

ESTUDO PRELIMINAR DA COMPATIBILIDADE BIOLÓGICA DOS CIMENTOS DE ÓXIDO DE ZINCO E COPAÍBA E ÓXIDO DE ZINCO E EUGENOL. AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA DE IMPLANTES SUBCUTÂNEOS EM RATOS

Carlos Alberto de Souza COSTA*

Josimeri HEBLING**

Flávia RABELLO***

Halbert VILLALBA***

- **RESUMO:** No tecido conjuntivo subcutâneo de 20 ratos foram implantados tubos de polietileno preenchidos com o cimento do óxido de zinco e copaíba (Grupo I) e óxido de zinco e eugenol (Grupo Controle II). Decorridos os períodos de 7, 15, 30 e 60 dias, biópsias foram realizadas e as peças cirúrgicas foram cortadas seriadamente e coradas com hematoxilina e eosina. Aos 7 dias para o Grupo I, houve discreta presença de células inflamatórias, necrose de contato e degradação de fibras colágenas, não sendo observada a presença de neutrófilos ou de células gigantes. O cone capsular formado junto à abertura tubular apresentou discreta amplitude. Todos estes eventos histopatológicos foram ligeiramente superiores para o Grupo II nos primeiros períodos. Com o decorrer dos períodos, para os dois grupos, todos os eventos analisados reduziram em quantidade, e no último período o tecido conjuntivo da área principal de análise apresentava características histológicas de normalidade, permanecendo o tubo de polietileno totalmente envolto por um tecido fibroso denso. Estes achados sugeriram que o material do Grupo I (OZ copaíba) foi menos irritante que o material do Grupo II (controle), quando implantados no tecido conjuntivo subcutâneo do rato.
- **PALAVRAS-CHAVE:** Materiais biocompatíveis; bálsamo de copaíba; cimento de óxido de zinco e eugenol.

Introdução

A partir de 1980, a Federation Dentaire Internationale (FDI) preconizou a necessidade de uma série de testes para avaliação dos materiais odontológicos,²¹ a fim de que fosse permitido o seu uso em seres humanos.

* Departamento de Patologia – Faculdade de Odontologia – UNESP – 14801-903 – Araraquara – SP.

** Departamento de Clínica Infantil – Faculdade de Odontologia – UNESP – 14801-903 – Araraquara – SP.

*** Graduando – Faculdade de Odontologia – UNESP – 14801-903 – Araraquara – SP.

Desta maneira, procuramos, neste trabalho, dar início ao estudo da biocompatibilidade de uma mistura de óxido de zinco e óleo de copaíba, usando como controle o óxido de zinco e o eugenol.

A copaíba é uma planta medicinal cujo nome científico é *Copaifera* L., pertencente à família *Leguminosae caesalpinioideae*. Possui várias sinonímias populares, como, por exemplo: Amarante, Bálsamo de Copaíba, Copaíba Verdadeira e outras. O seu hábitat é terrestre e sua ocorrência geográfica faz-se no Amazonas, Pará, Piauí, Minas Gerais e Bahia, podendo ser encontrada em outros países, como Venezuela, Colômbia, São Salvador, Antilhas e África Tropical.¹

A parte empregada desta árvore, que pode atingir de 18 a 20 m de altura, é a casca e o lenho dos quais é extraído um óleo-resina, cuja composição contém essência (40% a 50%) e resina (40% a 60%).⁵ Possui sabor amargo, sendo comercializado com outros nomes (Maranhão Good Bright). As propriedades terapêuticas que são dadas pela resina da copaíba são inúmeras – antiblenorrágica, cicatrizante, antitetânica, usada no tratamento da dermatose e coriza, anti-séptica –, mas em altas doses pode provocar diarreia, vômito, náusea e exantema particular.¹ Este óleo-resina é eliminado do corpo humano pela mucosa pulmonar e pelos rins.⁷ A dose média de copaíba é, segundo Youngken,²² de 2 a 6 g/dia em forma de cápsula. A copaíba também apresenta ação antiinflamatória e analgésica, tendo ainda atividade bactericida expectorante e diurética.¹⁰

Na odontologia, o cimento de óxido de zinco e eugenol (OZE) tem como principais aplicações clínicas a cimentação temporária de próteses, restauração temporária de dentes e forramento de cavidades profundas.^{6,21} A toxicidade do cimento de óxido de zinco-eugenol é geralmente atribuída ao eugenol.¹⁵ Além disso, Lindquist & Otteskog¹⁷ demonstraram que o eugenol é citotóxico e provoca reações adversas em animais experimentais e em seres humanos. De acordo com Costa et al.,⁹ o cimento de óxido de zinco mais a pasta de antibiótico são menos irritantes ao tecido conjuntivo de rato que o óxido de zinco-eugenol nos períodos iniciais de estudo, sendo esta pasta usada em pulpotomia de dentes decíduos. Costa et al.⁸ relataram ainda, em 1993, que o cimento de OZE será mais irritante ao tecido conjuntivo pulpar quanto mais fluido for o cimento e quanto mais envelhecido for o eugenol.

Esta pesquisa é indicada pela FDI como preliminar na seqüência de testes de biocompatibilidade e tem como objetivo analisar de forma comparativa as reações de tecido subcutâneo de rato, provocadas por um cimento de óxido de zinco e copaíba, usando como controle o OZE. Desta maneira, talvez seja possível substituir o eugenol do cimento de OZE pela copaíba, aproveitando a possível ação menos irritante deste óleo e suas inúmeras propriedades terapêuticas.

Material e método

Foram utilizados 20 ratos (*Rattus norvegicus, albinus*, Holtzman) machos, pesando em média 250 g, os quais, após anestesia com hidrato de cloral a 10% (0,4 ml do anestésico para cada 100 g de peso do rato por via intraperitoneal), foram fixados em mesa operatória.

Após tricotomia na região dorsal, foi feita a anti-sepsia do campo operatório com tintura de merthiolate 1:100. Na linha média, eqüidistante da inserção da cauda e da cabeça do animal, foi feita uma incisão de aproximadamente 6 mm de comprimento, e o tecido subcutâneo divulsionado lateralmente com tesoura de ponta romba, formando duas lojas cirúrgicas, uma a cada lado da incisão, com aproximadamente 2,5 cm de profundidade.

Completadas as lojas cirúrgicas, os materiais em teste foram introduzidos em tubos de polietileno com 10 mm de comprimento e 1 mm de diâmetro interno, os quais tiveram uma das extremidades fechada a quente, tomando-se cuidado para evitar bolhas e extravasamento.

O cimento de óxido de zinco e copaíba (Grupo I) foi preparado da seguinte maneira: numa placa de vidro, foram colocados 1 gota de óleo de copaíba (0,03 ml) e 30 mg de óxido de zinco; então, os materiais foram espatulados durante 60 segundos, resultando uma pasta densa, a qual foi inserida no tubo de polietileno. Este foi introduzido, com auxílio de uma pinça clínica, na loja cirúrgica do lado direito. Na loja cirúrgica esquerda, foi introduzido um tubo de polietileno preenchido com óxido de zinco e eugenol (Grupo II), cuja preparação da pasta seguiu a mesma proporção e tempo de espatulação realizados para o material do Grupo I.

As bordas das feridas foram suturadas com agulhas montadas 1,7 cm com fio de seda 3-0.

Todo o material cirúrgico foi esterilizado em estufa a 170°C durante 1 hora, enquanto os tubos de polietileno foram autoclavados a 100°C durante 20 minutos.

Os ratos foram mantidos em gaiolas individuais e alimentados com ração balanceada e água *ad libitum*. Decorridos 7, 15, 30 e 60 dias após a cirurgia, cinco animais em cada período foram anestesiados por inalação de éter sulfúrico, novamente tricotomizados, e a área do implante dissecada, abrangendo suficiente tecido normal circunjacente.

As peças foram fixadas em solução de formalina a 10% durante 24 horas, lavadas em água corrente pelo mesmo período de tempo e, em seguida, desidratadas e incluídas em parafina. Posicionados os blocos no micrótomo, estes foram desbastados até se encontrarem os tubos de polietileno, que, após seccionados ao meio, tiveram as duas partes cuidadosamente removidas. Em seguida, os espaços anteriormente ocupados pelos tubos foram preenchidos com parafina e foram obtidos cortes seriados de 6 µm de espessura, sendo corados com hematoxilina e eosina. No exame ao microscópio óptico, procuramos comparar, de acordo com os vários períodos estudados, os seguintes eventos histológicos provocados pelas pastas junto à abertura tubular: necrose, neutrófilos, células inflamatórias mononucleares, células gigantes, fibroblastos e organização da cápsula junto à abertura tubular, graduando estes achados histopatológicos em não-significante, discreto, moderado e intenso.

Resultado

7 dias – Neste primeiro período de análise, para o OZ – copaíba (Grupo I) ocorreu uma discreta reação inflamatória com predomínio de células inflamatórias mononucleares; para o ZOE (Grupo II), a reação local foi discreta/moderada. As áreas de degradação de colágeno e necrose de contato foram discretas, semelhantes para ambos os materiais em teste, não sendo observados neutrófilos e células gigantes na área principal de análise. O cone capsular formado junto à abertura tubular foi ligeiramente maior no Grupo II, sendo classificado como discreto/moderado, enquanto para o Grupo I, foi discreto (Figuras 1 e 2).

15 dias – Neste tempo de observação, os cortes histológicos revelaram presença de poucas células inflamatórias de predomínio mononuclear para o Grupo I, enquanto para o Grupo II, esta reação permaneceu discreta, não sendo determinados células gigantes e neutrófilos na região. Poucas áreas de degradação de colágeno e necrose de contato foram observadas no cone capsular. De um modo geral, os eventos histopatológicos analisados regrediram de intensidade quando se comparou com o período anterior, o mesmo ocorrendo com o cone capsular, o qual regrediu para ambos os materiais em teste, mas sendo ligeiramente mais amplo para o Grupo II (Figuras 3 e 4).

30 dias – Neste período de análise, ocorreu presença de poucas células inflamatórias mononucleares junto à abertura do tubo, o que não permitiu caracterizar uma reação inflamatória. O cone capsular regrediu, formando uma cápsula fibrosa densa com algumas células inflamatórias de permeio; essa cápsula mantinha contato com aquela formada na superfície lateral do tubo. O tecido conjuntivo adjacente apresentou numerosos fibroblastos e fibras colágenas entrelaçados em meio a poucas células inflamatórias mononucleares. Não foram determinados os seguintes eventos: áreas de degradação de colágeno, necrose de contato, células gigantes e neutrófilos.

O quadro histológico acima descrito foi observado para as lâminas do Grupo II, enquanto para o Grupo I, as características teciduais foram semelhantes; na cápsula fibrosa não foram observadas células inflamatórias (Figura 5).

60 dias – As características histológicas determinadas neste tempo de observação foram semelhantes ao período anterior para os dois grupos em estudo; o tecido conjuntivo junto à abertura tubular não apresentou células inflamatórias que pudessem caracterizar reação inflamatória, estando, desta forma, normal. O tubo de polietileno estava totalmente envolvido por uma cápsula fibrosa densa (Figura 6).

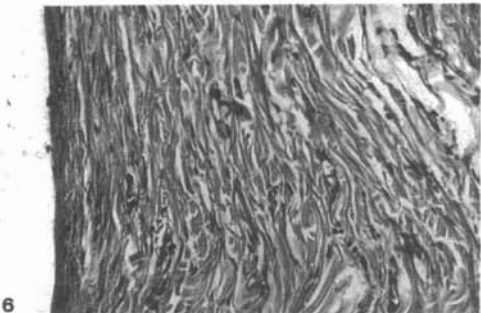
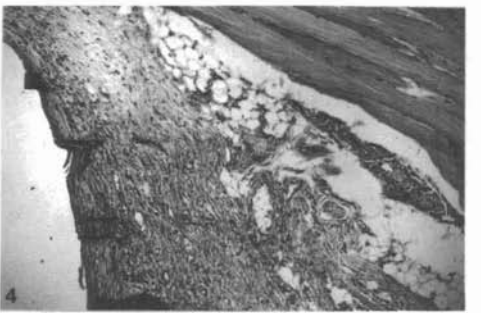
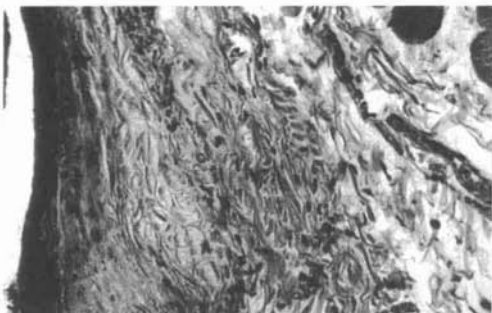
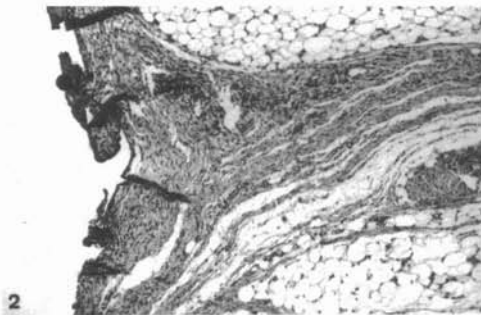
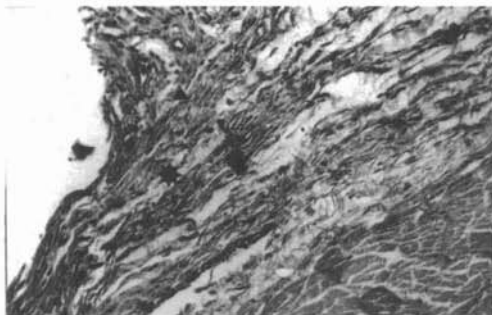


FIGURA 1 – OZ – Copaiba – 7 dias. Tecido conjuntivo junto à abertura tubular, apresentando discretas células inflamatórias de predomínio mononuclear (*) em meio a escassas áreas de degradação de colágeno (▲) e necrose de contato (★). H/E; Zeiss, 185x.

FIGURA 2 – OZ – Eugenol – 7 dias. São vistas regiões de necrose de contato (●), com presença discreta/moderada de células inflamatórias mononucleares em meio a fibroblastos, fibras colágenas e discretas áreas de degradação de colágeno. H/E; Zeiss, 64x.

FIGURA 3 – OZ – Copaiba – 15 dias. Área de tecido conjuntivo junto à abertura tubular, apresentando organização de fibras colágenas e fibroblastos, tendendo a formar uma cápsula fibrosa (★). Em meio a este tecido são vistas poucas células inflamatórias. H/E; Zeiss, 235x.

FIGURA 4 – OZ – Eugenol – 15 dias. Presença de fibras colágenas e fibroblastos se organizando para formar uma cápsula fibrosa densa que mantém continuidade com a superfície lateral do tubo (■). O tecido conjuntivo junto à abertura tubular apresenta discretas células inflamatórias. H/E; Zeiss, 125x.

FIGURA 5 – OZ – Copaiba – 30 dias. Cápsula fibrosa densa junto à abertura tubular, com o tecido conjuntivo adjacente apresentando fibras colágenas e fibroblastos entrelaçados. H/E; Zeiss, 235x.

FIGURA 6 – OZ – Eugenol – 60 dias. Tecido conjuntivo junto à abertura capsular semelhante àquele visto na figura anterior. H/E; Zeiss, 235x.

Discussão

A análise dos resultados obtidos no presente trabalho permitiu determinar que o cimento de óxido de zinco e copaíba (Grupo I) promoveu menor ação irritante sobre o tecido conjuntivo subcutâneo do rato, quando comparado com o óxido de zinco e eugenol (Grupo II), melhor determinado nos dois primeiros períodos de observação. Com o decorrer do tempo, os eventos histológicos tenderam a regredir, e, no último período, para os dois grupos em estudo, o tecido conjuntivo junto à abertura tubular, área principal de análise, apresentava características histológicas de normalidade, com o tubo de polietileno totalmente envolvido por uma cápsula fibrosa densa, livre de células inflamatórias.

A Federation Dentaire Internationale (FDI) estandardizou uma série de testes para os materiais odontológicos, dividindo-os em: Nível I, II e III. Dentro destas indicações, escolhemos o teste de implantação em tecido conjuntivo subcutâneo do dorso de rato, pois este animal possui alta resistência,¹³ inclusive contra infecções, é de fácil manipulação¹⁹ e permite uma análise preliminar da possível ação irritante dos materiais em teste.

O óxido de zinco é um material encontrado na forma de pó, que, segundo Meryon & Jakeman,¹⁸ é o principal agente irritante da mistura de ZOE. Por outro lado, Berman & Massler³ relataram que o íon zinco é aparentemente antiinflamatório *in vivo* e promove o processo de cura.

Segundo Langeland & Langeland;¹⁴ Rodrigues et al.²⁰ e Barkin et al.,² o eugenol é o principal agente irritante do cimento de OZE, chegando este último autor a relatar que o líquido pode promover necrose tecidual, dermatite de contato ou, ainda, uma verdadeira reação alérgica medicamentosa. Costa et al.,⁸ em 1993, realizaram um trabalho de pesquisa, em que os cimentos de OZE foram preparados variando a proporção pó/líquido e o tempo de envelhecimento do eugenol; concluiu-se que o cimento de ZOE menos denso, cujo eugenol era envelhecido, foi o material mais irritante quando aplicado sobre o tecido pulpar de molares de rato.

Desta maneira, procuramos substituir o eugenol, substância indicada por Glass & Zander¹¹ como terapêutico e analgésico local, por um óleo que, segundo a medicina folclórica do Brasil, países da América do Sul e da África, apresenta as seguintes propriedades terapêuticas: antiinflamatório, anti-séptico, bactericida, diurético, dermatológico e expectorante.^{4,5,12,16,22} Por outro lado, Fernandes et al.¹⁰ relataram em 1992 que o LD50 do óleo de copaíba é de 3.090 mg/kg, sugerindo que este óleo, quando usado por via oral, não é tão seguro quanto sugere a medicina folclórica. Todavia, no caso do cimento de óxido de zinco e copaíba, a proporção do óleo/pó usado foi de 0,03 ml para 30 mg; a quantidade de cimento preparado seria suficiente para realizar um capeamento pulpar, obturação de canais radiculares ou forramento cavitário.

Está claro que as indicações ora descritas para o uso deste novo cimento precisam ser confirmadas por meio de uma seqüência de novos trabalhos com o material em teste, agora nos demais níveis de pesquisa, como indica a FDI. Quanto

a outras indicações, tais como cimentação provisória de coroas e restauração provisória de cavidade dentária, trabalhos sobre resistência mecânica do material são necessários.

Desta forma, esta pesquisa deu início a uma série de outras para se utilizar o óleo de copaíba como um material odontológico apresentado na forma de cimento quando misturado com óxido de zinco. Todavia, as propriedades do óleo devem ser melhor esclarecidas, pois, segundo Fernandes et al.,¹⁰ a primeira ação farmacológica descoberta do óleo de copaíba foi a sua propriedade antiinflamatória, mas não foi possível determinar qual componente do óleo é responsável por esta propriedade.

Provavelmente, quando em contato com o tecido conjuntivo subcutâneo do rato, o cimento em estudo apresentou melhores resultados iniciais por promover menor ação irritante, em decorrência das propriedades antiinflamatórias já conhecidas do óxido de zinco e, principalmente, pela união deste pó à copaíba, relatada como sendo também antiinflamatória.^{4,5} Desta forma, foi substituída uma substância analgésica e bactericida (eugenol) por outra (copaíba) que possui, além destas propriedades, outras já citadas no texto.

Assim, após análise dos resultados desta pesquisa, foi possível concluir, dentro das condições experimentais, que o cimento de óxido de zinco e copaíba foi menos irritante do que o cimento de óxido de zinco e eugenol, quando implantados em contato direto com o tecido conjuntivo subcutâneo do rato. Este achado nos estimula a dar continuidade ao estudo deste novo material em desenvolvimento.

Agradecimento

Aos funcionários Artur Mendonça e Maria da Gloria Vieira Celli, pela confecção das lâminas, e à Herminia Bassi Maio, pelo auxílio no manuscrito.

COSTA, C. A. de S. et al. Preliminary study of the biological compatibility of a zinc oxide-copaiba and zinc oxide-eugenol cements. Histological evaluation of subcutaneous implants in rats. *Rev. Odontol. UNESP (São Paulo)*, v.25, n.1, p.19-26, 1996.

- **ABSTRACT:** *The biocompatibility of a zinc oxide-copaiba (Group I – ZOC) and zinc oxide-eugenol (Group II – Control–ZOE) was studied after subcutaneous implantation in rats. The implants, polyethylene tubes filled with the cements, were inserted into dorsal surgical pockets of 20 rats, and the animals sacrificed 7, 15, 30 and 60 days after. Serial sections of the skin, stained with H/E, showed in the first period (7 days) that the ZOC promoted a mild inflammatory reaction, contact necrosis and collagen degradation. These histopathological events were more severe in Group II. During the experiment, the subcutaneous tissue presented tendency for healing, with organization of a fibrous capsule surrounding the tubes in both Groups. It was concluded that ZOC was less irritant than ZOE, when implanted in subcutaneous tissue.*
- **KEYWORDS:** *Biocompatible materials; copaiba balsam; zinc oxide-eugenol cement.*

Referências bibliográficas

- 1 BAHIA. Subsecretaria de Ciência e Tecnologia. *Inventário das plantas medicinais do Estado da Bahia*. Salvador, 1979. p.413-5.
- 2 BARKIN, M. et al. Acute allergic reaction to eugenol. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.*, v.57, p.441, 1984.
- 3 BERMAN, D. S., MASSLER, M. Experimental pulpotomies in rat molars. *J. Dent. Res.*, v.37, p.229-42, 1958.
- 4 BRAGA, R. *Plantas do Nordeste, especialmente do Ceará*. 3.ed. Fortaleza: s.n., 1976.
- 5 CASAMADA, R. S. M. *Tratado de farmacognosia*. Barcelona: Ed. Científico-Médica, 1977. p.545-6.
- 6 CHVAPIL, M. Zinc and other factors of the pharmacology of wound healing. In: HUNT, T. K. (Ed.) *Wound healing and wound infection*. New York: Appleton Century – Crofts, 1980. p.135-52.
- 7 CORRÊA, M. P. *Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas*. Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura, 1931. v.2, p.370-5.
- 8 COSTA, C. A. S. et al. Pulp-capping studies with zinc oxide-eugenol, varying the age of materials, correlated with fluidity. *Rev. Odontol. UNESP*, v.22, p.223-30, 1993.
- 9 _____. Estudo preliminar da compatibilidade biológica de um cimento à base de antibiótico e óxido de zinco e eugenol quando implantado em tecido subcutâneo de rato. *Rev. Odontol. Univ. São Paulo*, v.8, p.65-70, 1994.
- 10 FERNANDES, R. M., PEREIRA, N. A., PAULO, L. G. Anti-inflammatory activity of copaiba balsam (*Copaifera cearensis*, Huber). *Rev. Bras. Farm.*, v.73, n.3, p.53-6, 1992.
- 11 GLASS, R. L., ZANDER, H. A. Pulp healing. *J. Dent. Res.*, v.28, p.97-107, 1949.
- 12 GUENTHER, E. *The essential oils*. Princeton: D. Van Nostrand, 1952. v.5, p.203-12.
- 13 GUTTUSO, J. Histopathologic study of rat connective tissue responses to endodontic materials. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.*, v.16, p.713-27, 1963.
- 14 LANGE LAND, K., LANGE LAND, L. Indirect capping and the treatment of deep carious lesions. *Int. Dent. J.*, v.18, p.326-80, 1963.
- 15 LANGE LAND, K. et al. Methods in study of biologic responses to endodontic materials. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.*, v.27, p.552-42, 1969.
- 16 LEUNG, A. Y. (Ed.) *Encyclopedia of common natural ingredients used in foods, drugs and cosmetics*. New York: John Wiley & Sons, 1980. p.47-8.
- 17 LINDQUIST, L., OTTESKOG, P. Eugenol liberation from dental materials and effect on human diploid fibroblast cells. *Scand. J. Dent. Res.*, v.89, p.552-6, 1981.
- 18 MERYON, S. D., JAKEMAN, K. J. The effects in vitro of zinc released from dental restorative materials. *Int. Endod. J.*, v.18, p.191-8, 1985.
- 19 RESTARSKI, J. S. Preserving vitality of pulps exposed by caries in young children. *Int. Dent. J.*, v.9, p.2-7, 1940.
- 20 RODRIGUES, H. et al. Biologic effect of dental materials. Effect of zinc oxide-eugenol cements on Hella cells in vitro. *Estomatol. Cult.*, v.9, p.191-4, 1975.
- 21 SMITH, D. C. Characteristics of dental tissues and their response to dental materials. In: SMITH, D. C., WILLIAMS, D. F. *Biocompatibility of dental materials*. Boca Raton: CRC Press, 1982. v.1, cap.1, p.6-7,21.
- 22 YOUNGKEN, H. W. *Tratado de farmacognosia*. México: Ed. Atlante, 1951. p.556-9.