THIAGO CARDOSO BULHÕES BRUM

**Análise química do precipitado formado na reação entre hipoclorito de sódio e
digluconato de clorexidina**

São Paulo
2012

THIAGO CARDOSO BULHÕES BRUM

**Análise química do precipitado formado na reação entre hipoclorito de sódio e
digluconato de clorexidina**

Versão Original

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

Área de Concentração: Endodontia

Orientador: Prof. Dr. Celso Luiz Caldeira

São Paulo

2012

Brum TCB. Análise química do precipitado formado na reação entre hipoclorito de sódio e digluconato de clorexidina. Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências Odontológicas.

Aprovado em: / /

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a). _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Dedico esse trabalho aos meus pais, **Sueli e Gil**, que são os grandes responsáveis por todos os ensinamentos e princípios adquiridos ao longo da vida. Sou extremamente grato por tudo que fizeram por mim.

Ao meu irmão **Felipe**. Grande parceiro e melhor amigo que Deus me deu. Meu acorde dissonante nos momentos excessivamente racionais.

À minha esposa, **Valéria**, parceira escolhida para seguir por toda a vida. Obrigado por compreender minhas ausências. Só você sabe tudo que foi necessário abrir mão para que esse trabalho fosse realizado.

À toda a minha **família** e aos grandes **amigos**.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. **Celso Luiz Caldeira**, pela amizade ao longo de toda a pós-graduação.

Aos amigos **Márcio Ferrarini** e **João Paulo Fernandes dos Santos**, sem os quais esse trabalho não seria possível.

Aos Professores **Marcelo José Pena Ferreira** e **Liliana Marzorati** pela ajuda nessa tese.

À equipe da Central Analítica do IQ-USP, **Alessandra**, **Giovana**, **Janaína** e **Márcio**.

Ao Prof. Dr. **Giulio Gavini**. Obrigado pelas oportunidades.

Aos Professores **Danilo Minor Shimabuko**, **Érico de Mello Lemos**, **Dirce Akemi Sacaguti Kawakami**, **Sérgio Bellacosa**, por todos os ensinamentos ao longo de meu convívio com vocês.

Ao Prof. Dr. **Antônio Carlos Bombana**, *in memoriam*. Pessoa ímpar a todos que tiveram a honra de conhecê-lo.

Aos professores e amigos da **FMU**. Obrigado por todo o suporte durante essa longa jornada.

Aos colegas de USP, UNISANTA e UNICID.

Aos alunos de graduação e pós-graduação. Sempre aprendo com vocês.

Aos colegas mestrandos e doutorandos. Muitos momentos não serão esquecidos.

À CAPES pela bolsa de doutorado.

"O pessimista reclama do vento, o otimista espera que ele mude, o realista ajusta as velas."

Provérbio chinês

"Amo a liberdade, por isso deixo as coisas que amo livres. Se elas voltarem é porque as conquistei. Se não voltarem é porque nunca as possuí."

John Lennon

"Quando fizeres algo nobre e belo e ninguém notar, não fique triste, pois o sol toda manhã faz um lindo espetáculo e no entanto, a maioria da platéia ainda dorme..."

John Lennon

RESUMO

Brum TCB. Análise química do precipitado formado na reação entre hipoclorito de sódio e digluconato de clorexidina [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2012. Versão Original.

O digluconato de clorexidina reage com o hipoclorito de sódio formando um precipitado, que segundo a literatura, é composto por para-cloroanilina (PCA), ou por para-clorofenil uréia (PCU) e para-clorofenilguanidil-1,6-diguanidil-hexano (PCGH). Este estudo visou analisar quimicamente os produtos formados e a presença de PCA no precipitado. Para isso, foi realizada a reação de 50 mL de solução de hipoclorito de sódio a 5% (NaOCl) e de 50 mL de solução de digluconato de clorexidina a 2% (CLX) em proporções iguais (1:1). O precipitado foi separado do sobrenadante e desidratado. A CLX pura, uma amostra do precipitado puro e outra amostra de precipitado com adição de PCA foram diluídas em dimetilsulfóxido deuterado e analisados em ressonância magnética nuclear 1D ^1H (RMN) para verificar, por comparação, a presença da PCA no precipitado e para obtenção dos deslocamentos químicos dos produtos presentes no precipitado. Outra amostra do precipitado, de solução de CLX e de PCA foram separadas em cromatografia líquida de alta eficiência e analisadas em espectrômetro de massa (HPLC-ESI-MS) para identificação dos pesos moleculares dos compostos. A comparação do espectro do precipitado puro e do espectro do precipitado com adição de PCA permitiu analisar que o dubleto presente na região dos compostos aromáticos, referente à PCA, não está presente no espectro do precipitado puro demonstrando que não há PCA no precipitado. A análise do espectro de RMN do precipitado puro sugere que há formação de compostos com um e dois anéis aromáticos. Os espectros de massa permitem sugerir que há quebra da molécula de CLX, pelo hipoclorito de sódio, em sítios específicos (grupo biguanidil) que resultam na formação de fragmentos da molécula de clorexidina que se reorganizam formando oligômeros, ou seja, moléculas em que algumas unidades se repetem e, uma vez formadas, são estáveis e insolúveis em água. É possível concluir que no precipitado não há presença de PCA, sugerindo-se que haja PCGH e outros compostos com pesos moleculares maiores que o da clorexidina, denominados, neste estudo, C3, C4, C5, C6 e C7.

Palavras-chave: Soluções irrigantes. Digluconato de clorexidina. Hipoclorito de sódio. Ressonância magnética nuclear. Cromatografia líquida de alta eficiência. Espectrometria de massa

ABSTRACT

Brum TCB. Chemical analysis of the precipitate formed by mixing sodium hypochlorite and chlorhexidine digluconate [thesis]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2012. Versão Original.

The reaction between chlorhexidine digluconate and sodium hypochlorite result in a precipitate, which according to the literature, is composed of para-chloroaniline (PCA), or para-chlorophenylurea (PCU) and para-chlorophenylguanidyl-1,6-diguanidyl-hexane (PCGH). The purpose of this study was to determine the chemical composition, the relative molecular weight of the compounds and whether PCA is formed in the precipitate. A 2% chlorhexidine digluconate solution was mixed in a 1:1 ratio with 5% NaOCl solution producing the precipitate. It was centrifuged, separated from the supernatant and dried. Pure CHX, the precipitate, as well as a mixture of precipitate and pure PCA were dissolved in deuterated dimethylsulfoxide and then analyzed using one-dimensional ^1H nuclear magnetic resonance (MNR) to determine whether PCA was formed and to obtain precipitate's chemical shifts. Other precipitate, CHX digluconate solution and PCA samples were analyzed using high performance liquid chromatography - electrospray ionization - mass spectrometry (HPLC-ESI-MS). Comparing the spectrum of the precipitate alone and precipitate with PCA allow to identify that PCA doublet peaks are not present in the spectrum of the precipitate alone, demonstrating that there are no PCA in the precipitate. NMR spectrum of the precipitate alone suggests that there is compounds with one and two aromatic rings. Mass spectra suggests that breaks in chlorhexidine molecule on specific sites (biguanidil groups), by sodium hypochlorite, results in fragments that forms oligomers molecules in wich some units are repeated and, once formed, are stable and insoluble in water. On the basis of this study, there is no PCA in the precipitate and suggesting that there may be other compounds like PCGH and others compounds, all of which are bigger in size than CHX, called, in this study, C3, C4, C5, C6 and C7.

Keywords: Endodontic irrigants. Chlorhexidine digluconate. Sodium hypochlorite. Nuclear magnetic resonance. High performance liquid chromatography. Mass spectrometry

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1 - Estrutura molecular da CLX.....	25
Figura 2.2 - Grupo hexileno.....	25
Figura 2.3 - Grupo biguanidil.....	25
Figura 2.4 - Grupo clorofenil.....	25
Figura 2.5 - Mecanismo de quebra da CLX sugerido por Nowicki e Sem (2011)	46
Figura 2.6 - Estrutura molecular da PHMB, apresentada por Santos e Fernandes (2010)	46
Figura 2.7 - Estrutura molecular da alixidina, segundo Kim et al. (2012).....	47
Figura 2.8 - Mecanismo de degradação da CLX proposto por Ha e Cheung (1996).	51
Figura 2.9 - Identificação na figura de mecanismo de degradação da CLX (Figuras 2.10 e 2.11), peso molecular e estrutura molecular proposta para os compostos intermediários de degradação da clorexidina em PCA, segundo Zong (2011)	52
Figura 2.10 - Mecanismo de degradação da CLX sugerido em condições ácidas, segundo Zong (2011)	53
Figura 2.11 - Mecanismo de degradação da CLX sugerido em condições alcalinas, segundo Zong (2011)	53
Figura 2.12 - Estruturas moleculares dos compostos CHCI-B, CHCI-BR e CHCI-D, segundo Uyeda et al. (1996)	54
Figura 2.13 - Estrutura molecular do CHDI-C, segundo Tanaka et al. (2005)	54

Figura 2.14 - Compostos da degradação da CLX e suas fragmentações em espectrometria de massa, segundo Tanaka et al. (2006)	55
Figura 2.15 - Compostos da degradação da CLX, segundo Musteata e Pawliszyn (2005)	56
Figura 2.16 - Compostos da degradação da CLX, segundo Usui et al. (2006).....	56
Figura 4.1 - Amostra de precipitado	61
Figura 4.2 - (A) Esquema do efeito de um campo magnético externo sobre o núcleo do hidrogênio (B) Perturbação do núcleo pelo sinal de radiofrequência (Tangerino, 2006).....	62
Figura 5.1 - Espectro de RMN 1D 1H da clorexidina pura	68
Figura 5.2 - Espectro de RMN 1D 1H do precipitado NaOCl/CLX puro.....	69
Figura 5.3 - Espectro de RMN 1D 1H do precipitado com adição de PCA.....	70
Figura 5.4 - Espectro de massas obtido da solução de PCA. O eixo horizontal (abscissas) representa a relação entre a massa e a carga (m/z) das moléculas ionizadas presentes na amostra. O eixo vertical (ordenadas) representa a abundância relativa dessas substâncias	74
Figura 5.5 - Espectro de massas obtido da solução de digluconato de CLX. O eixo horizontal (abscissas) representa a relação entre a massa e a carga (m/z) das moléculas ionizadas presentes na amostra. O eixo vertical (ordenadas) representa a abundância relativa dessas substâncias.....	75
Figura 5.6 - Cromatograma da separação realizada pelo método isocrático com metanol a 80% por 40 minutos com ionização no modo negativo. O eixo horizontal (abscissas) representa o tempo de retenção em minutos. O eixo vertical (ordenadas) representa a absorção ou absorbância em mAu	75
Figura 5.7 - Espectro de massas obtido pela separação em HPLC no tempo de 4,6 minutos. O eixo horizontal (abscissas) representa a relação entre a massa e a carga (m/z) das substâncias ionizadas presentes na amostra. O eixo vertical (ordenadas) representa a abundância relativa dessas substâncias	76

- Figura 5.8 - Espectro de massas obtido pela separação no tempo entre 6,3 e 7,1 minutos no HPLC pelo método isocrático. O eixo horizontal (abscissas) representa a relação entre a massa e a carga (m/z) das substâncias ionizadas presentes na amostra. O eixo vertical (ordenadas) representa a abundância relativa dessas substâncias.....76
- Figura 5.9 - Cromatograma da separação em HPLC pelo método com gradiente no modo de ionização positivo. O eixo horizontal (abscissas) representa o tempo de retenção em minutos. O eixo vertical (ordenadas) representa a absorção ou absorvância em mAu77
- Figura 5.10 - Espectro de massas obtido pela separação no tempo de 35,4 minutos em HPLC pelo método gradiente. O eixo horizontal (abscissas) representa a relação entre a massa e a carga (m/z) das substâncias ionizadas presentes na amostra. O eixo vertical (ordenadas) representa a abundância relativa dessas substâncias77
- Figura 5.11 - Cromatograma da separação em HPLC pelo método com gradiente no modo de ionização negativo. O eixo horizontal (abscissas) representa o tempo de retenção em minutos. O eixo vertical (ordenadas) representa a absorção ou absorvância em mAu.....78
- Figura 5.12 - Espectro de massas obtido pela separação no tempo entre 33,4 e 33,7 minutos em HPLC pelo método gradiente com ionização no modo negativo. O eixo horizontal (abscissas) representa a relação entre a massa e a carga (m/z) das substâncias ionizadas presentes na amostra. O eixo vertical (ordenadas) representa a abundância relativa dessas substâncias78
- Figura 5.13 - Espectro de massas obtido pela separação no tempo de 44,8 minutos em HPLC pelo método gradiente com ionização no modo negativo. O eixo horizontal (abscissas) representa a relação entre a massa e a carga (m/z) das substâncias ionizadas presentes na amostra. O eixo vertical (ordenadas) representa a abundância relativa dessas substâncias78
- Figura 6.1 - Estrutura molecular da CLX e sinalização da quebra para formação da PCA (quebra da ligação Carbono-Nitrogênio em F-PCA)84

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO DA LITERATURA	17
3 PROPOSIÇÃO	58
4 MATERIAL E MÉTODOS	59
4.1 MATERIAL	59
4.2 MÉTODOS	60
4.2.1 Preparo de amostras.....	60
4.2.2 Análises.....	61
4.2.2.1 Ressonância Magnética Nuclear.....	61
4.2.2.2 Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao espectrômetro de massa	63
5 RESULTADOS.....	67
6 DISCUSSÃO	80
7 CONCLUSÕES	89
REFERÊNCIAS.....	90

1 INTRODUÇÃO

A ciência tem como objetivo principal compreender os fenômenos naturais gerando desenvolvimento para que a condição de vida seja melhorada. As ciências da saúde usam esse conhecimento para combater doenças, aumentar a expectativa de vida e fornecer bem estar a toda a comunidade, seja através dos indivíduos que o produzem ou através dos indivíduos que o consomem.

A doença torna-se, dessa forma, a grande responsável pela evolução, servindo de combustível para elucubrar suas origens e criando estratégias para conseguir controlar ou eliminar os agentes responsáveis.

Em se tratando de preservação dos elementos dentais, as alterações reversíveis, como a desmineralização do esmalte ainda como lesões de cárie incipientes, evoluem para lesões que comprometem a dentina, que se aprofundam gerando, gradualmente, de forma rápida ou lenta, mudanças no complexo dentino/pulpar. Essas alterações inicialmente reversíveis, se tornam irreversíveis ou caminham em direção à necrose pulpar, causando danos aos tecidos periodontais, principalmente na região apical. Todo o processo pode ocorrer de forma assintomática ou sintomática, podendo também, em algumas situações, gerar manifestações sistêmicas.

O comprometimento da polpa se inicia a partir do momento em que microrganismos, ou seus subprodutos, são capazes de gerar uma inflamação irreversível desta, uma vez que o ambiente em que a polpa se localiza impede que fenômenos flogísticos possam recuperar o tecido a contento. Nesse momento, os microrganismos tem condições de invadir a câmara pulpar avançando para a região apical a medida que a necrose pulpar evolui. Assim, segmento após segmento, a polpa sofre a necrose e, em seguida, é modificada pela infecção. Desta forma, a câmara pulpar e todo o sistema de canais radiculares são invadidos pelos microrganismos, que permeiam os túbulos dentinários e finalmente comprometem o periodonto apical.

Assim, na endodontia, o conceito básico passa a ser a desinfecção deste ambiente radicular a fim de promover longevidade ao dente e às estruturas que o suportam.

Takehashi et al. (1965), já demonstraram que na ausência de microrganismos e seus produtos metabólicos, a polpa de ratos *germ-free* tem total condição de retornar a um estado de homeostasia, e mesmo assim não apresentar complicações futuras.

Embora exista uma variedade de técnicas de instrumentação, é frequente a presença de resíduos, bactérias, restos de tecido pulpar e raspas de dentina após o preparo do canal (Yesilsoy et al., 1995), que podem interferir negativamente no processo de reparação.

Fica claro ainda que, sem uma substância capaz de aumentar a permeabilidade da dentina, aliada à desinfecção dos túbulos dentinários, a endodontia não teria alcançado os índices de sucesso que atualmente exhibe, de métodos que aliam eficácia à boa aceitação pelos tecidos vivos.

Ao se conseguir acessar o comprimento total de um canal ou região contaminada através de um instrumento, sendo complementado por substâncias químicas adequadas, tem-se total condição de promover um ambiente asséptico; porém, em muitos casos, esse acesso se torna inviável.

Levando-se em consideração que já foram utilizadas substâncias como ácido sulfúrico (Callahan, 1894) para promover a desinfecção dos canais radiculares, pode-se observar uma evolução bastante importante a partir de meados da década de 20, quando, segundo Zerlotti (1959), deu-se início a era biológica da endodontia.

Este ponto marca a preocupação dos autores em moderar o emprego de substâncias bactericidas enérgicas, como os germicidas fenolados, em geral muito lesivos aos tecidos vivos.

Toma-se como referência ainda as Guerras Mundiais e o atendimento dos feridos para a utilização dos hipocloritos em diversas concentrações, como fator essencial para a condição curativa promovida pela atividade antimicrobiana destes compostos e, a partir daí, seu emprego como substância de escolha para qualquer procedimento que envolva desinfecção.

Walker (1936) introduziu o hipoclorito de sódio (NaOCl) na concentração de 5% na endodontia como substância química, iniciando uma fase em que essa solução seria reconhecida e mundialmente aceita.

No final da década de 40, a clorexidina (CLX) foi desenvolvida nos laboratórios de pesquisa da "Imperial Chemical Industries Ltd., Macclesfield, England". Inicialmente projetada para ser utilizada como agente antiviral da malária,

mas abandonada pela ineficiência, foi redescoberta, na década de 50, como antisséptico de amplo espectro no controle de bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e fungos. A CLX é uma base forte estável. Os sais originalmente produzidos foram o acetato de CLX e o cloridrato de CLX, mas ambos apresentam baixa solubilidade em água sendo substituídos pelo digluconato de CLX, por apresentar maior solubilidade em água (Zamany et al., 2003; Zehnder, 2006).

Vem sendo estudada também a possibilidade da utilização da CLX complementando a ação do NaOCl e do hidróxido de cálcio, de forma associada e em etapas diferentes da terapia endodôntica. As propriedades da CLX somadas as do NaOCl parecem preencher os requisitos da substância química ideal para ser utilizada durante o preparo do canal.

Por outro lado, cabe lembrar que algumas substâncias, quando utilizadas de forma associada, podem resultar na formação de produtos que obliteram a entrada dos túbulos dentinários, impedindo a desinfecção pelos fármacos de uso endodôntico. As associações geram tais produtos que também, por si só, podem causar reações inflamatórias agudas, interferir nos processos metabólicos, ter propriedades mutagênicas ou carcinogênicas e promover alterações celulares de forma nociva aos tecidos e conseqüentemente aos indivíduos.

Tais preocupações continuam sendo postas à prova por pesquisadores, a fim de obter uma substância ou um regime de utilização dessas substâncias, que tenham maior efeito antimicrobiano, grande poder de limpeza e maior biocompatibilidade.

2 REVISÃO DA LITERATURA

O principal objetivo dos tratamentos endodônticos é a remoção de tecidos pulparem inflamados ou necróticos através da modelagem com instrumentos complementado pela ação de substâncias químicas. Ainda não é possível valer-se de uma única substância química ideal que possa cumprir todas as funções desejadas. Sendo assim, utilizamos um número mínimo de substâncias que possam cumprir tais funções. As substâncias químicas podem ser empregadas na forma de medicação intracanal, irrigantes ou lubrificantes; podendo ter suas ações principais voltadas a atividade antimicrobiana, degradação de tecidos orgânicos ou inorgânicos.

Por outro lado, com a evolução dos instrumentos endodônticos, é observado um grande avanço que permite ao profissional, nos dias atuais, utilizar um único instrumento capaz de modelar o canal (Bürklein et al., 2011; Plotino et al., 2012).

Na endodontia existe uma preocupação em buscar instrumentos que tenham uma melhor eficiência de corte, maior flexibilidade e resistência, visando permitir preparos mais seguros e uniformes, que, conjuntamente às substâncias químicas, possam otimizar a capacidade de sanificação ou desinfecção do canal radicular.

Porém, mesmo os instrumentos rotatórios destinados ao preparo de canais radiculares confeccionados em liga de Níquel/Titânio (NiTi), que têm se tornado importante parte no arsenal endodôntico, apresentam algumas limitações (Peters, 2004).

Tais instrumentos têm se apresentado mais vantajosos que os instrumentos manuais feitos de aço inox, pois apresentam maior flexibilidade elástica e maior resistência à torção, além de apresentarem desenhos com propostas diversas. Quando utilizados para instrumentação rotatória automatizada, apresentam ainda um menor tempo de trabalho e limpam uma área maior das paredes dos canais radiculares (Walia et al., 1988).

Ademais, quando empregados de maneira correta, são mais seguros, uma vez que sua utilização mostra um número menor de acidentes como degraus, *zips*, rasgos, perda de comprimento de trabalho, perfurações e fratura de instrumentos (Hülsmann; Stryga, 1993; Hülsmann et al., 1999; Hülsmann et al., 2001).

Tal fato deve-se ao constante desenvolvimento de novas características como variações do tipo: conicidades, secções transversais, pontas, propriedades metalúrgicas da liga de NiTi e na cinemática.

Mesmo com este avanço, vários autores demonstram que, apesar da sujidade ser removida de modo mais eficaz com os instrumentos rotatórios de NiTi, o *smear layer* ainda se mantém presente na maioria dos canais, possivelmente havendo a presença concomitante de bactérias viáveis.

A literatura tem mostrado que essa preocupação já há muito tempo atormenta os profissionais cientes de que, sem uma desinfecção efetiva do canal radicular, certamente o tratamento endodôntico caminhará para o insucesso.

Ingle e Zeldow (1958), por exemplo, estudaram o efeito da instrumentação em 89 dentes comprovadamente infectados. Utilizando como solução irrigadora água destilada estéril, observaram que apenas 27% das culturas se apresentaram negativas imediatamente após o preparo, sendo que em 20% das culturas era notada a reinfecção após 48 horas. Os autores concluíram que apenas a instrumentação não é suficiente para desinfetar os canais radiculares e que a água destilada não tinha ação bactericida, como também não era capaz de agir nos interstícios do canal, onde provavelmente estariam as bactérias.

Portanto, apenas a ação dos instrumentos não é suficiente para se obter uma desinfecção do sistema de canais radiculares.

Assim, alguns autores como Ingle e Zeldow (1958), Grossman (1964), Paiva e Antoniazzi (1988), Cohen e Burns (2000) e Estrela (2004), dão fortes argumentos para a utilização de substâncias químicas e as classificam como imprescindíveis durante o preparo químico-cirúrgico.

Segundo Paiva e Antoniazzi (1988) as substâncias químicas devem possuir ainda as seguintes propriedades:

- Umectar as paredes dentinárias, possibilitando maior rapidez e uniformidade de limpeza;
- Lubrificar o canal, facilitando a ação dos instrumentos;
- Emulsionar as partículas de detritos existentes nas paredes do canal radicular, tornando possível a remoção dos mesmos;
- Ser solúvel em água;
- Ter biocompatibilidade, de modo a não lesar os tecidos vivos do coto pulpar e periodonto apical;

- Ter ação antimicrobiana efetiva;
- Aumentar a permeabilidade dentinária.

Já no entender de Estrela (2004) elas devem:

- Facilitar a ação do instrumento endodôntico;
- Alterar o pH do meio;
- Controlar uma possível infecção em casos de pulpectomia;
- Neutralizar o conteúdo presente nas infecções endodônticas;
- Remover sangue da cavidade pulpar (câmara coronária), prevenindo um possível escurecimento dentário;
- Remover matéria orgânica (restos pulpares) e inorgânica (detritos, raspas dentinárias), liberando e/ou solubilizando o material orgânico;
- Permitir a ação mais direta e intensa do agente antimicrobiano com a microbiota endodôntica;
- Apresentar compatibilidade biológica com os tecidos periapicais.

Segundo Cohen e Burns (2000), o irrigante ideal:

- Deve ser um germicida e um fungicida eficaz;
- Não deve ser irritante para os tecidos periapicais;
- Deve permanecer estável em solução;
- Deve ter efeito antimicrobiano prolongado;
- Deve ser ativo na presença de derivados sanguíneos, sépticos e proteicos dos tecidos;
- Deve ter baixa tensão superficial;
- Não deve interferir no reparo dos tecidos periapicais;
- Não deve manchar a estrutura dos dentes;
- Deve ser possivelmente inativado em um meio de cultura;
- Não deve induzir uma resposta imune celularmente mediada.
- Deve ser capaz de remover completamente a camada de esfregaço e desinfetar a dentina subjacente e seus túbulos.
- Não deve ser antigênico, tóxico e carcinogênico para células teciduais circundantes ao dente.
- Não deve ter efeitos adversos sobre as propriedades físicas da dentina exposta.

- Não deve ter efeitos adversos sobre a capacidade selante de materiais obturadores.
- Deve ter uma aplicação conveniente.
- Deve ser relativamente barato.

A substância que melhor preenche os requisitos de substância química a ser utilizada durante os procedimentos de modelagem e sanificação do canal continua sendo o NaOCl. Ele pode ser preparado pela absorção do gás cloro em solução de hidróxido de sódio mantida em resfriamento (abaixo dos 40 °C):

O hidróxido de sódio e o cloro não são produzidos comercialmente pelo processo cloro-álcali e, em tal processo, não há necessidade de isolá-los para a preparação do NaOCl. Portanto, o NaClO é produzido industrialmente pela eletrólise de uma solução de cloreto de sódio (salmoura) sem nenhuma separação entre o cátodo e o ânodo.

A solução deve ser mantida abaixo dos 40° C por serpentinas de resfriamento, para prevenir a formação de clorato de sódio.

As soluções comerciais de NaOCl sempre contêm quantias significantes de cloreto de sódio como o principal subproduto, como pode-se ver na equação acima.

O uso do NaOCl em altas concentrações foi preconizado por Grossman e Meiman (1941), para degradar os produtos protéicos presentes no interior do canal radicular, a fim de propiciar sua remoção.

Porém, alguns autores como Becker et al. (1974), Bhat (1974), Cohen e Burns (2000) relataram que o NaOCl em concentrações elevadas pode ser extremamente agressivo aos tecidos vivos.

Grossman (1964) apresentou em 1943 um método para irrigação dos canais radiculares com NaOCl a 5% associado ao peróxido de hidrogênio a 3%. Essa alternância produzia uma reação de efervescência, favorecendo a eliminação de restos orgânicos e dentina resultantes da instrumentação, deslocando-os para a câmara pulpar.

Preocupados com o poder de efervescência das substâncias, Paiva e Antoniazzi (1988) iniciaram o emprego experimental de uma combinação de

peróxido de uréia e detergente, veiculados numa base de Carbowax[®]. Chegaram à fórmula do Endo-PTC[®] (associação de peróxido de carbamida 10%, Tween 80 a 15% veiculados em uma base de Carbowax[®] 75%), que reage com o NaOCl a 0,5% durante o preparo químico-cirúrgico dos canais radiculares, mostrando ser uma substância bem tolerada pelos tecidos periapicais e que a reação de efervescência entre o Endo-PTC[®] e o NaOCl a 0,5% eliminava restos de dentina, bactéria e outros produtos tóxicos, bem como produzia a liberação de oxigênio nascente.

Neste rumo, Bombana et al. (1974), observaram a reação inflamatória em olho de coelho quando em contato por 10 minutos com substâncias preconizadas na técnica de Varella e Paiva (1969), com a utilização de NaOCl a 0,5% reagindo com o Endo-PTC[®], Furacin/Tergentol e, posteriormente, uso ou não de corticosteróide/antibiótico (grupo I e II) e na técnica proposta por Grossman (1964), com soda clorada reagindo com água oxigenada – 20 volumes (grupo III). Concluiu então que, a resposta inflamatória observada no grupo I e II foi reversível e bem tolerada pelos tecidos vivos, e que o grupo III apresentou respostas inflamatórias bem mais severas, denunciando a má tolerância dos tecidos conjuntivos aos fármacos empregados.

Já Aun e Paiva (1982), observaram a ação antibacteriana do NaOCl em concentrações de 0,5; 1,0 e 1,5% durante 1, 5, 15 e 30 minutos de permanência em 60 dentes humanos unirradiculares extraídos, portadores de polpas clinicamente mortificadas e com teste bacteriológico positivo. Os autores concluíram que a variação da concentração e também do tempo de contato são capazes de modificar a ação antibacteriana de uma substância de NaOCl.

Foley et al. (1983) avaliaram o efeito antimicrobiano do Clorox[®] (NaOCl a 5,25%) e Gly-oxide[®] (peróxido de carbamida a 10%) sobre *Bacteroides melaninogenicus* e *Peptostreptococcus anaerobius*. O estudo constou de dois experimentos. No primeiro, analisaram a ação de algumas diluições das soluções testadas sobre os microrganismos indicadores nos períodos de 15, 30 e 45 segundos, 1 e 10 minutos, 1 e 24 horas. No segundo, 100 dentes humanos unirradiculares foram instrumentados e então inoculados com os microrganismos indicadores, e incubados por 48 horas a 37° C em condições de anaerobiose. Após estes procedimentos fez-se a irrigação do canal radicular com as soluções testadas, seguida de irrigação com solução fisiológica. Coletou-se material do interior do canal radicular e procedeu-se a incubação em anaerobiose a 37° C. Os autores

concluíram que as soluções Clorox® e Gly-oxide® foram eficazes e, à medida que foram feitas diluições, a efetividade antimicrobiana foi reduzida, sendo que o Clorox® apresentou eficácia antimicrobiana superior ao Gly-oxide®.

Já Byström e Sundqvist (1985) analisaram a eficácia antimicrobiana do NaOCl a 0,5% e a 5%, e do NaOCl a 5% associado ou não ao EDTA. Foram utilizados 60 dentes humanos unirradiculares com necrose pulpar, divididos em três grupos de 20 dentes. As coletas microbianas foram feitas logo após a abertura coronária, dois dias após o preparo do canal com as soluções e na terceira sessão, após nova instrumentação e colocação de medicação intracanal. As amostras analisadas permitiram aos autores concluir que, o emprego do NaOCl associado ao EDTA apresentou os melhores resultados, uma vez que ocorreu a remoção da lama dentinária das paredes do canal radicular, o que promoveu ação mais efetiva do NaOCl a 5%. Quanto ao emprego isolado do NaOCl a 0,5% e do NaOCl a 5%, não foi possível observar nenhuma diferença clínica significativa.

Harrison et al. (1990) estudaram as propriedades antimicrobianas do NaOCl a 2,62% e 5,25% sobre *Enterococcus faecalis* e *Candida albicans*, em períodos variando de 15 a 120 segundos. Sessenta cones de papel absorvente esterilizados foram contaminados durante 3 a 4 minutos nas suspensões microbianas. Após 45 segundos de exposição ao NaOCl a 5,25% e 60 segundos de exposição ao NaOCl a 2,62%, não houve o crescimento de *Enterococcus faecalis*. A *Candida albicans* foi eliminada após 15 segundos de exposição a ambas as soluções testadas.

Souza et al. (1992) estudaram a atividade antimicrobiana do NaOCl em diferentes concentrações (1,0%, 0,5%, 0,25% e 0,12%) e em diferentes períodos (15, 30, 45, 60 e 75 segundos). Cones de papel absorvente esterilizados foram contaminados com suspensões de *Enterococcus faecalis* e *Candida albicans* durante 4 minutos. Em seguida, os cones foram transferidos para 5 mL das soluções analisadas. Procedeu-se, a seguir, a análise da presença ou não de crescimento microbiano. Os resultados mostraram que em 15 segundos o *Enterococcus faecalis* foi eliminado pelas soluções de NaOCl nas concentrações de 0,5% e 1%. Para este microrganismo, as demais concentrações do NaOCl não foram ativas sequer após 75 segundos de contato. Para a *Candida albicans*, no período de 15 segundos, as soluções de NaOCl nas concentrações de 0,5% e 1% foram eficazes; no período de 45 segundos a solução de NaOCl a 0,25% apresentou ação antimicrobiana,

enquanto a solução de NaOCl a 0,12% não apresentou atividade antimicrobiana em nenhum dos períodos analisados.

O NaOCl também desempenha importante papel na limpeza do superfície do canal radicular. Carvalho et al. (2008) estudaram a capacidade de limpeza de irrigantes e substâncias químicas durante a instrumentação endodôntica, através da análise em microscopia eletrônica de varredura. Trinta e dois dentes humanos unirradiculares foram submetidos a instrumentação radicular padronizada utilizando diferentes irrigantes (n = 8): Grupo 1, NaOCl a 2,5% + EDTA a 17%; Grupo 2, CLX gel a 2% + EDTA a 17%; Grupo 3, Canal Plus + NaOCl a 2,5%; Grupo 4, solução salina + EDTA a 17%. Após a instrumentação, os dentes foram preparados para análise de microscopia eletrônica de varredura, com magnificação de 2000x, para avaliar a limpeza dos terços cervicais, médios e apicais. A área analisada foi quantificada de acordo com a porcentagem de túbulos abertos e os dados foram analisados estatisticamente por análise de variância e teste de Tukey (p=0,05). Os resultados mostraram diferença estatisticamente significativa com a maior quantidade de túbulos abertos nos grupos 1 e 3. Em todos os grupos, o terço cervical obteve limpeza melhor do que a obtida nos terços médios e apicais, com diferença estatisticamente significativa no grupo da CLX. A irrigação com Canal Plus® em combinação com NaOCl e NaOCl seguido de EDTA produziu uma melhor limpeza das paredes do canal radicular.

Além da capacidade antimicrobiana, convém analisar também o potencial de dissolução de conteúdo orgânico, essencial para a promoção de desinfecção e eliminação de restos teciduais.

Spanó (1999) avaliou a dissolução de tecido pulpar bovino, promovida por soluções de NaOCl nas concentrações de 0,5; 1; 2,5 e 5%; e ainda o potencial hidrogeniônico, a tensão superficial, a condutividade iônica e o teor de cloro, antes e depois da utilização dessas substâncias no processo de dissolução. O autor conclui que, quanto maior a concentração da solução, tanto mais rápido se processa a dissolução do tecido pulpar; quanto maior a concentração inicial da solução de NaOCl, tanto menor foi a redução de seu potencial hidrogeniônico; quanto maior a concentração do NaOCl, maior foi a redução da tensão superficial; quanto maior a concentração de cloro inicial da solução, maior a porcentagem de cloro remanescente.

Okino et al. (2004) estudaram também a dissolução de tecido pulpar bovino, porém, frente à ação das soluções de NaOCl a 0,5; 1,0 e 2,5%, soluções aquosas de CLX a 2% e digluconato de CLX gel a 2%, tendo por controle a água destilada. Os autores verificaram que a capacidade de dissolução é diretamente proporcional à concentração de NaOCl, enquanto que as duas formas de CLX avaliadas não mostraram qualquer ação solvente sobre o tecido.

Siqueira (2004) após observar a dissolução de tecido pulpar bovino usando soluções de NaOCl em concentrações (0,5; 1; 2,5; 5%) e pH (7, 9, 11) diferentes, assim como digluconato de CLX a 2%, ambas em temperaturas de 27 e 37° C, concluiu que as soluções de NaOCl sofrem influência do pH, temperatura e concentração, nessa ordem decrescente, para agir sobre a dissolução do tecido pulpar bovino. Concluiu também que o gel de CLX a 2%, bem como as soluções de NaOCl a 0,5% em pH 7 com temperatura de 27 e 37° C, não dissolvem os fragmentos de tecidos durante o tempo de 120 minutos; a solução de NaOCl em concentrações menores mas com pH 11 mantiveram a capacidade de dissolução tecidual.

A CLX é um composto sintético derivado de uma biguanida, na forma monomérica, que pelas suas características apresenta um alto nível de atividade, própria dos antimicrobianos de amplo espectro. Em função deste grau de atividade, pequenas concentrações de sais de CLX são geralmente suficientes para inibir o processo reprodutivo ou eliminar a maioria das espécies bacterianas Gram-positivas e Gram-negativas, aeróbicas e anaeróbicas e fungos. As concentrações mínimas inibitórias (MIC) situam-se bem abaixo de 4% o que faz da CLX um dos antissépticos de melhor rendimento e total segurança. A solução de CLX mais utilizada na odontologia é o digluconato de CLX. A IUPAC ("International Union of Pure and Applied Chemistry") descreve como:

2-[6-[[amino-[[amino-(4-chloroanilino)methylidene]amino]methylidene]amino]hexyl]-1-[amino-(4-chloroanilino)methylidene]guanidine;2,3,4,5,6-pentahydroxyhexanoic acid

Apresenta massa molecular de 897,75716 g/mol, massa monoisotópica 896,319802 e fórmula molecular " $C_{34}H_{52}Cl_2N_{10}O_{14}$ " e número de registro CAS 18472-51-0 (registro em Pubchem compound, 2012). O digluconato de CLX é um sal solúvel em água. O íon positivo desse sal é a CLX que apresenta a forma molecular " $C_{22}H_{30}Cl_2N_{10}$ ", massa molecular de 505,4460 g/mol, massa monoisotópica de

504,2032 Dalton (Da) e número de registro CAS 55-56-1. A solução comercialmente disponível para análises apresenta concentração de 20% do sal em água (digluconato de CLX a 20%, Sigma-Aldrich, WGK, Germany). A estrutura molecular da CLX pode ser vista na Figura 2.1.

Figura 2.1 - Estrutura molecular da CLX

A CLX possui na sua estrutura molecular que pode ser descrita como sendo um grupo hexileno (Figura 2.2), com dois grupos guanidil (Figura 2.3) nos carbonos da extremidade e um grupo clorofenil (Figura 2.4) ligado a cada grupo guanidil.

Figura 2.2 – Grupo hexileno

Figura 2.3 - Grupo biguanidil

Figura 2.4 - Grupo clorofenil

O mecanismo de ação dos compostos derivados de biguanidas vem sendo estudado por vários cientistas ao longo de décadas. Baseado no trabalho destes cientistas, a sequência bactericida proposta pela Imperial Chemical Industries, começa com uma rápida atração da biguanida catiônica na superfície bacteriana negativamente carregada provocando uma falha no mecanismo de defesa da célula e a ruptura da parede da célula. A biguanida então é atraída para a membrana citoplasmática, onde causa a perda de substâncias de baixo peso molecular, tais como íons de potássio, cálcio e a inibição de enzimas responsáveis pela união da membrana, tais como o ATPase. A grande ruptura subsequente da membrana citoplasmática pode levar à perda de substâncias macromoleculares (ex. nucleotídeos) e à precipitação das substâncias celulares (Santos; Fernandes, 2010; Kim et al., 2012).

O digluconato de CLX vem demonstrando bons resultados na endodontia, sendo comparada ao NaOCl, quando utilizada como substância durante o preparo do canal, e ao hidróxido de cálcio, quando utilizada como medicação intracanal.

Tem se apresentado como possível substituto do NaOCl por apresentar menor toxicidade, ter ação antimicrobiana contra espécies resistentes ao NaOCl, menor tensão superficial e por apresentar ação residual após seu contato com a dentina, fenômeno conhecido como substantividade. Porém, o digluconato de CLX não tem a capacidade de degradar tecido orgânico, um importante requisito das substâncias químicas a serem usadas durante o preparo do canal. Dessa forma, procura-se empregar o digluconato de CLX como medicação intracanal ou como irrigante final com o objetivo de complementar a desinfecção do sistema de canais radiculares.

A eficácia antimicrobiana de irrigantes endodônticos no biofilme de canais radiculares foi avaliada in vitro por Spratt et al. (2001). Foram incubadas as seguintes bactérias: *Prevotella intermedia*; *Peptostreptococcus micros*; *Streptococcus intermedius*; *Fusobacterium nucleatum* e *Enterococcus faecalis*. A incubação durou 15 ou 60 minutos, com 5 ppm de NaOCl 2,25%; CLX 0,2%, iodo 10,0% ou PBS como controle. Iodine e hipoclorito foram mais eficazes que a CLX, com exceção de *P. micros* e *P. intermedium*, onde a CLX foi 100% efetiva. Depois de 60 minutos de incubação, Iodine e hipoclorito foram eficazes em todas as espécies. A *Fusobacterium* só sofreu efeito dos irrigantes depois de 60 minutos, sendo a bactéria resistente. A CLX foi eficaz em 100% após 60 minutos, porém em 15 minutos

reduziu muito pouco o número de bactérias. Concluíram que a eficácia dos irrigantes está na dependência da natureza do organismo do biofilme e do tempo de contato.

Ferraz et al. (2001) avaliaram a ação antimicrobiana e a propriedade mecânica do gel de CLX como irrigante endodôntico in vitro. Primeiramente foi investigada a propriedade do gel de CLX em desinfetar os canais radiculares contaminados com *Enterococcus faecalis*. Microscopia eletrônica foi usada para comparar as propriedades com outros irrigantes mais usados, como o hipoclorito e a CLX líquida. O resultado indicou que o gel de CLX produz uma superfície radicular limpa e possui atividade antimicrobiana comparável a outras soluções testadas. Concluíram que o gel de CLX possui alto potencial como irrigante endodôntico.

Lima et al. (2001) avaliaram a eficácia e as alternativas de medicamentos para eliminar o biofilme dos *Enterococcus faecalis*. Os *Enterococcus faecalis* têm se mostrado um importante agente etiológico no fracasso dos tratamentos endodônticos. Nesse estudo, CLX e medicações baseadas em antibióticos foram testadas para eliminar o biofilme dos *Enterococcus faecalis* in vitro. O biofilme dos *Enterococcus faecalis* foi induzido em membranas de celulose que continham 1 mL dos medicamentos a serem testados. O conjunto foi incubado por 24 horas a 37 °C. O biofilme foi transferido para placas de ágar que continham *Mitis salivarius*, e as colônias foram contadas depois de 48 horas de incubação. Houve grandes diferenças entre as formulações testadas. A associação da clindamicina com metronidazol reduziu significativamente o número de células em um dia de biofilme. No entanto, entre todos os medicamentos testados, somente a CLX a 2% foi capaz de eliminar a maioria de bactérias do biofilme dos *E. faecalis*.

Tanomaru Filho et al. (2002) avaliaram a resposta inflamatória de alguns irrigantes endodônticos injetados no interior da cavidade peritoneal de ratos. Foram utilizados 60 ratos que receberam 0,3 mL de: NaOCl a 0,5%, CLX a 2%, PBS (solução controle). Em cada grupo, 5 animais foram sacrificados após 4h, 24h, 48h, 7dias e líquido da cavidade peritoneal de cada animal foi coletado para contagem de células inflamatórias. Os resultados mostraram que o NaOCl a 0,5% causou irritação tecidual e intensa resposta inflamatória, enquanto que a CLX a 2% mostrou ser biocompatível, podendo sugerir alternativa ou complemento ao hipoclorito durante a irrigação.

Alguns autores demonstram uma característica importante de ação antimicrobiana residual ou substantividade presente no uso CLX.

O efeito antimicrobiano do gluconato de CLX a 2% e o NaOCl a 5,25%, como irrigantes endodônticos, foi comparado in vitro por Jeansonne e White (1994). Foram usados dentes humanos com polpas necrosadas, instrumentados com CLX, NaOCl e solução salina. Amostras microbiológicas foram coletadas: a) imediatamente depois da abertura do canal; b) depois da instrumentação e irrigação; c) depois de ficarem em atmosfera anaeróbica por 24 horas. A irrigação com CLX ou NaOCl reduziu o número de colônias em comparação aos dentes irrigados com solução salina. A diferença entre a CLX e o hipoclorito não foi estatisticamente significativa, porém após 24 horas a eficácia da CLX foi de 83% e do hipoclorito foi 50%, mostrando maior substantividade da CLX.

White et al. (1997) estudaram in vitro a atividade antimicrobiana residual depois da irrigação do canal com CLX. Dentes humanos foram instrumentados com CLX 2% e 0,2%. Depois da instrumentação, os canais foram lavados com água estéril e amostras do seu interior foram retiradas com cones de papel depois de 6, 12, 24, 48 e 72 horas após o tratamento. A atividade antimicrobiana esteve presente em todas as amostras tratadas com CLX a 2% depois de 72 horas. Com CLX a 2% houve uma ação relativamente menor em todas as amostras. Os resultados indicaram que a CLX possui efeito residual na ação antimicrobiana quando usada como irrigante endodôntico.

Leonardo et al. (1999) estudaram in vivo o efeito antibacteriano do gluconato de CLX a 2% como irrigante endodôntico. Para tanto, utilizaram 22 dentes com polpa necrosada e lesão periapical vista radiograficamente. Depois de abertos os canais, amostras microbiológicas foram retiradas com cones de papel. Os canais foram então preparados com limas tipo K e solução de CLX a 2%. Uma bolinha de algodão estéril foi colocada na entrada do canal e este foi selado com óxido de zinco e eugenol temporariamente (48 horas). Uma segunda amostra foi retirada com cones de papel e submetida a análise microbiológica. Os *Streptococcus mutans* que estavam presentes em dez casos, tiveram redução de 100% após a segunda sessão. O tratamento mostrou eficiência de 77,78% sobre microrganismos anaeróbicos depois da segunda sessão. Ficou demonstrado que a CLX evitou a atividade microbiana in vivo com efeito residual, no interior dos canais radiculares, após 48 horas.

Onçağ et al. (2003) compararam o efeito antibacteriano do gluconato de CLX 2%, do NaOCl 5,25% e do Cetrexidin® (gluconato de CLX 0,2% + cetrimide 0,2%), in

vitro e in vivo, e também compararam a citotoxicidade dessas soluções. O efeito desses irrigantes foi analisado in vitro após 5 minutos e após 48 horas a irrigação de dentes extraídos e infectados com *Enterococcus faecalis*. No estudo in vivo, amostras de culturas bacterianas foram coletadas antes do tratamento endodôntico de dentes decíduos infectados; em seguida, as soluções foram usadas para irrigar os canais que depois ficaram vazios por 48 horas. O crescimento de bactérias aeróbicas, anaeróbicas facultativas e anaeróbicas estritas foi comparado antes e após 48 horas da irrigação. Para avaliar o efeito tóxico dos irrigantes, foram aplicadas injeções dessas substâncias no tecido submucoso de ratos, e as reações inflamatórias que ocorreram em 2h, 48h e 2 semanas após as injeções, foram analisadas. Os resultados mostraram que no estudo in vitro, a CLX 2% e o Cetrexidin® foram significativamente mais efetivos sobre o *Enterococcus faecalis* do que o NaOCl 5,25% após 5 minutos. No estudo in vivo, a CLX 2% e o Cetrexidin®, também foram significativamente mais efetivos sobre bactérias anaeróbicas do que o NaOCl 5,25% nas 48 horas. No final de 2 semanas, a toxicidade do NaOCl foi maior do que a dos outros irrigantes. De acordo com os resultados, o Cetrexidin® e a CLX 2% foram mais efetivos, conferiram um maior efeito antibacteriano residual (substantividade) e apresentaram uma menor citotoxicidade, quando comparados ao NaOCl 5,25%.

Khademi et al. (2006) compararam essa ação residual de algumas substâncias de uso endodôntico, sendo elas: gluconato de CLX a 2%, doxiciclina 100 mg/mL e NaOCl em dentina bovina. Foi demonstrado que apenas a CLX apresenta tal característica por um período de no mínimo 28 dias.

Já Oliveira, D et al. (2007), observaram a ação antimicrobiana do gel de CLX a 2% comparado a duas diferentes concentrações de NaOCl (1,5 e 5,25%) contra o *Enterococcus faecalis*. Foram preparados 80 pré-molares humanos com um único canal, autoclavados e infectados por 7 dias com a monocultura bacteriana. Foram então divididos em 5 grupos de acordo com a irrigação a ser utilizada durante a instrumentação. Foram feitas coletas em três tempos diferentes, antes (S1), depois (S2) e 7 dias após o preparo (S3). Os resultados demonstraram que o gel de CLX e o NaOCl a 5,25% reduziram significativamente o número de microrganismos nos tempos S2 e S3 em relação a S1 e o NaOCl a 1,5% também reduziu a quantidade microbiana em S2, porém não permitiu o crescimento em S3, não tendo diferença estatística em relação ao controle. Portanto, o de CLX a 2% e o NaOCl a 5,25% têm

efetividades semelhantes contra o *Enterococcus faecalis* mesmo após 7 dias do preparo e quanto maior a concentração da solução de NaOCl, melhor sua ação antimicrobiana.

Ringel et al. (1982) estudaram in vivo o efeito da clorexidina e do hipoclorito de sódio como irrigante endodôntico. Utilizaram gluconato de CLX a 0,2% e NaOCl a 2,5% em 60 dentes assintomáticos com polpa necrosada. O efeito dos dois irrigantes foi monitorado no início e no término de cada sessão, com amostras microbiológicas de bactérias aeróbicas e anaeróbicas. Para tanto, foram utilizados 52 pacientes. Concluíram que o NaOCl a 2,5% como irrigante endodôntico foi mais eficaz que o gluconato de CLX a 0,2% como agente antibacteriano.

O uso de materiais restauradores resinosos tem se tornado amplamente aceitos nos reabilitação de dentes tratados endodonticamente. No entanto, algumas soluções rotineiramente utilizadas durante os procedimentos endodônticos podem ter um efeito sobre a adesão desses materiais à dentina radicular.

Sendo assim, Erdemir et al. (2004), avaliaram, in vitro, o efeito de vários medicamentos na resistência a microtensão da união material/dentina radicular. Catorze dentes humanos extraídos com raiz única foram utilizados. As coroas e os tecidos pulparem foram removidos. Os canais radiculares, em seguida, foram instrumentados. Os dentes foram aleatoriamente divididos em sete grupos de dois dentes. As paredes da dentina radicular das raízes foram tratadas com NaOCl a 5%, peróxido de hidrogênio (H_2O_2) a 3% e a combinação de H_2O_2 e NaOCl ou CLX a 0,2% por 60 s; ou hidróxido de cálcio ou formocresol para 24 h. Os dentes no grupo de controle foram irrigados com a água. Os canais radiculares foram obturados usando C&B Metabond[®]. Após 24 horas de armazenagem em água destilada, foram realizados cortes transversais de 1 mm de espessura e aproximadamente 12 amostras foram obtidas de cada grupo. Para o teste resistência a microtensão do material/dentina radicular foi utilizada uma máquina Instron. Os dados foram gravados e expressos em MPa. Os resultados indicaram que os tratamentos que utilizaram NaOCl, H_2O_2 ou uma combinação de NaOCl e H_2O_2 diminuiu a resistência de união à dentina radicular significativamente ($p<0,05$). Os dentes tratados com solução de CLX mostraram os maiores valores de força de ligação ($p<0,05$). Em conclusão, CLX é a solução irrigante adequado para o tratamento de canal radicular antes da aplicação de adesivos resinosos.

Outros autores (Santos et al., 2006) avaliaram a influência de irrigantes endodônticos na adesão à dentina da câmara pulpar. Setenta coroas de incisivos bovinos foram cortadas para expor a câmara pulpar. As espécimes foram divididas em sete grupos, de acordo com a solução irrigante usada: G1, NaOCl a 0,9% (controle); G2, NaOCl a 5,25%; G3, NaOCl a 5,25% + EDTA a 17%; G4, CLX a 2%; G5, solução CLX a 2% + EDTA a 17%; G6, CLX a 2% em uma base de gel; e G7, gel de CLX a 2% + EDTA a 17%. Após a irrigação, o adesivo Clearfil SE Bond® foi aplicado na dentina da câmara, seguida por Filtek Z250®. Seis bastões retangulares foram obtidas de cada espécime e a interface dentina/resina foi testada em tensão. As médias das força de adesão foram analisadas e houve uma significativa diminuição na força de adesão associada a utilização do NaOCl, considerando que a irrigação com CLX não mostrou efeitos sobre a aderência. Concluiu-se que irrigantes endodônticos afetam diferentemente a resistência de adesão à dentina de câmara pulpar.

O objetivo do estudo de Ari et al. (2004) foi avaliar o efeito do gluconato de CLX a 0,2% comparado com as soluções irrigantes endodônticas mais utilizadas quanto a aspereza de superfície e microdureza da dentina radicular. Noventa dentes anteriores extraídos foram usados. As coroas dos dentes foram removidas na junção amelo-cementária. As raízes foram separadas longitudinalmente em dois segmentos, incluídas em resina acrílica e então polidas. Um total de 180 espécimes foram divididas em 6 grupos de 30 dentes, de forma aleatória, de acordo com a solução de irrigação utilizado sendo: Grupo 1: NaOCl a 5,25% por 15 min; Grupo 2: NaOCl a 2,5% por 15 min; Grupo 3: H₂O₂ a 3% por 15 min; Grupo 4: EDTA a 17% por 15 min; Grupo 5: gluconato de CLX a 0,2% por 15 min; e Grupo 6: (controle) água destilada. Cada grupo, em seguida, foi dividido em 2 subgrupos de 15 amostras: os grupos 1a, 2a, 3a, 4a, 5a e 6a foram submetidos a testes de microdureza; os grupos 1b, 2b, 3b, 4b, 5b e 6b foram utilizados para determinação da rugosidade da dentina radicular. Os resultados foram analisados estatisticamente, usando ANOVA e testes de Tukey. Os resultados indicaram que todas as soluções de irrigação, exceto a CLX, diminuiram significativamente a microdureza da dentina radicular ($p < 0,05$); H₂O₂ a 3% e digluconato de CLX a 0,2% não apresentaram efeito sobre a aspereza da dentina radicular ($p < 0,05$). Embora haja muitos outros fatores para a preferência de solução de irrigação, de acordo com os resultados deste estudo, gluconato de CLX a 0,2% parece ser um soluções de

irrigação endodôntica apropriada devido ao seu efeito inofensivo quanto a microdureza e aspereza da dentina radicular.

A microdureza e a aspereza de superfície da dentina radicular também foram testadas por Patil e Uppin (2011). Para isso, cento e vinte incisivos humanos permanentes foram selecionados. As coroas dos dentes foram seccionadas e as raízes foram separadas longitudinalmente para obter 240 espécimes. Esses espécimes, em seguida, foram divididas em seis grupos de acordo com as soluções irrigantes. Foram utilizadas soluções de NaOCl a 5% e a 2,5%, peróxido de hidrogênio (H_2O_2) a 3%, EDTA a 17%, gluconato de CLX a 0,2% e água destilada. Em seguida, os espécimes foram submetidos a testes de microdureza e rugosidade. Os dados foram analisados indicando que todas as soluções de irrigação, exceto gluconato de CLX a 0,2%, diminuíram a microdureza da dentina radicular; e que o H_2O_2 e o gluconato de CLX a 0,2% não tiveram efeito na rugosidade da superfície. Pode-se concluir que o gluconato de CLX a 0,2% parece ser a solução de irrigação adequada, por causa do seu efeito inofensivo com relação a aspereza da superfície e microdureza da dentina radicular.

Porém, Oliveira, L et al. (2007), apresentam resultados diferentes quando da avaliação dos efeitos de irrigantes endodônticos sobre a microdureza da dentina radicular. Foram utilizados trinta dentes humanos extraídos com raiz única. As coroas foram seccionadas na junção esmalte/cimento. Cada raiz foi seccionado transversalmente em segmentos cervicais, médios e apicais, resultando em 90 espécimes. As 3 seções de cada raiz foram montadas separadamente em um dispositivo individual de silicone com resina acrílica. Os espécimes foram aleatoriamente divididos em 3 grupos ($n = 30$), de acordo com a solução de irrigante utilizada: (1) grupo 1, controle (solução salina); (2) grupo 2, solução de gluconato de CLX a 2%; e (3) grupo 3, NaOCl a 1%. Após 15 minutos de irrigação, foram realizados os ensaios de microdureza. Os dados obtidos foram analisados utilizando análise de variância e o teste de Tukey (5%). Os espécimes irrigados com CLX a 2% (grupo 2) e com NaOCl a 1% (grupo 3) apresentaram valores inferiores de microdureza da dentina, com diferença significativa em relação ao grupo controle ($p < 0,05$). Foi possível concluir que as soluções de CLX e NaOCl reduzem significativamente a microdureza da dentina radicular.

Alguns autores analisaram ainda a ação da CLX como medicação intracanal, à medida que constatava-se o grande potencial antimicrobiano dessa substância e a possibilidade de utilizá-la como componente auxiliar ao preparo já realizado.

Delany et al. (1982), estudaram o efeito do gluconato de CLX como irrigante radicular em dentes recém-extraídos com polpa necrosada. Quarenta dentes foram tratados endodonticamente simulando condições clínicas. Amostras bacteriológicas foram obtidas antes, durante, imediatamente depois e 24 horas; após instrumentação, irrigação e medicação intracanal; com CLX 0,2% em um grupo e solução salina estéril em outro. Houve alta redução de microrganismos nos dentes tratados com CLX depois da irrigação e instrumentação. Significante redução foi notada no interior do canal depois de 24 horas de ação da CLX. Os dentes tratados com solução salina demonstraram apenas uma pequena redução da flora após os procedimentos biomecânicos. Quando não medicados, notou-se um aumento de 80% de microrganismos nos dentes unirradiculares e 50% nos dentes multirradiculares, provavelmente pela existência de restos teciduais e substratos que contribuem para multiplicação bacteriana. Concluíram que o gluconato de CLX 0,2% pode ser um eficaz agente antimicrobiano quando usado como irrigante endodôntico, ou como medicação intracanal entre sessões para reduzir bactérias restantes no interior do canal radicular.

O objetivo do estudo de Haapasalo et al. (2000) foi investigar a inativação da atividade antibacteriana, pela dentina, de algumas medicações intracanal. As medicações testadas foram: a solução saturada de hidróxido de cálcio, NaOCl a 1%, acetato de CLX a 0,5% e 0,05% e iodeto de potássio iodado a 2/4% e 0,2/0,4%. A dentina foi autoclavada e esmagada na forma de pó com um tamanho de partícula de 0,2-20 μm . Porções de suspensão da dentina foram incubadas com os medicamentos nos tubos de teste a 37° C por 1 ou 24 horas antes de adicionar as bactérias. Em alguns casos, as bactérias foram adicionadas simultaneamente com pó de dentina e o medicamento. Foi utilizado o *Enterococcus faecalis* A197A para o teste. A coleta das amostras, para cultivo bacteriano, foi feita em 5 minutos, em 1 e em 24 horas após ter adicionado as bactérias. O pó da dentina teve efeito inibitório em todas as medicações testadas. O efeito era dependente da concentração das medicações, assim como no tempo em que as medicações eram pré-incubadas com o pó da dentina antes de adicionar as bactérias. O efeito do hidróxido de cálcio no *E. faecalis* foi totalmente inibido pela presença do pó de dentina. O iodeto de potássio

iodado a 0,2/0,4% também perdeu seu efeito após a pré-incubação por 1 hora com a dentina antes de adicionar as bactérias. O efeito da CLX a 0,05% e do NaOCl a 1% sobre *E. faecalis* foi reduzido mas não eliminado totalmente pela presença da dentina. Nenhuma inibição pôde ser observada quando as soluções de CLX e de iodeto de potássio iodado foram utilizadas em suas concentrações máximas contra o *E. faecalis*. O modelo do pó de dentina parece ser uma ferramenta eficiente para o estudo das interações entre medicações, a dentina e os microrganismos. Os autores discutem se a dentina exerce efeito tampão na capacidade de elevação do pH, principal característica do hidróxido de cálcio como medicação intracanal.

Almyroudi et al. (2002) compararam in vitro a efetividade de quatro substâncias químicas usadas como medicação intracanal: hidróxido de cálcio, CLX gel, PerioChip® (uma fórmula de CLX líquida) e CLX gel com hidróxido de cálcio. A solução salina foi usada como grupo controle. As substâncias foram testadas em três diferentes períodos: 3, 8 e 14 dias, utilizando dentes humanos previamente contaminados por *Enterococcus faecalis*. O hidróxido de cálcio eliminou os *E. faecalis* em 3 e 8 dias, mas não foi eficaz no grupo de 14 dias, provavelmente devido a uma queda de pH. A CLX, nas diferentes formulações, foi eficaz em eliminar os *E. faecalis* dos túbulos dentinários, com a CLX gel apresentando os melhores resultados.

Manzur et al. (2007) testaram a ação antibacteriana do hidróxido de cálcio em associação com a CLX, comparado a CLX e ao hidróxido de cálcio na forma de medicação intracanal por 7 dias. Em um estudo in vivo os autores fizeram análise microbiológica de 33 dentes de pacientes que apresentavam periodontite apical crônica em três diferentes tempos: imediatamente antes do preparo, imediatamente depois do preparo e 7 dias após a utilização das medicações em uma segunda sessão. Os autores concluíram que houve redução bacteriana significativa promovida pelo preparo, porém não houve redução estatisticamente significativa entre o período de medicação para nenhuma das medicações intracanal, não havendo também diferença estatística entre elas.

Wang et al. (2007) avaliaram a eficiência clínica da CLX gel a 2% em combater as bactérias intracanal. Para isso, foram feitas coletas de dentes de pacientes com periodontite apical crônica antes (S1), logo após (S2) e 14 dias após o preparo (S3). Os dentes foram preparados com CLX gel a 2% e medicados com a associação desta CLX com hidróxido de cálcio. Foi possível concluir que houve

diferença estatística entre a porcentagem de bactérias entre S1 e S2, mas não entre S2 e S3, portanto a CLX gel a 2% é efetiva na desinfecção de canais radiculares. Os autores ainda discutem que, apesar da medicação intracanal não ter ação desinfetante adicional, ela permitiu a manutenção dos níveis de desinfecção alcançados por 14 dias, pois também não houve aumento estatístico na porcentagem de bactérias.

Krithikadatta et al. (2007) analisaram in vitro o efeito antibacteriano de algumas medicações intracanal frente ao *Enterococcus faecalis*. Foram testadas: a CLX a 2%, o metronidazol a 2%, vidro bioactivo S53P4 (Bioactive glass, BAG) e hidróxido de cálcio. A desinfecção foi testada em duas profundidades: 200 e 400 µm através do desgaste da parede dos canais com brocas Gates Glidden 4 e 5, respectivamente. Os autores concluíram que a CLX gel a 2% apresentou os melhores resultados na desinfecção de canais infectados com *Enterococcus faecalis*, quando comparado às outras medicações testadas.

Neelakantan et al. (2007) demonstram através de teste de difusão em ágar nos tempos de 0, 24, 48 e 72 horas, a ação gel de CLX a 2% e do hidróxido de cálcio. As medicações foram testadas em culturas de *Enterococcus faecalis*, *Candida albicans*, *Porphyromonas gingivalis* e *Prevotella intermedia*. Puderam concluir que, ambas as medicações têm seu efeito diminuído em relação ao tempo e que o hidróxido de cálcio não apresentou efeito após 72 horas. O gel de CLX a 2% apresentou resultados significativamente melhores que os do hidróxido de cálcio.

Também em culturas, mas de *Enterococcus faecalis* e de *Candida albicans*, Ballal et al. (2007) demonstrou resultados semelhantes comparando o hidróxido de cálcio, gel de CLX a 2% e a associação de ambos. Concluíram que o gel de CLX a 2% sozinho apresentou os melhores resultados durante os tempos experimentais.

Gomes et al. (2001) avaliaram, in vitro, a capacidade antimicrobiana de diferentes concentrações do NaOCl (0,5; 1, 2,5; 4 e 5%) e do digluconato de CLX gel e líquido em 3 concentrações (0,2; 1 e 2%) contra o *Enterococcus faecalis*. Foi realizado um ensaio de difusão em meio líquido usando 24 poços e registrando o tempo necessário para que os irrigantes matassem as células bacterianas. Foram utilizadas culturas puras de *E. faecalis* cultivadas em sangue de ovelhas 10% com placas de ágar Brain Heart Infusion (BHI) suspensas em solução salina 0,85% estéril. O nível de turbidez do espectrofotômetro foi ajustado para 0,5 na escala McFarland. Uma quantidade de 1 mL de cada substância foi colocado do fundo dos

poços, incluindo o grupo controle. Foram utilizados 6 poços para cada tempo, de cada concentração. Dois mL da suspensão bacteriana foi misturado com auxílio do ultrassom por 10 segundos e colocado em contato com cada uma das substâncias por 10, 30 e 40 segundos; 1, 3, 5, 10, 20 e 30 minutos; 1 e 2 horas. Após cada período de tempo, 1 mL de cada poço era transferido para um tubo contendo 2 mL de BHI fresco + neutralizador para prevenir ação residual dos irrigantes. Todos os tubos foram incubados a 37° C por 7 dias. Foram considerados com crescimento positivo aqueles que apresentaram turbidez média durante o período de incubação. Os autores concluíram que o tempo necessário para a total eliminação do *E. faecalis* varia de acordo com a concentração e o tipo de irrigante. Os melhores resultados foram atribuídos a solução de CLX a 1 e 2% juntamente com o NaOCl a 5,25%.

A fim de avaliar os efeitos antifúngicos do hipoclorito de sódio e da clorexidina nos canais radiculares, Sen et al. (1999) realizaram um estudo onde foram feitas secções radiculares e a *smear layer* foi removida em metade dos espécies. Todos os dentes foram colonizados com *Candida albicans*. Depois de 10 dias os dentes foram tratados com a solução irrigadora correspondente. Foram utilizados 132 dentes com *smear layer* que receberam: 1% de hipoclorito de sódio (40 dentes); hipoclorito de sódio a 5% (40 dentes); clorexidina a 0,2% (40 dentes) e 12 dentes foram utilizados como controle. Outros 132 dentes sem *smear layer* também foram tratados da mesma forma. Os dois lotes foram testados por: 1, 5, 30 e 60 minutos. Na presença da *smear layer*, a atividade antifúngica de todos os irrigantes só se iniciou após 60 minutos. Nos dentes sem *smear layer* a atividade antifúngica foi superior. Em 30 minutos o NaOCl 5,0% mostrou atividade antifúngica de 70%, e em 60 minutos foi totalmente eficaz. A CLX 0,2% e o NaOCl a 1,0% mostraram eficácia total em 60 minutos.

Taşman et al. (2000) estudaram a tensão superficial dos seguintes irrigantes endodônticos: água destilada; NaOCl 2,5%; NaOCl 5,0%; EDTA 17%; peróxido de hidrogênio 3,0%; Citanest® 3,0% e CLX a 0,2%. A tensão superficial foi medida através do “Ring method” trabalhando com uma temperatura constante de 25° C. Em ordem crescente observaram os seguintes resultados: CLX; NaOCl a 2,5 %, NaOCl a 5%; EDTA a 17%; Citanest®; peróxido de hidrogênio; solução salina e água destilada. Essa menor tensão superficial permite que a CLX penetre melhor nos túbulos dentinários.

Parece interessante a possibilidade da associação dos efeitos complementares: a substantividade, a boa ação antimicrobiana da CLX e do alto poder de dissolução tecidual do NaOCl, que também possui efetiva propriedade antimicrobiana.

Kuruville e Kamath (1998) avaliaram a capacidade antimicrobiana de quatro substâncias químicas utilizadas como irrigantes do canal radicular de 40 casos de periodontite apical com lesão radiograficamente visível. As substâncias testadas foram: o NaOCl a 2,5% (G1), a solução de gluconato de CLX a 0,2% (G2), uma solução feita pela associação na proporção 1:1 das duas substâncias (G3) e solução fisiológica a 0,9% (G4). Eram feitas coletas microbianas em dois tempos: antes da irrigação e depois da irrigação. Os resultados demonstraram que houve uma redução do número dos microrganismos analisados de 59,4% no G1, 70% no G2, 84,6% no G3 e 25% no G4. Os autores concluíram que o composto formado pela associação de NaOCl a 2,5% e de CLX a 0,2% foi significativamente melhor que o NaOCl a 2,5%; mas não houve diferença estatística entre a combinação e a CLX 0,2% sozinha com relação à desinfecção através da irrigação. Todos os grupos apresentaram melhores resultados com relação a irrigação com solução fisiológica a 0,9%. Os autores também relatam que há o surgimento de uma substância com coloração marrom, quando da associação, que permanece na parte interna das raízes após a irrigação, mas que esta não é observada na porção externa das raízes.

White et al. (1999) também preconiza o uso da CLX após a utilização do NaOCl durante a fase de preparo, como um irrigante final do canal. Os autores afirmam ainda que o produto acastanhado formado da associação das substâncias é facilmente removido com o auxílio de um instrumento endodôntico e mesmo que não seja removido, não compromete esteticamente a superfície externa da raiz do dente.

Zenhder (2006) propõe um regime de irrigação com utilização do NaOCl como substância durante os procedimentos de sanificação e modelagem do canal radicular e uma irrigação final com CLX com o objetivo de complementar a desinfecção, o autor alerta apenas que deve haver uma irrigação intermediária com EDTA para a remoção dos resíduos do NaOCl para que não ocorra reação entre este e a CLX.

Porém, Siqueira Jr (1997) se contrapõe aos referidos autores, discutindo que as duas substâncias não devem ser usadas conjuntamente, porque ocorre uma

reação química gerando pigmento vermelho ou castanho, que impregna a intimidade da dentina, dificultando sua remoção.

O *Enterococcus faecalis* tem a capacidade de aderir ao substrato de dentina. Portanto, mesmo após o preparo, se tais bactérias permanecerem no interior do canal, esta capacidade promove o início da formação do biofilme, possibilitando um futuro insucesso nos tratamentos endodônticos. Foi pensando nisso, que Kishen et al. (2008) estudaram a capacidade de diminuir a adesão do *E. faecalis* de alguns regimes de irrigação. Foram testadas irrigações com: EDTA e posteriormente NaOCl, NaOCl e posteriormente EDTA, NaOCl seguido de EDTA e posteriormente NaOCl, NaOCl seguido de EDTA e posteriormente CLX, EDTA seguido de NaOCl e posteriormente CLX e apenas CLX. Os autores concluíram que, o regime de irrigação que mais diminui a capacidade de adesão do *E. faecalis* é a seguinte: NaOCl seguido de EDTA e posteriormente CLX. Porém, os autores discutem que deve-se tomar cuidado quando se utiliza CLX e NaOCl juntos em regimes de irrigação.

É importante citar que a CLX, assim como o NaOCl, apresenta instabilidade, e possível degradação, quando submetida a determinadas condições de temperatura e luminosidade.

No estudo de Jaminet et al. (1970) já havia sido sugerida a degradação da CLX em para-cloroanilina (PCA). Os pesquisadores avaliaram, por meio de exames da densidade óptica de soluções, a estabilidade da CLX a 0,02% frente a dois processos de esterilização em função de diferentes valores de pH. Os jatos de vapor de água a 100° C por 1 hora não degradaram nem produziram para-cloroanilina significativamente. A esterilização em autoclave possibilitou a hidrólise da CLX gerando PCA em quantidade que foi tão maior quão mais elevado o valor do pH da solução (4,7; 6,3; 7,3; 8,4; e 9,0). A esterilização, em autoclave, da CLX, em pH original, produz discreta decomposição térmica com pequena produção de PCA. Os autores observaram que a hidrólise da CLX provoca redução mínima na atividade antimicrobiana da solução e os subprodutos gerados não afetam a sua conservação. Os autores citaram, ainda, que a CLX é incompatível com inúmeras substâncias, ressaltando aquelas com caráter aniônico.

Vicente e Toledo (2003) avaliaram a presença de PCA em carcaças de frango tratadas com digluconato de CLX em função da cocção em forno a gás convencional a 200° C, cozimento em panela de pressão por uma hora e fritura em

óleo de girassol a 180° C por 15 minutos. As análises e identificação foram realizadas por meio da cromatografia gasosa e da espectrometria de massas. Os autores observaram que (1) os dois métodos empregados foram eficientes em identificar a PCA e que (2) o processamento térmico do digluconato de CLX resulta em sua decomposição formando a PCA, sendo que a fritura desencadeia a maior formação dela. Refletiu-se que a presença da PCA em carne de frango, previamente tratada com digluconato de CLX, após o cozimento, cocção e fritura, aliada à sua toxicidade e o risco provável de câncer, deveriam ser levados em consideração na avaliação da segurança desse método de sanitização. Reporta-se, ainda, que os testes de espectrometria de massas de identificação da PCA rastrearam os íons com valores de $m/z = 127$ e 129 com ocorrência daquele com valor de $m/z = 127$.

Usui et al. (2006), utilizando ESI-MS ("electrospray ionization - mass spectrometry") e LC-MS ("liquid chromatography - mass spectrometry"), analisaram um anti-séptico contendo digluconato de CLX a 5,0% adicionado de produto surfactante ("NPEOn - nonylphenolethoxylates"). O objetivo do trabalho foi o de testar o método espectrométrico para análise forense do digluconato de CLX no sangue hemolisado pela administração endovenosa com finalidade de suicídio, como foi reportado caso verídico pelos autores, de mulher de 22 anos, enfermeira, encontrada morta com indícios de auto-administração que, mais tarde, foi confirmada pelos testes relatados logo acima. Os autores ressaltaram alguns picos de grande importância para a detecção do digluconato de CLX como valores de $m/z = 504,2$; $505,2$ e $253,1$. Os valores de m/z de $504,2$ e $505,2$ são característicos da CLX. O valor de m/z de $253,1$ também é relevante para a sua identificação já que trata-se de um íon da CLX duplamente carregado. Os autores propuseram uma via de fragmentação da CLX formando subprodutos também úteis para a sua identificação com valores de m/z de 151 e $334,3$. Os autores concluíram que o digluconato de CLX é eficientemente detectado por ESI-MS e LC-MS.

Isso se torna crítico quando da associação de substâncias, pois a reação entre elas pode levar a degradação de uma, ou ambas, e produzir subprodutos tóxicos aos tecidos periapicais ou que interfiram nos demais passos da terapia endodôntica como a fase de medicação intracanal, quando a permeabilidade se torna importante, ou quando da obturação do sistema de canais.

Vivacqua-Gomes et al. (2002) testaram, em dentes extraídos, a influência dos irrigantes na percolação bacteriana após obturação. Foram testadas as soluções

de NaOCl a 1% isoladamente e com irrigação posterior com solução de EDTA a 17%. Testaram também o gel CLX a 2% isoladamente e com irrigação posterior com o NaOCl. Tiveram melhor resultado os dentes pertencentes aos grupos em que o NaOCl e EDTA foram utilizados, bem como os dentes em que apenas o gel de CLX foi utilizado.

Akisu et al. (2010) compararam o uso combinado de NaOCl e CLX com ácido cítrico e CLX sobre a permeabilidade dentinária e formação de precipitado. Trinta e quatro dentes anteriores superiores foram modelados com instrumentação rotatória e NaOCl. As superfícies do canal radicular foram condicionadas para remoção de magma dentinário com solução de AC a 15% sob ativação ultrassônica e uma lavagem final com água destilada. Todos os dentes foram secos e 30 espécimes foram aleatoriamente divididos em três grupos iguais da seguinte forma: grupo controle positivo (PC), sem irrigação; AC a 15% + grupo CLX a 2% (AC + CLX); NaOCl a 1% + grupo CLX a 2% (NaOCl + CLX). Todas as raízes foram imersas em uma solução de rodamina b de 0,2% para 24 horas. Cortes de 1 milímetro de espessura da junção cimento-esmalte foram digitalizadas em 400 dpi e analisados utilizando o software ImageLab (LIDO-USP, São Paulo, Brasil) para a avaliação da infiltração. Para a análise em microscopia eletrônica de varredura, quatro dentes, irrigados com NaOCl + CLX, foram divididas na metade e cada terço foi avaliado em 1.000x e 5.000x (na região com precipitado). Usando o teste de análise de variância seguido pelo método de comparação de Bonferroni, nenhuma diferença estatística entre os grupos foram encontradas quando analisados os terços cervical e médio. No terço apical, houve diferença estatística entre o PC e NaOCl + CLX ($p < 0,05$) e CA + CLX e NaOCl + CLX ($p < 0,05$). Os autores puderam concluir que a combinação de NaOCl 1% e CLX a 2%, ambas em solução, resultam na formação de um precipitado que age como uma camada de *smear layer* químico, reduzindo a permeabilidade dentinária no terço apical.

Basrani et al. (2007), no intuito de analisar, de forma qualitativa e quantitativa, o produto da associação de NaOCl e do gluconato de CLX utilizaram espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios-X (XPS, do inglês X-Ray Photoelectron Spectroscopy) e da Espectrometria de massa de íons secundários (TOF-SIMS Time-of-flight secondary ion mass spectrometry). Foram analisadas 9 diferentes concentrações de NaOCl com CLX a 2%. Foram analisadas: alteração cromática das associações, formação de precipitado e características químicas do

precipitado. Os resultados demonstraram que há reação das substâncias, mesmo nas mais baixas concentrações de NaOCl. Há formação do precipitado em concentrações a partir de 0,19% de NaOCl. Também foi possível observar a presença de PCA com relação diretamente proporcional a concentração do NaOCl, o que sugere que o precipitado seja formado principalmente por este produto.

Para complementar este estudo, o mesmo grupo de pesquisadores (Basrani et al., 2010), analisou a presença de 4-cloroanilina e seus isômeros, 2-cloroanilina e 3-cloroanilina, comparando novamente o precipitado a estas substâncias em cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massa (“Gas chromatography-mass spectrometry” ou CG-MS). Os resultados mostraram uma ausência de outros derivados de anilina no precipitado. Apenas 4-cloroanilina foi encontrado. Os autores enfatizam que até que o precipitado seja melhor estudado parece prudente minimizar a sua formação, evitando o uso de CLX juntamente com NaOCl.

O objetivo do estudo de Bui et al. (2008) foi avaliar o efeito da irrigação dos canais com a combinação de NaOCl e CLX na superfície e nos túbulos dentinários usando o microscópio eletrônico de varredura ambiental (MEVA). Foram preparados 40 dentes humanos e irrigados com solução de NaOCl a 5,25% e solução de CLX a 2% a fim de formar o precipitado. Nos dois grupos experimentais foi realizado o preparo com NaOCl a 5,25% e irrigação final com EDTA. Após esse preparo, os dentes do grupo A foram irrigados com 5 mL de NaOCl, que foi deixado preenchendo o canal e realizada irrigação com 5 mL de CLX. Os dentes foram então secos com cones de papel absorvente. Os dentes do grupo B foram irrigados com 5 mL de NaOCl, secos com cones de papel absorvente e então irrigados com 5 mL de CLX, a fim de promover uma mínima formação do precipitado. Os dentes dos grupos controle positivo foram irrigados com 5 mL de NaOCl e deixados para secagem naturalmente, já os dentes do grupo controle negativo foram irrigados com 5 mL de NaOCl e secos com cones de papel absorvente. Um grupo apenas com a irrigação de CLX foi descartado, uma vez que esta não tem a capacidade de degradar tecidos orgânicos remanescentes. Foram analisadas as paredes desses canais sob a luz do MEVA. Foram determinados: o número de túbulos abertos (ou patentes) e a quantidade de debris presente nas amostras. Os resultados demonstraram que não houve diferença estatística entre os grupos experimentais e o grupo controle negativo com relação à quantidade de debris. Houve diferença estatística entre o número de túbulos abertos do grupo controle negativo e os demais grupos. Os

autores concluíram que o precipitado formado entre a CLX e o NaOCl tende a obstruir a entrada dos túbulos dentinários e alertam para que cuidados sejam tomados com relação à associação, enquanto o precipitado não for exaustiva e corretamente estudado.

Marchesan et al. (2007) avaliaram a presença de metais na formação do precipitado formado entre CLX e NaOCl, através da espectrofotometria de absorção atômica. Os autores também avaliaram a capacidade de formar o precipitado em diferentes concentrações das substâncias e a capacidade de dissolver o precipitado de algumas substâncias. Foram reagidas 3 concentrações de soluções de NaOCl (0,5; 2,5 e 5%) com 2 concentrações de CLX (0,2 e 2%). Foram testados 4 solventes. Observou-se a formação do precipitado em todas as associações das concentrações e proporções das substâncias. Também foi observada, no precipitado, a presença de cálcio, ferro e magnésio. Quanto aos solventes, metanol e hexano por serem solventes universais (“similar dissolve similar”) foram usados para substâncias polares e apolares, respectivamente. Como só o metanol dissolveu o precipitado e este não deve ser usado in vivo, o ácido acético puro foi testado, pois também tem baixa polaridade, também dissolvendo o precipitado. Além disso, o vinagre comum (ácido acético a 0,1 mol/L) também foi testado. Este dissolveu o precipitado, porém manteve a coloração marrom da solução.

Parece mais prudente evitar a formação do precipitado NaOCl/CLX que dissolvê-lo depois de formado, uma vez que a reação pode ocorrer na intimidade da dentina obliterando os túbulos dentinários.

Com o objetivo avaliar a espessura máxima e composição química do precipitado formado entre o NaOCl e CLX; e avaliar a eficácia do álcool absoluto para remover NaOCl residual e assim, evitar a formação do precipitado, Krishnamurthy e Sudhakaran (2010) realizaram o seguinte experimento. Quarenta dentes humanos extraídos foram instrumentados. No grupo controle (Ts) os canais foram irrigados com EDTA a 17% e 2,5% NaOCl 2,5%, seguido por CLX 2,%. Nos demais grupos foi realizada irrigação intermediária, após o uso da NaOCl e antes da irrigação com EDTA e CLX, com as seguintes substâncias: álcool absoluto (Aba), solução salina (Sa) e o água destilada (Dw). Os dentes foram seccionados longitudinalmente e submetidos a um exame com o estereomicroscópio. As amostras do grupo Ts mostraram o precipitado marrom mais concentrados nos terços médio e no coronário. O grupo Aba não mostrou nenhuma evidência de

precipitado. Os grupos de Sal e Dw mostraram mínimas quantidades de precipitado nos terços médio e coronário. A espessura do precipitado foi medida utilizando o software ProgRes (Olympus, Hamburgo, Alemanha). A composição química do precipitado foi confirmada pelos testes de Beilstein, do HCl e de RMN que demonstrou a presença do cloro na posição para do anel de benzeno. A interação entre o NaOCl e CLX resultou em um sal insolúvel neutro como um precipitado que pode ser evitado com o uso de álcool absoluto e minimizado usando solução salina ou água destilada como irrigantes intermediários.

Porém, Brum (2008), realizando trabalho semelhante, com o objetivo de avaliar as consequências da utilização do NaOCl a 1% pH 9 como substância durante o preparo e do gel de CLX a 2% como medicação intracanal em diferentes condições, sob a luz do microscópio eletrônico de varredura ambiental (MEVA). Cinquenta pré-molares humanos inferiores foram preparados com ProTaper Universal, sendo quarenta com auxílio de NaOCl e Endo-PTC Leve[®]. Outros dez dentes foram preparados apenas com CLX (Grupo 2). Os espécimes foram submetidos à irrigação final com ácido cítrico (Grupos 1 e 2) e com tiosulfato de sódio 10% e ácido cítrico (Grupo 3). Todos os grupos experimentais foram medicados por 7 dias com CLX. Após esse período, a medicação foi removida e foram contados os túbulos visíveis e os túbulos patentes da superfície dentinária, nas imagens obtidas através do MEVA. Houve diferença estatística entre os grupos experimentais e o Grupo controle negativo, exceto no Grupo 3, em que foi utilizado o tiosulfato. Portanto, apenas quando o NaOCl foi inativado, pode-se observar quantidades desejáveis de túbulos visíveis e patentes.

Ferreira et al. (2008) avaliaram a capacidade de limpeza de diferentes substâncias químicas ativadas com ultrassom, usando análises morfológicas. Vinte e oito incisivos foram preparados com o sistema Hero 642 seguindo a seqüência: 25/12, 30/06, 35/02 e 40/02. Os espécimes foram então divididos em quatro grupos de sete dentes. Durante a modelagem os dentes foram irrigados com 2 mL de água destilada entre cada instrumento. Cada espécime recebeu irrigação final com 100 mL dos seguintes irrigantes que foram ativados com ultrassom por 3 minutos: Grupo 1 - destilada água; Grupo 2 - CLX a 0,2%; Grupo 3 - NaOCl a 2,5%; Grupo 4 - um filtrado obtido após a combinação de CLX a 0,2% e NaOCl a 2,5%. A região apical foi então submetida ao processamento histológico e analisada usando microscopia óptica. Os grupos Grupos 1 e 2 (água destilada e CLX a 0,2% respectivamente)

apresentaram a maior quantidade de detritos, enquanto que o grupo do NaOCl a 2,5% e do filtrado foram mais eficientes na remoção de detritos. Os autores puderam concluir que não há nenhum benefício adicional na remoção de detritos das paredes do canal radicular quando da irrigação com o filtrado obtido da combinação de NaOCl/CLX quando comparado ao uso de NaOCl sozinho. Os resultados deste estudo sugerem que o tempo de preparação e uso de uma combinação de NaOCl/CLX não justificam o uso quando comparados ao uso de NaOCl sozinho para irrigação do canal radicular.

Porém, deve-se ter cautela ao usar a irrigação ultrassônica passiva associada a CLX. O estudo de Basrani et al. (2009) teve como objetivo usar uma técnica de diazotização para confirmar a presença de uma amina aromática (como a PCA) no precipitado de NaOCl/CLX e também em CLX a 2% em diferentes temperaturas (37° C e 45° C), temperaturas essa que pode ser atingida quando da utilização da técnica de irrigação ultrassônica passiva com o intuito de otimizar a ação das substâncias químicas durante a terapia endodôntica. Os resultados confirmaram a presença de amina aromática no precipitado e na CLX a 45° C.

O objetivo do estudo de Barbin et al. (2008) foi determinar se a PCA e/ou espécies reativas de oxigênio (ROS) são gerados por CLX sozinha ou após CLX é misturada com hidróxido de cálcio, Ca(OH)_2 , em pontos de tempo diferentes. Foi realizada espectrometria de massa para detectar PCA em amostras de CLX 0,2% e Ca(OH)_2 misturadas a CLX 0,2%. Foi usada a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC, a sigla HPLC representa, na língua inglesa, "High-Performance Liquid Chromatography" e possui, como equivalente na língua portuguesa, a sigla CLAE que representa Cromatografia Líquida de Alta Eficiência) para confirmar a presença de CLX na mistura com Ca(OH)_2 . As amostras foram analisadas imediatamente após a mistura e depois de 7 a 14 dias. Durante os intervalos do ensaio, as amostras foram mantidas em 36,5° C e 95% de umidade relativa. PCA foi detectada na solução CLX 0,2% após 14 dias. A mistura de CLX com Ca(OH)_2 liberou ROS em todos os pontos de tempo, mas nenhum traço de CLX estava presente na mistura, resultado de uma degradação imediata do CLX.

Thomas e Sem (2010) também analisaram a presença de PCA na reação NaOCl/CLX. Inicialmente, uma amostra comercialmente disponíveis de acetato de CLX (CLXa) e PCA foram analisados com espectroscopia de ressonância magnética RMN ^1H . As soluções de NaOCl e de CLXa foram aquecidas a 37° C e misturados

produzindo um precipitado marrom. Esse precipitado foi separado ao meio e PCA pura foi adicionado à uma das amostras para comparação antes de cada uma ser analisada pelo RMN. Os picos no espectro resultante da análise de CLXa e PCA foram atribuídos a prótons específicos das moléculas. No espectro da PCA pode se definir um dubleto na região dos compostos aromáticos (dubleto de PCA). Embora o espectro do precipitado puro resultasse em uma combinação complexa de picos, na ampliação não havia nenhum dubleto de PCA. No espectro de precipitado, ao qual foi adicionada a PCA, os picos dubleto de PCA aparecem. Comparando este espectro com a do precipitado puro, o dubleto de PCA não é visível antes de sua adição. Os autores puderam concluir que a reação de NaOCl e CLXa não produz PCA em quantidade mensurável e são necessárias novas investigações para determinar a composição química do precipitado marrom.

O objetivo do estudo de Nowicki e Sem (2011) foi determinar a composição química do precipitado formado pela mistura de NaOCl e da CLX e o peso molecular relativo dos componentes. Usando digluconato de CLX comercialmente disponível a 20%, foi obtida uma solução a 2% através de diluição em água destilada e misturada na proporção 1:1 com NaOCl comercialmente disponível, produzindo um precipitado marrom. O precipitado, bem como uma mistura de precipitado e diacetato de CLX, em seguida, foi analisado usando espectroscopia RMN unidimensional e bidimensional. Os espectros de RMN unidimensionais e bidimensionais foram totalmente elucidativos em termos de deslocamento químicas de todos os átomos de próton (^1H) e carbono (^{13}C) em CLX pura. Isso permitiu identificação dois principais produtos da degradação da CLX, sendo que nenhum deles é a PCA. Ambos os produtos estão relacionados com PCA uma vez que também são compostos parasubstitutos do anel benzênico. Baseado em dados do RMN e um mecanismo proposto de degradação de CLX, os produtos parecem ser para-clorofenil uréia (PCU) e para-clorofenilguanidil-1,6-diguanidil-hexano (PCGH). Os autores puderam concluir que o precipitado formado na reação do NaOCl e CLX é composto de, pelo menos, duas moléculas separadas, que são menores em tamanho que CLX. Junto com CLX nativa (não degradada), o precipitado contém dois fragmentos químicos derivados da degradação da CLX (PCU e PCGH) não havendo a presença de PCA. O mecanismo de quebra da molécula de CLX sugerido pode ser observado na figura 2.5.

Figura 2.5 - Mecanismo de quebra da CLX sugerido por Nowicki e Sem (2011)

Um composto, também classificado como biguanida, foi descrito por Santos e Fernandes (2010). Os autores visaram comprovar a eficiência da ação bactericida do cloridrato de polihexametileno biguanida (PHMB), na desinfecção de indústrias cervejeiras bem como verificar seu custo benefício. Para tal, utilizou-se o produto Biguatin 400 (que contém 4% do princípio ativo) em diferentes concentrações nos tanques de fermentação de uma planta piloto de cervejaria, seguido de análise microbiológica. Ao final disto, avaliaram-se os resultados que mostraram o grau de eficiência do princípio ativo. A estrutura molecular da PHMB é apresentada na figura 2.6.

Figura 2.6 - Estrutura molecular da PHMB, apresentada por Santos e Fernandes (2010)

Também no grupo das biguanidas está a alexidina (Figura 2.7). A alexidina se difere quimicamente da CLX, pois possui grupos etilhexilo na extremidade da molécula, no lugar do grupo clorofenil. Kim et al. (2012) analisaram em espectrometria de massa de ionização por “electrospray (ESI-MS) e microscopia

eletrônica de varredura (SEM) se a reação química entre a alexidina e o NaOCl resultaria na formação de um precipitado e de PCA. A espectrometria foi realizada em 4 diferentes concentrações de alexidina reagindo com NaOCl a 4% para detectar a presença de PCA. Foram feitas também análises com microscopia eletrônica de varredura para visualização das superfícies dentinárias tratadas com a associação e análise de alteração cromática, *in vitro*, da reação. As análises em ESI-MS não detectaram a presença de m/z 128 (valor de m/z da PCA), o que sugere que a PCA não é formada na reação alexidina/NaOCl. Também não é observada a formação de precipitado na superfície dos canal radiculares tratados com a associação. A coloração da reação varia de cor amarela claro para translúcida com a diminuição da concentração de alexidina. Os autores sugerem que se a ação antimicrobiana da associação, que precisa ser estudada, for maior que a dos compostos isolados, uma biguanida pode ser utilizada em associação com o NaOCl, sem trazer consequências ao tratamento endodôntico.

Figura 2.7 - Estrutura molecular da alexidina, segundo Kim et al. (2012)

A técnica de análise química que utiliza a separação por HPLC acoplada a um detector foi empregada por Rasimick et al. (2008), para determinar se o precipitado formado entre CLX e EDTA envolve a degradação da CLX. O precipitado foi produzido e eluído em uma quantidade conhecida de ácido trifluoroacético diluído. A quantidade de CLX e EDTA presente no precipitado dissolvido foi determinada por HPLC de fase reversa com detecção ultravioleta a 288 nm. Mais de 90% da massa do precipitado demonstraram ser EDTA ou CLX. O restante aparenta ser água, gluconato e sódio. PCA, um produto de decomposição potencialmente cancerígenas de CLX, não foi detectado no precipitado (o limite de detecção foi de 1%). A razão molar de CLX para EDTA no precipitado foi cerca de 1,6:1. Com base

nos resultados, CLX forma um sal com EDTA, ao invés de sofrer uma reação química.

Outros trabalhos também utilizaram a HPLC para verificar a existência de compostos presentes em suas amostras.

Bezerra (2008), com o objetivo de avaliar a adsorção de alendronato de sódio pelo dente utilizando-se a HPLC. Para isto, realizou-se a imersão do dente em frascos contendo soluções deste medicamento nas concentrações de 3,2 Zg/mL (10^{-5} M) e 32,0 Zg/mL (10^{-4} M). Após períodos experimentais de 10, 15 e 30 minutos foram retiradas amostras das soluções para análise da concentração que foi comparada com a do controle que continha apenas a solução, sem presença do dente. Os resultados obtidos mostram que o dente adsorve alendronato de sódio quando imerso em solução e que para a concentração de 3,2 Zg/mL são necessários 15 minutos para que a saturação ocorra, já para a concentração de 32,0 Zg/mL uma elevada média de adsorção foi observada após 10 minutos de imersão.

Lembrando que a eliminação de microrganismos do sistema radicular requer o uso da combinação de soluções de irrigação para aprimorar sua propriedade antimicrobiana, mas que a combinação de irrigantes e suas interações, por vezes, podem ser prejudiciais para o resultado da terapia endodôntica, Ballal et al. (2011) se propuseram a (1) avaliar a interação entre o ácido maleico a 7% (MA) e a solução de gluconato de CLX a 2% e suas disponibilidades como irrigantes individuais; (2) determinar a quantidade de cloro livre disponível quando MA é misturado com solução NaOCl a 2,5%. A interação entre MA e CLX foi avaliada por HPLC. O teor de cloro livre no NaOCl foi avaliado pelo método padrão de titulação iodo/tiosulfato. Observou-se que mais de 90% de MA e CLX livre estavam disponíveis quando MA foi combinada com CLX. Também foi observado que não havia nenhuma formação de precipitado quando MA foi misturado com a CLX. O teor de cloro livre diminuiu significativamente na mistura MA/NaOCl. Não houve nenhuma interação adversa ou formação de precipitado observada quando MA foi combinado a CLX, mas o teor de cloro ativo foi reduzido quando NaOCl foi misturado ao MA.

O trabalho de De-Deus et al. (2009) foi outro trabalho que se valeu da HPLC para determinar e comparar a quantidade de arsênico em algumas marcas de mineral trióxido agregado (MTA) e cimento Portland. No presente estudo, especiações de arsênio (As[III], As[V] e ácido dimetilarsênico, DMA) foram

separadas por HPLC utilizando uma coluna de troca aniônica forte e convertido em arsênico por online HG. Foram aplicada 0,2 g de cada cimento, previamente digeridos em uma solução de HCl, HNO(3) e HBF(4), no instrumental HPLC. Foi possível detectar apenas o tipo III de arsênio. A quantidade mínima de arsênio foi detectada nas amostras de ProRoot® branco ($3,3 \times 10^{-4}$) e a máxima nas amostras MTA® Bio Angelus ($8,6 \times 10^{-4}$). Não foi possível detectar qualquer vestígio de arsênio nos cimentos: MTA® cinza Angelus, ProRoot MTA cinza (Tulsa/Dentsply, Tulsa, OK) e CP Juntalider (Brasilatex Ltda, Diadema, SP, Brasil). Os valores de arsênio encontrados no Irajazinho CP (Votorantim Cimentos, Rio Branco, SP, Brasil) e MTA Angelus branco foram intermediários entre os valores mínimos e máximo. O teste não paramétrico de Kruskal-Wallis mostrou resultados estatisticamente semelhantes entre todos os cimentos testados ($p > 0,5$). Em geral, o presente estudo demonstrou que todos os cimentos mostraram quantidades insignificantes do tipo III de arsênio, bem como nenhum vestígio de arsênio DMA e tipo V puderam ser detectados.

Usando HPLC, Camões et al. (2004) avaliaram pequenas quantidades de amostras líquidas nas quais 25 pré-molares humanos foram imersos. Cada dente foi imerso separadamente em frascos de 800 mL contendo água deionizada ultra-pura destilada e lá permaneceram por 1678 horas após o preenchimento dos seus canais com Ca(OH)_2 associado com veículos diferentes: Grupo 1: polietilenoglicol e colophon (Calen); Grupo 2: glicerina e paramonoclorofenol canforado; Grupo 3: paramonoclorofenol canforado; Grupo 4: glicerina e tricresolformalina; e grupo 5: solução anestésica (Citanest). Cinco tubos de polietileno foram preenchidos com cada uma dessas pastas e colocados sem lacre em frascos semelhantes. No final deste período, foram realizadas análises em HPLC de meio aquoso relacionados a cada grupo para detectar outras substâncias que tinham difundido das pastas usada nos canais dos dentes que não fossem cálcio e íons hidroxila. Embora os grupos apresentassem diferentes picos máximos quando não havia nenhuma barreira, todos eles mostraram valores maiores do que quando o dente estava presente. No grupo 4 foram detectadas no meio aquoso pelo menos 15 substâncias diferentes de Ca^{2+} e OH^- . Analisando os gráficos do HPLC, pode-se concluir que não só Ca^{2+} e OH^- , mas também uma quantidade considerável de outros componentes da pasta difunde através da dentina e atingiu a superfície externa da raiz.

Com HPLC, Schachman et al. (1995) puderam analisar a quantidade de catecolaminas na polpa dental humana. Esta pesquisa descreve um método para

quantificação de catecolaminas. Para isso, tecido pulpar obtido de dentes sem restauração ou inflamação que precisavam ser extraídos. As amostras foram coletadas, extraídas e analisadas por HPLC acoplada a um detector ultravioleta para níveis de catecolaminas (dopamina, epinefrina e norepinefrina). Como mediadores da vasoconstrição, catecolaminas desempenham um papel importante no controle da pressão intrapulpal. Estudos futuros de investigação de tecido inflamado agora podem ser realizados com o uso desse método analítico. Os resultados da presente investigação indicam uma referência no nível de catecolaminas na polpa dental humana não inflamada.

Assim como Nup et al. (2001) que compararam o nível de catecolaminas presentes na polpa dental humana inflamada com o nível basal estabelecido em dentes hígidos. Doze polpas sem inflamação foram analisadas como controle e para validar as conclusões anteriores. Tecido pulpar inflamado foi obtido de 10 dentes que necessitavam de tratamento endodôntico. Critérios seletivos para cada paciente incluído: ausência de doença sistêmica, medicamentos e alergias; resposta positiva aos testes de sensibilidade (gelo, calor e elétrico) e sondagem periodontal maior ou igual a 3 mm. Uma história prévia de dor associada com o dente foi um critério adicional para polpas inflamadas. Para evitar a presença de uma catecolamina exógena, anestesia local sem epinefrina foi administrada. Dopamina, epinefrina e norepinefrina foram extraídas quimicamente e analisadas pela HPLC com detecção ultravioleta. Os níveis de catecolamina encontrados na presença de inflamação pulpar eram maiores do que os níveis basais estabelecidos no tecido pulpar sem inflamação.

Koch et al. (2001) analisaram a liberação de formaldeído de três diferentes cimentos obturadores endodônticos. Dez espécimes de cada cimento: AH26, Amubarut e N2 foram armazenados secos por 6 meses. Uma quantidade de aproximadamente 100 a 200 mg de cada cimento foi obtida usando um broca esférica e armazenada por 10 min em água destilada. A concentração de formaldeído da água de imersão foi determinada por HPLC. A liberação média de formaldeído por cimento foi: 6,6 microgramas (+/-2,5) para o AH26 e 8,3 microgramas (+/-1,0) para o Amubarut. Uma baixa liberação de formaldeído foi detectável por nosso método nas amostras de N2, 0,3 microgramas (+/-0,1). Os autores puderam concluir que a liberação de formaldeído pelos cimentos

endodônticos é baixa, embora não se possa se excluir o risco de uma reação alérgica em pacientes suscetíveis.

Alguns autores estudaram a degradação da clorexidina em diferentes condições experimentais.

Ha e Cheung (1996), utilizando HPLC, propuseram o mecanismo de degradação da clorexidina observado na figura 2.8:

Figura 2.8 - Mecanismo de degradação da CLX proposto por Ha e Cheung (1996)

Zong (2011) discute que a clorexidina é degradada em PCA através de diversos mecanismos pH dependentes. Em condições ácidas, a formação do p-cloroanilina é direta sendo a principal via. Já em meio alcalino, o principal mecanismo de formação da PCA é indireta, através da formação inicial da PCU. O autor apresenta compostos intermediários (Figura 2.9) e descreve a seguinte via de degradação (Figuras 2.10 e 2.11) até a degradação completa:

Label used in degradation scheme	MW	Proposed Structure
PBG-AU	395
PBG-CA	396
CHD (PBG-PBG)	505
PBG-APU	506
APU-APU	507
PCA	127
PBG-G	352
PCPU	171

Figura 2.9 – Identificação na figura de mecanismo de degradação da CLX (Figuras 2.10 e 2.11), peso molecular e estrutura molecular proposta para os compostos intermediários de degradação da clorexidina em PCA, segundo Zong (2011)

Figura 2.10 - Mecanismo de degradação da CLX sugerido em condições ácidas, segundo Zong (2011)

Figura 2.11 - Mecanismo de degradação da CLX sugerido em condições alcalinas, segundo Zong (2011)

Uyeda et al. (1996) separaram e purificaram três intermediários de degradação da CLX, chamados CHDI-B, CHDI-BR e CHDI-D, a partir de incubação com bactérias para a degradação da CLX. As estruturas destes compostos foram determinadas por análises espectroscópicas de ^1H RMN, ^{13}C RMN e espectroscopia de massa. O composto CHDI-B tem uma estrutura em que 1 mol de 1-carboxietil é substituído na amina no grupo guanidina adjacente ao grupo hexileno da CLX. O composto CHDI-BR tem uma estrutura em que o OH carboxílico do grupo 1-carboxietil da CHDI-B liga-se ao grupo amina do grupo guanidina adjacente para formar um anel. O composto CHDI-D tem uma estrutura na qual 2 mol de 1-

carboxietil são substituídos nos dois grupos amina das guanidinas, adjacentes aos grupos hexanos da CLX. Os compostos podem ser observados na figura 2.12.

Figura 2.12 - Estruturas moleculares dos compostos CHCI-B, CHCI-BR e CHCI-D, segundo Uyeda et al. (1996)

Tanaka et al. (2005) separaram e purificaram compostos, a partir de incubação com bactérias para a degradação da CLX. Um novo composto intermediário (CHDI) da degradação, denominado CHDI-C, foi isolada por extração com acetato de etilo, n-butanol em coluna de cromatografia de coluna com sílica gel e purificada por cromatografia preparativa em camada delgada. A estrutura química deste produto foi analisada em infravermelho, ^1H RMN, ^{13}C RMN e espectrometria de massa. Os autores propõem que o CHDI-C seja um novo composto intermediário de degradação de CLX (Figura 2.13).

Figura 2.13 - Estrutura molecular do CHDI-C, segundo Tanaka et al. (2005)

Os mesmos autores (Tanaka et al., 2006), realizando separação e análise de compostos semelhantes às descritas anteriormente, também sugerem a existência de mais dois compostos intermediários do mecanismo de degradação da CLX,

denominados CHADP-4 e CHADP-6. Eles seriam pares de degradação da PCU e PCA, respectivamente. A atividade antimicrobiana de CHADP-6 é semelhante a da CLX, mas a atividade antimicrobiana de CHADP-4 é menor (Figura 2.14).

Figura 2.14 – Compostos da degradação da CLX e suas fragmentações em espectrometria de massa, segundo Tanaka et al. (2006)

Musteata e Pawliszyn (2005) apresentaram os seguintes compostos de degradação da CLX e seus respectivos valores de m/z observados no espectro de massa (Figura 2.15):

Figura 2.15 - Compostos da degradação da CLX, segundo Musteata e Pawliszyn (2005)

No trabalho de Usui et al. (2006) descrito anteriormente são descritos também alguns compostos como é possível observar na figura 2.16.

Figura 2.16 - Compostos da degradação da CLX, segundo Usui et al. (2006)

Apesar de apresentarem mecanismo e compostos de degradação da CLX diferentes, todos os trabalhos sinalizam para a existência de uma zona bastante

reativa, o grupo biguanidil, onde existe uma maior possibilidade de ocorrer a quebra da molécula. Isso ocorre, porque o nitrogênio mais externo, que apresenta ligação dupla com o carbono, é carregado positivamente, sendo um receptor de elétrons. No meio existe a presença de radicais hidroxila (OH.). Sugere-se a hipótese de que a CLX, quando degradada pelo NaOCl, se fragmente nesses pontos e posteriormente se reagrupe através dos mesmo pontos produzindo novos compostos com pesos moleculares maiores que o da CLX, gerando estruturas moleculares poliméricas semelhantes às dos polihexametileno biguanida (PHMB).

Pelo exposto na literatura revista, as substâncias químicas são parte imprescindível durante o tratamento endodôntico em diferentes etapas. Apesar de o NaOCl ser a substância mais utilizada na endodontia, sua ação não é completa sem associações com outras substâncias. A CLX se apresenta como uma substância com potencial de complementar a ação do NaOCl. Porém, cuidados devem ser tomados quando se utiliza estas substâncias de forma associada.

3 PROPOSIÇÃO

O objetivo desse trabalho foi (1) analisar se há formação de para-cloroanilina no precipitado formado pela reação do digluconato de clorexidina com o hipoclorito de sódio utilizando RMN 1D ^1H , (2) realizar separação dos compostos em cromatografia líquida de alta eficiência e identificar as massas moleculares dos compostos do precipitado em espectrometria de massa.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL

1. Solução de digluconato de CLX a 20% (Sigma-Aldrich)
2. Solução de NaOCl a 5% (Dinâmica)
3. Tubos de polipropileno do tipo eppendorf 1,5 mL (Axygen, USA)
4. Micro centrífuga SIGMA 1-15 (Sigma)
5. Becker de 500 mL (Laborglas - Brasil)
6. HPLC-ESI-MS - HPLC Shimadzu - Modelo SPDV 10 AV acoplado a um Espectrômetro Esquire 3000 Plus (Bruker Daltonics) equipado com “Electrospray” para ionização da amostra (Central analítica - IQ-USP)
7. Sistema Millipore de purificação de água MilliQ-Plus.
8. Balança de precisão de 0,01g (Mettler Toledo)
9. Detector - $\lambda = 254 \text{ nm}$
10. Dessecador de sílica gel
11. Dimetilsulfóxido deuterado (DMSO- d_6) (Sigma-Aldrich)
12. Pipeta de Pasteur (Laborglas / Schott)
13. Algodão
14. 4-cloroanilina sólida 97% (Sigma-Aldrich)
15. Vidro de relógio (Laborglas / Schott)
16. Coluna analítica para cromatografia líquida de alta eficiência (Hypersyl, Spherisorb® C8) recheda com partículas de sílica-C8 de 5 μm de tamanho 250 mm x 4,6 mm
17. Metanol para HPLC (Merck)
18. Espectrômetro de ressonância magnética nuclear Bruker AC200 (Central analítica - IQ-USP)
19. Espectrômetro de ressonância magnética nuclear Bruker DPX300 (Central analítica - IQ-USP)
20. Acetato de clorexidina a 99,5% (Sigma-Aldrich)

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Preparo de amostras

Uma solução de CLXg a 2% foi preparado misturando 5 mL de solução de CLXg a 20% com 45 mL de água deionizada.

Foi misturado a essa 50 mL de uma solução de NaOCl a 5% (Dinâmica, São Paulo, SP) gota a gota, sob constante agitação. Imediatamente, pôde-se observar a formação de um precipitado de cor marrom. A mistura foi deixada em temperatura ambiente por 60 minutos sem, no entanto, ocorrer nenhuma alteração visual da reação.

A mistura foi transferida para tubos de plástico eppendorf de 1,5 mL e centrifugada a 14.000 RPM durante 5 minutos. Dessa forma, o precipitado foi separado no fundo do tubo e o líquido sobrenadante foi removido e devidamente descartado. Todos os tubos de eppendorf foram preenchidos novamente e mais uma vez centrifugados. Assim foi possível acumular mais uma porção de precipitado nos mesmos tubos. Esse procedimento foi realizado até que todo o volume de mistura, 100 mL, fosse centrifugado e separado do sobrenadante.

Os tubos foram deixados abertos em um dessecador com sílica gel até que houvesse a desidratação do precipitado.

Na sequência, o produto foi removido dos tubos e transferido para um gral de porcelana para trituração com auxílio de um pistilo de porcelana. A amostra em pó foi transferida para o vidro de relógio e pesada. Ao final do processo, foi possível obter aproximadamente 23 mg de precipitado (Figura 4.1).

Figura 4.1 – Amostra de precipitado

4.2.2 Análises

4.2.2.1 Ressonância Magnética Nuclear

A espectroscopia de ressonância magnética nuclear é reconhecidamente a técnica mais importante para a investigação em níveis moleculares, permitindo obter informação estrutural e dinâmica para qualquer estado da matéria. Em particular é um método decisivo na determinação de estruturas tridimensionais de moléculas no estado líquido. A RMN ocupa, igualmente, um lugar de destaque no campo da análise qualitativa e quantitativa. Sua aplicação estende-se desde a análise de componentes em produtos alimentícios até a análise de fluidos biológicos e metabólitos em tecidos e órgãos de seres vivos, de modo não invasivo e não destrutivo.

A técnica se baseia no estudo de transições ou deslocamentos entre os níveis de energia do núcleo quando colocado em um campo magnético. O núcleo do átomo é constituído de prótons e nêutrons. Núcleos com número ímpar de prótons,

nêutrons ou ambos terão um spin nuclear intrínseco, isto é, apresentam um momento angular. Quando elementos com número quântico de spin, como o hidrogênio, são expostos a um campo magnético estático, forte e homogêneo, os núcleos dos átomos se comportam como magnetos e seus spins se alinham na direção do campo aplicado Figura (4.2). O alinhamento dos spins dos núcleos pode ser perturbado por um pulso curto de ondas de rádio (RF) que serve para tirar os spins do núcleo de sua orientação paralela ao campo magnético e para fornecer a energia necessária para movimentos do tipo giroscópio dos spins dos núcleos, denominados de precessão. Quando o pulso de RF é retirado, o núcleo tende a voltar para sua situação original e, assim fazendo, libera energia em forma de ondas de rádio. A frequência dessas ondas de rádio é distinta para diferentes espécies de átomos, assim como, para um determinado átomo em diferentes ambientes químicos ou físicos. Portanto, os núcleos ressonantes tornam-se transmissores de ondas de rádio com frequências características e revelam sua presença no composto pelos seus sinais de radiofrequência. Os deslocamentos químicos são medidos na escala horizontal do espectro, em unidades de partes por milhão (ppm). Depois de uma reação química, a presença ou ausência de moléculas específicas em uma mistura pode ser determinada através da comparação de espectros da mistura com os espectros dos compostos puros (Tangerino, 2006).

Figura 4.2 - (A) Esquema do efeito de um campo magnético externo sobre o núcleo do hidrogênio (B) Perturbação do núcleo pelo sinal de radiofrequência (Tangerino, 2006)

Neste estudo foram realizadas análises em um tipo específico de RMN que realiza leituras em apenas uma dimensão (1D) detectando o deslocamento químico do isótopo 1 do hidrogênio (^1H).

Para realizar as análises de RMN, foram preparadas três soluções:

1. Uma porção de 1 mg de acetato de CLX foi diluída em 1 mL de dimetilsulfóxido deuterado ($\text{DMSO}_{\text{d}6}$).
2. Uma porção de 1 mg do precipitado foi também diluída em 1 mL de $\text{DMSO}_{\text{d}6}$.
3. Uma porção de 1 mg do precipitado, diluída em $\text{DMSO}_{\text{d}6}$ e adicionada 0,5 mg de PCA. Esta amostra serve como padrão de comparação para estabelecer os valores de deslocamento químico da PCA no mesmo espectro do precipitado.

Uma vez solubilizadas, as soluções das amostras foram filtradas antes de serem transferidas para o tubo do RMN. Isso foi feito utilizando-se uma pipeta de Pasteur com um pequeno chumaço de algodão apertado na ponta e succionando a solução no solvente deuterado. A filtragem é necessária para se eliminar eventuais partículas presentes na amostra, que podem comprometer a qualidade das leituras. É importante observar que a escolha do solvente é imprescindível, pois este deve solubilizar completamente a amostra para não somente se obter análises por RMN de boa qualidade, mas também para se evitar manipulações excessivas com a mesma amostra. O solução de DMSO diluiu totalmente as três amostras.

As amostras foram analisadas no equipamento de ressonância magnética nuclear 1D ^1H Bruker DPX300 da Central Analítica de Instituto de Química da Universidade de São Paulo.

4.2.2.2 Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao espectrômetro de massa

Cromatografia é uma técnica de separação de misturas e identificação de seus componentes. Esta separação depende da diferença entre o comportamento dos analitos (amostra) entre a fase móvel, o solvente, ou uma mistura de solventes, que é usada para eluir (correr) uma amostra promovendo a separação dos seus componentes, e a fase estacionária (coluna analítica por onde a amostra corre). A

interação dos componentes da mistura com estas duas fases é influenciada por diferentes forças intermoleculares, incluindo iônica, bipolar, apolar e específicos efeitos de afinidade e solubilidade. No caso da técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (High Performance Liquid Chromatography” ou HPLC) esses princípios são mais precisos e eficientes por serem realizados com a fase móvel sob pressão. Por esse motivo, pode-se utilizar fases estacionárias com partículas menores, aumentando a superfície de contato permitindo, assim, uma separação com níveis mais críticos. É possível trabalhar com todas as variáveis do processo como polaridade, ionização e solubilidade da fase móvel e diferentes tamanhos e características de partículas da fase estacionária. É possível utilizar a mistura de solventes com a finalidade de alterar os tempos de retenção dos eluentes. Pode-se detectar compostos através de comparações entre os tempos de eluição dos anilinos, porém quando os compostos da amostra apresentam características de polaridade e ionização semelhantes, fica difícil tanto a separação, quanto a identificação por essa técnica.

Para melhor interpretar uma amostra, é bastante utilizada a associação da separação por cromatografia e identificação por detectores. Esse trabalho utilizou a detecção através de um tipo específico de espectrometria de massa (“mass spectrometry” ou MS) que se vale da técnica de ionização por “electrospray” (“electrospray ionization” ou ESI) para ionizar as moléculas das substâncias presentes na amostra.

Essa técnica é apropriada para produzir macromoléculas ionizadas, superando a propensão de fragmentação apresentada por elas no momento da ionização. As moléculas de uma determinada substância ionizada por um “electrospray” encontram-se em um estado onde o valor de massa/carga (m/z) da molécula é geralmente uma unidade maior ou menor que o valor da massa molecular do composto não ionizado na dependência do ajuste do espectrômetro. A massa de um íon de hidrogênio (H^+) é equivalente a uma unidade de m/z . Adicioná-lo (protonação) provê carga positiva à molécula enquanto retirá-lo (desprotonação), carga negativa (Silverstein et al. 1979; Silverstein et al. 2007).

A expressão dos resultados da espectrometria de massas se dá por intermédio de um gráfico chamado de espectro. O eixo horizontal (das abscissas) exibe valores de massa/carga (m/z). O eixo vertical (das ordenadas) abundância

relativa. Portanto, um pico representa, graficamente, um par ordenado, onde "x" é o valor de m/z e "y" a abundância relativa.

Vários valores de m/z já foram correlacionados com a identidade química dos compostos e fazem parte da memória científica. Quando se obtém um espectro de massa de um composto já cadastrado basta, para identificá-lo, realizar uma busca computadorizada em uma biblioteca de correspondência entre valores de m/z e estrutura molecular. A coincidência dos espectros de massas é uma evidência convincente da identificação que é, muitas vezes, aceita em procedimentos legais (Silverstein et al., 1979; Silverstein et al., 2007). Quando se observa em um espectro um pico com valor de m/z ainda não cadastrado, é necessário propor a sua estrutura molecular baseada nos reagentes e condições de sua obtenção.

Para realizar a interpretação de um espectro de massa é necessário identificar o íon molecular, que é a informação mais valiosa de um espectro. O valor da massa do íon molecular e sua composição elementar mostram os limites nos quais os fragmentos se situam. Para determinados tipos de moléculas, principalmente as de maior massa molecular, o íon molecular não é suficientemente estável para ser encontrado em quantidades apreciáveis, podendo até mesmo não estar presente no espectro, graças ao impacto de elétrons, que acabam por fragmentar a molécula. Este íon molecular deve ser o íon de maior massa no espectro. Íons mais estáveis, que podem ser o íon molecular (substância original) ou fragmentos, são mais abundantes nos espectros. Dessa forma, para determinar a estrutura molecular de um composto não basta a observação do pico com maior valor de abundância relativa, pois este valor pode estar relacionado com o fragmento mais estável da molécula e não é a representação do íon molecular, que pode apresentar menor valor de abundância relativa, mas apresenta o maior valor de m/z (Silverstein et al., 2007).

Foi realizada pesagem de mais 20 mg da amostra do precipitado e diluída em uma solução de metanol. A solução foi filtrada e injetada no equipamento para separação dos compostos da amostra.

A fase móvel utilizada foi a mistura de (A) metanol para HPLC com (B) água destilada Milli-Q. O fluxo foi mantido constante em 0,100 mL por minuto.

Em uma eluição feita em HPLC, a proporção entre os solventes da fase móvel pode permanecer constante durante o procedimento (fluxo isocrático) ou variar em função do tempo (gradiente de eluição).

Neste estudo foram realizadas eluições através dos dois métodos.

O método isocrático correu por um tempo total de 40 minutos, mantendo a proporção 80/20 de metanol/água.

O método de gradiente de eluição da fase móvel respeitou a proporção demonstrada no quadro 4.1:

Tempo em minutos	Concentração de metanol (%) em água
0,01	30
30	80
40	100
45	100
50	30
55	30

Quadro 4.1 - Gradiente de eluição utilizado nas separações por HPLC

O tempo total pelo método de gradiente de eluição foi de 55 minutos.

O sistema de HPLC utilizado neste estudo estava acoplado ao espectrômetro Esquire 3000 Plus equipado com ESI para ionização da amostra, que permite trabalhar nos dois modos de ionização, positivo e negativo. As leituras realizadas foram registradas nos dois modos com monitoramento de 1 a 1200 m/z.

5 RESULTADOS

5.1 RESULTADOS DA RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR 1D ^1H

Os espectros de ressonância magnética nuclear 1D ^1H de CLX pura, precipitado isolado, bem como de precipitado com adição de PCA podem ser observados nas figuras 5.1, 5.2 e 5.3, respectivamente.

Figura 5.2 – Espectro de RMN $1D^1H$ do precipitado NaOCl/CLX puro

Figura 5.3 – Espectro de RMN $1\text{D } ^1\text{H}$ do precipitado com adição de PCA

No espectro de RMN da CLX pura (Figura 5.1) pode-se observar os sinais referentes aos hidrogênios presentes no anel benzênico entre 7,2 e 7,6 ppm. Os sinais referentes aos hidrogênios presentes na ligação N-C entre o grupos hexileno e diguanidil com valores de deslocamento químico entre 3,0 e 3,4 ppm; e os hidrogênios com valores de deslocamento entre 1,2 e 1,8 referentes as ligações $\text{H}_2\text{C}-\text{CH}_2$ do grupo hexileno. Os outros sinais são referentes ao solvente DMSO_{d_6} e ao acetato (2,50 e 1,72, respectivamente).

Nos espectros de RMN das amostras de precipitado isolado (Figura 5.2) e precipitado com adição de PCA (Figura 5.3) é possível observar uma série complexa de picos situados na região de 6,5 a 8,5 ppm, região referente aos hidrogênios presentes nos anéis aromáticos, além dos sinais referentes ao solvente DMSO_{d_6} (2,497 a 2,517 ppm). O espectro de RMN do precipitado com PCA, apresenta um dubleto bastante representativo da presença de PCA com valores de 6,677 e 7,052 ppm. Não é possível observar o mesmo dubleto referente a PCA presente no espectro do precipitado puro, o que indica que a PCA não está presente, embora haja a presença de um par de dubletos que se referem a algum tipo de para-substituto do benzeno.

Quando se analisa o espectro do precipitado puro, os sinais com pico principal em 1,318 ppm são referentes aos hidrogênios pertencentes aos carbonos ligados a carbonos, sinalizando a existência de grupos hexileno nos compostos da amostra, já esperados, uma vez que esse tipo de ligação é bastante estável. Os valores com picos entre 3,062 e 3,708 sinalizam uma modificação no padrão da ligação entre N-C e N=C, também esperados já que esses são os pontos mais instáveis na molécula de CLX. Os sinais entre 6,75 e 8,5 são referentes aos hidrogênios pertencentes aos anéis aromáticos. Nesse ponto ocorre a maior alteração dos sinais. Apesar de existir uma série de sinais complexos, algumas observações podem ser feitas.

Um sinal pertence a um composto que é representado pelos valores entre 8,0 e 8,5 ppm. O outro composto é representado pelos sinais entre os valores entre 7,25 e 7,75 ppm. São sinais de hidrogênios posicionados em ambientes químicos diferentes, portanto compostos distintos. A quantidade relativa deste grupo aromático nos compostos é representada pela intensidade dos sinais (8,08 e 3,68 abaixo dos picos, Figura 5.2). É possível observar que existe uma proporção de 1:2 entre o primeiro e o segundo composto. Esse resultado sinaliza que caso o primeiro

sinal represente composto com apenas um anel aromático, o segundo composto obrigatoriamente deve apresentar dois anéis aromáticos. A estrutura molecular do primeiro composto poderia ser uma representação da PCA, porém esta apresentou sinais, quando adicionada, entre 6,5 e 7,1, o que descarta a possibilidade de o primeiro composto ser a PCA. Sendo assim, o primeiro sinal é da formação de um composto que apresenta um único anel aromático e obrigatoriamente diferente da PCA. O trabalho de Nowicki e Sem (2011) sugere a existência de PCU, que representa a quebra da molécula de CLX no segundo ponto possível, entre o segundo nitrogênio e o carbono seguinte. Assim, o primeiro sinal poderia ser da PCU ou da molécula complementar PCGH. O segundo sinal representa, possivelmente, um composto gerado da fusão de duas moléculas de PCU ou de duas moléculas de PCGH (Quadro 5.1), formando uma estrutura semelhante a biguanida polimérica estudada por Santos e Fernandes (2010), situação quimicamente aceitável.

Sugere-se, então, que quando ocorre a fragmentação da CLX pelo NaOCl haja um reagrupamento dos fragmentos de grupos biguanidil, hexileno e anel aromático, formando uma molécula maior que a CLX. As massas moleculares, suas identificações e estruturas moleculares sugeridas são observadas no quadro 5.1.

Massa molecular e identificação	Estrutura molecular sugerida
127 - para-cloro anilina (PCA)
170 - para-cloro fenil uréia (PCU) (Nowicki, 2011)
281 - Composto 1 (C1)
322 - Composto 2 (C2)
352 - PCGH (Nowicki, 2011)
507 - Composto 3 (C3) (Zong, 2011)
577 - Composto 4 (C4)
687 - Composto 5 (C5)
719 - Composto 6 (C6)
871 - Composto 7 (C7)

Quadro 5.1 - Massas moleculares e estruturas moleculares sugeridas dos compostos presentes no precipitado

5.2 RESULTADOS DA CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA - ESPECTROMETRIA DE MASSA

Foi realizada separação dos produtos por HPLC nos dois métodos, isocrático e gradiente, para posterior identificação por espectrometria de massa, nos dois modos de ionização positivo e negativo. Serão utilizados, como indicadores da presença das substâncias na análise dos espectros das amostras, os valores de m/z registrados na literatura como os de 127, 128, 149 e 167 para PCA; 170 e 171 para a PCU e 352, 353 e 354 para a PCGH (Vicente; Toledo, 2003; Musteata; Pawliszyn, 2005; Usui et al., 2006; Basrani et al., 2007; Barbin et al., 2008; Zong, 2011). Também serão utilizados os valores registrados, nos espectros de PCA e do digluconato de CLX, deste trabalho. Isso será necessário para relacionar os valores de m/z com as possíveis moléculas formadas.

A PCA foi detectada no modo positivo de ionização. No espectro de massa, é possível observar a existência do íon molecular da PCA com valor de m/z de 128, massa molecular da PCA (127), que uma vez ionizada no modo positivo é acrescida de 1 hidrogênio (protonação), observada na figura 5.4.

Figura 5.4 – Espectro de massas obtido da solução de PCA. O eixo horizontal (abscissas) representa a relação entre a massa e a carga (m/z) das moléculas ionizadas presentes na amostra. O eixo vertical (ordenadas) representa a abundância relativa dessas substâncias

Foi realizada também análise em espectrometria de massa do digluconato de CLX puro. A CLX também foi detectada no modo positivo de ionização. No espectro de massa, é possível observar a existência do íon molecular da CLX com valor de m/z de 505,3 (Figura 5.5).

Figura 5.5 – Espectro de massas obtido da solução de digluconato de CLX. O eixo horizontal (abscissas) representa a relação entre a massa e a carga (m/z) das moléculas ionizadas presentes na amostra. O eixo vertical (ordenadas) representa a abundância relativa dessas substâncias

O cromatograma da separação do precipitado puro foi realizada pelo método isocrático, bem como os espectros de massa realizados nas separações, nos dois modos de ionização, podem ser observados nas figuras 5.6, 5.7, 5.8, 5.9 e 5.10.

Figura 5.6 – Cromatograma da separação realizada pelo método isocrático com metanol a 80% por 40 minutos com ionização no modo negativo. O eixo horizontal (abscissas) representa o tempo de retenção em minutos. O eixo vertical (ordenadas) representa a absorção ou absorbância em mAu

Figura 5.7 – Espectro de massas obtido pela separação em HPLC no tempo de 4,6 minutos. O eixo horizontal (abscissas) representa a relação entre a massa e a carga (m/z) das substâncias ionizadas presentes na amostra. O eixo vertical (ordenadas) representa a abundância relativa dessas substâncias

É possível observar no espectro (Figura 5.7) um íon molecular com valor de m/z de 687, sugerindo a presença do composto C5, pois foi realizada ionização no modo negativo.

Também foi possível detectar o valor de 507, resultado esse que sugere a existência do composto com mesmo peso molecular apresentado por Zong (2011), denominado neste estudo de composto 3 (C3), cuja estrutura molecular pode ser observada no quadro 5.1.

Figura 5.8 – Espectro de massas obtido pela separação no tempo entre 6,3 e 7,1 minutos no HPLC pelo método isocrático. O eixo horizontal (abscissas) representa a relação entre a massa e a carga (m/z) das substâncias ionizadas presentes na amostra. O eixo vertical (ordenadas) representa a abundância relativa dessas substâncias

Nesse espectro é possível observar a identificação de dois íons moleculares com valores de m/z de 576,9 e 719,2; respectivamente denominados compostos 4 e 6 (C4 e C6) (quadro 5.1); sugerindo a existência dos dois compostos, pois a ionização foi realizada no modo negativo.

Figura 5.9 – Cromatograma da separação em HPLC pelo método com gradiente no modo de ionização positivo. O eixo horizontal (abscissas) representa o tempo de retenção em minutos. O eixo vertical (ordenadas) representa a absorção ou absorbância em mAu

Figura 5.10 – Espectro de massas obtido pela separação no tempo de 35,4 minutos em HPLC pelo método gradiente. O eixo horizontal (abscissas) representa a relação entre a massa e a carga (m/z) das substâncias ionizadas presentes na amostra. O eixo vertical (ordenadas) representa a abundância relativa dessas substâncias

Uma das sugestões de compostos formados foi apresentada por Nowicki e Sem (2011) como sendo a PCGH. O espectro (Figura 5.10) sugere a existência do mesmo composto que apresenta peso molecular 352, como o modo de ionização utilizado foi o positivo, deve-se adicionar um hidrogênio (protonação) para se obter o valor do íon molecular de 353.

O cromatograma da separação realizada pelo método gradiente, bem como os espectros de massa realizados nas separações, nos dois modos de ionização, podem ser observados nas figuras 5.11, 5.12 e 5.13.

Figura 5.11 – Cromatograma da separação em HPLC pelo método com gradiente no modo de ionização negativo. O eixo horizontal (abscissas) representa o tempo de retenção em minutos. O eixo vertical (ordenadas) representa a absorção ou absorbância em mAu

Figura 5.12 – Espectro de massas obtido pela separação no tempo entre 33,4 e 33,7 minutos em HPLC pelo método gradiente com ionização no modo negativo. O eixo horizontal (abscissas) representa a relação entre a massa e a carga (m/z) das substâncias ionizadas presentes na amostra. O eixo vertical (ordenadas) representa a abundância relativa dessas substâncias

Novamente é possível separar e identificar os compostos com valores m/z de 576,9 e 719,1; C4 e C6 (Quadro 5.1).

Figura 5.13 – Espectro de massas obtido pela separação no tempo de 44,8 minutos em HPLC pelo método gradiente com ionização no modo negativo. O eixo horizontal (abscissas) representa a relação entre a massa e a carga (m/z) das substâncias ionizadas presentes na amostra. O eixo vertical (ordenadas) representa a abundância relativa dessas substâncias

Neste espectro é possível identificar o composto com valor de m/z de 871,5, que sugere a presença do composto com mesmo peso molecular, denominado C7 (Quadro 5.1), uma vez que a ionização foi realizada no modo negativo.

Não foi possível registrar, na análise do precipitado, nenhum dos valores de m/z referidos a PCA, assim como também não foi possível detectar a existência de outros compostos sugeridos no quadro 5.1, como PCU, C1 e C2.

6 DISCUSSÃO

As dificuldades encontradas durante a modelagem do canal foram sendo minimizadas através da introdução das ligas de níquel-titânio e recentemente, novos instrumentos tem permitido que a modelagem seja realizada por um único instrumento (Bürklein et al., 2011; Plotino et al., 2012).

A sanificação através de substâncias químicas continua baseada na utilização do NaOCl, que cumpre o maior número de requisitos da substância ideal a ser utilizada durante a modelagem, limpeza e desinfecção dos canais radiculares. O NaOCl apresenta características importantes como facilitar a remoção e dissolução de restos orgânicos, ter ação efetiva no combate a microrganismos, apresentar biocompatibilidade quando usada em baixas concentrações e emulsionar as partículas de detritos existentes nas paredes do canal radicular, tornando possível a remoção dos mesmos, principalmente quando associada ao Endo-PTC®, além de ser solúvel em água e mostrando ser, de forma geral, a substância mais completa para ser utilizada durante a fase do preparo (Walker, 1936; Grossman; Meiman, 1941; Grossman, 1964; Varella; Paiva, 1969; Becker et al., 1974; Bhat, 1974; Bombana et al., 1974; Aun; Paiva, 1982; Foley et al., 1983; Byström; Sundqvist, 1985; Paiva; Antoniazzi, 1988; Harrison et al., 1990; Souza et al., 1992; Cohen; Burns, 2000; Estrela, 2004; Carvalho et al., 2008).

Alguns trabalhos demonstraram, porém, que, em baixas concentrações, o NaOCl apresenta sua ação antimicrobiana reduzida frente a alguns microrganismos quando comparado à CLX (Leonardo et al., 1999; Ferraz et al., 2001; Lima et al., 2001; Spratt et al., 2001; Onçağ et al., 2003; Oliveira, D et al., 2007).

A desinfecção propriamente dita acaba por depender muito da limpeza das paredes internas dos canais principais, pois só com essas paredes desobstruídas, a substância desinfetante poderá atingir a intimidade da dentina através da rede de canais radiculares e dos túbulos dentinários. A ação do NaOCl fica, assim, na dependência de uma segunda substância que possa promover a remoção dos tecidos que impedem sua penetração no sistema de canais, pois o NaOCl apesar de agir com bastante eficiência em tecido orgânico, não tem a capacidade de agir sobre matéria inorgânica. Neste caso, substâncias com a capacidade de remover tecido

inorgânico como o ácido cítrico ou o EDTA são necessárias para que a sanificação seja completa (Byström; Sundqvist, 1985; Spanó, 1999; Okino et al., 2004; Siqueira, 2004; Brum, 2008; Akisue et al., 2010).

Uma terceira substância pode ser necessária, principalmente em casos onde endotoxinas ou mesmo microrganismos resistentes a todos esses procedimentos iniciais permaneçam nos canais. O hidróxido de cálcio é mundialmente considerado a medicação intracanal de escolha da endodontia. Sua ação depende basicamente da elevação do pH e o tempo torna-se primordial para que todo o meio do sistema de canais se torne básico o suficiente para promover ou manter a desinfecção alcançada durante as fases anteriores (Haapasalo et al., 2000; Almyroudi et al., 2002; Erdemir et al., 2004; Ballal et al., 2007; Krithikadatta et al., 2007; Manzur et al., 2007; Neelakantan et al., 2007; Wang et al., 2007; Barbin et al., 2008).

A CLX tem sido estudado como substância substituta ou complementar do NaOCl e do hidróxido de cálcio (Ferraz et al., 2001; Lima et al., 2001; Tanomaru Filho et al., 2002; Taşman et al., 2000).

Esta substância tem apresentado propriedades até então pouco conhecidas e utilizadas na endodontia como a sua ação residual, ou substantividade. Essa propriedade parece ser bastante interessante, uma vez que a substância permanece agindo no interior do canal complementando ou mantendo os níveis de desinfecção após o preparo do canal (Ingle; Zeldow, 1958; Jeansson; White, 1994; White et al., 1997; Leonardo et al., 1999; Onçağ et al., 2003; Khademi et al., 2006; Oliveira, D et al., 2007; Wang et al., 2007).

Por não apresentar capacidade de degradar tecido orgânico, importante papel de uma substância endodôntica ideal, há uma limitação da utilização da CLX como substituta do NaOCl (Paiva; Antoniazzi, 1988; Spanó, 1999; Cohen; Burns, 2000; Estrela, 2004; Okino et al., 2004; Siqueira, 2004).

Mesmo sendo mais biocompatível em relação a altas concentrações de NaOCl (Tanomaru Filho et al., 2002), o fato de não auxiliar na remoção dos restos orgânicos do interior do canal pode causar comprometimento nos demais passos da terapia endodôntica.

Quando de sua utilização para esse fim, a CLX deixa a responsabilidade da remoção de tecidos orgânicos somente aos instrumentos. Porém, mais

recentemente, Peters (2004) demonstra que a ação do instrumento não basta para que todas as paredes sejam limpas. Alguns autores discutem que a instrumentação tem papel importante na modelagem do canal. Porém, a limpeza e a desinfecção do canal são responsabilidades divididas entre o preparo cirúrgico (físico) juntamente ao preparo químico (Hülsmann; Stryga, 1993; Hülsmann et al., 1999; Hülsmann et al., 2001; Walia et al., 1988; Yesilsoy et al., 1995).

A ação residual, somada a capacidade de agir sobre microrganismos distintos, com tensão superficial menor que a do NaOCl e não interferir na polimerização de cimentos resinosos, fazem da CLX uma substância interessante para ser utilizada como complementação do preparo químico estabelecido pelo NaOCl (Jeansonne; White, 1994; White et al., 1997; Leonardo et al., 1999; Onçağ et al., 2003; Khademi et al., 2006; Oliveira, D et al., 2007; Erdemir et al., 2004; Santos et al., 2006).

Apesar de a CLX ser apresentada como uma substância com diversas vantagens como substância química a ser usada durante a terapia endodôntica, seja durante a modelagem, como irrigante final ou como medicação intracanal, deve-se estar ciente de que sua degradação gera como principal subproduto a 4-cloroanilina (PCA).

Esta preocupação se faz presente uma vez que a PCA é tóxica, além de existir suspeitas de carcinogenicidade e mutagenicidade (Chhabra et al., 1990; Vicente; Toledo, 2003). Esta suspeita decorre da possibilidade de conversão de aminas, como a PCA, em compostos do tipo N-nitroso quando da presença de hemoglobina (Golly; Hlavica, 1983; Muller et al., 1997). Evidências de estudos toxicológicos indicam a toxicidade, imunotoxicidade e carcinogenicidade da PCA (Chhabra et al., 1990; Chhabra et al., 1991; Kacmar et al., 1995). O Programa Nacional de Toxicologia da Agência de Proteção Ambiental (EPA) dos Estados Unidos classificou a PCA como mutagênica e como provável carcinógeno humano.

Alguns autores sugerem um regime de irrigação onde NaOCl e CLX são associados de diferentes formas. Há uma grande discussão sobre a associação, pois estas substâncias reagem formando um precipitado de cor marrom, não solúvel em água (Siqueira Jr, 1997; Kuruvilla; Kamath, 1998; White et al., 1999; Vivacqua-Gomes et al., 2002; Zenhder, 2006; Basrani et al., 2007; Marchesan et al., 2007; Bui et al., 2008; Ferreira et al., 2008; Kishen et al., 2008; Akisue et al., 2010; Basrani et

al., 2010; Krishnamurthy; Sudhakaran, 2010; Thomas; Sem, 2010; Nowicki; Sem, 2011).

Os resultados também sinalizam que quando a reação ocorre dentro do canal parece trazer consequências para a obturação, assim como para a permeabilidade dentinária, resultados que estão relacionados a obliteração da rede de canais laterais e dos túbulos dentinários pelo precipitado, que teria a capacidade de se aderir a parede interna do canal formando algo parecido com um *smear layer* químico (Vivacqua-Gomes et al., 2002; Bui et al., 2008; Brum, 2008; Akisue et al., 2010).

Marchesan et al. (2007) analisaram a possibilidade de solubilizar o precipitado em metanol e ácido acético, substâncias que não devem ser utilizadas *in vivo* por apresentarem alta toxicidade. Portanto, parece mais prudente evitar sua formação através da inativação ou diluição do NaOCl para que depois a CLX possa ser utilizada sem ter contato com o NaOCl remanescente no sistema de canais radiculares (Marchesan et al., 2007; Brum, 2008; Krishnamurthy; Sudhakaran, 2010).

O presente estudo analisou o precipitado formado pela reação do digluconato de CLX e o NaOCl usando espectrometria RMN 1D ^1H para determinar se a PCA foi produzida.

Foi demonstrado anteriormente que a degradação de CLX ocorre através da quebra da molécula no grupo guanidil ligado aos anéis aromáticos em ambas as extremidades da molécula (Tanaka et al., 2005; Tanaka et al., 2006). Essa quebra resultaria em produtos de degradação menores em massa que a CLX, cada qual contendo um grupo anilina com um átomo de cloro na posição 4. Dessa forma, ocorreria uma quebra da ligação entre o segundo nitrogênio do grupo guanidil, ligado ao anel aromático, e o carbono subjacente, também pertencente ao grupo guanidil formando assim PCA (Figura 6.1).

Se PCA fosse produzida no precipitado NaOCl/CLXg, seria esperado o aparecimento do mesmo sinal referente a PCA pura no espectro do precipitado isolado, dois picos (dubleto) na região da PCA. Embora o espectro de RMN ^1H do precipitado isolado resulte em uma combinação complexa de picos de 6,5 a 8,5 ppm (onde aparecem os picos referentes aos compostos aromáticos) (Figura 5.6), fica claro que não há nenhum dos picos referentes ao dubleto da PCA, que podem ser

observados com grande intensidade na amostra que recebeu a adição de PCA, com valores de deslocamento químico de 7,8 e 6,7 ppm (Figura 5.7).

Comparando os espectros do precipitado isolado e do precipitado que recebeu a adição da PCA, pode-se observar que os picos não estão presentes no espectro antes da adição (Figura 5.6). No caso da análise em espectrometria de massa, este e outros estudos mostram que a molécula de PCA é possível de ser ionizada, portanto fica descartada a possibilidade de não ser detectada por esse motivo, uma vez que o detector apenas realiza leitura de moléculas ionizáveis (Basrani et al., 2007; Basrani et al., 2009; Basrani et al., 2010; Sodhi et al., 2011).

Caso a PCA seja formada, não apresenta concentração significativa para ser detectada pelas análises em RMN, nas condições apresentadas neste experimento. Já foi demonstrado que a PCA não é formada na reação do NaOCl /acetato de CLX e os resultados do presente estudo confirmam que também não há formação de PCA no precipitado formado entre NaOCl/digluconato de CLX (Thomas; Sem, 2010).

Figura 6.1 - Estrutura molecular da CLX e sinalização da quebra para formação da PCA (quebra da ligação Carbono-Nitrogênio em F-PCA)

A CLX quando aquecida a 37° C, temperatura corporal, ou a 45° C, temperatura atingida quando se utiliza a irrigação ultrassônica passiva, sofre degradação apresentando como principal subproduto a PCA (Barbin et al., 2008; Basrani et al., 2009).

Outros trabalhos sugerem a formação de PCA na reação NaOCl/CLX (Basrani et al., 2007; Basrani et al., 2009; Basrani et al., 2010; Sodhi et al., 2011) . Essa observação pode ser explicada pelo próprio processo de análise realizado.

Uma técnica bastante utilizada em química analítica é a cromatografia gasosa/espectrometria de massa. Nessa técnica a amostra pode ser aquecida a

temperaturas de até 370° C, para que ocorra a vaporização desta, uma vez que a separação ocorre em meio gasoso. Normalmente utiliza-se o gás hélio como fase móvel. Pelo fato de ocorrer aquecimento da amostra durante a separação e a reação de formação do precipitado NaOCl/CLX apresentar quantidades de CLX não degradada (Nowick; Sem, 2011), pode-se sugerir que a presença de PCA nos resultados de trabalhos que utilizam essa técnica para análise do precipitado sejam, na verdade, um espécie de “artefato de técnica”.

Nesses trabalhos, a solução de CLX é autoclavada a 121° C antes de reagir com o NaOCl, o que bastaria para a degradação da CLX em PCA. Como a PCA é uma molécula bastante estável, sugere-se que ela não seria degradada pelo NaOCl durante o preparo da amostra NaOCl/CLX, sendo observada no resultado da análise química (Basrani et al., 2007; Barbin et al., 2008; Basrani et al., 2010; Sodhi et al., 2011).

Assim, não seria possível afirmar se a PCA presente nos referidos resultados foi proveniente da reação NaOCl/CLX ou da técnica empregada.

Outro trabalho sugere que a PCA está presente no precipitado (Krishnamurthy; Sundhakaran, 2010), porém os autores se basearam em testes como o de Beilstein para identificação de compostos halogenados, como o cloro. O teste consiste no posicionamento de um arame de cobre limpo que é aquecida chama do bico de Bunsen para formar um revestimento de óxido de cobre e em seguida o arame é mergulhado na amostra e também levado à chama para visualização da cor da chama resultante da combustão. Quando a chama se torna verde, sinaliza a existência de formação de um halogeneto de cobre. Não é possível através de testes como esse a identificação exata de quebras moleculares. O espectro de RMN do referido estudo indica a presença de dois dubletos que sugerem apenas a existência de um parasubstituto benzênico, mas não permite identificar qual a natureza desta substituição.

A espectroscopia RMN analisa moléculas presentes em uma amostra no momento em que espectro é gerado, de forma não destrutiva. Se uma molécula está presente na solução, então o espectro de uma mistura de moléculas pode ser comparado com uma amostra padrão e os picos resultantes irão aparecer com o mesmo padrão (singletos, dubletos, tripletos, etc.), no mesmo valor de deslocamento químico. Se um pico não compartilha o mesmo padrão de deslocamento químico, a

molécula correspondente não está presente em uma mistura. A ausência da molécula esperada pode ser confirmada pela adição da forma pura da molécula esperada e comparando os espectros.

A análise por espectrometria de massa da PCA objetivou o registro de valores de m/z referenciais para comparação com os resultados presentes na análise da amostra do precipitado. A análise dos valores de m/z obtidos na espectrometria de massa, nas condições experimentais deste estudo, não permitiu observar os valores de m/z referidos a PCA. Isso demonstra que também não é possível detectar a presença de PCA, nessas condições, por HPLC-ESI-MS. A detecção de uma molécula em MS depende da possibilidade de sua ionização. Caso a molécula não seja ionizada, em nenhum dos dois modos, não será detectada. Este e outros trabalhos demonstram que é possível ionizar e consequentemente detectar a presença de PCA utilizando essa técnica (Vicente; Toledo, 2003; Basrani et al., 2007; Basrani et al., 2009; Basrani et al., 2010; Sodhi et al., 2011). Porém, ela não se apresenta nos resultados das análises do precipitado neste estudo. Mais um indício, em conjunto com os resultados do RMN, de que a PCA não está presente no precipitado.

O trabalho de Nowicki e Sem (2011) sugere a formação de apenas dois compostos no precipitado, a PCU e a PGCH, uma molécula complementar da outra quando da degradação da CLX. As análises de massa realizadas no presente estudo registraram valores de m/z que também sugerem a formação da PGCH ($m/z=353$), porém não foi possível detectar a PCU ($m/z=171$).

Os espectros apresentados neste estudo demonstram uma quantidade maior de compostos presentes no precipitado quando comparada com as encontradas na literatura. Frente ao exposto, não é possível afirmar que apenas um ou dois compostos são formados quando da reação NaOCl/CLX, como relatado em trabalhos anteriores (Basrani et al., 2007; Basrani et al., 2009; Basrani et al., 2010; Nowicki; Sem, 2011; Sodhi et al., 2011). Nos mesmos espectros é possível observar que a maior parte dos compostos presentes no precipitado apresentam pesos moleculares maiores que o da CLX, sugerindo que ocorra um reagrupamento de partes da molécula de CLX fragmentada ou dela inteira em sítios específicos de outra molécula de CLX. A adição também pode ocorrer com partes ou toda a

molécula do ácido glucônico. Uma vez reagindo com a CLX, o novo composto é estável e não apresenta solubilidade em água.

Uma hipótese seria o reagrupamento nas mesmas regiões de quebra relatadas nos trabalhos anteriormente vistos, formando uma espécie de polímero de CLX, semelhante a estrutura molecular do PHBG, mas com a presença de um grupo clorofenil em uma ou em ambas as extremidades da molécula.

Alguns autores sugerem que a associação teria ação antimicrobiana maior que a do NaOCl e da CLX isoladamente (Kuruvilla; Kamath, 1998; White et al., 1999; Zenhder, 2006; Kishen et al., 2008). Os compostos sugeridos neste estudo apresentam grupos guanidil. Este grupo funcional parece ser o responsável pela ação antimicrobiana dos antissépticos da família das biguanidas, sendo assim, os compostos apresentados teriam ação antimicrobiana (Santos; Fernandes, 2010; Kim et al., 2012).

Este estudo também utilizou metanol e DMSO para solubilizar a amostra de precipitado, demonstrado que ambos os solventes poderiam ser utilizados em um possível remoção do precipitado da parede do canal. Porém, como já foi relatado anteriormente (Marchesan et al., 2007) o metanol não deve ser utilizado *in vivo* por apresentar toxicidade. O DMSO é um crioprotetor para congelamento de células, mas não apresenta biocompatibilidade em temperatura ambiente, causando morte celular quando em contato por mais de um minutos nestas condições. Mesmo que o precipitado pudesse ser removido com um solvente viável do ponto de vista clínico, não se sabe quais seriam as consequências da utilização de DMSO na dentina. Também seria necessário saber se o solvente teria capacidade de penetrar em profundidade na dentina.

Outra preocupação se faz presente quando o precipitado se dissolve, desprendendo-se da parede dentinária e possivelmente atingindo a região periapical. Caso isso aconteça, os compostos presentes no precipitado, insolúveis em água, estariam em solução e poderiam penetrar nas células trazendo consequências até o presente momento desconhecidas nestas condições.

Novos estudos devem ser realizados para determinar a composição química da mistura de compostos formados na reação NaOCl/CLX. A real presença dos

compostos sugeridos neste estudo deve ser analisada pelo isolamento e identificação individual de cada um deles.

Sendo assim, como não são conclusivos os efeitos do precipitado junto ao dente, tecidos de suporte e contra microrganismos, até o presente momento, parece prudente evitar a associação de NaOCl e CLX.

7 CONCLUSÕES

Com base nos resultados apresentados no presente estudo pôde-se concluir que:

O precipitado formado na reação entre o hipoclorito de sódio e o digluconato de clorexidina não apresenta a para-cloro anilina em sua composição.

Há formação de um número maior de produtos que os relatados na literatura, sugerindo a presença dos compostos PCGH, C3, C4, C5, C6 e C7 com massas moleculares iguais a 353, 507, 577, 687, 719 e 817; respectivamente.

REFERÊNCIAS¹

Akisue E, Tomita VS, Gavini G, Poli de Figueiredo JA. Effect of the combination of sodium hypochlorite and chlorhexidine on dentinal permeability and scanning electron microscopy precipitate observation. *J Endod*. 2010 May;36(5):847-50. Epub 2010 Feb 6.

Almyroudi A, Mackenzie D, McHugh S, Saunders WP. The effectiveness of various disinfectants used as endodontic intracanal medications: an in vitro study. *J Endod*. 2002 Mar;28(3):163-7.

Ari H, Erdemir A, Belli S. Evaluation of the effect of endodontic irrigation solutions on the microhardness and the roughness of root canal dentin. *J Endod*. 2004 Nov;30(11):792-5.

Aun CE, Paiva, JG de. Viabilidade da velocidade de ação germicida do NaOCl em função da concentração (Contribuição ao estudo). *Rev Assoc Paul Cir Dent*. 1982; 36(5):510-7.

Ballal NV, Moorkoth S, Mala K, Bhat KS, Hussen SS, Pathak S. Evaluation of chemical interactions of maleic acid with sodium hypochlorite and chlorhexidine gluconate. *J Endod*. 2011 Oct;37(10):1402-5. Epub 2011 Aug 6.

Ballal V, Kundabala M, Acharya S, Ballal M. action of calcium hydroxide, chlorhexidine and their combination on endodontic pathogens. *Aust Dent J*. 2007 Jun;52(2):118-21.

Barbin LE, Saquy PC, Guedes DF, Sousa-Neto MD, Estrela C, Pécora JD. Determination of para-chloroaniline and reactive oxygen species in chlorhexidine and chlorhexidine associated with calcium hydroxide. *J Endod*. 2008 Dec; 34 (12):1508-14 Epub 2008 Oct 11.

Basrani BR, Manek S, Fillery E. Using diazotization to characterize the effect of heat or sodium hypochlorite on 2.0% chlorhexidine. *J Endod*. 2009 Sep;35(9):1296-9.

¹ De acordo com Estilo Vancouver.

- Basrani BR, Manek S, Mathers D, Fillery E, Sodhi RN. Determination of 4-chloroaniline and its derivatives formed in the interaction of sodium hypochlorite and chlorhexidine by using gas chromatography. *J Endod*. 2010 Feb;36(2):312-4. Epub 2009 Dec 14.
- Basrani BR, Manek S, Sodhi RN, Fillery E, Manzur A. Interaction between sodium hypochlorite and chlorhexidine gluconate. *J Endod*. 2007 Aug;33(8):966-9. Epub 2007 May 18.
- Becker GL, Cohen S, Borer R. The squeal of accidentally injecting sodium hypochlorite beyond the root apex. Report of a case. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1974 Oct;38(4):633-8.
- Bezerra AG. Análise da adsorção dental do alendronato de sódio através da cromatografia líquida de alta eficiência visando a utilização tópica antes do reimplante tardio [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo Faculdade de Odontologia; 2008.
- Bhat KS. Tissue emphysema caused by hydrogen peroxide. *Oral Surg*. 1974;(2):304-7.
- Bombana AC, de 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 Jul-Ago;28(4):216-23.
- Brum TCB. Avaliação da reação do hipoclorito de sódio e do gel de clorexidina na superfície do canal radicular [dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo Faculdade de Odontologia; 2008.
- Bui TB, Baumgartner JC, Mitchell JC. Evaluation of the interaction between sodium hypochlorite and chlorhexidine gluconate and its effect on root dentin. *J Endod*. 2008 Feb;34(2):181-5.
- Bürklein S, Hinschitza K, Dammaschke T, Schäfer E. Shaping ability and cleaning effectiveness of two single-file systems in severely curved root canals of extracted teeth: Reciproc and WaveOne versus Mtwo and ProTaper. *Int Endod J*. 2011 Dec 22. doi: 10.1111/j.1365-2591.2011.01996.x. [Epub ahead of print].
- Byström A, Sundqvist G. The antibacterial action of sodium hypochlorite and EDTA in 60 cases of endodontic therapy. *Int Endod J*. 1985 Jan;18(1):35-40.

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

Camões IC, Salles MR, Chevitaese O, Gomes LN. Diffusion of Ca(OH)_2 associated with different vehicles: chromatographic study (high-performance liquid chromatography). *J Endod*. 2004 Jan;30(1):30-4.

Carvalho AS, Camargo CH, Valera MC, Camargo SE, Mancini MN. Smear layer removal by auxiliary chemical substances in biomechanical preparation: a scanning electron microscope study. *J Endod*. 2008 Nov;34(11):1396-400. Epub 2008 Sep 17.

Chhabra RS, Huff JE, Haseman JK, Elwell MR, Peters AC. Carcinogenicity of p-chloroaniline in rats and mice. *Food Chem. Toxicol*. 1991;29(2):119-24.

Chhabra RS, Thompson M, Elwell MR, Gerken DK. Toxicity of p-chloroaniline in rats and mice. *Food Chem Toxicol* 1990 Oct;28(10):717-22.

Cohen S, Burns RC. *Caminhos da polpa*. 7ª Moreira E JL, tradutor. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2000.

De-Deus G, de Souza MC, Sergio Fidel RA, Fidel SR, de Campos RC, Luna AS. Negligible expression of arsenic in some commercially available brands of Portland cement and mineral trioxide aggregate. *J Endod*. 2009 Jun;35(6):887-90.

Delany GM, Patterson SS, Miller CH, Newton CW. The effect of chlorhexidine gluconate irrigation on the root canal flora of freshly extracted necrotic teeth. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1982 May;53(5):518-23.

Erdemir A, Ari H, Güngüneş H, Belli S. Effect of medications for root canal treatment on bonding to root canal dentin. *J Endod*. 2004 Feb;30(2):113-6.

Estrela C. *Ciência endodôntica*. São Paulo: Artes Médicas; 2004.

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

Ferreira RB, Marchesan MA, Silva-Sousa YT, Sousa-Neto M. Effectiveness of root canal debris removal using passive ultrasound irrigation with chlorhexidine digluconate or sodium hypochlorite individually or in combination as irrigants. *J Contemp Dent Pract.* 2008 Jul 1;9(5):68-75.

Foley DB, Weine FS, Hagen JC, deObarrio JJ. Effectiveness of selected irrigants in the elimination of *Bacteroides melaninogenicus* from the root canal system: an in vitro study. *J Endod* 1983 Jun;9(6):236-41.

Golly I, Hlavica P. The role of hemoglobin in the N-oxidation of 4-chloroaniline. *Biochim Biophys. Acta.* 1983;760(1):69-76.

Gomes BP, Ferraz CC, 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 Sep;34(6):424-8.

Grossman LI. Tratamento dos canais radiculares. Bevilacqua S, tradutor. Rio de Janeiro: Atheneu; 1964.

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

Ha Y, Cheung AP. New stability-indicating high performance liquid chromatography assay and proposed hydrolytic pathways of chlorhexidine. *J Pharm Biomed Anal.* 1996 Jun;14(8-10):1327-34.

Haapasalo HK, Sirén EK, Waltimo TM, Ørstavik D, Haapasalo MP. Inactivation of local root canal medicaments by dentine: an in vitro study. *Int Endod J.* 2000 Mar;33(2):126-31.

Harrison JW, Wagner GW, Henry CA. Comparison of the antimicrobial effectiveness of regular and fresh scent Clorox. *J Endod.* 1990 Jul;16(7):328-30.

Hülsmann M, Gambal A, Bahr R. An improved technique for the evaluation of root canal preparation. *J Endod.* 1999 Sep;25(9):599-602.

Hülsmann M, Schade M, Schäfers F. A comparative study of root canal preparation with HERO 642 and Quantec SC rotary Ni–Ti instruments. *Int Endod J.* 2001;34:538-46.

Hülsmann M, Stryga F. Comparison of root canal preparation using different automated devices and hand instrumentation. J Endod. 1993 Mar;19(3):141-5.

Ingle JI, Zeldow, BJ. An evaluation of mechanical instrumentation and the negative culture in endodontic therapy. J Am Dent Assoc. 1958;50:471.
J Endod. 2008 Dec;34(12):1508-14. Epub 2008 Oct 11.

Jaminet F, Delattre L, Delporte JP, Moes A. Effect of temperature of sterilization and of pH on stability of chlorhexidine in solution. Pharm Acta Helv. 1970 Jan;45(1):60-3.

Jeansonne MJ, White RR. A comparison of 2.0% chlorhexidine gluconate and 5.25% sodium hypochlorite as antimicrobial endodontic irrigants. J Endod. 1994 Jun;20(6):276-8.

Kacmar, P, Pistl J, Mikula I. The effect of p- chloroaniline on leukocytes of sheep peripheral blood under the migration-inhibition test conditions. Immunopharmacol Immunotoxicol. 1995;17(3):577-84.

Takehashi S, Stanley HR, Fitzgerald RJ. The effects of surgical exposures of pulps in germ-free and conventional laboratory rats. Oral Surg Oral Med Oral Pathol. 1965 Sep;20:340-9.

Khademi AA, Mohammadi Z, Havaee A. Evaluation of the antibacterial substantivity of several intra-canal agents. Aust Endod J. 2006 Dec;32(3):112 5.

Kim HS, Zhu Q, Baek SH, Jung IY, Son WJ, Chang SW, Lee W, Gu Y, Lee Y, Hong ST, Bae KS, Kim JW, Cho K, Kum KY. Chemical interaction of alexidine and sodium hypochlorite. J Endod. 2012 Jan;38(1):112-6.

Kishen A, Sum CP, Mathew S, Lim CT. Influence of irrigation regimens on the adherence of *Enterococcus faecalis* to root canal dentin. J Endod. 2008 Jul;34(7):850-4.

Koch MJ, Wünnstel E, Stein G. Formaldehyde release from ground root canal sealer in vitro. J Endod. 2001 Jun;27(6):396-7.

Krishnamurthy S, Sudhakaran S. Evaluation and prevention of the precipitate formed on interaction between sodium hypochlorite and chlorhexidine. J Endod. 2010 Jul;36(7):1154-7. Epub 2010 Apr 8.

Krithikadatta J, Indira R, Dorothykalyani AL. Disinfection of dentinal tubules with 2% chlorhexidine, 2% metronidazole, bioactive glass when compared with calcium hydroxide as intracanal medicaments. *J Endod*. 2007 Dec;33(12):1473-6.

Kuruville JR, Kamath MP. Antimicrobial activity of 2.5% sodium hypochlorite and 0.2% chlorhexidine gluconate separately and combined, as endodontic irrigants. *J Endod*. 1998 Jul;24(7):472-6.

Leonardo MR, Tanomaru Filho M, Silva LA, Nelson Filho P, Bonifácio KC, Ito IY. In vivo antimicrobial activity of 2% chlorhexidine used as a root canal irrigating solution. *J Endod*. 1999 Mar;25(3):167-71.

Lima KC, Fava LRG, Siqueira Jr, JF. Susceptibilities of *Enterococcus faecalis* biofilms to some antimicrobial medications. *J Endod*. 2001 Oct;27(10):616-9.

Manzur A, González AM, Pozos A, Silva-Herzog D, Friedman S. Bacterial quantification in teeth with apical periodontitis related to instrumentation and different intracanal medications: a randomized clinical trial. *J Endod*. 2007 Feb;33(2):114-8.

Marchesan MA, Pasternak Júnior B, Afonso MM, Sousa-Neto MD, Paschoalato C. Chemical analysis of the flocculate formed by the association of sodium hypochlorite and chlorhexidine. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2007 May;103(5):e103-5.

Muller L, Fattore E, Benfenati E. Determination of aromatic amines by solid Phase Microextraction and gas chromatography-mass spectrometry in water samples. *J Chromatogr*. 1997;791(1/2):221-30.

Musteata FM, Pawliszyn J. Assay of stability, free and total concentration of chlorhexidine in saliva by solid phase microextraction. *J Pharm Biomed Anal*. 2005 Apr 29;37(5):1015-24. Epub 2004 Dec 8.

Neelakantan P, Sanjeev K, Subbarao CV. Duration-dependent susceptibility of endodontic pathogens to calcium hydroxide and chlorhexidine gel used as intracanal medicament: an in vitro evaluation. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2007 Oct;104(4):e138-41.

Nowicki JB, Sem DS. An in vitro spectroscopic analysis to determine the chemical composition of the precipitate formed by mixing sodium hypochlorite and chlorhexidine. *J Endod*. 2011 Jul;37(7):983-8. Epub 2011 May 18.

Nup C, Rosenberg P, Linke H, Tordik P. Quantitation of catecholamines in inflamed human dental pulp by high-performance liquid chromatography. *J Endod*. 2001 Feb;27(2):73-5.

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

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

Oliveira LD, Carvalho CA, Nunes W, Valera MC, Camargo CH, Jorge AO. Effects of chlorhexidine and sodium hypochlorite on the microhardness of root canal dentin. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2007 Oct;104(4):e125-8. Epub 2007 Jul 26.

Onçağ O, Hoşgör M, Hilmioğlu S, Zekioğlu O, Eronat C, Burhanoğlu D. Comparison of antibacterial and toxic effects of various root canal irrigants. *Int Endod J*. 2003 Jun;36(6):423-32.

Paiva JG de, Antoniazzi JH. *Endodontia: bases para a pratica clínica*. 2a ed. São Paulo: Artes Medicas; 1988.

Patil CR, Uppin V. Effect of endodontic irrigating solutions on the microhardness and roughness of root canal dentin: an in vitro study. *Indian J Dent Res*. 2011 Jan-Feb;22(1):22-7.

Peters OA. Current challenges and concepts in the preparation of root canal systems: a review. *J Endod*. 2004 Aug;30(8):559-67.

Plotino G, Grande NM, Testarelli L, Gambarini G. Cyclic fatigue of Reciproc and WaveOne reciprocating instruments. *Int Endod J*. 2012 Jan 23. doi: 10.1111/j.1365-2591.2012.02015.x. [Epub ahead of print].

Pubchem coumpond [Citado 12 fev. 2012]. Disponível em: http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=44134624&loc=ec_rcs.

Rasimick BJ, Nekich M, Hladek MM, Musikant BL, Deutsch AS. Interaction between chlorhexidine digluconate and EDTA. J Endod. 2008 Dec;34(12):1521-3. Epub 2008 Oct 11.

Ringel AM, Patterson SS, Newton CW, Miller CH, Mulhern JM. In vivo evaluation of chlorhexidine gluconate solution and sodium hypochlorite solution as root canal irrigants. J Endod. 1982 May;8(5):200-4.

Santos JN, Carrilho MR, De Goes MF, Zaia AA, Gomes BP, Souza-Filho FJ, Ferraz CC. Effect of chemical irrigants on the bond strength of a self-etching adhesive to pulp chamber dentin. J Endod. 2006 Nov;32(11):1088-90. Epub 2006 Sep 15.

Santos PD, Fernandes PHS. Utilização de Cloridrato de Polihexametileno Biguanida (PHMB) na desinfecção de indústrias cervejeiras. Revista TECCEN 2010 abr.;3(1).

Schachman MA, Rosenberg PA, Linke HA. Quantitation of catecholamines in uninflamed human dental pulp tissues by high-performance liquid chromatography. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 1995 Jul;80(1):83-6.

Sen BH, Safavi KE, Spångberg LS. Antifungal effects of sodium hypochlorite and chlorhexidine in root canals. J Endod. 1999 Apr;25(4):235-8.

Silverstein RM, Bassler GC, Morrill TC. Identificação espectrométrica de compostos orgânicos. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Dois, 1979.

Silverstein RM, Webster FX, Kiemle DJ. Identificação espectrométrica de compostos orgânicos. 7. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2007.

Siqueira EL. Dissolução de tecido pulpar bovino por duas composições químicas utilizadas em Endodontia [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2004.

Siqueira Jr JF. Tratamento das infecções endodônticas. Rio de Janeiro: MEDSI; 1997.

Sodhi R, Manek S, Fillery E, Basrani B. ToF-SIMS studies on chlorhexidine and its reaction products with sodium hypochlorite to ascertain decomposition products. Surface and Interface Analysis. 2011 Jan-Feb;43, Issue 1-2, pages 591–594.

Souza MM, Souza MCMG, Saquy PC, Pécora JD. Ação antimicrobiana do NaOCl em diferentes concentrações e tempos de contato. *Odonto*. 1992;2(4):302-6.

Spanó JCE. Estudo in vitro das propriedades físico-químicas das soluções de NaOCl, em diferentes concentrações, antes e após a dissolução do tecido pulpar bovino [dissertação]. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 1999.

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 Jun;34(4):300-7.

Tanaka T, Ishii M, Nakano S, Mori Y, Yano Y, Iijima T, Takeda K, Kido Y. Microbial degradation of disinfectants: two new aromatic degradation products of chlorhexidine, chlorhexidine aromatic degradation product (CHADP)-4 and CHADP-6, produced by *Pseudomonas* sp. strain No. A-3. *J Health Sci*. 2006;52:58–62.

Tanaka T, Ishii M, Nakano S, Mori Y, Yano Y, Iijima T, Takeda K, Kido Y. Microbial Degradation of Disinfectants. A New Chlorhexidine Degradation Intermediate (CHDI), CHDI-C, Produced by *Pseudomonas* sp. Strain No. A-3. *J Health Sci*. 2005;51(3):357-361.

Tangerino LMB. Estudo das propriedades antimicrobianas de copolímeros derivados do eugenol. [dissertação]. Minas Gerais: Universidade Federal de Itajubá, Instituto de Ciências Exatas; 2006.

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

Taşman F, Cehreli ZC, Oğan C, Etikan I. Surface tension of root canal irrigants. *J Endod*. 2000 Oct;26(10):586-7.

Thomas JE, Sem DS. An in vitro spectroscopic analysis to determine whether para-chloroaniline is produced from mixing sodium hypochlorite and chlorhexidine. *J Endod*. 2010 Feb;36(2):315-7. Epub 2009 Dec 14.

USEPA - United States Environmental Protection Agency. Reregistration Eligibility Decision - Diflubenzuron. Washington: EPA 738-R-97-008; 1997.

Usui K, Hishinuma T, Yamaguchi H, Tachiiri N, Goto J. Determination of chlorhexidine (CHD) and nonylphenoethoxylates (NPEOn) using LC-ESI-MS method and application to hemolyzed blood. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2006 Feb 2;831(1-2):105-9. Epub 2005 Dec 27.

Uyeda M, Shiosaki T, Yokomizo K, Suzuki K, Uraki F, Tanaka T, Kido Y. Microbial Degradation of Disinfectants. Structures of Chlorhexidine Degradation Intermediates, CHDI-B, CHDI-BR and CHDI-D, Produced by *Pseudomonas* Sp. Strain No. A-3. *Jpn J Toxicol Environ Health*. 1996;42(2):121-6.

Varella JAF, Paiva JG. Manual de endodontia. 2a ed. São Paulo: Atheneu; 1969.

Vicente E, Toledo, MCF. Desenvolvimento de metodologia para determinação de 4-cloroanilina em frangos por cromatografia gasosa - espectrometria de massas. Análise em tecidos tratados com digluconato de clorexidina após o processamento térmico. *Ciênc Tecnol Aliment*. 2003 dez;23:71-8.

Vivacqua-Gomes N, Ferraz CC, Gomes BP, Zaia AA, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. Influence of irrigants on the coronal microleakage of laterally condensed gutta-percha root fillings. *Int Endod J*. 2002 Sep;35(9):791-5.

Walia HM, Brantley WA, Gerstein H. An initial investigation of the bending and torsional properties of Nitinol root canal files. *J Endod*. 1988 Jul;14(7):346-51.

Walker M. Creating interest in the dental library. *Bull Med Libr Assoc*. 1936 Sep;25(1-2):120-4.

Wang CS, Arnold RR, Trope M, Teixeira FB. Clinical efficiency of 2% chlorhexidine gel in reducing intracanal bacteria. *J Endod*. 2007 Nov;33(11):1283-9.

White RR, Hays GL, Janer LR. Residual antimicrobial activity after canal irrigation with chlorhexidine. *J Endod*. 1997 Apr;23(4):229-31.

White RR, Janer LR, Hays GL. Residual antimicrobial activity associated with a chlorhexidine endodontic irrigant used with sodium hypochlorite. *Am J Dent*. 1999 Jun;12(3):148-50.

Yesilsoy C, Whitaker E, Cleveland D, Phillips E, Trope M. Antimicrobial and toxic effects of established and potential root canal irrigants. *J Endod*. 1995 Oct;21(10):513-5.

Zamany A, Safavi K, Spångberg LS. The effect of chlorhexidine as an endodontic disinfectant. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2003 Nov;96(5):578-81.

Zehnder M. Root canal irrigants. *J Endod*. 2006;32:389–98.

Zerlotti, FE. Contribuição à terapêutica dos canais rediculares [tese]. Campinas: PUCAMP, Faculdade de Odontologia; 1959.

Zong Z. Studies on the mechanisms of solid state and solution instability of drugs. [dissertation]. University of Iowa; 2011. [Citado 12 fev. 2012]. Disponível em: <http://ir.uiowa.edu/etd/2795>.