

• U • C •

FMUC FACULDADE DE MEDICINA
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Efeito da Concentração, Temperatura e Agitação na capacidade Solvente do Hipoclorito de Sódio – Estudo *in vitro*

Mestrado Integrado em Medicina Dentária

Autor: Pedro Daniel da Silva Ambrósio

Orientador: Professor Doutor João Miguel Marques dos Santos

Co-Orientador: Professora Doutora Paula Cristina Nunes Ferreira Calvino

Coimbra, Julho 2012

Efeito da Concentração, Temperatura e Agitação na capacidade Solvente do Hipoclorito de Sódio – Estudo *in vitro*

Ambrósio, Pedro¹; Santos, João M²; Ferreira, Paula³

1 - Aluno do Mestrado Integrado em Medicina Dentária da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra

2 - Professor Auxiliar da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra

3 – Professora Auxiliar do Departamento de Engenharia Química da Faculdade de Ciências e Tecnologias da Universidade de Coimbra

Av. Bissaya Barreto, Bloco de Celas

3000-075 Coimbra

Telefone: +351 239 484183

Fax: + 351 239 402910

E-mail: pedro_amb@hotmail.com

Resumo

Estudou-se, *in vitro*, a acção solvente de 4 concentrações de hipoclorito de sódio (1%; 2,5%; 3% e 6% com adição de agente de tensão superficial) sobre tecido muscular bovino, o aumento de temperatura destas soluções, a introdução de agitação no meio, os valores de pH obtidos no final dos testes e o teor de cloro residual. Foi usado um grupo controlo com água destilada a temperatura ambiente.

Amostras padronizadas de tecido muscular bovino com peso de 70 ± 5 mg foram imersas em dez mililitros de solução teste, durante 5 minutos, sendo o seu peso registado antes e após o período de imersão e calculado posteriormente a percentagem de peso perdido. A determinação dos valores de pH iniciais foram realizados, para todas as soluções de concentrações distintas, antes dos procedimentos laboratoriais; após o tempo de imersão, estes valores voltaram a ser medidos na solução final (3 réplicas por grupo). Fez-se, em seguida, o cálculo da percentagem de variação de valores obtidos. Os valores de concentração de iões cloreto foram, à semelhança do procedimento utilizado para o pH, determinados para as soluções de diferentes concentrações antes dos procedimentos laboratoriais e medidos nas soluções finais; as variações encontradas para este parâmetro foram calculados e apresentados sob a forma de percentagem.

De acordo com a metodologia empregue e os resultados obtidos conclui-se que: os valores de concentração superior, a subida da temperatura e a indução de agitação no meio provocam um aumento da percentagem de dissolução tecidular. O aquecimento prévio das soluções a 37°C provou ser menos eficaz que a pipetagem exercida durante os primeiros 15 segundos de cada um dos 5 minutos de teste. Após o período de teste, os valores de pH e de concentração de ião cloreto baixaram em todos os casos; as soluções finais apresentavam-se alcalinas e com valores de cloro ainda assinaláveis o que nos permite constatar que ainda seria possível dissolver maior percentagem de matéria orgânica.

Palavras-chave: Hipoclorito de sódio, dissolução tecidular, concentração, temperatura, agitação, tensão superficial, pH, Cl^-

Introdução

O sucesso do tratamento endodôntico depende de uma antissepsia canalar eficaz e da prevenção da reinfecção. Os canais radiculares são conformados através de instrumentos manuais e rotatórios sob irrigação constante removendo o tecido inflamado ou necrótico, biofilme, microrganismos e outros detritos do sistema de canais radiculares.⁽⁶⁾

Aquando da realização de um tratamento endodôntico, podem encontrar-se no espaço pulpar tecidos distintos: polpa dentária sã, inflamada, necrótica não infetada ou infetada com ou sem envolvimento dos tecidos periapicais. Estas variáveis irão condicionar o efeito e a eficácia dos materiais de irrigação sobre o substrato, devendo ser tidas em conta na escolha do produto e método de irrigação a empregar.^(7, 8)

A irrigação é uma etapa fundamental do tratamento endodôntico devendo iniciar-se após o acesso à câmara, começando a actuar sobre o tecido pulpar, prolongando-se durante e após a instrumentação, removendo resíduos resultantes da preparação, neutralizando produtos tóxicos microbianos, mantendo o canal lubrificado e favorecendo a eliminação da matéria orgânica.⁽⁸⁾

Não existe ainda uma solução de irrigação que concentre em si todas as características ideais: efeito de arrastamento eficaz, eliminação de bactérias e fungos, baixa tensão superficial, hidrossolubilidade, biocompatibilidade e eficácia na presença de matéria orgânica (colagénio, polpa e biofilmes) e inorgânica (hidroxiapatite).

Estas soluções devem ajudar a prevenir a impactação apical de tecidos duros e moles assim como extrusão destes mesmos materiais para os tecidos periapicais através de um fluxo adequado.

Na atualidade, o hipoclorito de sódio continua a ser o composto mais utilizado na irrigação canalar.^(1,5,8) Trata-se de uma solução alcalina utilizada em concentrações que variam entre 0,5% e 6%, variando os protocolos de irrigação em volume consoante a concentração é maior ou menor. É usado, enquanto solução simples, com valores de pH 11 nas concentrações acima referidas ou tamponado com bicarbonato (pH 9) nas concentrações de 0,5% ou 1%, sendo capaz de oxidar e hidrolisar proteínas provocando hemólise celular por disrupção de diversas funções microbianas vitais.^(5, 6)

A sua utilização surgiu, com função antisséptica, em França na região de Javelle em 1789, tendo evoluído para “Dakin’s solution”⁽⁷⁾ sendo a sua utilização na irrigação canalar defendida por Coolidge, entre 1919 e 1929^(cit in 8), e posteriormente

confirmado o seu amplo espectro de acção antimicrobiano sobre microrganismos endodônticos e biofilmes, nomeadamente *Enterococcus*, *Actinomyces* e *Candida*.⁽³⁾

Sabemos que a capacidade de dissolução do hipoclorito de sódio apresenta uma relação direta com a sua concentração, volume, tempo de contacto mas também com a área de tecido exposto.⁽⁸⁾ Existem ainda algumas desvantagens como potencial citotóxico, caso exista extravasamento para os tecidos periapicais, incapacidade de remover a *smear layer* e sabor desagradável.^(5, 6)

As formas atualmente conhecidas de aumentar a eficácia de dissolução tecidular do NaOCl prendem-se com o aumento da temperatura da solução por um aquecimento prévio (que segundo Stojicic *et al* pode ser incrementada de 30% a 300% dependendo da temperatura e concentração), aumento do valor do pH alterando as concentrações para valores mais básicos, aumento do tempo de contacto recorrendo a protocolos de irrigação mais prolongados, adição de agente tensioactivo capaz de reduzir a tensão superficial aumentando o ângulo de contacto com as paredes dentinárias e introdução de agitação mecânica (activação sónica ou ultra-sónica) no meio com recurso a pontas específicas.^(3,8)

O objetivo deste trabalho de investigação laboratorial foi o de estudar, *in vitro*, o efeito de 5 soluções de hipoclorito de sódio com diferentes concentrações (1%; 2,5%; 3%, 6% e 6% com agente tensioactivo) na dissolução de tecido orgânico, avaliando a percentagem de dissolução, bem como os níveis de cloro residual e o pH após o período de incubação das amostras.

Materiais e métodos

Soluções testadas

Foram testadas soluções de hipoclorito de sódio, quanto ao seu poder de dissolução, nas concentrações de 1%; 2,5%; 3% (CanalProNaOCl- Coltene®; data de fabrico: 19/07/11 validade: 19/07/13) e 6% com adição de um agente tensioactivo (Canal Pro NaOCl Extra- Coltene®; data de fabrico: 19/07/11 validade: 19/07/13) com o intuito de avaliar o efeito da agitação, temperatura, concentração e adição de agentes de tensão superficial ao hipoclorito na dissolução de tecido orgânico. As soluções de 1% e 2,5% foram diluídas, em água destilada, a partir de uma solução de *stock* de 10% nos laboratórios dos CHUC enquanto as restantes, obtidas através da marca comercial, foram manipuladas consoante as indicações do fabricante. Todas as

soluções foram mantidas a uma temperatura de armazenamento de 4°C, sendo colocadas à temperatura ambiente antes de serem testadas.

As diferentes soluções de NaOCl foram testadas à temperatura ambiente (21°C) e a 37°C, com e sem agitação, sendo o efeito da agitação avaliado com recurso pipetagem manual (Thermo – Finnpipette 2-10ml) calibrada para um volume de 5,8 ml. A agitação foi introduzida nas amostras de NaOCl 1%, NaOCl 3% (CanalProNaOCl-Coltene®) e NaOCl com adição de um agente tensioactivo (Canal Pro NaOCl Extra-Coltene®) durante os primeiros 15 segundos de cada minuto, ao longo de 5 minutos. Sendo apenas medidos os valores de pH e de [Cl⁻] nas últimas duas. Foi usada água destilada nos grupos controlo.

Dissolução tecidual

Tecido muscular proveniente de bovino foi usado como amostra. Este material biológico foi adquirido com informações quanto à sua origem e data de abate (21 de Março 2012) e conservado num ambiente com 100% de humidade a uma temperatura entre 0° – 2°C durante o período de testes.

Antes de serem testadas as amostras foram cortadas, enquanto congeladas, em peças de 4 x 4 x 2 mm usando uma lâmina de bisturi número 11 (XINDA – Surgical Blades). Devido ao facto de a superfície de contacto ser um fator preponderante na dissolução tecidual, cada amostra foi cortada de forma a apresentar uma geometria e peso semelhantes. As amostras apresentavam um peso original de 70±5mg sem diferença significativa entre os grupos. A balança electrónica usada foi uma SartoriusAG- microbalance com câmara estanque, tendo sido calibrada antes de cada pesagem e o prato que recebia a amostra limpo com recurso a compressas embebidas em álcool de forma a evitar alterações na pesagem das peças. Foram conduzidas experiências, em 3 amostras paralelas por grupo, de forma individual, realizadas imediatamente após a preparação das amostras de tecido de modo a melhor controlar o tempo e o estado de hidratação/desidratação das mesmas.

Seguidamente, as amostras foram imersas em 10 mL da solução em estudo, durante 5 minutos, sendo estas pesadas numa balança electrónica (Sartorius AG- microbalance) no começo e 5 minutos após a imersão e registado o peso inicial e final, sendo calculada posteriormente, a percentagem de variação de peso entre os dois tempos. De forma a evitar que o peso registado durante estas medições sofresse um aumento devido ao facto de as amostras terem estado imersas num meio aquoso.

Nos testes realizados à temperatura de 37°C, as soluções teste de 10ml foram colocadas imediatamente antes numa estufa de aquecimento com dupla porta programa para a temperatura desejada. Foi usado um termómetro de mercúrio para melhor aferir a real temperatura das soluções.

No final obtiveram-se os grupos apresentados sob a forma de médias na Tabela I:

.Tabela I – Percentagem de perda de massa a diferentes temperaturas e com ou sem presença de agitação (S/A, sem agitação; C/A, com agitação; Surf, presença de surfactante; ■, sim; —, não)

Agitação	Temperatura			
	21°		37°	
	Sim	Não	Sim	Não
H ₂ O Controlo	■	■	■	■
NaOCl 1%	■	■	■	■
NaOCl 2,5%	—	■	—	■
NaOCl 3%	■	■	■	■
NaOCl 6% Surf	■	■	■	■

Valor do pH

Procedeu-se também à medição do valor do pH das diferentes soluções antes e imediatamente após os 5 minutos de contacto com a amostra de tecido utilizada no teste (ScanInst – pH/mV meter + eléctrodo de pH). O aparelho foi calibrado antes de cada série de utilizações sendo o eléctrodo de pH inserido nos recipientes logo após o período de incubação da amostra; obtendo-se, desta forma, o valor correspondente para aquela amostra.

Concentração do ião Cl⁻

A concentração do ião cloro ([Cl⁻]) foi determinada tanto nas soluções iniciais como nas soluções após imersão, após a aplicação dos diferentes protocolos.

Para tal, foi usado um sistema de cromatografia iónica (Millipore, com detector de condutividade modelo Waters 431). Procedeu-se inicialmente à elaboração de uma curva de calibração usando padrões de Cl⁻ com concentrações definidas (5, 30, 60, 80

e 100ppm) e foi determinada pelo *software* do aparelho a área dos picos correspondentes ao íon Cl^- para cada concentração. Foi então traçada a reta de calibração representando a concentração de íon cloro em função da área do respetivo pico.

As concentrações de cloro nas soluções teste foram também determinadas no mesmo sistema. Para tal foram diluídas em água ultrapura (100 μl solução em 250ml volume total) em balões de diluição. Da solução diluída foram retirados 100 μl com seringa de vidro que foram depois injectados no sistema de cromatografia. Novamente, foram determinadas as áreas dos picos correspondentes ao íon Cl^- , e recorrendo à curva de calibração foi determinada a concentração de cloro correspondente.

Análise de dados

O impacto do tipo de solução na variação de massa das amostras foi analisado através de testes não paramétricos Kruskal-Wallis, devido ao n limitado ($n=3$). Testes de Mann-Whitney U foram utilizados para testar diferenças entre pares de soluções, *post-hoc*.

Para se testar o impacto dos factores fixos temperatura (ambiente ou 37°C) e agitação (com ou sem), assim como o impacto das covariáveis variação de pH, variação de concentração de iões Cloro, e concentração da solução (assumindo 0% para água e 6% para NaOCl 6% + surfactante) na variável dependente variação de massa, o modelo linear geral foi utilizado.

Os dados foram analisados através do programa SPSS 19.0 (SPSS Inc, Chicago, IL). Significância estatística foi considerada quando $p < 0.05$.

Resultados

A percentagem de massa perdida, após 5 minutos nas diferentes concentrações de hipoclorito de sódio a temperaturas diferentes e sem/com indução de agitação no meio, estão representadas na Tabela I.

.Tabela II– Perda de massa (%_ desvio padrão) após 5 minutos de imersão nas 4 concentrações de hipoclorito de sódio a diferentes temperaturas com ou sem agitação no meio.

	Sem Agitação		Com Agitação	
	T ambiente	37°C	T ambiente	37°C
Água	-3,8%±4,55%	2,8%±4,51%	-0,9%±2,80%	14,3%±2,94%
NaOCl 1%	-9,2%±5,19%	-4,8%±2,45%	13,9%±3,02%	30,5%±7,58%
NaOCl 2,5%	-12,3%±3,21%	3,5%±8,84%		
NaOCl 3%	1,5%±11,66%	8,5%±1,20%	34,2%±3,63%	48,3%±0,95%
NaOCl 6% + surfactante	21,1%±0,96%	39,4%±2,50%	48,8%±3,69%	62,9%±6,88%

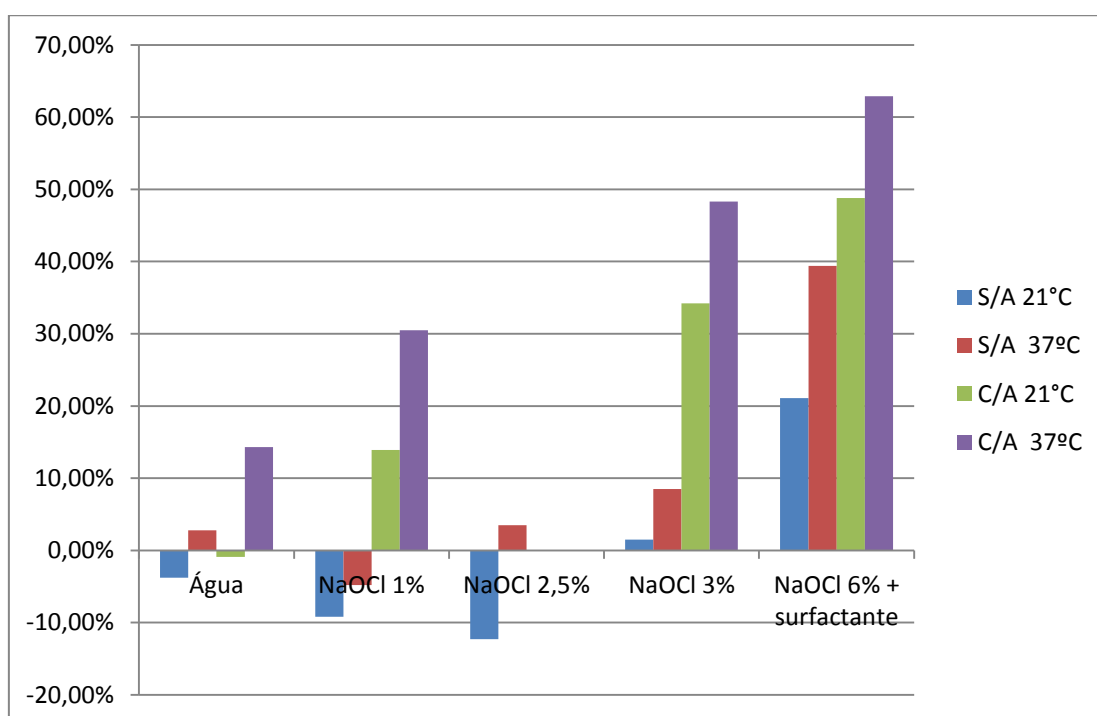


Figura 1– Gráfico com valores médios da percentagem de massa perdida a diferentes concentrações e temperaturas, com adição ou não de agitação no meio. (S/A, sem agitação; C/A, com agitação)

Análise do efeito da solução na variação de massa

Observou-se uma perda de massa, em todos os grupos-teste, após 5 minutos de exposição ao hipoclorito nas concentrações de 3% - CanalProNaOCl- Coltene® e 6% - Canal Pro NaOCl Extra- Coltene®.

Houve ganho de peso das amostras de imersas na solução de NaOCl 1% para os dois grupos teste sem agitação (21°C e 37°C). Este fenómeno verificou-se também para as amostras testadas nas soluções de hipoclorito de sódio a 2,5% para o grupo a temperatura ambiente sem agitação, sendo que foi aquela a registar maior aumento: - 12,3%. (Tabela I)

Verificou-se um aumento da perda de peso diretamente proporcional à concentração, com significância estatística, em todos os grupos-teste com excepção do grupo onde as amostras foram imersas nas condições de temperatura ambiente e sem agitação. ($p=0,05$).

O aquecimento das soluções aumentou, de forma estatisticamente significativa ($p=0,000$), a dissolução tecidular; o valor deste aumento quando comparado com os dois grupos à temperatura ambiente variou desde 52,7% a 186,7%, dependendo da concentração e da presença ou ausência de agitação no meio. (Tabela II)

A presença de agitação provocou também um aumento de peso perdido quando comparado com as amostras incubadas num meio sem a presença desta, a diferença é estatisticamente significativa ($p=0,000$). A percentagem de aumento vai 23,6% a 568,2%, aumentando com as concentrações e temperatura das soluções. (Tabela II)

Verificou-se, para as soluções de NaOCl, uma perda de peso superior quando realizada agitação em detrimento do aumento da temperatura da solução. Comparando os valores do primeiro grupo teste, no qual a solução se encontrava a temperatura ambiente e sem agitação, com os resultados obtidos para os grupos realizados à mesma temperatura mas com agitação e o grupo a 37°C sem agitação, verificamos uma gradação em todas as soluções de hipoclorito de sódio, sendo sempre maior a percentagem de aumento para o grupo com presença de agitação. A percentagem de dissolução máxima à temperatura ambiente sem agitação/ 37°C sem agitação variou 18,3 pontos percentuais enquanto a variação máxima obtida para temperatura ambiente sem agitação/ temperatura ambiente com agitação foi de 32,7 valores. (Tabela II)

A solução de maior concentração foi sempre aquela que dissolveu mais tecido embora não se possa criar uma relação linear entre aumento de concentração e o aumento de percentagem de massa perdida. (Tabela II)

A perda de peso foi mais alta nas amostras submetidas, de forma conjunta, a agitação e temperatura de 37°C do que aquelas submetidas aos mesmos parâmetros de forma separada. (Tabela II)

No entanto, esta diferença não é estatisticamente significativa. ($p=0,797$)

Análise da variação de pH, na variação de massa

Os resultados revelaram que as covariáveis variação de pH e variação de iões Cloro não têm impacto no modelo ($p>0.05$), enquanto a covariável concentração de solução de NaOCl tem um impacto significativo.

.Tabela III–Variação de valores de pH (%_ desvio padrão) após 5 minutos de imersão nas 4 concentrações de hipoclorito de sódio a diferentes temperaturas e condições de agitação no meio.

	Sem Agitação		Com Agitação	
	T ambiente	37°C	T ambiente	37°C
NaOCl 1%	3,1%±1,38%	6,5%±0,58%		
NaOCl 2,5%	1,2%±1,83%	2,8%±1,00%		
NaOCl 3%	8,2%±0,56%	12,1%±2,34%	19,1%±0,60%	21,2%±0,33%
NaOCl 6% + surfactante	0,3%±0,24%	0,8%±0,24%	1,0%±0,05%	1,6%±0,16%

A solução que apresentou menores variações em termos de valor de pH inicial e final foi a NaOCl 6% com adição de surfactante (registando o valor mínimo de 0,3%) enquanto aquela que apresentou resultados mais díspares foi a de NaOCl 3%, atingindo variações máximas de 21,2%. (Tabela III) (Figuras 2, 3, 4, 5)

Individualmente dentro de cada concentração, verificou-se uma relação de proporcionalidade direta entre a percentagem de peso perdido, obtida na Tabela II, com uma maior variação em termos valor de pH: ou seja, maior percentagem de massa perdida, maior variação de pH. (Tabela III) (Figuras 2, 3, 4, 5)

Todas as soluções finais obtidas são alcalinas e houve sempre uma diminuição do valor do pH com a maior variação a ser de -21% para a solução de NaOCl 3% , a 37°C com agitação e a menor(-0,24%) para a solução NaOCl 6% à temperatura ambiente e sem agitação.

Gráficos demonstrativos de médias para valores de variação do pH

Temperatura ambiente, sem agitação

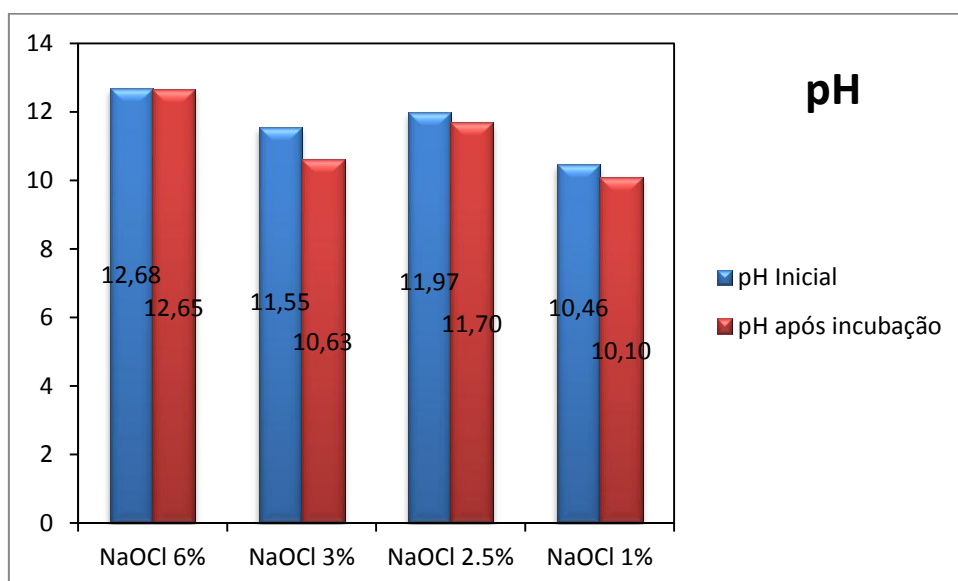


Figura 2 – Gráfico com valores médios de variação de pH das soluções à temperatura ambiente, sem agitação.

Temperatura 37°C, sem agitação

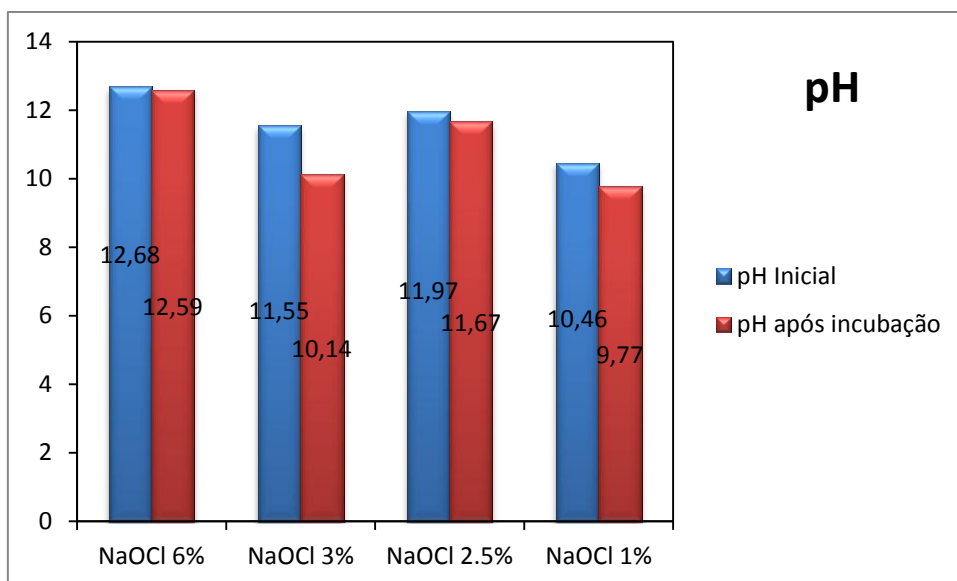


Figura 3– Gráfico com valores médios de variação de pH das soluções à temperatura de 37°C, sem agitação.

Temperatura ambiente, com agitação

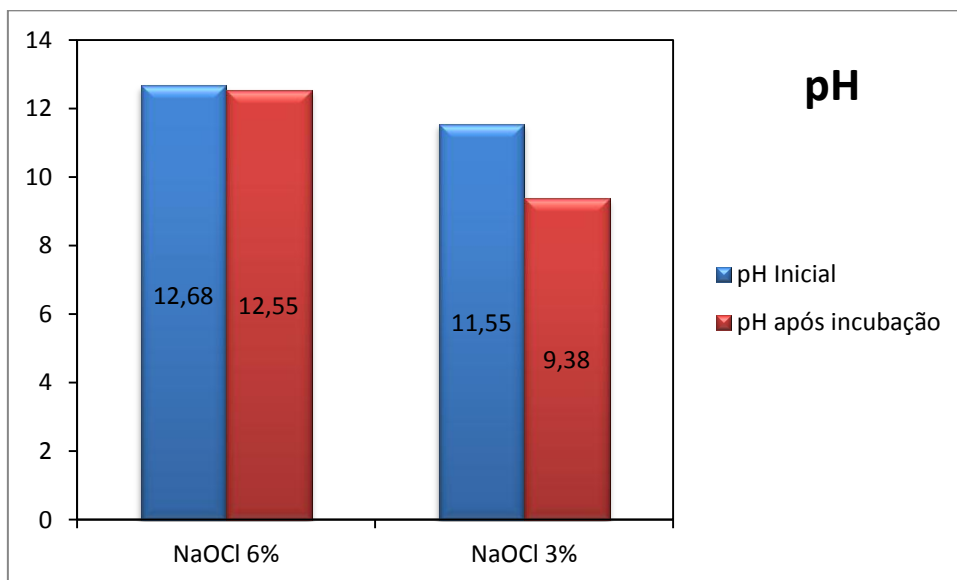


Figura 4– Gráfico com valores médios de variação de pH das soluções à temperatura ambiente, com agitação.

Temperatura 37°C, com agitação

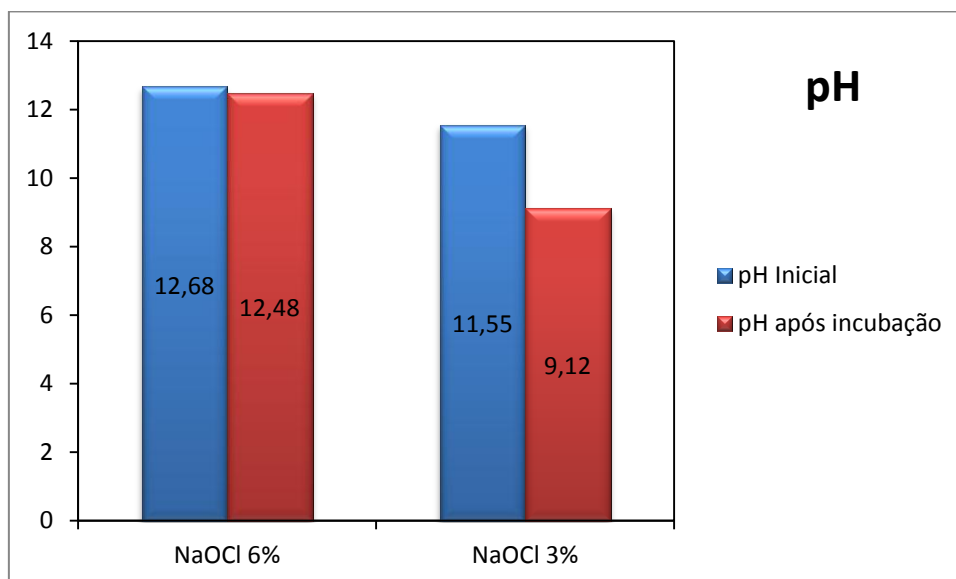


Figura 5– Gráfico com valores médios de variação de pH das soluções à temperatura de 37°C, com agitação.

Análise da variação da concentração de íons Cloro, na variação de massa

Não foi encontrada uma significância estatística na relação entre as concentrações das soluções usadas e a variação da concentração do íon cloreto.

.Tabela IV– Variação de valores de $[Cl^-]$ (%_ desvio padrão)após 5 minutos de imersão nas 4 soluções de hipoclorito de sódio a diferentes temperaturas e condições de agitação no meio.

	Sem Agitação		Com Agitação	
	T ambiente	37°C	T ambiente	37°C
NaOCl 1%	19,6%±6,75%	27,0%±2,76%		
NaOCl 2,5%	5,9%±3,06%	24,2%±2,58%		
NaOCl 3%	28,9%±2,36%	44,8%±2,97%	32,0%±0,43%	33,7%±3,58%
NaOCl 6% + surfactante	1,8%±3,62%	14,2,8%±3,15%	11,0%±1,24%	14,7%±2,03%

A solução com menor variação de concentração de íons Cl^- foi o NaOCl 6% com adição de surfactante (com um mínimo de 1,8% e um máximo de 14,7%) e a

solução com maiores variações registadas continua a ser a de NaOCl 3%, com valor máximo de 44,8%, sendo este valor 1,5 vezes superior ao mais baixo registado para esta solução (Tabela IV) (Figura 6, 7, 8, 9).

Para todas as medições, os valores de concentração de ião cloro final foram inferiores aos existentes no início do teste com a maior variação a ser de -44,9% para a solução NaOCl 3% a 37°C sem agitação e a menor de -2,5% para a solução NaOCl 6% à temperatura ambiente e sem agitação.

Gráficos demonstrativos de médias para valores de variação da concentração de iões Cloreto

Temperatura ambiente, sem agitação

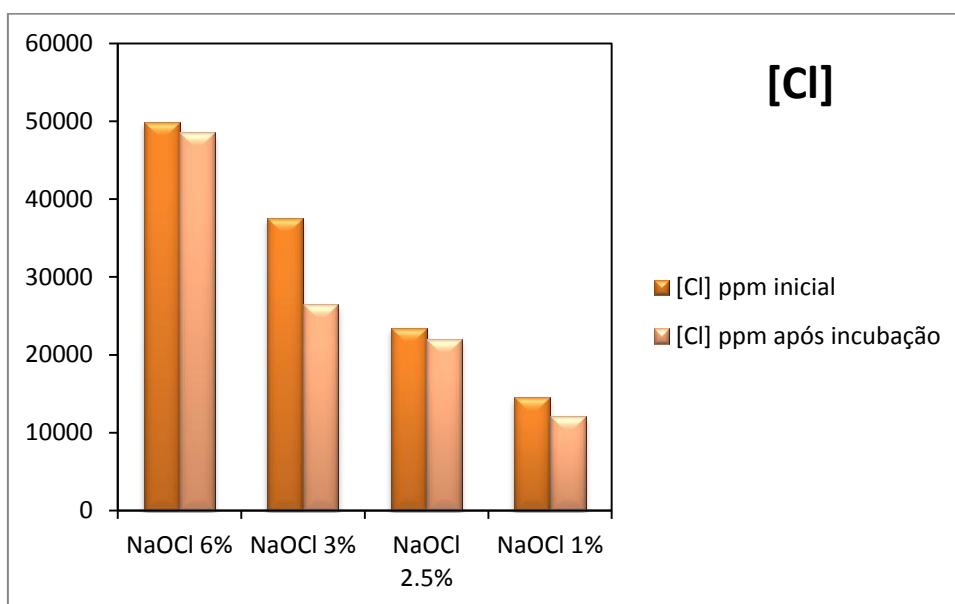


Figura 6– Gráfico com valores médios de variação de pH (ppm) à temperatura ambiente, sem agitação.

Temperatura 37°C, sem agitação

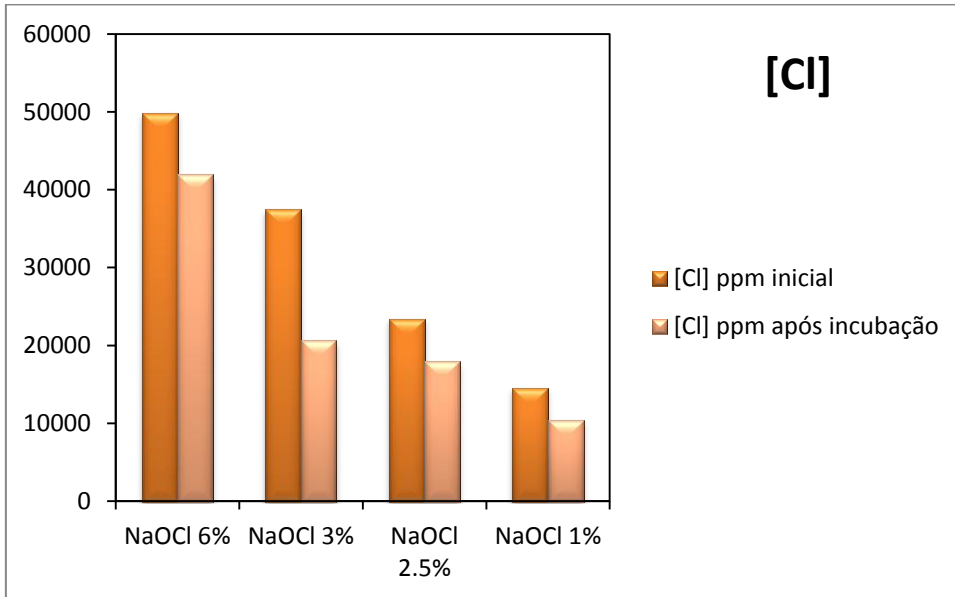


Figura 7– Gráfico com valores médios de variação de pH (ppm) à temperatura de 37°C, sem agitação.

Temperatura ambiente, com agitação

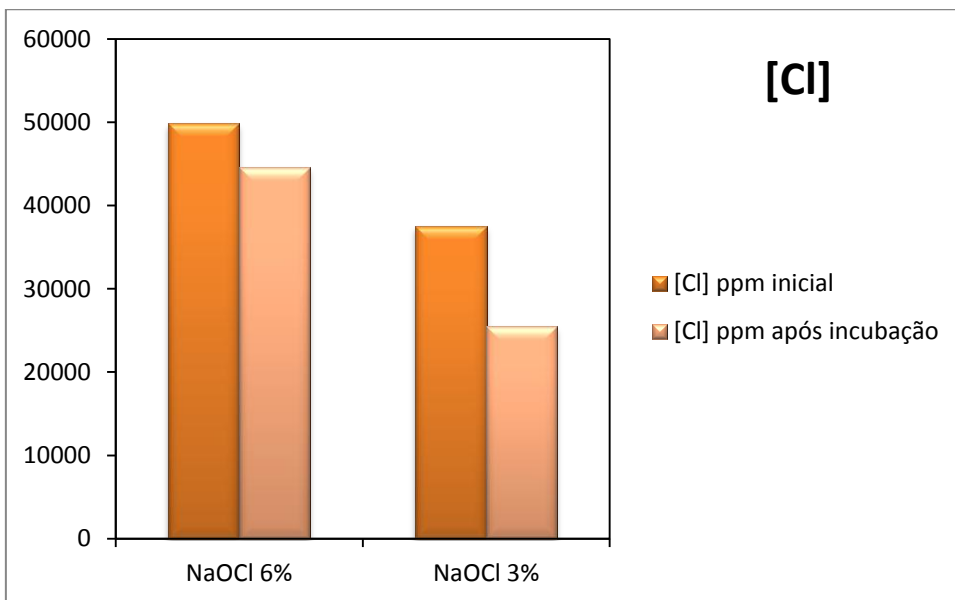


Figura 8– Gráfico com valores médios de variação de pH (ppm) à temperatura ambiente, com agitação.

Temperatura 37°C, com agitação

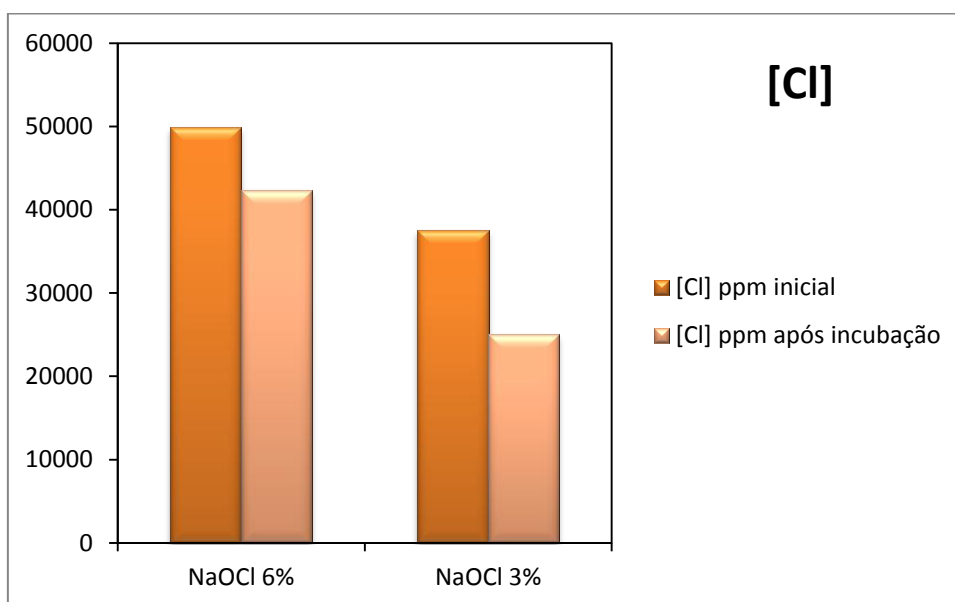


Figura 9– Gráfico com valores médios de variação de pH (ppm) à temperatura de 37°C, com agitação.

Discussão

Existe um grande número de estudos realizados com o objectivo de testar a capacidade dissolvente do hipoclorito de sódio. Sabe-se hoje que esta se encontra relacionada com a concentração; volume; tempo; temperatura; pH; agitação e do tipo, quantidade e qualidade da superfície de contacto.^(2,10,12) No entanto, devido ao facto de existirem grandes variações entre estes factores faz com que seja difícil fazer comparações e determinar a importância relativa de cada um deles.⁽¹⁴⁾

Este estudo avaliou o efeito da concentração, da presença de um agente surfactante, temperatura, e da agitação em soluções de hipoclorito de sódio na dissolução de tecido orgânico, num meio de acção controlado debruçando-se ainda sobre o pH e a quantidade de ião Cl⁻ livre presente no fim dos testes. Vários têm sido os tecidos orgânicos usados neste tipo de estudos para simular polpa dentária⁽¹³⁾: tecido muscular porcino⁽⁹⁾, fígado de roedor⁽¹²⁾, mucosa palatina porcina⁽¹⁵⁾, tecido muscular bovino⁽¹⁰⁾, polpa dentária de origem bovina⁽¹¹⁾, polpa dentária de origem porcina⁽¹³⁾. A razão pela qual se opta pela escolha destes tipos de tecidos recai no facto de serem de mais fácil acesso e padronização no que diz respeito à área de superfície exposta, à sua homogeneidade e controlo da quantidade de massa presente.⁽¹⁰⁾

O tecido biológico escolhido poderia ter-se aproximado mais do real (polpa dentária humana) caso se tivesse seguido o protocolo empregue por *Spanó et al* onde foi usada polpa dentária retirada de incisivos centrais de bovino extraídos recentemente.⁽⁴⁾ Através deste procedimento obteríamos uma superfície de contacto menos uniforme e um controlo do peso menos padronizado para cada uma das amostras mas conseguiríamos uma experiência de valor mais aproximado da realidade clínica. Não foi, contudo, esse o objectivo deste estudo onde houve uma preocupação maior em testar a capacidade dissolvente das diferentes soluções.

No estudo atual, foi usado tecido muscular bovino com peso padronizado (70 ± 5 mg) preparado num formato cúbico (4 x 4 x 2 mm) de forma a conferir igual área de superfície às amostras, estes parâmetros foram definidos anteriormente por outros autores.⁽²⁾ O controlo do peso perdido foi determinado após um período de tempo igual para cada teste (5 minutos), sendo os espécimes pesados no início e no fim da incubação. Este método foi adoptado em virtude de, desta forma, as bolhas formadas durante a dissolução tecidular (reação de saponificação) não interferirem na visualização da peça permitindo a percepção de quando esta estaria completamente dissolvida.⁽²⁾ Devido ao tempo escolhido ser relativamente curto optou-se por realizar simultaneamente o controlo dos valores de pH e de concentração de iões cloreto livre nas soluções (antes e após o contacto com as amostras) dando assim uma ideia quanto à intensidade da reação.

Poderíamos, no entanto, ter tentado determinar, para cada solução, nas diferentes condições testadas de temperatura e agitação, o tempo necessário para que a dissolução completa ocorresse⁽⁴⁾, registando o valor da variação do pH (verificando até que ponto a solução final acidificou) e contabilizando a concentração de iões cloreto presentes, procurando qualificar a capacidade reactiva da solução ainda existente; como alternativa, poder-se-ia ter avaliado a cinética da reação de dissolução, calculando a percentagem de peso perdido das amostras ao longo de períodos de tempo mais extensos (10 e 15 minutos) como realizado por outros autores⁽³⁾, evitando, desta forma, o problema causado pelas bolhas presentes no recipiente; *Zehnder et al* verificaram que para uma amostra de aproximadamente 80 miligramas, imersa numa solução de hipoclorito de sódio a 2,5%, o tempo de dissolução total foi de 90 minutos enquanto que para uma solução de 0,5% ainda se verificava a presença de 40% da amostra inicial ao fim deste período.

A temperatura de 37°C foi escolhida como temperatura mais elevada para estudo em virtude de ser um valor que se aproxima da temperatura encontrada no espaço canalar (32°C); segundo os resultados obtidos por De Figueiredo *et al* a temperatura máxima até á qual se verificam aumentos na capacidade de dissolução tecidual por parte do hipoclorito de sódio é de 60°C.⁽¹⁷⁾

Dissolução tecidual

Neste estudo, constatou-se uma relação direta entre o aumento da concentração de hipoclorito de sódio e o poder de dissolução tecidual das soluções, para todas as condições de temperatura e agitação testadas, excepto no caso da temperatura ambiente sem agitação, na qual a solução a 2,5% apresentou resultados inferiores á de 1%. Estes dados estão em concordância com outros autores, que constataam que quanto maior a concentração de hipoclorito de sódio mais elevada e rápida é a dissolução tecidual.^(4,2,10,13,16)

Sabe-se que o hipoclorito de sódio (NaOCl) encontra-se, em soluções aquosas, dissociado em hidróxido de sódio e ácido hipocloroso pela seguinte reacção química: $\text{NaOCl} + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{NaOH} + \text{HOCl}$. Quando o NaOCl entra em contacto com material orgânico, ocorrem diversas reacções químicas; nomeadamente reacção de saponificação quando ácidos gordos reagem com hidróxido de sódio originando um sal orgânico e glicerol, reacção de neutralização quando aminoácidos reagem com hidróxido de sódio e ainda a reacção dos aminoácidos com o ácido hipocloroso, resultando em cloramina e água. Estas reacções ocorrem de forma simultânea e sinérgica, conduzindo à dissolução orgânica.⁽⁴⁾

Nos grupos controlo, as peças de tecido muscular bovino, imersas em água destilada, apresentaram um aumento de peso para os dois ensaios realizados à temperatura ambiente (21°C), enquanto nos grupos com temperatura de 37°C, os pesos das amostras diminuíram. Os resultados obtidos a temperatura ambiente podem ser explicados pelo facto das amostras, quando colocadas no recipiente que contém a solução em causa, ainda se encontrarem parcialmente congeladas o que as torna desidratadas e com redução do volume original. Ao entrarem em contacto com água no estado líquido, o espaço ocupado pelos cristais de gelo vai ser substituído por água no estado líquido, hidratando a peça e aumentando assim o seu peso. Estes resultados estão de acordo com os obtidos por outros autores.⁽²⁾

A percentagem de perda de peso verificada no grupo controlo a 37°C com pipetagem (14,3%) pode ser explicada pela dissociação de pequenas porções da peça principal devido à agitação, responsável por um aumento da energia cinética no meio; este facto aliado a uma elevação da temperatura conduz à expansão da amostra, o que facilita a quebra de ligações e conseqüente perda de pequenos fragmentos de tecido muscular bovino. A reduzida dimensão dos mesmos não permite a sua identificação e recolha para pesagem o que justifica o valor observado.

As amostras de tecido imersas na solução de hipoclorito de sódio a 1% aumentaram de peso, após os 5 minutos do período de teste, em condições onde não existia agitação tanto à temperatura de 21°C como de 37°C (embora neste último o aumento de peso seja menos notório). Este acontecimento pode ser explicado pela hidratação tecidular que ocorre após um período inicial de dissolução da amostra (por quebra das ligações de colagénio). Stojicic *et al*⁽²⁾, quando testou soluções de hipoclorito de sódio a 1% também detectou aumento de peso durante os primeiros 5 minutos tanto a temperatura ambiente como a 37°C; o valor de aumento máximo encontrado no estudo actual foi de 9,2%, um valor que representa um ganho aproximado de peso 1,67 vezes superior ao encontrado pelo autor para as mesmas condições (5,5%).

No entanto, para os testes realizados com presença de agitação no meio, fica denotado um claro aumento de capacidade de dissolução tecidular do NaOCl a 1%. Com valores máximos atingidos para o grupo que congrega agitação e aumento da temperatura atingindo um valor de 39,7 pontos percentuais superior àquele realizado a temperatura ambiente sem agitação; demonstra-se assim que a junção destes dois factores resulta, *in vitro*, num aumento exponencial da capacidade de dissolução tecidular.

Este estudo mostrou que o aquecimento da solução de hipoclorito de sódio aumenta o seu efeito, seguindo os resultados obtidos por outros autores.^(2,17)

A presença de agitação é clinicamente importante pois sabe-se que o consumo das moléculas de NaOCl pelas reacções de saponificação e neutralização (das quais resultam iões cloreto e água), diminui a atividade local conferindo à agitação um papel renovador, permitindo a chegada de novas moléculas prontas a reagir, e removendo o tecido dissolvido uma vez que existem estudos que constataam a perda de eficácia do hipoclorito de sódio ao fim de 2 minutos⁽¹²⁾; os autores do estudo anterior concluíram que a temperatura, a agitação e a área de contacto apresentam uma maior importância do que a própria concentração das soluções usadas na dissolução

tecidual. Optámos, neste estudo, pela pipetagem manual uma vez que é de fácil realização e reproduz a utilização clínica das soluções de irrigação uma vez que entre cada irrigação são utilizados instrumentos (manuais ou mecânicos) que provocam agitação na solução contida no interior dos canais radiculares. Todas as soluções de hipoclorito de sódio testadas, apresentaram valores de dissolução tecidual superiores para a agitação quando comparados com os valores de percentagem de peso perdido obtidos para o aumento de temperatura.

Outros métodos de agitação empregues na prática clínica diária como agitação sónica e ultra-sónica foram comparados, *in vitro*, com a pipetagem manual, não tendo sido detetadas diferenças estatisticamente significativas. O volume de 5,8ml foi escolhido para a pipetagem manual devido ao facto de ter sido usado (associado aos 10ml de solução-teste) por outros autores⁽²⁾; no entanto verificou-se que o volume aspirado fazia com que a amostra presente se interpusse, por vezes, na entrada da pipeta sendo, desta forma, submetida a pressões superiores o que poderia alterar de certa forma a padronização pretendida parecendo-nos mais adequado no futuro a utilização de um volume menor, ou então o uso de uma rede de nylon, procedimento preconizado por Spanó *et al.* Este método não influenciaria a área/superfície de contacto mantendo, ao mesmo tempo, a amostra protegida.⁽⁴⁾

Segundo alguns autores, o facto de a agitação ser introduzida de forma programada para certos períodos de tempo durante a incubação ou ser aplicada de forma contínua parece causar diferenças significativas nos resultados finais⁽²⁾ pelo que esta teoria poderia ter sido testada neste estudo introduzindo agitação por pipetagem contínua durante os 5 minutos de teste.

Valores de pH

Os valores de pH iniciais foram determinados para cada uma das 4 soluções com diferentes concentrações de hipoclorito de sódio (1%; 2,5%; 3%; 6% com surfactante) os quais apresentavam todos valores altamente alcalinos parecendo seguir uma linha decrescente de valor com excepção da solução NaOCl 2,5% que apresenta um valor superior à de NaOCl 3%. Este aumento de variação pode ser eventualmente explicado pela presença de hidróxido de sódio [Na(OH)] na solução de 3% (CanalProNaOCl- Coltene®) o que pode alterar o equilíbrio da reacção de dissociação ácido-base do hipoclorito de sódio, no sentido do favorecimento da formação de ácido hipocloroso com conseqüente diminuição do valor do pH. Após os testes, todas as soluções se mantiveram fortemente alcalinas mas com diminuição do valor do pH em todas elas, estando de acordo com os resultados apresentados por

outros autores.^(4,13) Este fenómeno deve-se às reacções de saponificação e neutralização. A menor redução de pH, nas soluções mais concentradas, é atribuída à presença de um número superior de iões hidroxilo (OH^-).

Pode constatar-se também nos parâmetros do valor de pH um maior efeito do factor agitação relativamente à temperatura na dissolução da amostra de tecido.

Valores de concentração do ião cloreto $[\text{Cl}^-]$

À semelhança do pH, foram primeiramente determinados os valores intrínsecos de cada uma das soluções que se pretendia testar, servindo estes para posterior comparação com os valores de concentração de iões cloreto presentes nas diferentes soluções após os 5 minutos de período de ensaio. Verificou-se uma percentagem inicial de concentração de iões cloreto maior para as soluções com concentração mais elevada.

Verificou-se um decréscimo na percentagem de consumo de cloro à medida que as concentrações das soluções aumentavam: NaOCl 1%, NaOCl 2,5% e NaOCl 6% com adição de agente de tensão superficial, seguindo resultados obtidos por outros autores.⁽⁴⁾ Estes resultados indicam a existência de uma maior interacção do NaOCl com a matéria orgânica, consumindo mais iões cloreto, o que está de acordo com os valores de pH obtidos para estas soluções uma vez que a diminuição da concentração dos iões Cl^- irá baixar os valores de pH encontrados.

Zehnder *et al* referem que a capacidade de dissolução tecidular do hipoclorito de sódio se deve à quantidade de iões cloreto disponíveis em solução e não está dependente de factores como a osmolaridade ou o pH.⁽³⁾ Os dados observados no presente estudo corroboram esta tendência geral.

Este estudo deveria ter contado com a solução de NaOCl a 6% sem adição de agente de tensão superficial da mesma linha comercial da utilizada nas concentrações de 3% e 6% com adição de surfactante. Esta inclusão permitir-nos-ia retirar conclusões quanto ao real valor do agente de tensão superficial uma vez que seriam comparadas iguais concentrações em iguais condições onde apenas iria haver variação neste ponto específico. Iríamos poder aferir também se o facto de a solução NaOCl 6% com agente de tensão superficial apresentar valores tão diminutos de variação de pH e de concentração de iões cloro (desviando-se da linha lógica de que quanto maior a percentagem de tecido dissolvido maior a variação de pH e maior a dissociação dos iões Cloro a partir da molécula de NaOCl) se fica a dever à presença do detergente.

Conclusão

As conclusões válidas que podemos retirar deste estudo experimental *in vitro* relacionam-se com o facto de se verificar um aumento na capacidade de dissolução tecidual, por parte das soluções de hipoclorito, com o aumento da sua concentração. Este aumento de capacidade dissolvente aumenta também com o aquecimento prévio da solução usada assim como com a introdução de agitação. O aumento da concentração, da temperatura e a presença de agitação são variáveis com significância estatística no aumento da capacidade de dissolução do NaOCl.

Pôde verificar-se um efeito superior do factor agitação em relação ao aumento de temperatura para todas as soluções testadas. Os valores de maior percentagem de peso perdido obtiveram-se quando aumento de temperatura e a presença de agitação foram conjugados.

Para os valores de pH, verificou-se uma redução dos mesmos, após os 5 minutos de teste, para todas as soluções de hipoclorito de sódio testadas, permanecendo estas fortemente alcalinas no final do período de incubação das amostras.

Os valores da concentração do ião cloreto diminuíram sempre após os períodos de teste, permanecendo sempre uma grande percentagem de iões por reagir em todas as soluções.

Agradecimentos

Ao meu Orientador, Professor João Miguel Marques dos Santos pela oportunidade concedida, ajuda na realização deste projecto e ensinamentos transmitidos ao longo do meu percurso académico.

À minha Co-orientadora, Professora Paula Ferreira pela disponibilidade concedida, traduzida em horas de auxílio passadas no laboratório.

Ao Prof. Doutor Miguel Patrício e Prof. Doutor João Pereira, membros do Laboratório de Bioestatística e Informática Médica da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, responsáveis pela pronta análise estatística de todos os resultados obtidos.

À Rita, ao Samuel, ao Tiago, ao Diogo e à Sílvia pela ajuda inestimável nos processos mais tecnológicos e interpretativos deste trabalho.

Bibliografia

1 - Haapasalo M, Shen Y, Qian W, Gao Y. Irrigation in Endodontics. *DentClin N Am*2010; 54: 291–312.

2 – Stojicic S, Zivkovic S, Qian W, Zhang H, Haapasalo M. Tissue Dissolution by Sodium Hypochlorite: Effect of Concentration, Temperature, Agitation, and Surfactant. *Journal of Endodontics* 2010Sept; 36: 1558-1562.

3 – Zehnder M, Kosicki D, Luder H, Sener B, Waltimo T. Tissue-dissolving capacity and antibacterial effect of buffered and unbuffered hypochlorite solutions. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral RadiolEndod* 2002; 94: 756-62.

4 – Spanó J, Barbin E, Santos T, Guimarães L, Pécora J. Solvent Action of Sodium Hypochlorite on Bovine Pulp and Physico-Chemical Properties of Resulting Liquid. *Braz Dent J* 2001; 12 (3): 154-157.

5 - Hulsmann M, Rodig T, Nordmeyer S. Complications during root canal irrigation. *EndodonticTopics* 2009; 16: 27–63.

6 – Fidalgo T, Barcelos R, Petópolis D, Azevedo B, Primo L, Silva Filho F. Citotoxicity of different amounts of sodium hypochlorite on human cultured osteoblasts. *RGO Porto Alegre* 09 2009; 57: 317-321.

7 – Basrani E, Cañete MT, Blank AJ. *Endodoncia Integrada*. 1st ed. Colombia: Actualidades Médico Odontológicas Latinoamérica, Ca; 1999.

8 – Hargreaves MK, Cohen S, Berman LH. *Pathways of the pulp*. 10th ed. St Louis: Elsevier Inc, Mosby; 2011.

9 - Hasselgren G, Olsson B, Cvek M. Effects of calcium hydroxide and sodium hypochlorite on the dissolution of necrotic porcine muscle tissue. *J Endod* 1988;14:125–7.

- 10 - Turkun M, Cengiz T. The effects of sodium hypochlorite and calcium hydroxide on Tissue dissolution and root canal cleanliness. *IntEndod J* 1997;30:335–42.
- 11 - Okino LA, Siqueira EL, Santos M, et al. Dissolution of pulp tissue by aqueous solution of chlorhexidine digluconate and chlorhexidine digluconate gel. *IntEndod J* 2004;37:38–41.
- 12 - Moorer WR, Wesselink PR. Factors promoting the tissue dissolving capability of sodium hypochlorite. *IntEndod J* 1982;15:187–96.
- 13 – Clarkson R, Moule A, Podlich H, Kellaway R, Macfarlane R, Lewis D, Rowell J. Dissolution of porcine incisor pulps in sodium hypochlorite solutions of varying compositions and concentrations. *Australian Dental Journal* 2006;51:(3):245-251.
- 14 – Beltz E, Torabinejad M, Pouresmail M. Quantitative analysis of the solubilizing action of MTAD, sodium hypochlorite, and EDTA on bovine pulp and dentin. *J Endod* 2003;29:334–7.
- 15 - Naenni N, Thoma K, Zehnder M. Soft tissue dissolution capacity of currently used and potential endodontic irrigants. *J Endod* 2004;30:785–7.
- 16 - Reis Só M, Vier-Pelisser F, Darcie M, Smaniotto D, Montagner F, Kuga M. Pulp tissue dissolution when the use of sodium hypochlorite and EDTA alone or associated. *RevOdontoCienc* 2011;26(2):156-160.
- 17 - Rossi-Fedele G, De Figueiredo J. Use of a bottle warmer to increase 4% sodium hypochlorite tissue dissolution ability on bovine pulp. *AustEndod J* 2008; 34: 39–42.

Anexos

Participação laboratorial do aluno

O aluno, Pedro Daniel da Silva Ambrósio, foi responsável pela elaboração do protocolo laboratorial final tendo, para o efeito, realizado ensaios experimentais iniciais no corte, dissolução e pesagem das amostras.

Foi da responsabilidade do aluno a compra e certificação do tecido biológico usado assim como a realização de todos os testes nos quais o tecido foi utilizado: pesagem inicial e final, a imersão das amostras, a indução de agitação no meio, o controlo da temperatura e o registo dos resultados obtidos.

O aluno auxiliou e acompanhou tanto a determinação do valor de pH inicial e final, das soluções testadas, como a obtenção das concentrações de ião cloreto presentes nas soluções antes e após os ensaios.