

UNIVERSIDADE DO GRANDE RIO  
“PROFESSOR JOSÉ DE SOUZA HERDY”

**ANNIE BRAGA ERN**

CITOTOXICIDADE DE DIFERENTES PASTAS ENDODÔNTICAS UTILIZADAS EM  
ODONTOPEDIATRIA

DUQUE DE CAXIAS

2019

**ANNIE BRAGA ERN**

**CITOTOXICIDADE DE DIFERENTES PASTAS ENDODÔNTICAS UTILIZADAS EM  
ODONTOPEDIATRIA**

Dissertação apresentada à Universidade do Grande Rio “Prof. José de Souza Herdy” como parte dos requisitos para a obtenção do grau de Mestre em Odontologia.

Área de concentração: Endodontia

Orientador: Prof. Dr. Emmanuel João Nogueira Leal da Silva

DUQUE DE CAXIAS

2019

**“O pôr do sol pertence a quem o vê”.**

(Millôr Fernandes)

Dedico esse trabalho a todos que torceram por mim.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus, por ter me dado sabedoria, paciência e força para concluir mais essa etapa da minha vida.

À minha família, pelo apoio, carinho, incentivo e paciência.

Ao meu Padrinho Luiz Edmundo, por me mostrar um novo caminho.

Ao meu coordenador Paulo Ribeiro, pela oportunidade e incentivo.

Aos meus mestres e amigos Sileno Brum, Fátima Cristina Freitas e Roberto Gama, pelo incentivo e orientação.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Emmanuel João Nogueira Leal da Silva, pelo auxílio e orientações, fundamentais ao meu mestrado.

A Ana Beatriz Machado Lima, por toda a paciência, ensinamento e incentivo.

Ao coordenador Prof. Dr. Edson Jorge, por compreender meus desesperos e incentivar a seguir em frente.

À toda equipe de Endodontia da Unigranrio, na propagação de seus conhecimentos.

Aos colaboradores da Unigranrio, em especial a secretária do Programa de Pós-Graduação em Odontologia (PPGO) Andreia Fagundes, por suas solicitações e prestezas.

Fica expresso aqui a minha imensa gratidão.

Obrigado!

## RESUMO

**Objetivo:** O objetivo do presente trabalho foi avaliar o potencial citotóxico de três diferentes pastas endodônticas para uso em Odontopediatria, em culturas celulares de osteoblastos humanos.

**Materiais e Metodos:** As pastas endodônticas Calen PMCC (S.S.White Artigos Dentários LTDA, Rio de Janeiro, Brasil), Feapex (Fórmula e Ação, São Paulo, Brasil) e CTZ (Lenzafarm, Belo Horizonte, Brasil) foram preparadas e eluídas em meio de cultura celular durante 24 horas à 37°C em estufa de 5% de CO<sub>2</sub>. Foram realizadas quatro diluições distintas destes meios nas concentrações 1:1, 1:2, 1:4, 1:8. Essas diluições foram expostas à cultura celular de Osteoblastos Humanos da linhagem Saos-2 por 24 horas. O grupo controle negativo foi realizado expondo as células a meio de cultura celular sem contato com nenhuma pasta endodôntica. A citotoxicidade destes meios de cultura foram avaliadas utilizando o ensaio MTT. Os resultados foram transformados em porcentagens de células viáveis com relação ao grupo controle e negativo e analisados estatisticamente a partir da Análise Univariada da Variância (ANOVA) e pelo teste de Tukey utilizando o software SPSS 16.0 ( $P < 0.05$ ).

**Resultados:** O ensaio de MTT mostrou que a viabilidade celular foi significativamente alterada de acordo com o material testado ( $P < 0.05$ ) e com a concentração do extrato ( $P < 0.05$ ). Em todas as concentrações testadas a pasta Feapex apresentou maior viabilidade celular do que os demais materiais testados ( $P < 0.05$ ). Embora nenhuma diferença estatisticamente significativa tenha sido observada entre a pasta Calen PMCC e a pasta CTZ nas concentrações de 1:1 e 1:2 ( $P > 0.05$ ), a pasta CTZ apresentou maior citotoxicidade nas concentrações de 1:4 e 1:8 ( $P < 0.05$ ). De forma geral, a citotoxicidade diminui com o aumento da diluição do material.

**Conclusão:** De acordo com os resultados do presente estudo, pode-se concluir que a pasta endodôntica Feapex apresentou menor citotoxicidade do que as pastas Calen PMCC e CTZ.

**Palavras-Chave:** Pasta Calen PMCC, Feapex, CTZ, endodontia em dentes decíduos

## ABSTRACT

**Objective:** The aim of the present work was to evaluate the cytotoxic potential of three different endodontic pastes for use in pediatric dentistry in human osteoblast cell cultures.

**Materials and Methods:** Endodontic pastes Calen PMCC (SSWhite Dental Articles LTDA, Rio de Janeiro, Brazil), Feapex (Formula and Action, Sao Paulo, Brazil) and CTZ (Lenzafarm, Belo Horizonte, Brazil) were prepared and eluted in cell culture medium during 24 hours at 37 ° C in a 5% CO<sub>2</sub> greenhouse. Four distinct dilutions of these media were performed at concentrations 1: 1, 1: 2, 1: 4, 1: 8. These dilutions were exposed to cell culture of Saos-2 Human Osteoblasts for 24 hours. The negative control group was performed by exposing the cells to cell culture medium without contact with any endodontic paste. The cytotoxicity of these culture media was evaluated using the MTT assay. The results were transformed into viable cell percentages in relation to the control and negative group and statistically analyzed by Univariate Analysis of Variance (ANOVA) and by Tukey test using the SPSS 16.0 software (P <0.05).

**Results:** The MTT assay showed that cell viability was significantly altered according to the material tested (P <0.05) and extract concentration (P <0.05). At all concentrations tested, Feapex pulp presented higher cell viability than the other materials tested (P <0.05). Although no statistically significant difference was observed between Calen PMCC paste and CTZ paste at concentrations of 1: 1 and 1: 2 (P > 0.05), CTZ paste showed higher cytotoxicity at concentrations of 1: 4 and 1: 8 (P <0.05). In general, cytotoxicity decreases with increasing material dilution.

**Conclusion:** According to the results of the present study, it can be concluded that Feapex endodontic paste presented lower cytotoxicity than Calen PMCC and CTZ pastes.

**Keywords:** Calen PMCC paste, Feapex, CTZ, endodontics in deciduous teeth

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 01</b>	Apresentação comercial do estojo de Calen PMCC	17
<b>Figura 02</b>	Seringa endodôntica para Calen	19
<b>Figura 03</b>	Apresentação comercial do estojo Feapex	21
<b>Figura 04</b>	Apresentação comercial do estojo CTZ	23
<b>Figura 05</b>	Manipulação do CTZ	23
<b>Figura 06</b>	Molde O'ring	28
<b>Figura 07</b>	Cultura celular	29
<b>Figura 08</b>	Diluição do extrato	30
<b>Figura 09</b>	Exposição celular ao extrato	31
<b>Figura 10</b>	Ensaio de MTT	32

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 01</b>	Fórmula de composição S.S.White artigos dentários LTDA	17
<b>Tabela 02</b>	Fórmula de composição Formula e ação	20
<b>Tabela 03</b>	Fórmula de composição Lenzafarm	22
<b>Tabela 04</b>	Viabilidade celular de extratos em diferentes concentrações derivadas dos materiais testados após cultura celular	34



## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	REVISÃO DE LITERATURA	15
3	JUSTIFICATIVA	26
4	OBJETIVOS	27
5	MATERIAL E MÉTODOS	28
6	RESULTADOS	34
7	DISCUSSÃO	35
8	CONCLUSÕES	37
9	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	38

## 1. INTRODUÇÃO

A manutenção dos dentes decíduos em condições saudáveis até o período de esfoliação fisiológica é considerada um grande desafio clínico (Guedes-Pinto; Duarte 1998). Na Odontopediatria, quando à necessidade de intervenção nos condutos radiculares, a reação biológica dos tecidos pulparem ou periapicais é semelhante aos verificados nos dentes permanentes, com exceção dos fenômenos fisiológicos da reabsorção radicular verificada nos dentes decíduos (Lactiva et al, 2012). Os dentes afetados devem ser cuidados e conservados na arcada dentária como mantenedores de espaço natural, contanto que possam ser restaurados para a sua incumbência (Rajasekhar et al, 2018). A perda desse elemento implicará em sequelas, dentre as quais se destacam a perda do espaço para erupção do permanente e problemas relacionados a fonética, função mastigatória e estética (Guedes-Pinto; Duarte,1998; Camp.2000).

Os obstáculos na terapia pulpar em dentes decíduos, estão associados à instrumentação, como a curvatura da raiz dos molares, o grande número de canais colaterais, o processo fisiológico de reabsorção radicular e a viabilidade de dano ao periodonto e aos germes dos dentes permanentes (Cerqueira et al, 2007). Com isso levaram-se a pesquisa de materiais obturadores que pudesse superar todos os obstáculos da terapia pulpar (Cerqueira et al, 2007).

Um material de obturação endodôntico padrão para dentes decíduos deve conter uma série de atributos que o tornem oportuno para uso. Este material deve possuir uma taxa de reabsorção semelhante à da raiz e em casos de extravasamento aos tecidos periapicais o mesmo deve ser naturalmente reabsorvido. Além disso, o material deve apresentar baixa toxicidade aos tecidos periapicais e ao germe do dente permanente. Possuir um escoamento adequado com o intuito de fluir facilmente para a complexa anatomia dos canais radiculares. Também deve dispor da propriedade anti-séptica para permitir a desinfecção do conteúdo tóxico pulpar bem como coibir o crescimento de microrganismos no interior do sistema de canais radiculares (Pilownic et al, 2017). Contudo, ainda não foi desenvolvida uma única pasta capaz de preencher todos esses requisitos.

Dentre as pastas obturadoras encontradas no mercado, as mais utilizadas em Odontopediatria são as: pastas a base de óxido de zinco e eugenol, pasta a base de

hidróxido de cálcio e pastas que contém iodofórmio em sua formulação como por exemplo as pastas Vitapex (NEO DENTAL INTERNATIONAL INC, USA) e Feapex (Formula e ação, São Paulo, Brasil) (Dunston, Coll, 2008).

As pastas a base de óxido de zinco e eugenol (OZE) tem atuação antimicrobiana restrita e tende a reabsorver em ritmo mais lento que as raízes dos dentes decíduos (Pilownic et al, 2017). Quando submetido além do ápice, pode influenciar a erupção dos dentes permanentes (Reddy; Ramakrishna, 2007). Tais pastas são irritantes ao tecido periapical e desencadeiam uma reação inflamatória de corpo estranho no tecido periapical (Mostazavi; Mesbahi, 2004). As pastas a base de hidróxido de cálcio, tem atuação antimicrobiana, cabido ao seu pH elevado e a liberação de íons hidroxila e cálcio (Estrela et al, 1995). As mesmas são consideradas biocompatíveis, agem na formação de tecido mineralizado e contam com um adequado grau de reabsorção (Pilownic et al, 20017). Já a pasta Vitapex, formada pelo acréscimo de iodofórmio e silicone ao hidróxido de cálcio, apresenta-se mais radiopaca e muito biocompatível, mas com potencial de reabsorção dos canais radiculares maior que as raízes dos dentes decíduos (Cunha, 2005).

Além dessas pastas, uma pasta endodôntica composta por cloranfenicol, tetraciclina, óxido de zinco e eugenol (Pasta CTZ; proporção 1:1:2 respectivamente) também tem sido indicada como uma alternativa para preenchimento dos canais radiculares de dentes decíduos (Cappiello 1964). A técnica da pasta CTZ pode ser indicada independente do diagnóstico pulpar e não necessita de instrumentação dos canais radiculares (Leal et al,2004). Com isso, Passos et al (2008) concluíram que a terapia pulpar com a pasta CTZ é facilmente aplicada trazendo benefícios no tempo de cadeira do paciente pediátrico. Com relação a biocompatibilidade da mesma os resultados mostram-se conflitantes. Em um estudo no qual foram implementados tubos contendo as pastas à base de hidróxido de cálcio, à base de iodofórmio e a pasta CTZ em mandíbulas de porquinhos-da-índia foi demonstrado que a pasta CTZ induziu resposta inflamatória severa mesmo após 12 semanas de implementação (Lactiva et al. 2012). Em contrapartida, um estudo realizado em camundongos revelou que, a despeito de apresentar uma inflamação severa nos períodos iniciais de implementação, a pasta CTZ se mostrou biocompatível após 63 dias de implementação (Lima et al. 2014). Diante da inconsistência de resultados, uma melhor elucidação dos efeitos biológicos da pasta CTZ se faz necessária.

Dessa forma, o objetivo do presente estudo é avaliar a citotoxicidade da pasta CTZ e comparar os resultados obtidos por ela com as pastas Calen PMCC e Feapex. A hipótese nula testada é de que não existe diferença na citotoxicidade das diferentes pastas testadas.

## **2. Revisão de Literatura**

As pastas obturadoras assumem um papel fundamental para que o preparo do elemento dentário desenvolva-se de acordo com padrões biológicos normais (Holan; Fucks, 1993). Sendo assim, de acordo com Waterhouse e colaboradores (2011) o material ideal para obturação de canais radiculares em dentes decíduos deve:

- Ser reabsorvível numa taxa similar às raízes decíduas;
- Não ser tóxico para os tecidos periapicais bem como para o germe do dente permanente;
- Reabsorver rapidamente quando extravasado além do ápice;
- Ser antisséptico;
- Ser de fácil preenchimento do sistema de canais radiculares;
- Possuir adesão às paredes do canal radicular;
- Ser facilmente removido, quando necessário;
- Ser radiopaco;
- Não provocar escurecimento dos elementos dentários.

Embora a busca por um material dito ideal, ou seja, que possua todas essas propriedades em conjunto, até o presente momento nenhuma pasta obturadora é capaz de preencher todos os critérios expostos.

## 2.1- Pasta à base de hidróxido de cálcio associado ao paramonoclorofenol canforado (Calen PMCC).

Embora possa ser manipulada, a pasta à base de hidróxido de cálcio associado ao paramonoclorofenol canforado mais utilizada em formulação comercial é a pasta Calen PMCC (S.S.White Artigos Dentários LTDA, Rio de Janeiro, Brasil). Segundo o fabricante esta pasta é homogênea, levemente amarelada, alcalina, hidrossolúvel, com odor de paramonoclorofenol canforado e pronto para uso imediato.

### ► Fórmula de Composição:

De acordo com Siqueira e colaboradores (2015) o hidróxido de cálcio trata-se de uma base forte, obtida a partir da calcinação (aquecimento) do carbonato de cálcio (cal viva) e com a hidratação do óxido de cálcio. As propriedades derivam de sua dissociação iônica em íons cálcio e íons hidroxila, sendo que a ação destes íons sobre os tecidos e os microrganismos explicam as propriedades biológicas e antimicrobianas desta substância.

O uso do PMC fundamenta-se nas propriedades antissépticas do fenol e do íon cloro. Apresenta-se sob a forma de cristais e possui odor fenólico característico. A combinação do PMC com a canfora tem com o objetivo de potencializar a atividade antimicrobiana e reduzir a citotoxicidade do medicamento. Essa associação do PMC com a canfora em partes variáveis, forma-se uma mistura líquida denominada paramonoclorofenol canforado (PMCC). Comercialmente está associado na proporção de 3,5:6,5 (S.S White). O PMCC apresenta baixa tensão superficial e é solúvel em lipídios, estas características permitem que a substância apresente maior penetrabilidade tecidual, aumentando seu raio de atuação dentro do sistema de canais.

Os veículos viscosos como a Glicerina, embora sejam solúveis em água em qualquer proporção, tornam a dissociação do hidróxido de cálcio mais lenta, provavelmente em razão de seu elevado peso molecular. Apresenta-se como um líquido viscoso, higroscópico, incolor, com odor leve característico e sabor adocicado.

As demais substâncias adicionais têm sido acrescentadas ao hidróxido de cálcio no intuito de melhorar suas propriedades físico-químicas para utilização clínica, como a própria radiopacidade.

**- Pasta de hidróxido de cálcio com paramonoclorofenol canforado.**

Hidróxido de Cálcio	48,32g %
Paramonoclorofenol	0,72g %
Cânfora	2,16g %

Excipientes: Óxido de Zinco, Colofônia e PEG 400

**- Glicerina**

Glicerina	100,00g %
-----------	-----------

**Tabela 1.** Fórmula de Composição S.S. White Artigos Dentários Ltda

► Apresentação Comercial:

Estojo de Calen com paramonoclorofenol canforado contendo:

- 2 Tubetes plásticos, cada um com 2,7g de pasta cada tubete
- 2 tubetes plásticos com 2,2g de glicerina



**Figura 1.** Estojo de Calen PMCC

► Modo de utilização segundo as instruções do fabricante:

1. Coloque na seringa endodôntica ML, de êmbolo rosqueável para aplicação de Pasta Endodôntica, uma agulha descartável 27 G-LONGA, previamente recurvada, quando for o caso, provida de tope de borracha (odontometria).
2. Desenrosque completamente o êmbolo.
3. Mantenha a seringa na posição vertical, introduza o tubete. Em seguida, empurre-o para a frente de modo que a agulha perfure a membrana de borracha do tubete. Atenção: Evite que a capa de alumínio bata na agulha fazendo-a entortar prejudicando o fluxo do material e implicando na substituição desta.
4. Rosqueie o êmbolo até encostá-lo levemente no pistão do tubete.
5. Lubrifique a luz da agulha com a glicerina estéril fornecida no kit, num tubete. Este procedimento favorecerá a passagem da pasta.
6. Retire o tubete com glicerina e coloque o de Hidróxido de Cálcio com Paramonoclorofenol Canforado, tomando-se o cuidado em manter a seringa na posição vertical.
7. Com a seringa na posição vertical, rosqueie suavemente o êmbolo no sentido horário até fluir a pasta. Para não se exercer demasiada pressão e conseqüentemente extravasamento da pasta, o rosqueamento deve ser executado gradualmente.
8. Desenrosque o êmbolo até que a pasta deixe de fluir. Limpe a ponta da agulha com uma gaze esterilizada.
9. Retorne com o êmbolo até que ele toque sem pressão no pistão de borracha do tubete.
10. Leve a agulha ao interior do canal radicular, até o comprimento de trabalho e a seguir, dar uma volta completa ao êmbolo, para que a pasta flua na quantidade desejada com movimentos de vaivém, procurando se preencher totalmente o canal radicular.
11. Após o preenchimento do canal radicular, observado pelo refluxo da pasta, coloque uma mecha de papel absorvente estéril na cavidade pulpar, e em seguida

sele a abertura com cimento de presa rápida à base de óxido de zinco e eugenol - Pulpo-San (S.S. White).



**Figura 2.** Modo de utilização segundo o Fabricante. (A) Seringa Endodontica ML, de êmbolo rosqueável. (B) Seringa Endodontica ML com Agulha descartável 27 G- Longa e Tubete de Glicerina. (C) Seringa Endodontica ML com Agulha descartável 27 G- Longa e Tubete de Calen PMCC.

► Vantagens e Desvantagens:

A pasta de Calen com PMCC tem como principal vantagem a sua propriedade antimicrobiana devido ao seu pH e a dissociação iônica, liberando íons hidroxila e cálcio (Estrela et al,1995). Aliado a isto, nelas podem ser usadas com vários veículos. Os veículos viscosos e aquosos contribuindo para a fluidez, facilitando assim a inserção no canal radicular e melhorando o desempenho antimicrobiano (Fava e Saunders, 1999; Blancet et al,2008). No interior do conduto possuem a propriedade indutora de formação de tecido mineralizado, e em caso de extravasamento, não agredem os tecidos periapicais, isto é devido à sua biocompatibilidade (Pilownic et al,



2017). A facilidade de visualizar o preenchimento no interior dos canais radiculares se dá através da sua radiopacidade (S.S White Artigos Dentários Ltda). Além das vantagens descritas acima, a pasta é de fácil aquisição e armazenagem, uma vez que não necessita de receituário nem de refrigeração.

Entretanto, a pasta quando utilizada no dente decíduo tem como desvantagem, o não acompanhamento do processo de reabsorção fisiológica da raiz, desaparecendo precocemente, sendo essa sua grande desvantagem (Estrela et al, 1995; RajaSekhar et al, 2018).

## 2.2 - Pasta à base de hidróxido de cálcio e iodoformio (Feapex/ Vitapex):

Embora possa ser manipulada, a pasta à base de hidróxido de cálcio e iodoformio em veículo viscoso mais utilizada em formulação comercial é a pasta Feapex (Formula e ação, São Paulo, Brasil) ou Vitapex (NEO DENTAL INTERNATIONAL INC, USA). Estudos relatam excelentes resultados clínicos, radiográficos e histológicos. Segundo o fabricante a pasta é reabsorvível, não tóxica para os tecidos periapicais e o germe do dente permanente, radiopaca e de aplicação rápida e simples. Pronta para uso imediato.

### ► Fórmula de Composição:

De acordo com o fabricante o hidróxido de cálcio estimula as células “blastos” auxiliando a apicogênese. O índice de pH elevado neutraliza as endotoxinas produzidas pelas bactérias anaeróbias. O iodoforme tem ação bacteriostática e ajuda no aumento da radiopacidade. Já o óleo de Silicone é um lubrificante, assegura a cobertura total das paredes do canal, nunca endurece e o hidróxido de cálcio solubilizado permanece ativo no canal radicular.

Hidróxido de Cálcio	30 %
Iodoforme	40,4 %
Óleo de Silicone	22,4 %
Inerte	6,9 %

**Tabela 2.** Fórmula de Composição Formula e Ação.

► Apresentação Comercial:

Embalagem contendo 2g de pasta por seringa com 10 pontas descartáveis.



**Figura 3.** Estojo comercial Feapex

► Modo de utilização segundo as instruções do fabricante:

- 1- Inserir a ponta da seringa próxima do ápice.
- 2- Pressionar a pasta Feapex para o interior do canal até este recuar para a câmara pulpar. Nesta altura torna-se necessário o manuseio cuidadoso afim de se assegurar que o excesso da pasta Feapex não é extruído para além do ápice.

► Vantagens e Desvantagens:

A pasta feapex tem como principal vantagem os dois principais componentes (hidróxido de cálcio e o iodofórmio) que são responsáveis pelas suas propriedades antimicrobianas mais elevadas (Mortazavi et al,2004). Considerado um material de obturação de canal quase ideal para dentes decíduos (Kubota et al, 1992). A facilidade de visualizar o preenchimento no interior dos canais radiculares se dá através da sua radiopacidade elevada (Formula e ação). A aplicação é simples e rápida, com acesso fácil ao ápice graças as pontas aplicadoras (Formula e ação). A pasta é reabsorvível

e não tóxica para os tecidos periapicais e o germe do dente permanente (Formula e ação). Além das vantagens descritas acima, a pasta é de fácil aquisição e armazenagem, uma vez que não necessita de receituário nem de refrigeração. Entretanto, tem como desvantagem a rápida reabsorção, causando vazios no canal radicular e levando à formação de tubos ociosos (Al-Ostwani et al, 2016; RajaSkhar et al, 2018).

### 2.3- Pasta à base de óxido de zinco, eugenol, Cloranfenicol e Tetraciclina (CTZ):

Pasta manipulada, à base de óxido de zinco, cloranfenicol, Tetraciclina e eugenol. Conhecida como pasta CTZ. Segundo o fabricante esta pasta é homogênea quando misturada, coloração branca, necessita de receituário e não vem pronta para uso imediato.

#### ► Fórmula de Composição:

De acordo com os fabricantes, o óxido de zinco possui atividade antimicrobiana, grande resistência e baixa solubilidade. Apresenta-se como um pó finíssimo branco, inodoro, insípido e isento de partículas ásperas. O eugenol é um forte antisséptico, bactericida e anestésico. Possui odor característico de cravo. Utilizado como veículo. A pasta de óxido de zinco e eugenol possui um pH neutro (7,8), por isso não destrói ou diminui a ação do antibiótico. Já a parte de antibióticos, como o cloranfenicol é um fármaco bacteriostático altamente potente frente às bactérias anaeróbicas. A tetraciclina é eficaz contra bactérias aeróbicas e anaeróbicas, tanto gram-positivas quanto gram-negativas.

Parte de Pó	Pote com 10g
Óxido de Zinco	5,0g
Cloranfenicol	2,5g
tetraciclina	2,5g
Parte Líquida	Vidro com 5ml
Eugenol	

**Tabela 3.** Fórmula de Composição Lenzafarm

► Apresentação Comercial:

Pote plástico de 10g com a parte de pó e um vidro de 5ml com a parte líquida ou também pode ser dispensada em cápsulas no peso ideal para cada tratamento 200mg, por exemplo, para ser manipulado.



**Figura 4.** Estoque comercial CT

► Modo de utilização segundo as instruções do fabricante:

1- Numa placa de vidro estéril manipule o pó e o líquido na proporção 1:2 com uma espátula de metal até obter consistência semelhante à pasta de dente (Moura et al, 2016)



**Figura 5.** Manipulação do CTZ

► Vantagens e desvantagens:

A pasta CTZ tem como principal vantagem o uso de antibióticos como o cloranfenicol e a tetraciclina (Yagiella et al, 2000). A técnica pode ser indicada independente do diagnóstico pulpar e não necessita de instrumentação dos canais radiculares (Leal et al, 2004). A aplicação é simples trazendo benefícios no tempo de cadeira do paciente pediátrico (Passos et al, 2008). Possui excelente resultado radiográfico (Moura et al, 2016). Além das vantagens descritas acima, a pasta é de fácil armazenamento uma vez que não necessita de refrigeração (Lenzafarm).

Entretanto, a pasta tem como desvantagem a sua aquisição, uma vez que necessite de receituário, pois contém antibióticos em sua formulação. E também pode apresentar como desvantagem a pigmentação da coroa dental do dente decíduo (Silva, Leache,2010; Souza et al,2014).

*2.4- Propriedades Biológicas dos materiais obturadores:*

As propriedades biológicas são tão importantes quanto às mecânicas e físico-químicas na seleção de um material. Materiais odontológicos podem ser biocompatíveis e também apresentar atividade antimicrobiana.

A biocompatibilidade do hidróxido de cálcio é, sem dúvida, uma de suas características em que há unanimidade entre os autores. O fato de o hidróxido de cálcio apresentar uma difusibilidade baixa colabora para que não penetre em grande quantidade no interior dos tecidos, não causando, dessa forma, áreas extensas de necrose, já que sempre ocorre uma necrose superficial dos tecidos vivos quando entram em contato com o hidróxido de cálcio (Lopes; Siqueira JR, 1999).

Segundo Nurko et al (2000), a pasta de hidróxido de cálcio com iodofórmio (Vitapex), quando extruída na área de furca e na região periapical pode ser reabsorvida por macrófagos e ocorrer regeneração óssea.

Entretanto, a pasta CTZ nós-mostra uma variação de resultados. Bruno et al (2006), concluíram que o uso do cimento CTZ, parece-se destituído de efeitos tóxicos, em pulpotomias realizadas em cães.

Já Lactiva et al (2012) em seu estudo com porquinhos-da-índia e Lima et al (2014) com o estudo com camundongos demonstraram que a pasta CTZ induz resposta inflamatória severa (mesmo após 12 semanas ou nos períodos iniciais). Por fim Lima et al no mesmo estudo mostra que após 63 dias a pasta CTZ se torna biocompatível.

Diante da inconsistência de resultados da pasta CTZ, uma melhor elucidação dos efeitos biológicos se faz necessária.

### **3. JUSTIFICATIVA**

As pastas endodônticas utilizadas em Odontopediatria, têm sido indicadas com a justificativa de que seriam biocompatíveis. No entanto, um pequeno e controverso número de trabalhos científicos avaliando essa biocompatibilidade, tem colocado em dúvida a real citotoxicidade dessas pastas.

#### **4. OBJETIVOS**

O presente estudo tem como objetivo analisar o potencial citotóxico de três pastas endodônticas (Calen PMCC, Feapex e CTZ), em culturas de Osteoblastos Humanos da linhagem Saos-2.

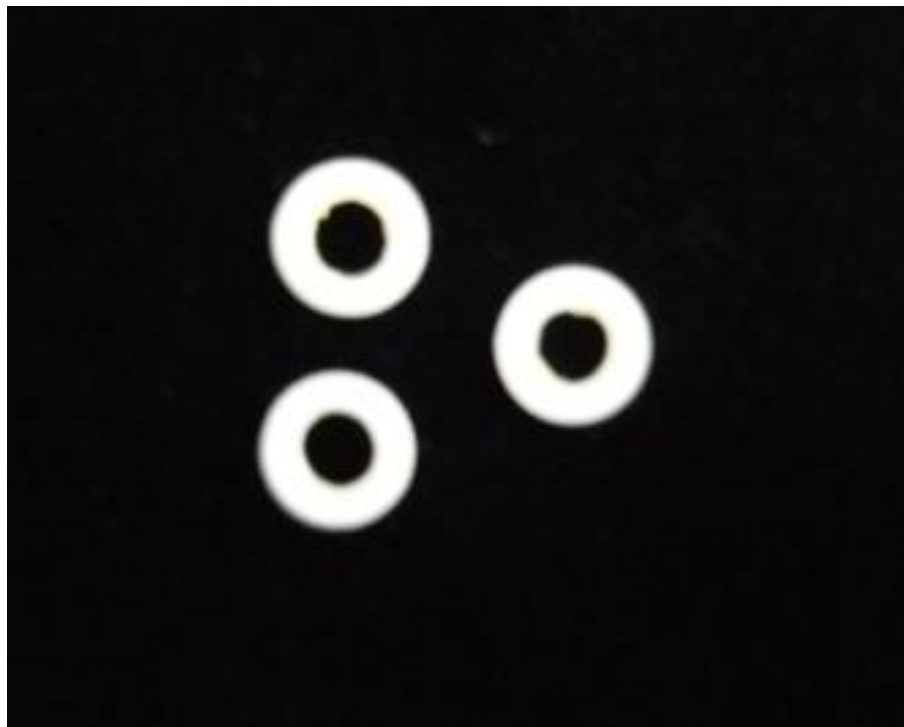


## 5. MATERIAL E MÉTODOS

### 5.1 - Materiais Endodônticos

As pastas manuseadas para este trabalho foram: Calen PMCC, Feapex e CTZ cada uma manipulada conforme o seu fabricante.

Discos de cada material foram preparados sob condições assépticas em um molde (O'ring) estéril, conforme a norma ISO 6876, com 5.0 mm de diâmetro e espessura 2.0 mm. Os moldes foram comportados por 24 horas em 37 °C em estufa 5%CO<sub>2</sub>. Após as 24 horas, os moldes (O'rings) das pastas foram armazenados em meio Dulbecco's Modified Eagle's Medium- DMEM (PAA, Germany) com 10% soro fetal bovino, penicilina e estreptomicina a 37 °C em uma estufa 5% CO<sub>2</sub> por 24 horas. Foi utilizado uma razão entre a superfície da pasta endodôntica e o volume do meio de aproximadamente 150mm<sup>2</sup>/ml.

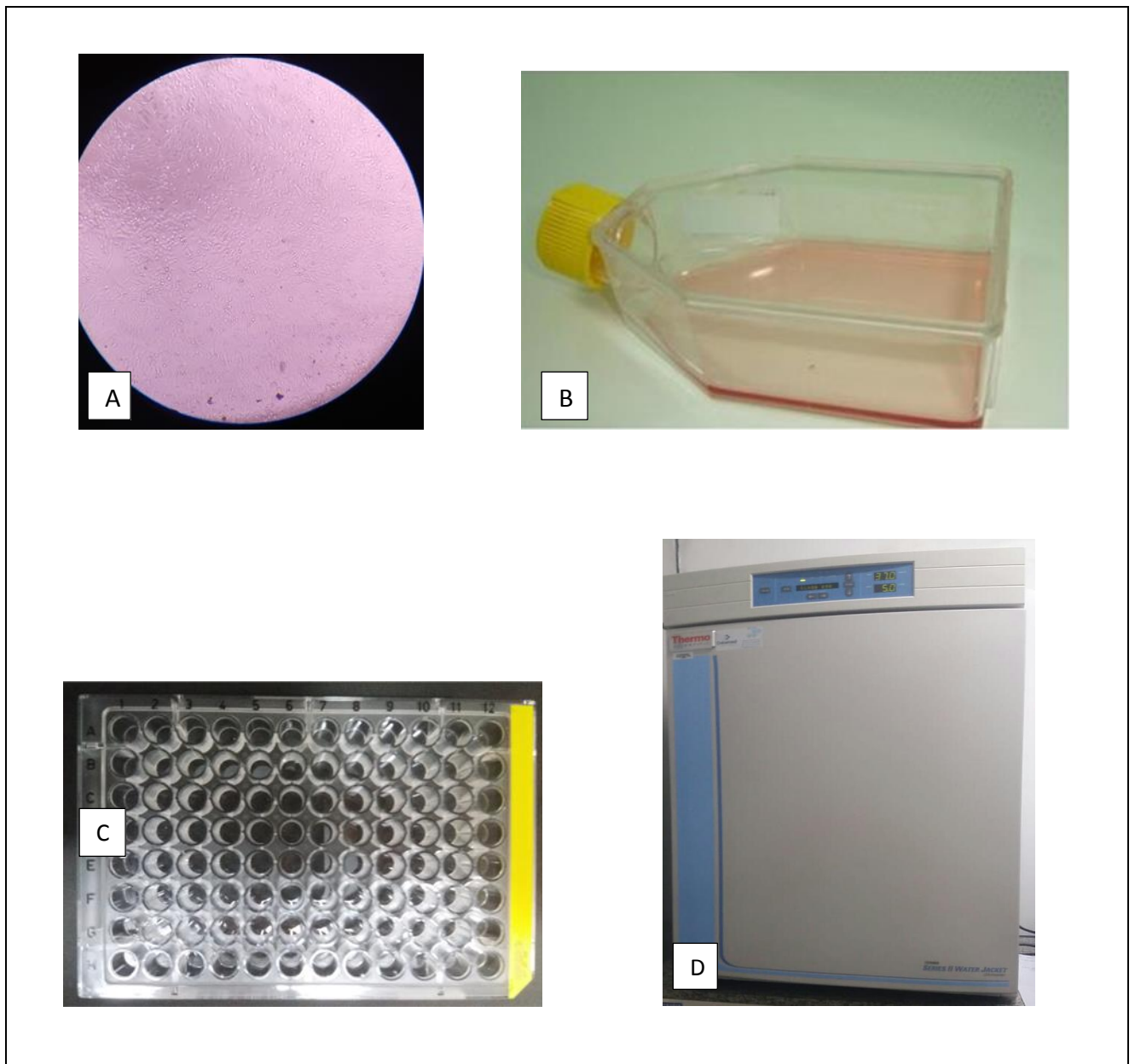


**Figura 6.** Molde O'ring

## 5.2 - Cultura Celular

As células empregadas neste trabalho foram os Osteoblastos Humanos da linhagem Saos-2. Inicialmente cultivadas em meio DMEM com 10% soro fetal bovino, penicilina e estreptomicina a 37°C em estufa 5% CO<sub>2</sub>.

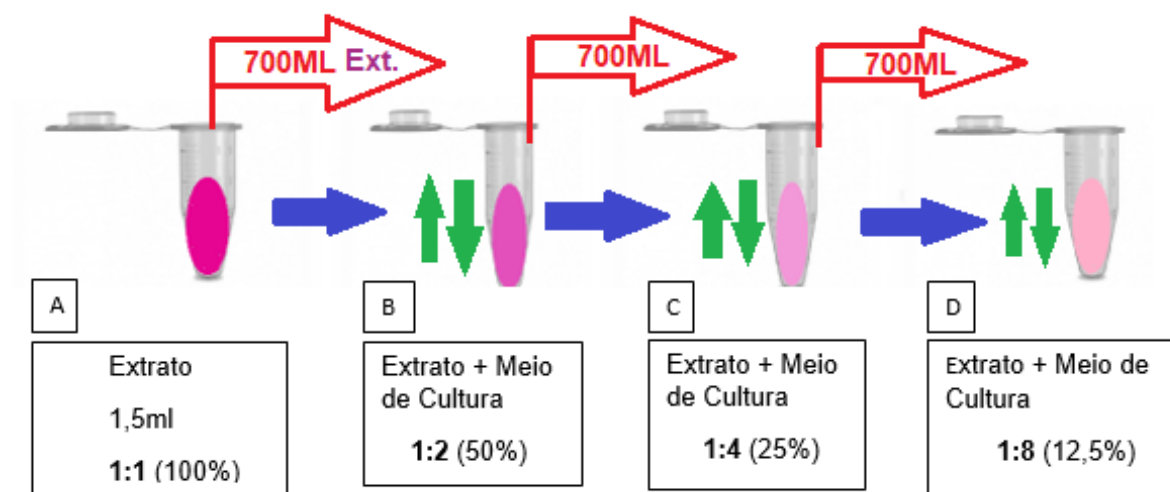
O experimento foi feito em Triplicata, utilizando o total de 1X10<sup>5</sup> células/poços em placas de 96 poços operando com uma suspensão de 200 µl de meio de cultura, sendo incubados por 24 horas a 37°C em estufa 5% CO<sub>2</sub>.



**Figura 7.** Cultura Celular: **(A)** Células Osteoblastos Humanos da linhagem Saos-2. **(B)** Cultivo das células em meio DMEM com 10% soro fetal bovino, penicilina e estreptomicina. **(C)** Placa de 96 poços. **(D)** Estufa 5% C

### 5.3 - Diluição do Extrato

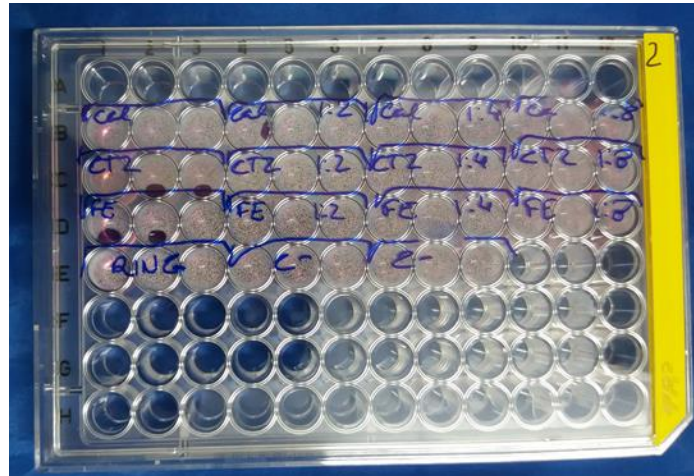
Foi realizado com o objetivo de verificar a viabilidade celular em quatro diluições diferentes das pastas endodônticas em meio de cultura (1:1, 1:2, 1:4, 1:8). Após o período de 24 horas para a presa das pastas endodônticas, as diluições seriadas foram realizadas a partir do extrato 1:1. Essa diluição ocorre com a incorporação do meio de cultura DMEM.



**Figura 8.** Diluição do extrato- **(A)** Eppendorf com o extrato a 100%. **(B)** Diluição do extrato com meio de cultura a 50%. **(C)** Diluição do extrato com o meio de cultura a 25%. **(D)** Diluição do extrato com o meio de cultura a 12,5%. A cada diluição foi retirado 700 µl de extrato.

#### 5.4 - Exposição celular ao extrato

As células foram expostas aos extratos das pastas endodônticas por um período de 24 horas. O controle negativo foi a linhagem celular sem a exposição às soluções e ao O' ring.

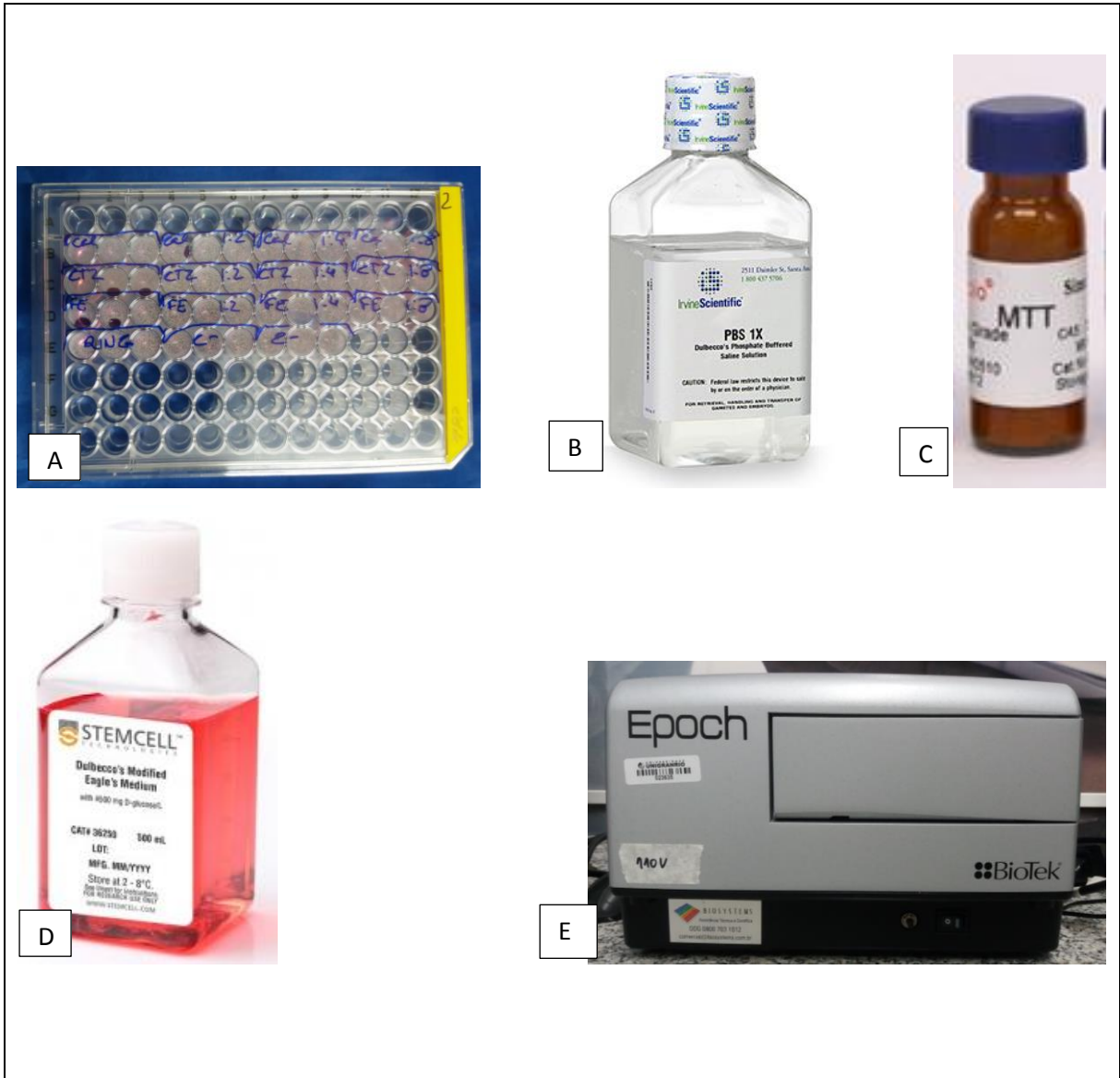


**Figura 9.** Exposição celular ao extrato

#### 5.5 - Ensaio de MTT

As normas de citotoxicidade foram realizadas de acordo com as normas de padrão internacional ISO 6876. Estas soluções foram deixadas em contato com as culturas celulares por um período de 24 horas em 37°C em uma estufa 5% CO<sub>2</sub>. Em seguida foi realizado o ensaio de MTT para verificar a viabilidade celular. As amostras de controle negativo foram tratadas nas mesmas condições, expostas ao meio de cultura normal. Após o contato das células com o extrato das pastas, o meio foi aspirado as células foram lavadas duas vezes com PBS estéril.

Foi adicionado a todos os poços 100µl da solução de MTT (0,5 mg/ml). Após incubação por duas horas, foi retirada toda solução de MTT e acrescido a todos os poços 100µl de DMSO puro. As placas foram agitadas pelo período de 5 minutos e permaneceram imóveis por 5 minutos para a estabilização da cor. Sendo transferidas após esses 5 minutos para o espectrofotômetro Biotek- Epoch (Winooski, VT, USA) para leitura com absorvância em 540 nM.



**Figura 10.** Ensaio de MTT- **(A)** Placa de 96 poços com células e extrato. **(B)** Líquido de PBS. **(C)** Solução de MTT. **(D)** Líquido de DMSO. **(E)** Espectrofotômetro Biotek-Epoch.

## **5.6 - Análise Estatística**

Análise univariada da variância (ANOVA) foi aplicada para examinar as diferenças entre os percentuais de citotoxicidade entre grupos usando o software SPSS 16.0 (SPSS Inc, Chicago, IL, EUA). O teste post-hoc de comparações múltiplas de Tukey foi utilizado para isolar e comparar os resultados em uma significância de  $P < 0.05$ .

## 6. RESULTADOS

O ensaio de MTT mostrou que a viabilidade celular foi significativamente alterada de acordo com o material testado ( $P < 0.05$ ) e com a concentração do extrato ( $P < 0.05$ ). Em todas as concentrações testadas o Feapex apresentou maior viabilidade celular do que os demais materiais testados ( $P < 0.05$ ). Embora nenhuma diferença estatisticamente significativa tenha sido observada entre a pasta Calen e a pasta CTZ nas concentrações de 1:1 e 1:2 ( $P > 0.05$ ), a pasta CTZ apresentou maior citotoxicidade nas concentrações de 1:4 e 1:8 ( $P < 0.05$ ). De forma geral, a citotoxicidade diminuiu com o aumento da diluição do material. Os resultados podem ser observados na Tabela 4.

**Tabela 4.** Viabilidade celular de extratos em diferentes concentrações derivadas dos materiais testados após cultura celular. Os resultados mostram a média percentual e o desvio padrão calculados a partir do controle negativo (células não expostas ao material).

	1:1	1:2	1:4	1:8
<b>Calen</b>	5.2±0.6 <sup>Aa</sup>	5.1±0.6 <sup>Aa</sup>	37.7±8.1 <sup>Bb</sup>	63.0±8.0 <sup>Bc</sup>
<b>CTZ</b>	6.5±0.8 <sup>Aa</sup>	4.7±0.2 <sup>Aa</sup>	4.4±0.3 <sup>Aa</sup>	38.4±10.5 <sup>Ab</sup>
<b>Feapex</b>	56.1±7.6 <sup>Ba</sup>	70.6±10.7 <sup>Bb</sup>	74.7±11.5 <sup>Bb</sup>	84.9±12.8 <sup>Cc</sup>

Diferentes letras maiúsculas superescritas representam diferença estatisticamente significativa entre os diferentes materiais em uma mesma concentração ( $P < 0.05$ )

Diferentes letras minúsculas superescritas representam diferença estatisticamente significativa entre o mesmo material em diferentes concentrações ( $P < 0.05$ ).

## 7. DISCUSSÃO

Um material de obturação endodôntico padrão para dentes decíduos deve possuir uma série de peculiaridades que o tornem conveniente para uso. Uma delas seria a baixa toxicidade aos tecidos periapicais e ao germe do dente permanente. Dado que quando extravasado do ápice são irritantes ao tecido periapical e desencadeiam reação inflamatória de corpo estranho neste tecido, sendo capaz de afetar a erupção do dente permanente (Mortazave et al.,2004).

A citotoxicidade é a capacidade intrínseca de um material promover alteração metabólica nas células em cultura, podendo culminar ou não em morte celular. Com o estabelecimento de uma gama de linhagens animais e humanas pôde-se testar uma série de produtos, desde drogas a material plástico, com intuito de avaliar o potencial de citotoxicidade (APABCAM- Associação Técnico Científica Paul Ehrlich, 1998). Testes *in vitro* vêm substituindo os ensaios *in vivo*, principalmente pelo seu custo reduzido, alta reprodutibilidade e facilidade de realização (Rogerio et al., 2003).

No presente estudo, os fármacos utilizados na terapia endodôntica de dentes decíduos como a pasta Calen PMCC, Feapex e CTZ foram submetidas ao teste de citotoxicidade (viabilidade celular). Esse teste foi aplicado em Osteoblastos Humanos da linhagem SAOS-2. Em 1987, Rodan et al determinaram que células SAOS-2 “possuem várias características osteoblásticas e poderiam ser úteis como linha permanente de células semelhantes a osteoblastos humanos e como fonte de moléculas relacionadas com os ossos”. Além de sua disponibilidade mundial, algumas das vantagens da utilização da linhagem SAOS-2 é que elas possuem dados de caracterização bem documentados, a possibilidade de obter grandes quantidades de células em curto espaço de tempo e o fato de que as células SAOS-2 podem ser totalmente diferenciadas de modo que as células osteoblásticas naturalmente fazem (Hausser, Benner, 2005).

A quantificação celular foi realizada pelo método colorimétrico do MTT, desenvolvido por Mosmann (1983), que se esteia na atividade mitocondrial das células que convertem o MTT em cristais azuis de formazan solúvel, quantificado por espectrofotometria. Por conseguinte, a atividade mitocondrial, presente somente nas células vivas, permitiu mensurar a viabilidade de sobrevivência celular.



Os resultados de viabilidade celular do presente estudo demonstraram que a pasta Feapex apresenta maior viabilidade celular do que as demais pastas testadas (Calen PMCC e CTZ). Estudos precedentes mostraram que os materiais a base de iodofórmio são facilmente absorvidos e não ocasionam reações de corpo estranho (Maryon et al., 1990). De acordo com os estudos de Wright et al., (1994) e Huang et al., (2006) que demonstraram a alta taxa de sobrevivência celular com a pasta Vitapex.

A citotoxicidade da pasta CTZ neste estudo foi maior do que as demais pastas testadas. Hume., (1984) constatou que qualquer material que inclui-se eugenol sucederia uma reação tecidual grave em virtude da depressão respiratória celular. Divergindo do estudo de Bruno et al., (2006) que destituiu o efeito citotóxico da pasta CTZ.

Contudo a pasta Calen PMCC nas concentrações mais baixas (1:1 e 1:2) apresenta citotoxicidade semelhante a pasta CTZ. Corroborando com o estudo Cerqueira et al., (2009) demonstra que a pasta Calen PMCC não é menos citotóxica que as demais testadas. Em um estudo de Lactiva et al., (2012) os resultados indicam que o Hidróxido de Cálcio apresenta um alto grau de toxicidade dentro do período experimental de 4 semanas, mais isso mudou significativamente em 12 semanas, quando apresentou características de biocompatibilidade sem resposta inflamatória significativa.

Diante dos resultados apresentados e do que foi mencionado, cabe ressaltar que outros estudos devem ser realizados para comprovar a efetividade dos materiais obturadores testados.

## **8. CONCLUSÕES**

De acordo com os resultados do presente estudo, pode-se concluir que a pasta endodôntica Feapex apresentou menor citotoxicidade do que as pastas Calen PMCC e CTZ.

## 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 – CAPPIELO, J. Tratamentos pulpares em incisivos primários. Rev. Asoc Odontol Argentina 52:139-45,1964
- 2 – WALTER,L.F.Tratamento endodôntico para molars primários. Rev. Gaúcha Odontol, v. 13, n 1, p.8-11,1965
- 3 – CAPPIELLO, J. Nuevos enfoques en odontologia infantil. Odontol Uruguayi 23: 23-30,1967
- 4 - GUEDES PINTO, A.C; PAIVA, J.G; BOZZOLA, JR. Endodontic treatment of deciduous teeth with nonvital pulp. Rev APCD, 35: 240-244, 1981
- 5- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays, J. Immunol. Methods, 65: 55- 63, 1983
- 6 – HUME, W.R. The effect of eugenol on respiration and division on human pulp, mouse fibroblasts, and liver cells in vitro. J Dent Res, 63: 1262-1265, 1984
- 7 – MARYON, S. D; BROOK, A.M. In vitro comparison of the cytotoxicity of twelve endodontic materials using a new technique. Int Endod J, 23: 203- 210, 1990
- 8 – KUBOTA, K; GOLDEN, B. E; PENUGONDA, B. Root canal filling materials for primary teeth: a review of the literature. Journal of Dentistry for Children; 58: 225-227, 1992
- 9 – HOLAN, G; FUCKS, A. B. A. Comparison of pulpectomies using ZOE and KRI paste in primary molars: a retrospective study. Pediatr Dent, Chicago, v.15, n.6, p. 403-407. Nov/Dec, 1993
- 10- WRIGHT, K. J; BARBOSA, S. V; ARAKI, K; SPANGBERG, L. S. In vitro antimicrobial and cytotoxic effects of Kri 1 paste and Zinco oxide eugenol used in primary tooth pulpectomies. Pediatr Dent; 16: 102- 106, 1994

- 11- COSTA, C. A. S; BENATTI, N. C; ABDALLA, R. E; GONZAGA, H. F. S; LIA, R. C. C. Estudo preliminar da compatibilidade biológica de um cimento à base de antibiótico e óxido de zinco e eugenol quando implantado em tecidos subcutâneo de rato. Rev. Odontol Univ. São Paulo; 8:65-79, 1994
- 12- ESTRELA, C; SYDNEY, G. B; BAMMANN, L. L; FELIPPE, O. JR. Mechanism of action of calcium and hydroxyl ions of calcium hydroxide on tissue and bacteria. Braz Dent J; 6:85- 90, 1995
- 13- Tchaou,W-S; Turng,B-F; Minah,C.G. F; Coil,J. A. In vitro inhibition of bacteria from root canals of primary teeth by various dental materials. American Academy of Pediatric Dentistry, Pediatric Dentistry - 17:5, 1995
- 14- COLL, J. A; SADRIAN, R. Predicting pulpectomy success and its relationship to exfoliation and succedaneous dentition.Pediatr Dent; 18: 57-63, 1996
- 15- GUEDES- PINTO, A. C; DUARTE, D. A. Pulpectomia em Odontopediatria, In: Guedes- Pinto, A. C (ED) Reabilitação em Odontopediatria Atendimento integral. São Paulo: Santos, 1998. Cap. 8, p. 103-119
- 16- NELSON FILHO, P. ET AL. Connective tissue responses to calcium hydroxide-based root canal medicaments. International Endodontic Journal, v. 32, p. 303-311, 1999
- 17- SIQUEIRA JUNIOR, J. F; LOPES, H. P. Mechanisms of antimicrobial activity of calcium hydroxide: a critical review International Endodontic Journal, v.32, p. 361- 369, 1999
- 18- LOPES, H. P; SIQUEIRA, J. R. Medicação intracanal In: Endodontia- biologia e técnica. 2<sup>o</sup> ed, Rio de Janeiro. MEDSI, p. 581-619, 1999
- 19- YAGIELLA, J. A; NEIDLE, E. A; DOWD, F. J. Farmacologia e terapêutica para dentistas. 4<sup>o</sup> ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 717, 2000
- 20- SOUZA, C. J. A; LACTIVA, A. M; PASCON, E. A; LOYOLA, A. M. Avaliação histológica da Resposta óssea à pasta Guedes- Pinto: estudo experimental em cobaias. Braz Oral Res, 14: 131 (abstract B 188), 2000

- 21- ROGERO, S. O; LUGÃO, A. B; IKEDA, T. I; CRUZ, Á. S. Teste in vitro de citotoxicidade: estudo comparative entre duas metodologias. *Materials Research*, v.6; n. 3; p. 317-320, 2003
- 22- MOSTAZAVI, M; MESBAHI, M. Comparison of zine oxide and eugenol, and Vitapex for root canal treatment of necrotic primary teeth. In *J. Paediatr Dent*; 14: 417-424, 2004
- 23- LEAL, S. C; BEZENA, A.C.B; TOLEDO, A. O. Orientações terapêuticas utilizadas pelos cursos de especialização em odontopediatria no Brasil para cárie severa da infância. *Rev. Abeno*; v. 4, n. 1, p. 57-62, 2004
- 24- CUNHA, C. B. C. S; BARCELLOSS, R; PRIMO, L. G. Soluções irrigadoras e materiais obturadores utilizados na terapia endodontica de dentes decíduos. *Pesq Bras Odontol Clin Integr*; 5 (1): p. 75- 83, 2005
- 25- HAUSSER, H. J; BENNER, R. E. Instabilidade fenotípica de células Saos-2 em cultura a longo prazo. *Biochem. Biofísica Res. Commun.* 333(1): p. 216- 222, 2005
- 26- BRUNO, G. B; MENEZES, V. A; BRUNO, J. A; ALMEIDA, M. W; VIANA, G. S. B. Avaliações hematológicas e bioquímicas do sangue de cães submetidos a pulpotomias com cimento de antibióticos. *Rev. Odontol UNESP*, 35(3): p. 125-133, 2006
- 27- Huang, T . H; Ding, S . J; Kao, C. T. Biocompatibility of Various Formula Root Filling Materials for Primary Teeth, 2006 Wiley Periodicals, Inc. *J Biomed Mater Res Part B: Appl Biomater* 80B: 486–490, 2007
- 28- BRUNO, G. B; ALVES, A. P. N; MARIA, V. A. M. M. C. G; BRUNO, J. A; VIANA, G. S. B. Biocompatibility evaluation of an antibiotic paste after pulpotomy in dogs. *Brazilian. J Oral Sci*; 22(6): 1397- 1401, 2007
- 29- REDDY, S; RAMAKRISHNA, Y. Evaluation of antimicrobial efficacy of various root canal filling materials used in primary teeth: a microbiological study. *J. Clin. Pediatr Dent*; 31: 193-198, 2007

- 30- CERQUEIRA, D. F; MOURA, A. C. V. M; SANTOS, E. M; GUEDES- PINTO, A. C. Cytotoxicity, Histopathological, Microbiological and clinical aspect of an endodontic iodoform- based paste used in pediatric dentistry: A Review. *J Clin Pediatr Dent*; 32(2): 105-110, 2007
- 31- DUNSTON, B; COLL, J. A. A. Survey of primary tooth pulp therapy as taught in us dental schools and practiced by diplomats of the American Board of Pediatric Dentistry. *Pediatr. Dent*, v.30, p. 42-48, 2008
- 32- CERQUEIRA, D. F; PINTO, A. C. G. Efeitos de fármacos utilizados na terapia endodontica dos dentes decíduos: analise da citotoxicidade e estudo in vitro da distribuição de proteínas da matriz extracelular e do citoesqueleto de fibroblastos da polpa humana, 2009
- 33- GUEDES- PINTO, A. C; SANTOS, E. M. Tratamento Endodôntico em Dentes decíduos. In: Guedes- Pinto, A. C. *Odontopediatria*. 8<sup>o</sup> ed. São Paulo: Santos, p. 587-612, 2010
- 34- LACATIVA, A. M; LOYOLA; A. M; SOUSA, C. J. A. Histological Evaluation of Bone Response to Pediatric Endodontic Pastes: An Experimental Study in Guinea Pig; *Braz Dent J*, 23(6): 635-644, 2012
- 35- Lima, C. C. B; Conde, A. M. J; Rizzo, M. S; Moura, R. D; Moura, M. S; Lima, M. D. M & Moura, L. F. A. D. Biocompatibility of root filling pastes used in primary teeth, *International Endodontic Journal*. Published by John Wiley & Sons Ltd, 2014
- 36- SOUZA, P. M; DUARTE, R. C; SOUSA, S. A. Acompanhamento clínico e radiográfico de dentes decíduos submetidos à terapia pulpar com a pasta CTZ. *Brazilian Research in Pediatric Dentistry and Integrated Clinic*, 14 (Supe.3): 56- 68, 2014
- 37- Pires, C. W; G. Botton, G; Cadon, F. C; Machado, A. K; Azzolin, V. F; Cruz, I. B. M; Sagrillo, M. R; & Praetzel J. R. Induction of cytotoxicity, oxidative stress and genotoxicity by root filling pastes used in primary teeth, *International Endodontic Journal*. Published by John Wiley & Sons Ltd, 2015
- 38- AL- OSTWANI, A. O; AL- MONAQUEL, B. M; AL-TINAWI, M. K. A Clinical and radiographic study of four different root canal fillings in primary molars. *J Indian Soc Pedod Prev Dent*; 34: 55-99, 2016

39- Moura, L. F. A. D; Lima, M. D. M; Lima, C. C. B; Machado, J. I. A. G; Moura, M. S; Carvalho, P. V. Endodontic Treatment of Primary Molars with Antibiotic Paste: A Report of 38 Cases; The Journal of Clinical Pediatric Dentistry; v. 40, n.3, 2016

40- Pilownic, K. J; Gomes, A. P. N; Wang, Z. J; Almeida, L.H.S, Romano, A. R; Shen, Y; Felix, A. O. C; Haapasalo, M; Pappen, F. G. Physicochemical and Biological Evaluation of Endodontic Filling Materials for Primary Teeth; Brazilian Dental Journal 28(5): 578-586,2017

41- RajaSekhar, S; Mallineni, S. K and Nuvvula, S. Obturating Materials Used for Pulpectomy in Primary Teeth- A Review; Journal of Dental and Craniofacial Research, V. 3 No.1:3, 2018

42- APABCAM, [www.bcrj.org.br/serviço/testes-de-citotoxicidade](http://www.bcrj.org.br/serviço/testes-de-citotoxicidade)