



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARAÇATUBA**

**AMANDA PONTES FIORAVANTE**

**BICOMPATIBILIDADE DO AZUL DE METILENO EM  
DIFERENTES PHs**

Araçatuba  
2017



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"

**AMANDA PONTES FIORAVANTE**

**BICOMPATIBILIDADE DO AZUL DE METILENO EM  
DIFERENTES PHs**

Trabalho de Conclusão de Curso  
apresentado à Faculdade de Odontologia de  
Araçatuba – UNESP como parte dos  
requisitos para obtenção do título de Bacharel  
em Odontologia.

Orientador: **Juliano Milanezi de Almeida**

Araçatuba  
2017

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por ter me dado o dom da vida, uma família maravilhosa e me permitido a realização deste sonho.

Aos meus pais, Pedro e Neusa, pelo o amor, carinho, preocupação e colaboração dedicados durante toda a minha vida, por me proporcionarem toda a base para a realização deste sonho e participarem dele.

Ao meu irmão, Evandro, pelo afeto e incentivo, sendo sempre um exemplo de caráter e empenho.

Ao Cássio, por todo amor, carinho e companheirismo, pela paciência que tem diariamente comigo, por estar sempre ao meu lado, me incentivando e dando força.

À minha prima Maiara e minhas amigas, Bárbara, Gabriela, Larissa, Loriane, Natália, por todos os momentos que passamos juntas, por todas as conversas, choros, conselhos e pelo companheirismo.

Aos amigos que a faculdade me trouxe, a toda a turma LIX. Em especial a Ana Carolina, Geovana, Jaqueline e Lohana, pelos anos maravilhosos que passamos juntas, apesar de todas as diferenças de personalidade, pelo apoio que sempre me deram e pela amizade, que sem dúvidas, levarei para vida toda.

Ao meu orientador Juliano Milanezi de Almeida, pelo excelente profissional que é, pelos ensinamentos passados, por sua atenção e pelo incentivo durante a realização deste trabalho.

Ao David, pela ajuda fundamental na realização deste trabalho, pelos ensinamentos, conselhos, paciência e pelas várias sextas-feiras limpando lâminas.

A todos os meus professores, por toda a dedicação em transmitir seus conhecimentos e cobrar o melhor de cada aluno.

À Faculdade de Odontologia de Araçatuba, por toda a estrutura disponibilizada aos alunos para que eles tenham um ensino de excelência.

À minha cachorrinha Lola, por ser minha companheira desde o início desta etapa, em todas as viagens de volta pra casa, finais de semana sozinha e madrugadas de estudo.

“O insucesso é apenas uma oportunidade de  
recomeçar com mais inteligência.”

Henry Ford

FIORAVANTE, A.P. **Biocompatibilidade do azul de metileno em diferentes pHs.** 2017. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2017.

## RESUMO

O objetivo deste estudo foi investigar a biocompatibilidade do azul de metileno em diferentes níveis de pH através do método de implantação de tubos em tecido subcutâneo. Oitenta e quatro tubos de polietileno esterilizados foram alocados no tecido subcutâneo de 21 ratos, cada um recebendo 4 tubos que foram divididos em 4 grupos: Grupo tubo (G-T) - tubo vazio; Grupo fibrina (G-F) - tubo preenchido de esponja de fibrina; Grupo Azul de Metileno pH 7 (G-AM/pH7) - tubo preenchido com esponja de fibrina embebida em azul de metileno (100 µg/ml) com pH 7,0; Grupo Azul de Metileno pH 1 (G-AM/pH1) - tubo preenchido com esponja de fibrina embebida em azul de metileno (100 µg/ml) com pH 1,0. Após 7, 15 e 30 dias, 7 animais de cada grupo foram eutanasiados e os tubos envolvidos pelo tecido circundante foram removidos e fixados com solução de formaldeído tamponado a 4%. As peças coletadas foram processadas e as secções histológicas (4 µm) foram coradas com hematoxilina e eosina e analisadas por microscopia óptica. Escores foram atribuídos à análise dos parâmetros histopatológicos. Os resultados foram analisados estatisticamente pelo teste de Kruskal Wallis ( $p \leq 0,05$ ). Resultados: Aos 7 e 30 dias, o grupo G-AM/pH1 não apresentou diferença significativa comparado ao grupo controle G-T, enquanto o G-AM/pH7 apresentou aumento significativo na reação tecidual, também quando comparado ao G-T. Aos 15 dias não houve diferença estatística entre os grupos. Dentro dos limites deste estudo, conclui-se que o azul de metileno em pH 1,0 proporcionou melhor biocompatibilidade do que em pH 7,0.

**Palavras-chave:** Teste de biocompatibilidade. Tecido subcutâneo. Concentração de íons de hidrogênio. Azul de metileno.

FIORAVANTE, A.P. **Biocompatibility of methylene blue at different pHs.** 2017.  
Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado) – Faculdade de Odontologia,  
Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2017.

## **ABSTRACT**

The aim of this study was to investigate the biocompatibility of methylene blue at different pH levels through the method of implantation in subcutaneous tissue. Eighty-four sterilized polyethylene tubes were allocated in the subcutaneous tissue of 21 rats, each one receiving 4 tubes, set into 4 groups: group tube (G-T) – empty tube; Fibrin group (G-F) – tube filled with fibrin sponge; Group Methylene Blue pH 7 (G-MB/pH7) – tube filled with fibrin sponge soaked by methylene blue (100µg/ml) at pH 7.0; Group Methylene Blue pH 1 (G-MB/pH1) – tube filled with fibrin sponge and soaked by methylene blue (100µg / ml) at pH 1.0. After 7, 15 and 30 days, 7 animals from each group were euthanized and the tubes involved by the surrounding tissue were removed and fixed with 4% buffered formaldehyde solution. The collected pieces were processed and histological sections (4 µm) were stained with hematoxylin and eosin and analyzed by light microscopy. Scores were assigned to analysis of histopathologic parameters. The results were statistically analyzed by the Kruskal Wallis test ( $p \leq 0.05$ ). At 7 and 30 days the G-MB/pH 1 group showed no significant difference in the G-T control group, while G-MB/pH 7 had a significant increase on tissue reaction, also when compared to G-T. At 15 days there was no statistical difference between the groups. Within the limits of this study, it is concluded that methylene blue at pH 1.0 provides better biocompatibility than at pH 7.0.

**Keywords:** Biocompatibility testing. Subcutaneous tissue. Hydrogen-ion concentration. Methylene blue.

## LISTA DE ABREVIATURAS

aPDT	Terapia fotodinâmica antimicrobiana
Bis-DMA	Bisfenol-A dimetacrilato
Bis-GMA	Bisfenol-A glicidil metacrilato
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
FGF	Fator de crescimento de fibroblasto
G-AM/pH1	Grupo preenchido com esponja de fibrina embebida em azul de metileno pH 1,0
G-AM/pH7	Grupo preenchido com esponja de fibrina embebida em azul de metileno pH 7,0
G-F	Grupo preenchido com esponja de fibrina
G-T	Grupo com tubo vazio
IL	Interleucina
pH	Potencial hidrogeniônico
RAR	Raspagem e alisamento radicular
TEGDMA	Trietileno glicol dimetacrilato
UDMA	Uretano dimetacrilato

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	9
<b>2</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	11
2.1	Animais.....	11
2.2	Disposição dos tubos.....	11
2.3	Grupos experimentais.....	11
2.4	Implantação subcutânea.....	11
2.5	Períodos experimentais e procedimentos laboratoriais.....	12
2.6	Análise histológica.....	12
2.7	Análise estatística.....	13
<b>3</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	14
3.1	Grupo controle (G-T).....	14
3.2	Grupo controle (G-F).....	14
3.3	Grupo de teste (G-AM/pH7).....	14
3.4	Grupo de teste (G-AM/pH1).....	14
3.5	Comparação entre os grupos.....	15
<b>4</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	16
<b>5</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	19
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	20
	<b>FIGURA 1</b> .....	28
	<b>TABELA 1</b> .....	29



## 1 INTRODUÇÃO

A capacidade de um material estranho residir em um organismo, fazendo contato com a matéria viva (tecido ou órgão) é chamado de biocompatibilidade<sup>1,2</sup>. O material estranho precisa ser aceito pelos tecidos dentro de seus limites fisiológicos, e os materiais dentários não biocompatíveis que afetam negativamente os pacientes tornaram-se uma crescente preocupação pública<sup>1,3</sup>.

Dentre os diversos materiais utilizados na odontologia, o azul de metileno é uma das principais substâncias usadas no tratamento de infecções, uma vez que possui um alto grau de seletividade para bactérias gram-positivas e gram-negativas, e na maioria das vezes é utilizado durante a terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT)<sup>4</sup>.

O azul de metileno é um agente fotossensibilizador, ativado pela luz num comprimento de onda específico (660 nm) que corresponde ao máximo de absorvância. A combinação de irradiação de luz visível e substâncias fotoativadas desencadeia o processo fotodinâmico<sup>5-9</sup>. Este processo produz radicais livres, oxigênio singleto e outras espécies reativas de oxigênio, levando à foto-oxidação da matéria orgânica<sup>10,11</sup>. A fotossensibilização letal dos microrganismos deve envolver alterações mediadas pelo oxigênio singleto nas membranas e/ou proteínas da membrana plasmática e DNA<sup>4,12-16</sup>.

Assim, a aPDT serve como terapia não-invasiva para o controle da infecção e tem sido usada como adjuvante no tratamento da periodontite crônica<sup>17</sup> e agressiva<sup>18</sup>, peri-implantite<sup>19</sup>, periodontite apical<sup>20</sup>, após remoção do terceiro molar impactado<sup>21</sup>, tratamento<sup>20,22</sup> e re-tratamento<sup>23</sup> endodôntico, cirurgia endodôntica<sup>24</sup>, e pode ser considerado promissor para tratamento de lesões de cárie dentária<sup>25</sup>.

Para a periodontite crônica e agressiva, a raspagem e alisamento radicular (RAR) é considerado o tratamento padrão ouro, proporcionando melhorias clínicas ao desorganizar o biofilme subgingival, diminuindo a quantidade de bactérias e retardando o repovoamento de microrganismos<sup>26,27</sup>. No entanto, dificuldades no acesso às áreas de furca, concavidades radiculares e durante a remoção de bactérias que penetraram os túbulos dentinários<sup>17,28,29</sup> demonstram que a RAR pode não ser completamente eficaz e, por essas razões, a aPDT tem sido recomendada<sup>17</sup>.

Por outro lado, habitualmente utilizam-se as substâncias ácidas tais como ácido cítrico (pH 1), ácido fosfórico (pH 1,02), ácido bórico (pH 4,9), ácido etilenodiaminotetraacético (EDTA) (pH 7,0-7,4) e tetraciclina (pH 2,2) para o condicionamento químico das paredes do canal radicular e da superfície radicular externa<sup>30,31,32</sup>. As substâncias ácidas modificadoras de superfície da raiz destinam-se a desintoxicar a superfície radicular, remover a camada de smear layer e a promover a desmineralização, aumentando a adesão das redes de fibrina e fibroblastos às superfícies radiculares, levando à exposição da matriz de colágeno<sup>20</sup>.

Nos últimos anos vários estudos têm proposto o uso de aPDT em diferentes tratamentos associados a vários agentes fotossensibilizantes, mas todos com substâncias com pH alcalino e neutro. Desta forma, é importante avaliar a biocompatibilidade de soluções utilizadas em combinação com aPDT, especialmente a influência dos níveis dos pHs destas soluções. Uma vez que a hipótese é de que o comportamento do tecido em contato com o azul de metileno em pH ácido poderia ser tão saudável quanto o azul de metileno em pH neutro, o objetivo deste estudo foi investigar a biocompatibilidade do azul de metileno com diferentes níveis de pH através do método de implante em tecido subcutâneo (ISO 10993-6/2007).

## 2 MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 Animais

Vinte e um ratos machos de 4 meses de idade (*Rattus norvegicus Albinus*, Wistar), pesando 250-300g (UNESP, Escola Odontológica de Araçatuba, Unidade de Cuidados com Animais) foram mantidos em gaiolas de plástico, com acesso a alimentos e água ad libitum, em uma sala com ciclo 12-h luz/12-h escuro e temperatura entre 22 °C e 24 °C. A pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (00310-2016) da Universidade Estadual Paulista - Julio de Mesquita Filho – Faculdade de Odontologia de Araçatuba.

### 2.2 Disposição dos tubos

Tubos de polietileno esterilizados (CPL Medical's, São Paulo, SP, Brasil) com diâmetro interno de 1,6 mm, diâmetro externo de 2,0 mm e medindo 10,0 mm de comprimento foram utilizados. Os materiais que preencheram os tubos foram: esponja de fibrina, azul de metileno pH 7,0 (Azul de metileno – pH 7.0, 100 µg/ml –Apothicário, Araçatuba, São Paulo, Brasil) e azul de metileno pH 1,0 (Azul de metileno – pH 1.0, 100 µg/ml – Apothicário, Araçatuba, São Paulo, Brasil). Utilizou-se o ácido cítrico (60 µg/ml) para atingir o pH 1 na solução ácida de azul de metileno. Ambas as soluções de azul de metileno apresentavam 98,5% de pureza.

### 2.3 Grupos experimentais

Os tubos foram separados em 4 grupos experimentais (n= 7): tubo sem qualquer preenchimento como grupo de controle (G-T); Grupo preenchido com esponja de fibrina (G-F); Grupo preenchido com esponja de fibrina embebida em azul de metileno pH 7,0 (G-AM/pH7); e o grupo preenchido com esponja de fibrina embebida em azul de metileno pH 1,0 (G-AM/pH1).

### 2.4 Implantação subcutânea

Os animais foram anestesiados por injeção intramuscular de ketamina (70 mg/kg-Francotar-Virbac do Brasil Ind. Com. Ltda, Roseira, Brasil) e xilazina (6 mg/kg-Rompum-Bayer S. A., São Paulo, Brasil). O procedimento cirúrgico foi semelhante ao de outros estudos<sup>33,34</sup>. O lado dorsal dos ratos foi tricotomizado e desinfetado com

digluconato de clorexidina a 0,2% (Colgate-Palmolive, New York, NY). Uma incisão de 2 cm foi feita na direção cabeça-caudal com uma lâmina de bisturi 15 Bard-Parker (Franklin Lakes, NJ). Foram criados duas bolsas de cada lado na porção craniana (alojando dois tubos) e na porção caudal (alojando dois tubos) por dissecação com tesoura ponta romba, os tubos foram implantados no tecido subcutâneo e a pele foi suturada com fio de seda 4-0 (Johnson & Johnson/Ethicon).

## 2.5 Períodos experimentais e procedimentos laboratoriais

Os animais foram sacrificados em intervalos de 7, 15 e 30 dias com tiopental (150mg/kg - Thiopentax-Cristália- Produtos Químicos Ltda, São Paulo, Brasil) e lidocaína (6mg / kg - Lidovet - Bravet, Ltda. Janeiro, Brasil). Os tubos e os tecidos circundantes foram removidos em blocos e fixados em solução de formaldeído tamponado 4%. Os espécimes foram processados em parafina e preparados longitudinalmente através da linha média dos tubos para se obterem secções de 4 µm de espessura e foi realizado a coloração com hematoxilina-eosina.

## 2.6 Análise histológica

Um valor médio para cada animal foi obtido a partir das células totais contadas em 10 áreas diferentes sob ampliação 400x. A análise foi realizada por um examinador cego e calibrado utilizando um microscópio óptico (Olympus BX 50 F4, Olympus Optical Co., Ltd., Tóquio, Japão). As imagens foram obtidas usando uma câmera digital (Olympus DP 10, Olympus Optical Co. Ltd., Tóquio, Japão) conectada ao microscópio.

Reações nas bordas dos tecidos em contato com os materiais foram analisadas e um sistema de escores foi empregado de acordo com estudos anteriores<sup>33-35</sup>. As reações inflamatórias foram categorizadas como:

- a) Escore 0, sem células inflamatórias;
- b) Escore 1, com leve inflamação (células <25);
- c) Escore 2, com moderada inflamação (células = 25-125); e
- d) Escore 3, com severa inflamação (>125 células).

A espessura da cápsula fibrosa quando analisada foi considerada:

- a) Fina quando <150 µm;
- b) Espessa quando >150 µm.

A necrose foi registrada como presente ou ausente e uma média do número de células para cada grupo foi obtida a partir de 10 áreas separadas e classificado de acordo com as pontuações 0-3.

## 2.7 Análise estatística

As medições foram repetidas duas vezes para assegurar a reprodutibilidade e a mediana dos escores foi calculada. Os resultados foram estatisticamente analisados pelos testes de Kruskal-Wallis ( $p < 0,05$ ).

### 3 RESULTADOS

#### 3.1 Grupo controle (G-T)

Aos 7 dias, uma moderada infiltração de células inflamatórias consistindo de linfócitos e macrófagos estava presente na cápsula fibrosa (Fig. 1[a]). Aos dias 15 e 30, o tecido conjuntivo estava bem organizado e observou-se uma infiltração de poucas células inflamatórias crônicas (Fig. 1[b]/[c]). A cápsula fibrosa que circundava o tubo era fina, com poucas células inflamatórias crônicas aos 15 e 30 dias (Fig. 1[b]/[c]).

#### 3.2 Grupo controle (G-F)

Aos 7 dias, uma severa infiltração de células inflamatórias consistindo em linfócitos e macrófagos estava presente na cápsula fibrosa (Fig. 1[d]). A intensidade inflamatória foi reduzida aos 15 e 30 dias (Fig. 1[e]/[f]), tornando-se moderada e leve respectivamente. A cápsula fibrosa ao redor do tubo era comparativamente fina aos 30 dias (Fig. 1 [f]).

#### 3.3 Grupo de Teste (G-AM/pH7)

Aos 7 dias, uma severa infiltração de células inflamatórias consistindo em linfócitos e macrófagos estava presente na cápsula fibrosa (Fig. 1[g]). No entanto, aos 15 e 30 dias, uma moderada infiltração de células inflamatórias constituída por linfócitos e macrófagos estava presente na cápsula fibrosa (Figura 1[h]/[i]), que foi considerada fina aos 30 dias (Fig. 1[i]).

#### 3.4 Grupo de teste (G-AM/pH1)

Aos 7 e 15 dias (Fig. 1[j]/[k]), uma moderada infiltração de células inflamatórias consistindo em linfócitos e macrófagos estava presente na cápsula fibrosa. Aos 30 dias (Fig. 1[l]), uma leve inflamação foi observada. A intensidade da inflamação e a espessura da cápsula fibrosa foram reduzidas no dia 30 (Fig. 1[1]), com leve infiltração de células inflamatórias crônicas constituídas por linfócitos e macrófagos presentes na cápsula fibrosa fina.

### 3.5 Comparação entre os grupos

Os dados em cada período foram comparados, como mostrado na Tabela 1. Nos dias 7 e 30, houveram diferenças estatisticamente significantes no número de células inflamatórias entre o grupo controle e o grupo G-AM/pH7 ( $p= 0,0014$  e  $0,0010$ , respectivamente). Aos 7 dias, o G-AM/pH1 (mediana 2) não apresentou diferença significativa com o grupo G-T (mediana 1) e o grupo G-AM/pH7 (mediana 3) foi estatisticamente significativo, mostrando maior reação tecidual. Aos 15 dias, não foi observado diferença significativa entre os grupos ( $p = 0,0051$ ). Aos 30 dias, o grupo G-AM/pH1 (mediana 1) não apresentou diferença significativa com o G-T (mediana 1) e o G-AM/pH7 (mediana 2) foi estatisticamente significativo, mostrando maior reação tecidual.

## 4 DISCUSSÃO

Atualmente, o desenvolvimento de biomateriais deve considerar a estética, força, aspectos funcionais e também sua biocompatibilidade com o tecido conjuntivo<sup>1</sup>. A implantação de tubos de polietileno esterilizados no tecido conjuntivo subcutâneo de ratos tem sido amplamente utilizada para avaliar a biocompatibilidade de materiais de acordo com as normas ISO 10993-6/2007<sup>33,36</sup>. Assim, o objetivo deste estudo foi investigar a biocompatibilidade do azul de metileno a diferentes níveis de pH.

O azul de metileno é usado na aPDT como um fotosensibilizador para descontaminação radicular<sup>38</sup> e poderia interagir com tecido conjuntivo de maneiras diferentes. Na RAR subgengival as curetas alcançam o tecido conjuntivo e facilitam a entrada do azul de metileno em seu interior<sup>39</sup>. Outras formas em que o azul de metileno poderia interagir com tecido conjuntivo são durante as cirurgias periodontais, como RAR cirúrgica<sup>40</sup> e enxerto de tecido conjuntivo subepitelial<sup>41</sup>.

O uso do Azul de metileno em pH ácido poderia aumentar a eficácia dessas terapias, uma vez que as substâncias ácidas poderiam melhorar a cicatrização e a regeneração periodontal após um procedimento RAR, como mostrado pelo estudo in vitro de Nanda et al., 2014<sup>32</sup>, no entanto, os benefícios clínicos são discutidos na literatura.

Em uma revisão sistemática realizada por Mariotti, 2003<sup>41</sup>, concluiu-se que o uso do ácido cítrico, tetraciclina ou EDTA para modificar a superfície radicular não proporciona benefício clínico significativo na regeneração em pacientes com periodontite crônica. No entanto, uma meta-análise encontrou 16 estudos que aplicaram tetraciclina como adjuvante a RAR e foram encontrados benefícios na redução da profundidade de sondagem após análise estatística<sup>42</sup>.

Os resultados clínicos sem benefícios podem ser explicados por Lan et al.<sup>43</sup>, uma vez que substâncias de pH baixo como o ácido cítrico podem apresentar efeito potencialmente necrosante, induzindo morte celular e alterações estruturais celulares dentro de um intervalo de 30 segundos, gerando necrose superficial. No entanto, o presente estudo não encontrou um efeito necrosante da solução de azul de metileno com pH de 1,0. A necrose celular e tecidual causada pela exposição a substâncias ácidas pode não ser explicada explicitamente ao baixo pH, uma vez que várias



características diferentes, como volume, força ácida, concentração e origem (orgânica ou inorgânica) podem afetar positivamente ou negativamente este processo.

É relatado na literatura que a aPDT é benéfica pelo aumento da proliferação celular em feridas infectadas e estimula uma resposta angiogênica<sup>44,45</sup>, reduz a quantidade de interleucinas pró-inflamatórias (IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2), induz a proliferação de fibroblastos<sup>46,47</sup> e aumenta a expressão de FGF2 melhorando o processo de reparo. Esses benefícios poderiam ser aumentados pelo azul de metileno com pH ácido, uma vez que seria exposto à matriz de colágeno<sup>20,48</sup>. No entanto, outros estudos devem ser realizados aplicando-se outros métodos para avaliar as interações fotoquímicas.

O grupo G-AM/pH1 não mostrou diferença estatística comparado ao grupo controle em todos os períodos experimentais. Por outro lado, o grupo G-AM/pH7 apresentou maior presença de células inflamatórias, principalmente linfócitos e macrófagos presentes em cápsulas fibrosas aos 7 e 30 dias. Todos os grupos mostraram melhora no processo inflamatório ao longo do tempo, mas o grupo G-AM/pH7 apresentou maior concentração do infiltrado inflamatório.

Estudos anteriores indicam que condições alcalinas e ácidas influenciam negativamente células inflamatórias<sup>49-51</sup>, contudo, no presente estudo, a substância ácida teve melhores resultados. Saghiri et al. 2013, analisou a resposta inflamatória do Geristore (ionômero de vidro resinoso) no tecido subcutâneo de ratos e relatou que a substância é caracterizada pelo pH baixo, o que pode explicar a significativa maior indução de inflamação<sup>49</sup>. No entanto, como mencionado pelos autores<sup>49</sup>, Geristore libera cinco monômeros Bis-GMA, Bis-DMA, TEGDMA, UDMA e Bisfenol A. Os monômeros mostram-se com efeitos citotóxicos<sup>52,53</sup> e podem ser capazes de iniciar tumores em concentrações relativamente baixas<sup>54</sup>, isso pode ser listado como outra explicação plausível para a resposta inflamatória exacerbada.

O ácido cítrico foi a substância utilizada para atingir o pH 1 na solução de azul de metileno. O ácido cítrico foi o menos tóxico e o mais eficaz entre todas as substâncias ácidas testadas por Register & Burdick 1975<sup>55</sup>. Além disso, Prasad et al. 2012<sup>56</sup> concluíram que o ácido cítrico é mais eficaz na remoção da camada de smear layer, expondo o colágeno radicular e causando maior grau de alterações morfológicas (diâmetro médio, área total média ocupada pelos túbulos dentinários). Estas características podem permitir que o cimento se forme dentro dos túbulos. Além

disso, as fibras colágenas radiculares expostas podem se entrelaçar com as fibrilas colágenas de um enxerto de tecido mole (interligação colágena) resultando em adesão colágena.

Os diferentes resultados entre as substâncias ácidas também podem ser explicados pela força ácida, que é a capacidade dos ácidos perderem um próton ( $H^+$ )<sup>57,58</sup>. A força ácida pode ser ajustada por diferentes fatores, por exemplo, forma de estado físico, estrutura topológica, morfologia, cristalinidade, além das composições químicas da substância<sup>57</sup>. No entanto, outros estudos com animais e estudos clínicos subsequentes são necessários para avaliar o uso de azul de metileno em pH 1,0.

## **5 CONCLUSÃO**

Dentro dos limites deste estudo, conclui-se que o azul de metileno em pH 1,0 proporcionou melhor biocompatibilidade do que em pH 7,0.

## REFERÊNCIAS

1. Pătroi D, Gociu M, Prejmerean C, Colceriu L, Silaghi Dumitrescu L, Moldovan M, Naicu V (2013) Assessing the biocompatibility of a dental composite product. *Rom J Morphol Embryol.* 54(2):321-6
2. de Campos-Pinto MM, de Oliveira DA, Versiani MA, Silva-Sousa YT, de Sousa-Neto MD, da Cruz Perez DE (2008) Assessment of the biocompatibility of Epiphany root canal sealer in rat subcutaneous tissues. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 105(5):e77-81
3. Grecca FS, Kopper PM, Santos RB, Fossati AC, Carrard VC, Acasigua GA, Figueiredo JA (2011) Biocompatibility of RealSeal, its primer and AH Plus implanted in subcutaneous connective tissue of rats. *J Appl Oral Sci.* 19(1):52-6
4. Santin GC, Oliveira DSB, Galo R, Borsatto MC, Corona SAM (2014) Antimicrobial photodynamic therapy and dental plaque: a systematic review of the literature. *ScientificWorldJournal.* 2014(24538):1-9
5. Lipson RL, Baldes EJ, Olsen AM. (1961) The use of a derivate of haematoporphyrin in tumor detection. *J Natl Cancer Inst.* 26: 1-11
6. Dougherty TJ. (1987) Photosensitizers:.. Therapy and detention of malignant tumors. *Phtochem Photobiol.* 45: 879-89
7. Modica-Napolitano JS, Joyal JL, Ara G, Oseroff AR, Aprille JR. (1990) Mitochondrial toxicity of cationic photosensitizers for photochemotherapy. *Concer Res.* 50(24): 7786-81
8. Tardivo JP, Del Giglio A, Oliveira CS, Gabrielli DS, Junqueira HC, et al. (2005). Methylene blue in Photodynamic Therapy: from basic mechanisms to clinical applications. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2/3: 175-91

9. Tardivo JP, Del Giglio A, Paschoal LH, Baptista MS. (2006) A new PDT protocol to treat AIDS-related Kaposi's Sarcoma. *Photomed Laser Surg.* 24(4):528-31
10. Foote CS. (1968) Mechanisms of photosensitized oxidation. There are several different types of photosensitized oxidation which may be important in biological systems. *Science.* 162(857): 963-70
11. Wilkerson F, Helman WP, Ross AB. (1995) rate constants for the decay and reactions of the lowest electronically excited singlet state of molecular oxygen in solution. An expanded and revised compilation. *J Phys Chem Ref Data.* 24:663-1021
12. Almeida JM, Theodoro LH, Bosco AF, Nagata MJH, Bonfante S, Garcia VG (2008) Treatment of experimental periodontal disease by photodynamic therapy in rats with diabetes. *J Periodontol.* 79:(11)2156-65
13. Bhatti M, MacRobert A, Meghji S, Henderson B, Wilson M. (1998) A study of the uptake of toluidine blue O by *Porphyromonas gingivalis* and the mechanism of lethal photosensitization. *Photochem Photobiol.* 68: 370-76
14. Maisch T, Szeimies RM, Jori G, Abels C. (2004) Antibacterial photodynamic therapy in dermatology. *Photochem Photobiol Sci.* 3:907-17
15. Meisel P, Kocher T. (2005) Photodynamic therapy for periodontal diseases: State of the art. *J Photochem Photobiol B.* 79:159-170
16. Jori G. (2006) Photodynamic therapy of microbial infections: State of the art and perspectives. *J Environ Pathol Toxicol Oncol.* 25:505-520
17. Betsy J, Prasanth CS, Baiju KV, Prasanthila J, Subhash N (2014) Efficacy of antimicrobial photodynamic therapy in the management of chronic periodontitis: a randomized controlled clinical trial. *J Clin Periodontol.* 41(6):573-81

18. Vohra F, Akram Z, Safii SH, Vaithilingam RD, Ghanem A, Sergis K, Javed F (2016) Role of antimicrobial photodynamic therapy in the treatment of aggressive periodontitis: A systematic review. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 13:139-47
19. Al Amri MD, Kellesarian SV, Ahmed A, Al-Kheraif AA, Romanos GE, Javed F (2016) Efficacy of periimplant mechanical debridement with and without adjunct antimicrobial photodynamic therapy in patients with type 2 diabetes mellitus. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 14:166-9
20. Silva LA, Novaes AB Jr, de Oliveira RR, Nelson-Filho P, Santamaria M Jr, Silva RA (2012) Antimicrobial photodynamic therapy for the treatment of teeth with apical periodontitis: a histopathological evaluation. *J Endod.* 38(3):360-6.
21. Batinjan G, Zore Z, Čelebić A, Papić M, Gabrić Pandurić D, Filipović Zore I (2014) Thermographic monitoring of wound healing and oral health-related quality of life in patients treated with laser (aPDT) after impacted mandibular third molar removal. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 43(12):1503-8
22. Tennert C, Feldmann K, Haamann E, Al-Ahmad A, Follo M, Wrbas KT, Hellwig E, Altenburger MJ. (2014) Effect of photodynamic therapy (PDT) on *Enterococcus faecalis* biofilm in experimental primary and secondary endodontic infections. *BMC Oral Health.* 14: 132
23. Jurič IB, Plečko V, Pandurić DG, Anić I (2014) The antimicrobial effectiveness of photodynamic therapy used as an addition to the conventional endodontic re-treatment: a clinical study. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 11(4):549-55
24. Garcez AS, Arantes-Neto JG, Sellera DP, Fregnani ER (2015) Effects of antimicrobial photodynamic therapy and surgical endodontic treatment on the bacterial load reduction and periapical lesion healing. Three years follow up. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 12(4):575-80

25. Diniz IM, Horta ID, Azevedo CS, Elmadjian TR, Matos AB, Simionato MR, Marques MM (2015) Antimicrobial photodynamic therapy: a promise candidate for caries lesions treatment. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 12(3):511-8
26. Nagarakanti S, Gunupati S, Chava VK, Reddy BV (2015) Effectiveness of subgingival irrigation as an adjunct to scaling and root planing in the treatment of chronic periodontitis: a systematic review. *J Clin Diagn Res.* 9(7):ZE06-9
27. Annaji S, Sarkar I, Rajan P, Pai J, Malagi S, Bharmappa R, Kamath V (2016) Efficacy of photodynamic therapy and lasers as an adjunct to scaling and root planing in the treatment of aggressive periodontitis - a clinical and microbiologic short term study. *J Clin Diagn Res.* 10(2):ZC08-12
28. Sgolastra F, Petrucci A, Severino M, Graziani F, Gatto R, Monaco A (2013) Adjunctive photodynamic therapy to non-surgical treatment of chronic periodontitis: a systematic review and meta-analysis. *J Clin Periodontol.* 40(5):514-26
29. Kikuchi T, Mogi M, Okabe I, Okada K, Goto H, Sasaki Y, Fujimura T, Fukuda M, Mitani. A (2015) Adjunctive Application of Antimicrobial Photodynamic Therapy in Nonsurgical Periodontal Treatment: A Review of Literature. *Int J Mol Sci.* 16(10):24111-26
30. Abed AM, Farhad SZ, Farhad A, Barekatain M, Mafi M, Abooie MS (2013) Debris and smear layer removal efficacy and changes in morphology of dentinal tubules after using citric acid, tetracycline-hydrochloride and mixture of tetracycline and acid and detergent. *Dent Res J (Isfahan).*10(2):232-7.
31. Sağlam M, Arslan U, Buket Bozkurt Ş, Hakki SS (2013) Boric acid irrigation as an adjunct to mechanical periodontal therapy in patients with chronic periodontitis: a randomized clinical trial. *J Periodontol.* 84(9):1297-308
32. Nanda T, Jain S, Kaur H, Kapoor D, Nanda S, Jain R (2014) Root conditioning in periodontology - Revisited. *J Nat Sci Biol Med.* 5(2):356-8

33. Cintra LT, Watanabe S, Samuel RO, da Silva Facundo AC, de Azevedo Queiroz IO, Dezan-Júnior E, Gomes-Filho JE (2014) The use of NaOCl in combination with CHX produces cytotoxic product. *Clin Oral Investig.* 18(3):935-40
34. Gomes-Filho JE, Silva FO, Watanabe S, Cintra LT, Tendoro KV, Dalto LG, Pacanaro SV, Lodi CS, de Melo FF (2010) Tissue reaction to silver nanoparticles dispersion as an alternative irrigating solution. *J Endod.* 36:1698–1702
35. Federation Dentaire International recommended standard practices for biological evaluation of dental materials (1980) Federation Dentaire International Commission on Dental Materials, Equipment, and Therapeutics: part 4.11—subcutaneous implantation test. *Int Dental J* 30:173–174
36. Andolfatto C, da Silva GF, Cornélio AL, Guerreiro-Tanomaru JM, Tanomaru-Filho M, Faria G, Bonetti-Filho I, Cerri OS (2012) Biocompatibility of intracanal medications based on calcium hydroxide. *ISRN Dent.* 2012:904963
37. Garcia VG, Longo M, Gualberto Júnior EC, Bosco AF, Nagata MJ, Ervolino E, Theodoro LH (2014) Effect of the concentration of phenothiazine photosensitizers in antimicrobial photodynamic therapy on bone loss and the immune inflammatory response of induced periodontitis in rats. *J Periodontal Res.* 49(5):584-94
38. Fowler C, Garrett S, Crigger M, Egelberg J (1982) Histologic probe position in treated and untreated human periodontal tissues. *J Clin Periodontol.* 9(5):373-85
39. Andrade PF, Garlet GP, Silva JS, Fernandes PG, Milanezi C, Novaes AB Jr, Palioto DB, Grisi MF, Taba M Jr, Souza SL (2013) Adjunct effect of the antimicrobial photodynamic therapy to an association of non-surgical and surgical periodontal treatment in modulation of gene expression: a human study. *J Photochem Photobiol B.* 126:119-25



40. Karam PS, Sant'Ana AC, de Rezende ML, Greggi SL, Damante CA, Zangrando MS (2016) Root surface modifiers and subepithelial connective tissue graft for treatment of gingival recessions: a systematic review. *J Periodontol Res.* 51(2):175-85
41. Mariotti A (2003) Efficacy of chemical root surface modifiers in the treatment of periodontal disease. A systematic review. *Ann Periodontol.* 8(1):205-26
42. Bonito AJ, Lux L, Lohr KN (2005) Impact of local adjuncts to scaling and root planing in periodontal disease therapy: a systematic review. *J Periodontol.* 76(8):1227-36
43. Lan WC, Lan WH, Chan CP, Hsieh CC, Chang MC, Jeng JH (1999) The effects of extracellular citric acid acidosis on the viability, cellular adhesion capacity and protein synthesis of cultured human gingival fibroblasts. *Aust Dent J.* (2):123-30
44. Sahu K, Sharma M, Dube A, Gupta PK (2015) Topical antimicrobial photodynamic therapy improves angiogenesis in wounds of diabetic mice. *Lasers Med Sci.* 30(7):1923-9
45. Sahu K, Sharma M, Gupta PK (2015) Modulation of inflammatory response of wounds by antimicrobial photodynamic therapy. *Laser Ther.* 224(3):201-8
46. Alghamdi KM, Kumar A, Moussa NA (2011) Low-level laser therapy: a useful technique for enhancing the proliferation of various cultured cells. *Lasers Med Sci* 27(1):237-49.
47. Pansani TN, Basso FG, Turirioni AP, Kurachi, C, Hebling J, de Souza Costa CA (2014) Effects of low-level laser therapy on the proliferation and apoptosis of gingival fibroblasts treated with zoledronic acid. *Int J Oral Maxillofac Surg* 43(8):1030-4
48. Franco EJ, Pogue RE, Sakamoto LH, Cavalcante LL, Carvalho DR, de Andrade RV (2014) Increased expression of genes after periodontal treatment with photodynamic therapy. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 11(1):41-7

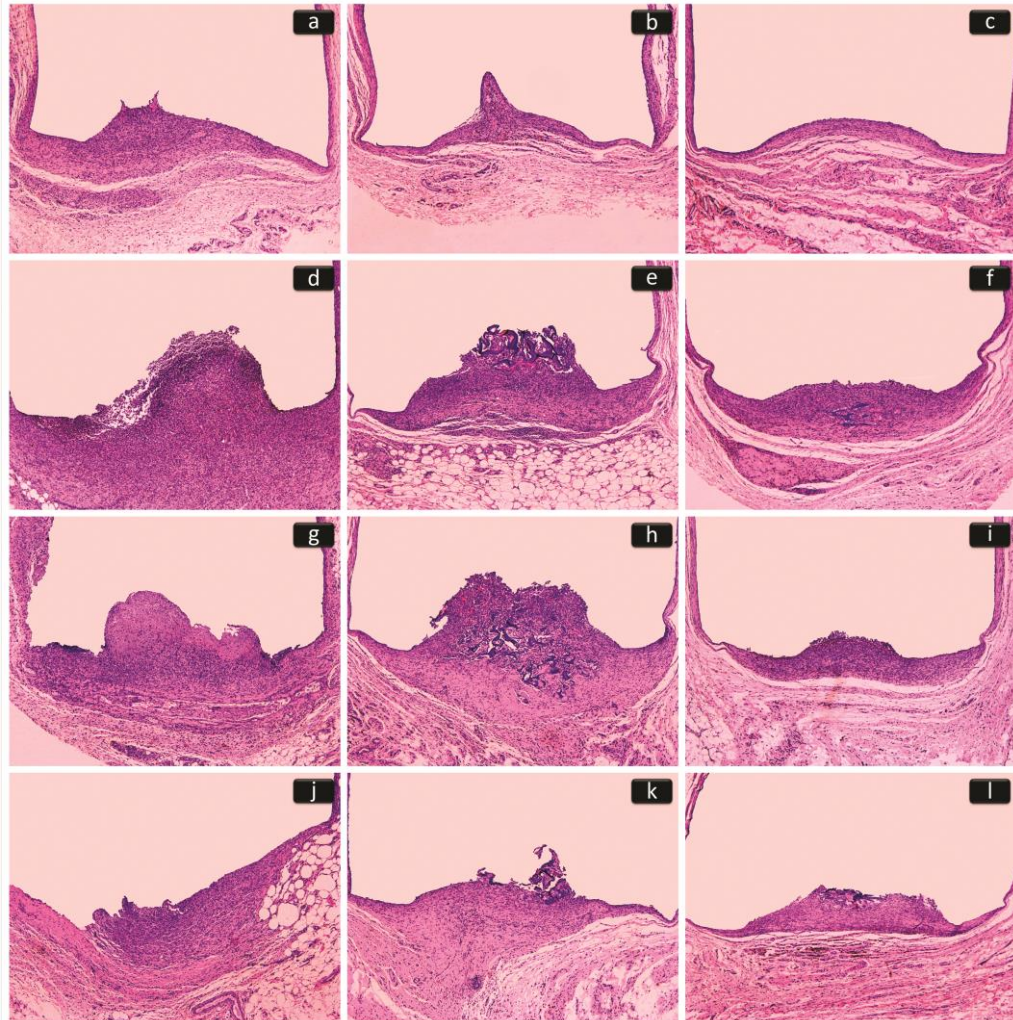
49. Saghiri MA, Tanideh N, Garcia-Godoy F, Lotfi M, Karamifar K, Amanat D (2013) Subcutaneous connective tissue reactions to various endodontic biomaterials: an animal study. *J Dent Res Dent Clin Dent Prospects*. 7(1):15-21.
50. Saghiri MA, Shokouhinejad N, Lotfi M, Aminsobhani M, Saghiri AM (2010) Push-out Bond Strength of Mineral Trioxide Aggregate in the Presence of Alkaline pH. *J Endod* 36:1856–9
51. Vosoughhosseini S, Lotfi M, Shahi S, Baloo H, Mesgariabbasi M, Saghiri MA, Zand V, Rahimi S, Ranjkesh B (2008) Influence of white versus gray mineral trioxide aggregate on inflammatory cells. *J Endod*. 34:715–7
52. Geurtsen W, Lehmann F, Spahl W, Leyhausen G. (1998) Cytotoxicity of 35 dental resin composite monomers/additives in permanent 3T3 and three human primary fibroblast cultures. *J Biomed Mater Res*. 41: 474-80.
53. Al-Hiyasat A, Darmani H, Milhem M. (2005) Cytotoxicity evaluation of dental resin composites and their flowable derivatives. *Clin Oral Invest*. 9:21-5
54. Kleinsasser NH, Schmid K, Sassen AW, Harréus UA, Staudenmaier R, Folwaczny M, et al. (2006) Cytotoxic and genotoxic effects of resin monomers in human salivary gland tissue and lymphocytes as assessed by the single cell microgel electrophoresis (Comet) assay. *Biomaterials*. 27:1762-70.
55. Register A, Burdick F. (1975) Accelerated reattachment with cementogenesis to dentin, the mineralized in situ. I. Optimum range. *J Periodontol*. 46:646-55
56. Prasad SS, Radharani C, Varma S, Kumar SV, Sinha S, Bijle MN. (2012) Effects of citric acid and EDTA on periodontally involved root surfaces: a SEM study. *J Contemp Dent Pract*. 13(4):446-51

57. Zhang X, Zhao Y, Xu S, Yang Y, Liu J, Wei Y, Yang Q (2014) Polystyrene sulphonic acid resins with enhanced acid strength via macromolecular self-assembly within confined nanospace. *Nat Commun.* 5:3170

58. Arean CO, Delgado MR, Nachtigall P, Thang HV, Rubeš M, Bulánek R, Chlubná-Eliášová P (2014) Measuring the Brønsted acid strength of zeolites--does it correlate with the O-H frequency shift probed by a weak base? *Phys Chem Chem Phys.* 16(21):10129-41

## FIGURA 1

**Figura 1 – Comparação da resposta inflamatória entre os grupos.**



Fonte: Elaborado pelo autor.

Fig. 1 – G-T: a cápsula fibrosa espessa e moderada infiltração de células inflamatórias constituída por linfócitos e macrófagos (7 dias, hematoxilina-eosina, ampliação original, x50); b, c cápsula fibrosa fina e leve infiltração células inflamatórias crônicas (15 e 30 dias, hematoxilina-eosina, x50); G-F: d cápsula fibrosa espessa e severa infiltração de células inflamatórias constituída por linfócitos e macrófagos (7 dias, hematoxilina-eosina, ampliação original, x50); e cápsula fibrosa espessa e moderada infiltração de células inflamatórias (15 dias, hematoxilina-eosina, ampliação original, x50); f cápsula fibrosa fina e leve infiltração de células inflamatórias (30 dias, hematoxilina-eosina, ampliação original, x50), G-AM/pH 7: g cápsula fibrosa espessa e severa infiltração de células inflamatórias constituídas por linfócitos e macrófagos (7 dias, hematoxilina-eosina, ampliação original, x50); h cápsula fibrosa espessa e moderada infiltração de células inflamatórias (15 dias, hematoxilina-eosina, ampliação original, x50); i cápsula fibrosa fina e moderada infiltração de células inflamatórias (30 dias, hematoxilina-eosina, ampliação original, x50); G-AM/pH1: j, k cápsula fibrosa espessa e moderada infiltração de células inflamatórias, constituída por linfócitos e macrófagos (7 e 15 dias, hematoxilina-eosina, ampliação original, x50); l cápsula fibrosa fina e leve infiltração de células inflamatórias (30 dias, hematoxilina-eosina, ampliação original, x50).

TABELA 1

**Tabela 1 – Escores inflamatórios e tamanho da cápsula fibrosa em diferentes tempos experimentais.**

Tempo/p valor	Material*	Escores				Mediana	Capsula		n
		0	1	2	3		Fina	Espessa	
7 dias p=0.0014	G-T	0	4	3	0	1 <sup>a</sup>	4	3	7
	G-F	0	0	3	4	3 <sup>b</sup>	2	5	
	G-AM/pH7	0	0	3	4	3 <sup>b</sup>	2	5	
	G-AM/pH1	0	1	3	3	2 <sup>a</sup>	2	5	
15 dias p=0.0051	G-T	0	5	2	0	1 <sup>a</sup>	5	2	7
	G-F	0	1	5	1	2 <sup>a</sup>	2	5	
	G-AM/pH7	0	1	4	2	2 <sup>a</sup>	2	5	
	G-AM/pH1	0	1	5	1	2 <sup>a</sup>	2	5	
30 dias p=0.0010	G-T	4	3	0	0	0 <sup>a</sup>	6	1	7
	G-F	0	4	3	0	1 <sup>a</sup>	4	3	
	G-AM/pH7	0	3	4	0	2 <sup>b</sup>	4	3	
	G-AM/pH1	0	4	3	0	1 <sup>a</sup>	5	2	

\*Diferentes letras sobrescritas indicam diferença estatística entre os grupos ( $p \leq 0.05$ ).

Fonte: Elaborado pelo autor.