GABRIELLA GUIMARÃES DE OLIVEIRA

**AVALIAÇÃO DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA EM TECIDO
CONJUNTIVO DE RATOS FRENTE AO USO DE DIFERENTES
SOLUÇÕES IRRIGADORAS**

São Paulo

2008

Gabriella Guimarães de Oliveira

**Avaliação da resposta inflamatória em tecido conjuntivo de ratos
frente ao uso de diferentes soluções irrigadoras**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, para obter o título de Mestre pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas.

Área de concentração: Endodontia

Orientador: Prof. Dr. Fábio Daumas Nunes

São Paulo

2008

FOLHA DE APROVAÇÃO

Oliveira GG. Avaliação da resposta inflamatória em tecido conjuntivo de ratos frente ao uso de diferentes soluções irrigadoras [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2008.

São Paulo, / /2008.

Banca Examinadora

1)Prof(a). Dr(a)._____

Titulação:_____

Julgamento:_____Assinatura:_____

2)Prof(a). Dr(a)._____

Titulação:_____

Julgamento:_____Assinatura:_____

3)Prof(a). Dr(a)._____

Titulação:_____

Julgamento:_____Assinatura:_____

DEDICATÓRIA

**Na vida o amor é tudo,
Principalmente daqueles que dedicaram
Os seus melhores momentos na criação de seus filhos.**

Aos meus pais, Marta e Renato, por todos os ensinamentos,
pela dedicação e amor dedicados sempre.
A felicidade e conquista deste momento,
Não seria nada sem o incentivo de vocês.

Ao Fábio, sempre companheiro, paciente
Apoiando todos os momentos desta conquista.

Renato, meu irmão, muito antes de irmãos, somos amigos.

Caro Evandro, obrigada pelo projeto, pelos ensinamentos,
incentivo e principalmente pela amizade.

Ao Prof. Fábio, obrigada pela paciência, ensinamentos, pela sua capacidade
como mestre em me direcionar
nos inúmeros momentos em que eu perdi o rumo.
Muito obrigada por tudo!

Aos colegas do curso de Pós-Graduação em Endodontia, pela amizade e
companheirismo.

A Deus, que me permitiu chegar até aqui.

AGRADECIMENTOS

À Prof(a). Silvia Lacchini pela disponibilização do Laboratório de anatomia do INSTITUTO DE CIÊNCIAS ODONTOLÓGICAS III.

Aos professores da disciplina de Endodontia da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo – SP, pelo apoio, dedicação e incentivo durante o período de desenvolvimento dos créditos.

Aos professores da APCD de Santo André, Marcelo dos Santos, Patrícia Ferrari, Evandro Siqueira, Luigina dos Santos, pelo apoio e incentivo.

A CAPES pela bolsa de Mestrado.

Oliveira GG. Avaliação da resposta inflamatória em tecido conjuntivo de ratos frente ao uso de diferentes soluções irrigadoras [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2008.

RESUMO

O emprego da solução de hipoclorito de sódio em Endodontia data de 1936 quando Walker a introduziu na forma de *soda clorada*. Desde então, essa veio a se constituir na solução mais bem aceita como irrigante para fins endodônticos. Nos últimos anos, atribuições de grande importância relativas ao desempenho das soluções de hipoclorito de sódio, têm sido referidas ao controle do seu pH. Este trabalho tem por objetivo avaliar a resposta inflamatória do tecido conjuntivo do dorso de ratos frente ao emprego de soluções de hipoclorito de sódio em diferentes concentrações e valores de pH. Para tanto, 36 ratos receberam quatro feridas circulares confeccionadas por um *punch*. Sobre cada três dessas feridas foi gotejada uma solução diferente, enquanto que a última foi utilizada para controle. Os tratamentos foram realizados em triplicata. Após a irrigação das feridas, os ratos foram sacrificados em 3, 7 e 14 dias. Os fragmentos foram fixados e corados com hematoxilina e eosina para análise histológica. A análise histológica mostrou que aos 14 dias quase todos os espécimes encontravam-se totalmente epitelizados, com fenômenos inflamatórios somente no tecido conjuntivo subjacente, com exceção do grupo no qual foi utilizado a solução de hipoclorito de sódio 5% pH 11.

Palavras-Chave: Endodontia; Hipoclorito de Sódio; Inflamação

Oliveira GG. Evaluation of the inflammatory response of some endodontic irrigations solutions in the conjunctive subcutaneous of mice [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2008.

ABSTRACT

Sodium hypochlorite has been used as an endodontic irrigant since 1936, when Walker used it as Sodium Chlorine. Since then it has become the most well acceptable endodontic irrigant. During the last few years many studies have reported the importance of pH control. This study evaluates the inflammatory response of some endodontic irrigations solutions in the subcutaneous connective tissue of mice. Thirty six mice were obtained from the Biomedical Sciences Institute at the University of São Paulo. Their backs were divided in four quadrants and each quadrant was injured with an 8 mm punch. Three of these wounds were submitted to different solutions, while the fourth was used as a control. This experiment was done in triplicate. After wound's irrigation mice were sacrificed at 3, 7 and 14 days. The samples were fixed on formol 10% and histologically analyzed after hematoxylin and eosin staining. At 14 days all wounds were covered with epithelium with a mild inflammatory infiltrate in the subjacent connective tissue, excepted the group that sodium hypochlorite 5% pH 11 was used.

Keywords: Endodontic; Sodium Hypochlorite; Inflammation.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	8
2 REVISÃO DA LITERATURA	10
3 PROPOSIÇÃO	20
4 MATERIAL E MÉTODOS	21
5 RESULTADOS.....	31
6 DISCUSSÃO	52
7 CONCLUSÃO	60
REFERÊNCIAS¹	61
ANEXO	Erro! Indicador não definido.

1 INTRODUÇÃO

A solução de hipoclorito de sódio sempre teve lugar de destaque durante a fase de preparo químico-cirúrgico, principalmente em função da sua atividade bactericida e capacidade em desnaturar matéria orgânica. Ao longo dos anos, estabeleceu-se relação diretamente proporcional dessa última característica com o aumento da concentração da solução de hipoclorito de sódio. Mais recentemente, entretanto, pesquisas têm demonstrado a importância de outros fatores que influenciam a ação das soluções de hipoclorito de sódio, tornando-as capaz de exercer suas propriedades tão bem quanto, ou melhor, do que pelo simples aumento na concentração. Nesse aspecto, o ajuste do pH tem sido reconhecido como o grande responsável por essas alterações, sendo que, quando básico possibilita maior estabilidade química, bem como maior capacidade em desnaturar proteínas. Apesar disso, tem-se como conhecimento químico que, quanto mais ácida ou básica for uma solução, maior será seu potencial de agressão aos tecidos vivos. Da mesma forma, diversos trabalhos já demonstraram a capacidade de irritação causada por soluções de hipoclorito de sódio em altas concentrações (2,5% a 5%).

Vários métodos têm sido utilizados para comprovar a biocompatibilidade das diversas substâncias químicas auxiliares utilizadas durante o tratamento endodôntico, entre eles certamente se destaca a ação destas sobre o processo reparacional. Os últimos trabalhos que se dedicaram a avaliar a reação inflamatória do tecido conjuntivo frente às ações de soluções de hipoclorito de sódio, não fazem qualquer referência aos valores do pH das mesmas e tampouco promovem interações com a concentração.

Considerando as alterações de pH e de concentração, não se pode ignorar a importância desses fatores no momento de estipular o que se deseja de uma solução de hipoclorito de sódio para uso endodôntico. Nesse sentido, deve ser considerada tanto a sua eficácia no binômio limpeza-desinfecção, quanto a sua ação sobre os tecidos periapicais. O emprego de soluções de hipoclorito de sódio alteradas, ou seja, com seu teor de cloro abaixo de 90% do especificado pode ser responsável por uma menor formação de gases (efervescência), afetando suas propriedades (PAIVA et al., 1989).

Em vista do exposto, pretende-se com esta pesquisa, avaliar a ação do pH e de diferentes concentrações de soluções de hipoclorito de sódio, sobre o processo reparacional de ferida induzida na pele do dorso de ratos, especificamente no que tange a participação de células inflamatórias específicas.

2 REVISÃO DA LITERATURA

Os objetivos da fase de preparo do canal radicular são alcançados diante da modelagem, limpeza e desinfecção do sistema de canais radiculares. Durante o processo de sanificação do canal radicular é importante que esse englobe os canais laterais, secundários, intercondutos, deltas apicais, além dos túbulos dentinários. Nesse aspecto há que se ressaltar a importância não só dos instrumentos endodônticos, como desbastadores da dentina, mas, também, das substâncias químicas que, ao longo do tempo, receberam muitas propostas para emprego inicial em Endodontia (CALLAHAN, 1894; GROSSMAN, 1943; GROSSMAN; MEIMAN, 1941; WALKER, 1936).

As substâncias químicas auxiliares ao tratamento endodôntico devem possuir inúmeras propriedades, dentre elas: capacidade de dissolver tecido orgânico e inorgânico, ação antimicrobiana, agir sobre a permeabilidade dentinária e ser biocompatível. Nesse contexto, dentre as substâncias que podem ser utilizadas durante a terapia endodôntica, têm-se os halogenados, os agentes quelantes, os demineralizantes, os tensoativos e, por fim, as associações entre os anteriores e demais (SIQUEIRA et al., 2002).

Destaca-se o grupo dos halogenados, por fazer parte destes a solução de hipoclorito de sódio, a substância química mais empregada na Endodontia ao longo dos anos, e até a presente data.

A solução de hipoclorito de sódio teve seu uso relatado em Endodontia por Walker (1936) seguindo orientações do desconhecido Dr. Blass da Universidade de Nova York. A partir daí sua aplicação se deu nas mais diversas concentrações, cada

uma com sua devida justificativa, mas quase sempre determinadas por suas atividades bactericida e capacidade de dissolver tecidos.

Essas características, no entanto, se devem principalmente à sua formulação, ou seja, especificações que às soluções foram determinadas, como concentração de cloro residual livre e pH, além das condições de armazenagem, como temperatura e tipo de embalagem, que serão responsáveis pela definição daquelas capacidades descritas e do seu prazo de validade.

Fabian e Walker (1982), Gélinas e Goulet (1982), Gélinas et al. (1984), Nicoletti e Magalhães (1995), Paiva et al. (1989), Pécora et al. (1987, 1988, 1997), Piskin e Türkün (1995) apresentaram estudos relatando a perda do teor de cloro residual livre em função da concentração, do tempo, da temperatura de armazenagem e verificaram que a instabilidade química é decorrente desses fatores. A avaliação de soluções comerciais também foi realizada por diversos pesquisadores que verificaram poucos cuidados nas suas especificações, resultando em equívocos em suas concentrações (MARCHESAN et al., 1998; PAIVA et al., 1989; PÉCORA et al., 1988; SIQUEIRA et al., 1999).

No que se diz respeito ao prazo de validade, a área farmacêutica tem por definição que essa é pré-definida por prazos de estabilidade química, física, toxicológica, terapêutica e microbiológica (UNITED STATES PHARMACOPEA, 1995).

A degradação do hipoclorito de sódio conduz à formação do ácido hipocloroso que, por sua vez, pode se apresentar na forma não dissociada (HClO) ou dissociada ($\text{H}^+ + \text{ClO}^-$). Essa reação é dependente do pH. Quando em meio neutro, se concentra na primeira forma, menos estável, porém mais bactericida, enquanto que em meio básico, prepondera na forma dissociada, mais estável apesar de menos

bactericida (MANFRINI, 1974; PAIVA; ANTONIAZZI, 1988). Disso ainda resulta o fato de sua degradação junto à matéria orgânica, que ao mesmo tempo pode ser dissolvida, sendo essa ação também decorrente do pH (LEHNINGER, 1990; PELCZAR; REID; CHAN, 1980).

As farmacopéias, que são compêndios oficiais nos quais se estabelecem especificações de matérias-primas e produtos acabados, propõem produtos de qualidade com base nas especificações estabelecidas nas monografias. Estas monografias são elaboradas por comissões científicas de diversas áreas constituindo documento reconhecido por lei-decreto ou outro instrumento similar, com periodicidade e outros fatores intrínsecos relacionados ao país ao qual pertence determinada farmacopéia.

As farmacopéias divergem quanto aos valores máximos e mínimos exigidos para a determinação da estabilidade química das soluções de hipoclorito de sódio (BUDAVARI, 1996; GENARO, 1990; REYNOLDS, 1996; VICENTE-BALLEREAU; MERVILLE; LAFREURIEL, 1989), no entanto, não extrapolam 10% da concentração inicial (PRISTA; ALVES; MORGADO, 1996). Poucos trabalhos deram atenção a esses parâmetros, mas Bloomfield e Sizer (1985) e Siqueira et al. (2002) confirmaram a sua importância, além de verificarem que o pH exerce grande influência. Valores próximos do pH neutro tornam as soluções de hipoclorito de sódio tão instáveis que podem ser consideradas inúteis para sua utilização como anti-sépticos, já com altos valores de pH, e conservadas sob refrigeração, consegue-se grande estabilidade, e, portanto manutenção das suas características conhecidas.

Como mencionado anteriormente, uma preparação farmacêutica pode ser afetada por diversos fatores, alguns inerentes à formulação e outros relacionados às

condições de armazenamento. Assim, para que o máximo proveito possa ser tirado de uma determinada composição torna-se imperioso saber como esta deve ser preparada e armazenada, para que mínimas perdas de seus princípios ativos ocorram até o momento da aplicação.

Quanto à atividade antimicrobiana, faz-se necessário entender que diversos são os microrganismos que habitam a cavidade endodôntica em casos de necrose. Sundqvist (1976), avaliando 32 dentes com coroas híginas e polpas necrosadas, verificou que 18 deles se apresentavam infectados, sendo 90% das cepas bacterianas isoladas, anaeróbias estritas.

Fabricius et al. (1982), trabalhando com macacos, observaram a evolução da contaminação microbiana do canal radicular em função do decorrer do tempo e da localização dos agentes infectantes. Verificaram que nos primeiros 7 dias, havia equilíbrio entre cocos, bacilos Gram-positivos, bacilos Gram-negativos e anaeróbios estritos; de 90 a 180 dias, anaeróbios estritos e facultativos na luz do canal e predominância de anaeróbios estritos na intimidade da dentina e junto ao ápice. Já aos 1060 dias, notaram a predominância de anaeróbios estritos, principalmente Gram-negativos e poucos cocos Gram-positivos.

As soluções de hipoclorito de sódio foram estudadas à exaustão e inúmeras condições as apontam como eficazes no combate aos principais microrganismos presentes na raiz.

A evolução dos trabalhos trouxe novas contribuições aos estudos da microbiota endodôntica, nos quais o *Enterococcus faecalis*, um microrganismo anaeróbio facultativo, ganha grande destaque ao ser observado, principalmente em casos de infecções resistentes ou retratamentos, ao lado de outros da mesma

espécie, *Streptococcus spp.*, *Actinomyces spp.*, *Streptococcus spp.* e *Candida albicans*.

A partir disso, inúmeras pesquisas surgiram no intuito de confirmar os efeitos das soluções de hipoclorito de sódio, que em altas concentrações (2,5% ou superior) mostraram-se muito eficientes na grande maioria dos trabalhos (ABDULLAH et al., 2005; AUN; PAIVA, 1982; AYHAN et al., 1999; BERBER et al., 2006; GOMES et al., 2001; OLIVEIRA et al., 2007; RADCLIFFE et al., 2004; SIQUEIRA et al., 1997; SOARES; PINTO JR, 2006; SPRATT et al., 2001; VIANNA et al., 2006).

Já Byström e Sundqvist (1985) verificaram a ação antimicrobiana de soluções de hipoclorito de sódio isoladamente, ou associadas ao EDTA, em 60 casos de tratamento endodôntico de dentes infectados. Observaram não existirem diferenças entre as soluções de hipoclorito de sódio a 0,5 ou 5%, quanto a ação antimicrobiana. O uso combinado do EDTA e do hipoclorito de sódio a 5%, apresentou maior eficiência que o hipoclorito de sódio isoladamente. Concluíram os autores que isso ocorre em função da remoção da camada residual de magma ampliando, portanto, a exposição dos túbulos dentinários.

De outra forma, Dunavant et al. (2006) utilizaram um modelo de biofilme para testar o efeito antimicrobiano de soluções de hipoclorito de sódio a 1% e 6%. Os autores observaram que as soluções de hipoclorito se comportaram de maneira semelhante e eficaz.

As soluções de hipoclorito de sódio, no entanto ganharam destaque quando utilizadas em algumas associações, propostas ao longo dos anos.

Blechman e Cohen (1951), Cobe (1960) e Stewart, Cobe e Rappaport (1961) iniciaram estudos com o peróxido de uréia para irrigação do canal radicular, que culminaram na formulação do RC Prep, um gel que contém essa substância para

reagir com o hipoclorito de sódio a 5%, proposto por Stewart, Kapssimalis e Rappaport (1969). Embuídos da mesma idéia, Paiva e Antoniazzi (1973) sugeriram a substituição do EDTA da fórmula original do RC-Prep por Tween 80, e criaram o Endo PTC que agora reage com o hipoclorito menos concentrado, a 0,5%. Os resultados dos testes bacteriológicos mostraram bons resultados. Mais recentemente, Ferrari, Cai e Bombana (2005) comprovaram os efeitos dessa nova associação. Diante de dentes portadores de infecção primária, os autores a utilizaram reduzindo em cerca de 90% a contaminação inicial por *Enterococcus ssp.* A associação de soluções de hipoclorito de sódio e peróxidos confere como subproduto, o oxigênio com uma característica particular, eletronicamente excitado e com seu *spin* invertido, o que é conhecido como oxigênio molecular singlet (DI MASCIO et al., 1995).

Claro ainda está que a anatomia dentinária é repleta de material orgânico e inorgânico. O inorgânico conhecido como “smear layer” ou magma, é reconhecidamente removido pela ação de agentes quelantes ou desmineralizantes, enquanto que a porção orgânica pode ser eliminada pela ação das soluções de hipoclorito de sódio (BYSTRÖM; SUNDQVIST, 1985; GAVINI; AUN; PESCE, 1994; GOLDMAN et al., 1981; GOLDMAN et al., 1982; McCOMB; SMITH, 1975; YAMADA et al., 1983).

A capacidade da solução de hipoclorito de sódio em dissolver tecido pulpar tem sido enfatizada por muitos estudos experimentais, já que a necessidade de remoção do conteúdo séptico do canal é de fundamental importância, e se dá através da desnaturação da cadeia protéica dos restos pulpare originando, como subprodutos, aminoácidos (ESTRELA et al., 2002; HAND; SMITH; HARRISON, 1978; NAKAMURA et al., 1985).

Vários estudos têm demonstrado que a velocidade da dissolução da matéria orgânica é diretamente proporcional à concentração (BARBIN et al., 2001; BAUMGARTNER; CUENIN, 1992; GORDON; DAMATO; CHRISTNER, 1981; GUERISOLI; SOUZA NETO; PÉCORA, 1998; OKINO et al., 2004; THÉ, 1979). Outros pesquisadores não comungam dessas conclusões, já que encontraram resultados semelhantes para concentrações diferentes, e apontam para outros fatores, como a temperatura que seria um dos grandes responsáveis por essa capacidade (CUNNIGHAM; BALEKJIAN, 1980; KOSKINEN; MEURMAN; STENVALL, 1980; NAKAMURA et al., 1985).

Dentre os que se valem das altas concentrações para dissolver, destacam-se Thé, Maltha e Plasschaert (1980) que ao estudarem as reações do tecido conjuntivo subcutâneo de cobaias exposto ao hipoclorito de sódio, nas concentrações de 0,9%; 2,1%; 4,1% e 8,4% entre outras, concluíram que a concentração ideal do hipoclorito de sódio não deve ser baseada na intensidade de resposta inflamatória do tecido conjuntivo, mas sim pela ação solvente desses hipocloritos, bem como pelo seu efeito antimicrobiano.

No entanto, de acordo com Siqueira, Santos e Bombana (2005) para que a dissolução ocorra, é fundamental trabalhar com soluções com valores elevados de pH, pois diante de soluções de hipoclorito de sódio em diferentes valores de pH e agindo sob diferentes temperaturas sobre polpas bovinas, confirmaram ser o pH o fator de maior influência sobre a velocidade da atividade solvente, seguido da temperatura e da concentração, nessa ordem. Confirmaram assim as assertivas de Abou-Rass e Oglesby (1981), Lehninger (1990) e Moorer e Wasselink (1982), os quais afirmaram que altas temperaturas e altos valores de pH são capazes de desnaturar proteínas do tecido conjuntivo.

Ao mesmo tempo em que concentrações mais elevadas de hipoclorito de sódio mostravam ações mais rápidas frente aos microrganismos mais resistentes, inúmeros trabalhos reportaram extravasamentos acidentais mostrando que essas soluções são bastante irritantes ao tecido conjuntivo adjacente, podendo causar hipersensibilidades, dor severa, edema imediato, acompanhado por necrose óssea e parestesia, além de infecções secundárias e possibilidade de obstrução das vias aéreas pelo edema (GATOT et al., 1991; GERNHARDT et al., 2004; GURSOY; BOSTANCI; KOSGER, 2006; PONTES et al., 2008; WITTON; BRENNAN 2005; WITTON et al., 2005).

Apesar de altas concentrações de hipoclorito de sódio favorecer as ações bactericidas e solventes, o processo de reparação também depende da utilização de substâncias químicas com parcimônia, caso contrário, pode perdurar por tempos mais longos, levando a pós-operatórios desfavoráveis e até mesmo comprometendo o processo.

Segundo Chvapil (1967), a cicatrização de uma ferida desenvolve-se obedecendo a um processo fisiológico, que segue uma série de fenômenos em que temos: a mobilização celular, o aumento da substância intercelular amorfa, a formação de fibras colágenas e, por fim, a reorganização da ferida.

Álvares (1972) observou que em feridas experimentais em dorso de ratos, as quais não sofreram ação de nenhuma substância química, após 1 dia os cortes apresentavam reação inflamatória intensa, caracterizada por grande número de polimorfonucleares neutrófilos. Aos 7 dias, começava a diminuir o infiltrado neutrofílico e ocorria o aumento das células mononucleares. Aos 14 dias a reparação epitelial já era evidente, com predomínio de infiltrado linfoplasmocitário. Aos 28 dias o tecido já estava reparado, confirmando os achados de Chvapil.

Paiva (1974) avaliou o processo inflamatório de feridas cirúrgicas em dorso de rato, com e sem interferência de agentes medicamentosos e verificou que, a utilização de uma associação corticosteróide-antibiótico melhora os fenômenos reparacionais, em perfeita concordância com os resultados do grupo controle.

Assim, Bombana et al. (1974) valeram-se do olho de coelho para aferir a reação inflamatória frente à aplicação do Endo PTC neutralizado por solução de hipoclorito de sódio a 0,5% e de uma solução de hipoclorito de sódio a 5% em associação ao peróxido de hidrogênio. A primeira combinação se mostrou bastante tolerável pela conjuntiva do olho do coelho, provocando reação inflamatória discreta, minimizada diante da aplicação de uma associação corticosteróide-antibiótico, enquanto que o hipoclorito de sódio a 5,25%, alternado com peróxido de hidrogênio, promoveu violenta desnaturação tecidual e conseqüente reação inflamatória intensa.

Mais tarde, Simões, Sampaio e Debelian (1989) avaliaram a reação do tecido conjuntivo de camundongos quando da inserção de tubos de polietileno contendo soluções de hipoclorito de sódio a 0,5% e 1% no dorso dos animais. A ação bactericida das referidas soluções também foi testada na presença de microrganismos encontrados comumente no interior dos canais radiculares. Os autores verificaram que as soluções estudadas eram bem toleradas pelo tecido conjuntivo do camundongo, além de exercerem atividade sobre os microrganismos testados.

Pesce, Medeiros e Haddad (1995) avaliaram o pós-operatório do preparo do canal radicular quando do emprego, durante a fase do esvaziamento, do hipoclorito de sódio nas concentrações 1; 1,5; 2; 2,5 e 3%. Verificaram que não houve diferença estatisticamente significativa, quanto ao pós-operatório, em função das diferentes concentrações das soluções de hipoclorito de sódio utilizadas.

Tanomaru Filho et al. (2002) avaliaram a resposta inflamatória do tecido conjuntivo de ratos frente o emprego de soluções de hipoclorito de sódio a 0,5% e a clorexidina a 2% e notaram que a primeira induziu resposta inflamatória, enquanto a segunda não.

Sendo assim, para que as substâncias químicas desempenhem de forma adequada suas atividades, é importante que sejam utilizadas na concentração correta e respeitados o tempo de vida útil, local e temperatura de armazenamento (PAIVA et al., 1989).

Pelo revisto até aqui, fica clara a importância da limpeza e desinfecção do sistema de canais radiculares realizada mecanicamente com o uso de instrumentos endodônticos, e quimicamente através das substâncias químicas e medicações intracanaís. O emprego de soluções de hipoclorito de sódio carece de estudos científicos, pois, sabidamente soluções de elevada concentração provocam, quando em contato com o tecido conjuntivo, indesejáveis e exuberantes respostas inflamatórias, aspecto não compatível com os objetivos clínicos de cura e reparação.

Especificamente, quanto às substâncias químicas utilizadas na Endodontia é importante a avaliação experimental de possível interferência no processo reparacional que ocorre no tecido conjuntivo quando da utilização de diferentes concentrações e valores de pH da solução de hipoclorito de sódio.

3 PROPOSIÇÃO

O objetivo deste trabalho é avaliar a resposta inflamatória do tecido conjuntivo de ratos em 3, 7 e 14 dias, quando submetido a solução de hipoclorito de sódio nas concentrações de 0,5%, 1%, 2,5% e 5%, cada concentração nos valores de pH de 7, 9 e 11.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Foram selecionados 36 ratos de linhagem Wistar (*rattus norvegicus*, *albinus Rodentia*, *Mammalia*) oriundos do biotério do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, machos, pesando entre 180 e 220 gramas.

Os animais foram acomodados em gaiolas individuais, nas quais receberam, durante a fase experimental, ração balanceada apropriada à manutenção de roedores, água *ad libitum* e assistência veterinária.

Após período de 10 dias, a fim de avaliar as condições de saúde dos animais, os mesmos foram pesados em balança apropriada para determinação da quantidade de solução anestésica a ser adotada para cada animal, à razão de 0,1 mL/100 g de peso de Francotar[®] associado a 0,05 mL/100g de peso de Rompum[®], via intraperitoneal conforme recomendação veterinária.

Anestesiados, os animais foram transferidos para uma prancha cirúrgica de medindo 30 x 20 cm. Em seguida, o dorso do animal foi tricotomizado com o auxílio de uma máquina para corte de cabelos, dotada de um pente de número 0, complementando-se a depilação com aparelho de barbear. Com a pele totalmente exposta, a área depilada foi limpa e desinfetada pela fricção de uma compressa de gaze, embebida em solução de iodopovidine 10%.

Os 36 ratos foram divididos em 4 grupos, sobre os quais utilizou-se as soluções de hipoclorito de sódio a 0,5% (Grupo 1), hipoclorito de sódio a 1% (Grupo 2), hipoclorito de sódio a 2,5% (Grupo 3) e hipoclorito de sódio a 5% (Grupo 4). As feridas foram realizadas com o auxílio de perfuradores (*punchs*) com 8 mm de diâmetro, os quais foram aplicados em quatro pontos do dorso dos animais: um

próximo ao crânio do lado direito (ferida A), outro do lado esquerdo (ferida B) e outros dois distantes do primeiro, em aproximadamente 5 cm em direção caudal, do lado direito (ferida C) e outro do lado esquerdo (ferida D). A ferida A foi utilizada como controle enquanto que nas feridas B, C, e D dos grupos foram aplicadas as soluções de hipoclorito de sódio em pH 7, 9 e 11, respectivamente. Ao assim proceder, foram obtidas feridas de igual tamanho e forma, conduzidas em igual profundidade, até o alcance do plano muscular (Figura 4.1).

Figura 4.1 - Disposições das feridas cirúrgicas construídas no dorso do rato. Ferida A é o controle, feridas B, C e D onde foram aplicadas as soluções de hipoclorito de sódio pH7, 9 e 11 respectivamente

As soluções de hipoclorito de sódio foram preparadas de acordo com Siqueira (2002, 2005) partindo de uma solução concentrada de hipoclorito de sódio 12-15%

adquirida em casa de química (Casa Bem Te Vi, São Paulo) e, diluída em água destilada até que se alcancem as concentrações designadas, confirmadas por titulometria na FUSP – Farmácia Universitária da Universidade de São Paulo, de acordo com a *British Pharmacopea Compendium* (1980). Para essa análise, foram usados¹: o ácido acético a 6%, iodeto de potássio PA, solução de tiosulfato de sódio 0.1 N padronizada e solução indicadora de amido a 1%.

Preparo da solução de ácido acético 6% - A solução de ácido acético foi obtida pela aferição, em balança semi-analítica, de 120 g do produto dissolvidos em 2000 mL de água destilada, armazenando-se a solução em frasco de vidro para 2000 mL de capacidade.

Preparo da solução indicadora de amido - Para esse procedimento, pesou-se 1g de amido em béquer com capacidade para 125 mL acrescentando-se 100 mL de água destilada. Esse preparo foi realizado toda vez que a solução findava. Durante o período de trabalho, a solução foi mantida em geladeira a 5 °C.

Na preparação da solução-padrão de tiosulfato de sódio 0,1 N, cujo título conhecido está próximo ao título requerido, a relação da exata proporção dessa solução para a normalidade nominal da solução é indicada por um fator, denominado fator de correção. O fator de correção é definido como o número exato de mililitros de solução de tiosulfato de sódio 0,1 N, que é equivalente a 1 mL da solução de mesma normalidade nominal. Ou seja, é o número pelo qual o volume atual de uma solução de título aproximado, deverá ser multiplicado para a obtenção do volume equivalente de uma solução-padrão de exata normalidade. Quando se realiza a padronização, objetiva-se fazer uma análise precisa da normalidade do tiosulfato de sódio. Quando formuladas, as soluções de tiosulfato não se

¹ Todas as soluções e reagentes descritos para titulometria foram adquiridos junto à Casa Bem Te Vi, São Paulo, SP.

encontram precisamente a 0,1 N e, quando da titulometria, cada mililitro de tiosulfato de sódio corresponde a 3,546 mg de cloro residual. Dessa forma, é necessário avaliar a solução de tiosulfato de sódio e padronizá-la, encontrando-se o fator de correção.

Iniciou-se o preparo da solução de tiosulfato de sódio 0,1 N pela pesagem de 50 g de tiosulfato de sódio pentaidratado, e completou-se o volume para 2000 mL em balão volumétrico com água destilada, previamente fervida e resfriada. Efetuou-se a mistura sob agitação manual até dissolução do tiosulfato que foi, a partir de então, deixada em repouso por 24 horas.

Procedeu-se à pesagem de uma amostra de dicromato de potássio - padrão primário - equivalente a 10 g, colocada em um cadinho de porcelana submetida à secagem em estufa a $120\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$ por três horas, que a seguir, foi depositada em um dessecador com sílica-gel, até alcançar a temperatura ambiente (período aproximado de 2 horas).

Obtenção do fator de correção - Realizaram-se 3 aferições por titulometria com tiosulfato de sódio 0,1 N. Reuniu-se num Erlenmeyer 15 mL de ácido clorídrico PA, 3 g de iodeto de potássio, 100 mL de água destilada e, 3 diferentes massas de dicromato de potássio com valores próximos a 0,15 g, previamente pesadas em balança analítica. Realizou-se a titulometria, de maneira que no momento da viragem ocorreu alteração da cor do líquido presente no Erlenmeyer, anotou-se o volume gasto da solução titulante de tiosulfato de sódio.

Realizou-se o seguinte cálculo para cada massa de dicromato de potássio com seu respectivo volume:

$$N = 6 \times A / 294,2 \times B$$

Onde:

N = Normalidade da solução de tiossulfato de sódio

A = Massa de dicromato de potássio utilizada

B = Volume da solução de tiossulfato de sódio gasto na titulação

294,2 = Peso molecular do dicromato de potássio

Dessa forma, obteve-se o valor N, que foi empregado na fórmula abaixo para definir o valor do fator de correção (Fc).

$$N \times Fc = 0.1 N$$

Assim, os cálculos indicaram fator de correção com o valor 0,010402.

Padronizado, o tiossulfato foi mantido na geladeira, à cerca de 5 °C, durante toda a fase experimental e retirado apenas para os tempos de titulação, com 1 hora de antecedência.

Iodometria é a reação entre o iodo e o tiossulfato de sódio é a base da iodometria indireta. No método indireto, as substâncias fortemente oxidantes reagem com íon iodeto, libertando o iodo. O método indireto consiste em tratar a substância oxidante a ser determinada com o excesso de iodeto de potássio e titular o iodo liberado, equivalente à quantidade da substância oxidante, com uma solução padrão de tiossulfato de sódio.

Inicialmente, realizou-se a determinação do teor de cloro residual livre da solução de hipoclorito de sódio a 10%, para posterior diluição. Isso porque precisamos primeiramente conhecer o teor de cloro residual livre da solução inicial a fim de preparar a solução de estudo. Para isso, tomou-se 5 mL da solução concentrada, transferindo-os para um balão volumétrico de 100 mL, e completando-se para esse volume com água destilada. Dessa preparação, tomaram-se 10 mL acondicionando-os num Erlenmeyer com capacidade de 250 mL, onde, também

foram depositados 50 mL de água destilada, 3 g de iodeto de potássio e 15 mL de solução de ácido acético 6% p/v.

Iniciou-se a titulação com tiosulfato de sódio 0,1 N sob agitação constante e quando a solução tornava-se amarelo clara, com uma pipeta graduada, adicionavam-se 3 mL da solução indicadora de amido, quando a solução adquiria tom azul-violáceo, passando posteriormente para a transparência pela complementação da titulação. Isso feito anotava-se o volume de tiosulfato de sódio consumido nesses procedimentos.

Realizou-se, então, o seguinte cálculo:

$$\text{Teor de cloro residual livre} = V \times Fc \times 3,546 \times 100/50$$

Onde,

V = Volume gasto de tiosulfato de sódio

Fc = Fator de correção do tiosulfato de sódio = 0, 010402

O fundamento do método de doseamento do cloro residual livre baseia-se no fato de o hipoclorito oxidar o iodeto, em meio ácido, de acordo com a reação:

O iodo liberado é titulado com a solução de tiosulfato de sódio 0,1 N. Todos os métodos iodométricos utilizam a titulação do iodo.

Adicionou-se água destilada à solução de hipoclorito de sódio a 10% a fim de que a diluição atingisse valores próximos de 2,5%, 1% e 0,5% para a elaboração das soluções em estudo.

Em função da metodologia descrita pela British pharmacopea (1980), adequou-se a tomada de ensaio, ou seja, o volume da amostra a ser utilizada para as determinações de concentrações de cloro residual livre das soluções a 0,5% e 1,0%, uma vez que, para a análise da solução concentrada e diluída, seriam

necessárias quantidades muito diferenciadas de solução titulante, que poderiam aumentar o erro inerente à análise química em questão.

Assim, tomaram-se 20 mL da solução de estudo, colocando-a em balão volumétrico de 100 mL, completando-se este volume com água destilada. Dessa preparação, tomaram-se 20 mL, acondicionando num Erlenmeyer com capacidade de 250 mL, no que também foram depositados 50 mL de água destilada, 3 g de iodeto de potássio, 15 mL de solução de ácido acético 6% p/v.

Iniciou-se a titulação com o tiossulfato de sódio 0,1 N sob agitação constante e quando a solução tornou-se amarelo-clara, adicionaram-se 3 mL da solução indicadora de amido por meio de uma pipeta graduada, onde a solução era tomada pela coloração azul que, com a complementação da titulação com a solução titulante, passava para a transparência. Neste momento, anotou-se o valor gasto em volume da solução de tiossulfato de sódio consumida na titulação.

As alterações no volume dos reagentes, para aferição da concentração próxima a 1,0% e 0,5%, derivaram do cálculo abaixo:

$$\text{Teor de cloro residual livre} = V \times Fc \times 3,546 \times 100/400$$

Onde,

V = Volume gasto de tiossulfato de sódio

Fc = Fator de correção do tiossulfato de sódio = 1,04676

Dessa forma definiram-se as concentrações finais 2,53%, 1,02% e 0,51%, obtendo-se 1,5 litros para cada concentração.

Ajustes dos valores de pH - Com o auxílio de um peagômetro² aferiu-se o pH das soluções de hipoclorito de sódio confirmando-se o valor 12,5.

² Aparelho para determinação do pH – pHmeter, M-12, Horiba, Japan.

Tomou-se o frasco de hipoclorito de sódio a 5% e acrescentou-se ácido bórico PA, homogeneizado até total dissolução, para que baixasse o valor do pH para 11, de onde se retirou 500 mL. A seguir, continuou-se acrescentando ácido bórico PA até que fosse atingido o pH 9, de onde se retirou 500 mL e , por fim novo acréscimo foi feito até atingir o pH 7 com os 500 mL restantes.

A solução foi, então, armazenada em frasco de vidro âmbar, com batoque rolha, para volumes equivalentes e armazenados sob refrigeração na geladeira até o momento do experimento.

O mesmo procedimento de ajuste dos valores de pH foi realizado para cada uma das demais concentrações e armazenadas igualmente, de tal forma que 12 soluções foram aviadas, conforme Quadro 4.1:

	NaClO 0,5%	NaClO 1%	NaClO 2,5%	NaClO 5%
pH 7	500 mL	500 mL	500 mL	500 mL
pH 9	500 mL	500 mL	500 mL	500 mL
pH 11	500 mL	500 mL	500 mL	500 mL

Quadro 4.1 – Distribuição das soluções de hipoclorito de sódio testadas

Após prontas, todas as soluções foram novamente submetidas a titulometria, a fim de verificar a não interferência do ácido bórico na concentração de cada uma das soluções de hipoclorito de sódio, o que se confirmou (Figura 4.2). As soluções foram utilizadas no máximo 24 horas após o preparo, mantidas sob refrigeração até a utilização sendo que, no momento do uso, estavam a temperatura ambiente.

Em seguida, sobre as feridas, com o auxílio de um equipo para soro regulado no sentido de que libere uma gota a cada 5 segundos, as feridas B, C e D (feridas experimentais), receberam as substâncias irrigadoras propostas para a análise durante 10 minutos, enquanto as feridas A (feridas controle), receberam, mantidas a

mesma forma e proporção, apenas solução fisiológica. A distribuição das aplicações está disposta no quadro 4.2.

Figura 4.2. Solução de hipoclorito de sódio 5%, pH 11, em frasco âmbar para armazenamento

Ao tempo em que as feridas foram irrigadas, o líquido excedente foi coletado por meio da aplicação de cânulas metálicas, acoplada à bomba de vácuo, posicionada entre 5 e 10 mm do campo de interesse experimental. Culminando os procedimentos do experimento, as feridas foram lavadas com 10 mL de soro fisiológico.

Decorridos os tempos determinados para o experimento – 3, 7 e 14 dias, os animais foram sacrificados em câmara de gás.

Ao se verificar o êxito letal de cada animal, removeu-se fragmentos de pele e parte do plano muscular dorsal, com aproximadamente 4 cm², correspondendo, três à ferida experimental e um à ferida controle.

Esses fragmentos foram, então, colocados em frascos plásticos contendo formol a 10% para a devida fixação dos tecidos.

Após 48 horas, completada a fixação das peças, as mesmas foram emblocadas em parafina, cortadas ao micrótomo, obtendo-se cortes histológicos com espessura de 6 µm. Os cortes estendidos sobre lâminas de vidro foram corados com hematoxilina-eosina, para análise histomorfológica ao microscópio de luz.

	3 dias	7 dias	14 dias	Total
Grupo 01- NaClO 0,5%	03	03	03	9
Grupo 02 - NaClO 1%	03	03	03	9
Grupo 03 – NaClO 2,5%	03	03	03	9
Grupo 03 - NaClO 5%	03	03	03	9
Total	12	12	12	36

Quadro 4.2 – Número de animais em cada grupo, segundo a concentração de hipoclorito e o número de dias da reparação

Para a análise morfológica (qualitativa), foram consideradas as seguintes alterações: Epitelização da ferida; presença de infiltrado inflamatório, edema, formação de placas de queratina, quantidade de vasos sanguíneos formados e em formação e formação de anexos cutâneos. Presentes em quatro campos de 250 µm em cada lâmina, nos períodos estabelecidos e para cada uma das soluções pesquisadas, totalizando quatro leituras por lâmina, utilizando-se para esse fim o microscópio. Essa análise foi realizada por um único observador previamente calibrado.

5 RESULTADOS

5.1 Resultados Morfológicos

Os resultados morfológicos (qualitativos) representam a observação da epitelização da ferida, presença de edema, de anexos cutâneos, quantificação do infiltrado inflamatório e quantidade de vasos sanguíneos.

3 DIAS

CONTROLE

O corte histológico mostrou ferida recoberta por fibrina e restos celulares, sem epitelização. Presença de tecido de granulação com intenso infiltrado inflamatório com polimorfonucleares e mononucleares mais próximos da superfície e na maior parte da extensão da ferida presença de edema intenso (++). Predominância de mononucleares na profundidade da ferida. Grande número de vasos sanguíneos em formação. Ausência de anexos cutâneos (Figura. 5.1 B, 5.2 B e 5.3 B).

pH 7

HIPOCLORITO DE SÓDIO 0,5%

O corte histológico mostrou ferida recoberta por fibrina e restos celulares, sem epitelização. Presença de tecido de granulação com intenso infiltrado inflamatório mononuclear e polimorfonuclear mais próximos da superfície. Grande número de vasos sanguíneos em formação. Na maior parte da extensão da ferida presença de edema intenso (++). Ausência de anexos cutâneos. Presença de fibrilas de colágeno delicadas (Figura 5.1 C).

HIPOCLORITO DE SÓDIO 1%

O corte histológico mostrou ferida recoberta por fibrina e restos celulares, sem epitelização.

Na derme, tecido de granulação com intenso infiltrado inflamatório mononuclear e polimorfonuclear mais próximos da superfície, com edema intenso na maior parte da ferida (+++). Grande número de vasos sanguíneos em formação. Ausência de anexos cutâneos (Figura 5.1 D).

HIPOCLORITO DE SÓDIO 2,5%

O corte histológico mostrou ferida recoberta por fibrina e restos celulares, sem epitelização. Na derme, presença de tecido de granulação com intenso infiltrado inflamatório mononuclear e polimorfonuclear mais próximo da superfície. Na maior parte da ferida presença de edema intenso (+++). Grande número de vasos sanguíneos em formação. Ausência de anexos cutâneos (Figura 5.1 E).

HIPOCLORITO DE SÓDIO 5%

O corte histológico mostrou intensa área de destruição tecidual (Figura 5.1 A e F).

pH 9

HIPOCLORITO DE SÓDIO 0,5%

O corte histológico mostrou ferida recoberta por fibrina e restos celulares, sem epitelização. Presença de tecido de granulação com intenso infiltrado inflamatório mononuclear e polimorfonuclear mais próximos da superfície. Grande número de vasos sanguíneos em formação. Presença de edema intenso na maior parte da extensão da ferida (+++). Ausência de anexos cutâneos (Figura 5.2 C).

HIPOCLORITO DE SÓDIO 1%

O corte histológico mostrou ferida recoberta por fibrina e restos celulares, sem epitelização.

Na derme, presença de tecido de granulação com intenso infiltrado inflamatório mononuclear e polimorfonuclear mais próximos da superfície da ferida. Edema intenso na maior parte da ferida (++). Grande número de vasos sanguíneos em formação. Ausência de anexos cutâneos (Figura 5.2 D).

HIPOCLORITO DE SÓDIO 2,5%

O corte histológico mostrou ferida recoberta por fibrina e restos celulares, sem epitelização

Na derme, presença de tecido de granulação com intenso infiltrado inflamatório mononuclear e polimorfonuclear mais próximo da superfície. Na maior parte da ferida presença de edema intenso (+++). Grande número de vasos sanguíneos em formação. Ausência de anexos cutâneos (Figura 5.2 E).

HIPOCLORITO DE SÓDIO 5%

O corte histológico mostrou área intensa de destruição tecidual(Figura 5.2 A e F).

pH 11

HIPOCLORITO DE SÓDIO 0,5%

O corte histológico mostrou ferida recoberta por fibrina e restos celulares, sem epitelização. Presença de tecido de granulação com intenso infiltrado inflamatório mononuclear e polimorfonuclear mais próximos da superfície com edema intenso na maior parte da extensão da ferida (++). Grande número de vasos sanguíneos em formação. Ausência de anexos cutâneos (Figura 5.3 C).

HIPOCLORITO DE SÓDIO 1%

O corte histológico mostrou ferida recoberta por fibrina e restos celulares, sem epitelização.

Na derme, presença de tecido de granulação com intenso infiltrado inflamatório mononuclear e polimorfonuclear mais próximos da superfície. Na maior parte da ferida, presença de edema intenso (+++). Grande quantidade de vasos sanguíneos em formação. Ausência de anexos cutâneos (Figura 5.3 D).

HIPOCLORITO DE SÓDIO 2,5%

O corte histológico mostrou ferida recoberta fibrina e restos celulares, sem epitelização. Com área focal de destruição tecidual.

Na derme, presença de tecido de granulação com intenso infiltrado inflamatório mononuclear e polimorfonuclear mais próximo da superfície. Na maior parte da ferida presença de edema intenso (+++). Grande quantidade de vasos sanguíneos em formação. Ausência de anexos cutâneos (Figura 5.3 E).

HIPOCLORITO DE SÓDIO 5%

O corte histológico mostrou intensa área de destruição tecidual (Figura 5.3 A e F).

7 DIAS

CONTROLE

O corte histológico mostrou ferida totalmente epitelizada com queratinização total.

Derme com tecido de granulação com intenso infiltrado inflamatório mononuclear e polimorfonuclear, presença de áreas de edema moderado. Grande

número de vasos sanguíneos em formação e formados. Ausência de anexos cutâneos (Figura 5.4 B, 5.5 B e 5,6 B).

pH 7

HIPOCLORITO DE SÓDIO 0,5%

O corte histológico mostrou ferida totalmente epitelizada.

Na derme, presença de tecido de granulação com intenso infiltrado inflamatório mononuclear e polimorfonuclear. Áreas de edema moderado. Grande quantidade de vasos sanguíneos em formação e formados. Ausência de anexos cutâneos (Figura 5.4 C).

HIPOCLORITO DE SÓDIO 1%

O corte histológico mostrou ferida com migração epitelial quase completa com início da formação de placas de queratina.

Derme com tecido de granulação com intenso infiltrado inflamatório mononuclear e polimorfonuclear, com edema intenso. Grande quantidade de vasos sanguíneos em formação e formados. Ausência de anexos cutâneos (Figura 5.4 D).

HIPOCLORITO DE SÓDIO 2,5%

O corte histológico mostrou ferida com migração epitelial quase total com início da formação de placas de queratina.

Derme com tecido de granulação com intenso infiltrado inflamatório mononuclear e polimorfonuclear. Áreas com edema moderado a intenso. Grande quantidade de vasos sanguíneos em formação e formados, e ausência de anexos cutâneos (Figura 5.4 E).

HIPOCLORITO DE SÓDIO 5%

O corte histológico mostrou ferida recoberta por fibrina e restos celulares, com início da migração epitelial.

Derme com tecido de granulação com intenso infiltrado inflamatório mononuclear e polimorfonuclear, com edema intenso na maior parte da extensão da ferida (+++). Grande quantidade de vasos sanguíneos em formação. Ausência de anexos cutâneos (Figura 5.4 A e F).

pH 9

HIPOCLORITO DE SÓDIO 0,5%

O corte histológico mostrou ferida com início da migração epitelial.

Derme com tecido de granulação com intenso infiltrado inflamatório mononuclear e polimorfonuclear mais próximo da superfície. Na maior parte da extensão da ferida áreas de edema intenso (++). Grande quantidade de vasos sanguíneos em formação e numerosos capilares formados. Ausência de anexos cutâneos (Figura 5.5 C).

HIPOCLORITO DE SÓDIO 1%

O corte histológico mostrou ferida recoberta por fibrina e restos celulares, com início da migração epitelial

Derme com tecido de granulação com intenso infiltrado inflamatório mononuclear e polimorfonuclear. Áreas com edema intenso. Grande quantidade de vasos sanguíneos em formação. Ausência de anexos cutâneos (Figura 5.5 D).

HIPOCLORITO DE SÓDIO 2,5%

O corte histológico mostrou ferida com migração epitelial total com início da formação de placas de queratina.

Derme com tecido de granulação com intenso infiltrado inflamatório mononuclear e polimorfonuclear. Áreas com edema intenso (+). Grande quantidade de vasos sanguíneos em formação e formados, e ausência de anexos cutâneos (Figura 5.5 E).

HIPOCLORITO DE SÓDIO 5%

O corte histológico mostrou ferida recoberta por fibrina e restos celulares, com início da migração epitelial.

Derme com tecido de granulação com intenso infiltrado inflamatório mononuclear e polimorfonuclear, com edema intenso na maior parte da extensão da ferida (+++). Grande quantidade de vasos sanguíneos em formação. Ausência de anexos cutâneos (Figura 5.5 A e F).

pH11

HIPOCLORITO DE SÓDIO 0,5%

O corte histológico mostrou ferida totalmente epitelizada.

Presença de tecido de granulação com intenso infiltrado inflamatório mononuclear e polimorfonuclear mais próximo da superfície. Na maior parte da extensão da ferida áreas de edema intenso (++). Grande quantidade de vasos sanguíneos em formação. Ausência de anexos cutâneos (Figura 5.6 C).

HIPOCLORITO DE SÓDIO 1%

O corte histológico mostrou ferida recoberta por fibrina e restos celulares, com início da migração epitelial.

Derme com tecido de granulação com intenso infiltrado inflamatório mononuclear e polimorfonuclear. Áreas com edema intenso (+). Grande quantidade de vasos sanguíneos em formação, e ausência de anexos cutâneos (Figura 5.6 D).

HIPOCLORITO DE SÓDIO 2,5%

O corte histológico mostrou ferida recoberta por fibrina e restos celulares, com início da migração epitelial.

Derme com tecido de granulação com intenso infiltrado inflamatório mononuclear e polimorfonuclear. Áreas com edema intenso (+). Grande quantidade

de vasos sanguíneos em formação e formados. Ausência de anexos cutâneos (Figura 5.6 E).

HIPOCLORITO DE SÓDIO 5%

O corte histológico mostrou ferida recoberta por fibrina e restos celulares, com início da migração epitelial.

Derme com tecido de granulação com intenso infiltrado inflamatório mononuclear e polimorfonuclear, com edema intenso na maior parte da extensão da ferida (++). Grande quantidade de vasos sanguíneos em formação. Ausência de anexos cutâneos (Figura 5.6 A e F).

14 DIAS

CONTROLE

O corte histológico mostrou ferida completamente epitelizada, com o mesmo número de camadas de células do epitélio adjacente, e presença de lâminas de queratina na superfície.

Derme com discreto infiltrado inflamatório, edema discreto. Presença de anexos cutâneos em formação e formados. O tecido conjuntivo ainda é constituído por colágeno de fibrilas finas. Os fibroblastos são jovens (Figura 5.7 B, 5.8 B e 5.9 B).

pH 7

HIPOCLORITO DE SÓDIO 0,5%

O corte histológico mostrou ferida completamente epitelizada com o mesmo número de camadas de células que o epitélio adjacente. Presença de lâminas de queratina na superfície.

Derme com moderado infiltrado inflamatório. Edema discreto. Presença de anexos cutâneos em formação. Grande número de vasos sanguíneos formados (Figura 5.7 C).

HIPOCLORITO DE SÓDIO 1%

O corte histológico mostrou ferida completamente epitelizada com o mesmo número de camadas de células que o epitélio adjacente. Presença de lâminas de queratina na superfície.

Derme com moderado infiltrado inflamatório. Edema discreto. Presença de anexos cutâneos em formação. Grande número de vasos sanguíneos formados. Tecido conjuntivo constituído por fibroblastos jovens e colágeno de fibrilas finas (Figura 5.7 D).

HIPOCLORITO DE SÓDIO 2,5%

O corte histológico mostrou ferida completamente epitelizada com o mesmo número de camadas de células que o epitélio adjacente. Presença de lâminas de queratina na superfície.

Derme com moderado infiltrado inflamatório. Edema discreto. Presença de anexos cutâneos em formação, grande número de vasos sanguíneos. Tecido conjuntivo formado por fibroblastos jovens e colágeno de fibrilas finas (Figura 5.7 E).

HIPOCLORITO DE SÓDIO 5%

O corte histológico mostrou ferida totalmente epitelizada com o mesmo número de camadas de células que o epitélio adjacente, com lâminas de queratina na superfície.

Derme com infiltrado inflamatório de moderado a intenso, edema moderado. Presença de alguns anexos cutâneos em formação, grande número de vasos

sanguíneos. Tecido conjuntivo formado por fibroblastos jovens e colágeno de fibrilas finas (Figura 5.7 A e F).

pH 9

HIPOCLORITO DE SÓDIO 0,5%

O corte histológico mostrou ferida completamente epitelizada com o mesmo número de camadas de células que o epitélio adjacente. Presença de lâminas de queratina na superfície.

Derme com moderado infiltrado inflamatório. Edema moderado. Presença de anexos cutâneos em formação. Grande número de vasos sanguíneos formados. O tecido conjuntivo é constituído por fibroblastos jovens e colágeno de fibrilas finas (Figura 5.8 C).

HIPOCLORITO DE SÓDIO 1%

O corte histológico mostrou ferida completamente epitelizada com o mesmo número de camadas de células que o epitélio adjacente. Presença de lâminas de queratina na superfície.

Derme com moderado infiltrado inflamatório. Edema moderado. Ausência de anexos cutâneos. Grande número de vasos sanguíneos formados. Tecido conjuntivo constituído por fibroblastos jovens e colágeno de fibrilas finas. (Figura 5.8 D).

HIPOCLORITO DE SÓDIO 2,5%

O corte histológico mostrou ferida completamente epitelizada com o número de camadas de células maior que o epitélio adjacente. Presença de lâminas de queratina em formação na superfície.

Derme com moderado infiltrado inflamatório. Edema moderado. Ausência de anexos cutâneos, grande número de vasos sanguíneos. Tecido conjuntivo formado por fibroblastos jovens e colágeno de fibrilas finas (Figura 5.8 E).

HIPOCLORITO DE SÓDIO 5%

O corte histológico mostrou ferida completamente epitelizada com o número de camadas de células maior que o epitélio adjacente e lâminas de queratina em formação na superfície.

Derme com infiltrado inflamatório de moderado a intenso, áreas de edema moderado. Ausência de anexos cutâneos, grande número de vasos sanguíneos. Tecido conjuntivo formado por fibroblastos jovens e colágeno de fibrilas finas (Figura 5.8 A e F).

pH 11

HIPOCLORITO DE SÓDIO 0,5%

O corte histológico mostrou ferida completamente epitelizada com o número de camadas de células mais espessa que o epitélio adjacente, com lâminas de queratina na superfície.

Derme com moderado infiltrado inflamatório. Edema discreto. Início da formação dos anexos cutâneos (Figura 5.9 C).

HIPOCLORITO DE SÓDIO 1%

O corte histológico mostrou ferida completamente epitelizada com o número de camadas de células ligeiramente maior que o epitélio adjacente. Presença de lâminas de queratina na superfície.

Derme com moderado infiltrado inflamatório. Edema moderado. Presença de alguns anexos cutâneos em formação, grande número de vasos sanguíneos. Tecido conjuntivo formado por fibroblastos jovens e colágeno de fibrilas finas (Figura 5.9 D).

HIPOCLORITO DE SÓDIO 2,5%

O corte histológico mostrou ferida completamente epitelizada com o número de camadas de células maior que o epitélio adjacente, lâminas de queratina em formação.

Derme com moderado infiltrado inflamatório. Edema moderado. Ausência de anexos cutâneos, grande número de vasos sanguíneos. Tecido conjuntivo formado por fibroblastos jovens e colágeno de fibrilas fina (Figura 5.9 E).

HIPOCLORITO DE SÓDIO 5%

O corte histológico mostrou ferida recoberta por fibrina e restos celulares, com migração epitelial quase completa.

Derme com tecido de granulação com infiltrado inflamatório intenso mononuclear e polimorfonuclear, áreas de edema intenso (+). Grande número de vasos sanguíneos formados. Ausência de anexos cutâneos (Figura 5.9 A e F).

Figura 5.1 - Imagem mostrando achados histopatológicos dos animais sacrificados em 3 dias, com o uso do hipoclorito de sódio pH 7, nas concentrações de 0,5%, 1%, 2,5% e 5% (C, D, E e F respectivamente) e controle com soro (B). Em C (NaOCl 0,5%) observa-se intenso infiltrado inflamatório com células mononucleares e polimorfonucleares, áreas de edema intenso na maior parte da extensão da ferida, fibrilas colágenas delicadas, superfície recoberta por fibrina e restos celulares e grande número de vasos sanguíneos. Em B, D e E o mesmo quadro histopatológico é observado para outras concentrações do hipoclorito de sódio e para o grupo controle. Em F observa-se área de intensa destruição tecidual. Em A observa-se a mesma imagem que F, porém em maior aumento. Cortes corados com hematoxilina e eosina. Barra de escala indicativa do aumento é apresentada em cada imagem.

Figura 5.2 - Imagem mostrando achados histopatológicos dos animais sacrificados em 3 dias, com o uso do hipoclorito de sódio pH 9, nas concentrações de 0,5%, 1%, 2,5% e 5% (C, D, E e F respectivamente) e controle com soro (B). Em C (NaOCl 0,5%) observa-se intenso infiltrado inflamatório com células mononucleares e polimorfonucleares, áreas de edema intenso, fibrilas colágenas delicadas, superfície recoberta por fibrina e restos celulares e grande número de vasos sanguíneos. Em B, D e E o mesmo quadro histopatológico é observado para outras concentrações do hipoclorito de sódio e para o grupo controle. Em F observa-se intensa área de destruição tecidual. Em A observa-se a mesma imagem que F, porém em maior aumento. Cortes corados com hematoxilina e eosina. Barra de escala indicativa do aumento é apresentada em cada imagem.

Figura 5.3 - Imagem mostrando achados histopatológicos dos animais sacrificados em 3 dias, com o uso do hipoclorito de sódio pH 11, nas concentrações de 0,5%, 1%, 2,5% e 5% (C, D, E e F respectivamente) e controle com soro (B). Em C (NaOCl 0,5%) observa-se intenso infiltrado inflamatório com células mononucleares e polimorfonucleares, áreas de edema, fibrilas colágenas delicadas, superfície recoberta por fibrina e restos celulares e grande número de vasos sanguíneos. Em B, D e E o mesmo quadro histopatológico é observado para outras concentrações do hipoclorito de sódio e para o grupo controle. Em F observa-se intensa área de destruição tecidual. Em A observa-se a mesma imagem que F, porém em maior aumento. Cortes corados com hematoxilina e eosina. Barra de escala indicativa do aumento é apresentada em cada imagem.

Figura 5.4 - Imagem mostrando achados histopatológicos dos animais sacrificados em 7 dias, com o uso do hipoclorito de sódio pH 7, nas concentrações de 0,5%, 1%, 2,5% e 5% (C, D, E e F respectivamente) e controle com soro (B). Em B (controle) observa-se ferida totalmente epitelizada com queratinização parcial. Intenso infiltrado inflamatório mononuclear e polimorfonuclear, áreas de edema moderado. Em C (NaOCl 0,5%) observa-se ferida totalmente epitelizada, intenso infiltrado inflamatório com células mononucleares e polimorfonucleares, áreas de edema moderado a intenso, fibrilas colágenas delicadas e grande número de vasos sanguíneos. Em D o mesmo quadro histopatológico é observado para a concentração 1%. Em E (NaOCl 2,5%) observa-se ferida em processo de epitelização com intenso infiltrado inflamatório mononuclear e polimorfonuclear, áreas de edema de moderado a intenso. Em F (NaOCl 5%), início da migração epitelial, ferida recoberta por restos celulares e fibrina, intenso infiltrado inflamatório mononuclear e polimorfonuclear, áreas de edema intenso. Em A observa-se a mesma imagem que F, porém em maior aumento. Cortes corados com hematoxilina e eosina. Barra de escala indicativa do aumento é apresentada em cada imagem.

Figura 5.5 - Imagem mostrando achados histopatológicos dos animais sacrificados em 7 dias, com o uso do hipoclorito de sódio pH 9 e nas concentrações 0,5%, 1%, 2,5% e 5% (C, D, E e F respectivamente) e controle (B). Em A observa-se a mesma imagem que F, porém em maior aumento. Em B (controle) observa-se ferida totalmente epitelizada com queratinização parcial, intenso infiltrado inflamatório mononuclear e polimorfonuclear e áreas de edema moderado. Em C (NaOCl 0,5%), início da migração epitelial, com intenso infiltrado inflamatório mononuclear e polimorfonuclear mais próximo da superfície. Áreas de edema intenso e ausência de anexos cutâneos. Em D (NaOCl 1%), ferida recoberta por fibrina e restos celulares, com intenso infiltrado inflamatório polimorfonuclear e mononuclear, áreas de edema intenso, grande quantidade de vasos sanguíneos em formação. Ausência de anexos cutâneos. Em E (NaOCl 2,5%) observa-se início de migração epitelial, infiltrado inflamatório intenso mononuclear e polimorfonuclear, áreas de edema intenso e grande quantidade de vasos sanguíneos. Em F (NaOCl 5%) observa-se ferida com superfície recoberta por fibrina e restos epiteliais, intenso infiltrado inflamatório mononuclear e polimorfonuclear mais próximo da superfície, áreas de edema intenso e grande quantidade de vasos sanguíneos. Cortes corados com hematoxilina e eosina. Barra de escala indicativa do aumento é apresentada em cada imagem.

Figura 5.6 - Imagem mostrando achados histopatológicos dos animais sacrificados em 7 dias, com o uso do hipoclorito de sódio pH 11 e nas concentrações 0,5%, 1%, 2,5% e 5% (C, D, E e F respectivamente) e controle (B). Em A observa-se a mesma imagem que F, porém em maior aumento. Em B (controle), observa-se ferida totalmente epitelizada com queratinização parcial. Tecido de granulação com intenso infiltrado inflamatório polimorfonuclear e mononuclear, edema moderado, ausência de anexos cutâneos. Em C (NaOCl 0,5%), ferida totalmente epitelizada, com intenso infiltrado inflamatório mononuclear e polimorfonuclear. Edema intenso, ausência de anexos cutâneos. Em D (NaOCl 1%), ferida recoberta por fibrina e restos epiteliais, intenso infiltrado inflamatório, áreas de edema intenso, grande quantidade de vasos sanguíneos. Em E (NaOCl 2,5%) observa-se ferida com a superfície recoberta por fibrina e restos epiteliais, infiltrado inflamatório intenso, áreas de edema e grande quantidade de vasos sanguíneos. Em F (NaOCl 5%) observa-se ferida com superfície recoberta por fibrina e restos epiteliais, intenso infiltrado inflamatório, áreas de edema intenso e grande quantidade de vasos sanguíneos. Cortes corados com hematoxilina e eosina. Barra de escala indicativa do aumento é apresentada em cada imagem.

Figura 5.7 - Imagem mostrando achados histopatológicos dos animais sacrificados em 14 dias, com uso de hipoclorito de sódio pH 7 e nas concentrações de 0,5%, 1%, 2,5% e 5% (C, D, E e F respectivamente) e controle (B). Em A observa-se a mesma imagem que F, porém em maior aumento. Em B (controle), observa-se ferida totalmente epitelizada com o mesmo número de células que o epitélio adjacente e presença de lâminas de queratina. Discreto infiltrado inflamatório com edema discreto e presença de anexos cutâneos em formação. Em C (NaOCl 0,5%) observa-se ferida totalmente epitelizada com lâminas de queratina na superfície. Moderado infiltrado inflamatório, com edema discreto e presença de anexos cutâneos em formação. Em D (NaOCl 1%) e E (NaOCl 2,5%), o mesmo quadro histológico que C. Em F (NaOCl 5%), o corte histológico mostrou ferida totalmente epitelizada com lâminas de queratina na superfície. Infiltrado inflamatório moderado a intenso, edema intenso com anexos cutâneos em formação. Cortes corados com hematoxilina e eosina. Barra de escala indicativa do aumento é apresentada em cada imagem.

Figura 5.8 - Imagem mostrando achados histopatológicos dos animais sacrificados em 14 dias, com uso de hipoclorito de sódio pH 9 e nas concentrações de 0,5%, 1%, 2,5% e 5% (C, D, E e F respectivamente) e controle (B). Em A observa-se a mesma imagem que F, porém em maior aumento. Em B (controle), observa-se ferida totalmente epitelizada com o mesmo número de células que o epitélio adjacente e presença de lâminas de queratina. Discreto infiltrado inflamatório com edema discreto e presença de anexos cutâneos em formação. Em C (NaOCl 0,5%) observa-se ferida totalmente epitelizada com lâminas de queratina na superfície. Moderado infiltrado inflamatório, edema moderado com alguns anexos cutâneos em formação. Em D (NaOCl 1%) observa-se o mesmo quadro histológico que C. Em E (NaOCl 2,5%), ferida totalmente epitelizada com lâminas de queratina na superfície. Derme com moderado infiltrado inflamatório, edema moderado, ausência de anexos cutâneos. Em F (NaOCl 5%) observa-se a ferida totalmente epitelizada com o número de camadas maior que o epitélio adjacente, com lâminas de queratina em formação na superfície. Infiltrado inflamatório moderado a intenso na superfície, áreas de edema moderado e ausência de anexos cutâneos.

Cortes corados com hematoxilina e eosina. Barra de escala indicativa do aumento é apresentada em cada imagem.

Figura 5.9 - Imagem mostrando achados histopatológicos dos animais sacrificados em 14 dias, com uso de hipoclorito de sódio pH 11 e nas concentrações de 0,5%, 1%, 2,5% e 5% (C, D, E e F respectivamente) e controle com soro (B). Em A observa-se a mesma imagem que F, porém em maior aumento. Em B (controle), observa-se ferida totalmente epitelizada com o mesmo número de células que o epitélio adjacente e presença de lâminas de queratina. Discreto infiltrado inflamatório com edema discreto e presença de anexos cutâneos em formação. Em C (NaOCl 0,5%) observa-se ferida totalmente epitelizada com o número de camadas de células maior que o epitélio adjacente e lâminas de queratina na superfície. Derme com moderado infiltrado inflamatório, edema discreto, com alguns anexos cutâneos em formação. Em D (NaOCl 1%) observa-se a ferida totalmente epitelizada com o número de células maior que o epitélio adjacente e lâminas de queratina na superfície. Moderado infiltrado inflamatório com edema moderado e presença de alguns anexos cutâneos em formação. Em E (NaOCl 2,5%) observa-se ferida totalmente epitelizada com o número de camadas de células maior que o epitélio adjacente e lâminas de queratina na superfície. Moderado infiltrado inflamatório, edema moderado e ausência de anexos cutâneos. Em F (NaOCl 5%) o corte histológico mostrou ferida recoberta por fibrina e restos celulares, com migração epitelial quase completa. Derme com intenso infiltrado inflamatório polimorfonuclear e mononuclear, edema intenso, ausência de anexos cutâneos. Cortes corados com hematoxilina e eosina. Barra de escala indicativa do aumento é apresentada em cada imagem.

6 DISCUSSÃO

As soluções de hipoclorito de sódio são as mais utilizadas em Endodontia na atualidade e, principalmente, aquelas com concentrações acerca de 2,5% ou superior, são consideradas as mais eficientes em atividades bactericida e solvente de tecidos orgânicos.

O transcorrer dos tempos e o avançar das pesquisas em microbiologia definiram melhores parâmetros da microbiota endodôntica e os microrganismos facultativos vêm se mostrando como os grandes ameaçadores do sucesso da terapia endodôntica. Dentre esses, destacam-se *Enterococcus spp.*, *Actinomyces spp.*, *Streptococcus spp.* e *Candida albicans*. O *Enterococcus faecalis*, por sua presença principalmente em casos de grande persistência de infecção, assim descrito em pesquisas da microbiota endodôntica, ou mesmo em diminutas periodontites apicais, tornou-se alvo principal de diversas investigações.

Há, porém de se ressaltar que, para toda e qualquer pesquisa, o hipoclorito de sódio mostra-se eficiente em sua atividade antimicrobiana, variando seu tempo de ação de maneira inversamente proporcional à sua concentração.

Discussões, entretanto, fazem presentes nas metodologias empregadas, já que a caracterização do meio poderia alterar resultados de grande importância. Os resultados do trabalho de Dunavant et al. (2006), no qual um modelo de biofilme apical é reproduzido, coincidem com os achados clínicos de Byström e Sundqvist (1985) que trabalharam em dentes necrosados e obtiveram redução bacteriana do canal radicular semelhante ao utilizar soluções de hipoclorito de sódio em altas e baixas concentrações.

Importante também esclarecer que Byström e Sundqvist (1985), utilizaram o EDTA em um dos grupos, alternando com o hipoclorito de sódio a 5% e notaram reduções ainda maiores, mas atribuíram tal fato ao quelante que auxiliou na remoção do *smear layer*, facilitando a ação do hipoclorito de sódio.

Vale rememorar as condições a que são submetidos dentes para trabalhos laboratoriais de pesquisa, em que banhos em cubas ultrassônicas contendo hipoclorito de sódio, seguido por novo banho com EDTA são aplicados como forma de prepararem os espécimes para receberem e incubarem os microrganismos a serem testados (FERRAZ et al., 2001).

Da mesma forma que o quelante é importante para a remoção de material inorgânico e permitir o acesso de substâncias químicas ao interior dos túbulos e canalículos dentinários, as soluções de hipoclorito de sódio também contribuem com a remoção do material orgânico presente no canal radicular a fim de cumprir o mesmo objetivo dos quelantes, dissolvendo essa obstrução (GOLDMAN et al., 1981; GOLDMAN et al., 1982; McCOMB; SMITH, 1975; YAMADA et al., 1983).

A dissolução, segunda grande contribuição do hipoclorito de sódio ao preparo químico do canal radicular, já foi estudada por diversos autores e quase que por unanimidade, considera-se que esse efeito é inversamente proporcional à sua concentração. Outros, porém, acreditam que tal efeito se dê em função da temperatura e Siqueira, Santos e Bombana (2005) afirmam que cabe ao pH a principal responsabilidade por esse fenômeno, ou seja, quanto mais elevado, mais efetivo e quanto mais próximo do neutro, menos efetivo.

Dado que a estabilidade química das soluções de hipoclorito de sódio também pode ser afetada pela ação do pH; e que quando este é elevado, a estabilidade química aumenta, o preparo dessas soluções com valores de pH

próximo de 11 (SIQUEIRA et al., 2002; SIQUEIRA; SANTOS; BOMBANA, 2005) proporciona boa atividade solvente e maior estabilidade na concentração desejada, o que não acontece em pH 7. Isso confirma a necessidade de maior atenção nas condições de preparo e uso das soluções de hipoclorito de sódio, a fim de permitir a real característica desse irrigante, daí a preocupação deste trabalho na produção das soluções, fato este pouco ou quase nunca relatado nos trabalhos de pesquisa.

É necessário entender que o cuidado com o preparo deve ser o mesmo com aquele sobre origem das cepas de bactérias, caso contrário, não se pode confirmar resultados de produtos sem padrões de fabricação e, conseqüentemente, qualidade.

Nesse aspecto, deve-se ressaltar que a estabilidade química das soluções de hipoclorito de sódio é relativamente fácil de ser controlada, porém é importante que a titulometria, método bastante conhecido e consagrado para a verificação do teor de cloro residual livre, seja feita com rigor, inclusive da padronização da solução titulante, o tiosulfato de sódio. Cada mililitro dessa solução, durante a titulação, equivale a 3,546 mg de cloro e, a não observação a esses critérios citados na metodologia deste trabalho, induz ao erro o que pode tornar a concentração verificada equivocada; daí o extremo cuidado deste trabalho em desenvolver soluções bastante quantificadas.

Segundo Thé, Maltha e Plasschaert (1980), a determinação da concentração clínica ideal do hipoclorito de sódio não deve ser baseada na intensidade de resposta inflamatória do tecido conjuntivo, mas sim pela ação solvente desses hipocloritos, bem como pelo seu efeito antimicrobiano.

Diante disso, este trabalho avaliou a resposta inflamatória do subcutâneo de ratos das soluções de hipoclorito de sódio nas concentrações 0,5%, 1%, 2,5% e 5% e cada uma delas nos valores de pH 7, 9 e 11.

Essas soluções foram escolhidas por serem as mais relatadas em trabalhos científicos e mais utilizadas clinicamente.

As análises dos cortes histológicos dos animais sacrificados três dias após a aplicação das soluções mostraram que as feridas onde se aplicaram as soluções de hipoclorito de sódio 0,5%, 1%, 2,5% apresentaram intenso infiltrado inflamatório polimorfonuclear e mononuclear, sendo que a intensidade deste infiltrado e do edema foi proporcional à concentração, ou seja, quanto maior a concentração, maior a intensidade da resposta. Da mesma forma, analisando-se os diferentes valores de pH utilizados, verificou-se que a intensidade da resposta inflamatória e do edema também foi proporcional ao valor de pH da solução utilizada, porém todos apresentavam intenso infiltrado inflamatório, com edema intenso, grande quantidade de vasos sanguíneos em formação, confirmando os achados de Álvares (1972) e Chvapil (1967), onde a evolução da ferida, independente do agente agressor utilizado, encontra-se na fase inicial, com intensa reação inflamatória, provocada não só pela substância química utilizada, mas também pelo trauma da realização da ferida. Porém, no grupo onde se utilizou as soluções de hipoclorito de sódio 5%, pH 7, 9 e 11, a análise dos cortes histológicos mostrou intensa destruição tecidual, independente do valor de pH utilizado, mostrando que além de reação inflamatória, a substância utilizada foi tão agressiva que destruiu o tecido no qual foi aplicado.

Os resultados da análise histológica dos animais sacrificados em sete dias mostraram que: O grupo controle mostrou ferida totalmente epitelizada com queratinização parcial, porém ainda com intenso infiltrado inflamatório mononuclear e com polimorfonucleares, de acordo com a evolução natural da resposta inflamatória encontrada por Álvares (1972) e Chvapil (1967). Porém nos grupos onde foram aplicadas as soluções de hipoclorito de sódio verificou-se que no grupo

de 0,5% a reação inflamatória foi proporcional ao pH da solução, ou seja, a ferida onde se aplicou pH 7 mostrou início da migração epitelial, com diminuição do edema na extensão da ferida. O grupo onde foi aplicada a solução com pH 9 também mostrou início da migração epitelial, porém ainda edema intenso em toda extensão da ferida com intenso infiltrado inflamatório. E no grupo onde se aplicou solução pH 11, a ferida ainda apresentava-se recoberta por fibrina e restos epiteliais, com edema muito intenso.

A análise histológica dos animais sacrificados em sete dias, onde se aplicou a solução de hipoclorito de sódio 1% mostraram que o pH 7, da mesma forma que o 0,5% pH 7, apresentava-se em processo de epitelização com diminuição do edema. Porém os grupos pH 9 e 11 mostraram ferida recoberta por fibrina e restos epiteliais, com intenso infiltrado inflamatório e edema intenso. Da mesma forma, os grupos onde se aplicaram as soluções de hipoclorito de sódio a 2,5%, em pH 7 e 9 mostraram início da epitelização e em pH 11 a ferida ainda encontrava-se recoberta por fibrina e restos epiteliais com intenso infiltrado inflamatório e edema intenso. Os grupos onde se aplicaram as soluções a 5%, em todos os valores de pH (7, 9 e 11), a análise histológica mostrou que as feridas encontravam-se recoberta por fibrina e restos celulares, com intenso infiltrado inflamatório. Isto evidencia que a concentração 5%, não mostrou resultados condizentes com os achados das demais concentrações, indicando que o agente agressor foi muito mais irritante, não propiciando o início da reparação tecidual após 7 dias.

A alta da instabilidade química das soluções com pH 7, onde, segundo Ribeiro (2008), 7 dias após a sua formulação, mesmo mantidas sob refrigeração, perdem mais que 10% da sua concentração de cloro inicial, torna estas soluções inúteis para utilização clínica, apesar da sua melhor compatibilidade tecidual já

apresentada aos sete dias após a injúria nos grupos das soluções de hipoclorito 0,5%, 1% e 2,5% [comunicação pessoal]³.

Nos animais sacrificados aos 14 dias, a análise histológica do grupo controle mostrou ferida totalmente epitelizada, presença de lâminas de queratina, condizentes com a evolução do processo de reparação. Nos grupos onde foram aplicadas as soluções de hipoclorito de sódio 0,5%, em todos os valores de pH, a avaliação histológica mostrou feridas totalmente epitelizadas lâminas de queratina na superfície e início da formação dos anexos cutâneos. Sabendo-se que, os grupos de solução 0,5% pH 9 e 11 são estáveis quimicamente, quando corretamente armazenadas, segundo Siqueira et al. (2002). Porém não apresentam uma boa dissolução tecidual, fator praticamente fundamental ao se optar por uma substância química de uso endodôntico (SIQUEIRA; SANTOS; BOMBANA, 2005).

Nos grupos onde se aplicou a solução de hipoclorito de sódio 1%, da mesma forma, nos três valores de pH, observaram-se feridas totalmente epitelizadas e início da formação dos anexos cutâneos. Na concentração de 1%, Ribeiro (2008) mostrou que apenas a solução de hipoclorito de sódio que estava em pH 11 manteve-se estável até o final do estudo, 120 dias [comunicação pessoal]⁴.

A análise histológica dos grupos onde se aplicaram as soluções de hipoclorito de sódio 2,5% em todos os valores de pH, a avaliação histológica mostrou completa epitelização da ferida com início da formação dos anexos cutâneos apenas na solução que estava em pH 7, nas demais soluções (pH 9 e 11), estes estavam ausentes.

³ Ribeiro ECC. Estabilidade química de soluções de hipoclorito de sódio. Comunicação pessoal na FOUSP, 2008.

⁴ Cf. p.57

No grupo do hipoclorito de sódio 5% a análise histológica mostrou que em pH 7 houve epitelização da ferida com início da formação dos anexos cutâneos; em pH 9, houve epitelização da ferida, porém sem a formação dos anexos cutâneos; porém no grupo onde se utilizou a solução em pH 11 a ferida ainda apresentava-se recoberta por fibrina e restos celulares e o processo de migração epitelial ainda não estava completo, na derme, presença de áreas de edema intenso e ausência de anexos cutâneos.

Este trabalho confirma o trabalho de Thé, Maltha e Plasschaert (1980). Os achados aqui observados mostram os danos causados aos tecidos periapicais, em caso de extravasamento de soluções de hipoclorito de sódio muito concentradas.

A intensidade do infiltrado inflamatório, do edema na maior parte da ferida, com não epitelização da ferida, que ocorre com a aplicação das diferentes soluções, indica que a resposta inflamatória ocorre com intensidade diferente nas diversas concentrações e valores de pH.

Pode-se verificar também que a concentração é também fator determinante para o aumento da inflamação, ora representado pela destruição intensa tecidual aos três dias e pela não cicatrização superficial e formação dos anexos cutâneos do grupo do hipoclorito de sódio 5% aos catorze dias. O aumento da inflamação se verifica de maneira diretamente proporcional à concentração de cloro nas soluções de hipoclorito de sódio.

Este trabalho mostra que o aumento do pH não se mostra tão agressivo quanto o aumento da concentração de cloro nas soluções de hipoclorito de sódio.

Sabendo-se que a estabilidade das soluções de hipoclorito de sódio está diretamente ligada ao pH, salienta-se a importância da utilização da solução de hipoclorito de sódio nas concentrações em pH 11, pois de acordo com os estudos de

Ribeiro (2008), este valor de pH foi o único que manteve as soluções de hipoclorito de sódio 1%, 2,5% e 5% estáveis durante 120 dias, quando armazenadas sob refrigeração ([comunicação pessoal])⁵.

Sendo assim, justifica-se a utilização das soluções de hipoclorito de sódio em pH 11, pela insuperável estabilidade química e dissolução de tecido orgânico, já que, apesar de mais agressivas tecidualmente, nas concentrações de 0,5%, 1% e 2,5%, aos catorze dias, pode-se verificar reparação tecidual compatível com os outros valores de pH. Porém não se justifica a utilização da solução de hipoclorito de sódio a 5%, já que esta se mostrou bastante irritante em todos os valores de pH.

⁵ Cf. p.57

7 CONCLUSÃO

Os resultados do presente trabalho permitiram concluir que:

1. Quanto mais altas as concentrações de hipoclorito de sódio maior é a inflamação observada junto ao tecido conjuntivo até 14 dias.
2. Após 14 dias, o processo inflamatório é controlado, independente da concentração ou pH, com exceção do grupo da solução de hipoclorito de sódio 5% pH11.
3. O valor máximo de pH utilizado nas soluções de hipoclorito de sódio não se mostrou tão agressivo quanto ao aumento da concentração desta solução.
4. Ao contrário das demais soluções, a solução de hipoclorito de sódio a 5% apresentou destruição tecidual no tempo inicial de 3 dias.

REFERÊNCIAS¹

Abdullah M, Ng Y L, Gulabivala K, Moles DR, Spratt DA. Susceptibilities of two *Enterococcus faecalis* to root canal medications. J Endod 2005;31(1):30-5.

Abou-Rass M, Oglesby SW. The effects of temperature, concentration, and tissue type on the solvent ability of sodium hypochlorite. J Endod 1981;7(8):376-7.

Alvares S. Contribuição para o estudo histométrico e histoquímico do processo de reparação de lesões obtidas experimentalmente na pele de ratos albinos [Tese de Doutorado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 1972.

Aun CE, Paiva JG. Viabilidade da velocidade de ação germicida do hipoclorito de sódio em função da concentração (Contribuição ao estudo). Rev Assoc Paul Cir Dent 1982;36(5):510-17.

Ayhan H, Sultan N, Çirak M, Ruhi MZ, Bodur H. Antimicrobial effects of various endodontics irrigants on selected microorganisms. Int Endod J 1999;32(2):99-102.

Barbin EL, Spanó JCE, Santos, TC, Guimarães LFL, Pécora JD. Solvent action of sodium hypochlorite on bovine pulp and physico-chemical properties of resulting liquid. Braz Dent J 2001;12:154-7.

Baumgartner JC, Cuenin PR. Efficacy of several concentrations of sodium hypochlorite for root canal irrigation. J Endod 1992;18(12):605-12.

Berber VB, Gomes BPFA, Sena NT, Vianna ME, Ferraz CCR, Zaia AA, et al. Efficacy of various concentrations of NaOCl and instrumentation techniques in reducing *Enterococcus faecalis* within root canals and dentinal tubules. Int Endod J 2006;39(1):10-7.

Blechman H, Cohen M. Use of aqueous urea solution in the field of endodontics: preliminary report. J Dent Res 1951;30(4):503-4.

Bloomfield SF, Sizer TJ. Eusol BPC and other hypochlorite formulations used in hospitals. Pharma J 1985;253:153-7.

¹ De acordo com estilo Vancouver. Abreviatura de periódicos segundo base de dados MEDLINE.

Bombana AC, Paiva JG, Alvares S, Antoniazzi JH. Reação inflamatória do olho de coelho que se segue à instilação de alguns fármacos de uso endodôntico. Rev Assoc Paul Cir Dent 1974;28(4):216-23.

British pharmacopoea compendium. London: Her Majesty's Stationary Office; 1980. p. A46.

Budavari S, editor. The Merck index. 12. ed. Whitehouse station: Merck e Co.,1996. 1741 p.

Byström A, Sundqvist G. The antibacterial action of sodium hypochlorite and EDTA in 60 cases of endodontic therapy. Int Endod J 1985;18(2):35-40.

Callahan JR. Sulfuric acid for opening root canals. Dent Cosmos 1894;36(12):957-9.

Chvapil M. Physiology of connective tissue. London: Butterworths; 1967.

Cobe HM. Investigations of a new dental chemotherapeutic agent in the presence of blood. Oral Surg Oral Med Oral Pathol 1960;13(6):678-85.

Cunningham WT, Balekjian AY. Effect of temperature on collagen-dissolving ability of sodium hypochlorite endodontic irrigant. Oral Surg 1980;49(2):175-7.

Di Mascio P, Medeiros MHG, Bechara, EJH, Catalani LH. Singlet molecular oxygen: generation, reactivity, identification and biological effects. Ciênc Cult 1995;47:297-311.

Dunavant TR, Regan JD, Glickman GN, Solomon ES, Honeyman AI. Comparative evaluation of Endodontic irrigants against *Enterococcus faecalis* biofilms. J Endod 2006;32:527-31.

Estrela C, Estrela CRA, Barbin EL, Spanó JCE, Marchesan MA, Pécora JD. Mechanism of action of sodium hypochlorite. Braz Dent J 2002;13:113-117.

Fabian TM, Walker SE. Stability of sodium hypochlorite solutions. Am J Hosp Pharm 1982;39(6):1016-7.

Fabricius L, Dahlén G, Öhman AE, Möeller AJR. Predominant indigenous oral bacteria isolated from infected root canals after varied times of closure. *Scand J Dent Res* 1982;90:134-40.

Ferrari PHP, Cai S, Bombana AC Effects of endodontic procedures on enterococci, enteric bacteria and yeasts in primary endodontic infections. *Int Endod J* 2005;38:372-80.

Ferraz CCR, Gomes BPFA, Zaia A, Teixeira F, Souza-Filho FJ. In vitro assessment of the antimicrobial action and mechanical ability of chlorhexidine gel as an endodontic irrigant. *J Endod* 2001;27(7):452-5.

Gatot A, Arbelle J, Leiberman A, Yanai-Inbar. Effects of sodium hypochlorite on soft tissues after its inadvertent injection beyond the root apex. *J Endod* 1991;17:573-4.

Gavini G, Aun CE, Pesce HF Análise das condições de limpeza do terço apical do canal radicular após o preparo químico-mecânico. *Rev Odontol Univ São Paulo* 1994; 8:155-62.

Gélinas P, Goulet J. Heat and light stability of eight sanitizers. *J Food Prot* 1982;45(13):1195-6.

Gélinas P, Goulet J, Tastayre GM, Picard GA. Effect of temperature and contact time on the activity of eight disinfectants – a classification. *J Food Prot* 1984;47(11):841-7.

Genaro AR, editor. *Remington's pharmaceutical sciences*. 18. ed. Easton: Mack Publishing Company; 1990. 200 p.

Gernhardt CR, Eppendorf K, Kozlowski A, Brandt M. Toxicity of concentrated sodium hypochlorite used as an endodontic irrigant. *Int Endod J* 2004;37:272-80.

Goldman LB, Goldman B, Kronman JH, Lins PS. The efficacy of several irrigating solutions for endodontics: a scanning electron microscopic study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1981;52(2):197-204.

Goldman M, Goldaman LB, Cavaleri R, Bogis J, Lins PS. The efficacy of several endodontic irrigation solutions: A scanning electron microscopic study. Part 2. *J Endod* 1982;8(11):487-92.

Gomes BPFA, Ferraz CCR, Vianna ME, Berber VB, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. *In vitro* antimicrobial activity of several concentrations of sodium hypochlorite and chlorhexidine gluconate in the elimination of *Enterococcus faecalis*. Int Endod J 2001;34(6):424-8.

Gordon T M, Damato D, Christner P. Solvent effect of various dilutions of sodium hypochlorite on vital and necrotic tissue. J Endod 1981;7(10):466-9.

Grossman LI. Irrigation of root canals. J Am Dent Assoc 1943;30(12):1915-7.

Grossman LI, Meiman B. Solution of pulp tissue by chemical agents. J Am Dent Assoc 1941;28(2):223-5.

Guerisoli DMZ, Sousa Neto MD, Pécora JD. Ação do hipoclorito de sódio em diversas concentrações sobre a estrutura dentinária. Rev Odontol UNAERP 1998;1(1):3-6.

Gursoy UK, Bostanci V, Kosger HH. Palatal mucosa necrosis because of accidental sodium hypochlorite injection instead of anaesthetic solution. Int Endod Journal 2006;39:157-61.

Hand RE, Smith ML, Harrison JW. Analysis of the effect of dilution on the necrotic tissue dissolution property of sodium hypochlorite. J Endod 1978;4(2):60-4.

Koskinen KP, Meurman JH, Stenvall H. Appearance of chemically treated root canal walls in the scanning electron microscope. Scand J Dent Res 1980;88(5):397-405.

Lehninger AL. Princípios de bioquímica. 6^a. ed. São Paulo: Sarvier; 1990.

Manfrini C. Ação bactericida do cloro. Reações do cloro na água. Reações com amônia. Tipos residuais. In: Secretaria dos Serviços e Obras Públicas. Desinfecção de águas. São Paulo: CETESB; 1974.

Marchesan MA; Souza RA; Guerisoli DMZ; Silva RS; Pécora JD. Análise de algumas propriedades físico-químicas das águas sanitárias encontradas no mercado brasileiro Rev Bras Odontol 1998;55(5):301-3.

Mc Comb D; Smith DC. A preliminary scanning electron microscopic study of root canals after endodontic procedures. J Endod 1975;1(7):238-42.

Nakamura H, Asai K, Fujita H, Nakazato H, Nishimura Y, Furuse Y, et al. The solvent action of sodium hypochlorite on bovine tendon collagen, bovine pulp, and bovine gingiva. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1985;60(3):322-6.

Nicoletti MA, Magalhães JF. Estudo de estabilidade de soluções comerciais contendo hipoclorito de sódio (água sanitária) *Rev Farm Bioquím Univ São Paulo* 1995;31(1):53-60.

Moorer WR, Wesselink PR. Factors promoting the tissue dissolving capability of sodium hypochlorite. *Int Endod J* 1982;15(4):187-96.

Okino LA, Siqueira EL, Santos M, Bombana AC, Figueiredo JAP. Dissolution of pulp tissue by aqueous solution of chlorhexidine digluconate and chlorhexidine gel. *Int Endod J* 2004;37(1):38-41.

Oliveira DP, Barbizam JVB, Trope M, Teixeira FB. In vitro antibacterial efficacy of endodontic irrigants against *Enterococcus faecalis*. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 2007;103(5):702-6.

Paiva JG. Contribuição para o estudo, mediante procedimentos histológicos no campo da morfologia e histometria, do processo reparatório de feridas cirúrgicas na pele de ratos com ou sem a interferência de medicamentos [Tese de Livre-docência]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 1974.

Paiva JG, Antoniazzi JH. O uso de uma associação de peróxido de uréia e detergente (tween 80) no preparo químico-mecânico dos canais radiculares. *Rev Assoc Paul Cir Dent* 1973;27(7):416-23.

Paiva JG, Antoniazzi JH. *Endodontia: bases para a prática clínica*. 2^a. ed. São Paulo: Artes Médicas; 1988.

Paiva G, Gutz I, Sampaio JMP, Simões W. Determinação do teor de cloro livre nas soluções de hipoclorito de sódio *Rev Bras Odontol* 1989;46(1):10-6.

Pécora JD, Murgel CA, Savioli RN, Costa WF, Vansan LP. Estudo sobre o "shelf-life" da solução de Dakin. *Rev Odontol Univ São Paulo* 1987;1(1):3-7.

Pécora JD, Murgel CA, Guimarães LF, Costa WF. Verificação do teor de cloro ativo de diferentes marcas de líquido de Dakin encontrados no mercado. *Rev Odontol Univ São Paulo* 1988;2(1):10-3.

Pécora JD, Guerisoli DMZ, Silva RG, Vansan LP. Shelf-life of 5,0% sodium hypochlorite solutions. *Braz Endod J* 1997;2(1):43-5.

Pelczar M, Reid R, Chan ECS. *Microbiologia*. 2ª. ed. São Paulo: McGraw-Hill; 1980.

Pesce HF, Medeiros JMF, Haddad JE. Influência, no pós-operatório, da concentração de hipoclorito de sódio utilizado quando do esvaziamento do canal radicular. *Odontologia USF* 1995;13(1):7-13.

Piskin B, Türkün M. Stability of various sodium hypochlorite solutions *J Endod* 1995;21(5):253-5.

Pontes F, Pontes H, Adachi P, Rodini C, Almeida D, Pinto Jr D. Gingival and bone necrosis caused by accidental sodium hypochlorite injection instead of anaesthetic solution. *Int Endod J* 2008;41:267-270.

Prista LN, Alves AC, Morgado R. *Tecnologia farmacêutica*. 4ª. ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian; 1996.

Radcliffe C E, Potouridou L, Qureshi R, Hababbeh N, Qualtrough A, Worthington H, et al. Antimicrobial activity of varying concentrations of sodium hypochlorite on the endodontic microorganisms *Actinomyces israelii*, *A. naeslundii*, *Candida albicans* and *Enterococcus faecalis*. *Int Endod J* 2004;37:438-46.

Reynolds JEF, editor. *Martindale. The extra pharmacopeia*. 31. ed. London: Royal Pharmaceutical Society, 1996. 1340 p.

Simões W, Sampaio JMP, Debelian GJ. Verificação da tolerância tecidual e poder bactericida do hipoclorito de sódio a 0,5% e 1% usados na clínica odontológica. *Rev Paul Odontol* 1989;11(4):35-8.

Siqueira EL, Nicoletti MA, Santos M, Bombana AC. Influência do pH sobre a estabilidade química do hipoclorito de sódio a 0,5%. *RPG* 2002;9(3):207-11.

Siqueira EL, Santos M, Bombana AC. Dissolução de tecido pulpar bovino por duas composições químicas utilizadas em Endodontia. *Revista de Pós-graduação da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo* 2005;12(3):316-22.

Siqueira EL, Nicoletti MA, Santos M. Avaliação da concentração de cloro em diferentes marcas de Líquidos de Dakin. In: Anais Soc Bras Pesq Odontol 1999;16:117.

Siqueira Jr JF, Machado AG, Silveira RM, Lopes HP, Uzeda M. Evaluation of the effectiveness of sodium hypochlorite used with three irrigation methods in the elimination of *Enterococcus faecalis* from the root canal *in vitro*. Int Endod J 1997;30(4):279-82.

Sjogren U, Figdor D, Persson S, Sundqvist G. Influence of infection at the time of root filling on the outcome of endodontic treatment of teeth with apical periodontitis. Int Endod J 1997;30:297-30.

Soares JA, Pires Jr DR. Influence of sodium hypochlorite-based irrigants on the susceptibility of intracanal microbiota to biomechanical preparation. Braz Dent J 2006;17(4):310-6.

Spratt DA, Pratten J, Wilson M, Gulabivala K. An *in vitro* evaluation of the antimicrobial efficacy of irrigants on biofilms of root canal isolates. Int Endod J 2001;34(4):300-7.

Stewart GG, Cobe HM, Rappaport H. A study of a new medicament in the chemomechanical preparation in infected root canal. J Am Dent Assoc 1961;63(2):33-7.

Stewart GG, Kapssimalis P, Rappaport H. EDTA and urea peroxide for root canal preparation J Am Dent Assoc 1969;78(2):335-9.

Sundqvist G. Bacteriologic studies of necrotic dental pulps. Odontological [Dissertation no. 7]. Umea: University of Umea;1976.

Tanomaru Filho M, Leonardo MR, Silva LA, Anibal FF, Faccioli LH. Inflammatory response to different endodontic irrigating solutions. Int Endod J 2002;35:735-9.

Thé SD. The solvent action of sodium hypochlorite on fixed and unfixed necrotic tissue. Oral Surg Oral Med Oral Pathol 1979;47(6):558-61.

Thé SD, Maltha JC, Plasschaert AJM. Reactions of guinea pig subcutaneous connective tissue following exposure to sodium hypochlorite. Oral Surg Oral Med Oral Pathol 1980;49(5):460-6.

United States pharmacopeia. 23^a. ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention; 1995. p.1957-9.

Vianna ME, Horz HP, Gomes BFPA, Conrads G. *In vivo* evaluation of microbial reduction after chemo-mechanical preparation of human root canals containing necrotic pulp tissue. Int Endod J 2006;39:484-92.

Vicent-Ballereau F, Merville C, Lafleuriel MT. Sodium hypochlorite as disinfectant for injection materials in third world rural dispensaries. Int J Pharm 1989;50(1):87-8.

Yamada RS, Armas A, Goldman M, Lins PS. A scanning electron microscopic comparison of a high volume flush with several irrigating solution. Part 3. J Endod 1983;9(4):137-42.

Walker A. A definite and dependable therapy for pulpless teeth. J Am Dent Assoc 1936;23(2):1418-25.

Witton R, Brennan PA. Severe tissue damage and neurological deficit following extravasation of sodium hypochlorite solution during routine endodontic treatment. Br Dent J 2005;198(12):749-50.

Witton R, Henthorn K, Ethunandan M, Harmer S e Brennan PA. Neurological complications following extrusion of sodium hypochlorite solution during root canal treatment. Int Endod J 2005;38:843-8.