

COMPATIBILIDADE BIOLÓGICA DO TECIDO CONJUNTIVO SUBCUTÂNEO DE RATO AO IMPLANTE DE CIMENTO DE ÓXIDO DE ZINCO E EUGENOL (OZE), VARIANDO A PROPORÇÃO PÓ/LÍQUIDO E O TEMPO DE ENVELHECIMENTO DO EUGENOL

Carlos Alberto de Souza COSTA*

Carlos BENATTI NETO*

Josimeri HEBLING**

Heron Fernando de Sousa GONZAGA*

Fábio César Braga de ABREU-E-LIMA**

- **RESUMO:** Foi testada a biocompatibilidade dos cimentos de OZE variando o tempo de envelhecimento do eugenol e a proporção pó/líquido, por meio de implantes dorsais em tecido conjuntivo subcutâneo de 48 ratos nos períodos de 15, 30 e 60 dias. O cimento de OZE novo/denso promoveu no 1º período de análise (15 dias) discreta reação inflamatória com predomínio de células mononucleares, organização e compactação de fibras colágenas e fibroblastos junto à abertura do tubo. Com o decorrer dos períodos, a reação inflamatória foi regredindo e a região principal de análise sofrendo um processo de reparação tecidual. No último período (60 dias) houve a formação de um tecido conjuntivo com características histológicas de normalidade na área, e o tubo estava totalmente envolto por um tecido fibroso denso. Os outros três grupos analisados (II – novo/fluido; III – velho/denso e IV – velho/fluido) apresentaram resultados inferiores aos já relatados, e aqueles com característica mais fluida foram os mais irritantes ao tecido subcutâneo do rato. Desta maneira, concluímos que o cimento de OZE menos irritante foi o novo/denso (Grupo I). Quando relacionamos os grupos em ordem crescente de irritação, temos: Grupos III, II e IV.
- **PALAVRAS-CHAVE:** Cimento de óxido de zinco e eugenol; materiais biocompatíveis.

Introdução

O óxido de zinco e eugenol tem como principais aplicações clínicas a cimentação temporária de próteses, restauração temporária de dentes e forramento de cavidades profundas.^{6,20}

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

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

Este cimento do sistema pó/líquido apresenta pó constituído essencialmente de óxido de zinco puro, porém às vezes são adicionados alguns sais, como acetato de zinco, cloro, fosfato e outros, os quais podem acelerar a reação de endurecimento.⁶

Entretanto, ao líquido, que é o eugenol purificado ou óleo de cravo-da-índia (85% de eugenol), pode ser adicionado ácido acético, álcool ou água, os quais também podem acelerar o endurecimento do cimento.⁶

Já é sabido que o eugenol é liberado do cimento de óxido de zinco e eugenol^{2,21} e apresenta efeito terapêutico sobre a dentina e polpa.⁸

A despeito do uso comum do material, tem sido demonstrado que o eugenol provoca reações adversas em animais experimentais e seres humanos.¹⁶

Lindquist & Otteskog,¹⁶ em 1981, demonstraram que o eugenol é citotóxico e Barkin et al.,¹ em 1984, fizeram uma revisão dos três tipos de reações que o eugenol pode causar: perda tecidual direta; dermatite de contato e reação alérgica verdadeira, esta última comprovada por Koch et al.¹² em 1973, sendo o tipo mais raro de reação.

Por outro lado, o íon zinco tem dois efeitos biológicos, os quais podem ser importantes com relação à propriedade tóxica dos materiais odontológicos. Primeiro, o zinco apresenta propriedade antiinflamatória *in vivo* e promove cura de feridas;³ segundo, é citotóxico quando estudado *in vitro*.

Miles,¹⁸ em 1982, demonstrou que o zinco estimula os fibroblastos a produzirem colágeno por promoverem síntese de DNA.

Tobias et al.,²¹ em 1985, e Watts & Paterson,²² em 1987, determinaram, utilizando vários cimentos, que o de óxido de zinco e eugenol apresenta efeito antibacteriano.

A toxicidade deste cimento é geralmente atribuída ao eugenol,¹⁴ porém trabalhos recentes¹⁰ têm investigado o possível efeito tóxico dos íons zinco.

Este trabalho tem por objetivo avaliar histopatologicamente a resposta do tecido subcutâneo de rato, quando implantado cimento de óxido de zinco e eugenol em tubos de polietileno, variando a proporção pó/líquido e o tempo de envelhecimento do eugenol.

Material e método

Foram utilizados 48 ratos (*Rattus norvegicus, albinus*, Holtzman), machos, adultos, pesando em média 250 g, distribuídos em quatro grupos de 12 animais cada (Tabela 1).

Os animais foram anestesiados por inalação de éter sulfúrico em cuba de vidro e logo colocados em mesa cirúrgica, sendo a anestesia controlada com algodão embebido em éter dentro de um recipiente de vidro.

Após a tricotomia da região dorsal média, realizamos a anti-sepsia do campo operatório com tintura de timerosal 1:100.

Foi feita uma incisão central, eqüidistante da inserção da cauda e cabeça, de aproximadamente 8 mm de comprimento e, com tesoura de ponta romba, foi realizada divulsão lateral, confeccionando duas lojas cirúrgicas para a acomodação do implante, sendo uma a cada lado e distantes 2,5 cm da incisão central.

Os tubos de polietileno, medindo 1,0 cm de comprimento por 0,1 cm de diâmetro, tiveram uma das extremidades fechadas a quente e foram autoclavados à temperatura de 110°C durante 20 minutos. Estes foram preenchidos, evitando-se a formação de bolhas, com o material a ser testado, variando a proporção pó/líquido e o tempo de envelhecimento do eugenol (Tabela 2).

Para cada tubo, foi preparado novo material.

Com o auxílio de uma pinça endodôntica para cones de guta-percha, os tubos foram introduzidos nas lojas cirúrgicas, tomando-se cuidado para não posicioná-los perpendicularmente à incisão.

A seguir, as bordas da ferida foram aproximadas e suturadas com fio de seda preto, montado em agulha X-8, 1,7 cm.

Todo o material clínico foi esterilizado em estufa a 180°C durante 1 hora.

Os animais foram mantidos em gaiolas individuais com alimentação balanceada e água *ad libitum*.

Decorridos os períodos de 15, 30 e 60 dias, os animais foram anestesiados em éter sulfúrico, fez-se nova tricotomia, e então foram realizadas as biópsias com suficiente margem de segurança.

As peças cirúrgicas permaneceram em formalina a 10% durante 72 horas; então foram preparadas e incluídas em parafina. Os cortes seriados, de 6 µm de espessura, foram preparados e procedemos à coloração do material com hematoxilina/eosina para análise histopatológica em nível de microscopia óptica.

Os resultados foram obtidos a partir da análise comparativa do grau de irritação do tecido subcutâneo dos ratos provocado pelos materiais em teste.

Tabela 1 – Distribuição de ratos por materiais e períodos

Grupos	Materiais	Períodos em dias			
		15	30	60	Total
Novo/denso I	OZE	4	4	4	12
Novo/fluido II	OZE	4	4	4	12
Velho/denso III	OZE	4	4	4	12
Velho/fluido IV	OZE	4	4	4	12
Total por período		16	16	16	48

Tabela 2 – Variação de peso/pH do pó e volume/pH do líquido em relação às variações de tempo e consistência do cimento de óxido de zinco e eugenol

Consistência/tempo dos cimentos OZE	Pó		Líquido	
	Peso	pH	Volume	pH
Novo/denso	30 mg	9,0	0,03 ml	5,5
Novo/fluido	18 mg	9,0	0,03 ml	5,5
Velho/denso	30 mg	9,0	0,03 ml	7,0
Velho/fluido	18 mg	9,0	0,03 ml	7,0

Resultado

OZE (novo/denso)

No período de 15 dias, observou-se reação inflamatória discreta, com predomínio de células mononucleares, sendo determinados poucos neutrófilos; enquanto o tecido junto à abertura tubular apresentou condensação de fibras colágenas e fibroblastos, com número reduzido de vasos sanguíneos (Figura 1). Com o decorrer dos períodos, pudemos notar um acentuado decréscimo de células inflamatórias, maior organização e compactação de fibras colágenas e fibroblastos, os quais mantinham continuidade com o tecido fibroso da superfície lateral do tubo (Figura 3). No período pós-cirúrgico de 60 dias, houve formação de um tecido conjuntivo normal junto à abertura tubular, área principal de análise, sendo o tubo totalmente envolvido por uma cápsula fibrosa densa (Figura 5). Em todos os períodos, não se observou presença de células gigantes.

OZE (novo/fluido)

No período de 15 dias, a reação inflamatória com predomínio de células mononucleares se apresentou discreta/moderada com tendência à compactação e organização das fibras colágenas e fibroblastos junto à abertura tubular (Figura 2). Aos 30 dias, a reação inflamatória foi discreta e o tecido da área com características semelhantes ao de granulação (Figura 4). No período seguinte, a quantidade de células inflamatórias mononucleares permaneceu discreta, não se notando áreas de necrose. O tecido fibroso, presente na superfície lateral do tubo, manteve continuidade com aquele formado junto à abertura do tubo, mas em meio a fibras colágenas e fibroblastos foram notadas algumas células inflamatórias (Figura 6).

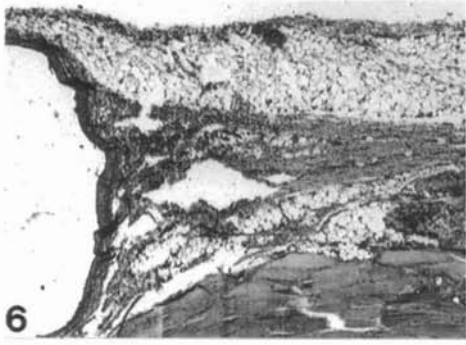
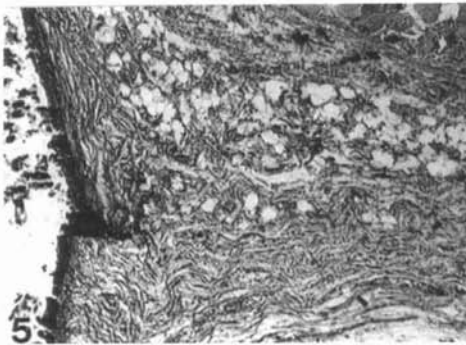
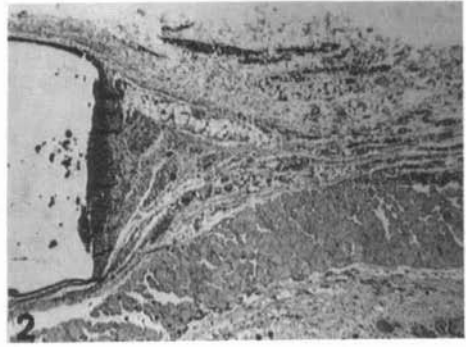


FIGURA 1 – ZOE (Novo/denso) – 15 dias. Discreta presença de células mononucleares associadas a uma compactação de fibras colágenas e fibroblastos, tendendo a formar uma cápsula em continuidade com aquela presente na superfície lateral do tubo. H/E; Zeiss, 32x.

FIGURA 2 – ZOE (Novo/fluido) – 15 dias. Área junto à abertura tubular com presença discreta/moderada de células inflamatórias de predomínio mononuclear. H/E; Zeiss, 32x.

FIGURA 3 – ZOE (Novo/denso) – 30 dias. Formação de uma cápsula fibrosa densa isolando o material em teste do restante do conjuntivo da área principal de análise, a qual apresenta características histológicas de normalidade. H/E; Zeiss, 32x.

FIGURA 4 – ZOE (Novo/fluido) – 30 dias. Tendência à organização de fibras colágenas e fibroblastos junto à abertura do tubo. O conjuntivo adjacente apresenta discretas células inflamatórias mononucleares. H/E; Zeiss, 125x.

FIGURA 5 – ZOE (Novo/denso) – 60 dias. Detalhe da figura anterior com predomínio de fibras colágenas e fibroblastos na área principal de análise. H/E; Zeiss, 125x.

FIGURA 6 – ZOE (Novo/fluido) – 60 dias. Organização da cápsula fibrosa densa junto à área principal de análise, a qual apresenta ainda discretas células inflamatórias mononucleares. H/E; Zeiss, 48x.

OZE (velho/denso)

No período de 15 dias, o quadro inflamatório foi discreto, ocorrendo um suave aumento dos vasos sanguíneos, fibras colágenas, fibroblastos e células mononucleares, quando comparado com o Grupo I, que caracterizaram um tecido em processo de reparação (Figura 11). Com o decorrer dos períodos, os eventos analisados foram semelhantes aos do Grupo de OZE – novo/denso (Figuras 13 e 15).

OZE (velho/fluido)

No primeiro período de análise (15 dias), foi observada moderada/intensa reação inflamatória, com predomínio de células mononucleares junto à abertura tubular com proliferação fibroangioblástica na área principal de análise. Havia moderada necrose de contato (Figura 12). Com o decorrer dos períodos, houve discreta/moderada presença de células inflamatórias mononucleares e compactação de fibras e fibroblastos, formando uma cápsula em continuidade com aquela estabelecida na superfície lateral do tubo (Figuras 14 e 16). A presença de vasos sanguíneos foi discreta/moderada, e as células gigantes não foram observadas em nenhum dos períodos.

Discussão

Quando analisamos e comparamos os resultados obtidos para os quatro grupos de OZE, pudemos observar que o Grupo I (novo/denso) foi aquele que promoveu menor irritação ao tecido conjuntivo subcutâneo do rato e permitiu uma maior colagenização e organização da cápsula fibrosa junto à abertura tubular em períodos intermediários. Por outro lado, o processo da resolução do quadro inflamatório, assim como a formação da cápsula, foram mais lentos nos Grupos II e IV, sendo o OZE velho/fluido o que pior quadro apresentou em todos os períodos analisados.

Hensten-Pettersen & Helgeland⁹ relataram que o cimento de óxido de zinco e eugenol apresenta um acentuado efeito tóxico quando aplicado sobre tecido mole ou em sistemas de cultura de células. Lindquist & Otteskog¹⁶ atribuíram a citotoxicidade do óxido de zinco e eugenol ao eugenol livre, sendo este fortemente citotóxico. Estes achados corroboram o presente trabalho, pois, quando testamos os materiais, aqueles que apresentavam uma proporção superior de eugenol promoveram maior reação inflamatória no tecido conjuntivo, assim como dificultaram o processo de organização e condensação das fibras colágenas e fibroblastos junto à abertura tubular.

Por outro lado, Meryon et al.¹⁷ relataram que o componente citotóxico do cimento de OZE eram os íons zinco. Leirskar¹⁵ relatou severa citotoxicidade do zinco, quando aplicado durante 24 horas sobre a linhagem de células epiteliais.

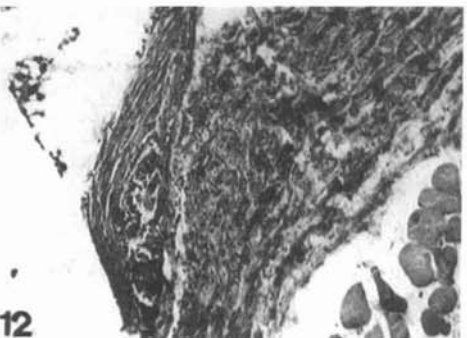
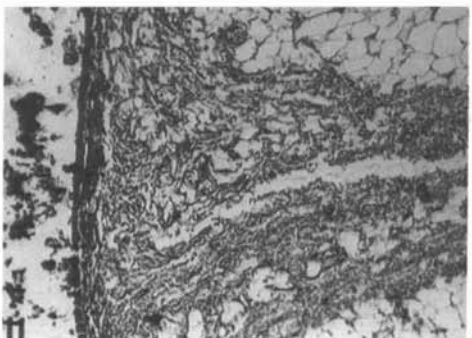
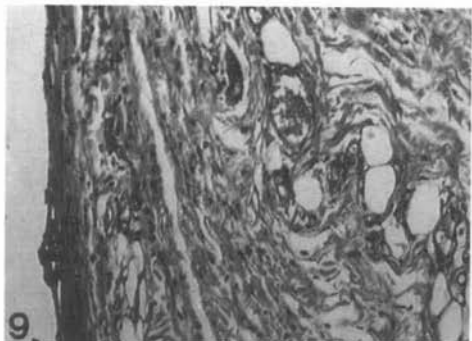
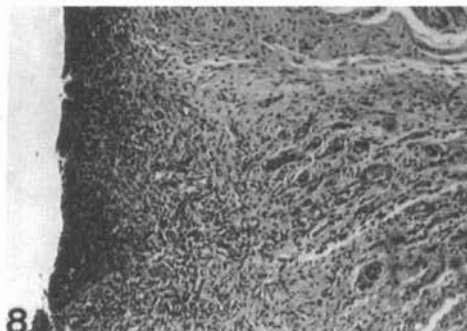
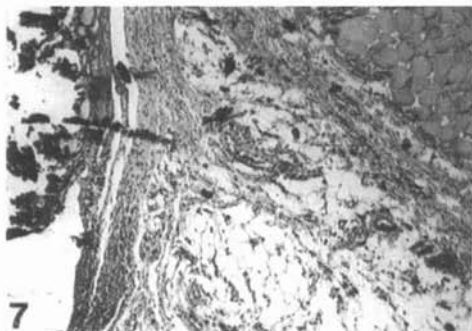


FIGURA 7 - ZOE (Velho/denso) - 15 dias. Tendência à organização e compactação de fibras colágenas e fibroblastos junto à abertura tubular com discreta/moderada presença de células mononucleares. H/E; Zeiss, 125x.

FIGURA 8 - ZOE (Velho/fluido) - 15 dias. Intensa proliferação fibroangioblástica junto à abertura tubular. Moderada/intensa reação inflamatória de predomínio mononuclear, principalmente próximo ao material em teste. H/E; Zeiss, 64x.

FIGURA 9 - ZOE (Velho/denso) - 30 dias. Presença moderada de vasos sanguíneos em meio a fibras colágenas e fibroblastos predominando sobre discretas células mononucleares. Tendência à formação de cápsula fibrosa. H/E; Zeiss, 250x.

FIGURA 10 - ZOE (Velho/fluido) - 30 dias. Presença discreta/moderada de células inflamatórias mononucleares associadas à compactação de fibras colágenas e fibroblastos junto à abertura tubular. H/E; Zeiss, 64x.

FIGURA 11 - ZOE (Velho/denso) - 60 dias. Tecido conjuntivo subcutâneo com características histológicas de normalidade. Junto à abertura tubular existe a formação da cápsula fibrosa densa. H/E; Zeiss, 125x.

FIGURA 12 - ZOE (Velho/fluido) - 60 dias. Tecido junto à abertura tubular com formação de cápsula fibrosa associada discreta/moderada reação inflamatória com predomínio de células mononucleares. H/E; Zeiss, 187x.

Estes relatos não foram confirmados pelo presente trabalho, já que a quantidade de óxido de zinco presente no Grupo III foi de 30 mg e no Grupo II, 18 mg, e os resultados mostraram maior irritação nos espécimes do Grupo II. Portanto, o óxido de zinco não influenciou diretamente os resultados, como ocorrido na variação da quantidade de eugenol, na qual, nos dois grupos de cimento de OZE fluido (Grupos II e IV), a reação inflamatória e necrose de contato foram superiores às do grupo de OZE denso (I e III).

A habilidade do eugenol em aliviar a dor dental é uma das principais razões do seu uso em Odontologia.¹¹ Esta substância, segundo Kozan,¹³ bloqueia a condução do potencial de ação no nervo ciático de rãs; Brodin⁴ e Brodin & Roed⁵ testaram a ação do eugenol e do OZE sobre o potencial de ação de nervos periféricos e relataram que baixas concentrações de eugenol inibiram a atividade nervosa de maneira reversível, como um anestésico local.

Esta condição do eugenol, associada à sua ação bactericida em baixas concentrações, talvez explique o motivo de as pastas de OZE densas (pouco eugenol livre) apresentarem bons resultados em tecido subcutâneo de rato e também em capeamentos pulpares diretos, como relatou Costa et al.⁷ em 1993. Nos casos das pastas fluidas, o excesso de eugenol pode fazer que OZE seja irritante tecidual intenso, citotóxico, podendo ainda promover efeito neurotóxico.

Os testes comumente usados para avaliar a biocompatibilidade não podem ser de imediato extrapolados para o homem,¹⁹ mas eles são recomendados pela FDI como preliminares, quando se compara o grau de irritabilidade dos materiais odontológicos. Assim, embora o tecido subcutâneo não reproduza as condições pulpares e periapicais,¹⁴ é um método relativamente simples para identificar as possíveis reações dos materiais. Nossos resultados mostraram que os cimentos de OZE fluido, principalmente o Grupo IV (velho/fluido) em que se associou eugenol oxidado em excesso com íons zinco, foram os materiais mais irritantes ao tecido conjuntivo subcutâneo do rato.

Agradecimento

Aos funcionários Artur Mendonça e Maria da Glória Vieira Celli, pelo auxílio na obtenção das biópsias e confecção das lâminas; e Herminia Bassi Maio, pela colaboração no preparo do manuscrito.

COSTA, C. A. de S. et al. de Biocompatibility of rat's connective subcutaneous tissue to zinc oxide-eugenol implants varying the aging time of eugenol and the powder/liquid proportion. *Rev. Odontol. UNESP (São Paulo)*, v.25, n.1, p.135-144, 1996.

- **ABSTRACT:** *The biocompatibility of zinc oxide and eugenol dental cements (ZOE) was tested varying the aging time of eugenol and the powder/liquid proportions. Dorsal implants of polyethylene tubes containing the studied material were placed in the subcutaneous connective tissue of 48 rats and histopathologically observed in 15, 30 and 60 days period. In the first period, the new/dense ZOE (group I) promoted discreet inflammatory reaction with preponderance of mononuclear cells. In addition, it was found nearby the tube opening a compact and organized layer of collagen fibers and fibroblasts. Through the periods, it was noticed a decreasing of the inflammatory reaction and a healing of the tube opening region. In the last period (60 days), a connective tissue with dense fibers was covering the tube and surrounding area was showing normal histologic characteristics. The other 3 analysed groups (II – new/fluid; II – old/dense; IV – old fluid) presented inferior results. The more irritating were the more fluid ones. Therefore, new/dense ZOE (Group I) was considered the less irritating followed by the group III, II and IV.*
- **KEYWORDS:** *Zinc oxide-eugenol cement; biocompatible materials.*

Referências bibliográficas

- 1 BARKIN, M. E., BOYD, J. P., COHEN, S. Acute allergic reaction to eugenol. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.*, v.57, p.441-2, 1984.
- 2 BECKER, R. M., HUME, W. R., WOLINSKY, L. E. Release of eugenol from mixtures of zinc oxide and eugenol in vitro. *J. Pedodont.*, v.8, p.71-7, 1983.
- 3 BERMAN, D. S., MASSLER, M. Experimental pulpotomies in rat molars. *J. Dent. Res.*, v.37, p.229-42, 1958.
- 4 BRODIN, P. Neurotoxic and analgesic effects of root canal cements and pulp protecting dental materials. *Endod. Dent. Traumatol.*, v.4, p.1-11, 1988.
- 5 BRODIN, P., ROED A. Effects of eugenol on rat phrenic nerve and phrenic nerve-diaphragm preparations. *Arch. Oral Biol.*, v.29, p.611-5, 1984.
- 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 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.
- 8 CRAIG, R. G. *Restorative dental materials*. 6.ed. St. Louis: Mosby, 1980. p.443.
- 9 HENSTEN-PETTERSEN, A., HELGELAND, K. Evaluation of biologic effects of dental materials using four different cell culture techniques. *Scand. J. Dent. Res.*, v.85, p.291-6, 1977.
- 10 HOLLAND, R. et al. Estudo histológico do comportamento do tecido celular subcutâneo do rato ao implante de alguns materiais obturadores de canal radicular. Influência da proporção pó-líquido. *Rev. Assoc. Paul. Cir. Dent.*, v.25, p.101-10, 1971.
- 11 KENNETH, M. et al. Biologic properties of eugenol and zinc oxide-eugenol. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.*, v.73, p.729-37, 1992.

- 12 KOCH, G., MAGNUSSON, B., NYQUIST, G. Contact allergy to medicaments and materials used in dentistry. II. *Odontol. Revy*, v.22, p.275-89, 1973.
- 13 KOZAN, G. The effect of eugenol on nerve transmission. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.*, v.44, p.799-805, 1977.
- 14 LANGE LAND, K. et al. Methods in study of biologic responses to endodontic materials. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.*, v.27, p.522-42, 1969.
- 15 LEIRSKAR, J. On the mechanisms of cytotoxicity of silver and copper amalgams in a cell culture system. *Scand. J. Dent. Res.*, v.82, p.74-81, 1974.
- 16 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.
- 17 MERYON, S. D., JOHNSON, S. G., SMITH, A. J. Eugenol release and the cytotoxicity of different zinc oxide-eugenol combinations. *J. Dent.*, v.16, p.66-70, 1988.
- 18 MILES, D. A. Functions of zinc: a literature resume. *J. Oral Med.*, v.37, p.95-7, 1982.
- 19 ROWE, A. H. Z. Reaction of rat molar pulp to various materials. *Br. Dent. J.*, v.22, p.291-300, 1967.
- 20 SMITH, D. C., WILLIAMS, D. F. (Ed.) *The biocompatibility of dental materials*. Boca Raton: CRC Press, 1982. v.1, cap.1, p.6-7, 21.
- 21 TOBIAS, R. S., BROWNE, R. M., WILSON, C. A. Antibacterial activity of dental restorative materials. *Int. Endod. J.*, v.18, p.161-71, 1985.
- 22 WATTS, A., PATERSON, R. C. Pulpal response to a zinc oxide-eugenol cement. *Int. Endod. J.*, v.20, p.82-6, 1987.