

Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra

Mestrado Integrado em Medicina Dentária



**Estudo *in vitro* da eficácia antimicrobiana de
diferentes soluções de irrigação**

Sílvia Areias Martins

Orientador: Professor Doutor João Miguel dos Santos
Co-orientadora: Professora Doutora Teresa Gonçalves

Coimbra, 2012

Estudo *in vitro* da eficácia antimicrobiana de diferentes soluções de irrigação

Martins S*, Santos JM**, Gonçalves T***

* Aluna do Mestrado Integrado em Medicina Dentária da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra

** DMD, MSc, PhD, Professor Auxiliar da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra

*** BSc, MSc, PhD, Professora Auxiliar da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra

Endereço: Área de Medicina Dentária da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra,
Avenida Bissaya Barreto, Bloco de Celas
3000-075 Coimbra
Telf: +351 239484183
Fax: +351 239402910
Coimbra, Portugal

Endereço eletrónico: martins.silvia89@gmail.com

Resumo

Introdução: O tratamento endodôntico tem como principal objetivo manter as condições de assépsia do sistema de canais, eliminar os microrganismos do seu interior promovendo a integridade dos tecidos periapicais. A preparação biomecânica dos canais radiculares é feita através de um protocolo que conjuga a instrumentação com soluções para irrigação. A irrigação canalar assume um papel fundamental na redução de microrganismos do interior dos canais, facilita a remoção de resíduos e melhora os efeitos produzidos pelos instrumentos. Este estudo teve por objetivo avaliar a eficácia antimicrobiana *in vitro* de diferentes concentrações de hipoclorito de sódio (NaOCl), 1%, 2,5%, 3% e 6% com adição de um agente tensioativo, e clorhexidina (CHX) a 0,1 e 2% sobre o *Enterococcus faecalis* e a *Candida albicans*. **Materiais e Métodos:** Para a avaliação da eficácia antimicrobiana utilizou-se o método de difusão em agar. Foram realizadas culturas prévias dos microrganismos em meio sólido BHI (*Brain Heart Infusion*) e YPD (*Yeast-Peptone-Dextrose*), efetuadas suspensões das colónias de cada microrganismo e espalhadas em placas de Petri sobre meio sólido BHI. Utilizaram-se discos de papel de 6 mm saturados com as diferentes soluções testadas e colocados nas placas de Petri. Estas foram incubadas em estufa a 37°C, durante 48 horas. O diâmetro dos halos de inibição foi medido às 24 e às 48 horas. **Resultados:** A solução que apresentou maior eficácia antimicrobiana foi o NaOCl 3% para ambos os microrganismos e a que apresentou menor foi a CHX a 0,1%. Não se observaram diferenças estatisticamente significativas entre as medições dos halos às 24 e 48

horas, constatando-se no entanto uma diminuição dos halos para as soluções de NaOCl às 48 horas. Os halos de inibição para a *C. albicans* apresentaram para todas as soluções maior diâmetro em relação aos do *E. faecalis*. **Conclusão:** Todas as soluções de irrigação testadas foram efetivas sobre o *E. faecalis* e a *C.albicans*, evidenciando-se para ambos os microrganismos uma eficácia antimicrobiana superior do NaOCl a 3%.

Palavras-chave: eficácia antimicrobiana, soluções de irrigação, hipoclorito de sódio, clorhexidina, método de difusão em agar, *Enterococcus faecalis*, *Candida albicans*.

Abstract

Introduction: The main objective of endodontic treatment is to maintain aseptic conditions and focus on exclusion of microorganisms from the root canal system, aiming to maintain or reestablish the integrity of the periapical tissues. The biomechanical preparation of root canals is done through a protocol that combines instrumentation and antiseptic irrigant solutions. Root canal irrigation plays a key role in the reduction of microorganisms of the canals, facilitates the removal of debris and improves the results of instrumentation. The aim of this study was to evaluate *in vitro* the antimicrobial efficacy of different concentrations of sodium hypochlorite (NaOCl), 1%, 2,5%, 3% and 6% with the addition of a surfactant, and chlorhexidine (CHX) 0,1 e 2% of the *Enterococcus faecalis* and *Candida albicans*. **Materials and Methods:** The agar diffusion test was used to evaluate the antimicrobial efficacy of the tested solutions. Previously, the microorganisms were cultivated in BHI (*Brain Heart Infusion*) and YPD (*Yeast-Peptone-Dextrose*), suspensions were made of each microorganism and spread on the BHI solid medium, on Petri plates. Paper disks (6 mm in diameter) were saturated with the different experimental solutions and were placed on the BHI agar surface in each Petri plate. The plates were incubated at 37 °C for 48 hours. The diameter of inhibition zones were measured at 24 and 48 hours. **Results:** 3% NaOCl was superior in its antimicrobial efficacy for both microorganisms compared with other irrigants used, and 0,1% CHX showed the smallest zones. There were no statistical significant differences between measurements at 24 and 48 hours, however there was a decrease of the inhibition zones observed for the NaOCl solutions at 48 hours. The inhibition zones for *C. albicans*, for all irrigants, were bigger than the *E. faecalis*. **Conclusion:** All irrigants showed antimicrobial efficacy against *E. faecalis* and *C. albicans*. NaOCl 3% solution showed the best antimicrobial efficacy against both tested microorganisms.

Keywords: antimicrobial efficacy, root canal irrigants, sodium hypochlorite, chlorhexidine, agar diffusion test, *Enterococcus faecalis*, *Candida albicans*.

Introdução

A capacidade do clínico na eliminação dos microrganismos dos canais radiculares infectados está diretamente associada ao sucesso do tratamento endodôntico⁽¹⁻⁶⁾. Estudos clássicos demonstram que apenas a instrumentação canal não é eficaz e não consegue eliminar a totalidade de microrganismos do interior dos canais⁽⁷⁾. A instrumentação deve sempre ser complementada com o uso de irrigação^(3, 8-10). Alguns estudos demonstram que grande área das paredes canulares não é instrumentada, devido à sua complexa anatomia e difícil acesso dos instrumentos, evidenciando-se, assim, a importância da irrigação canal^(8, 11).

As soluções de irrigação são um método indispensável que ajuda na desinfecção de todo o sistema canal, tem ação lubrificante sobre as limas, elimina detritos do interior do canal, tem um efeito de dissolução tecidual e atividade antimicrobiana^(3, 8, 12). Um irrigante ideal deve ser fortemente antimicrobiano, mas não tóxico para os tecidos periapicais de modo a não atrasar o processo de cicatrização e reparação dos tecidos⁽¹⁾, além do risco inerente de extravasamento através do ápex que pode levar à lesão dos mesmos.

No entanto, a eficácia destes procedimentos também depende da vulnerabilidade das espécies envolvidas na colonização do canal⁽⁴⁾. Entre as espécies de microrganismos mais frequentemente utilizadas nos testes de eficácia antimicrobiana destacam-se o *Enterococcus faecalis* e a *Candida albicans*.

O *E. faecalis* está associado a diferentes formas de periodontite apical incluindo as infecções primárias e as persistentes⁽¹³⁾. Segundo Rôças *et al.* a sua prevalência em casos de infecção primária varia de 4 a 40%^(cit in 13), por outro lado em canais radiculares de dentes com periodontite periapical persistente oscila entre os 12 e os 77%, consoante os estudos⁽¹⁴⁾, sendo muitas vezes isolado como espécie única^(2, 15).

Embora alguns fungos tenham sido ocasionalmente relatados em casos de infecção primária, também são relacionados com casos de insucesso do tratamento endodôntico^(16, 17) sendo a espécie mais comum a *C. albicans*. Em 50% dos casos associada com o *E. faecalis* e em 18% dos casos associada com outras bactérias⁽¹⁸⁾.

Um dos requisitos mais importantes da irrigação canal é a atividade antimicrobiana, sendo os compostos mais utilizados com essa característica o hipoclorito de sódio (NaOCl) e a clorhexidina (CHX)^(3,18,19). Estes têm sido amplamente testados em modelos experimentais com recurso a bactérias planctónicas^(15, 17, 18).

O hipoclorito de sódio (NaOCl) é a solução de irrigação mais utilizada em Endodôncia^(5, 20, 21), considerando-se a mais adequada devido às suas fortes propriedades

antimicrobiana, proteolítica e antisséptica^(1, 5, 8, 22). O seu mecanismo de ação baseia-se sobretudo na reação ácido-base que este sofre em solução aquosa, dependendo também do seu elevado pH (varia de 11 a 12)^(5, 22).

Diferentes concentrações de NaOCl podem ser utilizadas durante a preparação biomecânica dos canais, não existindo atualmente unanimidade e consenso na escolha da concentração mais apropriada^(8, 12, 23).

A clorhexidina (CHX) é recomendada como solução de irrigação endodôntica pelas suas propriedades de atividade antimicrobiana de largo espectro, substantividade e baixa toxicidade⁽²⁴⁾. A CHX é um agente catiónico pertencente ao grupo das bisguanidas, cuja natureza catiónica dos seus componentes promove a ligação com compostos aniónicos da superfície da parede celular bacteriana^(3,4). Uma característica importante é a substantividade, capacidade de ligação às proteínas da hidroxiapatite dentinária⁽⁹⁾, que se traduz num efeito antimicrobiano residual de libertação prolongada⁽¹⁷⁾, geralmente até 72 horas após irrigação^(9, 25). À semelhança de outras soluções, a eficácia da CHX depende do pH, esta é ativa num pH entre 5,5 e 7, e fica diminuída na presença de matéria orgânica⁽⁵⁾.

Um dos métodos mais utilizado para testar a atividade antimicrobiana *in vitro* é o método de difusão em agar^(26, 27), que envolve a colocação de discos de papel saturados com determinadas soluções sobre o agar em contacto com o microrganismo selecionado. Após um certo período de tempo irão formar-se zonas de inibição de diâmetros variáveis em torno dos discos, as quais representam a atividade antimicrobiana das soluções^(3, 26).

O presente estudo tem como objetivo avaliar *in vitro* a eficácia antimicrobiana de diferentes soluções de hipoclorito de sódio em concentrações de 1, 2,5 e 3% (CanalPro NaOCl - Coltène[®]) isoladamente e na concentração de 6% associado a um agente tensoactivo (CanalPro NaOCl EXTRA - Coltène[®]), bem como uma solução de clorhexidina a 0,1% (Eludril – Pierre Fabre) e a 2% (Clorhexidina S – FGM).

Materiais e Métodos

A avaliação da eficácia antimicrobiana foi realizada pelo método de difusão em agar, que se baseia na determinação dos halos de inibição do crescimento microbiano, com recurso aos microrganismos *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) e *Candida albicans* (YP0015).

O *Enterococcus faecalis* e a *Candida albicans* foram previamente cultivados em meio sólido *Brain Heart Infusion* (BHI, Cultimed) e *Yeast-Peptone-Dextrose* (YPD, Cultimed),

respetivamente, e incubados durante 24 horas. A *Candida albicans* foi colocada numa estufa a 30°C e o *Enterococcus faecalis* em estufa a 37°C

Após o crescimento das culturas foram feitas suspensões de ambos os microrganismos em tubos de Falcon, esterilizados, contendo 5 ml de solução tamponada de fosfato (PBS). Foram transferidos 2 ml de cada suspensão para ampolas de vidro e estas foram padronizadas de acordo com o valor 1 da escala de McFarland na concentração aproximada de 3×10^8 UFC/ml (unidades formadoras de colónias/ml), medida através do densitómetro (Densimat, bioMérieux).

Foram utilizadas no total 33 placas de Petri com meio sólido *Brain Heart Infusion* (BHI, Cultimed), 15 placas para o ensaio com o *E. faecalis* e 18 placas para a *C. albicans*. De seguida foram espalhados 100 µl de cada uma das suspensões de *E. faecalis* e *C. albicans* em toda a superfície do agar contido nas placas de Petri.

As soluções testadas foram designadas de acordo com a tabela I.

Tabela I – Soluções de irrigação testadas.

Solução A	Soro fisiológico 0,9% (B.Braun)
Solução B	CHX 0,1% (Eludril – Pierre Fabre)
Solução C	CHX 2% (Clorhexidina S – FGM)
Solução D	NaOCl 1%
Solução E	NaOCl 2,5%
Solução F	NaOCl 3% (CanalPro NaOCl - Coltène®)
Solução G	NaOCl 6% + surfatante (CanalPro NaOCl EXTRA - Coltène®)

As soluções de hipoclorito de sódio (NaOCl) a 1 e 2,5% foram preparadas no laboratório de farmácia dos CHUC (Centro Hospitalar e Universtário de Coimbra) a partir da diluição de uma solução inicial na concentração de 10%, enquanto as restantes foram fornecidas pela marca comercial. As soluções de preparação extemporânea foram utilizadas nos 30 dias seguintes e as soluções comerciais dentro do prazo de validade indicado pelo fabricante.

O soro fisiológico a 0,9% constituiu o controlo negativo das experiências por não ter capacidade antimicrobiana sobre as estirpes testadas e para nos assegurarmos que a inibição do crescimento microbiano era apenas devido ao uso das soluções antissépticas.

Para testar a eficácia antimicrobiana das soluções em estudo, foram embebidos discos de papel de 6 milímetros (mm) de diâmetro (BD - Becton, Dickinson) até estes estarem saturados, com cada um dos produtos testados. Depois foram colocados na superfície do agar nas placas de Petri e posteriormente estas foram incubadas em estufa a 37°C. O diâmetro dos halos de inibição formados à volta dos discos foram medidos, em milímetros, para cada um dos produtos testados, após 24 e 48 horas.

Todos os procedimentos foram realizados em câmara de fluxo de ar laminado e este desenho experimental foi realizado em triplicado, ou seja, foram embebidos 3 discos para cada solução e para cada microrganismo.

Quanto ao método estatístico, a análise foi feita com recurso ao programa SPSS 19.0 (SPSS Inc, Chicago, IL). O efeito dos diferentes tipos de soluções na variação dos halos de inibição foi analisado através de testes não paramétricos de Kruskal-Wallis, devido ao número limitado de amostras em cada grupo (n=3). Testes de Mann-Whitney U *post-hoc* foram utilizados para averiguar diferenças entre pares de soluções, nos controlos efetuados às 24 e 48 horas. Recorreu-se ao mesmo tipo de teste para identificar diferenças nos halos de inibição medidos, para cada solução, para os dois microrganismos. O teste de Wilcoxon foi utilizado para comparar as medições efetuadas, para cada solução, nos dois momentos distintos. O nível de significância estatística foi considerado quando $p < 0,05$.

Resultados

Todas as soluções de irrigação apresentaram eficácia antimicrobiana sobre os microrganismos *Enterococcus faecalis* e *Candida albicans*, em todos os testes para ambos os microrganismos obtiveram-se halos de inibição. A solução A, o soro fisiológico, usado como controlo negativo, não produziu qualquer zona de inibição para o *E. faecalis* ou para a *C. albicans*.

As médias e desvio padrão, em milímetros (mm), dos diâmetros dos halos de inibição do crescimento microbiano produzidos pelas diferentes soluções testadas às 24 e 48 horas estão representados na tabela II.

Tabela II – Média e desvio padrão do diâmetro dos halos de inibição, em mm, do *E. faecalis* e *C. albicans*, às 24 e 48 horas.

Soluções	<i>E. faecalis</i>		<i>C. albicans</i>	
	24 horas	48 horas	24 horas	48 horas
A (Soro fisiológico)	0	0	0	0
B (CHX 0,1%)	12,33 ± 0,58	13 ± 1,73	14 ± 1,73	13,67 ± 2,08
C (CHX 2%)	16,67 ± 0,58	16,67 ± 0,58	21,33 ± 0,58	21 ± 0
D (NaOCl 1%)	16,67 ± 2,08	15 ± 1,0	27 ± 2,0	25,67 ± 2,08
E (NaOCl 2,5%)	16,67 ± 2,08	15 ± 1,0	34,67 ± 3,79	32,67 ± 2,89
F (NaOCl 3%)	31,33 ± 0,58	28,67 ± 1,15	54 ± 1,0	51 ± 1,0
G (NaOCl 6% + surfatante)	21 ± 1,0	19 ± 1,0	41,33 ± 3,51	38,33 ± 2,51

A solução de NaOCl a 3 % (solução F) foi a mais efetiva sobre o *E. faecalis* e a *C. albicans* mostrando, respetivamente, halos de inibição de 31,33 ± 0,58 mm e 54 ± 1,0 mm, às 24 horas, e halos de 28,67 ± 1,15 mm e 51 ± 1,0 mm, às 48 horas. Por outro lado, a solução de CHX a 0,1% (solução B) foi a que apresentou menor ação antimicrobiana sobre ambos os microrganismos testados.

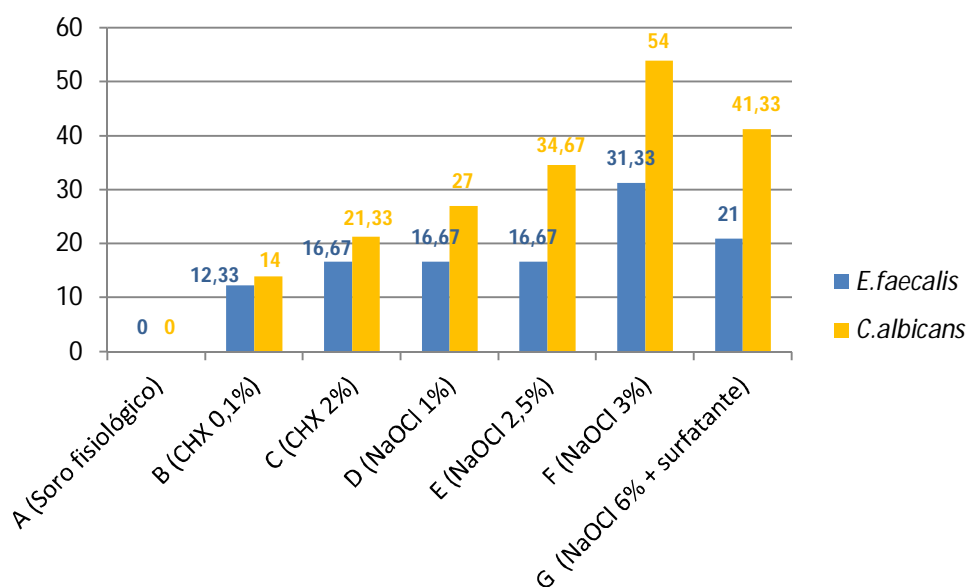


Figura 1 – Diâmetros (em mm) dos halos de inibição produzidos pelas diferentes soluções sobre o *Enterococcus faecalis* e *Candida albicans*, às 24 horas.

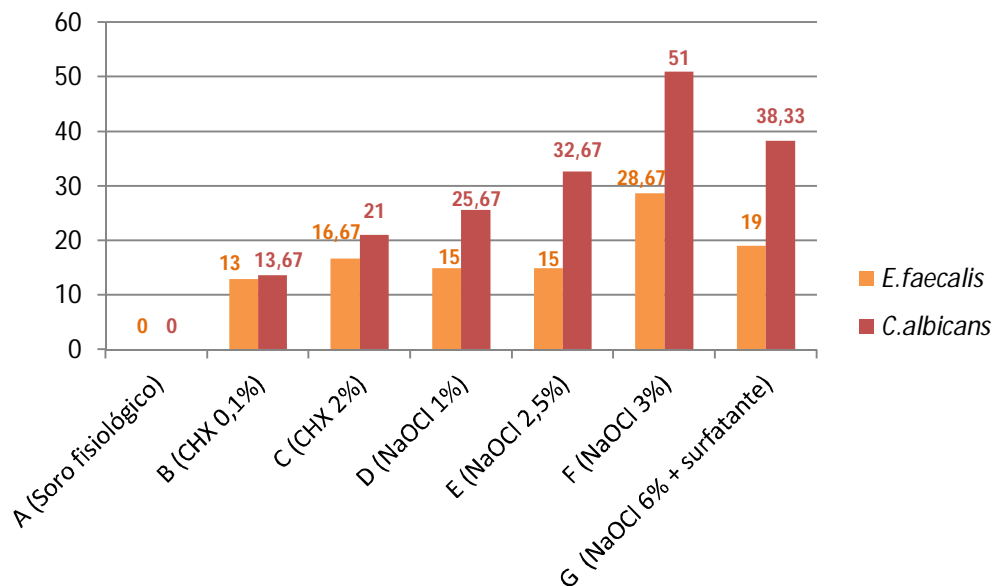


Figura 2 – Diâmetros (em mm) dos halos de inibição produzidos pelas diferentes soluções sobre o *Enterococcus faecalis* e *Candida albicans*, às 48 horas.

Análise do impacto do lapso temporal nas medições

No controlo dos halos de inibição às 48 horas houve uma ligeira diminuição dos halos para as soluções de hipoclorito de sódio testadas (soluções D, E, F e G) para ambos os microrganismos, observando-se crescimento microbiano em zonas de anterior inibição. Tal facto não se verificou para as soluções de clorohexidina (soluções B e C). No entanto, as diferenças constatadas entre ambos os períodos de tempo não são estatisticamente significativas para nenhum dos microrganismos.

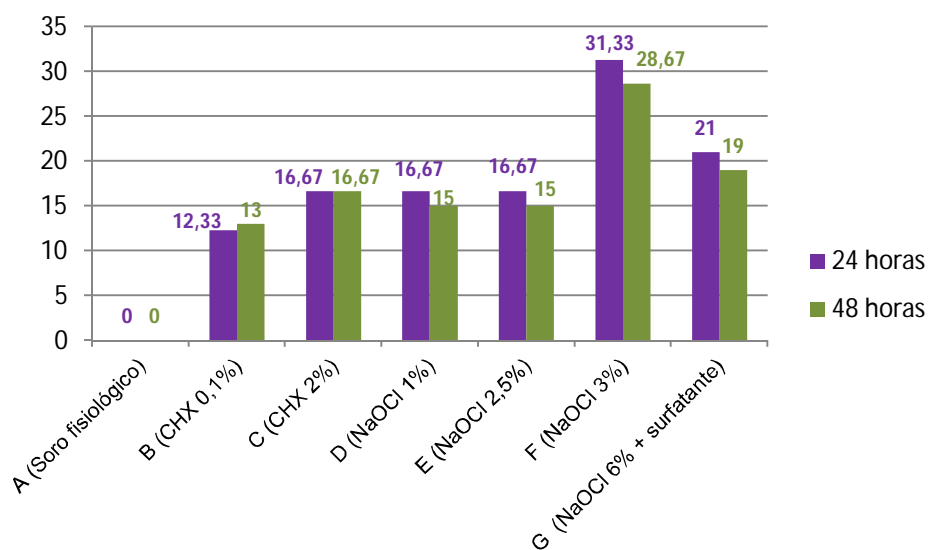


Figura 3 – Variação do diâmetro (em mm) dos halos de inibição para as diferentes soluções, às 24 e 48 horas, para o *E. faecalis*.

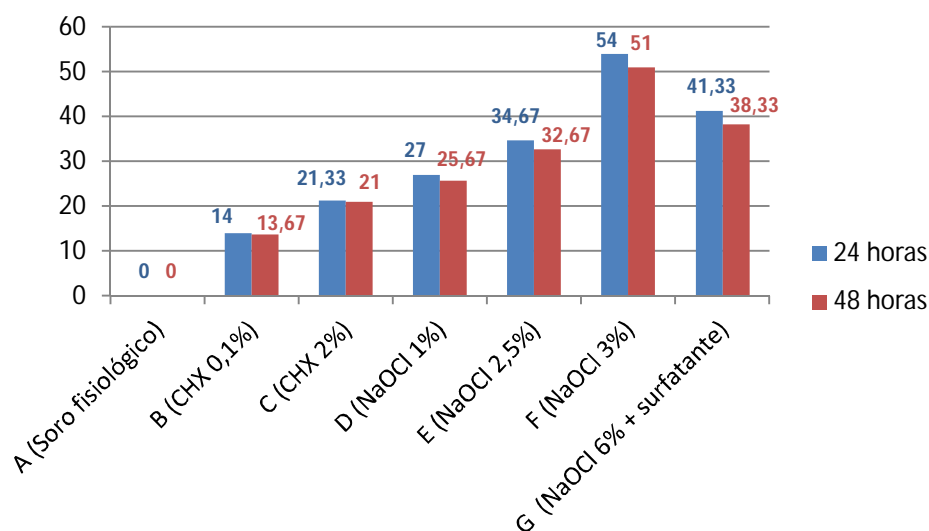


Figura 4 – Variação do diâmetro (em mm) dos halos de inibição para as diferentes soluções, às 24 e 48 horas, para a *C.albicans*.

Análise do efeito da solução na variação do tamanho dos halos

Enterococcus faecalis

Para o caso do microrganismo *Enterococcus faecalis* foram detetadas diferenças estatisticamente significativas entre os impactos das sete soluções testadas (soro fisiológico, CHX 0,1%, CHX 2%, NaOCl 1%, NaOCl 2,5%, NaOCl 3% e NaOCl 6% + surfatante) na variação dos halos às 24 horas ($X^2_{KW}(6) = 18,441$; $p = 0,005$) e 48 horas ($X^2_{KW}(6) = 18,364$; $p = 0,005$).

24 horas

Analisando a eficácia antimicrobiana entre soluções para o *Enterococcus faecalis*, no intervalo às 24 horas, verificou-se que as soluções de NaOCl a 1 e a 2,5% e a CHX a 2% apresentaram um efeito antimicrobiano semelhante, com halos de inibição iguais, de 16,67 mm, não havendo assim diferenças significativas entre estas soluções.

A solução F, NaOCl 3%, apresentou um halo de inibição de $31,33 \pm 0,58$ mm, enquanto para a solução G, NaOCl 6% com adição de surfatante, o halo foi de $21 \pm 1,0$ mm, evidenciando assim a maior atividade antimicrobiana para a primeira solução. A diferença observada entre estas duas soluções é estatisticamente significativa ($p = 0,046$).

48 horas

Às 48 horas, a solução B, CHX 0,1%, apresentava um halo de inibição de $13 \pm 1,73$ mm e as soluções D e E, NaOCl 1 e 2,5%, halos de inibição de $15 \pm 1,0$ mm. Embora os diâmetros dos halos para as soluções de hipoclorito de sódio se tenham mantido superiores em relação aos da CHX 0,1%, essa diferença não é considerada estatisticamente significativa ($p=0,178$).

A diferença entre os halos de inibição produzidos pelas soluções NaOCl a 3% e a 6% com adição de surfatante não se mostrou estatisticamente significativa ($p= 0,376$), embora tenha havido diminuição dos dois halos de inibição relativamente ao período das 24 horas.

Candida albicans

Para o caso do microrganismo *Candida albicans* foram detetadas diferenças significativas entre os impactos das sete soluções testadas (Soro Fisiológico, CHX 0,1%, CHX 2%, NaOCl 1%, NaOCl 2,5%, NaOCl 3% e NaOCl 6% + surfatante) na variação dos halos às 24 horas ($X^2_{KW}(6) = 19,574$; $p = 0,003$) e 48 horas ($X^2_{KW}(6) = 19,691$; $p = 0,003$).

24 horas

Para o caso da *Candida albicans*, no intervalo às 24 horas, todas as concentrações de NaOCl apresentaram maior eficácia contra a *Candida albicans*, do que ambas as soluções de CHX, com diferença estatisticamente significativa ($p=0,046$).

48 horas

No controlo às 48 horas, o diâmetro dos halos de inibição para ambas as soluções de CHX foi menor do que para qualquer concentração de NaOCl testada.

O maior halo foi observado para o NaOCl a 3% ($51 \pm 1,0$ mm) com diferença estatisticamente significativa ($p=0,046$) em relação ao NaOCl a 2,5% ($32,67 \pm 2,89$ mm).

Análise do impacto dos microrganismos no modelo experimental

Também foram estudadas diferenças nos halos de inibição entre os dois microrganismos. Todas as soluções apresentaram uma maior inibição do crescimento microbiano para a *Candida albicans* com o diâmetro dos halos observados sempre superior em relação ao *Enterococcus faecalis*.

Discussão

O sucesso do tratamento endodôntico é diretamente influenciado pelo eficaz controlo da microbiota endodôntica. Para isso é fundamental o conhecimento dos microrganismos responsáveis pela patologia pulpar e periapical, bem como o domínio do mecanismo de ação e propriedades das soluções de irrigação canal. A seleção de um irrigante complementar da instrumentação canal baseia-se na análise das suas características físicas, químicas e biológicas, de modo a cumprir os objetivos do tratamento endodôntico^(23, 28).

O estudo da eficácia antimicrobiana das soluções de irrigação tem sido realizado com recurso a diversos modelos experimentais *in vitro*. Os testes laboratoriais utilizam métodos como o do contacto direto das soluções, o da infeção artificial de dentes extraídos humanos ou animais, ou o método da difusão em agar^(2, 18, 29, 30).

O método da difusão em agar utilizado neste estudo é útil como uma abordagem inicial para a avaliação *in vitro* da atividade antimicrobiana dos irrigantes⁽³¹⁾.

Este modelo de estudo tem limitações e não reproduz as características clínicas dos canais radiculares em pacientes humanos, pelo que os seus resultados não podem ser diretamente extrapolados para a clínica⁽³²⁾. A atividade antimicrobiana *in vitro* do NaOCl e da CHX está dependente do substrato contido nas placas, da solubilidade e da capacidade de difusão das soluções⁽³⁾, assim como das suas quantidades, tempo de incubação, tipo de microrganismos inoculados e atividade metabólica dos mesmos^(1, 4). Soluções que apresentem baixa difusibilidade no agar vão originar zonas de inibição de pequeno diâmetro, mesmo que tenham um potente efeito antimicrobiano⁽³¹⁾. Este fenómeno foi documentado por Estrela *et al.*⁽³⁾ ao estudarem o efeito antimicrobiano do NaOCl e da CHX a 2% sobre os microrganismos *S. aureus*, *E. faecalis*, *P. aeruginosa*, *B. subtilis*, *C. albicans* e ainda uma combinação destes, através de dois métodos diferentes: contacto direto e difusão em agar. Os autores concluíram que o NaOCl 2% teve melhor efeito antimicrobiano no teste de contacto direto, enquanto a CHX 2% foi mais eficaz no teste de difusão em agar, constatando que a magnitude da ação antibacteriana é influenciada pelo método experimental e pelo tempo de exposição.

Pelo contrário, no presente estudo as soluções de NaOCl evidenciaram efeito antimicrobiano superior em relação às soluções de CHX.

Neste modelo *in vitro* também há um contacto direto das soluções com os microrganismos, por outro lado os modelos de estudo em dentes humanos *in vivo* ou *ex vivo*

não implicam que haja necessariamente um contacto direto com os irrigantes devido à localização das bactérias e fungos em zonas inacessíveis no interior dos canais ou mesmo nos túbulos dentinários⁽¹⁸⁾. Ainda assim, os métodos simples como o utilizado nesta experiência conseguem revelar-nos de forma rápida o efeito antimicrobiano de diferentes soluções de irrigação⁽³³⁾.

Para avaliar os resultados obtidos e compará-los com outros estudos *in vitro*, ou mesmo *in vivo*, é necessário ter em conta a ausência de inúmeras variáveis relacionadas com as situações clínicas como a presença de matéria orgânica e inorgânica, o efeito tampão da dentina, o crescimento organizado em biofilmes e o tempo de contacto com a solução^(22, 34). A preparação canalar químico-mecânica decorre num período curto de tempo, pelo que o NaOCl contacta durante pouco tempo com os microrganismos. O efeito dos irrigantes sobre os patogénios endodônticos deve ser analisado com base nestas condicionantes.

Pappen *et al.*⁽²¹⁾ estudaram o efeito de matéria orgânica na inibição da eficácia antimicrobiana do NaOCl, com recurso a quatro microrganismos, o *E. faecalis*, a *C. albicans*, o *S. epidermidis* e a *E. coli*. Foram avaliadas concentrações de NaOCl de 0,03 a 2% na presença de concentrações de BSA (albumina de soro bovino) de 0,1 a 6,7%, concluindo que a BSA tem um efeito inibitório na ação do NaOCl sobre os microrganismos que é diretamente proporcional à sua concentração. Sassone *et al.*⁽²⁷⁾, num teste de difusão em agar, avaliaram o impacto da presença de BSA na eficácia antimicrobiana de soluções de NaOCl a 1 e 5%, reportando que não se observaram halos de inibição para os microrganismos testados, enquanto que para a CHX em concentrações de 0,12%, 0,5% e 1% não houve diminuição dos halos. Este estudo demonstra uma maior sensibilidade do NaOCl à presença de exsudatos do que a CHX.

Além da BSA, a presença de dentina, colagénio, hidroxiapatite ou componentes da membrana celular dos microrganismos possuem também um efeito de inibição na eficácia antimicrobiana dos irrigantes. Um dos estudos que justifica este facto é o de Portenier *et al.*⁽³⁴⁾ no qual testaram a atividade antimicrobiana da CHX a 0,02% e do iodeto de potássio na presença de dentina e da sua matriz orgânica, microrganismos inviabilizados pelo calor e colagénio tipo I bovino. A matriz orgânica da dentina e os elementos celulares dos microrganismos foram os componentes com maior efeito de inibição da CHX. Noutro estudo de Portenier *et al.*⁽³⁵⁾, os autores observaram o efeito da dentina, hidroxiapatite e BSA numa solução de CHX a 0,05% na sua capacidade antimicrobiana sobre o *E. faecalis*. Os resultados mostraram que a hidroxiapatite teve pouco efeito na inibição da CHX e o maior efeito da dentina ocorreu apenas após 1 hora em contacto com o microrganismo.

Haapasalo *et al.*⁽³⁶⁾ também confirmaram a ação da dentina na eficácia antimicrobiana de vários irrigantes. A dentina mostrou um efeito inibitório em todas as soluções testadas, sendo este dependente da concentração e do tempo de contacto da solução com a dentina.

O efeito de todas estas condicionantes pode, em parte, ajudar a compreender a diminuição da eficácia antimicrobiana do NaOCl *in vivo* quando comparada com os resultados observados nos estudos *in vitro*.

Outro facto importante é que a maioria dos estudos *in vitro* recorrem ao uso de culturas planctónicas para testar a capacidade antimicrobiana de diversos agentes⁽³⁷⁾, e assim frequentemente estes refletem um efeito antimicrobiano muito superior que não tem correlação com o que se observa na clínica⁽³⁸⁾. Uma solução de irrigação pode ser eficaz sobre um microrganismo *in vitro* e não apresentar esse mesmo nível de eficácia quando aplicada numa situação clínica no sistema de canais radiculares.

Ao contrário das condições em laboratório, na clínica estamos perante uma flora polimicrobiana com patogenicidade superior⁽¹⁹⁾. O comportamento de bactérias em biofilme é notavelmente diferente da forma planctónica correspondente, os modelos com biofilmes conseguem reproduzir de forma mais fiel as condições *in vivo*⁽³⁹⁾. Os biofilmes endodônticos conferem aos seus membros vários mecanismos de defesa dos quais o principal é a maior resistência a agentes antimicrobianos⁽³²⁾. Têm sido evidenciados quatro mecanismos que lhes conferem essa resistência: as propriedades de barreira da matriz extracelular, em que as enzimas extracelulares, como as β -lactamases, vão ficando retidas e concentradas na matriz formando uma barreira e inativando o efeito dos agentes antimicrobianos; o crescimento mais lento dos microrganismos em biofilme torna o seu contacto com os agentes mais moroso, e a falta de nutrientes pode forçar as bactérias a entrarem num processo estacionário de crescimento no qual estão protegidas; o terceiro mecanismo sugerido é a heterogeneidade metabólica apresentada pelos elementos do biofilme, havendo complexos aeróbios e outros anaeróbios em maior profundidade no biofilme; por último, a existência de elementos persistentes, embora em pequena percentagem, constituem um fenótipo altamente resistente e extremamente difícil de eliminar⁽³⁷⁾.

Neste estudo optou-se por utilizar os microrganismos *E. faecalis* (ATCC 29212) e *C. albicans* (YP0015) por três principais razões: a sua prevalência em casos de periodontite apical primária e persistente^(10, 13, 16, 40); são espécies fáceis de utilizar em laboratório⁽²⁰⁾ e foram já usados com sucesso em estudos anteriores idênticos^(1, 3, 23, 24, 26, 27, 30, 31).

O *E. faecalis*, segundo Sedgley *et al.*^(cit in 14), apesar de ser considerado um habitante comensal da flora oral, a sua prevalência em pacientes com história prévia de patologia oral

é de apenas 1%, enquanto que em pacientes alvo de tratamento ou retratamento endodôntico atinge os 11%. Tem sido seleccionado para vários estudos experimentais sobre a eficácia de soluções de irrigação, especialmente pelo seu elevado nível de resistência a uma vasta gama de agentes antimicrobianos^(4, 6) e preponderância na patologia de casos pós-tratamento^(4, 20, 41). A sua resistência antimicrobiana, a capacidade de adaptação a variações ambientais bruscas, relacionadas com os seus fatores de virulência, e o seu crescimento nos canais como biofilme, são responsáveis por muitos dos insucessos no tratamento endodôntico^(13, 15).

Há também evidência da presença de fungos no sistema de canais radiculares, especialmente *Candida albicans*. Foram demonstrados no interior de canais e áreas periapicais por meio de microscopia de luz e eletrónica e através de técnicas de cultura. Estes estão muitas vezes associados a infeções persistentes. Os mecanismos de virulência que promovem a colonização do canal radicular por *C. albicans* têm sido identificados, estes incluem uma atividade colagenolítica que torna possível o fungo usar a dentina como fonte de nutrientes^(cit in 40). Os modelos de infeção dos túbulos dentinários *in vitro* demonstraram a afinidade da *C. albicans* para invadir a dentina e a sua capacidade para penetrar nos túbulos dentinários^(cit in 14). A sua suscetibilidade a diferentes medicações intracanalares e soluções de irrigação tem sido avaliada em modelos *in vitro*⁽⁴⁰⁾.

Alguns estudos procuram comparar o efeito do NaOCl e CHX sobre o *E. faecalis* e a *C. albicans*, isto é, procuram saber sobre qual das espécies serão mais eficazes. No entanto, não podemos afirmar uma maior ou menor eficácia sobre determinado microrganismo sem ter em conta a sensibilidade deste à solução.

Segundo Ayhan *et al.*⁽¹⁾, a solução de CHX a 2% apresentou maior halo de inibição para a *C. albicans* do que para o *E. faecalis*, dados que se encontram em concordância com os do presente estudo.

Num estudo de Estrela *et al.*⁽³⁾ em que utilizaram o mesmo modelo, obtiveram halos de inibição para a CHX 2%, num controlo às 48 horas, de 18 mm e de 16 mm para o *E. faecalis* e *C. albicans*, respetivamente. Pelo contrário, o presente estudo verificou para a mesma solução, um maior halo de inibição para a *C. albicans*, 21 mm, do que para o *E. faecalis*, 16,67 mm.

Num estudo de Farias *et al.*⁽²³⁾ uma solução de NaOCl a 2,5% produziu um maior halo de inibição para o *E. faecalis* em relação à *C. albicans* e por outro lado a solução de NaOCl 1% não apresentou qualquer efeito sobre o *E. faecalis*. O presente estudo não corrobora estes dados, uma vez que todas as soluções testadas tiveram efeito

antimicrobiano para ambos os microrganismos em estudo, e os halos de inibição foram sempre superiores para a *C. albicans*.

Uma das possíveis justificações para os diferentes resultados observados prende-se com a utilização de estirpes de microrganismos que diferem umas das outras, o que pode influenciar a comparação entre estudos semelhantes, em que utilizaram a mesma espécie mas uma estirpe com características diferentes.

Quanto às diferenças verificadas no diâmetro dos halos de inibição nos controlos às 24 e 48 horas, houve no controlo às 48 horas uma ligeira diminuição dos halos. Isto é explicado pelas características de cada uma das soluções, o NaOCl é o irrigante de escolha no tratamento canalár, mas como sabemos não tem ação residual e além disso é neutralizado na presença da membrana celular dos microrganismos^(10, 11, 34). O seu efeito diminui com o tempo, uma vez que fica reduzida a quantidade de iões cloro livres. Já a CHX tem a importante característica de substantividade, exercendo uma atividade residual e promovendo um efeito mais prolongado.

A eficácia antimicrobiana do hipoclorito de sódio e da clorhexidina tem vindo a ser estudada ao longo dos anos. O hipoclorito de sódio (NaOCl) constitui um agente antimicrobiano com eficácia amplamente comprovada. As concentrações de NaOCl defendidas por diversos autores variam de 0,5 (Solução de Dakin) a 6%^(5, 21). Segundo Young *et al.*⁽⁸⁾ vários estudos demonstraram que a redução de bactérias intracanalares não é significativamente melhorada quando utilizada irrigação com NaOCl a 5% comparando com NaOCl a 0,5%. Monteiro-Souza *et al.*^(cit in 23) afirmaram que quando o NaOCl apresenta teor de cloro abaixo de 0,3% não é efetivo contra o *E. faecalis* e a *C. albicans*. Já as soluções a 0,5% são efetivas contra estes microrganismos num tempo de contacto de 15 segundos. No presente estudo a solução que mostrou maior eficácia foi a de NaOCl numa concentração de 3% tanto para o *E. faecalis* como para a *C. albicans*.

É necessário que se conheça a concentração mais adequada à terapêutica endodôntica, visando a obtenção das maiores vantagens⁽²³⁾ e sabendo que a eficácia antimicrobiana melhora com o aumento da concentração de NaOCl mas simultaneamente também aumenta o seu risco tóxico^(8, 22, 42).

Encontram-se descritos vários métodos para otimizar a eficácia clínica de soluções de NaOCl sem aumentar a sua concentração, como a alteração do pH e temperatura, ativação ultrassónica ou adição de agentes surfatantes. A literatura refere que a diminuição do pH para valores entre 6 e 7,5 leva a um aumento da capacidade antimicrobiana⁽⁴³⁾, assim como o aumento de temperatura conduz também a uma melhoria do efeito bactericida da

solução. Num estudo, encontra-se reportado que no intervalo de 5 a 60°C este duplica a cada aumento de 5°C⁽⁴⁴⁾. A adição de agentes tensioativos permite também uma redução da sua tensão superficial, aumentando deste modo a molhabilidade da solução garantindo um melhor acesso a todas as áreas do interior dos canais⁽⁴⁵⁾.

No presente estudo verificou-se que a solução de NaOCl a 6% com a adição de um surfatante não apresentou eficácia antimicrobiana superior à de soluções de NaOCl com concentrações mais baixas sem surfatante. Assim, podemos especular que o efeito do agente tensioativo na solução poderá prejudicar o efeito antimicrobiano desta. Contudo, uma vez que não se testou em paralelo uma solução de NaOCl da mesma concentração sem o surfatante, bem como o surfatante isoladamente não podemos aferir conclusões exatas acerca deste produto. A utilização do surfatante separadamente possibilitaria a obtenção de mais um controlo da nossa experiência laboratorial uniformizando melhor os resultados. Contudo, o fabricante não divulga na MSDS (*Material Safety Data Sheet*) da solução o composto utilizado como surfatante, nem a solução de NaOCl a 6% esteve disponível no mercado durante este período.

A eficácia antibacteriana da clorhexidina é comparável com a do NaOCl, esta é eficaz contra espécies resistentes ao hidróxido de cálcio, tal como o *E. faecalis*⁽⁹⁾. Tem mostrado ser mais ativa contra bactérias Gram-positivas, tem atividade moderada sobre fungos e vírus e inibe a germinação de esporos⁽⁹⁾. A baixas concentrações de 0,2% a CHX comporta-se como bacteriostática, e por outro lado a concentrações mais elevadas de 2% a CHX é bactericida⁽¹⁷⁾. Esta molécula atravessa a parede celular, presumivelmente por transporte passivo, e atinge a membrana citoplasmática, alterando o equilíbrio osmótico no interior da célula e causando rutura dos constituintes intracelulares. Em altas concentrações, a CHX provoca a precipitação desses constituintes, particularmente de adenosina trifosfato e ácidos nucleicos, culminando em lise celular^(25, 46). A concentração de CHX mais comumente usada em Endodôncia é 2%^(9, 44).

No nosso estudo a CHX a 2% apresentou a mesma eficácia antimicrobiana que as soluções de NaOCl a 1 e 2,5% sobre o *E. faecalis*. Contrariamente ao presente estudo, Dunavant *et al.*⁽³⁷⁾ mostraram que a CHX a 2% é menos efetiva do que a solução de NaOCl a 1% na eliminação do *E. faecalis*. E num estudo de Ferraz *et al.*⁽²⁶⁾, pelo método de difusão em agar, avaliaram o efeito antimicrobiano de soluções de NaOCl (0,5% 1% 2,5% 4% e 5,25%) e gel de CHX (0,2%, 1% e 2%). As zonas de inibição produzidas pela CHX a 2% foram significativamente maiores do que aquelas produzidas por todas as concentrações de NaOCl, incluindo a de 5,25%.

Neste estudo as soluções de hipoclorito que tiveram menor eficácia antimicrobiana foram o NaOCl a 1 e 2,5%, facto que é corroborado pelo estudo de Vianna *et al.*⁽⁴⁷⁾, que pelo método de difusão em agar, estudaram o efeito antimicrobiano de várias soluções de NaOCl e CHX, separadamente e em conjunto, sobre o *E. faecalis*. As soluções com menor efeito inibitório foram o NaOCl a 1% e a 2,5% usados separadamente, apresentando halos de inibição de 0,3 e 0,5 mm, respetivamente, sem diferença estatisticamente significativa.

Conclusão

Os resultados obtidos no presente estudo permitem concluir que:

- Todas as soluções testadas são efetivas contra o *Enterococcus faecalis* e a *Candida albicans*;
- A solução de NaOCl a 3% apresentou a maior eficácia antimicrobiana sobre ambos os microrganismos. A CHX numa concentração a 2% mostrou ter efeito antimicrobiano semelhante às soluções de NaOCl a 1 e 2,5% para o *Enterococcus faecalis*, e por outro lado, um menor efeito antimicrobiano em relação às mesmas concentrações de NaOCl, sobre a *Candida albicans*;
- Houve diminuição dos halos de inibição às 48 horas para as soluções de NaOCl o que não se verificou com a CHX, para ambos os microrganismos testados.

Os resultados deste estudo devem ser considerados com base nas limitações do mesmo, devendo-se tratar com cuidado as extrapolações para o uso clínico das soluções no tratamento endodôntico. Outras propriedades além da capacidade antimicrobiana devem também ser investigadas antes da escolha final de um irrigante para uso clínico.

Agradecimentos

Ao Professor Doutor João Miguel dos Santos pela oportunidade de participar neste projeto e pela sua ajuda em torná-lo possível. Por todo o apoio, dedicação e transmissão de conhecimentos fundamentais à minha formação e ao meu percurso académico.

À Professora Doutora Teresa Gonçalves por disponibilizar todos os materiais e equipamentos do Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra para a realização do trabalho experimental e por toda a sua ajuda e profissionalismo demonstrados.

À Dra. Alexandra Abrunheiro cuja sua dedicação, empenho e toda a ajuda prestada no laboratório foram imprescindíveis na elaboração deste estudo.

Ao Professor Doutor Miguel Patrício e Professor Doutor João Pereira, do Laboratório de Bioestatística e Informática Médica da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, pela disponibilidade e pronto auxílio na execução de toda a análise estatística dos dados.

Bibliografia

1. Ayhan H, Sultan N, Cirak M, Ruhi MZ, Bodur H. Antimicrobial effects of various endodontic irrigants on selected microorganisms. *Int Endod J.* 1999 Mar;32(2):99-102.
2. Estrela C, Silva JA, de Alencar AH, Leles CR, Decurcio DA. Efficacy of sodium hypochlorite and chlorhexidine against *Enterococcus faecalis*--a systematic review. *J Appl Oral Sci.* 2008 Nov-Dec;16(6):364-8.
3. Estrela C, Ribeiro RG, Estrela CR, Pecora JD, Sousa-Neto MD. Antimicrobial effect of 2% sodium hypochlorite and 2% chlorhexidine tested by different methods. *Braz Dent J.* 2003;14(1):58-62.
4. Gomes B, Ferraz C, Vianna ME. In vitro antimicrobial activity of several concentrations of sodium hypochlorite and Chlorhexidine gluconate in the elimination of *Enterococcus Faecalis*. *International Endodontic Journal.* 2001;34:424-8.
5. Haapasalo M, Shen Y, Qian W, Gao Y. Irrigation in endodontics. *Dent Clin North Am.* 2010 Apr;54(2):291-312.
6. Soares JA, Roque de Carvalho MA, Cunha Santos SM, Mendonca RM, Ribeiro-Sobrinho AP, Brito-Junior M, et al. Effectiveness of chemomechanical preparation with

alternating use of sodium hypochlorite and EDTA in eliminating intracanal *Enterococcus faecalis* biofilm. *J Endod.* 2010 May;36(5):894-8.

7. Bystrom A, Sundqvist G. Bacteriologic evaluation of the efficacy of mechanical root canal instrumentation in endodontic therapy. *Scand J Dent Res.* 1981 Aug;89(4):321-8.

8. Young GR, Parashos P, Messer HH. The principles of techniques for cleaning root canals. *Aust Dent J.* 2007 Mar;52(1 Suppl):S52-63.

9. Ryan S. Chlorhexidine as a canal irrigant: a review. *Compend Contin Educ Dent.* 2010 Jun;31(5):338-42; quiz 43, 64.

10. Baca P, Junco P, Arias-Moliz MT, Gonzalez-Rodriguez MP, Ferrer-Luque CM. Residual and antimicrobial activity of final irrigation protocols on *Enterococcus faecalis* biofilm in dentin. *J Endod.* 2011 Mar;37(3):363-6.

11. Baca P, Mendoza-Llamas ML, Arias-Moliz MT, Gonzalez-Rodriguez MP, Ferrer-Luque CM. Residual effectiveness of final irrigation regimens on *Enterococcus faecalis*-infected root canals. *J Endod.* 2011 Aug;37(8):1121-3.

12. Hulsmann M, Hahn W. Complications during root canal irrigation--literature review and case reports. *Int Endod J.* 2000 May;33(3):186-93.

13. Stuart CH, Schwartz SA, Beeson TJ, Owatz CB. *Enterococcus faecalis*: its role in root canal treatment failure and current concepts in retreatment. *J Endod.* 2006 Feb;32(2):93-8.

14. Santos JMMd. *Prevenção da Microinfiltração Coronária no Tratamento Endodôntico.* Coimbra: Universidade de Coimbra; 2008.

15. Arias-Moliz MT, Ferrer-Luque CM, Espigares-Garcia M, Baca P. *Enterococcus faecalis* biofilms eradication by root canal irrigants. *J Endod.* 2009 May;35(5):711-4.

16. Radcliffe CE, Potouridou L, Qureshi R, Hababbeh N, Qualtrough A, Worthington H, et al. Antimicrobial activity of varying concentrations of sodium hypochlorite on the endodontic microorganisms *Actinomyces israelii*, *A. naeslundii*, *Candida albicans* and *Enterococcus faecalis*. *Int Endod J.* 2004 Jul;37(7):438-46.

17. El Karim I, Kennedy J, Hussey D. The antimicrobial effects of root canal irrigation and medication. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2007 Apr;103(4):560-9.

18. Menezes MM, Valera MC, Jorge AO, Koga-Ito CY, Camargo CH, Mancini MN. In vitro evaluation of the effectiveness of irrigants and intracanal medicaments on microorganisms within root canals. *Int Endod J.* 2004 May;37(5):311-9.

19. Estrela C, Estrela CR, Decurcio DA, Hollanda AC, Silva JA. Antimicrobial efficacy of ozonated water, gaseous ozone, sodium hypochlorite and chlorhexidine in infected human root canals. *Int Endod J.* 2007 Feb;40(2):85-93.

20. Mercade M, Duran-Sindreu F, Kuttler S, Roig M, Durany N. Antimicrobial efficacy of 4.2% sodium hypochlorite adjusted to pH 12, 7.5, and 6.5 in infected human root canals. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2009 Feb;107(2):295-8.

21. Pappen FG, Qian W, Aleksejuniene J, Leonardo Rde T, Leonardo MR, Haapasalo M. Inhibition of sodium hypochlorite antimicrobial activity in the presence of bovine serum albumin. *J Endod.* 2010 Feb;36(2):268-71.

22. Mohammadi Z. Sodium hypochlorite in endodontics: an update review. *Int Dent J*. 2008 Dec;58(6):329-41.
23. Farias M, Ribeiro A, Góis D, Ramos J. Análise química e antimicrobiana das soluções de hipoclorito de sódio comercializados no município de Aracaju-SE. *Rev Port Estomatol Med Dent Cir Maxilofac*. 2010;52(1):24-8.
24. Giardino L, Savoldi E, Ambu E, Rimondini R, Palezona A, Debbia EA. Antimicrobial effect of MTAD, Tetraclean, Cloreximid, and sodium hypochlorite on three common endodontic pathogens. *Indian J Dent Res*. 2009 Jul-Sep;20(3):391.
25. Kandaswamy D, Venkateshbabu N. Root canal irrigants. *J Conserv Dent*. 2010 Oct;13(4):256-64.
26. Ferraz CC, Gomes BP, Zaia AA, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. Comparative study of the antimicrobial efficacy of chlorhexidine gel, chlorhexidine solution and sodium hypochlorite as endodontic irrigants. *Braz Dent J*. 2007;18(4):294-8.
27. Sassone LM, Fidel RA, Murad CF, Fidel SR, Hirata R, Jr. Antimicrobial activity of sodium hypochlorite and chlorhexidine by two different tests. *Aust Endod J*. 2008 Apr;34(1):19-24.
28. Cohen S, Hargreaves KM. *Cohen's Pathways of the Pulp*. 10th ed. 2010.
29. Basrani B, Santos JM, Tjaderhane L, Grad H, Gorduysus O, Huang J, et al. Substantive antimicrobial activity in chlorhexidine-treated human root dentin. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2002 Aug;94(2):240-5.
30. Basrani B, Tjaderhane L, Santos JM, Pascon E, Grad H, Lawrence HP, et al. Efficacy of chlorhexidine- and calcium hydroxide-containing medicaments against *Enterococcus faecalis* in vitro. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2003 Nov;96(5):618-24.
31. Athanassiadis B, Abbott PV, George N, Walsh LJ. An in vitro study of the antimicrobial activity of some endodontic medicaments and their bases using an agar well diffusion assay. *Aust Dent J*. 2009 Jun;54(2):141-6.
32. Estrela C, Sydney GB, Figueiredo JA, Estrela CR. Antibacterial efficacy of intracanal medicaments on bacterial biofilm: a critical review. *J Appl Oral Sci*. 2009 Jan-Feb;17(1):1-7.
33. Williamson AE, Cardon JW, Drake DR. Antimicrobial susceptibility of monoculture biofilms of a clinical isolate of *Enterococcus faecalis*. *J Endod*. 2009 Jan;35(1):95-7.
34. Portenier I, Haapasalo H, Orstavik D, Yamauchi M, Haapasalo M. Inactivation of the antibacterial activity of iodine potassium iodide and chlorhexidine digluconate against *Enterococcus faecalis* by dentin, dentin matrix, type-I collagen, and heat-killed microbial whole cells. *J Endod*. 2002 Sep;28(9):634-7.
35. Portenier I, Haapasalo H, Rye A, Waltimo T, Orstavik D, Haapasalo M. Inactivation of root canal medicaments by dentine, hydroxylapatite and bovine serum albumin. *Int Endod J*. 2001 Apr;34(3):184-8.
36. Haapasalo HK, Siren EK, Waltimo TM, Orstavik D, Haapasalo MP. Inactivation of local root canal medicaments by dentine: an in vitro study. *Int Endod J*. 2000 Mar;33(2):126-31.

37. Dunavant TR, Regan JD, Glickman GN, Solomon ES, Honeyman AL. Comparative evaluation of endodontic irrigants against *Enterococcus faecalis* biofilms. *J Endod*. 2006 Jun;32(6):527-31.
38. 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.
39. Sena NT, Gomes BP, Vianna ME, Berber VB, Zaia AA, Ferraz CC, et al. In vitro antimicrobial activity of sodium hypochlorite and chlorhexidine against selected single-species biofilms. *Int Endod J*. 2006 Nov;39(11):878-85.
40. Ferguson JW, Hatton JF, Gillespie MJ. Effectiveness of Intracanal Irrigants and Medications against the Yeast *Candida albicans*. *Journal of Endodontics*. 2002;28(2):68-71.
41. Portenier I, Waltimo TMT, Haapasalo M. *Enterococcus faecalis* – the root canal survivor and ‘star’ in posttreatment disease. *Endodontic Topics*. 2003;6:135-59.
42. Ercan E, Ozekinci T, Atakul F, Gul K. Antibacterial activity of 2% chlorhexidine gluconate and 5.25% sodium hypochlorite in infected root canal: in vivo study. *J Endod*. 2004 Feb;30(2):84-7.
43. Rossi-Fedele G, Guastalli AR, Dogramaci EJ, Steier L, De Figueiredo JA. Influence of pH changes on chlorine-containing endodontic irrigating solutions. *Int Endod J*. 2011 Sep;44(9):792-9.
44. Zehnder M. Root canal irrigants. *J Endod*. 2006 May;32(5):389-98.
45. Mohammadi Z, Mombeinipour A, Giardino L, Shahriari S. Residual antibacterial activity of a new modified sodium hypochlorite-based endodontic irrigation solution. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2011 Jul;16(4):e588-92.
46. Siqueira JF, Jr., Rocas IN, Paiva SS, Guimaraes-Pinto T, Magalhaes KM, Lima KC. Bacteriologic investigation of the effects of sodium hypochlorite and chlorhexidine during the endodontic treatment of teeth with apical periodontitis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2007 Jul;104(1):122-30.
47. Vianna ME, Gomes BP. Efficacy of sodium hypochlorite combined with chlorhexidine against *Enterococcus faecalis* in vitro. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2009 Apr;107(4):585-9.

Anexos

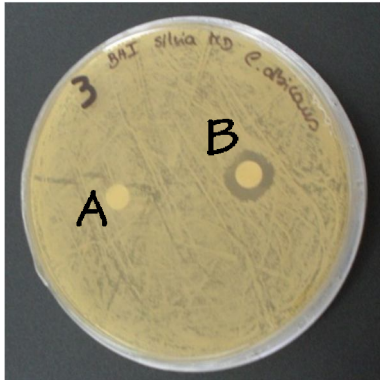


Figura 5 – Halos de inibição da solução A (soro fisiológico) e B (CHX 0,1%) para a *C.albicans*, às 24 horas

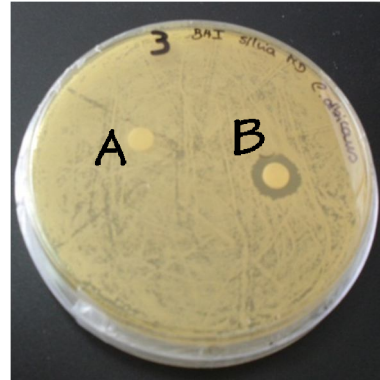


Figura 6 – Halos de inibição da solução A (soro fisiológico) e B (CHX 0,1%) para a *C.albicans*, às 48 horas

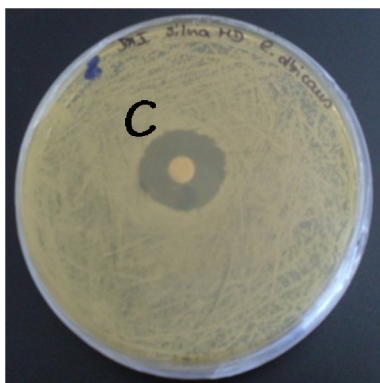


Figura 7 – Halos de inibição da solução C (CHX 2%) para a *C.albicans*, às 24 horas

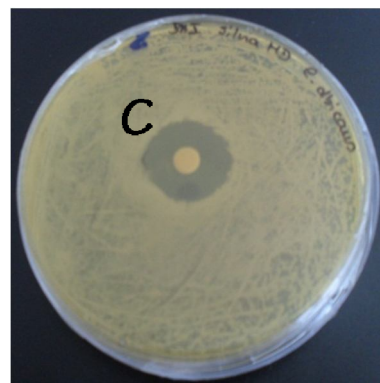


Figura 8 – Halos de inibição da solução C (CHX 2%) para a *C.albicans*, às 48 horas

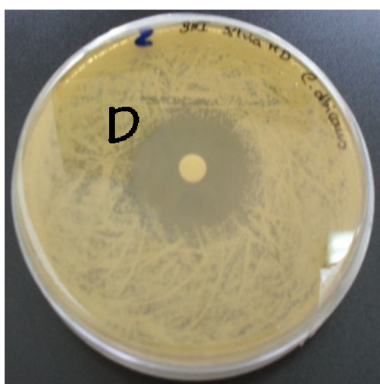


Figura 9 – Halos de inibição da solução D (NaOCl 1%) para a *C.albicans*, às 24 horas

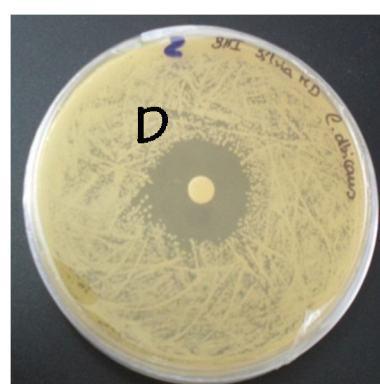


Figura 10 – Halos de inibição da solução D (NaOCl 1%) para a *C.albicans*, às 48 horas

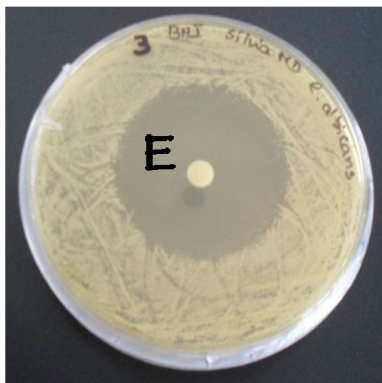


Figura 11 – Halos de inibição da solução E (NaOCl 2,5%) para a *C.albicans*, às 24 horas

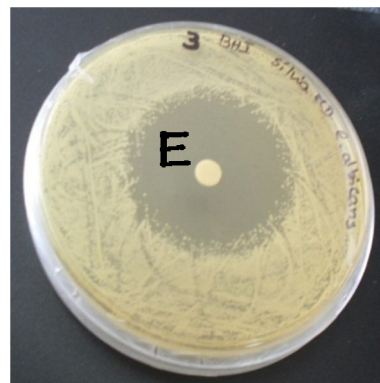


Figura 12 – Halos de inibição da solução E (NaOCl 2,5%) para a *C.albicans*, às 48 horas

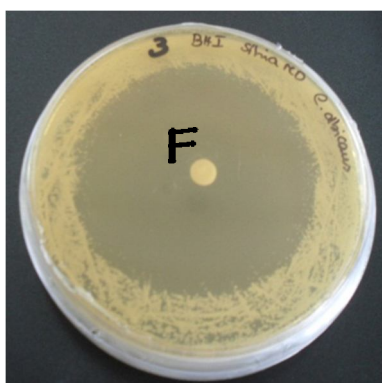


Figura 13 – Halos de inibição da solução E (NaOCl 3%) para a *C.albicans*, às 24 horas

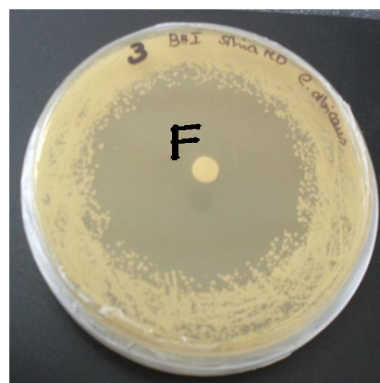


Figura 14 – Halos de inibição da solução E (NaOCl 3%) para a *C.albicans*, às 48 horas

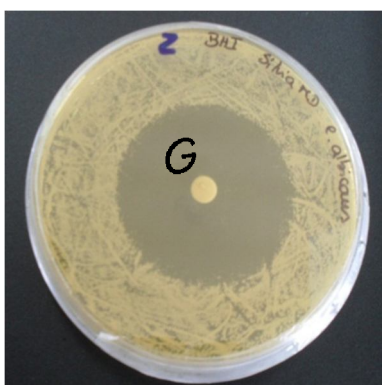


Figura 15 – Halos de inibição da solução G (NaOCl 6% + surfatante) para a *C.albicans*, às 24 horas

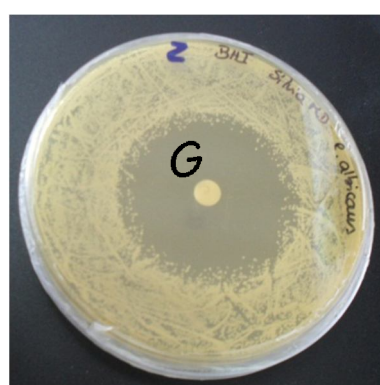


Figura 16 – Halos de inibição da solução G (NaOCl 6% + surfatante) para a *C.albicans*, às 48 horas

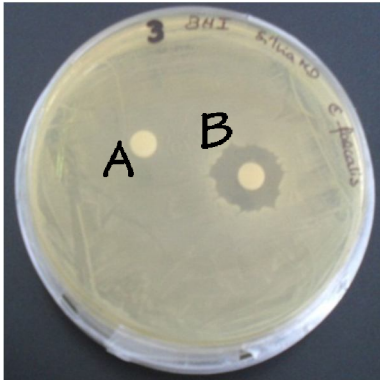


Figura 17 – Halos de inibição da solução A (soro fisiológico) e B (CHX 0,1%) para o *E. faecalis*, às 24 horas

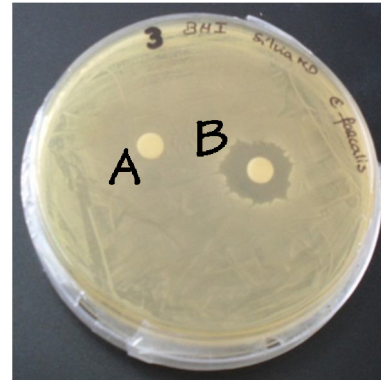


Figura 18 – Halos de inibição da solução A (soro fisiológico) e B (CHX 0,1%) para o *E. faecalis*, às 48 horas



Figura 19 – Halos de inibição da solução C (CHX 2%) para o *E. faecalis*, às 24 horas

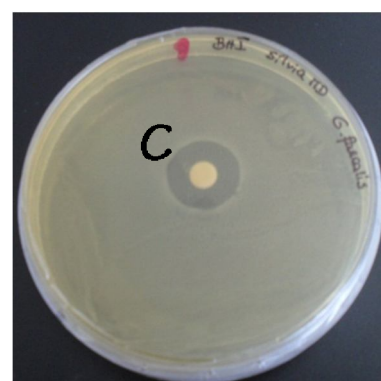


Figura 20 – Halos de inibição da solução C (CHX 2%) para o *E. faecalis*, às 48 horas

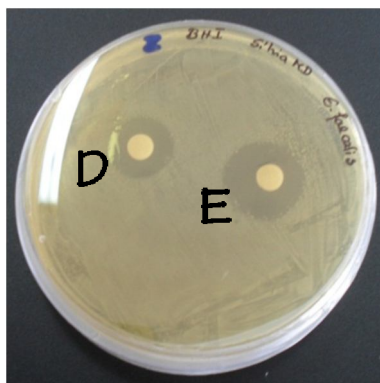


Figura 21 – Halos de inibição das soluções D (NaOCl 1%) e E (NaOCl 2,5%) para o *E. faecalis*, às 24 horas

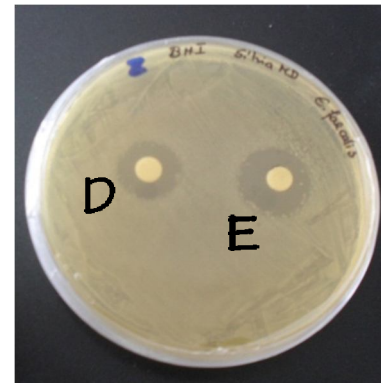


Figura 22 – Halos de inibição das soluções D (NaOCl 1%) e E (NaOCl 2,5%) para o *E. faecalis*, às 48 horas

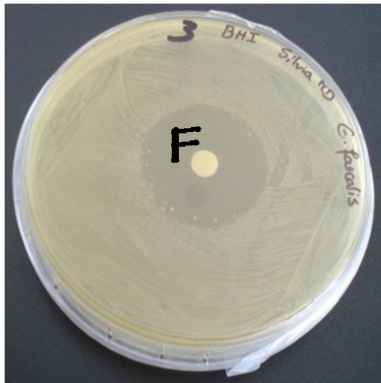


Figura 23 – Halos de inibição da solução F (NaOCl 3%) para o *E. faecalis*, às 24 horas

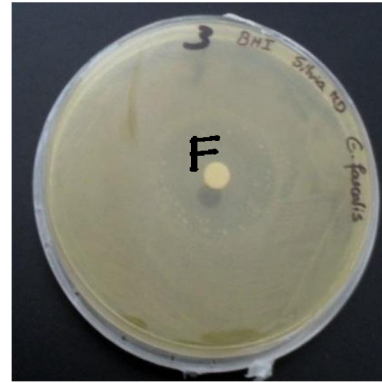


Figura 24 – Halos de inibição da solução F (NaOCl 3%) para o *E. faecalis*, às 48 horas

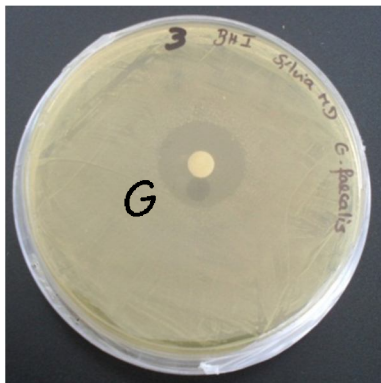


Figura 25 – Halos de inibição da solução G (NaOCl 6% + surfatante) para o *E. faecalis*, às 24 horas

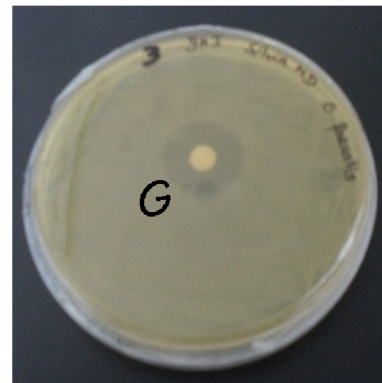


Figura 26 – Halos de inibição da solução G (NaOCl 6% + surfatante) para o *E. faecalis*, às 48 horas

Contribuição da aluna no trabalho

A aluna participou em todas as etapas do trabalho experimental no laboratório de Microbiologia da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra. Ajudou na preparação dos meios para o crescimento dos microrganismos, realizou as culturas microbianas e sucessivas repicagens de modo a mantê-las em condições adequadas para a realização dos ensaios. Fez um estudo piloto para definir critérios de uniformização das experiências e o protocolo experimental. A aluna foi responsável pela execução completa de todo o protocolo experimental definido. Fez todo o registo numérico e fotográfico dos halos de inibição do crescimento.

Também foi responsável por fazer a pesquisa e revisão bibliográfica para enquadramento teórico do tema e do trabalho laboratorial, e análise crítica dos resultados observados.

