



## Avaliação *in vitro* da citotoxicidade de um novo irrigante: clorofila

## *In vitro* evaluation of the new irrigant cytotoxicity: chlorophyll

Maria Regina Japiassú SANTIAGO\*  
 Sandra Rivera FIDEL\*\*  
 Marcos Veiga KALIL\*\*\*  
 Luciane Kac SZMAJSER\*\*\*\*  
 Maria Aparecida A. BOLLER\*\*\*\*\*  
 Rivail Antônio Sérgio FIDEL\*\*\*\*\*

### Endereço para correspondência:

Maria Regina Japiassú Santiago  
 Rua Henry Ford, 161/902 – Tijuca – Rio de Janeiro – RJ  
 CEP 20520-150 – Tel: (21) 2575-6827  
 E-mail: reginasantia@aol.com

\* Profa. Substituta da disciplina de Endodontia da FO/UERJ – RJ. Mestranda em Endodontia – FO/ UERJ.

\*\* Profa. Dra. Adjunta da disciplina de Endodontia da FO/UERJ – RJ. Responsável pela pós-graduação de Endodontia da FO/ UNIGRANRIO – Duque de Caxias – RJ.

\*\*\* Prof. Assistente da disciplina de Endodontia da FO/UFF – RJ. Doutorando em Endodontia – FO/UERJ.

\*\*\*\* Profa. Assistente de Endodontia da FO/UNIGRANRIO – Duque de Caxias – RJ. Mestre em Endodontia – FO/UERJ.

\*\*\*\*\* Profa. M.Sc. em Biologia Parasitária – Virologia da Fiocruz – RJ.

\*\*\*\*\* Prof. Titular da disciplina de Endodontia da FO/UERJ – RJ. Coordenador do mestrado e doutorado da FO/UERJ – RJ. Coordenador da disciplina de endodontia da FO/UNIGRANRIO – RJ. Presidente da sociedade brasileira de traumatologia dentária.

Recebido em 6/3/04. Aceito em 6/4/04.

### Palavras-chave:

clorofila; citotoxicidade;  
 cultura de células;  
 fibroblastos.

### Resumo

A desinfecção do sistema de canais radiculares é o somatório da ação mecânica dos instrumentos com os agentes antimicrobianos usados na irrigação ou na medicação intracanal. Vários estudos foram feitos com o objetivo de se alcançar um irrigante com atividade antimicrobiana e habilidade de solvência de matéria orgânica, porém sem causar severas reações inflamatórias quando em contato com tecidos vitais. O objetivo deste trabalho foi avaliar *in vitro* o efeito citotóxico da clorofila a 100% no cultivo de células Hep-2 (fibroblasto humano). Essa avaliação foi realizada pelo teste de citotoxicidade em monocamadas celulares, utilizando linhagem de células Hep-2 originária de células epitelióides de carcinoma de laringe humana (Departamento de Imunologia – INCQS) a uma concentração de  $5 \times 10^5$  e tempo de exposição de 5 minutos. Compararam-se os efeitos citotóxicos da solução testada com os efeitos da solução aquosa de hipoclorito de sódio a

2,5% como grupo controle positivo e o meio de Duldecco's como controle negativo. Os dados foram submetidos aos testes não paramétricos de Kruskal-Wallis e de Mann-Whitney, a um nível de significância de 5%, demonstrando uma diferença significativa ( $p = 1,2 \times 10^{-10}$ ) da solução testada quando comparada ao controle. Essa diferença significativa nos mostra que a solução aquosa de clorofila a 100% testada se comportou como uma solução não citotóxica, sendo a solução de hipoclorito de sódio a 2,5% severamente citotóxica.

**Keywords:**  
chlorophyll; cytotoxicity;  
cell culture; fibroblasts.

## Abstract

The disinfection of the root canal system is achieved by the mechanical action of the instruments together with the antimicrobial agents in the irrigating solutions. Many studies are realized with the objective to find an irrigant with antimicrobial activity and tissue-dissolving ability without causing severe inflammatory reactions when placed in contact with vital tissues. The purpose of this study was to estimate the cytotoxicity effects of 100% Chlorophyll by Hep-2 cell (human fibroblast) cultivation. This evaluation was done by cytotoxicity test on cell monolayer by  $5 \times 10^5$  concentration and exposure time of 5 (five) minutes. Chlorophyll cytotoxic effects were compared with 2,5% sodium hypochlorite used as positive control and Duldecco's modified Eagle's medium (DMEM) as negative control. The results were evaluated by Kruskal-Wallis and Mann-Whitney tests, displaying a significant difference ( $p = 1,2 \times 10^{-10}$ ) between them. This study showed us that 100% Chlorophyll solution is not cytotoxic and 2,5% sodium hypochlorite is highly cytotoxic.

## Introdução

Os procedimentos de limpeza e desinfecção dos canais radiculares são fortemente dependentes dos efeitos mecânicos – representados pela ação dos instrumentos e fluxo e refluxo do ato de irrigar –, como também dos químicos, como a ação solvente de matéria orgânica e efeito antibacteriano das substâncias irrigantes.

Várias soluções irrigantes são usadas durante o tratamento endodôntico para atingir os objetivos anteriormente citados, porém, segundo Siqueira *et al.* [14], um irrigante ideal deveria destruir microrganismos e neutralizar seus produtos sem danificar tecidos vitais, ou seja, a solução escolhida deveria ter uma concentração desejada a fim de que possuísse baixa toxicidade e adequado efeito antibacteriano.

Leonardo *et al.* [9] afirmam que todo material endodôntico, tanto cimentos como soluções irrigantes e outros, deve ser biocompatível e ter propriedades físico-químicas satisfatórias.

Os testes de citotoxicidade *in vitro* fazem parte dos testes que avaliam a biocompatibilidade dos materiais odontológicos. Estudos em cultivo celular,

como o presente trabalho, vêm sendo empregados por mais de trinta anos visando à avaliação da citotoxicidade induzida por materiais utilizados em endodontia e em outras áreas da ciência [3, 4, 6, 10].

Entre as soluções mais empregadas na terapia endodôntica, o hipoclorito de sódio (NaOCl) é o mais comumente usado como irrigante em endodontia, por causa das suas propriedades físico-químicas como: ação lubrificante, poder antimicrobiano e solvência de tecido vital e não vital. Porém apresenta algumas limitações como: desagradável odor e sabor, não ser capaz de remover a *smear layer* das paredes dentinárias e ser severamente citotóxico quando extruído para os tecidos perirradiculares [2, 5, 13, 15].

Um estudo realizado por Heling *et al.* [5] demonstrou que o hipoclorito de sódio em concentrações superiores a 0,01% eliminou fibroblastos em cultura celular, confirmando a citotoxicidade da solução estudada.

Com relação ao tratamento das infecções endodônticas, é sabido que qualquer substância antimicrobiana, invariavelmente, irá apresentar toxicidade às células vivas. Isso porque não detém propriedade de seletividade para bactérias, o que torna difícil conciliar ação antibacteriana, ou

solvente de tecido, ou ainda quelante, com a compatibilidade biológica, já que quanto maior a concentração das soluções mais efetiva se torna a sua ação antibacteriana [14].

Enfim, apesar de o hipoclorito de sódio ser considerado na literatura endodôntica o irrigante mais comumente usado, como descrito anteriormente ele apresenta limitações, as quais fazem com que haja uma procura por um melhor irrigante do sistema de canais radiculares.

Visando a essa procura, este trabalho teve como proposta estudar uma nova solução irrigante: clorofila a 100%, que é considerada o sangue verde das plantas e é feita por elas próprias por meio do processo químico chamado fotossíntese. A estrutura básica da molécula da clorofila é muito similar à molécula presente no grupo encontrado das hemoglobinas. Apesar de ser considerada uma substância fitoterápica por apresentar propriedades curativas conhecidas, é pouco usada na odontologia. Assim alguns trabalhos na endodontia vêm sendo realizados com o propósito de utilizar a clorofila como uma possível alternativa de solução irrigante no tratamento endodôntico.

Um dos trabalhos foi elaborado com o intuito de avaliar a capacidade de limpeza dos túbulos dentinários utilizando clorofila 100% como irrigante. Essa solução foi comparada ao hipoclorito de sódio a 2,5% e a clorexidina a 0,2%. O estudo demonstrou que a solução de clorofila permitiu um elevado grau de limpeza dos túbulos dentinários, como também o uso do hipoclorito de sódio. Porém o mesmo não aconteceu com a clorexidina [11].

Assim, dando continuidade aos estudos sobre esta possível solução irrigante – a clorofila 100% –, este estudo teve como objetivo avaliar sua citotoxicidade *in vitro*, utilizando cultura celular proveniente de uma linhagem de células Hep-2 originária de células epitelióides de carcinoma de laringe humana.

## Material e métodos

### Cultura de células

Utilizou-se neste experimento uma linhagem de células Hep-2 originária de células epitelióides, de carcinoma de laringe humana (Departamento de Imunologia – INCQS). Trata-se de uma linhagem que foi aceita e faz parte da Coleção Americana de Tipos de Culturas Celulares (ATCC) desde 1961.

### Teste aplicado

Foram dispensados 250  $\mu$ L por poço da solução clorofila em placas de 24 poços contendo a monocamada celular para avaliação, conforme a figura 1.

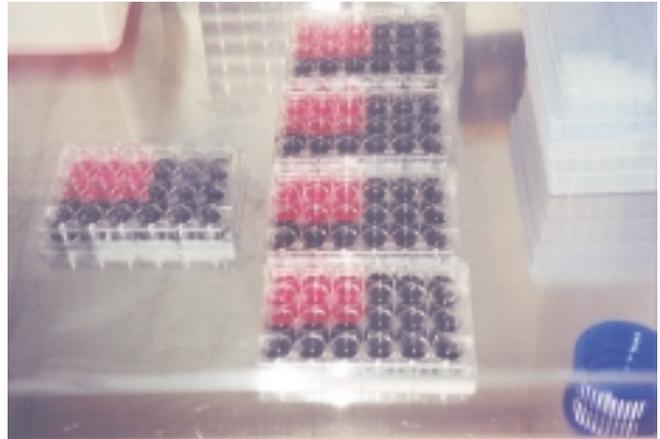


Figura 1 – Placas com 24 poços

Com a finalidade de retirar do experimento qualquer possibilidade de erro nas leituras, foram testados também os efeitos da solução clorofila direta na placa. A leitura dos poços sem nenhuma solução ou célula (grupo branco) também foi realizada para eliminar os possíveis efeitos da placa na leitura por espectrofotômetro e, ainda, o meio com a placa. O controle negativo foi realizado nos poços contendo a monocamada celular com o meio Dulbecco's (Eagle's modificado) para cultura celular. E, finalmente, fez-se o controle positivo com a solução aquosa de hipoclorito de sódio a 2,5% (Biodinâmica Química e Farmacêutica LTDA.), em placa específica [6].

O tempo de exposição padronizado foi de 5 minutos, visto que esse teste nos permite a exposição direta das soluções em suas concentrações de uso. Obedeceu-se ainda a critérios individuais e pertinentes ao mecanismo de ação da solução utilizada, levando-se em conta o tempo de permanência da substância no organismo [6, 14].

Em seguida, procedeu-se à lavagem das células com solução PBS, 500  $\mu$ L através do poço e, em seguida, fixação com 1 mL de solução salina fosfatada (PBS) com formol a 0,01% por 15 minutos. E só depois da completa secagem das placas colocou-se o corante Coomassie Brilliant Blue R-250, 250  $\mu$ L por orifício e por uma hora. Após esse período, lavaram-se as placas em água com posterior secagem. Com a finalidade de eluição, colocou-se 1 mL/ poço de solução de dodecil sulfonato de sódio (SDS) a 1,0% por uma hora. Passou-se, então, à leitura ótica no leitor de microplacas Bio-Tec ELX-800 (figura 2) a um comprimento de onda de

595 nm. O processamento da placa para fins de leitura foi realizado em todos os 24 poços das cinco placas deste experimento, e os resultados foram submetidos aos critérios de classificação da norma número nove da FDI de 1980.



Figura 2 – Leitor de microplacas (ELX 800)

## Resultados

A leitura em espectrofotômetro forneceu valores que, transferidos para o computador, geraram planilhas que permitiram a confecção de gráficos (figura 3).

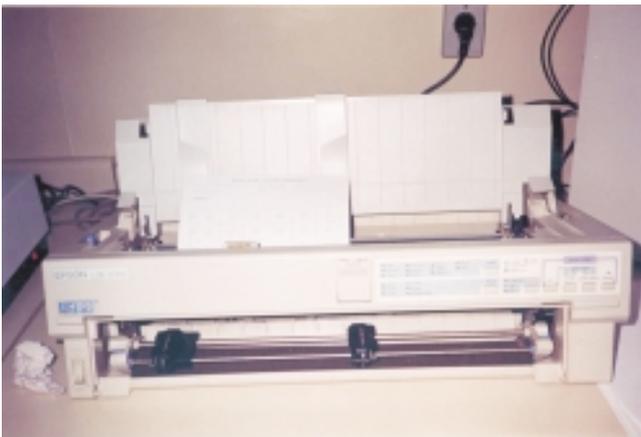


Figura 3 – Planilhas com a leitura das microplacas (EPSON LQ - 1170)

Os resultados obtidos por este teste foram avaliados de duas maneiras. A primeira, por intermédio de uma análise estatística da variância, demonstrou ter diferença significativa. Os dados foram submetidos aos testes não paramétricos de

Kruskal-Wallis e de Mann-Whitney, a um nível de significância de 5%, constatando-se diferença significativa ( $p = 1,2 \times 10^{-10}$ ) da solução quando comparada ao controle.

Os resultados representam as percentagens de células que sobreviveram e foram coradas e eluídas, já que as lesadas foram desprezadas após o tempo de exposição, as lavagens das células com solução PBS e posterior fixação com a solução de PBS + formol a 0,01% por 15 minutos. Os resultados do gráfico 1 representam a diferença entre os grupos controles e a quantidade de células que sobreviveram, indicando aproximadamente o número de células lesadas e permitindo-nos uma conclusão sobre o grau de citotoxicidade das substâncias [6].

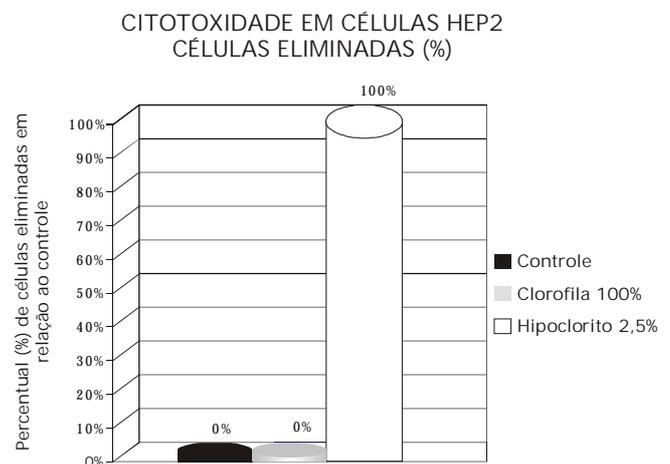


Gráfico 1 – Diferença entre os grupos controles e a quantidade de células que sobreviveram

## Discussão

Os testes de citotoxicidade *in vitro* estão inclusos entre os que avaliam a biocompatibilidade dos materiais odontológicos. Estudos em cultivo celular, como o presente trabalho, vêm sendo empregados por mais de trinta anos visando à avaliação da citotoxicidade induzida por materiais utilizados em endodontia e em outras áreas da ciência [3, 4, 6, 10].

No entanto a metodologia aplicada em outros trabalhos, *in vitro*, não permite a avaliação das soluções em suas concentrações de uso, o que não acontece no teste de contagem por espectrofotômetro. Esse fator permite maior confiabilidade nos resultados, sendo então utilizado no controle de qualidade de soros e vacinas pelo Instituto Nacional de Controle de Qualidade na Saúde [6, 7, 8, 10].

Os resultados obtidos por intermédio deste experimento, quando comparados aos de outros trabalhos semelhantes, que se utilizam de cultivo celular, demonstram correspondência, o que o credencia como um recurso de fácil reprodução e eficiente no estudo da citotoxicidade *in vitro* [6, 7].

Não parece existir um consenso quanto à padronização de um cultivo celular universal. Pelo contrário, os ensaios são realizados em diferentes linhagens celulares, visto que as células cultivadas são fibroblastos humanos [1, 6, 7, 8].

Outro fator importante é a padronização do tempo de exposição ou tempo de incubação das substâncias testadas. Os trabalhos avaliados parecem obedecer a critérios individuais e pertinentes à característica de cada material estudado. Convencionou-se o tempo de exposição em 5 minutos, para avaliação da eficácia, levando-se em conta a sua utilização com segurança [6, 12].

O mecanismo de ação das substâncias testadas, assim como o tempo de exposição aos tecidos delas e local de utilização, foi levado em consideração para o modelo metodológico do presente trabalho. Já os testes de longa duração e baixas concentrações, em substâncias que manterão contato com o organismo por um breve espaço de tempo, servem mais como ilustração para extrapolação de resultados do que a simulação direta de utilização [6].

A possibilidade da realização de trabalhos *in vitro* que favoreçam o teste de concentrações de uso, simulando a utilização clínica, parece-nos eficaz e necessária [12].

Diante dos resultados obtidos, perante as pesquisas relatadas na literatura, convém destacar a necessidade do perfeito conhecimento dos efeitos biológicos básicos das soluções irrigadoras dos canais radiculares, para a segura indicação delas, a fim de possibilitar uma maior segurança e sucesso na clínica diária.

Pesquisas adicionais são necessárias para assegurar que os efeitos de tais agentes sejam completamente compreendidos. É preciso considerar que há limitações quando as informações científicas são obtidas por intermédio do sistema de modelo de cultivo celular, existindo riscos em extrapolar os resultados para a clínica. Um estudo clínico para avaliar uma situação *in vivo* deve ser levado em conta, assim como trabalhos visando avaliar sua atividade antimicrobiana.

## Conclusão

Dentro da metodologia empregada, após análise e discussão dos resultados obtidos no trabalho, pode-se concluir:

- Clorofila a 100% foi considerada uma solução não citotóxica;
- Hipoclorito de sódio a 2,5% é uma solução severamente citotóxica.

## Referências bibliográficas

1. Chang Y, Huang F, Cheng M, Chou L S, Chou M. In vitro evaluation of cytotoxicity and genotoxicity of root canal medicines on human pulp fibroblast. *J Endodon* 1998; 24: 604-6.
2. Fachin E V F, Hahn L, Palmieri A L F. Revisão e enfoque clínico sobre o uso do hipoclorito de sódio em endodontia. *RBO* 1994; 51 (6): 14-8.
3. Gillies R J, Didier N, Denton M. Determination of cell number in monolayer cultures. *Analytical Biochemistry* 1986; 159: 109-13.
4. Hauman C H J, Love R M. Biocompatibility of dental used in contemporary endodontic therapy: a review. Part 1. Intracanal drugs and substance. *Int Endod J* 2003; 36: 75-85.
5. Heling I, Rotstein I, Dinur T, Szwec-Levine Y, Steinberg D. Bactericidal and cytotoxic effects of sodium hypochlorite and sodium dichloroisocyanurate solutions in vitro. *J. Endodon* 2001; 27 (4): 278-80.
6. Kalil M V. *Estudo comparativo entre as soluções aquosas de ácido cítrico a 10% e EDTA a 15%, pelo teste in vitro em culturas de células Hep-2* (Dissertação Mestrado). Niterói: Universidade Federal Fluminense; 2000.
7. Kinomoto Y, Carnes J R D L, Ebisu S. Cytotoxic of intracanal bleaching agents on periodontal ligament cell in vitro. *J Endodon* 2001; 27: 574-7.

8. Koulaouzidou E A, Margelos J, Beltes P, Kortsaris A H. Cytotoxic effects of different concentrations of neutral and alkaline EDTA solutions used as root canal irrigants. *Endodon* 1999; 25: 21-3.
9. Leonardo R T, Consolaro A, Carlos I Z, Leonardo M R. Evaluation of cell culture cytotoxicity of five root canal sealers. *J. Endo* 2000; 26 (6): 328-30.
10. Margis R, Borojevic R. Quantification of attached cell in tissue. Culture plates and on microcarriers. *Analytical Biochemistry* 1989; 181: 209-11.
11. Santiago M R J, Szmajser L K, Fidel R A S, Fidel S R. Avaliação sob MEV da limpeza de canais radiculares através da clorofila, clorox e clorexidina. *Pesquisa Odontológica Brasileira* 2002; 16: 38.
12. Semra Ç, Ahmet S. Time-depend effects of EDTA on dentin structures. *J Endodon* 2000; 28: 17-9.
13. Shabahang S, Pouresmail M, Torabinejad M. In vitro antimicrobial efficacy of MTAD and sodium hypochlorite. *Endodo* 2003; 29 (7): 450-2.
14. Siqueira Jr. J F, Moraes S R, Lopes H P. Atividade antimicrobiana das águas sanitárias disponíveis no mercado nacional. *RBO* 1999; 56: 57-60.
15. Yesilsoy C, Whitaker E, Cleveland D, Phillips E, Trope M. Antimicrobial and toxic effects of established and potential root canal irrigants. *J Endodon* 1995; 21 (10): 513-5.

---

DENTSPLY

MAILLEFER