

Mariana Carneiro Pereira

Síntese, Caracterização de nanopartículas de Óxido de Zinco e Avaliação Histológica de sua biocompatibilidade por meio de implantes intra-ósseos em cobaias *Guinea-Pig*.

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Uberlândia, para obtenção do Título de Mestre em Odontologia, Área de Concentração em Clínica Odontológica Integrada.

Uberlândia, 2011

Mariana Carneiro Pereira

Síntese, Caracterização de nanopartículas de Óxido de Zinco e Avaliação Histológica de sua biocompatibilidade por meio de implantes intra-ósseos em cobaias *Guinea-Pig*.

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Uberlândia, para obtenção do título de Mestre em Odontologia.

Área de Concentração: Clínica Odontológica Integrada

Orientador: Prof. Dr. Cássio José Alves de Sousa

Co-Orientador: Prof.Dr. Noélio O. Dantas

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Cássio José Alves de Sousa

Prof. Dr. Carlos José Soares

Prof. Dr. Manuel Damião de Sousa Neto

Uberlândia, 2011



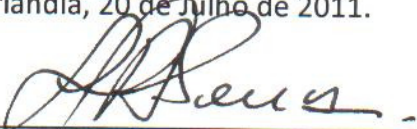
SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
ODONTOLOGIA

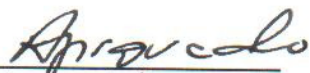


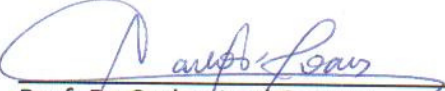
RELATÓRIO DA COMISSÃO JULGADORA DA 205ª DEFESA DE MESTRADO DA CD MARIANA CARNEIRO PEREIRA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA DESTA UNIVERSIDADE.

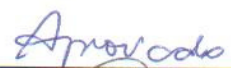
Às nove horas e trinta minutos do dia vinte de julho do ano de dois mil e onze, reuniu-se a Comissão Julgadora aprovada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Uberlândia, para o julgamento da Dissertação de Mestrado apresentada pela candidata MARIANA CARNEIRO PEREIRA com o *título: Síntese, Caracterização de nanopartículas de óxido de zinco e Avaliação Histológica de sua biocompatibilidade por meio de implantes intra-ósseos em cobaias Guinea-pig*. O julgamento do trabalho foi realizado em sessão pública compreendendo a exposição, seguida de arguição pelos examinadores. Encerrada a arguição, cada examinador, em sessão secreta, exarou o seu parecer. A Comissão Julgadora, após análise do Trabalho, verificou que o mesmo encontra-se em condições de ser incorporado ao banco de Dissertações e Teses da Biblioteca desta Universidade. Acompanham este relatório os pareceres individuais dos membros da Comissão Julgadora.

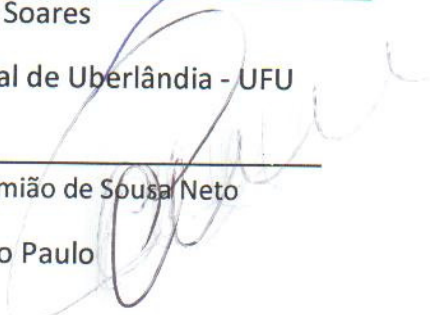
Uberlândia, 20 de Julho de 2011.

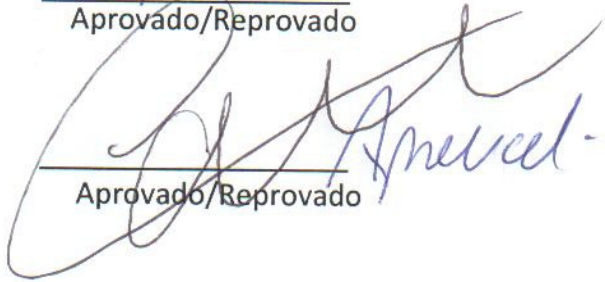

Prof. Dr. Cássio José Alves de Sousa
Titulação: Doutor
Universidade Federal de Uberlândia – UFU


Aprovado/Reprovado


Prof. Dr. Carlos José Soares
Titulação: Doutor
Universidade Federal de Uberlândia - UFU


Aprovado/Reprovado


Prof. Dr. Manoel Damião de Sousa Neto
Titulação: Doutor
Universidade de São Paulo


Aprovado/Reprovado

Dedico este trabalho a todos que me acompanharam nesta trajetória, em especial aos meus pais, **Angelo e Ana Lúcia** e ao meu marido, **Tiago**.

Agradecimentos

Ao **Angelo e Ana Lúcia**, meus pais, grandes amigos e companheiros da minha vida. Pelo incentivo, pela confiança, pela acolhida em todas as horas e, sobretudo, pelo privilégio de ser filha ... Muito Obrigada!!!

Ao **Tiago**, meu marido e ponto de apoio. Agradeço pela paciência, pelo amor, pela compreensão, pois não é nada fácil conviver com quem tem tanto o que pesquisar e tão pouco tempo para tudo mais.

Aos meus irmãos, tios e avós pela torcida e força irrestrita e, em especial minha **avó Lúcia** que, de outros mundos, acompanha e se alegra com essa conquista.

Ao **Prof. Dr. Cássio José Alves de Sousa**, meu Orientador – profissional e pesquisador incansável, agradeço pela oportunidade deste desafio.

Ao meu Co-Orientador e amigo **Prof. Dr. Noélio Oliveira Dantas**, seu caráter e sua concepção do que é a docência e a pesquisa científica me acompanhará por toda vida. Agradeço pela atenção constante, pela paciência, pelo incentivo e por tudo que me ensinou.

Ao **Prof. Adriano Loyola**, sempre disponível e atencioso, agradeço especialmente as contribuições e sugestões no meu processo de Qualificação.

Á todos os Professores do Programa de Mestrado em Odontologia, pelo conhecimento compartilhado e experiências divididas.

Á **Graça**, secretária do Programa de Mestrado, agradeço por toda ajuda e atenção.

Aos alunos da minha turma do Mestrado, por todos os momentos de uma convivência amigável e carinhosa.

Á **Anielle**, querida amiga, pela disposição em ajudar, sempre com um sorriso amável, agradeço.

Ao **Ronaldo**, meu parceiro de mestrado, companheiro para todas as horas, a quem tanto desabafei, meu braço direito e esquerdo, outro grande obrigada.

“Os sonhos não determinam o lugar onde vamos chegar, mas produzem a força necessária para nos tirar do lugar em que estamos.”

(Cury A, 2007)

SUMÁRIO

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS	2
RESUMO	4
ABSTRACT	6
1. INTRODUÇÃO	8
2. REVISÃO DE LITERATURA	11
2.1. Estudos relevantes sobre cimentos a base de óxido de zinco e eugenol	11
2.2. Estudos relevantes sobre a nanotecnologia	22
2.3. Nanopartículas de óxido de zinco	23
2.4. Estudos de biocompatibilidade relevantes para a metodologia da presente pesquisa	30
3. PROPOSIÇÃO	34
4. MATERIAL E MÉTODOS	36
4.1 Síntese dos nanocristais de ZnO	36
4.2 Caracterização dos nanocristais de ZnO	36
4.3 Material testado	37
4.4 Implante intra-ósseo	37
4.5 PROCEDIMENTOS LABORATORIAIS	39
4.5.1 Preparo histológico	40
4.5.2 Critérios histológicos	40
4.5.3 Avaliação semiquantitativa da resposta inflamatória	41
4.4.3 Requisitos histológicos	42
4.5.3.1 Avaliação	42
4.5.3.2 Interpretação	43
5. RESULTADOS	45
5.1 Caracterização dos nanocristais de ZnO	45
5.2 Controles	46
5.3 Material testado	47
5.3.1 Avaliação da resposta inflamatória	48
6. DISCUSSÃO	53
7. CONCLUSÃO	61
8. REFERÊNCIAS	63

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADA –	American Dental Association
CS –	Citosan
CuO –	Óxido de Cobre
FDI –	Federation Dentaire International
G –	Gramas
IRM –	Intermediate restorative material
ISO –	International Standards Organization
Kg –	Kilograma
L –	Litros
M –	Molar
Mg –	Miligrama
mg/ml –	Miligrama por mililitros
mm –	Milímetros
MTA –	Mineral Trióxido Agregado
MTT –	Metil tiazolil tetrazolim
NCs –	Nanocristais
Nm –	Nanômetro
NP –	Nanopartícula
OZE –	Óxido de Zinco e Eugenol
RPM –	Rotação por minuto
SEM –	Scanner de Microscopia Eletrônica
SR –	Sulforhodamine-B
TEM –	Microscópio de Transmissão Eletrônica
TiO ₂ –	Dióxido de Titânio
TNF –	Fator de Necrose Tumoral
UV –	Ultra-Violeta
ZnO –	Óxido de Zinco
WST –	Solubilidade em água de tetrazolim
Mm –	Micrômetro

RESUMO

As investigações a cerca da nanotecnologia e o desenvolvimento de novos materiais para aplicações diversas é fato comprovado pela literatura. Verifica-se ainda, nos dias atuais, a falta de consenso entre os pesquisadores sobre qual o material ideal para ser utilizado como obturador endodôntico. Assim, o presente trabalho realizou a síntese, caracterização e a avaliação histológica de nanocristais de óxido de zinco, por meio de testes biológicos, segundo critérios estabelecidos pela Federação Dentária Internacional. A composição química e o grau de pureza do material foram verificados por meio de espectroscopia Micro-Raman (Raman) e sua estrutura espacial, fase e tamanho médio por meio da difratograma de raios X (DRX). Os nanocristais de óxido de zinco foram obtidos através da transformação do complexo tetraminzinco em um pó de coloração branca de óxido de zinco, em pH 8,5 a 80⁰ C. Este pó, provavelmente amorfo, foi mantido à temperaturas elevadas de 500⁰ C por duas horas objetivando a sua cristalização. Foram utilizadas 10 cobaias ("Guinea Pig") divididas em períodos experimentais de 30 e 90 dias. Foram realizados dois implantes intra-ósseos em cada animal, na região entre a sínfise mandibular e dentes incisivos. Para acondicionar os materiais testados, foram utilizados copos de Teflon, tendo suas laterais como controle. Decorridos os períodos experimentais, os animais foram sacrificados e os espécimes preparados para o exame histológico de rotina. Após análise pelo espectro Micro-Raman e o difratograma de Raio X visualizamos que os nanocristais de óxido de zinco apresentaram-se com um tamanho médio de 21nm, estrutura hexagonal, não sendo observada a presença de impurezas ou outros compostos misturados. A reação tecidual aos nanocristais de Óxido de Zinco apresentou-se predominantemente de intensidade ausente/suave, caracterizando o material como biocompatível no modelo teste, segundo os protocolos da FDI e ANSI/ADA.

Palavras – chave: Biocompatibilidade. Endodontia. Nanocristais de óxido de zinco. Nanobiotecnologia

ABSTRACT

Investigations about nanotechnology and the development of new materials for various applications is the fact evidenced by literature. There is, today, the lack of consensus among researchers about what the ideal material to be used as endodontic filling. Thus, the present study evaluated the synthesis, characterization and histological evaluation of zinc oxide nanocrystals through biological tests, according to criteria established by the International Dental Federation. The chemical composition and purity of the material were verified by Micro-Raman spectroscopy (Raman) and their spatial structure, phase and average of the particle size by X-ray diffraction (XRD). Ten *guinea pigs* ("Guinea Pig"), divided into experimental periods of 30 and 90 days, were used. Two intra-osseous implants were performed in each animal in the region between the mandibular symphysis, and incisors. To pack the materials tested, Teflon cups were used with their side as a control. After the experimental periods, animals were sacrificed and specimens were prepared for the routine histological examination. The nanocrystals of zinc oxide presented with a size of 21nm, hexagonal structure, not observed the presence of impurities. Tissue reaction to zinc oxide nanocrystals showed predominantly absent/mild intensity, characterized the material as biocompatible in the model test, according to the protocols of the FDI and ANSI/ADA.

Key words: Biocompatibility. Endodontics. Zinc oxide nanocrystals. Nanobiotechnology.

1. INTRODUÇÃO

O sucesso do tratamento endodôntico depende da completa remoção dos conteúdos necróticos e infectados dos sistemas de canais radiculares, proporcionado por limpeza eficiente, neutralização de microbiota presente, e acompanhada de selamento hermético. Além das propriedades físico-químicas, tais como estabilidade dimensional; baixa solubilidade; adesividade; radiopacidade e capacidade de selamento apical, o cimento obturador deve ser biocompatível, ou seja, deverá não induzir dano adicional aos procedimentos da terapêutica endodôntica (Huang et al., 2002; Sousa et al., 2004; Bodrumlu, 2008).

Nesse contexto, os materiais à base de óxido de zinco e eugenol têm sido empregados com êxito na prática endodôntica, sendo muito utilizados nas últimas décadas (Economides et al., 1995; Koloukouris et al., 1998; Schwarze et al., 2002). Vários ensaios biológicos e estudos ,*in vitro*", mostraram que cimentos à base de óxido de zinco e eugenol apresentam propriedades físico-químicas e biológicas que sustentam a sua indicação na terapêutica endodôntica. Assim, embora induzam lesões teciduais em curto prazo, seu efeito patogênico é reduzido a médio e longo prazo (Hume, 1988; Gerosa et al., 1996; Leonardo et al., 2000; Schwartz et al., 2002; Schwartz et al., 2002; Lee et al., 2002; Mendes et al., 2003; Batista et al., 2006; Kasemets et al., 2009). Estudos experimentais em *guinea pigs* mostram que, após 90 dias de observação, observa-se tecido conjuntivo remodelado normal ou cicatricial envolvendo o material implantado, em geral, separando o material implantado do tecido ósseo normal, que se encontra estável, sem sinais aparentes de necrose ou reabsorção. Nestes casos, vale salientar que os efeitos precoces ou tardios têm sido atribuídos quase que exclusivamente ao efeito tóxico do eugenol (Sousa et al., 2004).

O desenvolvimento da nanociência, nesta última década, proporcionou grandes avanços no domínio da síntese e caracterização de materiais. A redução do material à escala nanométrica traz modificações nas suas propriedades estruturais e físico-químicas e, com isto, dúvidas são suscitadas

se estas propriedades estariam acompanhadas de efeitos biológicos inusitados, diferentes daqueles já mensurados para partículas microdimensionadas presentes nos materiais tradicionalmente empregados na prática médica (Kasemets et al., 2009).

Até o presente momento, são escassos os estudos que avaliam a biocompatibilidade de cimentos obturadores em escalas nanométricas (menor que 100nm). Todavia, estudos ,”*in vitro*”, identificam que nanocristais de ZnO apresentam propriedades antibacterianas (Kishen et al., 2007; Shrestha et al., 2010). Da mesma forma, Liu et al., (2009) afirmaram que NP de ZnO podem distorcer e danificar a membrana celular bacteriana, resultando na quebra dos conteúdos intracelulares e eventualmente na morte das células bacterianas, recorrendo sobre a sua capacidade antimicrobiana a *E.coli*.

Paralelamente, tem sido também observado que estes nanocristais são tóxicos para células em cultura, mostrando impactos em órgãos como: coração, pâncreas, osso, fígado e pulmão (Song et al., 2010). Embora ainda não seja bem elucidado os riscos que essas partículas possam trazer para saúde humana, acredita-se que após a sua administração sistêmica, essas pequenas partículas possam penetrar os capilares e circular por todo organismo inclusive no cérebro (Hu et al., 2010).

Portanto, parece-nos importante a realização de estudo da biocompatibilidade utilizando metodologia padronizada, de fácil reprodução e com resultados baseados em análises semiquantitativas adequadas, para avaliar as propriedades dos nanocristais de óxido de zinco em ensaio biológico, após sua síntese e caracterização física, analisando sua forma, tamanho e estrutura. A hipótese a ser testada é se o nanopó de óxido de zinco apresenta característica de biocompatibilidade, visando aplicações como integrante de cimento obturador endodôntico favorecendo o surgimento de materiais livres de eugenol.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Estudos relevantes sobre cimentos a base de óxido de zinco e eugenol

Hume (1988), estudou a liberação do eugenol analisando amostras de OZE por meio da marcação do eugenol pelo trítio radioativo. Verificaram que ao ocorrer o contato deste produto com solução salina, nota-se imediata liberação de eugenol da superfície do cimento. O maior índice de liberação foi encontrado no primeiro momento após este contato, decrescendo nos períodos posteriores. Verificaram, ainda, que esta liberação de eugenol ocorre apenas na superfície do OZE e não em função do volume da amostra. O decréscimo desta liberação ocorre pela diminuição da quantidade de eugenol da camada superficial.

Pascon & Langeland (1989), testaram um cimento obturador de canal à base de hidróxido de cálcio – Apexit – que foi comparado com o AH26, Endo-Fill, Dentinol e o Óxido de Zinco/Eugenol. Os materiais foram classificados por ordem decrescente de toxicidade, após 4 horas de contato material/célula, em: Fresco: OZE, AH26, Dentinol, Endo-Fill, e Apexit; 24 horas de presa: OZE, Endo-Fill, Apexit, AH26, e Dentinol; 60 horas de presa: OZE, Endo-Fill, AH26, Dentinol, e Apexit. Os resultados mostraram que, embora o AH26 e o Dentinol tenham apresentado toxicidade elevada quando recentemente preparados, ela era muito baixa após 24 e 60 horas de presa, e que o material Apexit apresentou baixa toxicidade em todo o experimento.

Gulati et al (1991), avaliaram a citotoxicidade de dois cimentos endodônticos à base de óxido de zinco em suas formulações. Os cimentos utilizados foram: o óxido de zinco e eugenol e o óxido de zinco glicerina. Utilizaram 15 ratos albinos injetando estes materiais no tecido subcutâneo. As reações inflamatórias foram analisadas nos períodos de 1, 7 e 15 dias e comparadas por meio da verificação do número de polimorfonucleares presentes nos cinco ratos de cada tempo experimental. Os resultados mostraram que em todos os períodos avaliados a toxicidade foi maior para o cimento contendo óxido de zinco e eugenol. Para o cimento sem eugenol, as

reações foram menos significativas e diminuíram com o transcorrer do experimento.

Mittal et al (1995), avaliaram a resposta tecidual histológica de quatro cimentos endodônticos. Os cimentos foram: óxido de zinco e eugenol, Sealapex, Tubli Seal e Endoflas F.S. Participaram do estudo 15 ratos albinos adultos pesando em média de 150 a 200g. Em cada rato foi demarcado, na superfície dorsal, cinco círculos que receberiam os materiais a serem testados. O estudo foi conduzido em cinco fases (48 horas, 7 dias, 14 dias, 1 mês, e três meses) e para cada fase três animais eram sacrificados. Após a morte dos animais o processamento histológico foi realizado e a resposta inflamatória foi avaliada em: grau 0, grau 1, grau 2 e grau 3. Os cimentos a base de óxido de zinco e eugenol, Tubliseal e Endoflas F.S apresentaram severa toxicidade em 48 horas, porém a partir de 7 dias apresentaram diminuição graduativa dos seus efeitos. Após três meses nenhuma reação inflamatória foi vista por qualquer cimento analisado.

Economides et al (1995), estudaram a biocompatibilidade de quatro cimentos endodônticos sendo que dois deles eram a base de hidróxido de cálcio (CRCS, Sealapex), um deles era a base de óxido de zinco e eugenol (Roth 811) e o outro era a base de resina epóxica (AH-26). O estudo também avaliou a influência dos cimentos nas concentrações de cálcio e zinco nos tecidos dos ratos (cérebro, fígado, rim, e útero). Cada cimento foi carregado em tubos de teflon e implantado em subcutâneo de ratos. Após 7,14 e 21 dias, os implantes foram removidos, fixados e preparados para análise histológica. Foram observadas um total de 100 espécimes. Os resultados evidenciados mostraram que no sétimo dia o material mais irritante foi o AH-26, porém sua reação inflamatória diminuiu com o tempo do experimento. Os cimentos Roth 811 e o Sealapex são responsáveis por desenvolver reações inflamatórias de moderada a severa, enquanto o cimento CRCS causou reação de média a moderada. Quanto à concentração de íons de zinco e cálcio, o autor concluiu que os cimentos CRCS e Roth 811 induzem a redistribuição de íons de zinco, enquanto que o cimento AH-26 induzem variações de íons de cálcio no organismo.

Gerosa et al (1996), avaliaram, “*in vitro*”, a citotoxicidade do eugenol puro. Foram utilizados fibroblastos gengivais humanos, extraídos de biópsias

gingivais, incubados em placa de cultura de 25cm² com HEPES (solução tamponada), 2% de glutamina, 0,11 g/l de ácido pirúvico, 0,05 mg/l de glucose, 10% de soro fetal de bezerro e 3,7 g/l de NaHCO₃. Após todo o preparo laboratorial, a citotoxicidade foi determinada expondo as células a várias concentrações de etanol (0,017 a 1,75M). Subsequentemente, 20 l (0,34M) de álcool diluído com eugenol na concentração entre 0,015 a 974M foram adicionados às células e estas incubadas a 37° C com 100% de umidade por 48 horas. A citotoxicidade foi determinada utilizando método de quantificação das células sobreviventes de acordo com os critérios estabelecidos por Landegren (1984). No grupo de células controle, não expostas ao álcool, a vitalidade celular permaneceu inalterada até a concentração final de 0,68M. Com o aumento das concentrações, a sobrevivência celular reduziu significadamente. Os experimentos que continham o eugenol, com concentrações superiores a 1,9M, demonstraram ser citotóxicos. Este autor relata, que a toxicidade do óxido de zinco e eugenol está diretamente relacionada com a concentração de eugenol presente no cimento.

Kolokouris et al (1998), avaliaram, “*in vivo*”, a biocompatibilidade de dois cimentos endodônticos: Apexit (a base de hidróxido de cálcio) e Pulp Canal Sealers (a base de óxido de zinco e eugenol) após a implantação de tubos de teflon em tecido conectivo de rato. Participaram do estudo 44 ratos pesando de 150 a 200g. Os animais foram divididos em quatro grupos, observados por tempos de 5, 15, 60 e 120 dias. Em cada tempo experimental havia um grupo controle. Foi avaliado o tecido ao redor da área cirúrgica, a ocorrência e localização de tecido fibroso, os tipos de células inflamatórias e as variações vasculares. O estudo mostrou presença de reações inflamatórias severas com diferentes extensões e necrose para o cimento Apexit, no período de 5 a 15 dias, diminuindo a reação com 60 dias e continuamente com 120 dias. Áreas de necroses também foram observadas com o cimento Pulp Canal Sealer, apresentando de reações moderadas a severas até o quinto dia experimental, diminuindo sua intensidade com o passar do tempo.

Hashieh et al (1999), investigaram a liberação de eugenol dos cimentos à base de óxido de zinco e eugenol, em ápices de dentes obturados pelas técnicas de cone único e pelo Thermafil. A coroa de 10 incisivos centrais superiores foi removida e os canais preparados com limas profile para receber

as obturações. No estudo, cinco desses dentes foram obturados usando o cone Thermafil número 30 e os outros cinco dentes foram obturados com guta-percha cone 30. A liberação do eugenol foi determinada por espectrofluorescência após 1 dia e 1 mês. O estudo mostrou que pela técnica de cone único foi liberado mais eugenol do que a técnica usando o thermafil e que em ambas as técnicas, com o passar do tempo, a concentração do eugenol diminuiu. Os autores concluíram que o nível de eugenol liberado do cimento a base de óxido de zinco e eugenol além ápice é baixo e que diminui sua concentração com o passar do tempo.

Guigand et al (1999), avaliaram, “*in vitro*”, a relativa citocompatibilidade de três materiais endodônticos. Os materiais avaliados eram à base de hidróxido de cálcio e cimento à base de óxido de zinco e eugenol. A avaliação foi conduzida em 24, 72 e 168 horas após o contato dos materiais, com as técnicas de colorimetria, *scanner* de microscopia eletrônica e citometria. Os resultados confirmaram que o cimento a base de óxido de zinco e eugenol apresentam maior toxicidade inicial, diminuindo com o tempo.

Tassery et al (1999), investigaram a resposta tecidual dos materiais Vitremer (íonômero de vidro) e Super EBA (cimento de óxido de zinco e eugenol) na mandíbula e no fêmur de coelhos. Participaram do estudo 22 coelhos pesando 2,5 kg. Os animais receberam tubos de silicone esterilizados contendo os materiais testados. Foram realizadas cirurgias no osso mandibular e na porção média do fêmur. Os animais também receberam 8 tubos de silicones vazios para controle negativo. Após a realização da cirurgia, os animais foram observados por períodos de 4 a 12 semanas. Os coelhos foram sacrificados, e através de análises histológicas foi determinado o nível da resposta inflamatória. Os resultados mostraram que na quarta semana nenhuma diferença significativa havia sido encontrada entre os sítios de implantação, porém na décima segunda semana, a cicatrização do osso se mostrou melhor na mandíbula que no fêmur. Quanto aos materiais testados, o Vitremer na quarta semana apresentou biocompatibilidade similar ao Super EBA e superior na décima segunda semana.

Leonardo et al (2000), avaliaram a citotoxicidade de cinco cimentos de canais radiculares. Dos cimentos analisados, quatro deles à base de hidróxido de cálcio (Sealapex, CRCS, Apexit, e Sealer 26) e um à base de óxido de zinco

e eugenol (Fill Canal). Foram avaliadas microscopicamente as alterações morfológicas em macrófagos peritoniais de ratos. Os autores concluíram que cimento menos tóxico foi o Fill canal, seguidos pelos cimentos CRCS, Sealer 26, Apexit, e Sealapex.

Leonardo et al (2000), realizaram estudo para avaliar, "*in vitro*", a atividade antimicrobiana de cimentos e pastas de uso endodônticos. Foram utilizados quatro cimentos (AH plus, Sealapex, Ketac Endo, e Fill Canal), duas pastas à base de hidróxido de cálcio (Calen, e Calasept) e uma pasta de óxido de zinco. Foram avaliadas sete bactérias utilizando o método de difusão de Agar com infusão de Brain Heart e Muller Hinton. O estudo mostrou que as bactérias foram inibidas por todos os materiais testados, porém esse fato ocorreu apenas quando as culturas de células estavam otimizadas com 0,05g% TTC gel.

Azar et al (2000), compararam os efeitos citotóxicos dos cimento endodôntico: AH Plus com os cimentos AH-26 e o óxido de zinco e eugenol em fibroblastos humanos. A citotoxicidade foi avaliada por meio da incubação direta das células sobre os cimentos em diferentes intervalos de tempos: 1 hora, 4 horas, 8 horas, 24 horas, 48 horas, 5 dias, 1 semana, 2 semanas, 4 semanas, 5 semanas. Os resultados demonstraram que os efeitos citotóxicos induzidos pelo óxido de zinco e eugenol foram detectados muito cedo, 1 hora após manipulação e mantida em alto nível até completar todo o tempo experimental. O cimento AH-26 induziu citotoxicidade na primeira semana, reduzindo substancialmente com o tempo. O cimento AH Plus limitou sua toxicidade ao período inicial do experimento e após 4 horas da sua manipulação não era mais detectado nenhuma toxicidade.

Figueiredo et al (2001), avaliou a presença de pigmentação causada por cimentos endodôntico e a resposta tecidual a quatro cimentos injetados ou implantados na mucosa oral de coelhos. Participaram do estudo 30 coelhos, divididos em quatro grupos. No grupo I e grupo II, com 8 animais em cada grupo, testaram respectivamente os cimentos N- Rickert e AH-26. Os grupos III e IV eram representados por 7 animais e em cada grupo foi testado respectivamente os cimentos Fillcanal e Sealer 26. Cada animal recebeu do lado direito do sulco gengivo-labial a injeção do cimento e do lado esquerdo era implantado com tubo de polietileno o mesmo material. Os períodos

experimentais foram de 30, 60 e 90 dias. Passados os tempos cirúrgicos, os animais foram sacrificados e as análises histológicas realizadas. Os resultados mostraram que não existe relação entre os métodos aplicados, a presença de pigmentação e a resposta tecidual, e que somente produz pigmentação os cimentos que apresentam a prata em sua composição. Os autores concluíram, ainda, que dos cimentos utilizados o que promove melhor cicatrização é o cimento a base de hidróxido de cálcio (Sealer 26) e o mais irritante é o Fillcanal, à base de óxido de zinco e eugenol).

Lee et al (2002), testaram a habilidade de adesão de cimentos endodônticos na dentina e na guta-percha. Os cimentos testados foram: Kerr (à base de óxido de zinco e eugenol), Sealapex (à base de hidróxido de cálcio), AH 26 (à base de resina) e Ketac-endo (à base de ionômero de vidro). O estudo mostrou que os piores resultados foram encontrados na adesão a dentina pelo cimento base de óxido de zinco e eugenol. Bons resultados foram obtidos quando a adesão foi à guta-percha, provavelmente, devido a presença de ingredientes em comum. Os autores concluíram que os melhores resultados foram encontrados com os cimentos a base de resina.

Huang et al (2002), determinaram a citotoxicidade e a biocompatibilidade de diferentes tipos de cimentos endodônticos em células humanas do ligamento periodontal e em células permanentes de Hamister. Foram utilizados seis cimentos, sendo eles: AH-26, AH plus (à base de resina), Canals, Endomethasone, N₂ (à base de óxido de zinco e eugenol) e Sealapex (à base de hidróxido de cálcio). Os materiais foram preparados em meio de cultura por 1, 2, 3 e 7 dias. A citotoxicidade foi avaliada por meio da redução do brometo de tetrazolim em linhagem de células humanas e em células derivadas de Hamister. Os resultados mostraram que os cimentos à base de resina, óxido de zinco e eugenol e hidróxido de cálcio são responsáveis por desenvolver citotoxicidade em células humanas e permanentes de Hamister. Dentre os cimentos analisados, o que apresentou menor toxicidade foi o Sealapex e o mais irritante foi o N₂.

Schwarze et al (2002), avaliaram a compatibilidade celular de cinco cimentos endodônticos (N₂, Endometasona, Apexit, AH Plus, e Ketac-endo) durante as primeiras 24 horas após a sua manipulação. Foram preparados e manipulados 300 mg de cada cimento e aplicados em um molde de plástico.

Os espécimes foram mantidos em cultura de células por um período de 0, 1, 5, e 24 horas, para analisar as células de fibroblastos 3T3 e fibroblastos permanentes de ligamento periodontal humanos. Os autores afirmaram que o cimento N₂ é responsável por causar completa inibição da atividade mitocondrial nos período de 24 horas, enquanto o cimento endometasona inibe nas primeiras cinco horas diminuindo sua toxicidade nas 24 horas. Portanto, o cimento Apexit não revelou nenhum potencial tóxico.

Schwarze et al (2002), investigaram a citotoxicidade de vários tipos de cimentos endodônticos (N₂, Apexit, Roekoseal, AH Plus, Ketac-endo, Endometasona) e ao cone de guta-percha. O estudo foi realizado ,*“in vitro”*, em período de 1 ano, usando modelo teste de dentes humanos extraídos. Foram utilizadas 24 raízes de dentes anteriores ou de pré-molares no experimento, preparadas com limas de Níquel Titânio (Profile). Após o preparo, estas foram obturadas. Em adição, três canais foram obturados por condensação lateral de guta-percha e o cimento N₂ para determinar a influência do cimento na citotoxicidade. Todos os espécimes foram mantidos em água destilada por período de um ano, para análise da toxicidade em fibroblastos 3T3 e ligamento periodontal humano. Pronunciados efeitos foram encontrados apenas pelo cimento N₂, em ambas as culturas de células; na décima semana foram encontradas alterações citotóxicas significativas induzidas pelo cimento Endometasona. Os outros materiais não apresentaram alterações no metabolismo celular significativa.

Mendes et al (2003), avaliaram os efeitos na aderência, na atividade fagocitária, de interleucinas 12 e na produção de óxido nítrico de dois cimentos obturadores endodônticos contendo eugenol. Os cimentos a base de óxido de zinco e eugenol selecionados foram: Pulp Canal Sealer EWT e o Endofill. Os cimentos foram preparados e após o tempo de presa foram determinados à atividade macrofágica. Os materiais foram colocados em tubo de vidro e avaliados em cultura. Os autores afirmaram que os cimentos não afetam na viabilidade dos macrófagos, porém alteram na aderência e na fagocitose. Os autores concluíram que os cimentos testados não influenciam nas respostas pró-inflamatórias (produção de inter-12), mas causam efeitos inibitórios na fagocitose e produção de óxido nítrico.

Sousa et al (2004), realizaram experimento para avaliar as propriedades biológicas dos materiais obturadores óxido de zinco e eugenol, MTA e com resina Z-100 em cirurgia apical. O estudo seguiu os critérios adotados pela FDI e ADA. Foram realizados implantes intra-ósseos em 30 *guinea pigs*, sendo 10 cobaias para cada material testado. Após a cirurgia ser realizada e esperados os tempos de observação de 4 e 12 semanas, os animais foram sacrificados, tiveram suas mandíbula dissecadas e preparadas para análises histológica. A lateral do tubo de teflon serviu como controle negativo. Após as análises qualitativas da intensidade de resposta e sua classificação em ausência de reação, reação moderada e reação severa, os autores concluíram que apenas o óxido de zinco e eugenol não apresenta nível de biocompatibilidade aceitável.

Perassi et al (2004), analisaram a produção de TNF-alfa em macrófagos peritoniais de camundongos quando expostos a dois diferentes cimentos endodônticos. Foram utilizados oito camundongos de 6 a 8 semanas, pesando de 25 a 30 g. Os cimentos Sealapex (a base de hidróxido de cálcio) e Endometasona (a base de óxido de zinco e eugenol) foram preparados em soluções que apresentavam concentrações de 100, 50 e 25 mg/ml. Os camundongos receberam injeção abdominal para estimulação de macrófagos e foram sacrificados após 72 horas. Cinquenta mililitros das concentrações das soluções dos cimentos foram adicionados nas placas de cultura de células e analisados. Os autores concluíram que o cimento à base de óxido de zinco e eugenol (Endometasona) é tóxico e estimula os macrófagos peritoniais de camundongos a liberarem altas concentrações de TNF-alfa.

Bernabé et al (2005), realizaram estudo, "*in vivo*", para comparem os efeitos do MTA, IRM, Super EBA e OZE, usados para obturação retrógrada, no processo de reparo dos tecidos periapicais de dentes de cães. A amostra era composta por 24 pré-molares superiores e inferiores de três cães. Na primeira intervenção foi realizada abertura coronária e pulpectomia, sendo que os elementos foram mantidos abertos para o meio oral por 180 dias para induzir a formação de lesão peiapical, e confirmada radiograficamente. Na segunda intervenção os cães foram submetidos a cirurgias apicais seguidas de retrobturação convencional realizada pelos cimentos MTA, IRM, Super EBA e o OZE. Os autores concluíram que o OZE apresentou influência negativa

significativamente maior no reparo apical quando comparado com os outros materiais testados.

Koulaouzidou et al (2005), avaliaram a atividade antiproliferativa de três materiais dentários (MTA, cimentos à base de óxido de zinco e eugenol e cimento à base de ionômero de vidro) contra a estabilização fibroblástica de três linhagens de células (L929, BHK21/C13, RPC-C2A). Os três materiais testados ProRoot MTA, IRM e GC Fuji II foram preparados de acordo com as instruções dos fabricantes e inseridos em poços com diâmetro de 0,4 µm. Após 48 horas, os materiais receberam irradiação UV e foram incubados por um período de 12, 24 e 48 horas. Após esse período, o número de células foi estimado pelo SR (sulforhodamine –B). Os resultados mostraram que o IRM foi o material mais tóxico e que os MTA e o Fuji II provaram ser materiais biocompatíveis.

Souza et al (2006), realizaram estudo para avaliar as propriedades biológicas dos cimentos EndoREZ e Epiphany, comparando-os com o convencional AH Plus, seguindo os critérios estabelecidos pelo FDI. Para o experimento, foram utilizadas 30 cobaias de *guinea pig* divididas em três grupos, sendo 10 animais para cada um dos cimentos. O experimento foi observado por períodos de 4 a 12 dias, logo após as cobaias foram sacrificadas e o processamento histológico realizado. O critério de avaliação adotado foi uma análise qualitativa em que se examinava a intensidade da resposta inflamatória e a classificava em ausência de reação, reação leve, reação moderada e reação severa. Os autores concluíram que somente o cimento Epiphany apresentou características de biocompatibilidade

Zafalon et al (2007), realizaram um experimento objetivando avaliar reações em tecidos conectivos de ratos para os cimentos endodônticos Endomethasone e EndoREZ. Para o experimento foram utilizados 40 roedores machos divididos em dois grupos, 20 animais para cada um dos cimentos. Após os períodos experimentais de 15, 30, 60 e 90 dias, as cobaias foram sacrificadas e os espécimes processados histologicamente. O critério de avaliação adotado foi uma análise qualitativa em que se examinava a intensidade da resposta inflamatória e a classificava em ausência de reação, reação leve, reação moderada e reação severa. Os autores concluíram que somente pode ser considerado biocompatível o cimento Endomethasone.

Batista et al (2007), realizaram análise histológica da reação tecidual causada por cones de guta-percha e cimentos endodônticos. Os cones foram utilizados por implantes em cânulas de polietileno sob condições similares a realidade clínica. Foram utilizados os cimentos Endofill, Endometasone, Sealer 26 e AH Plus. Após os implantes serem realizados, as reações inflamatórias causadas foram avaliadas em 7, 14 e 30 dias, usando análise histopatológica descritiva. As respostas inflamatórias foram classificadas em ausente, discreta, moderada e intensa. Os resultados mostraram que o cimento que apresenta melhores respostas biológicas foi o Endometasone e o mais irritante foi o Endofill. Os autores concluíram que todos os cimentos analisados causaram respostas inflamatórias em subcutâneos dos ratos e que a intensidade varia de acordo com o tipo de cimento e com o período pós-implante.

Gomes Filho et al (2007), avaliaram, "*in vivo*", a biocompatibilidade dos cimentos endodônticos Endomethasone, Pulp Canal Sealer EWT e AH Plus por meio de implantes em tecidos subcutâneo de ratos. Foram usados 24 ratos pesando de 180 a 200g, recebendo três implantes cada. Os implantes foram realizados com tubos de polietilenos preenchidos com o cimento e um implante vazio para ser o controle. Os implantes foram removidos após 3, 7 e 30 dias e examinados a microscópio quanto à reação inflamatória. Os autores concluíram que os cimentos apresentam similares poderes de irritação, sendo mais severa no início e diminuindo com o tempo. Concluíram ainda que houve melhor organização tecidual frente ao Pulp Canal Sealer EWT que ao Endomethasone e AH-Plus.

Bodrumlu et al (2007), realizaram revisão de literatura sobre a biocompatibilidade dos materiais de obturação retrógrada (amálgama, guta-percha, cimentos óxido de zinco e eugenol, cimento de ionômero de vidro, compósito de resina e MTA). O autor discute que ainda não existe material ideal que ofereça o selamento hermético entre periodonto e sistema de canais radiculares, porém afirma que o MTA e o Super EBA (cimento reforçado à base de óxido de zinco de eugenol) parecem ser os mais biocompatíveis quando colocados em cavidades apicais.

Da Silva et al (2008), avaliaram, "*in vitro*", a citotoxicidade de quatro cimentos obturadores: Top Seal (à base de resina epóxica), EndoREZ (à base de metacrilato), Tubliseal e Kerr Pulp Canal Sealer (à base de óxido de zinco e

eugenol) e seus efeitos na liberação de reativos intermediários de oxigênio e nitrogênio em cultura de macrófagos peritoniais de ratos. A cavidade peritoneal de camindongos foi irrigada com 5 ml de solução salina 10 mM. As células foram lavadas duas vezes em então suspensas em meio apropriado para os testes. A citotoxicidade dos cimentos foi determinada pela presença de peróxido de hidrogênio e óxido nítrico pela oxidação da peroxidase dependente. A suspensão dos cimentos foi obtida em duas diferentes concentrações para cada material: 18mg/ ml e 9 mg/ml, estabelecidas previamente pelo teste de viabilidade celular MTT. O estudo concluiu que o cimento que apresenta maior citotoxicidade foi o Top Seal.

Pinna et al (2008), avaliaram a citotoxicidade “*in vitro*” do cimento MetaSeal por um período de tempo e compararam seus resultados com os cimentos a base de resina epóxica (AH Plus) e o cimento a base de óxido de zinco e eugenol (Pulp Canal Sealers). Os três cimentos endodônticos foram preparados de acordo com as instruções dos fabricantes e cada material foi colocado dentro de seis moldes de teflon previamente esterilizados, para estarem em contato com osteosarcoma de ratos (ROS) 17/2.8. Foram utilizados seis períodos experimentais e após 72 horas ocorreu a completa configuração. O estudo mostrou que todos os cimentos apresentaram toxicidade severa nas 72 horas avaliadas, diminuindo gradualmente ao longo dos tempos experimentais com exceção do cimento Pulp Canal Sealer, que permaneceu severamente tóxico.

Scarparo et al (2009), realizaram estudo para investigar a reação em tecido subcutâneo de ratos a cimentos endodônticos à base de metacrilato (EndoREZ), à base de resina epóxica (AH Plus) e à base de óxido de zinco e eugenol (Endofill). O experimento foi realizado com 18 ratos, divididos em quatro grupos e avaliados por três tempos experimentais (7,30 e 60 dias). Após à preparação e à avaliação dos espécimes, os autores concluíram que os materiais testados não apresentam características ideais de biocompatibilidade.

Zmener et al (2010), avaliaram a biocompatibilidade dos cimentos ER/ACC(EndoREZ e ER Accelerator) e do Real Seal comparando-os com o Pulp Canal Sealer por meio de implantes em subcutâneos de ratos. Foram utilizados no trabalho 24 ratos que receberam tubos de silicones contendo o material

testado, bem como tubos sólidos para controle negativo. Após 10, 30 e 90 dias, os animais foram sacrificados e foi realizado o processamento e a análise histológica. Os cimentos EndoREZ/ACC e Real Seal tiveram diminuição da resposta inflamatória com o passar do tempo, sendo, portanto, considerados como aceitáveis biologicamente. O mesmo não ocorreu com o cimento Pulp Canal Sealer que apresentou reação severa em todos os tempos experimentais.

Da Silva et al (2011), avaliaram a resposta biológica causada no tecido periodontal adjacente após perfurações obturadas com os cimentos Endo-CPM-sealer (CPM), MTA Angelus (MTA) e com óxido de zinco e eugenol (OZE). Fizeram parte do estudo 60 ratos, divididos em três grupos, sendo que cada grupo representava um tipo de cimento obturador. Após os animais terem sido anestesiados foi realizada abertura coronária do primeiro molar direito, sendo que no teto da câmara na região de furca foi realizado perfuração com 2 mm de diâmetro. Passados 7, 15, 30 e 60 dias, os animais foram sacrificados e o tecido periodontal adjacente ao dente foi removido e imediatamente imerso em solução de fixação para preparação histológica. O estudo mostrou que o material induziu a reparação óssea e mais biocompatível que os cimentos à base de ZOE.

2.2. Estudos relevantes sobre a nanotecnologia

Feynman (1959), proferiu a palestra, *There's Plenty of Room at the Bottom: An Invitation to Enter a New Field of Physics*, no Instituto de Tecnologia da Califórnia e sugeriu que em um futuro não muito distante, os engenheiros poderiam manipular átomos e colocá-los onde bem entendessem, desde que, é claro, não fossem violadas as leis da natureza.

Silva Jr. (2002), mostrou em seu trabalho como está presente a nanotecnologia no mercado mundial, percorrendo sobre produtos tecnologicamente sofisticados, como: microprocessadores de última geração, vidro autolimpante, fibras ópticas e telefonia celular avançada. Avanços em nanomateriais permitiram o desenvolvimento de novos tipos de *lasers*, como é o exemplo do *laser* azul, assim como aumento nas densidades e capacidades de armazenamento de dados digitais. Têm-se, ainda, catalisadores

nanométricos mais diversificados e eficientes, materiais para próteses e até anticorpos sintéticos capazes de encontrar e destruir vírus ou células cancerígenas no corpo. Dessa forma, doses menores de drogas podem ser efetivas, reduzindo os efeitos colaterais.

Chaves (2002), mostrou que a utilização inteligente de nanoestruturas, isoladas ou acopladas com outras, pode levá-las a novas aplicações. Um exemplo típico e de sucesso foi a descoberta do nanotubo de carbono, que representou um marco na nanociência. Os nanotubos de carbono vêm sendo estudados devido às suas possíveis aplicações tecnológicas, uma delas é a aglomeração texturizada desses para a fabricação de materiais cinco vezes mais leves e vinte vezes mais resistentes que o aço, além da capacidade de operar sob temperaturas três vezes mais elevadas. Materiais com tais propriedades revolucionarão a indústria mecânica, especialmente a de veículos terrestres, aéreos e espaciais, tornando-se muito mais duráveis, leves e eficientes no uso da energia de seu combustível.

2.3. Nanopartículas de óxido de zinco

Aruoja et al (2008), realizaram estudo para estimar a toxicidade das NPs de ZnO, TiO₂ e CuO contra algas *Pseudokirchneriella subcapitata*. Foram utilizados os seguintes tamanhos de NPs: TiO₂ (25-70nm), ZnO (50-70nm) e CuO(~30nm), e suas fórmulas *bulk*. Os metais óxidos foram mantidos em suspensão até se tornarem homogêneos e turvos sem, contudo, terem sedimentado. As substâncias NPs foram incubadas na presença das espécies das algas a 24⁰ C por pelo menos 72 horas. Os autores mostraram que o óxido metálico ZnO tanto em NPs quanto em sua fórmula *bulk* são tóxicas às algas referidas, apresentadas mesmo em baixas concentrações (menor 0,1 mg/l), e que apesar de não haver diferença estatística nos efeitos tóxicos, existe uma leve tendência da escala micro de ZnO ser mais inibitória ao crescimento das algas.

Kishen et al (2008), investigaram a eficiência das nanopartículas para desinfecção dos canais radiculares. Foram realizados dois tipos de experimentos. O primeiro examinou as propriedades físicas de dois tipos de nanopartículas: nanopartículas puras, nanopartículas misturada com cimento à

base de óxido de zinco e eugenol. No segundo estágio foi estudado a habilidade das nanopartículas tratadas na dentina (nanopartículas de óxido de zinco, nanopartículas de citosan, mistura de óxido de zinco e nanopartículas de citosan e nanopartículas de óxido de zinco com camada de citosan) para prevenir a aderência do *E. faecalis*. O estudo mostrou que as nanopartículas não alteram a fluidez do cimento, mas provoca, diretamente, propriedades antibacterianas, trazendo vantagens para desinfecção dos sistemas de canais radiculares.

Liu et al (2009), realizaram estudo para investigar a atividade antibacteriana de nanopartículas de ZnO e suas ações contra o patógeno *Escherichia coli* 0157:h7 com o uso de scanner de microscopia eletrônica (SEM), microscopia de transmissão eletrônica (TEM) e Eletroscopia Raman. Foram utilizados no estudo NPs de ZnO com tamanho de 70nm diluídos em diferentes concentrações como: 0,3,6 e 12mmol l⁻¹. As bactérias obtidas para a realização do teste antibacteriano foram mantidas em meios aeróbicos a 37⁰C por 12 a 16 horas para o crescimento, quando foram inoculadas em placas TSA contendo as diferentes concentrações de NPs. O SEM foi usado para examinar as variações morfológicas das bactérias e o TEM para caracterizar o tamanho da NP e sua ação bactericida. Os autores mostraram aumentos dos efeitos inibitórios no crescimento da *E.coli* com o aumento da concentração das NPs do ZnO. Foi observado que a completa inibição de crescimento antimicrobiano foi alcançada quando os níveis de concentração foram de 12mmol l⁻¹. Outro resultado que o trabalho conclui foi que NP de ZnO podem distorcer e danificar a membrana celular bacteriana, resultando na quebra dos conteúdos intracelulares e eventualmente na morte das células bacterianas.

Kasemets et al (2009), realizaram estudo para avaliar os efeitos tóxicos de nanopartículas de ZnO, CuO e TiO₂ ao *Saccharomyces cerevisiae*, e os efeitos dos óxidos de nano em suas formas nano e *bulk*(micro partículas) comparando-as. Os óxidos foram preparados nos tamanhos: TiO₂ (25-70nm), ZnO(50-70nm) e CuO(~30nm). Para o teste de citotoxicidade, as bactérias foram mantidas em meio aeróbico a 30⁰C com centrifugação de 200 RPM em extrato de malt para crescimento. Quando a suspensão dos óxidos estava opaca e turva, foram realizadas as mensurações da densidade óptica e a

produção de biomassa. Neste método foi estimada a contagem de viabilidade celular em placas de Agar durante 24 horas (2, 4, 6, 8, 10, 12 e 24 horas). A avaliação dos efeitos tóxicos foi avaliada pelo método de inibição de crescimento e contagem de redução de viabilidade celular de 8 a 24 horas. Os autores concluíram que as fórmulas de ZnO em nanopartículas e Bulk mostraram os efeitos de crescimento variando de acordo com a concentração, porém não foi encontrado diferença estatisticamente significativa na toxicidade nas duas fórmulas.

Panacek et al (2009), realizaram estudo objetivando a determinação da atividade antifúngica das nanopartículas de prata utilizando *Candida spp*, bem como os efeitos citotóxicos do íon de nanopartículas de prata em fibroblastos humanos. Para que o trabalho fosse realizado, foram sintetizadas nanopartículas de prata com tamanho de 25nm e testada a atividade antifúngica usando *Candida albicans* (I e II) *Candida tropicalis* e *Candida parapsilosis*. Para verificação dos resultados, foram utilizados os seguintes métodos: concentração inibitória mínima (para avaliar a capacidade de inibição das nanopartículas ao crescimento dos fungos), inibição de doses dependentes ao crescimento das nanopartículas de prata e concentração fungical mínima. A citotoxicidade foi determinada ,”*in vitro*”, por linhagens de células BJ. Os autores concluíram que as nanopartículas de prata exibem alto nível de atividade antifúngica contra patógenos da *Candida ssp.*, porém os íons de prata remanescentes são considerados tóxicos aos fibroblastos humanos nas concentrações que inibam o crescimento dos fungos.

Jiang et al (2009), realizaram um estudo para avaliar a toxicidade em tamanho nano e *bulk*, bem como avaliar a contribuição da dissolução de íons metálicos na toxicidade. As espécies de bactérias analisadas foram: *Bacillus subtilis* (gram+), *Escherichia coli* e *Pseudomonas fluorescens* (gram-). Foram utilizados os seguintes óxidos: alumínio (60nm), titânio (50nm) e zinco (20nm). A concentração dos íons foi mensurada pelo ICP-OES após acidificação de ácido nítrico 1% com os metais em suspensão. Os testes de citotoxicidade foram realizados e as imagens foram obtidas em microscopia de transmissão eletrônica. Os autores concluíram que todos os óxidos mostraram alta toxicidade para todas as espécies de bactérias estudadas e que as fórmulas *bulk* e nano apresentavam diferença na toxicidade, sendo a primeira menos

que a segunda. Quanto a liberação dos íons, os autores observaram que as duas fórmulas liberam quantidades similares de íons de zinco indicando que a toxicidade não varia somente com a dissolução desses. O ZnO apresentou-se mais tóxico em comparação com as 3 nanopartículas testadas, causando 100% de mortalidade das três bactérias testadas.

Mortimer et al (2009), avaliaram a toxicidade de NP de ZnO e CuO ao protozoário ciliado *Tetrahymena thermophila*, bem como os efeitos do tamanho das nanopartículas em diferentes tempos de exposição (4 e 24 horas) e com as duas formulações. Foram analisadas NP de ZnO (50-70nm), NP CuO (~30nm) e paralelamente as suas formas *bulk* (micro-partículas). Esses materiais foram suspensos em soluções para serem caracterizados em SEM (*scanner* de microscopia eletrônica). Para o teste de viabilidade celular, as soluções foram preparadas com o *T. Tetrahymena* por 4 e 24 horas com e sem toxicantes. Foi observado uma diminuição do comprimento e do diâmetro celular após 4 horas de respectivamente 15 e 20% e após 24 horas de respectivamente 20 a 30%. Os autores concluíram também que ambas as fórmulas de ZnO apresentam efeitos similares de toxicidade ao ciliado causando 50% de perda de viabilidade após 4 horas de exposição.

Newman et al (2009), realizaram revisão de literatura a cerca do uso de filtro solar contendo nanopartículas de ZnO e TiO₂. No estudo, os autores discutiram que a toxicidade dessas partículas é resultante das suas propriedades e da habilidade dessas partículas em liberar radicais livres quando expostos a raios UV, porém esse fato só ocorre se elas conseguirem penetrar pela epiderme. Estudos têm sugerido que nanopartículas de titânio e o zinco não conseguem penetrar pela epiderme, concluindo que o uso de filtro solar com essas nanopartículas é seguro para ser usado.

Yang et al (2009), exploraram as relações entre tamanho, forma e composição da nanopartícula e seus efeitos tóxicos. Foram avaliados: carbono preto, nanotubos de carbono, dióxido de silício e óxido de zinco. Investigaram a sua toxicidade, genotoxicidade e seus efeitos oxidativos em fibroblastos de células embrionárias de ratos. As observações foram realizadas por meio dos métodos MTT e WST. Os resultados mostraram que as nanopartículas de ZnO apresentaram uma toxicidade mais elevada que as outras avaliadas, provavelmente devido a sua composição.

Zaveri et al (2010), avaliaram as respostas dos macrófagos em superfícies com estruturas nano ovais para modular a adesão e a viabilidade de fibroblastos e células endoteliais. A superfície nano oval de ZnO foi comparada com uma superfície plana do ZnO e de vidro. Os autores encontraram que embora os macrófagos são capazes de aderir sobre o substrato nano oval de ZnO, este acontece com número restrito quando comparado com o substrato plano de ZnO e o vidro. Os autores concluíram que embora esses dados sugerem que a nanotopografia pode modular a adesão dos macrófagos, a viabilidade celular encontra-se diminuída nos substratos planos e ovais de ZnO, indicando a presença de toxicidade apreciável associado ao ZnO.

Heng et al (2010), investigaram a exposição temporária de células humanas epiteliais brônquicas (BEAS-2B) ao estresse oxidativo e subsequentemente a citotoxicidade de NPs de ZnO. O estresse oxidativo foi induzido pela exposição de BEAS-2B ao peróxido de hidrogênio (5 e 10 μM) por 45 minutos. Essas células foram lavadas e expostas a várias concentrações de NPs de ZnO (5-25 $\mu\text{g/ml}$) em cultura média por 24 horas para verificação da viabilidade celular. O grupo controle não recebeu exposição ao peróxido de hidrogênio. O trabalho mostrou que o grupo controle apresentou 99% das suas células viáveis até a concentração de 10 $\mu\text{g/ml}$ das NPs de ZnO, diminuindo sua viabilidade com valores maiores de concentração das NPs de ZnO. Por outro lado, as células que receberam a exposição com peróxido de hidrogênio apresentaram viabilidade mesmo após concentrações com 10 $\mu\text{g/ml}$. Os autores concluíram que as células BEAS-2B expostas ao estresse oxidativo sensibilizam suas respostas aos efeitos citotóxicos das NPs de ZnO.

Tsou et al (2010), realizaram estudo para determinar os mecanismos onde nanopartículas de ZnO causam ativação de respostas inflamatórias nas células endoteliais vasculares. Os efeitos das partículas de 50 e 100 nm de ZnO foram caracterizados por meio de teste de citotoxicidade, proliferação celular. As concentrações de ZnO levaram a aumento da proliferação celular. Estas partículas induziram um aumento da ICAM-1 (adesão intercelular da molécula1), proteínas responsáveis por indicar a inflamação endotelial vascular. Com base no estudo, os autores concluíram que as nanopartículas de ZnO são moduladores da resposta endotelial vascular.

Song et al (2010), realizaram estudo para investigar a citotoxicidade de diferentes tamanhos e formatos de nanopartículas de ZnO, bem como analisar os efeitos da dissolução de íons de zinco. Para o estudo foram utilizados diferentes tamanhos de nanopartículas de ZnO: 100 +/- 10 nm; 30 +/- 10nm; 10 +/- 30 nm. Foram obtidas do banco de células macrófagos Ana-1, mantidos em culturas de células e preparadas para o tratamento objetivando testar a citotoxicidade das NPs. Para a visualização do tamanho e formato das partículas, foi utilizado o método de microscopia de transmissão eletrônica e a estrutura cristalina foi caracterizada usando o método de difração de raio X. O trabalho mostrou que as nanopartículas de ZnO apresentam manifestações tóxicas dependentes de seus efeitos nas células Ana-1, não variando de acordo com o tamanho das partículas, mas apenas com o seus formatos. Quanto à dissolução de íon de zinco, foi observado que desempenhou o principal efeito tóxico atribuído pelo material e que induziu 50% de morte celular.

Hu et al (2010), realizaram revisão de literatura para investigar o potencial neurocitotóxico das nanopartículas. De acordo com a literatura, as nanopartículas podem ser administradas nos organismos por vias como: inalação, ingestão, penetração cutânea e injeção, podendo se distribuir sistemicamente por vários tecidos. Por serem em escalas nano, apresentam uma maior área de superfície podendo penetrar facilmente em capilares e inclusive ultrapassar barreiras hemato-encefálica, entrando em contato com o cérebro e com nervos olfatórios. Os autores afirmam que a neurotoxicidade ainda esta pobremente explicada e que mais estudos ainda serão necessário.

Shrestha et al (2010), testaram a eficiência de nanopartículas de ZnO e CS (citosan) na desinfecção e destruição do biofilme bacteriano e avaliou a longos tempos a atividade bacteriana nas nanopartículas testadas no processo. O biofilme bacteriano (tratadas com Scanner microscópico confocal) e bactérias *Enterococcus faecalis* (tratados com métodos microbiológicos) receberam tratamento com diferentes concentrações de nanopartículas de óxido de zinco e citosan e seus efeitos foram examinados. Os resultados mostraram que a morte bacteriana depende da concentração e do tempo de interação com as nanopartículas. Após o tratamento, as células bacterianas morreram e o biofilme apresentou uma significativa diminuição. O estudo

concluiu que as nanopartículas de ZnO e CS são eficazes na redução do biofilme.

Li et al (2011), realizaram estudo para examinar o impacto da matéria orgânica dissolvida e sais da NPs de ZnO, bem como sua toxicidade para minhocas *Eisenia fétida*. Para avaliar a toxicidade das nanopartículas, foram realizadas exposição em Agar e papel filtro. Seguidamente foi realizada a adição de sais às nanopartículas para verificarem sua agregação por meio do MEV. O trabalho mostrou que na concentração de 1000 ZnOmg/Agar kg, 100% das minhocas expostas em Agar morreram. No papel filtro foi observado que a mortalidade foi maior na presença de menores concentrações de exposição (50mg ZnO/L) e parecia diminuir com o aumento de exposição. Pelo MEV mostraram que a adição de sais levou maior agregação de ZnO em Agar e consequentemente afetou o comportamento da dissolução e disponibilidade biológica das partículas.

Hackenberg et al (2011), realizaram estudo com o intuito de mensurar a danificação do DNA e a citotoxicidade induzidas por nanopartículas de ZnO, em células da mucosa nasal de humanos. Adicionalmente foi determinado a secreção de interleucinas 8 para estimar a indução dessas partículas a reações imunológicas. A morfologia das partículas e sua distribuição intracelular foram avaliadas por meio do método de transmissão de microscopia eletrônica. Foram avaliados NPs de ZnO com área de superfície de 15-25m²/g e também o pó de ZnO. As nanopartículas de ZnO foram transferidas para o citoplasma em 10% das células, porém a distribuição celular só foi observada em 1,5%. Os resultados deste trabalho sugere que as NPs de ZnO apresentam capacidade de induzir a danificação do DNA e inflamações mesmo em baixas concentrações.

Gordon et al (2011), realizaram estudo para investigar a estabilidade dos ZnO e Fe₃O₄ em nanofluidos e suas atividades antibacterianas. Foram testadas a capacidade antibacteriana contra os patógenos *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. As nanopartículas estudadas foram sistetizadas por hidrólise dos íons de Fe²⁺ e Zn. O trabalho mostrou que as NPs de ZnO exibem maiores capacidades antibacteriana sendo capaz de erradicar completamente as duas espécies bacteriana testadas. Quanto aos compostos à base de NPs de óxido férrico, demonstram uma variedade na atividade contra as duas espécies,

sendo mais eficaz contra a *S. aureus*, provavelmente devido à polaridade da membrana ser negativa.

2.4. Estudos de biocompatibilidade relevantes para a metodologia da presente pesquisa

Damen et al (1966), realizaram estudo teórico e experimental a cerca dos modos vibracionais característicos de composto de ZnO. Os resultados mostraram que os valores de E_2 , localizados em torno de 101 e 437 cm^{-1} , A_1 transversal de 381 e E_2 transversal a 407 cm^{-1} , A_1 longitudinal de 574 cm^{-1} e E_1 a 583 cm^{-1} , são característicos de ZnO.

Spangberg (1969), introduziu método conveniente e simples para a implantação na mandíbula de cobaias. O implante é colocado no triângulo ósseo formado entre os incisivos e a parte inferior da sínfise que une as duas metades da mandíbula. Esta área pode ser alcançada por meio de uma incisão extra-oral na pele e camada muscular submandibular. Quando a área é atingida, o periósteo é removido e uma cavidade é preparada em cada lado da sínfise. A cavidade deve ser preparada de maneira tal que seu tamanho final seja obtido por meio de brocas com diâmetros crescentes, começando com uma esférica menor, com rotação de 2000 a 3.000 rpm e irrigação constante com solução salina esterilizada. A broca seguinte é espiral, à qual se segue uma broca de fissura de diâmetro equivalente ao do implante.

A fim de carregar o material a ser estudado, autor desenvolveu um veículo especial feito de Teflon®, com ranhuras externas para retenção na cavidade óssea. O veículo tem a forma de um copo, com diâmetro externo de 2 mm, interno de 1,3 mm e comprimento de 2 mm. Ao preenchê-lo com o material, deve-se tomar cuidado para não contaminar a sua superfície externa, pois a broca serve como controle negativo da técnica. Após o preparo da cavidade, ela é irrigada com solução salina e o copo com o material é inserido, tendo sua abertura direcionada para o osso. Quando a cavidade é feita apropriadamente, o copo se acomoda de maneira justa e as ranhuras se preenchem rapidamente com osso neoformado, mantendo-o em posição durante todo o experimento, independentemente das reações tissulares que possam ocorrer. Após a colocação dos implantes, os tecidos moles são

recolocados em posição e suturados. Na introdução dessa técnica, o autor avaliou a compatibilidade de uma série de cimentos de obturação de canal: prata, cone de guta-percha, guta-percha bactericida, Chloropercha NÖ, amálgama de prata, Tubli-seal, Diaket, AH26, N2, pasta de hidróxido de cálcio e pasta de Riebler. Copos vazios de Teflon® introduzidos na cavidade óssea serviram como controle.

Considerando que 11 materiais de obturação foram comparados, no que concerne ao seu potencial de irritação do tecido ósseo, os experimentos foram desenhados de modo a permitir análise estatística dos resultados. Materiais foram implantados, um em cada lado da sínfise, de maneira que pudessem ser comparados quanto à resposta inflamatória, a qual foi classificada em moderadamente severa (+) ou muito severa (++). Os resultados mostraram que o quadro histológico variou largamente entre os materiais usados, enquanto que as variações entre implantes do mesmo material eram muito pequenas. Os implantes de duas semanas mostraram infiltrado de neutrófilos e células redondas para os cimentos Riebler, N2, Diaket e Tubli-seal. Havia uma tendência regular de formação de cápsula sob a guta-percha, guta-percha bactericida, Chloropercha NÖ, e AH26. As cápsulas mais finas e bem organizadas foram vistas sob a guta-percha. O quadro inflamatório se repetiu após 12 semanas, com diferenças maiores entre os diversos materiais e uniformes entre implantes do mesmo material. Havia infiltração de células crônicas junto ao Tubli-Seal e N2 e, também, sequestro ósseo junto ao N2 e a pasta Riebler. Esta última apresentava desorganização tissular e áreas de necrose com células gigantes de corpo estranho. O hidróxido de cálcio foi substituído por osso e apenas pequenos defeitos foram vistos no lume do copo. Com exceção da prata, os outros materiais mostravam cápsulas de tecido fibroso de graus variados de espessura. O autor concluiu que, após a análise dos resultados, foi possível estabelecer uma classificação dos materiais na seguinte ordem crescente de toxicidade, após 12 semanas: prata, hidróxido de cálcio, guta-percha, Chloropercha NÖ, guta-percha bactericida, amálgama de prata, AH26, Diaket, N2, Tubli-Seal e pasta de Riebler.

O Technical Report Nº9 da Federação Dentária Internacional e o Documento Nº 41 da ANSI/ADA recomendam três níveis de avaliação dos materiais utilizados na terapia intrarradicular: teste inicial *in vitro*, por meio de

teste em cultura de células, teste secundário em animais de pequeno porte *in vivo*, subcutâneo ou intra-ósseo e o teste de uso em primatas subumanos e humanos.

Dantas et al (2008), realizaram estudo para sintetizar NCs de $\text{Zn}_{1-x}\text{Mn}_x\text{O}$, usando o método químico de precipitação em solução aquosa. A preparação da rota das amostras de $\text{Zn}_{1-x}\text{Mn}_x\text{O}$ foi realizada na presença de oleato de sódio, sulfato de hidrazina e cloreto de manganês na 80°C . Durante todo o processo, o PH foi mantido a 8,5 utilizando solução de hidróxido de sódio a 4 M. A reação foi realizada por 2 horas resultando em um precipitado branco contendo NCs de ZnO e $\text{Zn}_{1-x}\text{Mn}_x\text{O}$. Pelos espectros de Raman e padrões vibracionais de difração de raio X, comprovou-se a formação de NCs de ZnO e $\text{Zn}_{1-x}\text{Mn}_x\text{O}$.

Proposição

3. PROPOSIÇÃO

A presente pesquisa teve como objetivo sintetizar, caracterizar por espectro Micro-Raman e Difratoograma de Raio X a estrutura dos nanocristais de óxido de zinco e avaliar a resposta inflamatória a estes nanocristais por meio de implantes intra-ósseos em “*Guinea Pig*”, conforme estabelecidos pela FDI e ANSI/ADA.

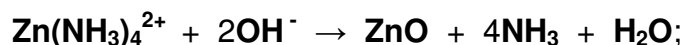
4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Síntese dos nanocristais de ZnO

Neste trabalho, as sínteses de nanopartículas de ZnO basearam-se na transformação do complexo $\text{Zn}(\text{NH}_3)_4^{2+}$ (tetramin zinco) na presença do passivante oleato de sódio e do redutor hidrazina. O valor mínimo do pH foi de 8,5 durante todo o processo da reação química a 80°C, o qual foi ajustado com hidróxido de sódio, seguindo as seguintes etapas:

1- foram misturados e colocados sob agitação, 100 mL de sulfato de zinco 0,38 M e amônia 0,71 M durante 10 minutos para que se formassem o complexo $\text{Zn}(\text{NH}_3)_4^{2+}$;

2- foram acrescentados 0,016 mol de hidrazina e 0,08 g de oleato de sódio na solução descrita na primeira etapa, em que a redução do complexo $\text{Zn}(\text{NH}_3)_4^{2+}$ ocorreu da seguinte forma:



3- a solução final foi mantida a 80°C em banho-maria e sob agitação para transformar o complexo $\text{Zn}(\text{NH}_3)_4^{2+}$ em ZnO, mantendo-se o pH controlado a 8,5, utilizando uma solução de hidróxido de sódio 4M ao longo de toda a fase de eliminação de amônia da solução;

4- a reação foi concluída após 4 horas, resultando em precipitado de ZnO que foi recolhido, centrifugado e lavado com água destilada e em seguida com etanol absoluto por 5 vezes;

5- o precipitado obtido foi seco em vácuo a temperatura de 60°C, durante 24 horas, obtendo pó branco característico de ZnO e

6- esse pó branco, provavelmente, em sua grande parte é amorfo, finalmente foi submetido a 500°C por 2 horas, para favorecer o processo de cristalização, visando obter nanocristais de ZnO. Mais detalhes sobre o processo de sínteses podem ser vistos nos relatos de Dantas et al., 2008.

4.2 Caracterização dos nanocristais de ZnO

As caracterizações foram feitas por micro-Raman e Difração de Raios-X. O espectro de micro-Raman foi detectado por uma câmara CCD da Jobin-Yvon acoplada a um monocromador triplo da SPEX, utilizando como fonte de excitação a linha 514,5 nm de um *laser* de argônio. O difratogramas de raios-X (DRX) foi registrado com um XRD-6000 SHIMADZU, usando radiação monocromática Cu-K_{a1} ($\lambda = 1,54056 \text{ \AA}$), para confirmar a formação dos nanocristais (NCs) de ZnO, bem como a estrutura cristalina e tamanho médio. Todas as caracterizações foram feitas à temperatura ambiente. Quanto as amostras testadas, a espectroscopia não existe barra de erro - basta uma medida. O espectros Raman registrado é o resultante de uma média de 5 aquisições de diferentes partes da amostra.

4.3 Material testado

Para a pesquisa foi utilizado nanocristais de óxido de zinco com o tamanho de 20nm.

4.4 Implante intra-ósseo

Esta modalidade de teste é realizada para se avaliar a toxicidade ,*“in vivo”*, dos materiais utilizados e que estão em contato direto com o osso.

Para este experimento foram utilizadas cobaias (*guinea pig*) com aproximadamente 800 gramas de peso. Cada animal recebeu dois implantes em suas mandíbulas, na região localizada entre as raízes dos dentes incisivos e a sínfise mentoniana, conforme ilustrado na figura 3C e 3D.

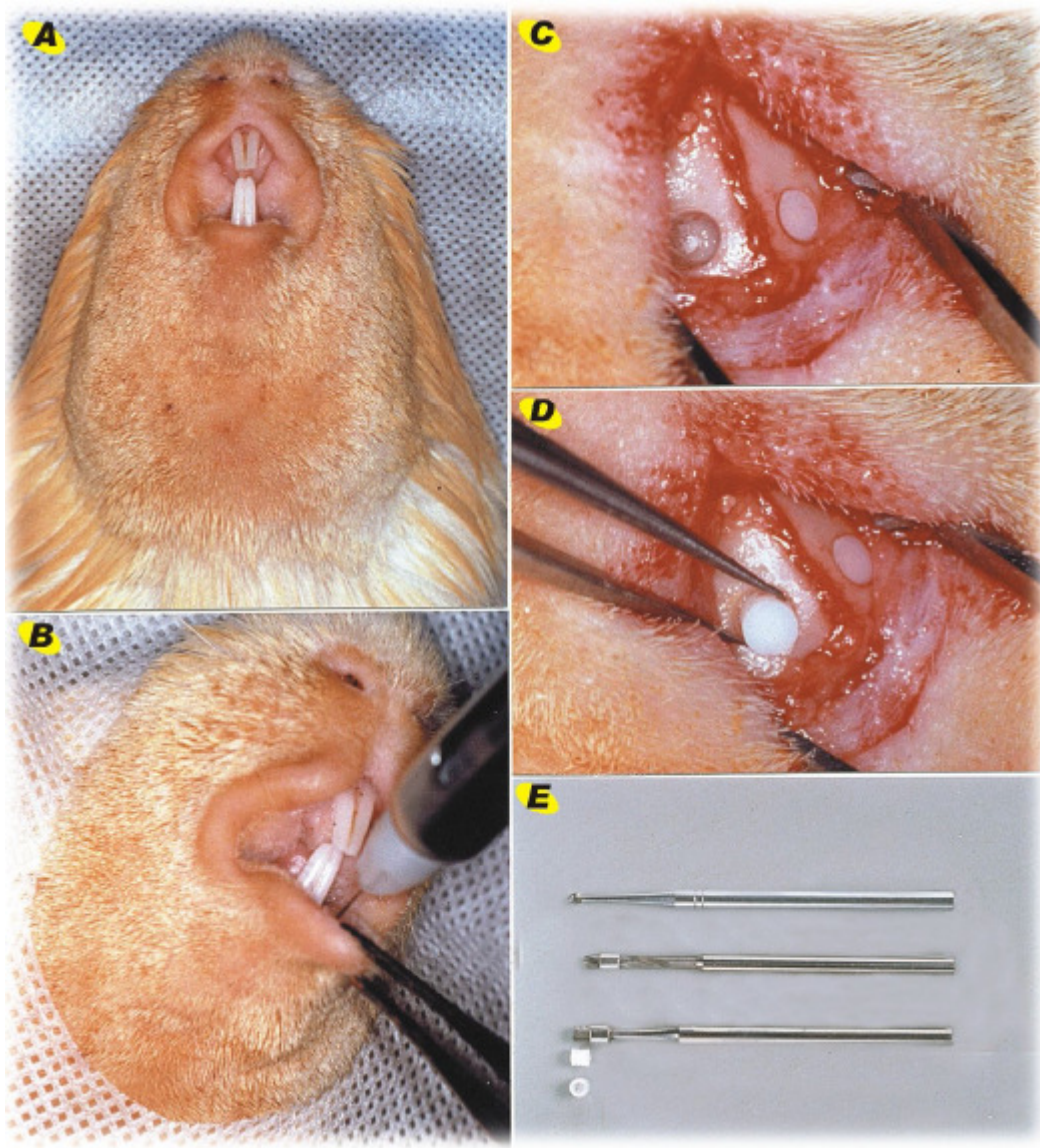


Figura 1. Ilustração da metodologia de implante intra-ósseo, onde se observa: A. tricotomia e desinfecção com álcool iodado; B. instalação de campo cirúrgico fenestrado e anestesia infiltrativa; C e D. lojas ósseas e posicionamento dos implantes; E. brocas especiais e copos de teflon.

Foram utilizados 10 cobaias para o material testado, divididos em períodos experimentais de 4 e 12 semanas (5 cobaias para cada período), sendo inserido 2 implantes por animal, assim, foram avaliados 20 implantes contendo o material.

Os animais foram mantidos em gaiolas durante o experimento, em ambiente de temperatura controlada (22 °C), com controle de luz em ciclos de claro-escuro de 12 horas, recebendo ração e água *ad libitum*. Em momentos prévios à realização da cirurgia, as cobaias foram submetidas à anestesia geral por meio de injeção intramuscular de 0,6ml de ketamine (100mg/ml)

(Francotar®-Brasil) misturada com acepromazine (0,5mg/ml) (Dorcipec®-Brasil), na proporção 2:1, respectivamente. Após a anestesia, foram realizados os procedimentos necessários à manutenção da cadeia asséptica, tricotomia da região mentoniana e desinfecção da área com iodopolividona à 10% (Riodeine®-Brasil), e injeção local intra-oral, de aproximadamente 0,5 ml de xilocaína a 2% com epinefrina 1/100.000 (Lidocaina100®-Brasil) na mucosa sinfisária, próxima a área dos implantes, para evitar o desconforto e movimentação do animal (Figura 3B).

Após a incisão, a deflexão do retalho cirúrgico e a exposição do osso, foram feitos preparos cavitários em ambos os lados da sínfise mandibular, com 2mm de diâmetro e de profundidade, para receber copos de teflon, com o material manipulado conforme técnica preconizada (Figura 1D). No procedimento foi utilizado micro-motor cirúrgico com rotação entre 2000 a 3000 rpm, com brocas especiais padronizadas (Figura 1E), sob irrigação constante com soro fisiológico esterilizado.

Este dispositivo cilíndrico de teflon é aberto em uma extremidade, sendo que a superfície externa contém sulcos para a melhor fixação no tecido ósseo. Este cilindro possui 2mm de comprimento com 1,3 mm de diâmetro interno e 2mm de diâmetro externo. (Figura 1 E). A limpeza e descontaminação dos dispositivos foram realizadas por meio da imersão em clorofórmio, para a remoção de graxa impregnada quando da sua usinagem, seguido por banhos em álcool 70%, dois banhos em água destilada e, finalmente, autoclavados antes de serem utilizados.

Realizados os implantes e, decorridos 30 e 90 dias de observação, os animais foram sacrificados por meio de overdose anestésica e tiveram suas mandíbulas seccionadas para a obtenção da região mentoniana, contendo os implantes.

Estes espécimes foram fixados em solução de formol a 10%, tamponado com cacodilato de sódio, mantidos a 4 graus centígrados para a pré-fixação por 48 horas e levados ao laboratório a fim de serem preparados para o devido processamento histológico.

4.5 PROCEDIMENTOS LABORATORIAIS

4.5.1 Preparo histológico

Após a permanência no fixador por 48 horas, os blocos foram lavados por 12 horas em água corrente e descalcificados com solução aquosa de ácido nítrico a 5%. A desidratação foi realizada mergulhando os espécimes em solução de álcool etílico, em concentrações crescentes de 50%, 70%, 90% e absoluto. Posteriormente, procedeu-se a inclusão dos espécimes em parafina (Paraplast) para a confecção de 24 lâminas com 144 cortes histológicos semiseriados, estando o micrômetro regulado para cortes de 5 micrômetros. Os cortes foram realizados em planos paralelos à direção de entrada do copo, visando à exposição da interface de contato do material com o tecido ósseo. A técnica de coloração foi realizada utilizando-se a hematoxilina e eosina. Após o processamento de rotina, as lâminas foram avaliadas em microscopia óptica.

4.5.2 Critérios histológicos

Foram coradas 24 lâminas, totalizando 144 cortes, escolhidos em intervalos regulares nestas. (1ª e a cada 4ª lâmina). A interface na abertura do copo, entre o material que está sendo testado e o osso, foi a área avaliada.

Como controle, foram observadas as interfaces laterais entre o copo de teflon e o osso contíguo, pois esta área reflete o trauma causado pelo procedimento cirúrgico.

Foram anotadas as seguintes observações:

- 1- a presença ou ausência de necrose;
- 2- a frequência e intensidade de células inflamatórias agudas e crônicas – neutrófilos, linfócitos, macrófagos, mastócitos, plasmócitos e células gigantes de corpo estranho;
- 3- a possível reabsorção do material e o preenchimento do copo por osso;
- 4- a atividade osteolítica, osteoclástica ou osteoblástica;
- 5- a degeneração e a desintegração de células inflamatórias;
- 6- o transporte do material a distância em vasos e células e
- 7- as alterações em vasos e nervos.

As reações inflamatórias foram classificadas em suave, moderada e severa.

-Reação inflamatória suave: A designação de inflamação suave foi dada aos espécimes que mostraram poucas células inflamatórias, na maioria linfócitos e plasmócitos e o tecido ósseo com características histológicas identificáveis.

-Reação inflamatória moderada: A designação de inflamação moderada foi dada aos espécimes que mostraram acúmulo focal de células inflamatórias, mas sem tecido necrótico. Entretanto, poderia haver desarranjo das características histológicas do tecido ósseo.

-Reação inflamatória severa: Esta designação foi dada aos espécimes que mostraram substituição do tecido ósseo por tecido inflamatório. Foram, também, avaliados a extensão e o tipo necrótico, por exemplo, liquefação ou coagulação.

4.5.3 – Avaliação semiquantitativa da resposta inflamatória

A avaliação da resposta tecidual foi baseada na observação qualitativa e semiquantitativa de fenômenos celulares e teciduais relacionados ao processo inflamatório e reparos encontrados no tecido imediatamente situado na interface do material implantado e da distância deste. Foram designados dois avaliadores independentes e calibrados para verificarem e classificarem a intensidade da resposta inflamatória de acordo com a presença ou ausência de: 1) neutrófilos, 2) macrófagos, 3) linfócitos, 4) plasmócitos, 5) células gigantes de corpo estranho, 6) material disperso, 7) cápsula, 8) neoformação óssea, 9) necrose tecidual e 10) reabsorção óssea. Todos os elementos teciduais citados anteriormente foram avaliados por meio de escores de intensidade caracterizados como (+) ausente ou leve; (++) moderado; (+++) severo. Para fins de caracterização do material como biologicamente aceitável, utilizaram-se os seguintes parâmetros: resposta inflamatória ausente ou suave

em ambos os períodos de observação (4 e 12 semanas), aceitável; presença de resposta moderada na quarta semana e suave na décima segunda semana de observação, aceitável; reações severas em qualquer tempo, não aceitável. Todo o protocolo desenvolvido no presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa Animal da Universidade Federal de Uberlândia (CEP # 101/10).

4.4.3 Requisitos histológicos

O plano de corte histológico deve passar pela abertura do copo, incluindo toda a interface entre o material e o osso. Os cortes histológicos não devem conter artefatos histológicos que prejudiquem a avaliação. Experimentos, testes ou controles que resultaram em cortes que não preencheram estes requisitos foram repostos.

4.5.3.1 Avaliação

A severidade da resposta celular decidiu a aceitabilidade ou não dos materiais. Esta foi alcançada por meio do registro dos achados, de acordo com o critério FDI e ANSI/ADA a seguir:

a) Reação inflamatória suave

Aos 30 dias após a realização do implante, há ausência ou mínima inflamação presente. O tecido ósseo está organizado, com inflamação na área de abertura do copo, comparável com aquela ao longo das paredes externas do copo. Além disso, há ausência de reabsorção óssea. Aos 90 dias, a reação tecidual, na abertura do copo, é comparável àquela ao longo de sua periferia. O tecido está bem organizado com total regeneração óssea, ausência completa de inflamação e possivelmente presença de algumas células de corpo estranho.

b) Reação inflamatória moderada

Aos 30 dias de implante, há alguma inflamação na entrada do copo e nenhuma ou mínima, na sua periferia. O tecido adjacente ao material testado terá mantido sua estrutura, contendo linfócitos, plasmócitos, macrófagos e ocasionalmente células gigantes de corpo estranho, mas sem acúmulo de neutrófilo. Ademais, a reabsorção óssea suave poderá estar presente. Aos 90 dias há a presença de algumas células inflamatórias, linfócitos, macrófagos e ocasionalmente células gigantes de corpo estranho na entrada do copo. O tecido está bem organizado, com total regeneração óssea e linfócitos, plasmócitos e células gigantes de corpo estranho espalhadas, mas sem reabsorção do osso.

c) Reação inflamatória severa

Aos 30 dias há reação inflamatória distinta na abertura do copo, quando comparada com sua periferia. O tecido está pobremente organizado e contém acúmulo de neutrófilos. Diante disso, a reabsorção óssea poderá estar presente. Aos 90 dias, há uma reação inflamatória distinta na abertura do copo, com osso regenerado e tecido fibroso ao longo de sua periferia. O tecido, na abertura do copo, está organizado, mas contém acúmulo de linfócitos, plasmócitos e macrófagos (inflamação crônica). A Reabsorção óssea poderá estar presente.

4.5.3.2 Interpretação

A interpretação dos resultados foi realizada por meio da análise dos dados obtidos, demonstrando a aceitação ou a rejeição do material, baseando-se no seguinte:

- nenhuma ou suave reação inflamatória nos dois períodos: aceitável;
- nenhuma ou suave reação inflamatória aos 30 dias, que aumente no período subsequente para moderada ou severa: não aceitável;
- reação moderada aos 30 e 90 dias: não aceitável;
- reação moderada aos 30 dias, que diminui aos 90 dias: aceitável e
- reações severas em qualquer período: não aceitável.

5. RESULTADOS

5.1 Caracterização dos nanocristais de ZnO

A Figura 2 mostra o espectro micro-Raman de nanocristais de ZnO. Observa-se neste espectro modos Raman ativos típicos somente de nanocristais (NCs) de ZnO, em que certifica a não existências de outros tipos de nanoestruturas. Os modos Raman ativos, em torno de 334, 382, 410, 439, 516, 541, 586 e 638 cm^{-1} , correspondem aos nanocristais de ZnO (Damen et al., 1966; Dantas et al., 2008).

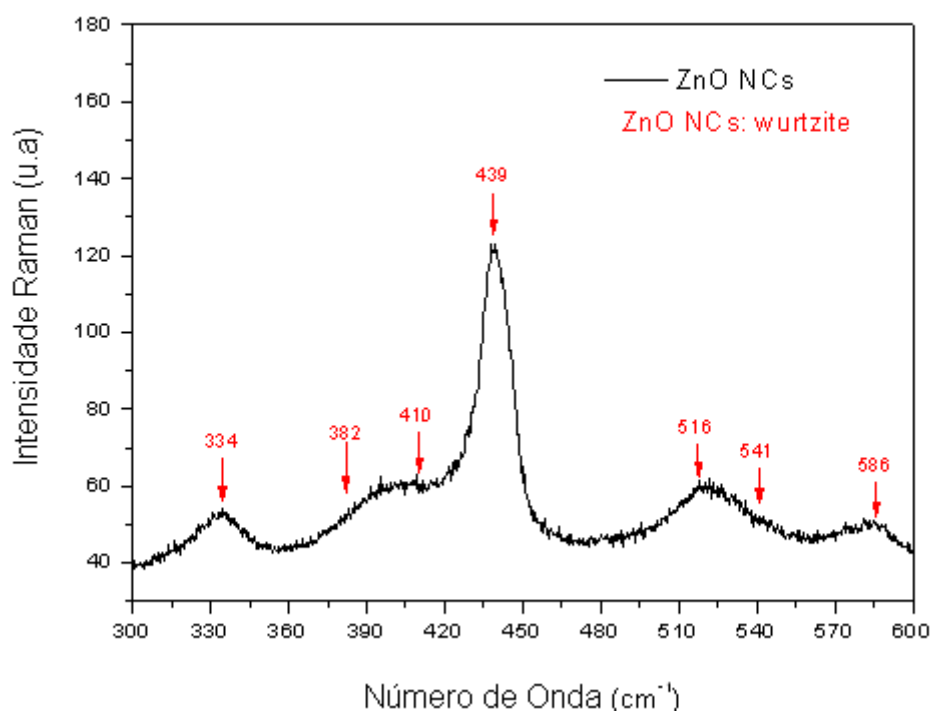


Figura 2. Espectro Micro-Raman de nanocristais de ZnO

A Figura 3 mostra o difratograma de raio X de NCs de ZnO empregados nesta pesquisa, em que todos picos de difração de Bragg são típicos de cristais de óxido de zinco com estrutura hexagonal (JCPDS: 36-1451). Pode-se observar, também, que não existe evidência de pico extra difração de Bragg. Estes resultados vêm reforçar a evidência de que os nanocristais de ZnO, além de apresentarem uma estrutura hexagonal e monofásicos (wurtzita), são de alta pureza. O tamanho médio dos NCs de ZnO foi determinado pela fórmula de Scherre $\tau = (K\lambda/\beta\cos\theta)$, em que K é o fator de forma, λ é o comprimento de

onda de raios-X, β é a largura da meia altura da intensidade máxima de um pico de difração de Bragg, dada em radianos, e θ é ângulo de Bragg. Portanto, tomando como base o pico de difração de Bragg (100) do difratograma da figura 2, localizado em torno de $2\theta=31,8^\circ$, o cálculo do tamanho médio foi realizado considerando os grãos esféricos ($K = 0.9$), mensurando o valor de β a partir de um ajuste gaussiano, sendo $\theta=15,9^\circ$, e utilizando $\lambda = 1,54056 \text{ \AA}$, obtém-se um diâmetro τ em torno de 21 nm, para esses NCs de ZnO. Não foi detectado nos difratogramas nenhum tipo de impureza, ou seja, observou-se apenas os padrões de difração característicos do ZnO de estrutura hexagonal.

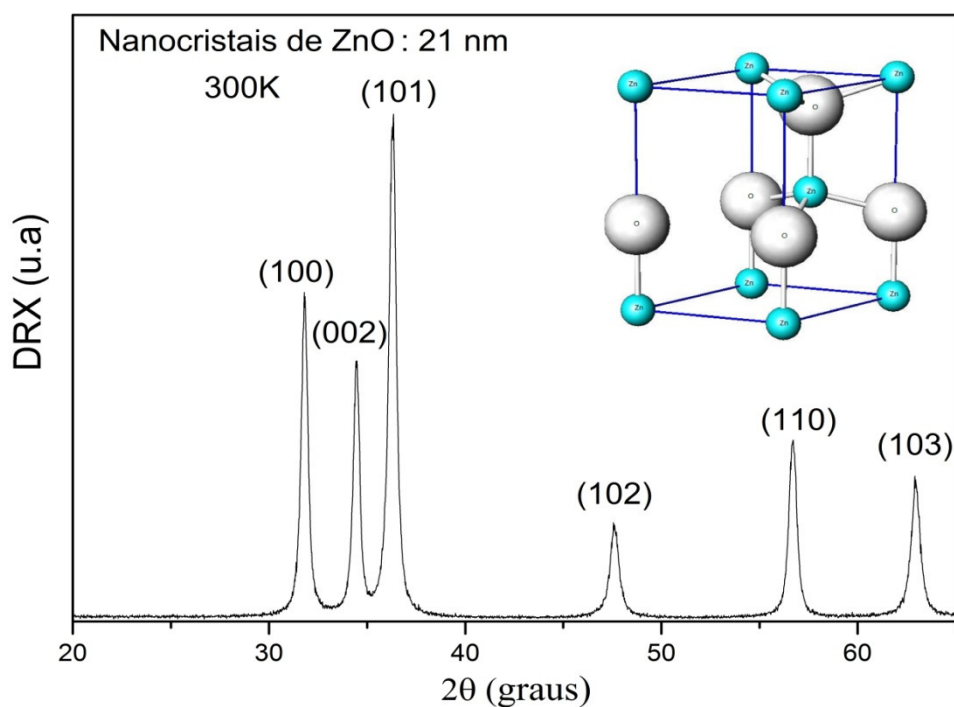


Figura 3. Difração de Raio X de nanocristais de ZnO em temperatura ambiente

5.2 Controles

Como definidos pelo item 4.12.10, pág. 175, do FDI Technical Report N^o 9 (1980), foram utilizados as áreas de contato do implante de Teflon com o osso circundante para a verificação do grau de agressão imposta ao tecido ósseo, quando do ato cirúrgico e o procedimento de inserção do copo de teflon. (FDI, 1980).

Em ambos os períodos de observação (4 e 12 semanas) observou-se que as retenções na superfície do copo de Teflon foram preenchidas por tecido ósseo ou por delgada camada de tecido conjuntivo não modelado, de variável densidade, associado a resposta inflamatória crônica granulomatosa inespecífica (tipo corpo estranho). As células foram observadas no tecido conjuntivo justapostas ao copo, de forma alinhada e alongadas, com número variável de núcleos, acompanhadas por macrófagos mononucleares. O tecido ósseo adjacente apresentou-se com características de normalidade, estável, sem sinais de aposição recente ou de reabsorção. Não foram evidenciados sinais de dispersão do material implantado nesta região.

5.3 Material testado

A Tabela 1 representa o *design* experimental do trabalho. Nela podemos observar o período experimental da pesquisa e o número de implantes intra-ósseos utilizados para avaliar os nanocristais de ZnO, bem como do grupo controle.

Tabela 1. Modelo experimental

Materiais	Período Experimental (Semanas)	Número de Implantes intra-ósseo
ZnO	04	10
	12	10
Controle	04	10
	12	10

As ocorrências histopatológicas que se fizeram mais frequentes está descrita na Tabela.2, de acordo com a cronologia de observação dos implantes intra-ósseos de nanopartículas de ZnO, seguindo os critérios da FDI (1980) e da ADA (1982).

As tabulações dos diversos grupos celulares e eventos são resultados do agrupamento de todas as observações dos cortes histológicos avaliados, nos diversos tempos experimentais. Essas avaliações foram realizadas por meio de uma análise qualitativa, subjetiva, por concordância de dois avaliadores, observando-se o aspecto geral do quadro inflamatório instalado.

Tabela 2. Caracterização qualitativa do processo inflamatório segundo a cronologia de observação, segundo critérios da FDI (1980) e da ADA (1982)

Critérios Histológicos	Implantes NCs ZnO		Controle	
	04 Semanas / 12 Semanas		04 Semanas/ 12 Semanas	
Neutrófilos Leucócitos	X	X	X	X
Macrófagos	X	X	X	X
Linfócitos	X	X	X	X
Células Plasmáticas	X	X	X	X
Células Gigantes Tipo Corpo Estranho	XX	X	X	X
Material Disperso	X X	X X	X	X
Cápsula	XX	X	X	X
Neoformação óssea	XX	XX	X	X
Tecido Necrótico	X	X	X	X
Reabsorção	X	X	X	X
Resposta Inflamatória	X	X	X	X

5.3.1 Avaliação da resposta inflamatória

a) Em 30 dias

As respostas inflamatórias do material testado foram caracterizadas como predominantemente de intensidade leve, com alguns quesitos caracterizados de intensidade moderada (Tabela 2). Estas variações também foram acompanhadas de variações na diversidade dos elementos celulares observados.

Os infiltrados inflamatórios de intensidade leve eram dominados por macrófagos mono e multinucleados, estes do tipo “corpo estranho” (Figura 4 D, seta verde). Nos casos em que o infiltrado aumentou de intensidade (moderado), observamos também, maior número de linfócitos, plasmócitos e neutrófilos, sendo estes menos prevalentes.

A zona de contato do material com o tecido denso, não modelado, com celularidade marcante, e discreta deposição de fibras, em a sua toda extensão, interpondo-se entre o material implantado e o tecido ósseo neoformado (Figura 4B, 4C). Foi também marcante a presença de vasos sanguíneos hiperêmicos, aparentemente neoformados, com endoteliócitos proeminentes (Figura 4C, seta amarela)

O tecido ósseo neoformado apresentou-se com características de normalidade, com sinais evidentes de neoformação, caracterizada pela presença de discreta faixa de matriz osteóide e maior densidade de osteoblastos em torno das trabéculas. Este aspecto caracterizava-se como estáveis, sem matriz óssea aparente (Figura 4B). Raros foram os osteoclastos observados nesta região, assim com os sinais de reabsorções e necrose, caracterizando-se como um osso estável (Figura 4C, seta azul). Ademais, nenhuma alteração do osso adjacente, em profundidade, foi observada.

b) 90 dias

Decorrido este tempo experimental, as reações ocorridas com o ZnO NPs permaneceram de maneira similar aos verificados aos 30 dias (Tabala 2). Foi observada a manutenção da camada de tecido conjuntivo interpondo-se entre o osso e o material, porém com uma maior fibrose pelo depósito de fibras colagénas em determinadas áreas (Figura 5C) Nessa zona de contato também verificou-se uma reação inflamatória predominantemente suave, com alguns casos de intensidade moderada. Ainda assim, podem-se perceber sinais de resposta inflamatória, no caso, por macrófagos mono e multinucleados (Figura 5D). Nesta área ainda podemos perceber os sinais da reação inflamatória pela presença de espaços entre os elementos teciduais, notando-se uma parede edema residual (Figura 5 B, seta amarela).

O tecido ósseo neoformado apresentou-se com características similares aos verificados com 30 dias, mostrando-se estável e com características de normalidade (Figura 5B). Aqui, os sinais de remodelação foram menos evidentes.

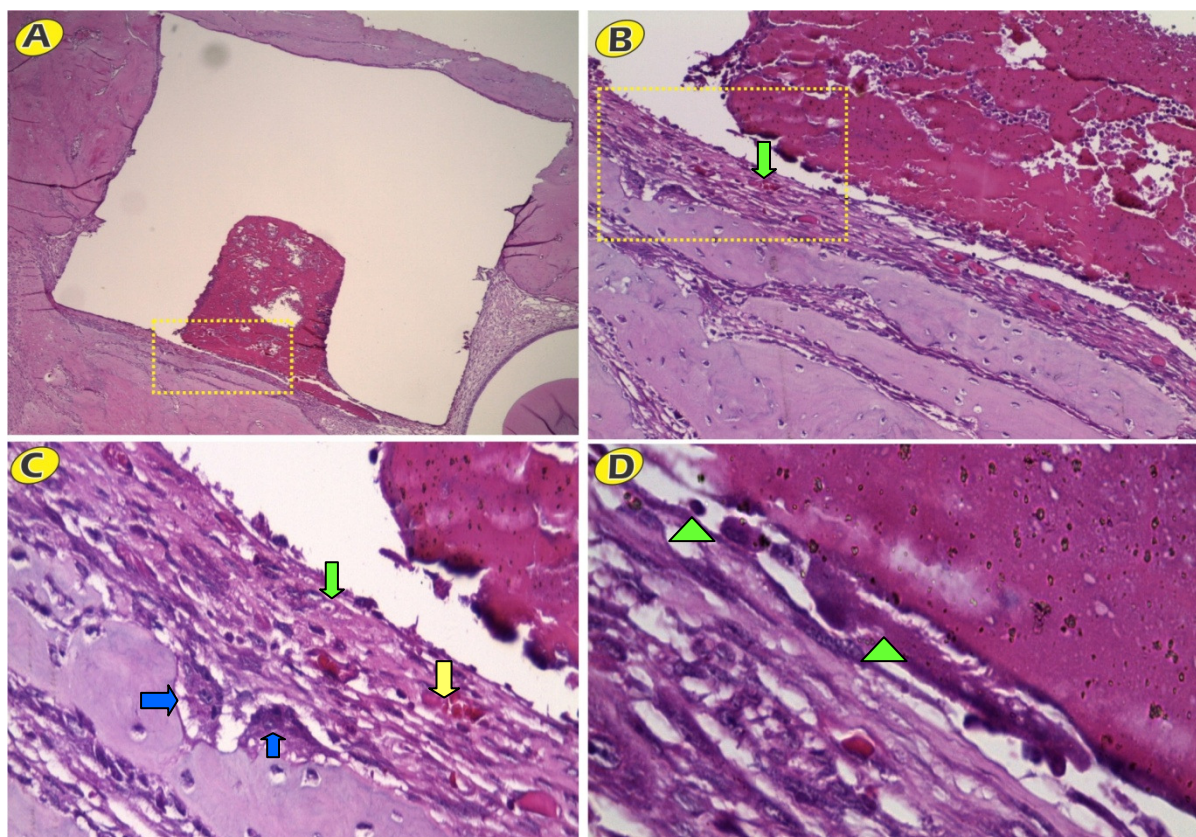


Figura 4. Avaliação histológica dos implantes de NCs de ZnO em 04 semanas; A. Visão panorâmica do material implantado (Ampliação original 40x, HE); B. Ampliação da imagem na área pontilhada de (A), mostrando a presença de tecido conjuntivo denso (cápsula) interpondo-se ao material implantado e o tecido ósseo subjacente (seta verde). Observamos tecido ósseo com sinais de normalidade (Ampliação original 100x, HE); C. Ampliação da imagem na área pontilhada de (B), onde observamos infiltrado inflamatório crônico com poucos aglomerados de macrófagos e células gigantes tipo corpo estranho (seta verde). Nessa área podemos visualizar a presença de vasos hiperêmicos (seta amarela) Na superfície do tecido ósseo ficam evidentes a presença de osteoclastos e o processo de reabsorção (seta azul), (Ampliação original 200x, HE); D. Ampliação da imagem (C). Observa-se detalhes os macrófagos

mononucleares e as células gigantes tipo corpo estranho (cabeça de seta verde) (Ampliação original 1000x, HE).

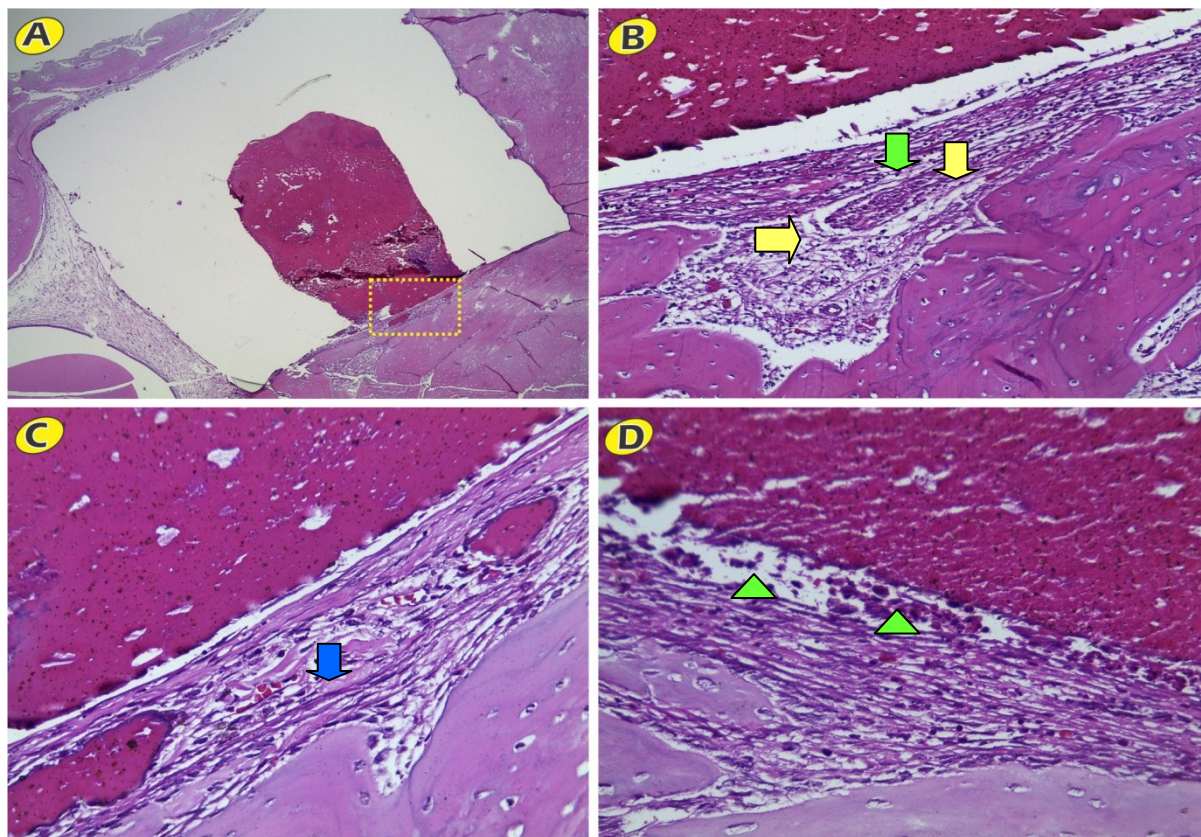


Figura 5. Avaliação histológica dos implantes de nanocristais de ZnO em 12 semanas; A. Visão geral do implante, onde é possível verificar a integração do copo de teflon com o tecido ósseo circundante. (Ampliação original 40x, HE); B. Ampliação da imagem na área pontilhada de (A), mostrando a presença de tecido conjuntivo denso (cápsula) interpondo-se ao material implantado e o tecido ósseo subjacente (seta verde). Nota-se aparente edema residual, caracterizado por discretos espaços entre os elementos teciduais (seta amarela). Observa-se que o tecido ósseo encontra-se estável e com características de normalidade (Ampliação original 100x, HE); C. Ampliação da imagem (B), onde observamos infiltrado inflamatório crônico e zonas de maiores densidades de fibras colágenas (seta azul) (Ampliação original 200x, HE); D. Ampliação da imagem (C), observa-se detalhes a presença de macrófagos mononucleares e multinucleados (cabeça de seta verde) (Ampliação original 400x, HE).

6. DISCUSSÃO

A presente pesquisa teve como objetivo avaliar as propriedades biológicas de nanocristais de óxido de zinco, considerando a caracterização física do material, bem como sua forma, tamanho e estrutura. A hipótese testada era de que uma interação positiva a cerca das respostas biológicas do material poderia contribuir para o desenvolvimento de novos materiais, de uso clínico odontológico, em especial, o endodôntico, com características de biocompatibilidade aos tecidos vivos da região perirradicular. Este estudo confirma a hipótese testada demonstrando ser biocompatível em ambos os tempos avaliados.

O nanobiomaterial sintetizado foi caracterizado fisicamente para que tivéssemos o controle das suas dimensões, bem como suas estruturas, purezas, e estabilidade para ser usado em meio biológico. A caracterização por Micro-Raman nos permite avaliar o grau de pureza do pó testado através de espectro, na qual tem-se pontos e picos determinantes para tal material. Através deste, na presente pesquisa, determinamos um material altamente puro e com modos vibracionais evidentes de nanocristais de óxido de zinco.

Em combinação, o método de difração de raio x, também revisado em literatura(Song et al, 2010; Gordon et al, 2011), verifica o tamanho das partículas testadas, bem como sua estrutura, composição, pureza, e cristalinidade,sendo estes de extrema importância ao material por relacionar-se com sua estabilidade. Neste trabalho, após a utilização do método confirmou-se estarmos diante de nanocristais de óxido de zinco e com tamanho de 21nm.

O estudo a cerca da biocompatibilidade dos materiais endodônticos é fato rotineiro na literatura (Huang et al., 2001; Huang et al., 2002; Sousa et al., 2004; Bodrumlu, 2008; Saleh et al., 2010). Dentre as diferentes metodologias que podem ser empregadas, o teste secundário de implante em tecido ósseo recomendado pela FDI, por meio de seu Technical Report # 9, permite ao investigador testar o material utilizando-o da mesma maneira como é usado na clínica, obedecendo às recomendações de manuseio indicadas pelo fabricante. Este sistema de avaliação, “*in vivo*”, apresenta constituição e características morfo-fisiológicas próximas daquele observado no ser humano, se viabilizando

como alternativa para avaliação do comportamento de sistemas biológicos complexos frente a materiais de natureza variada. Neste sentido, Olsson et al. (1981) alertam para o fato de que uma cavidade óssea artificial, usada para implantes intra-ósseo, é diferente do tecido de suporte, ligamento alveolar, a despeito das importantes informações que este teste pode oferecer. Não obstante, o desafio de um sistema biológico complexo, com o material implantado, possibilita verificar como este material interfere nos mecanismos moduladores da homeostasia tecidual, que proporciona, assim, informações sobre a atuação do sistema de defesa quando exposto a esse tipo de material e como modula a remodelação tecidual após a agressão.

Os primeiros estudos, em que se avaliam o implante intra-ósseo em copos de teflon, foram sugeridos por Spångberg (1969), e tem sido aceito e utilizado largamente na literatura, até os dias atuais, mas com algumas variações. O autor sugeriu, originalmente, a implantação de dois materiais diferentes; um em cada lado da sínfise mandibular do animal para que se pudesse fazer comparação da resposta inflamatória de cada um deles. Na avaliação dos resultados Spångberg (1969) descreve: “A diferença das respostas foi avaliada, em duas ocasiões diferentes, e classificada em moderadamente severa (+) e severa (++); na ausência de diferenças entre as inflamações, com o símbolo zero (0). Na análise estatística, foi calculado o número de comparações intra-individuais com outros materiais produzindo irritação menor, bem como o número de comparações que mostraram irritações mais severas. Por eliminação das variáveis extremas obtidas nessa comparação, as novas combinações de materiais foram analisadas para verificar quaisquer desvios. As diferenças significantes encontradas após tal eliminação podem ser duvidosas, mas assim mesmo servem como guia na classificação dos materiais estudados.”

Mais uma vez estamos diante da análise descritiva (+ ou ++) dos resultados e da tentativa de análise de estatística, o que pode ser duvidoso. Dessa maneira, fica sem sentido implantar-se material diferente em cada lado da mandíbula do animal, visto que a classificação da inflamação depende da observação individual. Isto encarece e complica a experimentação. Optou-se, portanto, pela utilização da análise descritiva e comparação dos resultados com demonstração fotográfica dos casos mais significativos. De acordo com a

metodologia citada, as reações ao longo da superfície do copo de Teflon serviram como controle para as reações oriundas do trauma cirúrgico e para caracterizar o grau de reação inflamatória, ao material testado, partindo-se da premissa de que o teflon é um material de pouca capacidade antigênica. Nos implantes efetuados, nos dois tempos experimentais, o autor relatou que as retenções na superfície do copo de teflon foram preenchidas por delgada camada de tecido conjuntivo não modelado, de variável densidade, associado à resposta inflamatória crônica granulomatosa inespecífica (tipo corpo estranho). As células foram observadas, no tecido conjuntivo justapostas ao copo, de forma alinhada e alongadas, com número variável de núcleos, acompanhadas por número variável de macrófagos mononucleares. O tecido ósseo adjacente apresentou-se com características de normalidade, estável, sem sinais de aposição recente ou de reabsorção. Não foram evidenciados sinais de dispersão do material implantado nesta região.

A contagem celular não foi considerada, pois Spängberg (1988), afirmou que os resultados podem ser analisados de forma direta sob investigação macro ou microscópica. Os exames microscópicos são a regra e seus objetivos visam qualificar a reação tecidual em contato com o material implantado. Entretanto, como já afirmado anteriormente, as reações teciduais são processos tridimensionais e a caracterização precisa de tais reações em termos mensuráveis é impossível, porque a leitura deve ser realizada camada por camada em secções finas de cortes bidimensionais, que permitem apenas uma interpretação subjetiva.

Apesar da literatura já apresentar inúmeros estudos a cerca da biocompatibilidade dos materiais obturadores endodônticos, ainda não há uma resposta conclusiva sobre o cimento que apresenta características que o torne ideal para ser utilizado na prática odontológica. Os cimentos à base de óxido de zinco e eugenol, embora muito utilizados com êxito, têm se mostrado com um alto índice de agressão, principalmente nos períodos iniciais de contato com os tecidos (Langeland, 1980; Eucomides et al., 1995; Kolokouris, 1998; Sousa et al., 2004; Zafalon et al., 2007). Economides et al. (1995) testaram a biocompatibilidade de cimentos endodônticos. Os cimentos testados foram à base de hidróxido de cálcio (CRCS, Sealapex), à base de óxido de zinco e eugenol (Roth 811) e, por último, à base de resina epóxica (AH-26). Os autores

encontraram que, com 20 dias, o material mais irritante foi o AH-26, porém foi observado que a sua reação inflamatória diminui com o tempo. Os cimentos Roth 811 e Sealapex causaram reações moderadas para severa, enquanto o cimento CRCS causou reação de média à moderada intensidade.

Kolokouris et al (1998), mostraram o potencial irritativo do cimento à base de óxido de zinco e eugenol após os primeiros dias de contato com os tecidos. Os autores verificaram a presença de áreas de necroses pelo cimento Pulp Canal Sealer, com reações de moderada à severa intensidade, até o quinto dia experimental, diminuindo sua intensidade com o passar do tempo. Tal suposição também foi confirmada por Azar et al. (2000), que ao compararem os efeitos citotóxicos dos cimento endodôntico: AH Plus com os dos cimentos AH-26 e do óxido de zinco e eugenol em fibroblastos humanos, verificaram que os efeitos citotóxicos induzidos pelo óxido de zinco e eugenol foram detectados muito cedo; 1 hora após manipulação e mantida em alto nível até completar todo o tempo experimental.

Resultados semelhantes também foram encontrados por Sousa et al. (2004), que ao avaliar a biocompatibilidade de materiais obturadores como: óxido de zinco e eugenol, MTA e com resina Z-100, concluíram que apenas o óxido de zinco e eugenol não apresenta nível de biocompatibilidade aceitável. Da mesma forma, Scarparo et al. (2009) mostrou em seu estudo, que os cimentos à base de óxido de zinco e eugenol não apresentam características ideais de biocompatibilidade para serem utilizadas como cimentos endodônticos.

Diante dos resultados, o efeito tóxico do cimento foi atribuído ao eugenol da mistura. Conforme Gulatti et al. (1991), os compostos de óxido de zinco e eugenol revelam uma intensidade de reação inflamatória dependente do eugenol livre na mistura, podendo ser irritante severo. Portanto, depende também do momento em que o material é inserido na cavidade, pois antes da presa final, a quantidade de eugenol livre é maior. Da mesma opinião são os trabalhos de Hume (1984), ao revelarem que qualquer substância que contenha eugenol em sua fórmula é tóxica devido à depressão da respiração celular causada por ele. Em seus testes com cimentos de óxido de zinco e eugenol, estes autores dizem que a resposta inflamatória parece aumentar com o decorrer do tempo e atribuem isto ao fato de que o eugenolato, que em

contato com os fluidos, libera eugenol livre aumentando a toxicidade com o passar do tempo.

Sob mesmo raciocínio, Hashieh et al (1999), também mostraram e atribuíram os efeitos irritativos ao eugenol, porém acreditam que o nível de eugenol liberado do cimento à base de óxido de zinco e eugenol, além ápice, é baixo e diminui sua concentração com o passar do tempo.

Apesar da literatura já apresentar vários estudos de biocompatibilidade dos cimentos à base de óxido de zinco e eugenol e demonstrar os efeitos tóxicos atribuídos ao eugenol, poucos trabalhos discutem o papel do pó do óxido de zinco nesses processos. No trabalho realizado por Hackenberg et al (2011), este pó não apresenta características de citotoxicidade nem de genotoxicidade. Porém ainda faltam resultados mais consistentes a cerca desse assunto.

O principal desafio da nanotecnologia engloba o desenvolvimento de novos materiais que exibam propriedades físico-químicas e funcionais específicas e diferentes dos seus materiais precursores (Adamson 1990). Assim, óxidos metálicos como o óxido de zinco, que apresentam grandes aplicações comerciais como em cosméticos, aditivos alimentares e eletrônicos, vem ganhando popularidade como agentes antimicrobianos no biofilme apical. (Kishen et al., 2007; Shrestha et al., 2010). Muitos estudos tem relatado a capacidade de óxidos, como ZnO, TiO₂, CuO, em escalas nanométricas, de inibir o crescimento de algas aquáticas, bactérias, protozoários e fungos, descrevendo seus efeitos tóxicos eficientes contra a cultura (Aruoja et al., 2010; Song et al., 2010; Mortimer et al., 2010).

Com relação aos efeitos antimicrobianos encontrados no nano óxido de zinco, Aruoja et al (2008), estimaram a toxidades dessas partículas contra algas *Pseudokirchneriella subcapitata*, relatando estar presente mesmo em baixas concentrações e também na sua forma *bulk*. Da mesma forma, Liu et al. (2009) afirmaram que NPs de ZnO podem distorcer e danificar a membrana celular bacteriana, resultando na quebra dos conteúdos intracelular e eventualmente na morte das células bacterianas, discorrendo sobre a sua capacidade antimicrobiana a *E.coli*.

Mortimer et al (2009), analisando a toxicidade das NP de ZnO e do CuO ao protozoário ciliado *Tetrahymena thermophila*, mostraram que efeitos de

toxicidade ao ciliado causam 50% de perda de viabilidade após 4 horas de exposição.

Quanto a sua capacidade antimicrobiana ao biofilme dental Kishen et al. (2008) avaliaram a eficiência dessas partículas para a desinfecção dos canais radiculares, mostrando-se eficientes, sem contudo interferir nas propriedades do cimento obturador utilizado. Achados semelhantes também foram encontrados por Shrestha et al (2010), que ao avaliarem a desinfecção e destruição do biofilme bacteriano, por meio de Scanner microscópico confocal e de testes microbiológicos, encontraram evidências de que as células bacterianas morreram e o biofilme apresentou uma significativa diminuição após serem tratados com nanopartículas de ZnO.

Muito embora a grande maioria dos estudos, a cerca da toxicologia das nanopartículas, ainda não foram elucidados, muitos trabalhos realizados *in vitro* trazem relevâncias para os trabalhos, " *in vivo*", e seus potenciais de riscos para o ser humano. Tsou et al (2010), afirmaram o potencial dessas partículas como indicadores de inflamação endotelial vascular, apresentando implicações inclusive para o tratamento de desordens vascular. Para Hackenberg et al. (2011), as nanopartículas de ZnO são responsáveis por causar inflamações mesmo em baixas concentrações, podendo ainda induzir a danificação do DNA.

No presente trabalho, foi avaliada a resposta inflamatória tecidual intra-óssea causada por nanocristais de óxido de zinco em teste intra-ósseo em cobaias *guinea pig*, segundo Federação Dentária Internacional. Nossos achados evidenciaram, nos dois tempos experimentais, a presença de reação inflamatória predominantemente leve e caracterizada como crônica granulomatosa inespecífica dominada por células do tipo corpo estranho. Podemos observar a presença de uma faixa de tecido conjuntivo fibroso interpondo o material e de tecido adjacente com discreta diversidade celular (Figura 4C e 5C). O tecido ósseo apresentou-se estável, íntegro e com áreas de neoformação. Estes achados foram similares àqueles observados no tecido em contato com a superfície do copo de teflon, consideradas como controles negativos em ambos os tempos experimentais (Spangberg, 1969). Essas evidências permite-nos acreditar que, os NCs de ZnO possuam uma capacidade limitada de ativação celular, não renovável, produzindo

modificações teciduais limitadas, interferindo de forma discreta na sua homeostasia (Liu et al., 2009). Esses achados, segundo Tsou et al. (2010), também podem ser considerados pelo fato de estarmos diante de mínimas nanopartículas nanocristalinas, que são capazes de resultar em variações das superfícies eletrônicas de suas estruturas, bem como na sua área de superfície, fato pelo qual elas apresentam características únicas.

Estes resultados aparentemente são contraditórios aos observados nos estudos ,*“in vitro”*, tendo em vista sua documentada toxicidade para células em cultura. Embora não tenhamos uma explicação objetivamente provável para isto, é possível que o sistema biológico complexo proporcione uma interação do material com diferentes produtos do líquido tissular, incluindo proteínas, reduzindo o potencial agressivo dos NCs, em função da limitação de sua difusão e do contato direto com o sistema de membrana celular. Assim, os fagócitos poderiam ser mais eficientes no processo de fagocitose, limitando a agressão tecidual e, portanto, os efeitos tóxicos sobre o tecido. A ação tóxica contínua do material sobre o tecido poderia ser traduzida pela presença de maior número de neutrófilos e plasmócitos condizentes com a presença de maior quantidade disponível de antígenos gerados da agressão ao tecido alvo do implante. Os mecanismos envolvidos nas diferenças das respostas observadas, *“in vivo”*, e *“in vitro”*, poderiam favorecer a compreensão do comportamento da substância e da resposta tecidual a sua presença, favorecendo o entendimento da melhor forma do emprego biomédico do material.

Ao final da presente pesquisa, após leitura da literatura pertinente ao assunto e a avaliação da parte experimental, acreditamos estarmos diante de um nanobiomaterial com características de biocompatibilidade, o que possibilitaria o seu emprego como um material de uso odontológico e, em específico, na área da endodontia. Na literatura ainda existem controvérsias quanto ao seu potencial tóxico aos tecidos e órgãos, porém já encontramos estudos *in vitro* com relevância ,*“in vivo”* ,.

Como sugestão, novas pesquisas devem ser realizadas com a finalidade de avaliar a toxicologia desses materiais em humanos, de modo a indicar, segundo suas considerações, aplicações em áreas biomédicas.

Conclusão

7. CONCLUSÃO

Conclui-se, com base nos resultados deste estudo, que os nanocristais de ZnO, caracterizados por meio de Micro-Raman e DRX, apresentaram-se com tamanho médio de 21nm, estrutura hexagonal e altamente puros e podem ser considerados um nanobiomaterial, por apresentarem, em ambos os períodos experimentais, respostas inflamatórias predominantemente leves, segundo critérios estabelecidos pela FDI. Esta conclusão, quanto à biocompatibilidade dos NCs de ZnO, é reforçada pelo fato de ter sido tolerada pelos tecidos, permitindo neoformação e remodelação óssea.

Referências

8. REFERÊNCIAS*

- 1- ANSI/ADA **Specification for Biological Evaluation of Materials**. Approved January 4, 1982.
- 2- Aruoja V, Dubourguier H-C, Kasemets K, Kahru A. Toxicity of nanoparticles of CuO, ZnO and TiO₂ to microalgae *Pseudokirchneriella subcapitata*. **Science of the Total Environment** . 2009; 407: 1461-1468.
- 3- Azar NG, Heidari MH, Bahrami ZS, Shokri F. In vitro cytotoxicity of a new epoxy resin root canal sealer. **Journal of Endodontics**. 2000; 26(8): 462-465.
- 4- Batista RFC, Hidalgo MM, Hernandez L, Consolaro A, Velloso TRG, Cuman RKN, et al. Microscopic analysis of subcutaneous reactions to endodontics sealers implants in rats. **Journal of Biomedical Materials Reserch**. 2007; 81: 171-177.
- 5- Bernabé PFE, Holland R, Morandi R, Souza V, Nery MJ, Otoboni Filho FA, et al. Comparative study os MTA and outhier materials in retrofilling of pulpless dog's teeth. **Braz Dent Journal**. 2005,16(2): 149-155.
- 6- Bodrumlu E. Biocompatibility of retrograde root filling materials: A review. **Aust. Endod. Journal**. 2008; 34:30-35.
- 7- CHAVES, A. Reportagem nanociência e nanotecnologia.Disponível em: www.comciencia.br, 2002.
- 8- Da Silva PT, Pappen FG, Souza EM, Dias JE, Bonetti Filho I, Carlos IZ,et al. Cytotoxicity evaluation of four endodontic sealers. **Braz Dent Journal**. 2008;19(3): 228-231.

* De acordo com a Norma da FOUFU, baseado nas Normas de Vancouver. Abreviaturas dos periódicos com conformidade com Medline (Pubmed).

- 9- Da Silva G F, Guerreiro- Tanomaru J M, Sasso-Cerri E, Tanomaru-Filho M, Cerri PS. Histological and histomorphometrical evaluation of furcation perforations filled with MTA, CPM and ZOE. **International Endodontics Journal**. 2011; 44: 100-110.

- 10- Damen TC, Porto SPS, Tell B. Raman Effect in Zinc Oxide. **Physical Review**. 1966; 142: 570-574.

- 11- Dantas NO, Damigo L, Qu F, Cunha JFR, Silva RS, Miranda KL, et al. Raman investigation of ZnO and $Zn_{1-x}Mn_xO$ nanocrystals synthesized by precipitation method. **Journal of Non-Crystalline Solids**. 2008;354: 4827-4829.

- 12- Economides N, Kotsaki-Kovatsi VP, Pouloupoulos A, Kolokuris I, Rozos G, Shore R. Experimental study of the biocompatibility of four root canal sealers and their influence on the zinc and calcium content of several tissue. **Journal of Endodontics**. 1995; 21(3):122-127.

- 13- Technical Report F.D.I. Langeland, K.; Cotton, W.R. Recommended standard practices for biological evaluation of dental materials. **International Dentistry Journal**. 1980; 30(2): 140-88.

- 14- Figueiredo JAP, Pesce HF, Gioso MA, Figueiredo MAS. The histological effects of four endodontic sealers implanted in the oral mucosa: submucous injection versus implants in polyethylene tubes. **International Endodontics Journal**. 2001;34:377-385.

- 15- Gerosa R, Borin M, Menegazzi G, Puttini M, Cavalleri G. In vitro evaluation of the cytotoxicity of pure eugenol. **Journal of Endodontics**. 1996;22(10):532- 534.

- 16- Guigand M, Mussi PP, Goff AL, Vulcain JM, Mallet MB. Evaluation of the cytocompatibility of three endodontic materials. **Journal of Endodontics**. 1999;25(6):419-423.

- 17- Gulati N, Chandra S, Aggarwal PK, Jaisval JN, Singh M. Citotoxicity of eugenol in sealer containing zinc oxide. **Endod. Dent.Traumatol.** 1991; 7: 181-185.
- 18- Gomes-Filho JE, Gomes BPFA, Zaia AA, Ferraz CR, Souza-Filho FJ. Evaluation of the biocompatibility of root canal sealers using subcutaneous implants **Journal of Applied Oral Science.** 2007;15(3):186-94.
- 19- Gordon T, Perlstein B, Houbara O, Felner I, Banin E, Margel S. Synthesis and characterization of zinc/iron oxide composite nanoparticles and their antibacterial properties. **Colloids and Sufaces A: Physicochemical and Engineering Aspects.** 2011; 374: 1-8.
- 20- Hackenberg S, Scherzed A, Technau A, Kessler M, Froelich K, Ginzkey C, et al. Cytotoxic, genotoxic and pro-inflammatory effects of zinc oxide nanoparticles in human nasal mucosa cells *in vitro*. **Toxicology in vitro.** 2011; 25: 657-663.
- 21- Hashieh IA, Pommel L, Camps J. Concentration of eugenol apically released from zinc oxide-eugenol-based sealers. **Journal of Endodontics.** 1999;25(11): 713-715.
- 22- Heng BC, Zhao X, Xiong S, Ng KW, Boey FYC, Loo JSC. Toxicity of zinc oxide(ZnO) nanoparticles on human bronchial epithelial cells (BEAS-2B) is accentuated by oxidative stress. **Food and Chemicas Toxicology.** 2010; 48: 1762-1766.
- 23- Hu YL, Gao JQ. Potencial neurotoxicity of nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics.** 2010; 394: 115-121.

- 24- Huang FM, Tai KW, Chou MY, Chang YC. Cytotoxicity of resin, zinc oxide-eugenol, and calcium hydroxide-based root canal sealers on human periodontal ligament cells and permanent V79 cells. **International Endodontics Journal**. 2002;35:153-158.
- 25- Hume W.R. In vitro studies on the local pharmacodynamics, pharmacology and toxicology of eugenol and zinc oxide-eugenol. **International Endodontics Journal**. 1988, 21:130-134.
- 26- Jiang W, Mashayekhi H, Xing B. Bacterial toxicity comparison between nano-and micro scales oxide particles. **Environmental Pollution**. 2009; 157:1619-1625.
- 27- Kasemets K, Ivask A, Dubourguier H-C, Kahru A (2009) Toxicity of nanoparticles of ZnO, CuO and TiO₂ to yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Toxicology in vitro**. 2009; 23: 1116-1122.
- 28- Kishen A, Shi Z, Sherestha A, Neoh KG. An investigation on the antibacterial and antibiofilm efficacy of cationic nanoparticulates for root canal disinfection. **Journal of Endodontics**. 2007;34(12):1515-1520.
- 29- Kolokouris I, Economides N, Beltes P, Vlemmas I. In vivo comparison of the biocompatibility of two root canal sealers implanted into the subcutaneous connective tissue of rats. **Journal of Endodontic**. 1998;24(2):82-85.
- 30- Koulaouzidou EA, Papazisis KT, Economides NA, Beltes P, Kortsaris A. Antiproliferative effect of mineral trioxide aggregate, zinc oxide-eugenol cements, and glass-ionomer cement against three fibroblast cell lines. **Journal of Endodontics**. 2005; 31(1): 44-46.
- 31- Lee KW, Williams MC, Camps JJ, Pashley DH. Adhesion of endodontic sealers to dentin and gutta-percha. **Journal of Endodontics**. 2002;28(10):684-688.

- 32- Leonardo RY, Consolaro A, Carlos IZ, Leonardo MR. Evaluation of cell culture cytotoxicity of five root canal sealers. **Journal of Endodontics**. 2000;26(6):328-330.
- 33- Leonardo MR, Silva LAB, Filho MT, Bonifácio KC, Ito IY. In vitro evaluation of antimicrobial activity of sealers and pastes used in endodontics. **Journal of Endodontics**. 2000;26(7): 391-394.
- 34- Li LZ, Zhou DM, Peijnenburg WJGM, Gestel CAMV, Jin SY, Wang YJ, et al. Toxicity of zinc oxide nanoparticles in the earthworm, *Eisenia fetida* and subcellular fractionation of Zn. **Environment International**. 2011: 1-7.
- 35- Liu Y, He L, Mustapha A, Li H, Hu ZQ, Lin M. Antibacterial activities of zinc oxide nanoparticles against *Escherichia coli* 0157:h7. **Journal of Applied Microbiology**. 2009; 107: 1193-1201.
- 36- Mendes STO, Sobrinho APR, Carvalho AT, Cortes MIS, Vieira LQ. In vitro evaluation of the cytotoxicity of two root canal sealers on macrophage activity. **Journal of Endodontics**. 2003; 29(2): 95-99.
- 37- Mittal M, Chandra S, Chandra S. Comparative tissue toxicity evaluation of four endodontic sealers. **Journal of Endodontics**. 1995: 21(12): 622-624.
- 38- Mortimer M, Kasemets K, Kahru A (2010) Toxicity of ZnO and CuO nanoparticles to ciliated protozoa *Tetrahymena thermophila*. **Toxicology** 269, 182-189.
- 39- Newman MD, Stotland M, Ellis JI. The safety of nanosized particles in titanium dioxide and zinc oxide based sunscreens. **Journal American Dermatological**. 2009;61:685-92.
- 40- Olsson B, Sliwowskia L, Langeland K. Subcutaneous implantation for the biological evaluation of endodontic materials. **Journal of Endodontics**. 1981;7:355-69.

41- Panecek A, Kolar M, Vecerova R, Pucek R, Soukupová J, Krystof V, et al. Antifungal activity of silver nanoparticles against *Candida ssp.* **Biomaterials**. 2009; 30: 6333-6340.

42- Pascon EA, Langeland K. Cytotoxicity of a new endodontic sealer. [Resumo] **Journal Dentistry Reserch**. 1989, 68: 244.

43- Perassi FT, Filho IB, Berbert FLCV, Carlos IZ, Leonardo RTL. Secretion of tumor necrosis factor- alpha by mouse peritoneal macrophages in the presence of dental sealers, Sealapex e Endomethasone. **Journal of Endodontics**. 2004, 30(7):534-537.

44- Pinna L, Brackett MG, Lockwood PE, Huffman BP, Mai S, Cotti E, et al. In vitro cytotoxicity evaluation of a self-adhesive, methacrylate4 resin-based root canal sealer. **Journal of Endodontics**. 2008; 34(9): 1085-1088.

45- Scarparo RK, Grecca FS, Fachin EVF. Analysis of tissue reactions to methacrylate resin-based, epoxy resin-based, and zinc oxide-eugenol endodontic sealers. **Journal of Endodontics**. 2009;35(2):229-232.

46- Schwartze T, Fieldler I, Leyhausen G, Geurtsen W. The cellular compatibility of five endodontic sealers during the setting period. **Journal of Endodontics**. 2002; 28(11): 784-786.

47- Schwartze T, Leyhausen G, Geurtsen W. Long –term cytocompatibility of various endodontics sealers using a new root canal model. **Journal of Endodontics**. 2002; 28(11):749-753.

48- Silva Jr F. Texto a respeito da cooperativa para pesquisa em nanodispositivos semicondutores e materiais nanoestruturados (NanoSemiMat). www.semicondutores.ufpe.br, 2002.

- 49- Shrestha A, Zhilong S, Gee NK, Kishen A. Nanoparticulates for antibiofilm treatment and effect of aging on its antibacterial activity. **Journal of Endodontics**. 2010;36(6):1030-1035.
- 50- Song W,m Zhang J, Guo J, Zhang J, Ding F, LI L, et al. Role of the dissolved zinc ion and reactive oxygen species and cytotoxicity of ZnO nanoparticles. **Toxicology letters**. 2010. 389-397.
- 51- Sousa CJA, Loyola AM, Versiani MA, Biffi JCG, Oliveira RP e Pascon EA. A comparative histological evaluation of the biocompatibility of materials used in apical surgery. **International Endodontic Journal**. 2004;37:738-748.
- 52-Sousa CJA, Montes CRM, Pascon EA, Loyola AM, Versiani MA. Comparison of the intraosseous biocompatibility of AH Plus, EndoREZ, and Epiphany root canal sealers. **Journal of Endodontics**. 2006; 32: 656-662.
- 53- Spangberg L S. Biologic effects of root canal filling materials. **Odontologic Revysion**, 1969;20:123-132, 133-145, 283-287, 289-299, 427-436.
- 54- Tassery H, Pertot WJ, Camps J, Proust JP, Dejou J. Comparison of two implantation sites for testing intraosseous biocompatibility. **Journal of Endodontics**. 1999; 25(9): 615-618.
- 55- Tsou TC, Yeh SC, Tsai FY, Lin HJ, Cheng TJ, Chao HR, Lin AT. Zinc oxide particles induce inflammatory response in vascular endothelial cells via NF- kB signaling. **Journal of Hazardous Materials**. 2010; 183: 182-188.
- 56- Zafalon EJ, Versiani MA, Souza CJA, Moura CCG, Dechichi P. In vivo comparison of the biocompatibility of two root canal sealers implanted into subcutaneous connective tissue of rats. **Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathologic Oral Radiologic Endodontic**. 2007;103:88-94.

57- Zaveri TD, Dolgova NV, Chu BH, Lee J, Wong J, Lele TP, et al. Contributions of surface topography and cytotoxicity to the macrophage response to zinc oxide nanorods. **Biomaterials**. 2010; 31: 2999-3007.

58- Zmener O, Pameijer CH, Kokubu GA, Grana DR. Subcutaneous connective tissue reaction to metacrylate resin-based and zinc oxide and eugenol sealers. **Journal of Endodontics**. 2010; 36(9): 1574-1579.

59- [<http://www.its.caltech.edu/~feynman>]

60- Yang H, Liu C, Yang D, Zhang H, Xi Z. Comparative study of cytotoxicity, oxidative stress and genotoxicity induced by four typical nanomaterials: the role of particles size, shape and composition. **Journal Application Toxicology**. 2009; 29: 69-78.