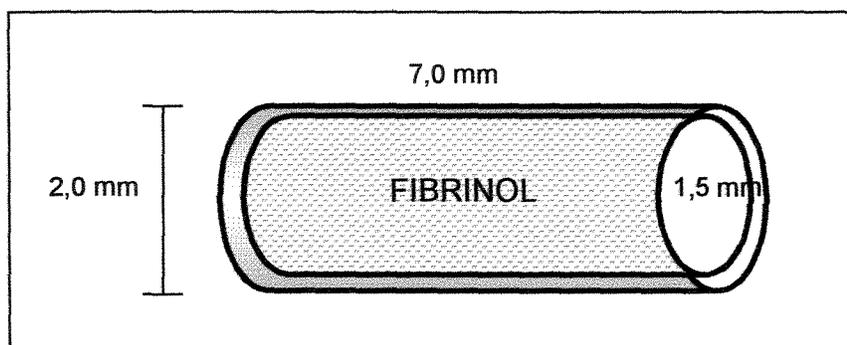


FIGURA 1 – Desenho esquemático do corpo de prova a ser implantado.

4.4 IMPLANTAÇÃO

O momento cirúrgico teve início com a introdução da substância-teste no interior de cada tubo de polietileno, feita por meio de seringa descartável estéril tipo insulina com agulha 12,7 X 0,33 (BEKTON & DICKINSON – Curitiba – PR), onde o solvente foi depositado lentamente, umedecendo totalmente o Fibrinol no interior do tubo.

Três tubos foram preparados com cada substância-teste e um tubo com apenas o Fibrinol serviu de controle.

Os animais, um de cada vez, foram anestesiados por inalação de éter sulfúrico. Para a implantação dos tubos, foi feita a antissepsia de toda a região dorsal do animal com tintura de iodo a 2% antes e após a tricotomia, desde a região

anterior até a posterior (caudal).

Duas incisões retilíneas, superficiais, de aproximadamente 10 mm de comprimento foram feitas, uma anterior e outra posterior, seguindo a linha média, sobre a coluna vertebral, com lâmina de bisturi número 15 (BEKTON & DICKINSON – Juiz de Fora – MG). Uma tesoura fina de ponta romba foi inserida delicadamente com o objetivo de divulsionar o tecido, separando o tecido dérmico do subcutâneo (FIG. 3).

Na incisão anterior, foi feita uma divulsão para o lado esquerdo e outra para o lado direito em direção à cabeça e na posterior do mesmo modo, mas em direção à cauda, com a preocupação da mesma não ser extensa em lateralidade, mas sim, em comprimento.

Feita a divulsão, os tubos de polietileno foram levados para interior da loja cirúrgica com auxílio de um trocart, para que estes ficassem tão longe quanto possível da incisão. De acordo com KALLUS & EKLUND (1983), este procedimento evita que o processo de cicatrização da incisão atinja a área a ser observada (FIG. 2 e 3). Duas suturas com pontos interrompidos coaptaram os bordos da ferida cirúrgica, utilizando fio de seda 3.0 (ETHICON).

Desta forma um mesmo animal recebeu quatro implantes: três com cada uma das substâncias-teste e mais o controle, aplicando-se um sistema de rodízio da região. Todos esses procedimentos foram conduzidos sob rigorosas condições de assepsia.

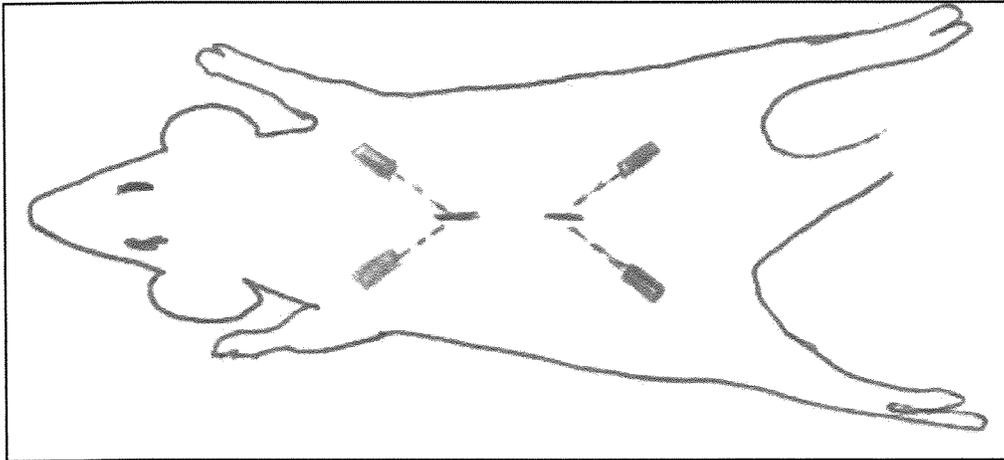


FIGURA 2 – Desenho esquemático do dorso do rato mostrando as regiões de implantação dos tubos de polietileno.

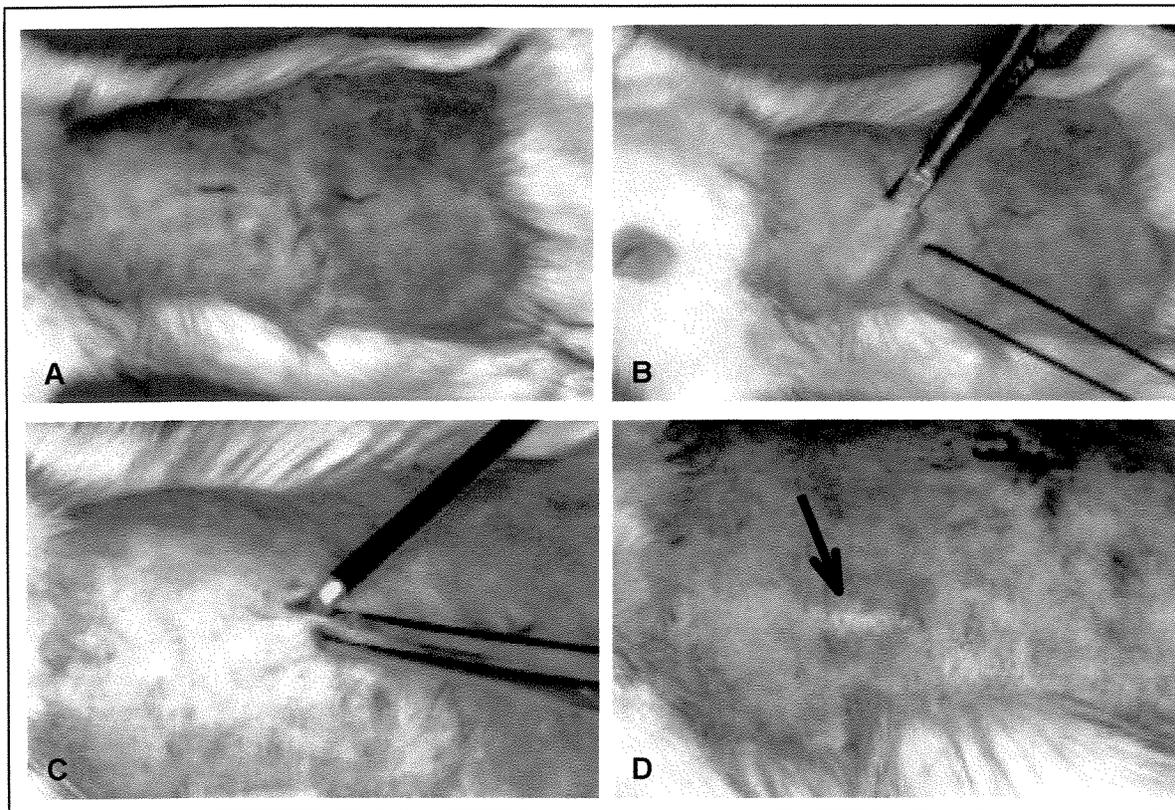


FIGURA 3 – Implantação dos tubos de polietileno. A, incisões no dorso do animal seguindo a linha média. B, divulsão do tecido. C, implantação do tubo com o trocart. D, imagem do tubo implantado (seta).

Após a implantação, os ratos foram colocados em gaiolas e mantidos no laboratório até que se completasse o período de observação.

4.5 SACRIFÍCIO DOS ANIMAIS

Cada três animais foram sacrificados por inalação de éter sulfúrico a cada intervalo de tempo (ADA, 1972), ou seja, aos 4, 7, 11 e 15 dias após a implantação dos tubos, sendo imediatamente removidas as amostras dos tecidos que continham os tubos implantados.

4.6 REMOÇÃO DAS PEÇAS

Feita a antissepsia antes e após a tricotomia, os corpos de prova foram localizados por palpação.

Em seguida foi realizado um ato cirúrgico que consistiu em uma incisão longitudinal sobre a coluna vertebral, até atingir a camada muscular e outra incisão no sentido transversal entre a região anterior e posterior do animal. Foi realizado o rebatimento total do retalho, por meio de divulsão. Estando o retalho inteiramente rebatido, foram visualizados os tubos implantados, removendo-os imediatamente através do recorte do retalho com margem de segurança de mais de 1 cm em todas as direções (FIG. 4). As peças removidas foram colocadas em solução de formol

tamponado a 10%, permanecendo por 72 horas e encaminhadas para inclusão em glicol metacrilato.

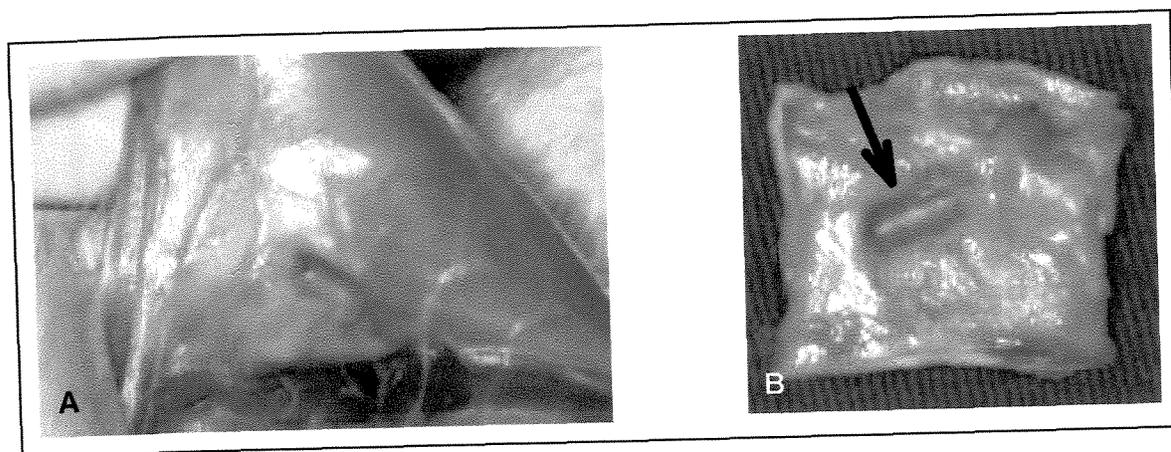


FIGURA 4 – A, incisões realizadas até a camada muscular. Rebatimento do retalho. Localização do tubo (seta). B, remoção da amostra.

Após a fixação em formol, os tubos foram localizados no interior dos blocos e divididos com auxílio de lâmina de barbear em dois segmentos no sentido longitudinal, a fim de atingir a sua metade.

4.7 INCLUSÃO EM GLICOL METACRILATO

O método de inclusão em glicol metacrilato foi baseado na técnica de GOMES FILHO (1999).

As amostras foram lavadas em água corrente para remoção da solução de fixação e desidratadas em álcool em concentrações crescentes: álcool 70% pelo

período de uma noite, álcool 90% em 3 trocas de 30 minutos e álcool 95% em 3 trocas de 30 minutos.

Foi utilizado o kit de glicol metacrilato JB4 (Polysciences Inc.), que é constituído de Solução A, Ativador e Solução B. As peças desidratadas foram então, colocadas na Solução A ativada (0,9 mg de Ativador para cada 100 ml de Solução A) e deixadas para infiltrar à temperatura ambiente em um vibrador por 72 horas.

Para inclusão, moldes de plástico de 1,0 ml foram cobertos com uma camada de Teflon em *spray*, o que impede a adesão do glicol metacrilato ao molde e controla o aquecimento durante a polimerização. Os moldes foram preenchidos pela solução de inclusão (0,04 ml da solução B para cada ml da Solução A ativada).

As peças foram colocadas no interior dos moldes já cobertos pelo Teflon para o preenchimento com a solução de inclusão. Cada molde foi coberto com resina autopolimerizável para evitar o contato do glicol metacrilato com o oxigênio do ar, pois este dificulta a reação normal da resina.

Após a completa polimerização, os blocos foram mantidos em vidros com tampa lacrada e encaminhados para o corte.

4.8 PREPARO HISTOLÓGICO

Foram utilizadas navalhas de tungstênio (Tungsten Carbide Blades – TC 65 – Heidelberg) em micrótomo comum. Cortes seriados na espessura de 3

micrometros foram realizados no sentido longitudinal ao longo eixo do tubo, de modo que as duas extremidades pudessem ser observadas, e colocados diretamente sobre a lâmina de vidro contendo uma gota de água deionizada para que espalhassem .

Como as amostras foram divididas ao meio, de uma das hemi-metades foram confeccionados os cortes, a outra foi armazenada como reserva.

As secções foram coradas pelo método de Hematoxilina e Eosina (H.E.), seguindo a técnica rotineira, mas com uma pequena modificação em relação ao tempo de permanência nas soluções, que foi aumentado.

As observações morfológicas e fotografias dos cortes corados foram feitas em fotomicroscópio (Olympus- BX 50), em aumento de 40 e 400 X.

Para um mesmo tubo (teste ou controle) foram realizados vários cortes e realizada a descrição das características morfológicas do tecido observado.

4.9 ANÁLISE DAS LÂMINAS

Para cada tubo, analisaram-se duas reações tissulares localizadas, cada uma, respectivamente, em cada extremidade. Para facilitar a descrição e padronizar a área de análise, dividiu-se o tecido em crescimento em dois campos:

Campo I: tecido em contato com a esponja embebida no solvente;

Campo II: tecido presente na extremidade do tubo.

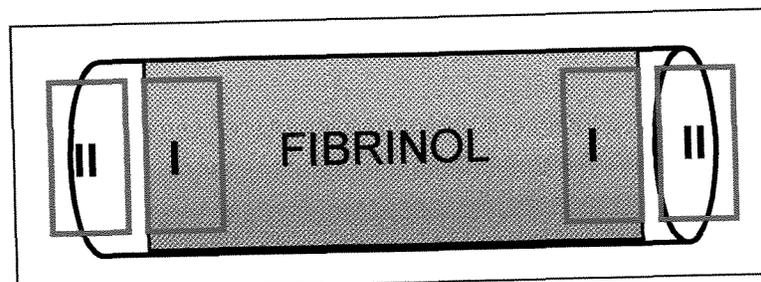


FIGURA 5 – Desenho esquemático do tubo e dos campos de análise selecionados

Para cada campo, foram analisados mais de um corte, sendo que as células e estruturas distinguíveis foram classificadas em leucócitos polimorfonucleares (neutrófilos), células mononucleares, vasos hiperêmicos, exsudato e neoformação vascular. No aspecto células mononucleares, estão incluídas as inflamatórias (macrófagos, linfócitos, plasmócitos) e fibroblastos. Os fenômenos observados foram de acordo com as fases seqüenciais do processo inflamatório-reparativo.

5. RESULTADOS

As observações fotomicroscópicas estão organizadas na seqüência evolutiva dos períodos e expressas nas PRANCHAS de 1 a 11.

5.1 Descrição morfológica

A implantação de tubos de polietileno subcutaneamente provocou a formação de uma cápsula fibrosa englobando os tubos, exceto nas extremidades abertas, o que foi observado em todos os grupos. Esta cápsula consistiu de fibroblastos, fibras colágenas e vasos sanguíneos (FIG. 6).

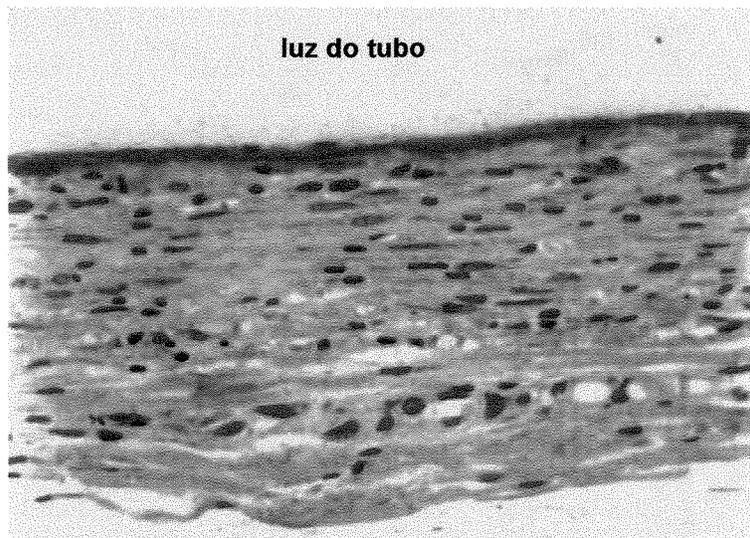


FIGURA 6 – Formação capsular sobre a parede externa do tubo aos 7 dias. Aumento: 400x.

Na porção interna de todos os tubos (experimental e controle), entre os poros do Fibrinol, notou-se um material homogêneo rosado, provavelmente um exsudato. Em contato com esse fluido, observou-se células inflamatórias e quantidades variadas de grânulos azuis, indicando a presença de células desintegradas – não viáveis (FIG. 7).

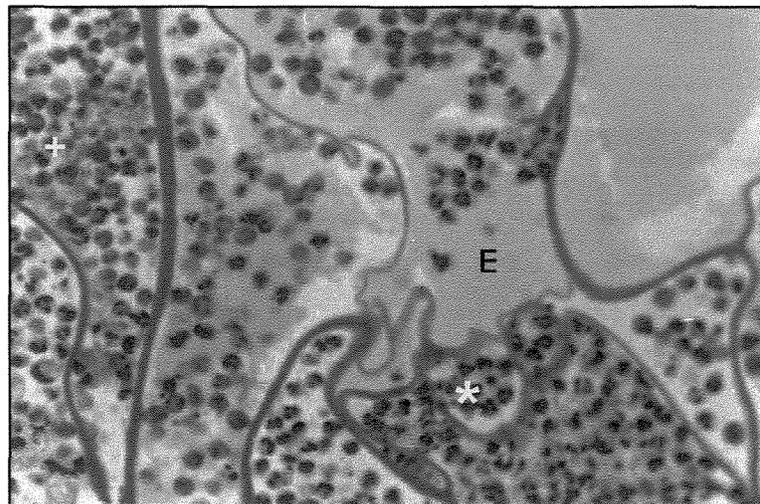


FIGURA 7 – (E) exsudato; * células inflamatórias; + células desintegradas

a) Período de observação – 4 dias

Neste período o Fibrinol encontrava-se presente na extremidade do tubo em todos os grupos, sendo assim foi feita uma única análise para os dois campos.

Controle (CO):

Observou-se a migração de elementos celulares para o interior da luz do tubo entre os poros da esponja de fibrina (PRANCHA 1).

Campo I e II – Em contato com o Fibrinol presente na extremidade do tubo, notou-se células inflamatórias mononucleares (linfócitos e alguns plasmócitos), predominância de leucócitos polimorfonucleares (neutrófilos) e células desintegradas (PRANCHA 2).

Eucaliptol (EU):

Como foi observado no grupo controle, houve também a proliferação de células para o interior do tubo entre os poros do Fibrinol (PRANCHA 1).

Campo I e II: Em contato com o Fibrinol observou-se um infiltrado inflamatório com predomínio de neutrófilos. O aspecto da região foi similar ao controle (PRANCHA 2).

Clorofórmio (CL):

Uma migração leucocitária intensa foi observada para o interior da luz do tubo (PRANCHA 1).

Campos I e II: O acúmulo de células polimorfonucleares nesta área foi maior, como também a desintegração celular, quando comparado ao CO, ao EU e ao OL (PRANCHA 2).

Óleo de Laranja (OL):

Observou-se a migração de elementos celulares para o interior do tubo, no entanto menor quando comparada ao CO, EU e CL (PRANCHA 1).

Campos I e II: Maior foi o número de células inflamatórias mononucleares (linfócitos e alguns plasmócitos) além de neutrófilos e células desintegradas o que difere este grupo dos anteriores (PRANCHA 2).

PRANCHA 1

4 dias (aumento 40X)

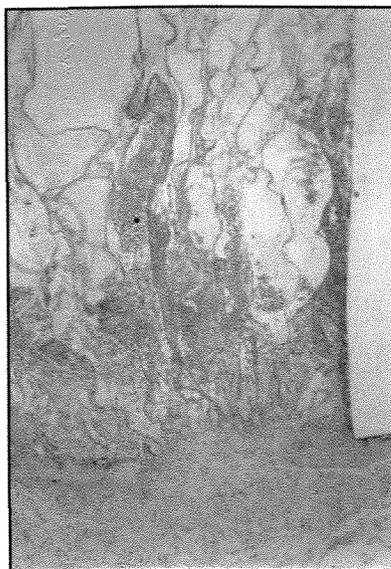


Figura 1.1 - Controle

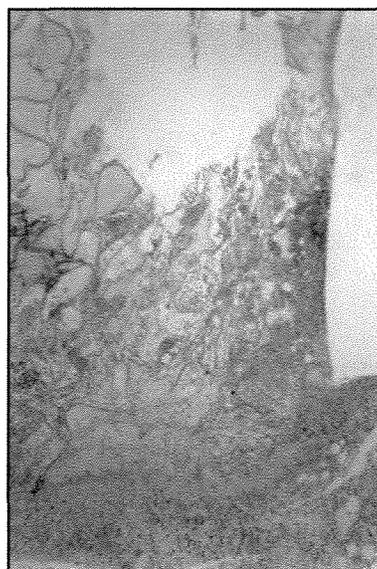


Figura 1.2 - Eucaliptol



Figura 1.3 - Clorofórmio

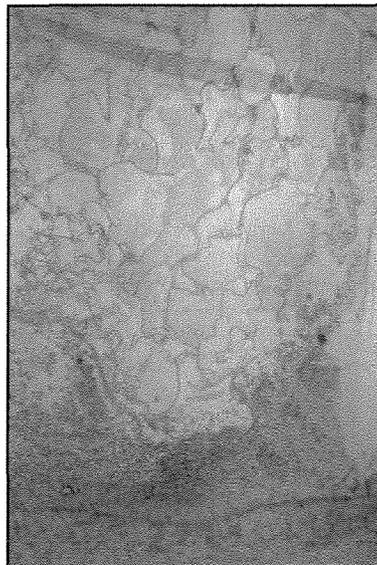


Figura 1.4 - Óleo de Laranja

PRANCHA 2

4 dias (aumento 400X)

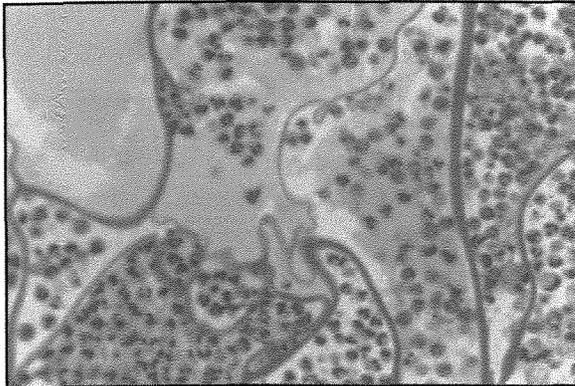


Figura 2.1- Controle

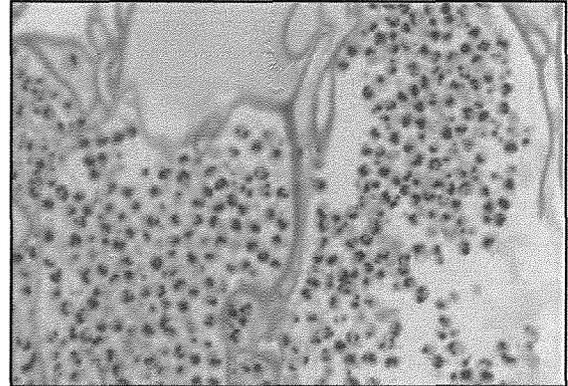


Figura 2.2 Eucaliptol

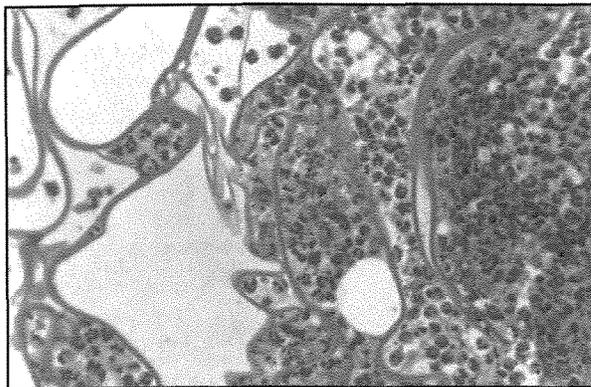


Figura 2.3- Clorofórmio

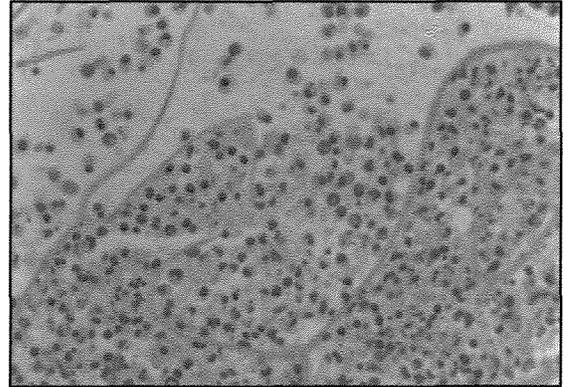


Figura 2.4 Óleo de Laranja

b) Período de observação – 7 dias

Controle (CO):

Observou-se o crescimento de tecido conjuntivo para o interior do tubo, com reabsorção do Fibrinol (PRANCHA 3).

Campo I: Em contato com o Fibrinol observaram-se células inflamatórias mononucleares, polimorfonucleares e exsudato, além de células desintegradas, no entanto, notou-se nesta região, proliferação de fibroblastos e presença de vasos sangüíneos hiperêmicos (PRANCHA 4).

Campo II: O tecido conjuntivo apresentou-se com células inflamatórias mononucleares (linfócitos, macrófagos), proliferação de fibroblastos e vasos neoformados caracterizando um tecido de granulação. Observou-se um início da formação de colágeno (PRANCHA 5).

Eucaliptol (EU):

Notou-se um crescimento menor do tecido de granulação para o interior do tubo quando comparado ao CO, sendo similar aos outros grupos (PRANCHA 3).

Campo I: Presença de células inflamatórias mononucleares (linfócitos, macrófagos, plasmócitos), leucócitos polimorfonucleares e células desintegradas.

Ausência de vasos sangüíneos e de crescimento de tecido de granulação nesta área o que foi diferente do CO. Presença de exsudato (PRANCHA 4).

Campo II: Permanece na extremidade do tubo, resíduos do Fibrinol demonstrando não haver a sua absorção como foi observada no grupo CO e OL. Encontrou-se ainda acúmulo de leucócitos polimorfonucleares (neutrófilos) nesta área, o que não foi observado no CO, EU ou OL. Foram observados poucos fibroblastos (PRANCHA 5).

Clorofórmio:

Em relação ao controle, o crescimento de tecido de granulação para o interior do tubo foi menor, porém, similar ao do EU e OL (PRANCHA 3).

Campo I: Em contato com o Fibrinol embebido nesta substância, observou-se células inflamatórias mononucleares (linfócitos, macrófagos) neutrófilos e células desintegradas em menor concentração quando comparado ao EU (PRANCHA 4).

Campo II: Nesta região notou-se ainda, a presença do Fibrinol e de neutrófilos entremeados por células inflamatórias mononucleares (predominantemente linfócitos e macrófagos). Observou-se maior número de fibroblastos em relação ao EU. O tecido mostrou-se menos organizado quando comparado ao CO e ao OL (PRANCHA 5).

Óleo de Laranja:

O crescimento de tecido de granulação para o interior do tubo foi menor em relação ao controle, apresentando-se similar aos outros grupos (PRANCHA 3).

Campo I: O Fibrinol encontrou-se isolado do tecido de granulação por uma camada com intenso acúmulo de leucócitos polimorfonucleares. Observou-se células inflamatórias mononucleares (linfócitos, macrófagos) e células desintegradas. Aspecto semelhante ao EU, embora fibroblastos estivessem presentes entre estas células (PRANCHA 4).

Campo II: Na extremidade do tubo observou-se um tecido de granulação semelhante ao encontrado no Controle, com células inflamatórias mononucleares (linfócitos e macrófagos) vasos sanguíneos dilatados, neoformados e proliferação de fibroblastos. Já se observa, como no CO, a formação incipiente de colágeno. Ao contrário do EU e CL, notou-se a ausência de neutrófilos e de resíduos do Fibrinol (PRANCHA 5).

PRANCHA 3

7 dias (aumento 40X)

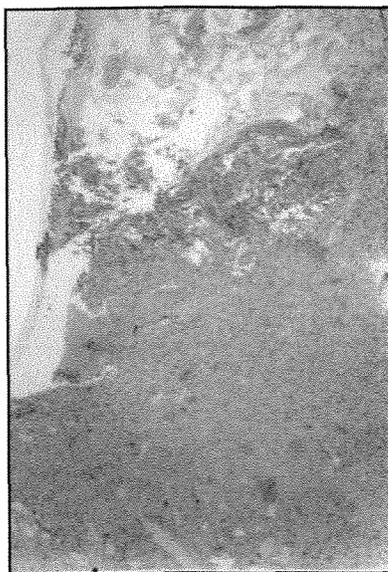


Figura 3.1- Controle

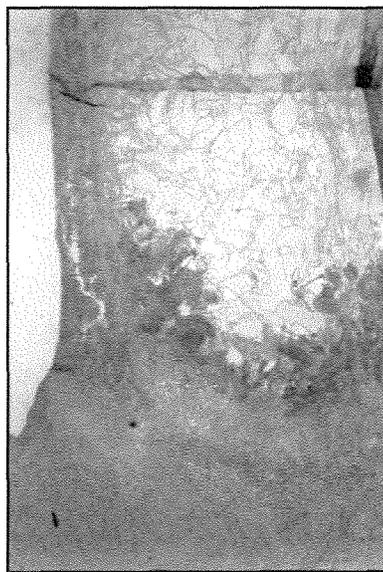


Figura 3.2- Eucaliptol

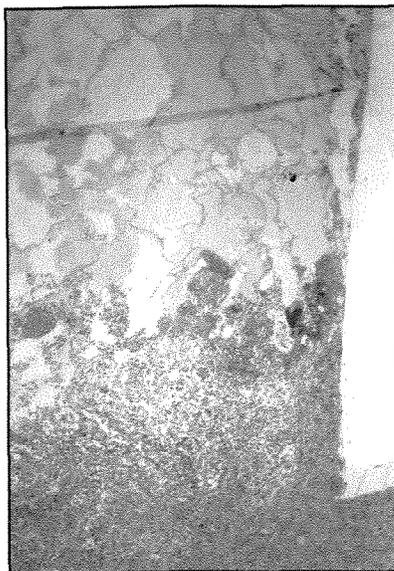


Figura 3.3- Clorofórmio

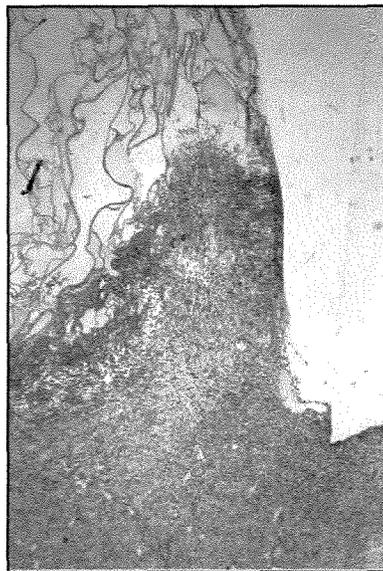


Figura 3.4- Óleo de Laranja

PRANCHA 4

7 dias – CAMPO I (aumento 400X)

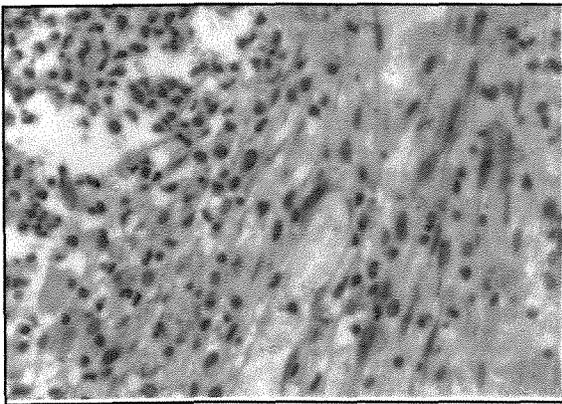


Figura 4.1- Controle

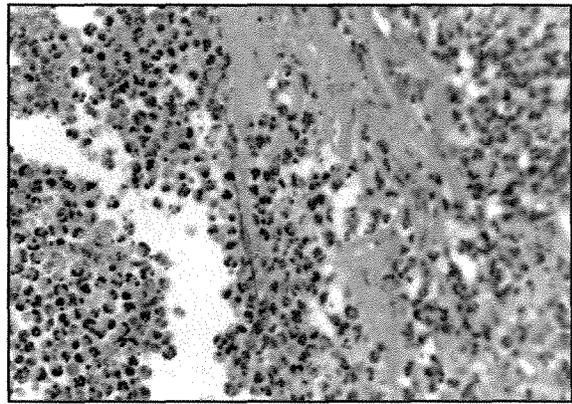


Figura 4.2-Eucaliptol

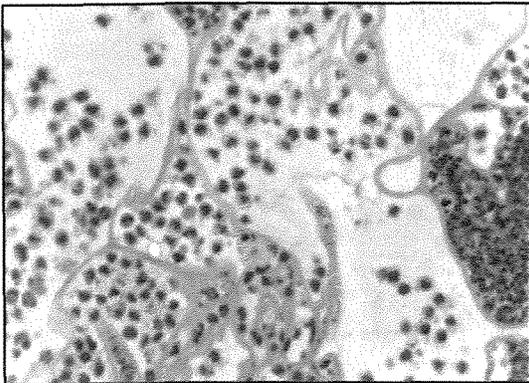


Figura 4.3- Clorofórmio

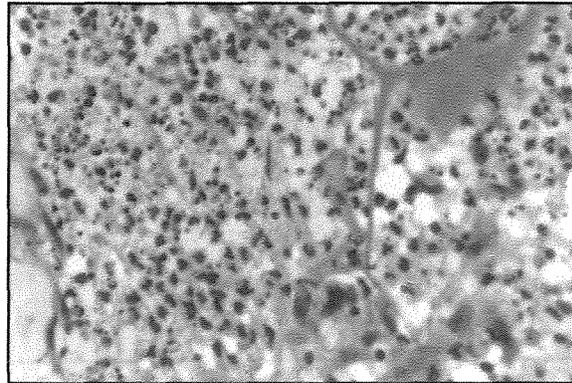


Figura 4.4- Óleo de Laranja

PRANCHA 5

7 dias – CAMPO II (aumento 400X)

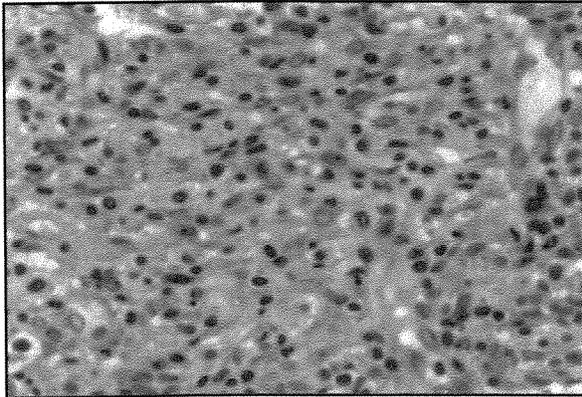


Figura 5.1- Controle

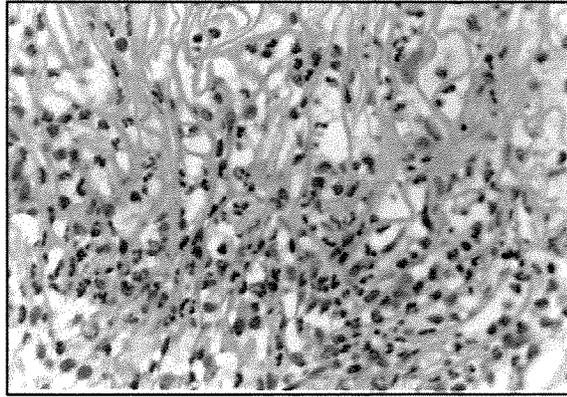


Figura 5.2- Eucaliptol

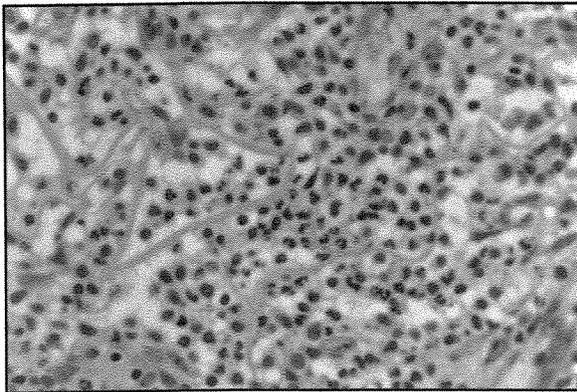


Figura 5.3- Clorofórmio

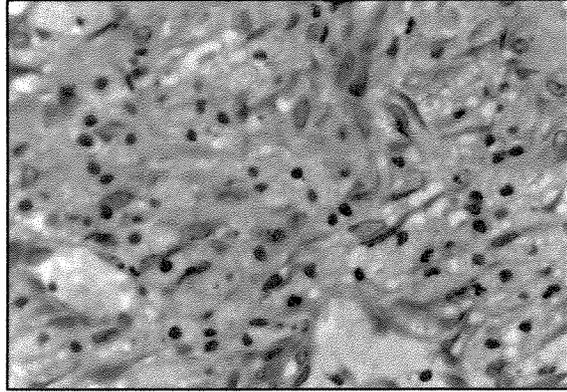


Figura 5.4- Óleo de Laranja

c) Período de observação – 11 dias

Controle (CO):

Neste período observou-se um maior crescimento de tecido de granulação para o interior da luz do tubo quando comparado aos intervalos de tempo anteriores (PRANCHA 6).

Campo I: Em contato com o Fibrinol observou-se a proliferação de tecido de granulação. Presença de fibroblastos e de vasos hiperêmicos, no entanto células inflamatórias mononucleares (linfócitos, macrófagos, plasmócitos) e alguns neutrófilos permaneceram na região (PRANCHA 7).

Campo II: O tecido de granulação apresentou-se ainda com um número razoável de células, porém menor do que aos 7 dias. Presença discreta de células inflamatórias mononucleares. Predomínio de fibroblastos e presença de vasos sangüíneos neoformados. Observou-se um aumento da fibrinogênese em relação ao CO de 7 dias (PRANCHA 8).

Eucaliptol (EU):

O crescimento do tecido de granulação para o interior do tubo foi menor em relação ao CO e ao CL, porém similar ao OL (PRANCHA 6).

Campo I: Em contato com o Fibrinol observou-se uma extensa área com

acúmulo de células inflamatórias e células desintegradas, semelhante ao CL. Entre esta área observou-se a migração de tecido de granulação (PRANCHA 7).

Campo II: Observou-se na extremidade do tubo um tecido de granulação rico em células inflamatórias mononucleares (linfócitos, macrófagos e alguns plasmócitos), fibroblastos e neoformação de vasos sanguíneos. Leucócitos polimorfonucleares (neutrófilos) ainda permaneciam em pontos localizados, além de resíduos da esponja. Notou-se neste grupo um atraso no desenvolvimento do tecido de granulação em relação ao CO, CL e OL (PRANCHA 8).

Clorofórmio (CL):

Neste período, comparado ao controle, o crescimento do tecido para o interior do tubo foi semelhante (PRANCHA 6).

Campo I: Em algumas áreas observou-se uma camada espessa formada por leucócitos polimorfonucleares e células inflamatórias mononucleares, numa maior concentração em relação ao CO e próxima dos outros grupos (PRANCHA 7).

Campo II: O desenvolvimento do tecido de granulação foi mais semelhante ao grupo CO e OL, no entanto alguns neutrófilos ainda permaneciam em pontos localizados (PRANCHA 8).

Óleo de Laranja (OL):

O crescimento do tecido de granulação para o interior do tubo é menor do

que no CO e no do CL, sendo similar ao EU (PRANCHA 6).

Campo I: Presença de uma camada discreta com concentração de células inflamatórias mononucleares (linfócitos, macrófagos, plasmócitos) neutrófilos e células desintegradas, semelhante ao CO e ao EU. Proliferação de tecido de granulação nesta área (PRANCHA 7).

Campo II: Observou-se um tecido formado predominantemente por fibroblastos e formação de feixes de colágeno mostrando um maior fibrosamento do tecido em relação aos outros grupos e uma diferença discreta comparado ao CO neste 11º dia (PRANCHA 8).

PRANCHA 6

11 dias (aumento 40X)

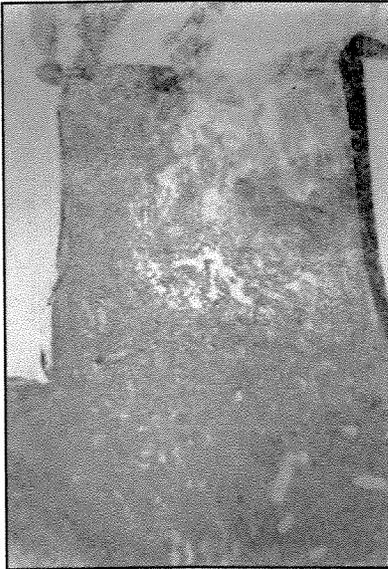


Figura 6.1- Controle

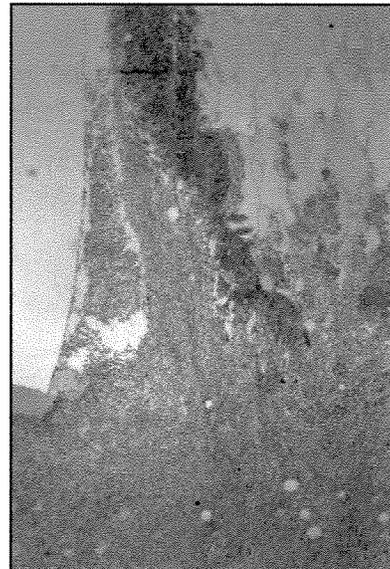


Figura 6.2- Eucaliptol



Figura 6.3- Clorofórmio

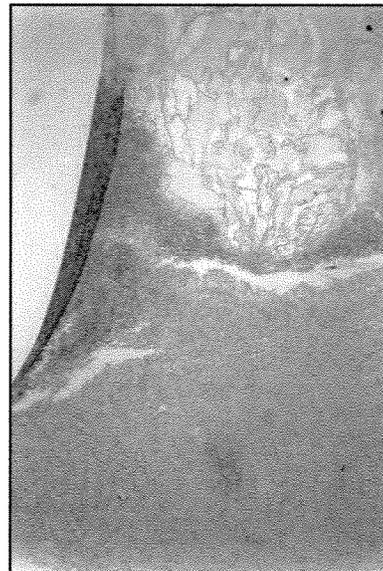


Figura 6.4- Óleo de Laranja

PRANCHA 7

11 dias – CAMPO I (aumento 400X)

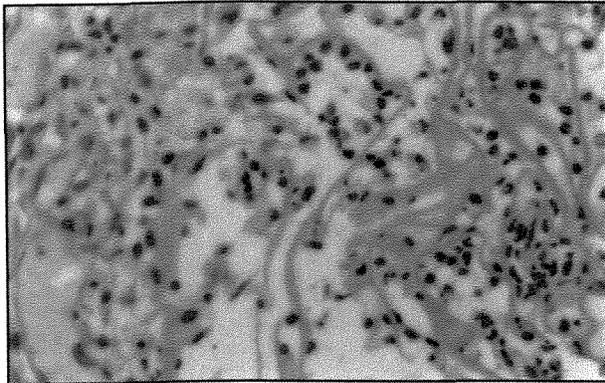


Figura 7.1- Controle

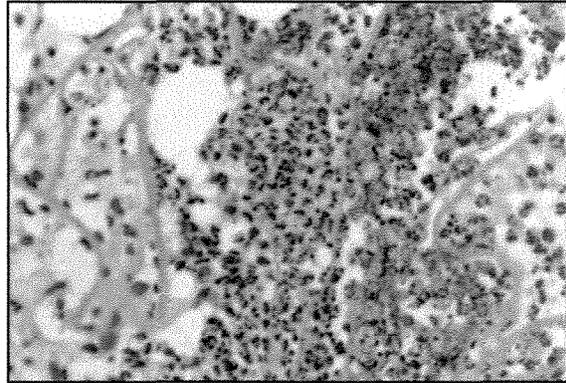


Figura 7.2- Eucaliptol

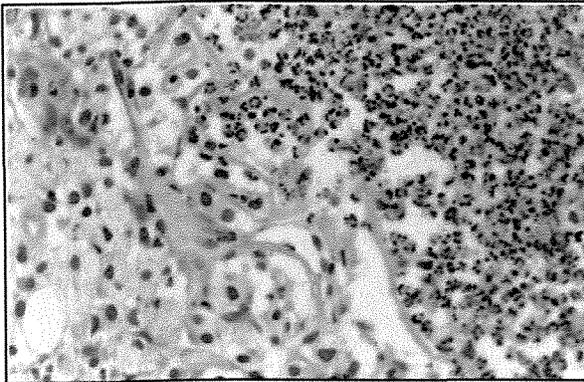


Figura 7.3- Clorofórmio

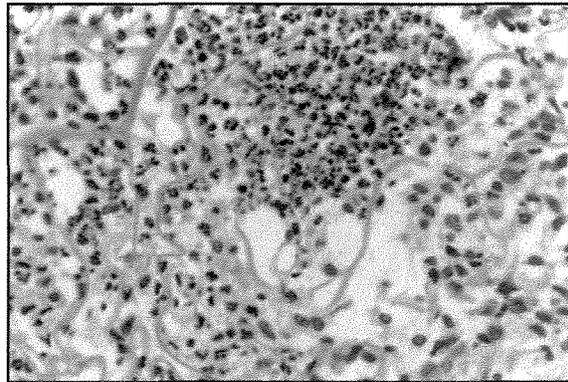


Figura 7.4- Óleo de Laranja

PRANCHA 8

11 dias – CAMPO II (aumento 400X)

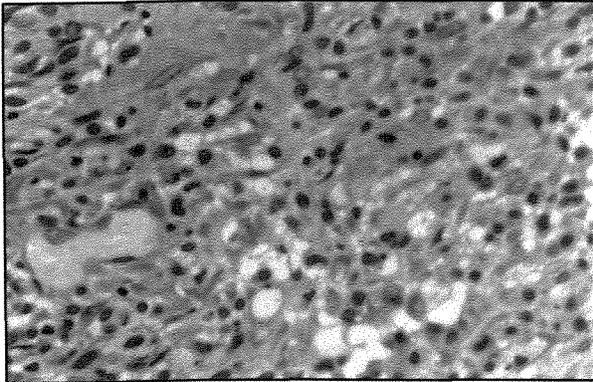


Figura 8.1- Controle

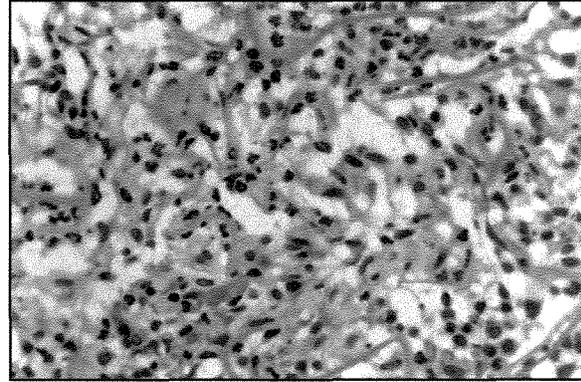


Figura 8.2-Eucaliptol

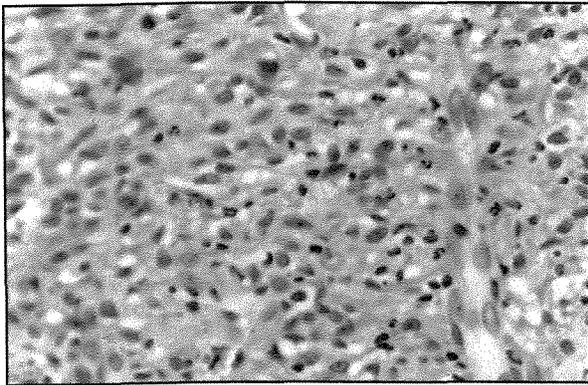


Figura 8.3- Clorofórmio

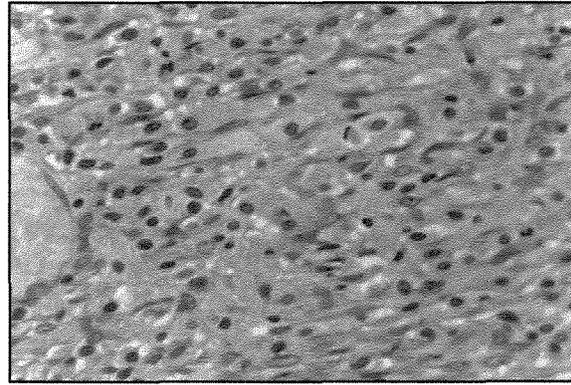


Figura 8.4- Óleo de Laranja

d) Período de observação – 15 dias

Controle (CO):

Apenas a área central do tubo não foi preenchida por tecido de granulação, permanecendo resíduos do Fibrinol (PRANCHA 9).

Campo I: Em contato direto com resíduos do Fibrinol, observou-se células inflamatórias mononucleares (linfócitos, macrófagos e plasmócitos), neutrófilos e células desintegradas com proliferação de fibroblastos entre os poros da esponja. Observou-se a presença de fibras colágenas. O tecido de granulação logo abaixo encontrou-se evoluído com bastante fibroblastos e vasos sanguíneos (PRANCHA 10).

Campo II: Observou-se uma redução no número de vasos e de fibroblastos enquanto a formação de colágeno foi mais acentuada em relação aos 11 dias, mostrando, no conjunto, tecido organizado e em processo de reparação (PRANCHA 11).

Eucalipto:

O crescimento de tecido para o interior do tubo é bem menor em relação ao controle e semelhante ao CL e OL (PRANCHA 9).

Campo I: Observou-se uma estreita camada de células inflamatórias mononucleares e polimorfonucleares, além de células não viáveis em contato com o

Fibrinol isolando-o do restante do tecido . Presença discreta de fibroblastos. Aspecto semelhante ao CL (PRANCHA 10).

Campo II: Notou-se ainda um tecido bastante celular com predomínio de fibroblastos porém, leucócitos polimorfonucleares (neutrófilos) ainda permaneceram em pontos localizados o que foi visto também no grupo do CL. Presença de vasos neoformados (PRANCHA 11).

Clorofórmio:

Menor foi o crescimento de tecido granulação para o interior do tubo quando comparado ao controle, sendo similar ao EU e OL (PRANCHA 9).

Campo I: Permanece um intenso acúmulo de células inflamatórias (mononucleares e polimorfonucleares) e de células desintegradas em contato com o Fibrinol (PRANCHA 10).

Campo II: O desenvolvimento do tecido de granulação foi semelhante ao grupo do EU , em relação ao número e tipo de células e a presença de vasos sanguíneos. Notou-se nestes dois grupos (EU, CL) um atraso no processo de reparação tecidual em relação ao CO e ao OL (PRANCHA 11).

Óleo de Laranja:

Menor crescimento de tecido para o interior do tubo em relação ao controle, sendo semelhante aos grupos do EU e CL como descrito anteriormente (PRANCHA 9).

Campo I: Em contato com o Fibrinol observou-se um acúmulo intenso de células inflamatórias mononucleares, neutrófilos e células desintegradas, porém entre os poros da esponja houve o crescimento de tecido de granulação com formação de feixes de colágeno similar ao CO (PRANCHA 10).

Campo II: O tecido de granulação apresentou-se ainda com um número razoável de células onde predominaram fibroblastos. Notou-se a formação de colágeno. O grau de reparo do tecido foi semelhante ao grupo CO e superior ao EU e CL (PRANCHA 11).

PRANCHA 9

15 dias (aumento 40X)

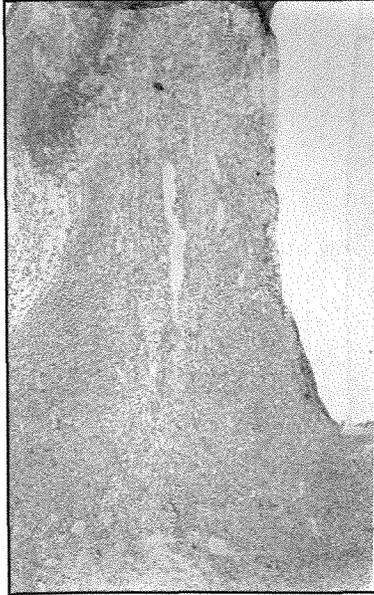


Figura 9.1- Controle

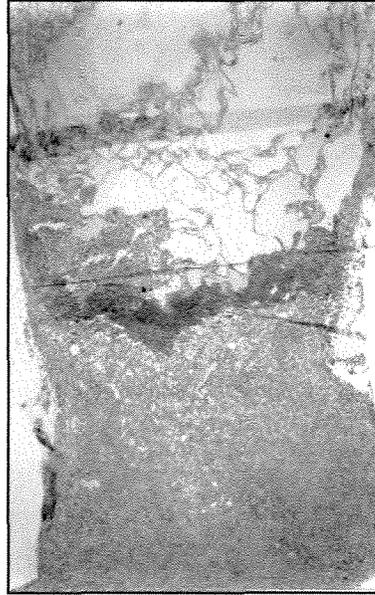


Figura 9.2- Eucaliptol

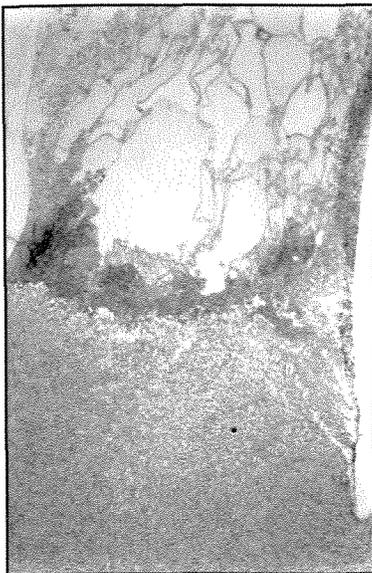


Figura 9.3- Clorofórmio



Figura 9.4- Óleo de Laranja

PRANCHA 10

15 dias – CAMPO I (aumento 400X)

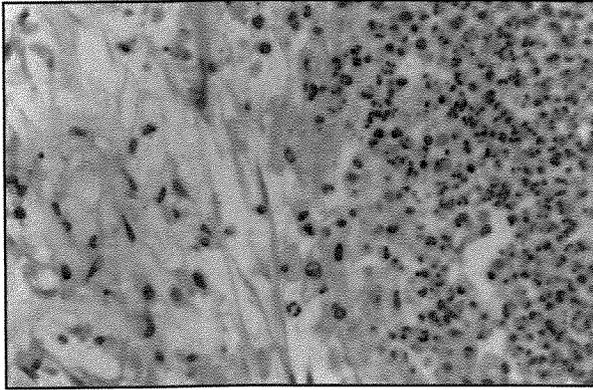


Figura 10.1- Controle

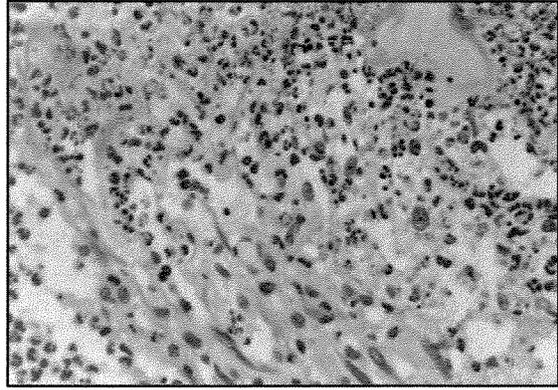


Figura 10.2-Eucaliptol

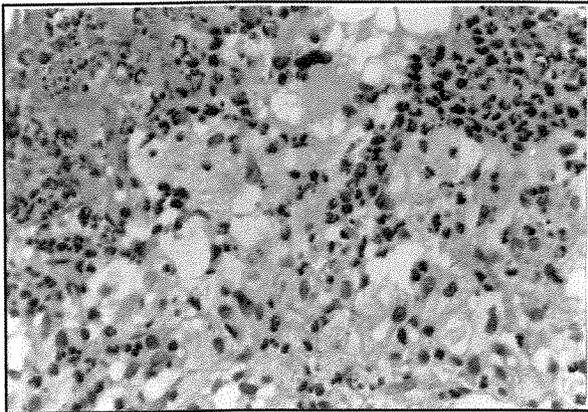


Figura 10.3- Clorofórmio

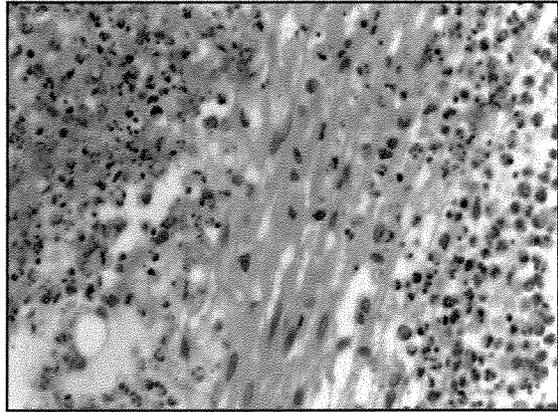


Figura 10.4- Óleo de Laranja

PRANCHA 11

15 dias – CAMPO II (aumento 400X)

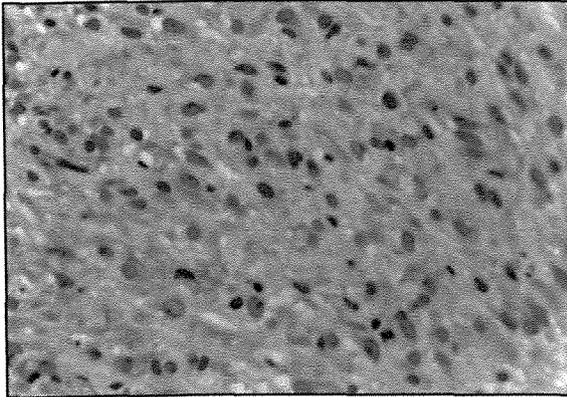


Figura 11.1- Controle

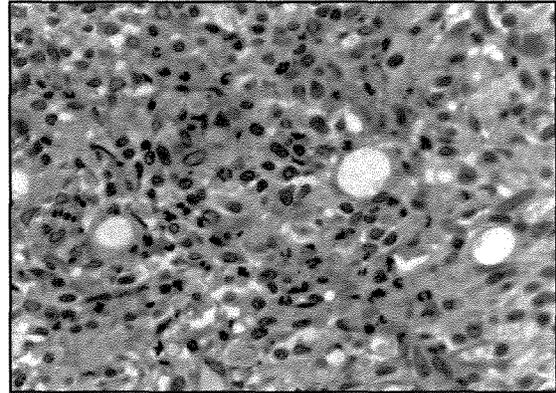


Figura 11.2- Eucaliptol

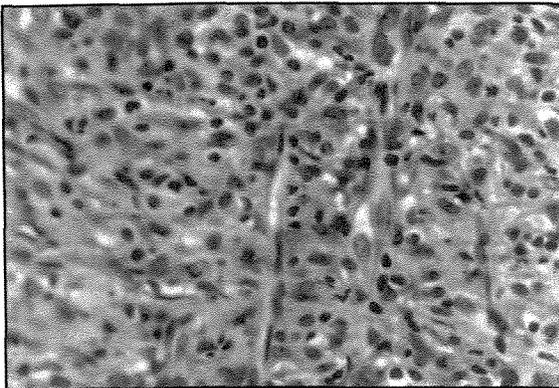


Figura 11.3- Clorofórmio

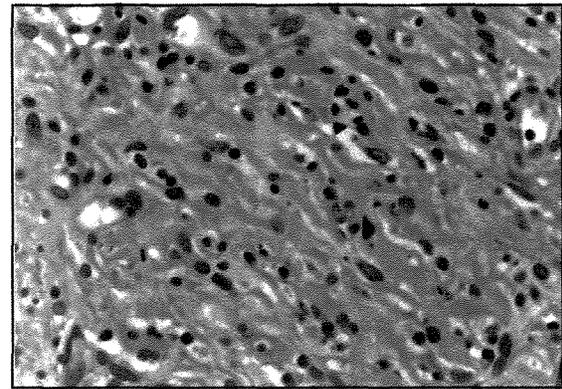


Figura 11.4- Óleo de Laranja

6. DISCUSSÃO

Durante o retratamento endodôntico são utilizadas diferentes substâncias químicas como auxiliares na remoção do material obturador. Atualmente, para a escolha correta de uma substância solvente é fundamental, além de sua efetividade, a apreciação de sua biocompatibilidade em respeito, particularmente, aos tecidos periapicais, objetivando alcançar os princípios que sustentam as bases biológicas.

Embora a ação desta substância deva restringir-se ao espaço do sistema de canais radiculares, ela atinge os tecidos vivos periapicais quando extravasa através do forame apical (JOHNSON & BEATTY, 1988; ANTONIAZZI & COSTA, 1992; WALTON & TORABINEJAD, 1997). Sendo assim, acreditamos ser necessário conhecer o seu potencial inflamatório, apesar de CHUTICH (1998) afirmar que o volume de solvente extravasado além do forame apical durante a remoção do material obturador, representa um risco desprezível para o paciente. No entanto, neste estudo o autor utilizou dentes unirradiculares com ápices completamente formados, recentemente obturados e com guta-percha bem condensada. Na prática clínica, o dente com indicação de retratamento normalmente apresenta uma obturação insatisfatória, reabsorção externa na região apical e falhas no selamento apical, podendo ainda ser multirradicular, condições estas que predisõem maior exposição do solvente no tecido periapical do que o apresentado nesse estudo.

A análise microscópica do tecido é o melhor método de controle científico para avaliar a biocompatibilidade de um material, quanto às alterações vasculares e a intensidade do processo inflamatório causado por determinado agente agressor (GUTTUSO, 1963). Além destes fatores consideramos ainda o desenvolvimento do tecido de granulação, bem como a evolução do processo de reparação tecidual.

Com este objetivo, a ADA (1972) recomenda a implantação de tubos, no tecido subcutâneo de animais, contendo as substâncias-teste. TORNECK (1961, 1966) foi o primeiro a descrever o modelo experimental utilizado no presente estudo.

Segundo MAKKES et al. (1977), os tubos confeccionados em polietileno são quimicamente estáveis no organismo e não são influenciados por medicamentos ou outras substâncias colocadas no seu interior. Provocam pequena ou nenhuma reação no tecido ao seu redor, o que foi observado neste estudo, tanto no grupo controle quanto no experimental. Uma cápsula de tecido fibroso, livre de células inflamatórias, formou-se ao redor do tubo. É importante salientar que esta formação capsular livre de células inflamatórias, é um elemento de defesa que buscou limitar e isolar a fonte de agressão física, representada pelo tubo de polietileno. A característica do tecido fibroso formado, ao redor do tubo, demonstrou o comportamento inerte do material no tecido subcutâneo do rato. Este aspecto histológico foi também observado por vários autores (TORNECK, 1961,1966; PHILIPPS, 1967; MAKKES et al., 1977; OLSSON, (1981); COSTA JÚNIOR 1997).

Para a avaliação da biocompatibilidade de materiais odontológicos devem ser simuladas, sempre que possível, as condições de uso clínico do material (SPANGBERG, 1973).

Neste estudo, a colocação do solvente no interior de tubos de polietileno, procura fazer analogia com o canal radicular, simulando uma situação clínica. Neste sentido, acreditamos ter obtido resultados confiáveis, pois sendo os tubos de mesmo diâmetro, permitiu-nos a padronização da área de contato entre o tecido e o material.

Uma das vantagens deste modelo experimental em relação aos testes realizados diretamente em canais radiculares *in vivo*, é o fato do final aberto do tubo

(forame apical) e do seu comprimento (comprimento do canal radicular) serem padronizados, pois, conforme TORNECK (1966) relatou, diferentes comprimentos e diâmetros dos tubos têm influência no crescimento do tecido conjuntivo para o interior da luz do tubo. Diante dos resultados obtidos por este autor, utilizamos tubos com dimensões que possibilitassem o crescimento do tecido para o seu interior, a fim de que houvesse o contato deste com a esponja embebida no solvente, e pudéssemos avaliar os efeitos desta substância no tecido conjuntivo.

É de conhecimento clássico de que o processo inflamatório, decorrente da agressão tecidual, inicia-se por uma fase aguda caracterizada por uma reação vascular e consequente fenômenos exsudativos, sob a mediação de inúmeras substâncias biologicamente ativas. Esta fase revela um quadro dominado por hiperemia, edema, formação de redes de fibrina e infiltração de leucócitos polimorfonucleares.

O quadro inflamatório desenvolve-se em tempo que depende da ação agressora e da capacidade reacional do organismo, evoluindo para uma inflamação crônico-reparativa caracterizada pelo predomínio das células mononucleares e dos fenômenos proliferativos de células e vasos sanguíneos, na tentativa de reparar os tecidos lesados.

Tem sido demonstrado que a irritação produzida por trauma e/ou por drogas, durante a terapia endodôntica, desencadeia um processo inflamatório que resulta em vários graus de desconforto para o paciente, podendo ainda retardar ou mesmo impedir o processo de reparação tecidual (RAPPAPORT et al., 1964; ANTONIAZZI & COSTA, 1992; MITTAL & CHANDRA, 1996; WALTON & TORABINEJAD, 1997).

Neste trabalho, no período inicial de observação (4 dias), a predominância dos fenômenos exsudativos-vasculares foi evidente, notando-se a presença de exsudato e migração de células polimorfonucleares para o interior do tubo de polietileno, entre os poros da esponja. Embora tendo acontecido para todos os grupos, notou-se que, para o clorofórmio, a presença de regiões com exsudato (espaços negativos nos cortes histológicos), e a maior concentração de polimorfonucleares, demonstrou uma reação inflamatória aguda mais intensa (PRANCHA 1- FIG. 1.3), sugerindo ser esta uma substância mais agressiva neste 4º dia quando comparada aos outros grupos.

De acordo com COTRAN et al. (1991); TROWBRIDGE & EMLING (1996), as alterações no fluxo sangüíneo e no calibre vascular ocorrem no início do processo inflamatório e desenvolvem-se na dependência da gravidade da agressão. Sugere-se portanto, que o clorofórmio é mais agressivo neste período, o que vai ao encontro dos estudos que avaliaram a biocompatibilidade do clorofórmio (MORSE et al., 1981) e da cloropercha (RAPPAPORT et al., 1964; SPANGBERG & LANGELAND, 1973; MORSE et al., 1984; PASCON & SPANGBERG, 1990; PASCON et al., 1991; BARBOSA et al., 1994).

Apesar de utilizarem diferentes metodologias e tempos de observação, os autores anteriormente citados afirmam que inicialmente o clorofórmio é altamente tóxico e após a sua volatilização a resposta no tecido é suave. Resultados contraditórios foram obtidos por OLSSON et al. (1981) utilizando a cloropercha no interior de tubos de teflon. Uma resposta severa variou amplamente dentro de cada grupo, nos períodos observados (14, 30, 90 e 180 dias). Provavelmente esta reação num período inicial de 14 dias (tempo longo em relação aos outros estudos), não tenha ocorrido pela presença do clorofórmio, mas pela liberação de íons de zinco

componente da guta-percha, como concluíram ORSTAVIK & MIJÖR, 1988; PASCON & SPANGBERG, 1990; PASCON et al., 1991. Ainda não foi possível detectar o ritmo e a forma de como o clorofórmio é volatilizado nos tecidos, mas é razoável acreditar que seja lento, pois ao final de 15 dias, observamos no Campo II - extremidade do tubo - (PRANCHA 11- FIG. 11.3) a persistência de células inflamatórias mononucleares (linfócitos, macrófagos) e alguns neutrófilos, indicando ainda a presença de fator irritante no local.

O crescimento de tecido de granulação para o interior dos tubo foi observado a partir do 7º dia e evoluiu até o final do experimento, para todos os grupos; porém, maior evolução deste tecido foi apresentada pelo grupo controle. A evolução no crescimento do tecido de granulação pode ser visualizada nas PRANCHAS 1, 3, 6 e 9.

SOUZA FILHO et al. (1996) com resultados obtidos diretamente de canais radiculares, observaram que a ausência de fatores irritantes no interior dos canais permitiu o crescimento de tecido de granulação para o seu interior. O mesmo foi observado por COSTA JÚNIOR (1997). Pode-se sugerir então, que os solventes testados atuam como irritantes, não impedindo, mas ao menos inibindo o crescimento do tecido para o interior do tubo.

No Campo I, região de contato direto do tecido com a esponja, observamos, em todos os tempos analisados, um tecido desorganizado com presença de material homogêneo rosado, provavelmente um fluído, células inflamatórias (neutrófilos, linfócitos e macrófagos) e quantidades variadas de grânulos azuis indicando a desintegração de elementos celulares (FIG.7). TORNECK (1966) e PHILLIPS (1967), após sessenta dias de implantação dos tubos, descreveram estas mesmas características. O primeiro afirmou que este fato ocorreu como resultado do

procedimento cirúrgico inicial, onde a estagnação de fluídos no interior do implante atuaria como irritante local, enquanto o segundo apontou que este fato aconteceu devido à perda de nutrição das células nesta área. Portanto, não podemos afirmar que a presença deste quadro seja uma consequência do Fibrinol, já que nos trabalhos dos autores citados, os tubos foram implantados vazios.

Sabe-se que a presença física de um material em contato com um tecido tem a propriedade de agredí-lo fisicamente, suscitando uma resposta inflamatória. Com base nisto, poderíamos relacionar que a reação provocada pelo contato da esponja com o tecido, teria sido causada pela presença física da esponja, o que foi inevitável neste estudo, já que precisávamos de um veículo para a retenção do solvente.

A escolha pela esponja de fibrina, com este objetivo, baseou-se no trabalho de OKAMOTO et al. (1994) onde foi demonstrado que a esponja é completamente absorvível após 9 dias de implantação, em alvéolo de ratos após exodontia, diminuindo o aparecimento de reação do tipo corpo estranho, responsável pela inflamação crônica.

Observamos que no centro dos tubos-controle, até o período final de observação houve a presença ainda, de resíduos da esponja e de uma reação inflamatória discreta em relação aos outros grupos (PRANCHA 9 - FIG. 9.1). Deve-se considerar que o Fibrinol está presente na porção central de um tubo onde o reduzido suprimento sangüíneo da área provavelmente impediu a sua total absorção.

A partir do 7º dia para os grupos CO e OL (PRANCHA 4 - FIG.4.1 e 4.4) e a partir do 11º para o EU e CL (PRANCHA 7 - FIG. 7.3 e 7.4) notou-se no Campo I, a proliferação de fibroblastos e vasos sangüíneos entremeando células inflamatórias mononucleares e polimorfonucleares, indicando um início de organização do tecido

da região. Notou-se portanto, que para o EU e o CL, esta reação aconteceu mais tarde, sugerindo um poder de irritação maior destes solventes.

Aos 15 dias, o desenvolvimento deste tecido foi ainda discreto para o EU e CL, enquanto que para o CO e OL feixes de fibras colágenas foram observadas na região, demonstrando uma tendência ao reparo na área de contato com a esponja (PRANCHA 10).

No campo II (extremidade do tubo) para o CL até os 7 dias (PRANCHA 5 – FIG. 5.3) e para o EU até os 11 dias (PRANCHA 8 – FIG. 8.2), notou-se ainda a presença de resíduos do Fibrinol e de leucócitos polimorfonucleares, demonstrando a persistência de substância irritante no local. Este fato sugere que estas substâncias se difundem pelo tecido, à medida que se distanciam do ponto de origem (contato com a esponja), impedindo a absorção do material.

O exame histológico mostrou que para dois grupos, CO e OL, a evolução do tecido de granulação foi semelhante, e seguiu a sequência normal de um processo de reparação tecidual, sendo que aos 7 dias já se observou o início da formação de colágeno (PRANCHA 5 - FIG. 5.1 e 5.4), e aos 15 dias, a presença de fibras colágenas em maior quantidade (PRANCHA 11 - FIG. 11.1 e 11.4), revelando um estágio de reparação tecidual já avançado, o que está de acordo com os estudos de VIZIOLI (1971, 1973).

O processo de reparação tecidual progrediu para todos os grupos, embora possa ser observado que para o EU e CL a organização ocorreu de maneira mais lenta. Para o 7º e 11º dia de evolução do tecido de granulação, os dois grupos experimentais acima citados, comparados ao CO e OL, mostraram atraso no processo de reparação tecidual. Este quadro permaneceu até o último dia de observação, o que permite afirmar que o contato do tecido com estes solventes

interferiu retardando, mas não impedindo, o reparo. É possível que a combinação dos efeitos tóxicos do material e suas propriedades físicas, como a capacidade de difusão e solubilidade nos fluídos teciduais tenha interferido neste processo. Estas substâncias parecem sofrer difusão pelo tecido e diluição lenta pelos fluídos, atingindo os tecidos subjacentes numa concentração suficiente para manter a reação inflamatória.

De acordo com COTRAN et al. (1991) a proliferação de fibroblastos contribui para o processo de cura da lesão, sendo as células mais importantes neste processo, devido a sua capacidade de produzir fibras colágenas e matriz extracelular. Segundo TROWBRIDGE (1990) os fibroblastos “aguardam” um meio favorável para a proliferação e isto é possível à medida que o agente agressor é eliminado, o que não aconteceu para o EU e CL aos 15 dias.

TROWBRIDGE & EMLING (1996) afirmam que os fibroblastos não funcionam bem se há presença de produtos tóxicos, o que pode interferir no processo atuando na velocidade de síntese de colágeno. É possível que o EU e o CL sejam capazes de alterar a biossíntese do tecido de granulação retardando ou alterando o metabolismo do colágeno (HEUGHAN & HUNT, 1975).

A ausência de investigações sobre biocompatibilidade dos solventes usando esta metodologia, inviabiliza o confronto entre as observações. Mesmo assim, é oportuno destacar trabalhos de outros autores.

MORSE et al. (1981) ao injetarem eucaliptol e clorofórmio no tecido subcutâneo de ratos, observaram através de cortes histológicos, um efeito local suave após 6 horas, enquanto no nosso estudo a reação inflamatória foi intensa nos primeiros 4 dias de observação.

Já GROSSMANN & EDWARD (1982), ao injetarem 0,05 ml de eucaliptol e óleo de laranja na região dorsal de coelhos, observaram após 7 dias, uma reação inflamatória severa com perda de estrutura celular e necrose dos tecidos. Os mesmos resultados foram encontrados por DAMBRÓS (1999).

Acreditamos que a região de contato entre o tecido e o solvente, além do volume da substância utilizado no nosso estudo, são alguns fatores que podem estabelecer condições totalmente diferentes daquelas em que a solução é injetada na intimidade dos tecidos. Possivelmente o potencial agressivo da substância é maior nesses casos, pois de acordo com TORNECK (1961), dentre outros fatores, a quantidade ou volume da droga utilizada, a forma como a droga é levada, a região de contato com o tecido e o tempo de contato, podem estabelecer diferentes graus nas reações teciduais.

O trabalho conduzido por PASSOLD & TEIXEIRA (1999), que avaliaram a biocompatibilidade dos solventes através da exsudação de corantes vitais, nas primeiras horas do processo inflamatório, demonstrou que o eucaliptol provocou maior reação inflamatória quando comparado ao óleo de laranja. Ainda que consideremos a diferença de metodologia e a subjetividade das nossas análises, julgamos que nossos resultados concordam com os desses autores, discordando de FRIEDMAN et al. (1990) e ZAKARIASEN et al. (1990) que afirmam ser o eucaliptol o solvente menos irritante aos tecidos.

Observamos que todos os solventes avaliados são irritantes aos tecidos vivos; no entanto o óleo de laranja demonstrou não interferir no processo de reparação tecidual, enquanto o eucaliptol e o clorofórmio provocaram um retardo para a cura dos tecidos. Concordamos com DAMBRÓS (1999) ao afirmar que os tecidos que receberam inoculação de óleo de laranja demonstraram uma tendência

mais rápida ao reparo, quando comparado ao eucaliptol. Observamos ainda que, comparado ao controle, este óleo demonstrou, subjetivamente, uma aceleração no processo de reparo.

Estudos demonstram que o d'limoneno, principal constituinte do óleo de laranja, quando administrado através da dieta, é capaz de prevenir carcinoma mamário induzido em ratos (ELEGBEDE, 1986), inibir a formação de adenoma pulmonar (WATTENBERG & COCCIA, 1991) e estomacal (WATTENBERG et al., 1995) agindo por mecanismos múltiplos na quimioprevenção e quimioterapia de câncer (CROWELL, 1999). Baseado nesta característica, sugerimos que estudos neste sentido sejam realizados objetivando testar a capacidade de regeneração do óleo de laranja em áreas de lesão tecidual.

Considerando que o clorofórmio apresenta um potencial carcinogênico e que o eucaliptol, além de ser o mais lento na remoção do material obturador, provoca uma reação inflamatória capaz de retardar o processo de reparação tecidual, acreditamos que o óleo de laranja possa ser a alternativa mais adequada para a desintegração do material obturador durante o retratamento endodôntico.

7. CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos e discutidos, dentro das condições experimentais desta pesquisa, pode-se concluir que:

- O óleo de laranja mostrou ser o menos irritante aos tecidos vivos e pareceu não interferir na cronologia do processo de reparação tecidual;
- O eucaliptol e o clorofórmio demonstraram ser os solventes mais irritantes aos tecidos e causaram um retardo no desenvolvimento do tecido de granulação e no processo de reparação tecidual. Subjetivamente, não houve diferença entre eles.

Sendo assim, acreditamos que o óleo de laranja possa ser a alternativa mais adequada para a desintegração do material obturador durante o retratamento endodôntico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

1. AMERICAN DENTAL ASSOCIATION. Recommended standard practices for biological evaluation of dental materials. *J Am Dent Assoc*, Chicago, v.84, n.2, p.382-387, Feb. 1972.
2. ANTONIAZZI, J.H., COSTA, W.F. Retratamento dos canais radiculares. *In*: BOTTINO, M.A., FELLER, C. (Coord.) **Atualização na clínica odontológica**: o dia-a-dia do clínico geral. Rio de Janeiro: Artes Médicas, 1992. p.123-142.
3. AUTIAN, J. General toxicity and screening test for dental materials. *In*: SESIÓN ANUAL DE LA FÉDÉRATION DENTAIRE INTERNATIONALE, 61, 1973, Sydney. **Memorias...** Sydney, 1973. p.235-249.
4. BARBOSA, S.V. *et al.* Cytotoxic effects of gutta-percha solvents. *J Endod*, Baltimore, v.20, n.1, p.6-8, Jan. 1994.
5. BHAT, K.S., WALVEKAR, S. Response of subcutaneous connective tissue to materials and drugs: a simplified technique. *J Endod*, Baltimore, v.1, n.6, p.202-204, June 1975.
6. BRUNETON, J. **Elementos de fitoquímica y de farmacognosia**. Zaragoza : Acribia, 1991.
7. BUENO, C.E.S., VALDRIGHI, L. Efetividade de solventes e de técnicas na desobturação dos canais radiculares : estudo "in vitro". *Rev ABO Nac*, São Paulo, v.8, n.1, p.21-25, 2000.

*De acordo com a NBR-6023 de 1989, da Associação Brasileira de Normas Técnicas(ABNT). Abreviaturas de periódicos de conformidade com a Base de Dados MEDLINE.

8. CHUTICH, M.J. *et al.* Risk assessment of the toxicity of solvents of gutta-percha used in endodontic retreatment. **J Endod**, Baltimore, v.24, n.4, p.213-216, Apr. 1998.
9. COSTA JR., E.D. **Reação do tecido conjuntivo subcutâneo do rato ao ácido lipotécóico de *Streptococcus faecalis***. Piracicaba, 1997. Dissertação (Mestrado em Clínica Odontológica) - Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade de Campinas.
10. COTRAN, R.S., KUMAR, V., ROBBINS, S.L. **Robbins** : patologia estrutural e funcional. 5.ed. Guanabara Koogan : Rio de Janeiro, 1996. Cap.3, p.45-83.
11. CROWELL, P.L. Prevention and therapy of cancer by dietary monoterpenes. **J Nutr**, Bethesda, v.129, n.3, p.775S-778S, 1999.
12. DAMBRÓS, M. **Avaliação comparativa do potencial irritativo dos solventes** : óleo essencial de laranja e eucaliptol, em tecidos moles. Itajaí, 1999. Monografia (Especialização em Endodontia) - Centro de Ciências da Saúde, Universidade do Vale do Itajaí.
13. DEWICK, P.M. **Medicinal naturals products** : a biosynthetic approach. Chichester : Willy & Sons, 1997.
14. ELEGBEDE, J.A. Mouse skin tumor promoting activity of orange peel oil and d-limonene: a re-evaluation. **Carcinogenesis**, Oxford, v.7, n.12, p.2047-2049, Dec. 1986.
15. FAHEY, T. J. et al. Diabetes impairs the late inflammatory response to wound healing. **Journal of Surgical Research**, v. 50, n. 4, Apr. 1991.

16. FRIEDMAN, S. *et al.* Endodontic retreatment - Case selection and technique. Part 3. Retreatment techniques. **J Endod**, Baltimore, v.16, n.11, p.543-549, Nov. 1990.
17. FRIEND, L.A., BROWNE, R.M. Tissue reactions to some root filling materials. **Br Dent J**, London, v.125, n.7, p.291-298, Oct. 1968.
18. GOMES FILHO, J.E. **Estudo do método de utilização do glicol metacrilato como material de inclusão de implantes subcutâneos em ratos.** Piracicaba, 1999. 102p. Dissertação (Mestrado em Endodontia) – Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas.
19. GÖRDÜYSUS, M.O. *et al.* Solubilizing efficiency of different gutta-percha solvents: a comparative study. **J Nihon Univ Sch Dent**, Tokyo, v.39, n.3, p.133-135, Sept. 1997.
20. GROSSMANN, L.I., EDWARD, T.L. Assessment of irritation potential of essential oils for root canal cement. **J Endod**, Baltimore, v.8, n.5, p.208-212, May 1982.
21. GUTTUSO, J. Histopathologic study of rat connective tissue response to endodontic materials. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**, Saint Louis, v.16, n.6, p.713-727, June 1963.
22. IMURA, N., ZUOLO, M.L. **Endodontia para o clínico geral.** São Paulo: Artes Médicas, 1998.
23. JOHNSON, W.B., BEATTY, R.G. Clinical technique for removal of root canal obstructions. **J Am Dent Assoc**, Chicago, v.117, n.3, p.473-476, Sept. 1988.

24. JUNQUEIRA, C.L., CARNEIRO, J. *Histologia básica*. 9.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. 427p.
25. KALLUS, T., EKLUND, G. Instrumentation for preparation and placement of subcutaneous implants. *J Biomed Mat Res*, New York, v.17, n.5, p.735-740, Sept. 1983.
26. KAPLOWITZ, G.J. Evaluation of the ability of essential oils to dissolve gutta-percha. *J Endod*, Baltimore, v.17, n.9, p.448-449, Sept. 1991.
27. LAVABRE, M. *Aromaterapia: a cura pelos óleos essenciais*. Rio de Janeiro : Record, 1992. 95p.
28. MACDONALD, M.N., VIRE, D.E. Chloroform in the endodontic operatory. *J Endod*, Baltimore, v.18, n.6, p.301-303, June 1992.
29. MAKKES, P.C. *et al.* Polyethylene tubes as a model for the root canal. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*, Saint Louis, v.44, n.2, p.293-300, Aug. 1977.
30. MARGELOS, J. *et al.* Verter clorofórmio en guta-percha y evaluar su concentración en el aire. *J Endod*, Baltimore, v.3, n.1, p.73-77, 1997.
31. MITTAL, M., CHANDRA, S. Evaluación de cuatro selladores endodónticos para comparar su toxicidad en los tejidos. *J Endod*, Baltimore, v.2, n.2, p.17-21, 1996.
32. MORSE, D.R. *et al.* A comparative tissue toxicity evaluation of guta-percha root canal sealers. Part I. six hour findings. *J Endod*, Baltimore, v.10, n.6, p.246-249, Oct. 1984.

33. _____. *et al.* A comparative tissue toxicity evaluation of the liquid components of gutta-percha root canal sealers. **J Endod**, Baltimore, v.7, n.12, p.545-550, Dec. 1981.
34. OKAMOTO, T. *et al.* Implante de esponja de fibrina em alvéolos dentais. **Rev Gaucha Odontol**, Porto Alegre, v.42, n.1, p.37-43, jan./fev. 1994.
35. OLSSON, B., SLIWKOWSKI, A., LANGELAND, K. Subcutaneous implantation for the biological evaluation of endodontic materials. **J Endod**, Baltimore, v.7, n.8, p.355-369, Aug. 1981.
36. ORSTAVIK, K.D., MIJÖR, I.A. Histopathology and x-ray microanalyses of the subcutaneous tissue response to endodontic sealers. **J Endod**, Baltimore, v.14, n.1, p.13-23, Jan. 1988.
37. PAIVA, J.G., ANTONIAZZI, J.H. **Bases para a prática clínica**. 2.ed. São Paulo : Artes Médicas, 1988. 651p.
38. PASCON, E.A., SPANGBERG, L.S.W. In vitro cytotoxicity of root canal filling materials : 1 Gutta-percha. **J Endod**, Baltimore, v.16, n.9, p.429-433, Sept. 1990.
39. _____ *et al.* Tissue reaction to endodontic materials: methods, criteria, assesment and observations. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**, Saint Louis, v.72,n.2, p.222-237, Aug. 1991.
40. PASSOLD, V.T., TEIXEIRA, I.S. **Biocompatibilidade e caracterização química dos óleos essenciais de laranja e eucalipto, utilizados no tratamento endodôntico**. Itajaí, 1999. Monografia (Graduação em Odontologia) – Centro de Ciências da Saúde, Universidade do Vale do Itajaí.

41. PATTNAIK, S. *et al.* Antibacterial and antifungal activity of ten essential oils in vitro. **Microbios**, Cambridge, v.86, n.349, p.237-246, 1996.
42. PÉCORÁ, J.D. In vitro study on the softening of gutta-percha cones in endodontic retreatment. **Braz Dent J**, Ribeirão Preto, v.4, n.1, p. 43-47, Feb. 1993.
43. _____. *et al.* Apresentação de um óleo essencial, obtido de *Citrus aurantium*, eficaz na desintegração do cimento de óxido de zinco-eugenol do interior do canal radicular. **Odonto**, São Bernardo do Campo, v.1, n.5, p.130-132, jan./fev. 1992.
44. PHILLIPS, J.M. Rat connective tissue response to hollow polyethylene tube implants. **J Can Dent Assoc**, Toronto, v.33, n.2, p.59-64, 1967.
45. RAMADAN, W. *et al.* Oil of bitter orange: new topical antifungal agent. **Int J Dermatol**, Lewiston, v.35, n.6, p.448-449, June 1996.
46. RAMOS, M.P. **Avaliação "in vitro" do comportamento do óleo de laranja na desintegração do óxido de zinco e eugenol no interior do canal radicular.** Itajaí, 1997. Monografia (Curso de Aperfeiçoamento para docentes da FAOVI) - Centro de Ciências da Saúde, Universidade do Vale do Itajaí.
47. RAPPAPORT, A.B. *et al.* Toxicity of endodontic filling materials. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**, Saint Louis, v.18, n.6, p.785-802, Dez. 1964.
48. RUBIN, E., FARBER, J.L. **Patologia.** Rio de Janeiro : Interlivros, 1990. 1381p.

49. SILVA, R. **Estudo comparativo entre o óleo de laranja e o eucaliptol para dissolver a guta-percha.** Itajaí, 1996. Monografia (Graduação em Odontologia) - Centro de Ciências da Saúde, Universidade do Vale do Itajaí.
50. SOUZA FILHO, F.J., VALDRIGHI, L., BERNARDINELLI, N. Influência do nível da obturação e do alargamento do forame apical no processo de reparo tecidual. **Rev Assoc Paul Cir Dent**, São Paulo, v.50, n.1, p.175-177, mar./abr. 1996.
51. SPANBERG, L., LANGELAND, K. Biological effects of dental materials. 1-Toxicity of root canal filling materials on Hela cells in vitro. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**, Saint Louis, v.35, n.3, p.403-414, Mar. 1973.
52. SPANÓ, J.C.E. *et al.* Eficácia dos óleos essenciais na desobturação dos canais radiculares. **ROBRAC**, Goiânia, v.5, n.14, p.25-28, mar. 1995.
53. STERNBERG, S.S. **Histology for pathologist.** 2^a ed. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1997. p.135-136.
54. TANOMARU FILHO, M. *et al.* Avalia o da capacidade solvente de algumas substâncias empregadas no retratamento endodôntico. **Rev Fac Odontol Lins**, Lins, v.10, n.2, p.48-50, jul./dez. 1997.
55. TISSERAND, R., BALACS, T. Essential oil safety. *In*: NEWALL, C.A., ANDERSON, L.A., PHILLIPSON, J.D. **Herbal medicines, a guide for health – care professionals.** London : Pharmaceutical Press, 1996.
56. TORNECK, C.D. Reaction of hamster tissue to drugs used in sterilization of the root canal. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**, Saint Louis, v.14, n.6, p.731-747, June 1961.

57. _____. Reaction of rat connective tissue to polyethylene tube implants:Part I. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**, Saint Louis, v.21, n.3, p.379-387, Mar. 1966.
58. TROWBRIDGE, H.O, EMLING, R.C. **Inflamação** : uma revisão do processo. 4.ed. São Paulo : Quintessence Publishing, 1996. 172p.
59. UEMURA, M. *et al.* Effectiveness of eucaliptol and d'limonene as gutta-percha solvents. **J Endod**, Baltimore, v.23, n.12, p.739-741, Dec. 1997.
60. VIZIOLI, M.R. Macromolecular organization of rat sponge-induced granulation tissue as revealed by dichroism. **Acta anat**, v.80 p.73-81, 1971.
61. _____. Dynamics of fibrillar componentes in rat sponge-induced granulation tissue. **Acta anat**, v.85, p.368-377, 1973.
62. WALTON, R.E., TORABINEJAD, M. **Princípios e prática em endodontia**. 2.ed. São Paulo : Santos, 1997. 558p.
63. WATTENBERG, L.W., COCCIA, J.B. Inhibition of 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone carcinogenesis in mice by D-limonene and citrus fruit oils. **Carcinogenesis**, Oxford, v.12, n.1, p.115-117, 1991.
64. _____ *et al.* Chalcones, myo-inositol inhibitors carcinogenesis pulmonary. **Cell**
65. **de J Bichem Suppl**, v.22, p.162-168, 1995.
66. ZAKARIASEN, K.L. *et al.* Efficient and affective root canal treatment without chloroform. **J Can Dent Assoc**, Toronto, v.56, n.6, p.509-512, June 1990.