

CYNTIA RODRIGUES DE ARAÚJO ESTRELA

**EFICÁCIA ANTIMICROBIANA DE SOLUÇÕES
IRRIGADORAS DE CANAIS RADICULARES**

**GOIÂNIA
2000**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL
E SAÚDE PÚBLICA**

**EFICÁCIA ANTIMICROBIANA DE SOLUÇÕES
IRRIGADORAS DE CANAIS RADICULARES**

CYNTIA RODRIGUES DE ARAÚJO ESTRELA

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado em Medicina Tropical (área de concentração: Microbiologia), da Universidade Federal de Goiás, como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre.

ORIENTADOR: PROF. Dr. CLEÔMENES REIS

**GOIÂNIA
2000**

**Estrela, Cyntia Rodrigues de Araújo.
Eficácia antimicrobiana de soluções irrigadoras de
canais radiculares / Cyntia Rodrigues de Araújo
Estrela - Orientador Prof. Dr. Cleômenes Reis -
Goiânia - Universidade Federal de Goiás - Instituto de
Patologia Tropical e Saúde Pública - Dissertação
(Mestrado em Microbiologia) – Instituto de Patologia
Tropical de Saúde Pública, Universidade Federal de
Goiás, 2000.**

88p: ilus.

1. Canais radiculares - microbiologia

I. Título

CDU – 616.314

***Longo é o caminho, grande o
nosso débito,mas inesgotável é a
nossa esperança.,
“ André Luiz “***

DEDICATÓRIA

***Ao nosso Senhor Jesus Cristo,
sempre presente em minha vida,
pela sua imensa misericórdia e
disposição em nos presentear
com a vida eterna.***

***A meus pais, João e Maria Ilma,
pelo amor e oportunidade da
educação. Por todo o amor,
exemplo e dedicação que muito
contribuíram na minha formação.***

AGRADECIMENTOS

Ao Professor CLEÔMENES REIS,

**pela amizade, incentivo e oportunidade
que tens me proporcionado ao longo do
caminho do magistério. Que em todos
os encontros mostrou-nos cordialidade,
sempre acolhedor, incentivador.
Muito, muito obrigado por tudo.**

À Querida Professora LILI LUSCHKE BAMMANN

**amiga constante, que muito me estimulou no campo
do aprendizado, mostrando-me o ideal
científico, incentivando-me na busca incessante
do aprender e do descobrir. Agradeço todas
as oportunidades, a atenção, a dedicação,
presteza, o especial carinho e a boa
vontade na realização deste e de todos os trabalhos
que fizemos e faremos em conjunto.**

**Aos professores do curso de Mestrado em
Microbiologia do IPTSP - UFG, por
todo o ensino, dedicação e orientação,
meus sinceros agradecimentos.**

**Aos Colegas do curso de Mestrado em
Microbiologia, pelo companheirismo,
amizade e oportunidade de convivência.**

À FABIANA CRISTINA PIMENTA,

**pela amizade, presteza e disposição
de nos auxiliar nos momentos em que
a procuramos.**

A CARLOS ESTRELA,

**Meu esposo,
pelo carinho, atenção,
colaboração na realização deste trabalho
pelo apoio e por todos os momentos alegres
que temos passado juntos.**

A minhas irmãs, DENISE e FLÁVIA,

**pelo apoio, incentivo,
carinho e união.**

A toda proteção, ajuda e incentivo que

tenho recebido dos Irmãos de Luz.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

LISTA DE FLUXOGRAMAS

Fluxograma 1	Esquema representativo da determinação da concentração inibitória mínima	34
Fluxograma 2	Esquema representativo da determinação da ação antimicrobiana por exposição direta	36

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Resultados da concentração inibitória mínima das soluções estudadas.....	38
Tabela 2	Resultados da diluição inibitória máxima das soluções de hidróxido de cálcio e detergente (HCT20)	39
Tabela 3	Resultados do efeito antimicrobiano por exposição direta das soluções de hipoclorito de sódio a 1%, 2% e 5%	39
Tabela 4	Resultados do efeito antimicrobiano por exposição direta do digluconato de clorexidina a 2%	40
Tabela 5	Resultados do efeito antimicrobiano por exposição direta da solução de hidróxido de cálcio a 1%.....	40
Tabela 6	Resultados do efeito antimicrobiano por exposição direta da solução de hidróxido de cálcio e detergente (HCT20).....	41
Tabela 7	Resultados do efeito antimicrobiano por exposição direta da água destilada esterilizada	41

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Médias de valores de propriedades físico-químicas de soluções de hipoclorito de sódio	24
Quadro 2	Microrganismos indicadores empregados nos experimentos	31
Quadro 3	Soluções irrigadoras testadas.....	32

LISTA DE ABREVIATURAS

ATCC - American type culture collection (coleção americana de cepas)

BHI - Brain heart infusion (infusão cérebro coração)

BHIa - Brain heart infusion agar

CBS-ICB - Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de São Paulo

CIM - concentração inibitória mínima

Cl⁻ - íon cloro

Cl₂ - gás cloro

CO₂ - dióxido de carbono

H⁺ - íon hidrogênio

H₂O - água

H₂O₂ - peróxido de hidrogênio

HCT20 - nome comercial da solução de hidróxido de cálcio e detergente

HOCl - ácido hipocloroso

mL - mililitro

µg - micrograma

NaCl - cloreto de sódio

NaOCl - hipoclorito de sódio

NaOH - hidróxido de sódio

O₂ - gás oxigênio

OCl⁻ - íon hipoclorito

ufc - unidades formadoras de colônias

RESUMO

RESUMO

Estudou-se a efetividade de diferentes soluções irrigadoras de canais radiculares sobre *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *Candida albicans* e a mistura destes microrganismos. Com o objetivo de se determinar a concentração inibitória mínima das soluções estudadas: hipoclorito de sódio a 1%, 2% e 5%, digluconato de clorexidina a 2%, solução de hidróxido de cálcio a 1% e solução de hidróxido de cálcio associada ao detergente (HCT 20), foi feita a diluição seriada na razão de 10. No teste de exposição direta, avaliou-se a ação antimicrobiana das soluções irrigadoras estudadas nos intervalos de 5, 10, 15, 20 e 30 minutos. Frente aos resultados obtidos, observou-se que a concentração inibitória mínima do hipoclorito de sódio a 1%, 2% e 5% para *S. aureus*, *E. faecalis*, *P. aeruginosa* e *C. albicans* foi igual a 0,1%, para *B. subtilis* e a mistura foi igual a 1%. Todos os microrganismos foram inativados por estas soluções em todos os períodos de observação. A concentração inibitória mínima do digluconato de clorexidina a 2% foi igual a 0,000002% para *S. aureus*, 0,002% para *P. aeruginosa*, 0,02% para *E. faecalis*, *B. subtilis*, *C. albicans* e para a mistura, e, por exposição direta, observou-se, em todos os períodos, efetividade antimicrobiana sobre *S. aureus*, *E. faecalis* e *C. albicans*, e inefetividade sobre *P. aeruginosa*, *B. subtilis* e a mistura. A solução de hidróxido de cálcio a 1% apresentou concentração inibitória mínima igual a 1% para *P. aeruginosa* e, para os demais microrganismos e a mistura, a concentração inibitória mínima foi maior que 1%. A ação antimicrobiana por exposição direta foi evidenciada sobre *S. aureus*, *E. faecalis* e *P. aeruginosa* no período de 30 minutos, sendo que sobre *B. subtilis*, *C. albicans* e a mistura, a solução de hidróxido de cálcio a 1% foi inefetiva em todos os períodos. A solução de hidróxido de cálcio associada ao detergente (HTC20) apresentou concentração inibitória mínima igual a 4,5 mL para *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *B. subtilis*, *C. albicans* e a mistura, e concentração inibitória mínima maior que 4,5 mL para *E. faecalis*. A efetividade antimicrobiana por exposição direta foi verificada no período de 20 minutos para *S. aureus* e no período de 30 minutos para *E. faecalis*. Sobre os demais microrganismos (*P. aeruginosa*, *B. subtilis*, *C. albicans* e a mistura) apresentou inefetividade antimicrobiana.

SUMMARY

SUMMARY

The efficacy of different root canal irrigating solutions was studied on *S. aureus*, *E. faecalis*, *P. aeruginosa*, *B. subtilis*, *C. albicans* and a mixture of these microorganisms. With the purpose to determine the minimum inhibitory concentration of the tested solutions: 1%, 2% and 5% sodium hypochlorite, 2% chlorhexidine digluconate, 1% calcium hydroxide solution, a solution of calcium hydroxide associated with a detergent (HCT20), serial dilution in the reason of 10 was realized. In the direct exposure test, antimicrobial effectiveness of the tested irrigating solutions was studied in the periods of 5, 10, 15, 20 and 30 minutes. Based on the results it can be concluded that: the minimum inhibitory concentration of 1%, 2% and 5% sodium hypochlorite solutions on *S. aureus*, *E. faecalis*, *P. aeruginosa* and *C. albicans* was 0.1%, and 1% for *B. subtilis* and for the mixture. All microorganisms were inactivated by these solutions in all the experimental periods. 2% chlorhexidine digluconate showed minimum inhibitory concentration of 0.000002% for *S. aureus*; 0.002% for *P. aeruginosa*; 0.02% for *E. faecalis*, *B. subtilis*, *C. albicans* and the mixture. The direct exposure test observed that in all the experimental periods it was effective for *S. aureus*, *E. faecalis* and *C. albicans*, and ineffective on *P. aeruginosa*, *B. subtilis* and the mixture. The minimum inhibitory concentration of 1% calcium hydroxide solution was equal to 1% for *P. aeruginosa* and to the other microorganisms, it was bigger than 1%. Antimicrobial activity by direct exposure test was evident on *S. aureus*, *E. faecalis* and *P. aeruginosa* in the period of 30 minutes, although it was not effective against *B. subtilis*, *C. albicans* and the mixture in all the periods analyzed. The solution of calcium hydroxide associated with a detergent (HCT20) showed showed minimum inhibitory concentration equal to 4.5 mL on *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *B. subtilis*, *C. albicans* and the mixture and against *E. faecalis*, bigger than 4.5 mL for *E. faecalis*. In the direct exposure test the effectiveness was observed in the period of 20 minutes for *S. aureus* and 30 minutes for *E. faecalis*. This solution was not effective on *P. aeruginosa*, *B. subtilis*, *C. albicans* and the mixture.

SUMÁRIO

LISTA DE ILUSTRAÇÕES	x
LISTA DE TABELAS	xi
LISTA DE QUADROS	xii
LISTA DE ABREVIATURAS	xiii
RESUMO	xiv
SUMMARY.....	xvi
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. RETROSPECTIVA DA LITERATURA	3
2.1. Efetividade Antimicrobiana de Soluções Irrigadoras	5
2.2. Características Físico-químicas das Soluções Irrigadoras.....	23
3. PROPOSIÇÃO.....	28
4. MATERIAL E MÉTODOS	30
4.1. Microrganismos Indicadores	31
4.2. Soluções Analisadas	31
4.3. Preparo das Suspensões Microbianas	32
4.4. Determinação da Concentração Inibitória Mínima	33
4.5. Determinação da Ação Antimicrobiana por Exposição Direta	35
5. RESULTADOS	37
6. DISCUSSÃO	42
7. CONCLUSÃO	57
REFERÊNCIAS BLIOGRÁFICAS	59
APÊNDICE.....	73

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

Os recentes avanços nas ciências básicas favoreceram a íntima relação da Endodontia com a Microbiologia. A instalação da patologia pulpar e periapical é determinada pela presença de microrganismos, sendo que o conhecimento destes habitantes especiais de canais radiculares infectados caracteriza a necessidade da seleção de um efetivo meio de controle microbiano durante a fase de sanificação do sistema de canais.

Os microrganismos constituintes da microbiota endodôntica foram isolados e identificados posterior ao desenvolvimento de modernas técnicas de coleta e de transporte para a realização de suas culturas (SUNDQVIST, 1976, 1994; BYSTROM et al., 1987; SLOTS & TAUBMAN, 1992; NAIR, 1997). A partir da evolução das técnicas de identificação dos microrganismos, conheceu-se que as infecções de canais radiculares infectados são mistas, predominando bactérias anaeróbias Gram-negativas.

O processo de eliminação ou redução da comunidade microbiana de canais radiculares infectados com periodontites apicais tem sido bastante estudado e discutido (BYSTROM et al., 1987; ORSTAVIK & HAAPASALO, 1990; HOLLAND et al., 1992; SYDNEY & ESTRELA, 1996; BAMMANN & ESTRELA, 1999; LANA, 1999). Para o controle microbiano tem sido utilizado o processo de sanificação, proporcionado durante o preparo do canal radicular, em que se realiza o esvaziamento associado a dilatação do canal, por meio de agentes químicos e mecânicos. Além destes recursos, a manutenção de uma medicação intracanal contribui expressivamente para a adequada execução deste processo (BYSTROM et al., 1987; ESTRELA et al., 1998, 1999).

Anterior à seleção da substância química, além da análise e valorização da situação clínica presente, polpa viva ou necrose pulpar, deve-se avaliar as propriedades destas substâncias, quanto à capacidade antimicrobiana, ação de dissolução tecidual, poder de limpeza e a adequada tolerância aos tecidos periapicais.

Diferentes substâncias químicas auxiliares do preparo do canal radicular têm sido propostas, entre as mais empregadas em endodontia estão: compostos halogenados (hipoclorito de sódio), tensoativos (aniônicos, catiônicos, neutros), quelantes (ácido etileno diaminotetracético), peróxidos, associações (hidróxido de cálcio e água destilada, hidróxido de cálcio e detergente), clorexidina e outros (PÉCORA et al., 1999)

Considerando a necessidade de se empregar uma substância química irrigadora durante o preparo do canal radicular que aglutine o maior número de propriedades desejáveis, a

literatura registra diferentes investigações destinadas a estudar as propriedades relativas a efeitos sobre a biocompatibilidade (ROSENFELD et al., 1978; THË et al., 1980; LAMERS et al., 1980; GORDON et al., 1981; RINGEL et al., 1982; PASHLEY et al., 1985; NAKAMURA et al., 1985; HASSELGREN et al., 1988; MORGAN et al., 1991; HOLLAND et al., 1992; YANG et al., 1995), a atividade antimicrobiana (HENNESSEY, 1973; MARTIN & SPRIGS, 1975; THË, 1979; CUNNINGHAN & JOSEPH, 1980; HARRISON & HAND, 1981; RAPHAEL et al., 1981; BUTTLER & CRAWFORD, 1982; BYSTROM & SUNDQVIST, 1981, 1983, 1985; FOLEY et al., 1983; NIKOLAUS et al., 1988; HARRISON et al., 1990; BRISENO et al., 1992; WEBB et al., 1995; SYDNEY & ESTRELA, 1996; WHITE et al., 1997; NETUSCHIL et al., 1998; CALAS et al., 1998) e as características físico-químicas (TREPAGNIER et al., 1977; HAND et al., 1978; CUNNINGHAN & BALEKJIAN, 1980; CUNNINGHAN & JOSEPH, 1980; KOSKINEN et al., 1980; ABOURASS & OGLESBY, 1981; NERY et al., 1982; RINGEL et al., 1982; MOORER & WESSELINK, 1982; BAUMGARTNER & IBAY, 1987; GUIMARÃES et al., 1988; PAIVA et al., 1989; GUTIERREZ et al., 1990; GERHARDT & WILLIAMS, 1991; ANDERSEN et al., 1992; BAUMGARTNER & CUENIN, 1992 PÉCORÁ et al., 1993; JOHNSON & REMEIKIS, 1993; YANG et al., 1996; BERUTTI et al., 1997; PÉCORÁ et al., 1997 a,b; TURKUM & GENGIZ, 1997; PÉCORÁ et al., 1998; GAMBARINI et al., 1998)

Destacam-se dentre as propriedades das substâncias químicas irrigadoras alguns fatores que mostram-se expressivos, como o efeito antimicrobiano, a biocompatibilidade, a capacidade de dissolução tecidual, a concentração da solução, a temperatura ideal, o volume necessário e o tempo de ação para expressar o efeito desejado. Frente aos aspectos analisados, verifica-se a importância de se estudar o efeito antimicrobiano das substâncias irrigadoras de canais radiculares, destacando-se que as soluções de hipoclorito de sódio, digluconato de clorexidina e hidróxido de cálcio são as mais recomendadas para uso endodôntico. Os microrganismos *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis* e *Candida albicans* estão em evidência entre os que determinam e mantêm infecções endodônticas. Outrossim, justifica-se o estudo da concentração inibitória mínima e da eficácia antimicrobiana destas substâncias químicas irrigadoras de canais radiculares sobre estes microrganismos.

2. RETROSPECTIVA DA LITERATURA

2. RETROSPECTIVA DA LITERATURA

A presença e distribuição de microrganismos em canais radiculares infectados e sua influência como expressivos precursores das reações inflamatórias da polpa dentária e dos tecidos periapicais estabeleceram uma importante associação de causa e efeito, definindo melhor alguns parâmetros de respostas a diferentes agressores.

A dinâmica existente entre microrganismo, virulência e resposta orgânica incentivou o desenvolvimento de pesquisas que proporcionam explicações e definições mais compreensíveis e convincentes da íntima relação entre microbiologia e patologia (ESTRELA, 1997).

SHOVELTON (1964) estudou a presença e distribuição de microrganismos em dentes desvitalizados de 97 pacientes, provenientes de processos de cárie ou traumáticos. Os resultados mostraram maior percentual de microrganismos na região cervical, quando comparados com os terços médio e apical da raiz. Os dentes portadores de processos crônicos evidenciaram uma maior proporção de microrganismos que aqueles com processos agudos.

KAKEHASHI et al. (1965) observaram o efeito de exposições cirúrgicas à cavidade bucal de polpas dentais de ratos livres de germes e ratos com microbiota oral nativa. No grupo em que estava presente a microbiota nativa houve presença de destruição pulpar e formação de lesão periapical. No grupo de animais livres de germes, não se observou o desenvolvimento de lesão periapical, mas sim, a tentativa de reparação pulpar com formação de pontes de osteodentina, demonstrando o potencial de reparação pulpar na ausência de infecção.

Embora o fator etiológico mais freqüente de injúria pulpar seja a presença de microrganismos estabelecendo a infecção, uma polpa injuriada por traumatismo dentário (asépticamente) torna-se mais sensível às bactérias infectantes que uma polpa dental saudável.

Para o melhor estudo e compreensão da efetividade e mecanismo de ação das substâncias antimicrobianas, torna-se imprescindível conhecer detalhes especiais dos microrganismos. O estudo dos microrganismos engloba o conhecimento de algumas características principais, como: culturais (nutrientes exigidos para o crescimento e as condições físicas que favorecem o desenvolvimento); morfológicas (dimensões das células, seus arranjos, as diferenciações e a identificação de suas estruturas); metabólicas

(mecanismos utilizados pelos microrganismos para desenvolver os processos químicos vitais); composição química (identificação dos principais e típicos constituintes químicos das células); antigênicas (componentes químicos especiais das células que fornecem evidências de semelhança entre as espécies) e genéticas (análise da composição dos ácidos nucleicos com a determinação das relações entre o DNA isolado de diferentes microrganismos).

Desta maneira, a retrospectiva da literatura foi realizada por tópicos representativos, para o melhor entendimento e estudo das soluções irrigadoras do sistema de canais radiculares.

2.1. Efetividade Antimicrobiana de Soluções Irrigadoras

O efeito antimicrobiano das soluções irrigadoras, há muito tempo, tem sido pesquisado. Várias soluções foram sugeridas para o emprego em endodontia, porém, muitas destas, não apresentaram efeito antimicrobiano.

O hipoclorito de sódio (NaOCl) foi indicado pela primeira vez como uma solução anti-séptica por DAKIN (1915a,b), para lavar as feridas de soldados da I Guerra Mundial. Entretanto, acredita-se que Berthollet (1788) foi quem utilizou inicialmente o hipoclorito de sódio como solução desinfetante (DAKIN, 1915a). BARRETT (1917) difundiu o uso da solução de Dakin para irrigação de canais radiculares e relatou a eficiência dessa solução como anti-séptico. COOLIDGE (1919, 1929) também empregou o hipoclorito de sódio para melhorar o processo de limpeza e de desinfecção do canal radicular.

WALKER (1936) indicou a utilização do hipoclorito de sódio a 5% (soda clorada) para o preparo de canais radiculares de dentes com polpas necrosadas, uma vez que auxilia na descontaminação dos instrumentos, manipulação dos canais radiculares e proteção do paciente e do operador, devido aos microrganismos que um canal radicular pode abrigar.

GROSSMANN & MEIMAN (1941), analisando *in vitro* a capacidade solvente do hipoclorito de sódio a 5% (soda clorada) sobre polpas dentárias recentemente extraídas, concluíram que sua efetiva dissolução em alguns casos ocorria em período inferior a 1 hora.

GROSSMAN (1943) propõe o emprego de uma técnica de irrigação de canal radicular alternando o hipoclorito de sódio a 5% com o peróxido de hidrogênio 3%, uma vez que a reação entre as duas substâncias promoveria efervescência com liberação de oxigênio nascente, favorecendo a eliminação de microrganismos e resíduos do canal radicular, como descreve a seguinte equação:



LAWRENCE (1960) , estudando *in vitro*, a atividade antimicrobiana da clorexidina, do cloreto de benzalcônio, do iodo-povidone e do fenol, observou que a clorexidina desempenhou atividade antimicrobiana superior quando comparada às substâncias derivadas do amônio quaternário.

SHIH et al. (1970) estudaram *in vitro* a ação antibacteriana do hipoclorito de sódio a 5,25% (Clorox) sobre *Streptococcus faecalis* e *Staphylococcus aureus*. Os autores concluíram que o hipoclorito de sódio a 5,25% mostrou-se efetivo, porém sugerem o emprego de uma medicação intracanal com a finalidade de controlar as bactérias, visto que a esterilização do canal radicular não é possível de ser obtida.

SENIA et al. (1971) relataram que o hipoclorito de sódio a 5% apresenta eficiência na limpeza do canal radicular, exceto nos 3 mm apicais, e os fatores críticos deste fato são a pequena superfície de contato, pequeno volume de solução e a pequena circulação de líquido no local.

HELGELAND et al. (1971), analisando o mecanismo de ação antimicrobiana da clorexidina em função da concentração, reportaram que o aumento desta conduz a um decréscimo na atividade intracelular dos microrganismos patogênicos, o que levaria à liberação e/ou desnaturação das enzimas proteolíticas que constituem a membrana celular microbiana.

HENNESSEY (1973), verificando as propriedades antimicrobianas da clorexidina, relatou que essa substância apresenta eficiente ação, sendo que os microrganismos Gram positivos são mais sensíveis que os Gram negativos, e que os estafilococos mostraram-se mais resistentes que os estreptococos.

ROLLA & MELSEN (1975) analisaram *in vitro* a ligação da clorexidina com diversos componentes orgânicos e inorgânicos presentes na saliva, tais como: grupos carboxílicos, sulfatos, fosfatos e extratos proteicos das glândulas salivares maiores. Sabendo-se que, cátions bivalentes podem desalojar a clorexidina de grupos fosfatos e grupos carboxílicos, os autores sugerem que a substância da clorexidina seja explicada pela liberação da mesma droga advinda dos vários sítios de ligação, por ação do cálcio salivar. Outros mecanismos inibidores de placa são citados, a exemplo da redução dos microrganismos disponíveis na saliva e ligações subletais da clorexidina com grupos fosfatos da superfície bacteriana que reduzem a adsorção de bactérias ao dente.

CVEC et al. (1976) avaliaram clínica, microbiológica e radiograficamente o efeito do tratamento endodôntico de 141 incisivos permanentes com rizogênese completa e incompleta, sem vitalidade pulpar, com ou sem alterações detectáveis radiograficamente. Todos os canais radiculares foram preenchidos com hidróxido de cálcio na mesma sessão e

divididos em três grupos em função do emprego de diferentes substâncias químicas auxiliares da instrumentação: solução fisiológica (52 dentes), hipoclorito de sódio a 0,5% (53 dentes) e hipoclorito de sódio a 5% (36 dentes). Os resultados mostraram que as amostras bacteriológicas tomadas dos canais radiculares após o período de 3 meses, em 90% dos casos, não houve crescimento bacteriano, independente do estado bacteriológico destes antes da obturação. Analisando os tipos de bactérias presentes nas amostras tomadas após o preparo do canal radicular e aquelas encontradas após 3 e 6 meses, concluíram haver razões para suspeitar que várias espécies eram produtos de contaminações, julgando desnecessário acrescentar qualquer outra substância ao hidróxido de cálcio com o objetivo de conferir-lhe propriedade antibacteriana mais acentuada.

EMILSON (1977) procurou determinar a capacidade inibitória da clorexidina por meio da determinação de sua concentração inibitória mínima (CIM), bem como a presença de zonas de inibição através de provas de difusão em ágar com discos contendo 5 µg de clorexidina. Os resultados encontrados permitiram concluir que existe uma correlação positiva entre os valores de zonas de inibição encontrados, com os valores da CIM, a qual se mostrou baixa para *Staphylococcus sp.*, *S. mutans* e *S. salivarius*, dentre outras. Porém, a sensibilidade do *S. sanguis* se apresentou intermediária.

FERREIRA et al. (1978) avaliaram *in vitro* e *in vivo*, o poder bacteriostático e bactericida da solução de hidróxido de cálcio, em concentrações de 5%, 10% e 20%, sobre culturas de *Streptococcus sp.*, utilizada como medicação intracanal nos canais radiculares. Os resultados mostraram que a solução de hidróxido de cálcio a 20%, proporcionou após 30 minutos resultados negativos em todos os testes colhidos, enquanto que, em concentrações de 10%, os primeiros resultados negativos foram observados após 30 minutos e em 5% até o período de 30 minutos os testes bacteriológicos mostraram-se positivos. Estes resultados permitiram aos autores deduzirem que a concentração de hidróxido de cálcio é inversamente proporcional ao tempo de contato com os microrganismos.

BOUCHER (1979) salienta que a eficiência antibacteriana do hipoclorito de sódio é diretamente proporcional à quantidade de ácido hipocloroso presente na solução, sendo que o mecanismo de ação ainda não foi evidenciado experimentalmente. Acredita-se que o cloro combine com as proteínas das membranas celulares formando compostos que interferem no metabolismo celular.

MACHTOU (1980) reporta que o sucesso endodôntico está vinculado ao preparo do canal radicular, ao controle da infecção e à obturação do canal radicular, sendo que a ação da solução irrigante, depende do contato entre a solução e os resíduos e seu tempo de ação.

BYSTROM & SUNDQVIST (1981) avaliaram a eficácia antibacteriana da

instrumentação mecânica na terapia endodôntica. A instrumentação e a irrigação com solução fisiológica, reduz bom número de microrganismos de canais radiculares infectados. No entanto, na maioria dos casos é necessário o emprego associado da modelagem realizada com auxílio de uma solução com expressiva característica desinfetante.

RINGEL et al. (1982) analisaram a eficácia antimicrobiana do gluconato de clorexidina a 0,2% e do hipoclorito de sódio a 2,5%. Para tanto, foram empregados 60 dentes humanos unirradiculares com necrose pulpar. Após a abertura coronária introduziu-se meio de cultura no interior do canal radicular e, em seguida, fez-se instrumentação com as limas de números 10 e 15, alcançando o maior número possível de microrganismos. Após a remoção das limas do interior do canal radicular, removeu-se o cabo das mesmas, sendo as limas introduzidas em tubos com caldo tioglicolato de sódio (meio de Brewer). Em seguida, foi feita nova coleta com o emprego de cones de papel absorvente. Procedeu-se a instrumentação do canal radicular com o emprego das soluções testadas, seguindo-se de irrigação final com solução fisiológica. Novamente fez-se coleta e os dentes foram temporariamente selados. Na segunda sessão, procedeu-se os mesmos passos e, na terceira sessão, o canal radicular foi obturado. Após o processamento das amostras os autores puderam observar que o hipoclorito de sódio a 2,5% foi mais efetivo que o gluconato de clorexidina a 0,2%.

FOLEY et al. (1983) avaliaram o efeito antimicrobiano do Clorox (hipoclorito de sódio a 5,25%) e Gly-oxide (peróxido de carbamida a 10%) sobre *Bacteroides melaninogenicus* e *Peptostreptococcus anaerobius*. O estudo contou 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 37o 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 37o C. Os autores concluíram que as soluções Clorox e Gly-oxide foram eficazes e que, à medida que foram feitas diluições, a efetividade antimicrobiana foi reduzida, sendo que o Clorox apresentou eficácia antimicrobiana superior ao Gly-oxide.

BYSTROM & SUNDQVIST (1983) pesquisaram o efeito antibacteriano do hipoclorito de sódio a 0,5% comparado à solução fisiológica, em 30 dentes humanos com necrose pulpar. Após a abertura coronária, os canais radiculares foram irrigados com solução fisiológica e instrumentados até a lima número 40, sendo realizada coleta do conteúdo do canal radicular por meio de cones de papel absorvente esterilizados. A instrumentação foi

completada, os canais radiculares irrigados com hipoclorito de sódio a 0,5% e, em seguida lavados com solução fisiológica, secados e preenchidos com tiosulfato de sódio. Após a remoção desta substância, os canais radiculares foram preenchidos com solução fisiológica e feitas novas coletas, seguindo-se os selamentos temporários. Na segunda sessão, após a remoção dos selamentos temporários e preenchimentos dos canais radiculares com solução fisiológica, fez-se uma coleta e, após a instrumentação e irrigação com a solução testada, foram realizadas outras coletas. Estes procedimentos foram realizados nas cinco sessões, com intervalo entre sessões variando de 2 a 4 dias. As amostras foram processadas e os microrganismos identificados. Neste experimento, os autores isolaram 169 cepas bacterianas diferentes, quando se empregou a solução fisiológica como solução irrigadora e 89 cepas bacterianas distintas quando a solução empregada foi o hipoclorito de sódio a 0,5%. Os autores concluíram que o hipoclorito de sódio a 0,5% se mostrou mais efetivo para a irrigação de canais radiculares que a solução fisiológica.

BYSTROM & SUNDQVIST (1985) analisaram a eficácia antimicrobiana do hipoclorito de sódio a 0,5% e a 5% e do hipoclorito de sódio a 5% associado ao EDTA. Foram utilizados 60 dentes humanos unirradiculares com necrose pulpar, divididos em três grupos de 20 dentes. Após a abertura coronária, fez-se a primeira coleta do conteúdo do canal radicular. Os dentes foram instrumentados com o emprego das soluções - teste e, em seguida, posteriormente à secagem do canal radicular foram selados provisoriamente. Dois dias após este procedimento, o selamento temporário foi removido e nova coleta foi realizada. O canal radicular foi novamente instrumentado com o emprego das soluções irrigadoras, secado e selado. Na terceira sessão, coletou-se material do interior do canal radicular e, então fez-se uso da medicação intracanal. As amostras analisadas permitiram aos autores concluir que o emprego do hipoclorito de sódio 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 hipoclorito de sódio a 5%. Quanto ao emprego isolado do hipoclorito de sódio a 0,5% e do hipoclorito de sódio a 5%, não foi possível observar nenhuma diferença clínica significativa.

SAFAVI et al. (1985) compararam o efeito antimicrobiano do hidróxido de cálcio, com o iodo iodeto de potássio em 1030 dentes humanos. Após o preparo do canal radicular com o hipoclorito de sódio a 1% , empregou-se o tiosulfato de sódio a 5% para neutralizar o hipoclorito de sódio, sendo posteriormente, removido através de irrigação com solução fisiológica. Os canais radiculares foram secados utilizando-se cones de papel absorvente esterilizados. Para a coleta microbiológica, os canais radiculares foram preenchidos com solução fisiológica esterilizada e suas paredes instrumentadas com lima de diâmetro

apropriado, sendo o conteúdo do canal absorvido com cones de papel esterilizados, e transferidos para tubos de ensaio com caldo de tioglicolato e enviados para processamento microbiológico. Em 340 dentes a medicação empregada foi uma mecha de algodão umedecida com iodo iodeto de potássio a 2%; em 517 dentes, pasta de hidróxido de cálcio tendo como veículo o solução fisiológica e 173 dentes ficaram sem nenhum tipo de medicamento (grupo controle). Quando, após 7 dias de processamento microbiológico, as culturas apresentaram resultado positivo, esses dentes eram reinstrumentados, nova coleta era realizada e a mesma medicação utilizada, sucessivamente, até que resultados negativos fossem obtidos. Os resultados demonstraram menor número de culturas positivas quando o hidróxido de cálcio foi utilizado, atingindo 77,4% de culturas negativas; 66,1% para o iodo iodeto de potássio e 63,6% para o grupo sem medicação. Essa diferença de frequência foi estatisticamente significativa.

BARBOSA et al. (1987) analisaram o efeito antimicrobiano da solução de hidróxido de cálcio pura, de um detergente (Tergentol) e de duas soluções de hidróxido de cálcio associadas ao detergente, HCT10 e HCT20. Neste estudo foram empregados os microrganismos: *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus sanguis*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus salivarius*, *Neisseria* sp., *Lactobacillus* sp., *Candida albicans*, *Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* e difteroides. A análise antimicrobiana foi realizada com a adição, a 5,0 mL das soluções-teste, de 0,5 mL de suspensão bacteriana por períodos de 1, 3, 5, 10, 30 e 60 minutos. Após este período removeu-se 0,1 mL e semeou-se no meio de cultura contido placas. Decorridas 72 horas, observou-se a presença ou ausência de crescimento bacteriano. De acordo com a metodologia empregada concluíram que as soluções HCT10 e HCT20 apresentaram efeito antimicrobiano, enquanto a solução de hidróxido de cálcio sem a adição de um detergente não apresentou atividade antimicrobiana sobre os microrganismos testados.

NIKOLAUS et al. (1988) estudaram o efeito do ácido cítrico a 50%, hipoclorito de sódio a 5,25%, nos períodos de 5 e 15 minutos sobre bactérias anaeróbias estritas (*Bacteroides melaninogenicus*, *Bacteroides fragilis*, *Clostridium perfringens* e *P. anaerobius*). Inicialmente, cones de papel esterilizados foram contaminados durante 3 minutos nas soluções de microrganismos. Após este procedimento, os cones foram transferidos para as soluções testadas, permanecendo em contato com estas soluções durante 5 e 15 minutos, para serem, então, transferidos para o meio de cultura e incubados por 72 horas a 37°C. Posterior a este período, placas de ágar-sangue Brucella foram inoculadas com amostras dos conteúdos dos tubos, seguindo-se a incubação em condições de anaerobiose. Os resultados evidenciaram que tanto o ácido cítrico a 50% quanto o hipoclorito de sódio a 5,25% apresentaram ação

antimicrobiana sobre os microrganismos testados nos períodos de 5 e 15 minutos.

PADER (1988) verificou a ação antibacteriana da clorexidina sobre *Bacteroides melaninogenicus* e *Actinomyces viscosus*. A clorexidina mostrou-se eficaz em reduzir os níveis destes microrganismos, apresentando boas propriedades, específicas com máxima eficácia capaz de impedir a adesão bacteriana pela desorganização dos agrupamentos microbianos pré-formados e manutenção da atividade antimicrobiana por longo período de tempo.

RANTA et al. (1988) relataram o sucesso obtido na eliminação de *Pseudomonas aeruginosa* presente em infecção no canal radicular de dente humano, refratária ao tratamento endodôntico, com persistência de exsudato após várias sessões de preparo dos canais radiculares e emprego de diferentes soluções irrigadoras. Realizado o isolamento absoluto, antisepsia do campo operatório e acesso, o canal foi irrigado com solução fisiológica, e amostras bacteriológicas obtidas através de cones de papel absorvente esterilizados e inoculadas em meio ágar sangue. A *Pseudomonas aeruginosa* foi isolada em placas que cresceram em aerobiose e em 5% de CO₂ em cultura pura. Os microrganismos contidos nas placas cultivadas em anaerobiose não mostraram crescimento. O canal foi preparado até o instrumento 80, irrigado com etanol a 70% por alguns minutos, seguido de irrigação com solução fisiológica, secagem e preenchimento com pasta à base de hidróxido de cálcio e a abertura coronária selada com Cavit. Nos períodos compreendidos entre 6, 10 e 30 dias, o canal era irrigado novamente com solução fisiológica, as paredes instrumentadas com lima 80 e nova coleta microbiológica obtida, permanecendo o hidróxido de cálcio como medicação intracanal. Nenhuma das amostras revelou crescimento bacteriano com os sintomas desaparecendo logo após a primeira sessão de medicação intracanal. Uma vez obturado, radiografias de controle foram tomadas 1 e 3 anos após, permanecendo o dente assintomático sem a observação de quaisquer alterações.

CERVONE et al. (1990) analisaram o efeito *in vitro* da clorexidina em um sistema de liberação controlada. Os sistemas contendo clorexidina foram colocados em placas contendo ágar-sangue previamente inoculado com *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Actinomyces viscosus*, *Streptococcus mutans*, *Wolinella recta*, *Bacteroides gingivalis*, *Bacteroides intermedius*, *Eikenella corrodens*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter aerogenes* e *Enterobacter cloacae*. Em seguida, foi feita incubação aeróbia e em anaerobiose por 24 horas a 37°C. Após este período, as zonas de inibição foram mensuradas, mostrando inibição do crescimento de todos os microrganismos empregados neste estudo.

HARRISON et al. (1990) estudaram as propriedades antimicrobianas do hipoclorito de sódio a 2,62% e 5,25% sobre *Enterococcus faecalis* e *Candida albicans*, em

períodos variando de 15 a 120 segundos. 60 cones de papel absorvente esterilizados foram contaminados durante 3 a 4 minutos nas suspensões microbianas. Após a contaminação, os cones foram transferidos para tubos com 10 mL das soluções teste e, posterior a 15, 30, 45, 60, 90 e 120 segundos, cada cone foi transferido para o meio de cultura e incubado por 72 horas a 37°C, quando se observou a presença ou não de turvação do meio. Após 45 segundos de exposição ao hipoclorito de sódio a 5,25% e, 60 segundos de exposição ao hipoclorito de sódio a 2,62%, não houve o crescimento de *Enterococcus faecalis*. *Candida albicans* foi eliminada após 15 segundos de exposição a ambas as soluções testadas.

ORSTAVIK & HAAPASALO (1990) pesquisaram o efeito de alguns medicamentos usados em Endodontia: Calasept (solução saturada de hidróxido de cálcio), Paramonoclorofenol canforado, Hibitane (gluconato de clorexidina a 0,2%), solução iodo iodeto de potássio (PVPI), hipoclorito de sódio a 5,25% e EDTA, sobre os microrganismos: *Streptococcus sanguis*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*. Para tanto, utilizaram discos de dentina bovina esterilizados, que foram contaminados e, em seguida, colocou-se as soluções teste no interior dos discos, permanecendo desta forma por períodos que variaram de 5 minutos a 7 dias. A seguir, os espécimes foram lavados com água destilada e, com o auxílio de brocas, removeu-se amostras da dentina, que foram colocadas em caldo BHI e incubadas por 7 dias. A eficácia da medicação foi monitorada pela observação do decréscimo da viabilidade microbiana e pelo tempo necessário para se obter a desinfecção dos túbulos dentinários. Os resultados mostraram que a eficácia antimicrobiana das medicações testadas variou muito e foi dependente da espécie microbiana e do tempo em que a medicação permaneceu em contato com as paredes dentinárias.

SAFAVI et al. (1990) avaliaram o efeito de dois agentes antimicrobianos, pasta de hidróxido de cálcio e solução de iodo iodeto de potássio em dentes humanos. Após o preparo (remoção da coroa e ápice), os espécimes foram esterilizados e incubados, durante duas semanas a 37°C, em 50 mL de caldo tioglicolato. Após a confirmação da esterilização, os espécimes foram divididos em três grupos, sendo o grupo 1 inoculado com cultura de *Enterococcus faecium* e incubado a 37°C por 27 dias. A cada 72 horas o meio de cultura turvo foi dispensado e os espécimes colocados em meio de cultura esterilizado. Este grupo foi denominado infectado. Os espécimes do grupo 2 foram expostos durante 10 minutos a uma suspensão de *Enterococcus faecium* e recebeu a denominação de contaminado. E o grupo 3 não foi contaminado e foi utilizado como controle negativo, recebendo a denominação de grupo controle. Após estes procedimentos, todos os espécimes foram submersos em 2,0 mL de solução fisiológica e agitados, seguindo-se nova submersão em solução de iodo-iodeto de potássio a 2% e pasta de hidróxido de cálcio. Após os períodos de exposição às substâncias

teste, lavou-se os espécimes com 2,0 mL de solução fisiológica esterilizada e transferiu os mesmos para 8,0 mL de caldo tioglicolato. Procedeu-se incubação a 37°C por 60 dias, seguida de observação da turbidez do meio de cultura. Antes do experimento antimicrobiano, alguns espécimes foram preparados para estudo histológico, com a observação através da técnica de Brown e Brenn, em que se verificou a presença de microrganismos apenas no grupo 1. O experimento microbiológico revelou que a solução de iodo iodeto de potássio foi mais eficaz que a pasta de hidróxido de cálcio em todos os períodos analisados.

SOUZA et al. (1992) estudaram a atividade antimicrobiana do hipoclorito de sódio 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 5,0 mL das soluções analisadas. Em intervalos de 15, 30, 45, 60 e 75 segundos, os cones de papel foram removidos das soluções e colocados em 10 mL de caldo tioglicolato e incubados a 37°C durante 72 horas. 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 hipoclorito de sódio nas concentrações de 0,5% e 1%. Para este microrganismo, as demais concentrações do hipoclorito de sódio não foram ativas sequer após 75 segundos de contato. Para a *Candida albicans*, no período de 15 segundos, as soluções de hipoclorito de sódio nas concentrações de 0,5% e 1% foram eficazes; no período de 45 segundo a solução de hipoclorito de sódio a 0,25% apresentou ação antimicrobiana, enquanto a solução de hipoclorito de sódio a 0,12% não apresentou atividade antimicrobiana em nenhum dos períodos analisados.

BRISENO et al. (1992) analisaram a eficácia antimicrobiana do hipoclorito de sódio a 1%, hipoclorito de sódio a 2%, do fokalhydran I (solução de clorexidina), fokalhydran II (solução de clorexidina) e solução fisiológica sobre a *Escherichia coli* e *Streptococcus mutans* por diferentes métodos de irrigação em 75 dentes humanos. Os canais radiculares foram ampliados, esterilizados e, então contaminados com 10 µL da mistura das bactérias durante 30 minutos (tempo necessário para a adesão dos microrganismos às paredes do canal radicular). Após este período, os canais radiculares foram irrigados com 5,0 mL das soluções testadas, durante 20 segundos, com o auxílio de limas e do ultra-som. Procedeu-se, então, a coleta de material do interior dos canais radiculares com cones de papel absorvente esterilizados, que em seguida, foram transferidos para tubos de ensaio com 1,5 mL de solução fisiológica. Os tubos foram agitados e, após a homogeneização, 0,1 mL da suspensão contida nos tubos de ensaio foi removido e inoculado em placas com meio de cultura seletivos para cada bactéria analisada. Feita a incubação realizou-se a contagem de unidades formadoras de

colônias (ufc). Outra análise realizada foi a microscopia eletrônica de varredura para a observação da quantidade de bactérias presente nas paredes dos canais radiculares. Os autores puderam concluir que para todas as soluções testadas, houve redução do número de microrganismos. Entretanto, quando se avaliou o método empregado para a irrigação dos canais radiculares (manual ou ultrassônico), pode-se verificar que os resultados obtidos com o hipoclorito de sódio a 1% foram significativamente superiores quando comparados ao hipoclorito de sódio a 2%. Quanto ao fokalhydran I e fokalhydran II, respectivamente, o primeiro se mostrou mais efetivo contra *Escherichia coli*, enquanto não se observou diferença significativa para *Streptococcus mutans*.

HELING et al. (1992 a) estudaram a ação antimicrobiana do gluconato de clorexidina a 0,2%, da clorexidina contida em um dispositivo de liberação lenta (SRD), do paramonoclorofenol canforado como medicação intracanal, nos períodos de 5 minutos, 24, 48 horas e 7 dias. Para tanto, empregaram o *Enterococcus faecalis* como microrganismo indicador. Os autores observaram que todas as substâncias testadas alcançaram o mesmo resultado, porém, como a clorexidina é um agente antimicrobiano de amplo espectro, o seu papel como medicação intracanal deveria ser considerado.

HELING et al. (1992 b) investigaram a ação antimicrobiana da água de cal (solução saturada de hidróxido de cálcio) e da clorexidina contida em um dispositivo de liberação lenta (SRD) sobre *Enterococcus faecalis*, nos períodos de 24, 72 horas e 7 dias. A metodologia empregada pelos autores foi aquela relatada por Haapasalo & Orstavik (1987). Os autores relataram que a água de cal não é eficaz na prevenção da infecção do canal radicular, enquanto o SRD apresentou ação antimicrobiana.

OHARA et al. (1993) avaliaram o efeito antimicrobiano de soluções de hipoclorito de sódio a 5,25%, peróxido de hidrogênio a 3%, REDTA, clorexidina a 0,2% e solução saturada de hidróxido de cálcio. Os efeitos destas soluções foi testado nos períodos de 1, 15, 30, 60 minutos e 1 semana sobre os microrganismos: *Peptococcus magnus*, *Propionibacterium acnes*, *Veillonella parvula*, *Lactobacillus fermentum*, *Porphyromonas gingivalis* e *Fusobacterium nucleatum*. 0,1 mL de suspensão bacteriana foi colocado em tubos contendo 9 mL de caldo tioglicolato. Em seguida, 1 mL de cada diluição das soluções (1/5, 1/10, 1/20 e 1/40) foi adicionado ao meio inoculado, obtendo-se diluições finais iguais a 1/10, 1/50, 1/100, 1/200 e 1/400. Após cada período, 0,1 mL foi removido de cada amostra e transferido para 9 mL de caldo tioglicolato. Fez-se então, a homogeneização e, em seguida, os tubos foram incubados durante 1 semana a 37°C, observando, a seguir, a presença ou ausência de turvação do meio. Os resultados obtidos permitiram chegar à conclusão de que a clorexidina a 0,2% foi a solução irrigadora mais eficaz em todas as diluições e períodos

analisados. O peróxido de hidrogênio a 3%, o hipoclorito de sódio a 5,25% e o REDTA foram menos eficazes que a clorexidina, enquanto a solução saturada de hidróxido de cálcio mostrou totalmente inefetiva sobre os microrganismos e períodos testados.

HOLLAND et al. (1992) avaliaram a influência da irrigação e da medicação intracanal sobre o processo de cura de dentes com periodontite apical. Para tanto, empregaram 90 raízes de pré-molares e incisivos de cães adultos. O primeiro passo foi a indução de lesões periapicais, através da abertura coronária e pulpectomia, permanecendo os dentes abertos até se evidenciar por meio radiográfico áreas radiolúcidas na região periapical. A partir da confirmação da presença de lesões periapicais, os dentes foram divididos em grupos. As raízes pertencentes ao grupo 1 permaneceram abertas ao meio bucal durante 6 meses. No grupo 2, os canais radiculares foram preparados, utilizando-se, como solução irrigadora, a solução fisiológica, sendo o tratamento realizado em três sessões. Para o grupo 3, a solução irrigadora empregada foi o hipoclorito de sódio a 0,5%, juntamente com o curativo intracanal paramonoclorofenol canforado. No grupo 4, os procedimentos foram semelhantes àqueles usados no grupo 2, com a diferença que o tratamento foi realizado em sessão única. No grupo 5, o procedimento foi o mesmo do grupo 4, com a exceção de se ter utilizado o hipoclorito de sódio a 0,5% como solução irrigadora. Seis meses após a obturação dos canais radiculares, os animais foram sacrificados e as peças removidas e processadas para estudo histopatológico. Esta metodologia permitiu que os autores afirmassem a necessidade do emprego, entre sessões, de uma medicação intracanal com ação antimicrobiana, independentemente da solução irrigadora empregada.

VAHDATY et al. (1993) investigaram a eficácia do gluconato de clorexidina a 0,2% e a 2% e do hipoclorito de sódio a 0,2% e 2% sobre o *Enterococcus faecalis* em túbulos dentinários de incisivos de bovinos. Os espécimes foram preparados acorde HAAPASALO & ORSTAVIK (1987) e divididos em grupos, que após esterilizados foram colocados em meio de cultura. 0,1 mL da suspensão bacteriana foi inoculado ao meio de cultura e espécimes contidos em tubos de ensaio, e incubados durante 6 dias a 37°C. Após este período os espécimes foram removidos dos tubos, secos e lavados com 20 mL das soluções testadas durante 2 minutos, sendo o excesso da solução irrigadora removido. Novamente os espécimes foram secos e, através do uso de brocas, removeu-se dentina da superfície do canal radicular irrigado. O pó obtido foi transferido para 5 mL de caldo BHI e, simultaneamente, 0,1 mL dessa suspensão foi inoculado em placas com ágar-sangue, seguindo-se incubação em anaerobiose por 7 dias, e posteriormente realizou-se a contagem do número de colônias. Os resultados indicaram que tanto a clorexidina quanto o hipoclorito de sódio em concentrações iguais, reduziram o número de microrganismos.

BARBOSA et al. (1994) estudaram a eficácia antimicrobiana das soluções saturadas de hidróxido de cálcio associadas a um detergente, HCT10 e HCT20, da solução saturada de hidróxido de cálcio e da solução do detergente lauril dietilenoglicol éter sulfato de sódio a 0,125% dissolvido em água destilada. Os microrganismos empregados foram: *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus sanguis*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus salivarius*, *Neisseria* sp., *Lactobacillus* sp., *Candida albicans*, *Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* e difteroides, em períodos de 1, 3, 5, 10, 30 e 60 minutos. A metodologia empregada foi a mesma descrita por BARBOSA et al. (1987). Os resultados obtidos permitiram concluir que as soluções acrescidas do detergente apresentaram maior eficácia sobre os microrganismos testados.

GEORGOPOULOU et al. (1994), avaliando a efetividade antimicrobiana do ácido cítrico a 25% e do hipoclorito de sódio a 2,5%, em intervalos de 5, 15, 30 e 60 minutos, sobre microrganismos anaeróbios isolados de canais radiculares (cocos Gram- positivos e Gram-negativos, bastonetes Gram-positivos e Gram-negativos), verificaram que o hipoclorito de sódio a 2,5% foi o mais eficaz em todos os períodos analisados.

PUPPO et al. (1994) investigaram a ação antimicrobiana do hipoclorito de sódio a 0,5%, hipoclorito de sódio a 1%, hipoclorito de sódio a 5%, ácido cítrico a 1%, ácido cítrico a 10%, ácido cítrico a 50%, EDTA, solução de hidróxido de cálcio saturada e de um detergente, o tergentol, sobre os microrganismos: *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* e uma microbiota mista, previamente obtida de 10 canais radiculares. Após a contaminação, os cones de guta-percha foram transferidos para as soluções testadas, e permaneceram em contato com estas nos períodos de 5 e 10 minutos. Em seguida, foram colocados em 8 mL de caldo tioglicolato, incubados a 37°C por 48 horas, e então foi realizada a leitura macroscópica dos resultados que revelaram que, das soluções testadas, apenas as soluções de hipoclorito de sódio foram eficazes contra os microrganismos indicadores nos períodos de 5 e 10 minutos.

JEANSONE & WHITE (1994) analisaram a ação do hipoclorito de sódio a 5,25% e gluconato de clorexidina a 2% em 62 dentes humanos. O primeiro procedimento foi a abertura coronária, e após fez-se a primeira coleta de material do interior dos canais radiculares. Procedeu-se o preparo químico-mecânico com o auxílio das soluções teste, seguido da segunda coleta; a terceira coleta foi obtida após 24 horas de incubação dos dentes em condições de anaerobiose; as amostras assim obtidas foram incubadas. Para se avaliar a substantividade das soluções testadas, irrigou-se os canais radiculares com caldo tioglicolato, seguido da incubação em anaerobiose. Após 24 horas, coletou-se material do interior dos canais radiculares, que foi incubado. A análise dos resultados revelou que tanto a clorexidina a 2% quanto o hipoclorito de sódio a 5,25% foram eficazes na redução da microbiota do canal

radicular, porém, como o hipoclorito de sódio tem a capacidade de dissolução tecidual é a solução mais indicada para a irrigação de canais radiculares.

YESILSOY et al. (1995) estudaram, através de teste de difusão em ágar, o efeito antimicrobiano do hipoclorito de sódio a 5,25%, hipoclorito de sódio a 2,5%, hipoclorito de sódio a 0,5%, Peridex, gluconato de clorexidina a 0,12%, álcool a 11,6% e therasol, sobre os microrganismos: *Streptococcus mutans*, *Pepstostreptococcus micros*, *Prevotella intermedius* e *Porphyromonas gingivalis*. Os resultados mostraram que o hipoclorito de sódio a 5,25% foi efetivo sobre todos os microrganismos indicadores. Os efeitos tóxicos (alterações teciduais) destas substâncias, em 0,1 mL de solução injetado no tecido subcutâneo de guinea pigs foram observados após 2 horas, 2 dias e 2 semanas. Através de observação microscópica, pode-se concluir que o hipoclorito de sódio a 5,25% usado cautelosamente é uma boa solução irrigadora, porém, deve-se dar preferência para materiais menos agressivos e com eficácia antimicrobiana.

ESTRELA et al. (1996) observaram clinicamente a influência do emprego de hipoclorito de sódio a 1% alternado nas duas irrigações finais com EDTA, na prevalência de dor na periodontite apical traumática, em dentes com vitalidade pulpar. Os resultados demonstraram elevados valores (85,74% a 88,60%) de ausência total de dor pós-operatória, quando da utilização desta associação.

SYDNEY & ESTRELA (1996) determinaram qualitativamente a presença de bactérias anaeróbias em dentes portadores de lesões periapicais crônicas em função do preparo do canal radicular e da substância química empregada (hipoclorito de sódio e solução fisiológica). Os autores empregaram o tioglicolato para anaeróbios como meio de transporte e enriquecimento para as bactérias presentes nas raspas dentinárias do canal radicular e identificação através do sistema Vitek, a partir de um cartão de identificação de anaeróbios, auxiliado por um programa específico de computador. Trinta dentes anteriores com lesão periapical assintomática de pacientes com idade entre 18 e 40 anos foram selecionados. Após isolamento absoluto e cuidadosa anti-sepsia do campo operatório realizada 2 vezes, a primeira com álcool iodado a 0,4 % e a segunda com álcool a 70 %, realizou-se a abertura coronária e preenchimento do canal radicular com solução fisiológica. Um instrumento do tipo Hedström de calibre compatível com o diâmetro do canal foi introduzido até o terço apical e com movimentos de raspagem, raspas de dentina da parede do canal radicular foram coletadas, o cabo do instrumento removido com alicate apropriado e o instrumento introduzido no meio de tioglicolato para anaeróbios e sendo, a seguir, encaminhado ao laboratório para processamento microbiológico. Após a determinação do comprimento de trabalho, iniciou-se o preparo com novas coletas sendo realizadas após o uso do terceiro e do

quarto instrumento empregado além do instrumento anatômico, totalizando 90 amostras. Os resultados verificados mostraram que no grupo em que se empregou solução fisiológica como agente irrigador, 5 espécies de bactérias foram isoladas: *Clostridium ramosum*, *Prevotella bucle*, *Propionibacterium acnes*, *Propionibacterium granulosum* e *Bifidobacterium sp.*. Quando a solução de hipoclorito de sódio foi utilizada, ao término do quarto instrumento apenas *Propionibacterium acnes* e *Clostridium histolyticum* foram isolados. Estes resultados permitiram concluir que o estabelecimento de regras para a dilatação do canal radicular não está definido no que diz respeito à eliminação de bactérias em canais radiculares infectados e, que após o uso de quatro instrumentos, bactérias anaeróbias Gram-positivas são aquelas que prevalecem.

WHITE et al. (1997) avaliaram a atividade antimicrobiana residual de soluções irrigadoras de canais radiculares (gluconato de clorexidina a 2% e gluconato de clorexidina a 0,12%). Foram utilizados dentes humanos unirradiculares, cujos ápices foram selados com resina. Os dentes foram preparados empregando-se as soluções irrigadoras a cada troca de lima. Após o completo preparo, os canais radiculares foram irrigados com 1 mL da solução teste e, em seguida, 3 mL de água destilada esterilizada. Os dentes foram secados, preenchidos com água destilada esterilizada e mantidos em umidificador à temperatura ambiente. Ao completar 6, 12, 24, 48 e 72 horas, um cone de papel absorvente esterilizado, de número 80 foi inserido no canal radicular por 2 minutos. Este cone, em seguida, foi armazenado em câmara criogênica a 20°C e o canal radicular irrigado com água destilada esterilizada. 24 horas após a remoção do último espécime, testou-se a atividade antimicrobiana utilizando-se o *Streptococcus mutans*. Este microrganismo foi semeado em meio MS-BS (mitis-salivarius bacitracina e estreptomicina). Os cones de papel foram distribuídos no meio contido na placa, incubados a 37°C por 48 horas em atmosfera rica em dióxido de carbono. Após 48 horas, fez-se a mensuração dos halos de inibição. Os resultados mostraram que para todos os períodos analisados a atividade antimicrobiana residual do gluconato de clorexidina a 2% foi significativamente maior.

SILVA et al. (1997) analisaram o efeito antimicrobiano de soluções de clorexidina (a 0,12%, a 0,2% e 2%) sobre o *Streptococcus sanguis*. Foram empregados 20 incisivos, que com a remoção do cimento, coroa e terço apical, foram transformados em cilindros. Após a remoção do smear layer e esterilização, os espécimes foram colocados em tubos contendo caldo BHI e incubados durante 1 semana a 37°C. Inoculou-se os tubos com 0,2 mL de solução de *Streptococcus sanguis*, sendo este procedimento repetido a cada três dias. Os espécimes foram divididos em quatro grupos e colocados em tubos contendo as soluções teste por períodos de 5 minutos, 1 dia e 1 semana. Após cada período foram removidos, lavados com

uma solução tampão e colocados em caldo tioglicolato e incubados durante 1 mês. Os autores observaram que após os períodos de 1 dia e 1 semana todas as soluções testadas apresentaram ação antimicrobiana.

MARQUES (1997) avaliou a atividade antimicrobiana de diferentes concentrações de soluções irrigadoras à base de clorexidina, solução de hipoclorito de sódio a 1% e um detergente (lauril sulfato de sódio), valendo-se de teste de difusão em ágar, sobre os microrganismos: *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus sanguis*, *Streptococcus mutans*, *Enterococcus faecalis*, *Candida albicans* e cultura mista do canal radicular. Os resultados mostraram que a solução de clorexidina a 1% foi mais eficaz que a mesma solução a 0,5% e 0,12%; o hipoclorito de sódio a 1% foi o único a apresentar atividade sobre o *Enterococcus faecalis*; a *Candida albicans* mostrou-se resistente a todas as soluções de clorexidina e sobre o hipoclorito de sódio a 1%; o lauril sulfato de sódio foi incapaz de inibir o crescimento de todos os inóculos microbianos e as soluções testadas, com exceção do lauril sulfato de sódio, mostraram ação antibacteriana predominantemente bacteriostática; fatores como concentração e tempo de contato mostraram influência sobre atividade antimicrobiana das soluções testadas.

HELING & CHANDLER (1998) estudaram o papel do hipoclorito de sódio, clorexidina e peróxido de hidrogênio em várias concentrações, isoladas e combinadas, sobre o *Enterococcus faecalis*. Incisivos de bovinos foram preparados segundo o modelo experimental de HAAPASALO & ORSTAVIK (1987). Os espécimes foram contaminados com culturas de 24 horas do microrganismo indicador durante 5 dias. Procedeu-se então a irrigação dos espécimes com as soluções, isoladamente ou combinadas durante 10 minutos. Em seguida, a dentina do lúmen radicular foi removida com o auxílio de brocas e o pó obtido colocado em 0,5 mL de caldo BHI. Seguiu-se o período de 24 horas de incubação. Após fez-se diluições através da adição de 0,7 mL de água destilada. A densidade óptica foi analisada através de espectrofotometria. Os autores verificaram que o emprego do hipoclorito de sódio isoladamente é a solução de escolha para a irrigação de canais radiculares.

KURUVILLA & KAMATH (1998) avaliaram o efeito do hipoclorito de sódio a 2,5%, gluconato de clorexidina a 0,2% e suas combinações sobre microrganismos coletados de 40 dentes humanos unirradiculares com polpas necrosadas. Coletou-se material do interior dos canais radiculares logo após a abertura coronária e após o preparo químico-mecânico com o emprego das soluções teste. As amostras foram incubadas e, após a leitura macroscópica, pode-se concluir que o uso alternado do hipoclorito de sódio a 2,5% e gluconato de clorexidina a 0,2% apresentou maior eficácia antimicrobiana que o emprego isolado da cada solução.

SIQUEIRA Jr. et al. (1998) analisaram o efeito antibacteriano do hipoclorito de sódio a 0,5%, hipoclorito de sódio a 2,5%, hipoclorito de sódio a 4%, digluconato de clorexidina a 0,2%, digluconato de clorexidina a 2%, ácido cítrico a 10% e EDTA a 17%, sobre *Porphyromonas endodontalis*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguis* e *Streptococcus sobrinus*. A análise foi realizada por difusão em ágar, sendo que os resultados mostraram que o hipoclorito de sódio a 4% apresentou os melhores resultados.

D'ARCANGELO et al. (1999) verificaram a atividade antimicrobiana do hipoclorito de sódio em diferentes concentrações, diferentes concentrações de clorexidina, e cetrimida, sobre os microrganismos: *Candida albicans*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus sanguis*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Actinomyces odontolyticus*, *Fusobacterium nucleatum*, *Porphyromonas gingivalis* e *Prevotella melaninogenica*, nos períodos de 10, 20 e 30 minutos. Os autores concluíram que todas as soluções testadas foram eficazes sobre todos os microrganismos após o período de 10 minutos.

AYHAN et al. (1999) estudaram o efeito do hipoclorito de sódio a 5,25%, hipoclorito de sódio a 0,5%, gluconato de clorexidina a 2%, álcool a 21% e cresofeno sobre *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus pyogenes*, *Escherichia coli* e *Candida albicans*. A suspensão de microrganismos foi ajustada à escala 0,5 de MacFarland e inoculada em meio de cultura. Para testar as soluções, embebeu-se discos de papel em 15 µL das soluções e colocou sobre as placas inoculadas. Procedeu-se o período de 24 horas de incubação a 37°C e os halos de inibição foram mensurados. Os autores observaram que o hipoclorito de sódio a 5,25% foi efetivo contra todos os microrganismos, enquanto o hipoclorito de sódio a 0,5% apresentou menor efetividade. O álcool apresentou halos de inibição menores que o gluconato de clorexidina, porém, sem significância estatística. O cresofeno foi a substância que apresentou os maiores halos, porém é uma substância citotóxica e possivelmente carcinogênica, mutagênica e teratogênica. Portanto, a solução de hipoclorito de sódio a 5,25% é a solução que pode ser de escolha para irrigação de canais radiculares.

BUCK et al. (1999) avaliaram a efetividade do hipoclorito de sódio a 5,25%, clorexidina a 0,12% e RC Prep, em túbulos dentinários. Dentes unirradiculares humanos foram seccionados em quatro partes e esterilizados. Em seguida, foram colocados em contato com discos de papel esterilizados, embebidos em soluções de *Micrococcus luteus* e *Bacillus megaterium* e incubados durante 24 a 26 horas. Com o objetivo de verificar a migração bacteriana através dos túbulos dentinários, foi feita a impressão, em ágar, tanto do lado que

ficou em contato com os microrganismos, quanto do lado oposto, e pôde-se verificar o crescimento de colônias no meio. Os segmentos contaminados foram colocados em contato com discos de papel esterilizados, embebidos nas soluções testadas, durante 1 minuto. Novamente foi feita a impressão em placa com ágar, e observou-se após 12 horas de incubação que no lado dos segmentos em que ficou em contato com as soluções teste não houve crescimento do *Micrococcus luteus*, enquanto do lado oposto havia crescimento. Já com o *Bacillus megaterium*, houve crescimento de ambos os lados.

FERREIRA et al. (1999) analisaram a atividade do gel de papaína a 0,4%, óleo de castor a 3,3% e hipoclorito de sódio a 0,5% sobre microrganismos anaeróbios, estreptococos e *Streptococcus mutans*, em 60 dentes unirradiculares necrosados. Os dentes foram divididos em 3 grupos de 20. Realizou-se a abertura coronária e a coleta de material do canal radicular com cones de papel absorvente esterilizados, que foram colocados em meio de cultura. Procedeu-se o preparo químico-mecânico, utilizando-se as 3 soluções analisadas e o selamento temporário com Cimpat. Após 72 horas, o selamento foi removido e novas coletas foram feitas. O material coletado foi processado e inoculou-se 0,05 mL das suspensões, em placas com meio seletivo. Após a incubação realizou-se a contagem das unidades formadoras de colônias (ufc), o que permitiu concluir que todas as soluções testadas apresentaram ação antimicrobiana, havendo redução do número de unidades formadoras do colônias. O gel de papaína a 0,4% foi menos eficaz.

LEONARDO et al. (1999) estudaram, *in vivo*, a atividade antimicrobiana do gluconato de clorexidina a 2% em 22 canais radiculares de incisivos e molares com necrose pulpar e reação periapical. Após a abertura coronária, as amostras microbiológicas foram coletadas e colocadas em meio de transporte reduzido, sendo posteriormente processadas. Simultaneamente, os canais radiculares foram preparados utilizando-se a solução irrigadora. Nova coleta foi feita após a secagem dos canais radiculares e os dentes foram temporariamente selados. Decorridas 48 horas, coletou-se novas amostras, que foram processadas. Os resultados indicaram significativa redução dos microrganismos anaeróbios e completa eliminação de *Streptococcus mutans*.

SEN et al. (1999) avaliaram, *in vitro*, as propriedades antifúngicas da clorexidina a 0,12%, hipoclorito de sódio a 1% e a 5% em 266 incisivos superiores humanos. Os canais radiculares foram preparados e divididos em 2 grupos, sendo que no grupo 1 se empregou o EDTA. Os canais radiculares foram inoculados com 20 µL de suspensão com *Candida albicans* e, em seguida, incubados durante 10 dias. Após este período os canais radiculares foram lavados com solução tampão. Então, introduziu-se 3 mL das soluções testadas por períodos de 1, 5, 30 minutos e 1 hora. Novamente irrigou-se os canais radiculares com PBS e

os dentes foram colocados em tubos de ensaio contendo meio de cultura. Após a leitura macroscópica seguiu-se a observação através da microscopia eletrônica de varredura. Os resultados indicaram que nos dentes do grupo 2, em que o smear layer estava presente, nenhuma das soluções testadas foi eficaz, enquanto que no grupo 1, em que o smear layer estava ausente, nos períodos de 1, 5 e 30 minutos, o hipoclorio de sódio a 1% e a 5% e a clorexidina a 0,12% não foram eficientes porém, após 1 hora, todas as soluções mostraram atividade antifúngica.

SANTA CECÍLIA (1999) verificou o efeito antimicrobiano de uma solução experimental de hipoclorito de sódio (Clor-in) e do hipoclorito de sódio a 1%, por meio de teste de difusão em ágar, sobre os microrganismos: *Porphyromonas endodontalis*, *Enterococcus faecalis* e *Fusobacterium nucleatum*. A solução experimental, tanto a estocada quanto a recém preparada, apresentou maiores zonas de inibição microbiana quando comparada com a solução de hipoclorito de sódio a 1%, demonstrando efetividade contra todas as cepas.

HAAPASALO et al. (2000) estudaram, in vitro, a inativação local de medicamento em dentina radicular. As substâncias testadas foram a solução de hidróxido de cálcio a 1%, acetato de clorexidina a 0,5% e a 0,05%, o hipoclorito de sódio a 1% e a solução de iodo-iodeto de potássio a 0,2-0,4% e 2-4%, sobre o *Enterococcus faecalis* (A197A) isolado de uma infecção persistente. Os autores trabalharam com alíquotas de 50 µL dos medicamentos testados, e incubados a 37°C por 0, 1 e 24 horas antes da adição de 50 µL da suspensão bacteriana. Os resultados mostraram que o pó de dentina apresenta um efeito inibitório sobre os medicamentos testados, e que parece ser um modelo eficiente para estudar as interações entre medicamentos endodôntico locais, dentina e microrganismos.

KOMOROWSKI et al. (2000) analisaram a substantividade de algumas substâncias empregadas na irrigação de canais radiculares, como o hipoclorito de sódio a 5,25% e a clorexidina 0,2%. Empregando a metodologia proposta por ORSTAVIK & HAAPASALO (1990), puderam verificar que após 5 minutos de contato com a dentina, nenhuma das soluções analisadas conseguiu eliminar *Enterococcus faecalis* do interior de túbulos dentinários bovinos. Porém, quando empregadas como medicação intracanal, em que o período de contato da solução com os túbulos dentinários foi igual a 7 dias, a clorexidina a 0,2% apresentou efeito sobre o microrganismo analisado após um período de 3 semanas, enquanto o hipoclorito de sódio não foi capaz de eliminar os microrganismos que ainda permaneceram no interior dos túbulos dentinários. Portanto, os autores indicam o emprego da clorexidina a 0,2% como medicação intracanal, e não como solução irrigadora dos canais radiculares.

2.2 Características Físico-químicas das Soluções Irrigadoras

O processo de sanificação e modelagem do canal radicular acontece de maneira interativa, devendo ser valorizado e analisado antes da seleção de uma substância química, a conveniência com a situação clínica frente à suas propriedades e, de modo especial, a capacidade antimicrobiana, a ação de dissolução tecidual, o poder de limpeza e a boa tolerância aos tecidos periapicais.

O hipoclorito de sódio é uma substância química auxiliar do preparo do canal radicular que tem sido utilizada há bastante tempo. Uma divulgação de destaque inicial desta substância foi realizada por WALKER em 1936. As propriedades fundamentais aplicadas de interesse à endodontia, têm sido constantemente investigadas.

Várias pesquisas estudaram a capacidade de dissolução tecidual do hipoclorito de sódio em tecidos vivos e necrosados, alterando a concentração da solução, a temperatura, o volume, o tempo de ação, a superfície de contato, a quantidade da solução e a massa de tecido e outras variáveis (HAND et al., 1978; THÉ, 1979, 1980; CUNNINGHAM & BALEKJIAN, 1980; CUNNINGHAM & JOSEPH, 1980; KOSKINEN et al., 1980; ABOU-RASS & OGLESBY, 1981; GORDON et al., 1981; MOORER & WESSELINK, 1982; NAKAMURA et al., 1985; HASSELGREN et al., 1988; MORGAN et al., 1991; ANDERSEN et al., 1992; JOHNSON & REMEIKIS, 1993; YANG et al., 1995; TURKUN & GENGIZ, 1997; BARBIN, 1999; SANTOS, 1999; SPANÖ, 1999). Pode-se verificar que uma propriedade adicional e muito importante para o estabelecimento do processo de sanificação do sistema de túbulos dentinários é a expressiva capacidade de dissolução tecidual mostrada pelo hipoclorito de sódio.

PÉCORRA et al. (1997 b) estudaram o *Shelf life* (tempo de vida) da solução de Dakin (hipoclorito de sódio a 0,5%) armazenada em vidro âmbar em diversas condições de temperatura, ou seja, à luz solar, à sombra – temperatura ambiente e, em geladeira à 9 graus centígrados e isento de luz. Os autores observaram que após 4 meses a solução perdia 80% de seu teor de cloro quando deixada a receber luz solar, 60% à temperatura ambiente e, apenas 20% quando conservada a baixa temperatura e isenta de luz. Verificaram também que apenas 30% das marcas comerciais testadas apresentavam teor de cloro dentro das especificações, ou seja, acima de 0,4%.

GUERISOLI et al. (1998 a) avaliaram algumas propriedades físico-químicas (densidade, tensão superficial, pH, viscosidade e capacidade de umectação) das soluções de hipoclorito de sódio nas concentrações de 0,5%, 1%, 2,5% e 5%. Os resultados estão descritos no Quadro 1.

Quadro 1 – Propriedades físico-químicas de soluções de hipoclorito de sódio

Propriedades	Hipoclorito de Sódio			
	0,5%	1%	2,5%	5%
Densidade(g/cm ³)	1,00	1,04	1,06	1,09
Tensão Superficial(dinas/cm)	74,3	75,0	75,7	73,8
pH	11,98	12,60	12,65	12,89
Viscosidade (centiPoise)	0,956	0,986	1,073	1,110
Condutividade (miliSiemens)	26,0	65,5	88,0	127,5
Capacidade de Umectação	2 h. 20 min	1 h. 27 min	1 h. 23 min	18 min

GUERISOLI et al. (1998 b) investigaram a ação das soluções de hipoclorito de sódio nas concentrações de 0,5%, 1%, 2,5% e 5% sobre a estrutura dentinária mineralizada e desmineralizada pelo tempo de 1 hora. Os autores constataram que dentina mineralizada apresenta perda de massa tecidual de modo estatisticamente semelhante para todas as concentrações das soluções estudadas. Porém, a dentina desmineralizada (colágeno) sofria perda de massa de modo diretamente proporcional à concentração da solução, ou seja, quanto maior a concentração da solução de hipoclorito de sódio, tanto maior a perda de massa da dentina desmineralizada.

WADACHI et al. (1998) estudaram a dissolução do tecido mole das paredes do canal radicular promovida pelo hidróxido de cálcio, pelo hipoclorito de sódio e pela associação hidróxido de cálcio e hipoclorito de sódio, à luz da microscopia eletrônica de varredura. Concluíram que o hipoclorito de sódio, usado isoladamente, apresentou menos resíduos que a associação hidróxido de cálcio e hipoclorito de sódio, e que o hidróxido de cálcio sozinho.

BARBIN (1999) avaliou, *in vitro*, o efeito da adição de lauril dietilenoglicol éter sulfato de sódio às soluções de hipoclorito de sódio (0,5%, 1%, 2,5% e 5%), sobre a velocidade de dissolução da polpa bovina, o potencial hidrogeniônico, a condutividade iônica, a tensão superficial e o teor de cloro. Com base na metodologia empregada, pode-se concluir que: a velocidade de dissolução do tecido pulpar bovino é diretamente proporcional à concentração da solução de hipoclorito de sódio; a velocidade de dissolução do tecido pulpar é maior nas soluções de hipoclorito de sódio sem a adição do tensoativo lauril dietilenoglicol éter sulfato de sódio; a velocidade de dissolução pulpar foi tão maior quanto maior a

disponibilidade de íons hidroxila e de íons hipoclorito na solução de hipoclorito de sódio, o que promoveu nesses casos maior redução da tensão superficial por saponificação de gorduras e um maior percentual de cloro remanescente após o processo de dissolução respectivamente; a adição de tensoativo reduziu a velocidade de dissolução pulpar e promoveu nesses casos uma ligeira elevação da tensão superficial, interrompendo o processo de saponificação de gorduras, além de reduzir o percentual de cloro remanescente, após o processo de dissolução do tecido pulpar; a redução do pH, entre o início e o final do processo de dissolução pulpar, é inversamente proporcional à concentração da solução de hipoclorito de sódio com e sem tensoativo; a maior velocidade de dissolução parece relacionar-se com a menor redução do pH, sugerindo a importância da abundância dos íons hidroxila no processo de dissolução, permitindo a maior frequência da reação de saponificação que parece ser mais rápida que as demais; a redução da condutividade iônica, entre o início e o final do processo de dissolução pulpar, ocorreu da mesma forma nas diferentes concentrações da solução de hipoclorito de sódio, com e sem tensoativo; a redução geral da condutividade iônica sugere que a formação de produtos moleculares é quantitativamente semelhante. No entanto, devem ser diferentes qualitativamente uma vez que a velocidade de dissolução pode ser maior ou menor; os valores absolutos de variação da tensão superficial, entre o início e o final do processo de dissolução pulpar, são diretamente proporcionais à concentração da solução de hipoclorito de sódio; a variação da tensão superficial é maior nas soluções sem tensoativos; as soluções sem tensoativos apresentaram redução da tensão superficial e, as soluções com tensoativo, elevação; quanto maior a redução da tensão superficial tanto maior a velocidade de dissolução do tecido pulpar o que indica a maior frequência da reação de saponificação, que parece ser mais rápida que as demais, nesse processo; os menores teores de cloro remanescente ocorreram com a solução de hipoclorito de sódio a 0,5% e, os maiores, com o grupo formado pelas soluções a 1%, 2,5% e 5%; as soluções de hipoclorito de sódio com tensoativo mostraram os menores teores de cloro remanescente após o processo de dissolução pulpar; quanto menor o teor de cloro remanescente tanto menor a velocidade de dissolução do tecido pulpar, o que sugere que nas soluções menos concentradas a reação de formação de cloraminas, que parece ser mais lenta que as demais, é mais frequente.

SANTOS (1999) analisou, *in vitro*, o efeito do aumento da temperatura das soluções de hipoclorito de sódio sobre suas propriedades físico-químicas anteriores e posteriores à dissolução do tecido pulpar bovino, observando o potencial hidrogeniônico, a condutividade iônica, a tensão superficial e o teor de cloro remanescente. O autor concluiu que: a velocidade de dissolução do tecido pulpar bovino foi diretamente proporcional à concentração e à temperatura de utilização da solução de hipoclorito de sódio, isto é, quanto

maiores a concentração e a temperatura utilizadas tanto maior a velocidade de dissolução tecidual; no que concerne às concentrações das soluções de hipoclorito de sódio observou-se que o hipoclorito de sódio a 0,5% e a 1% agiram de modo estatisticamente semelhantes entre si quanto à velocidade de dissolução do tecido pulpar bovino; a redução percentual do potencial hidrogeniônico (pH), após o processo de dissolução pulpar, foi inversamente proporcional à concentração da solução de hipoclorito de sódio, isto é, quanto maior a concentração da solução de hipoclorito de sódio utilizada, tanto menor a redução percentual do potencial hidrogeniônico; a redução percentual do potencial hidrogeniônico (pH) foi menor à temperatura de 24°C e maior no grupo formado pelas temperaturas de 37°C e 50°C, ou seja, o aumento de temperatura da solução causou maior redução percentual do potencial hidrogeniônico; a redução percentual da condutividade iônica foi diretamente proporcional à concentração da solução de hipoclorito de sódio, ou seja, quanto maior a concentração da solução de hipoclorito de sódio utilizada, tanto maior será a redução percentual da condutividade iônica; a temperatura de 24°C apresentou a menor redução da condutividade iônica e o grupo formado pelas temperaturas de 37°C e 50°C, a maior, isto é; o aumento de temperatura da solução causou maior redução percentual da condutividade iônica. A redução percentual da tensão superficial foi diretamente proporcional à concentração da solução de hipoclorito de sódio e, inversamente proporcional à temperatura de utilização da solução; as soluções de hipoclorito de sódio nas concentrações de 0,5% e 1% agiram de modo estatisticamente semelhantes entre si quanto à redução percentual de tensão superficial; a redução da tensão superficial foi maior na temperatura de 24°C e menor no grupo formado pelas temperaturas de 37°C e 50°C. O aumento de temperatura da solução causou menor redução percentual da tensão superficial; o percentual de cloro remanescente foi diretamente proporcional à concentração da solução de hipoclorito de sódio, ou seja, quanto maior a concentração da solução de hipoclorito de sódio utilizada, tanto maior o seu percentual de cloro remanescente; o aumento da temperatura de utilização da solução de hipoclorito de sódio causou maior redução do seu percentual de cloro remanescente.

SPANÓ (1999) avaliou, *in vitro*, a dissolução do tecido pulpar bovino promovido pela solução de hipoclorito de sódio, considerando: o efeito das concentrações de hipoclorito de sódio a 0,5%, 1%, 2,5% e 5% sobre a velocidade de dissolução à temperatura ambiente; análise das variações do potencial hidrogeniônico, da condutividade iônica, da tensão superficial e de cloro remanescente das soluções de hipoclorito de sódio antes e depois do teste de dissolução do tecido pulpar. Com base na metodologia empregada , pode-se concluir que: a velocidade de dissolução dos fragmentos do tecido pulpar bovino é diretamente proporcional à concentração das soluções de hipoclorito de sódio, ou seja, quanto maior a

concentração das soluções de hipoclorito de sódio, mais rápido se processa a dissolução do tecido pulpar. Após a dissolução do tecido pulpar, a variação percentual do potencial hidrogeniônico das soluções de hipoclorito de sódio é inversamente proporcional à concentração inicial dessas soluções, ou seja, quanto maior a concentração inicial das soluções de hipoclorito de sódio, menor será a redução de seu potencial hidrogeniônico; em todas as concentrações testadas, as soluções de hipoclorito de sódio apresentam redução dos valores da condutividade iônica após o processo de dissolução do tecido pulpar bovino. Após a dissolução do tecido pulpar bovino, a variação percentual da tensão superficial das soluções de hipoclorito de sódio é diretamente proporcional à concentração, ou seja, quanto maior for a concentração do hipoclorito de sódio, maior será a redução da tensão superficial; após o processo de dissolução da polpa bovina, o percentual de cloro remanescente das soluções de hipoclorito de sódio apresenta relação diretamente proporcional com a sua concentração inicial da solução, ou seja, quanto maior a concentração de cloro inicial de uma solução de hipoclorito de sódio, maior foi a porcentagem de cloro remanescente; as soluções de hipoclorito de sódio nas concentrações de 0,5% e 1% apresentam variações percentuais de cloro remanescente de modo estatisticamente semelhante entre si, o mesmo ocorrendo com as soluções de hipoclorito de sódio a 2,5% e 5%, formando, assim, as duas primeiras e estas duas últimas, dois grupos distintos.

Frente aos trabalhos expostos, pode-se observar a importância e justificativa de se estudar a concentração inibitória mínima e o efeito antimicrobiano por exposição direta de diferentes substâncias químicas empregadas em Endodontia.

3. PROPOSIÇÃO

3. PROPOSIÇÃO

Os objetivos do presente estudo foram:

1. Determinar a concentração inibitória mínima das soluções de hipoclorito de sódio a 1%, 2%, 5%, solução de digluconato de clorexidina a 2%, solução de hidróxido de cálcio a 1%, solução de hidróxido de cálcio e detergente (HCT 20) sobre os microrganismos: *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *Candida albicans*.
2. Determinar a eficácia antimicrobiana destas soluções, por exposição direta, sobre os microrganismos mencionados em períodos de 5, 10, 15, 20 e 30 minutos.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Microrganismos Indicadores

Neste estudo foram utilizados microrganismos com distintas características morfológicas, tintoriais e respiratórias: cocos e bastonetes, Gram positivos e negativos, aeróbios facultativos e uma levedura. Os microrganismos constituíam-se de quatro cepas provenientes da *American Type Culture Collection* (ATCC), e uma oriunda do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de São Paulo. A partir das cepas selecionadas foi preparada uma mistura microbiana.

Os microrganismos indicadores e a respectiva mistura, que foram utilizados na forma de suspensões teste, estão referidos no Quadro 2.

Quadro 2 - Microrganismos Indicadores

MICRORGANISMOS	ATCC / CBS
1. <i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 6538
2. <i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC 29212
3. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853
4. <i>Bacillus subtilis</i>	ATCC 6633
5. <i>Candida albicans</i>	CBS - ICB / USP 562
6. Mistura (<i>S. aureus</i> + <i>E. faecalis</i> + <i>P. aeruginosa</i> + <i>B. subtilis</i> + <i>C. albicans</i>)	

4.2 Soluções Analisadas

Estudou-se a concentração inibitória mínima (CIM) e o efeito antimicrobiano por exposição direta de seis soluções químicas irrigadoras, freqüentemente empregadas durante o preparo do canal radicular, que encontram-se descritas no Quadro 3.

Quadro 3 - Soluções Irrigadoras Testadas

1. Hipoclorito de Sódio a 1% [®]	Halex Istar, Goiânia, GO, Brasil
2. Hipoclorito de Sódio a 2% [®]	Biodinâmica, Ibiporá, PR, Brasil
3. Hipoclorito de Sódio a 5% [®]	Inodon Laboratório, Porto Alegre, RS, Brasil
4. Solução de Digluconato de Clorexidina a 2% [®]	F.G.M., Joinville, SC, Brasil
5. Solução de Hidróxido de Cálcio a 1%	Solução preparada a partir de 1 grama de hidróxido de cálcio pró-análise [®] (Quimis, Maillinkoet, USA) para 100 mL de água destilada esterilizada
6. Solução de Hidróxido de Cálcio e Solução de hidróxido de cálcio a 0,2% Detergente (HCT 20) (80 mL) associado ao Tergentol (Lauril dietilenoglicol éter sulfato de sódio a 0,125%) (20 mL)	
7. Água Destilada Esterilizada (Controle)	

4.3 Preparo das Suspensões Microbianas

Os microrganismos foram cultivados no bisel do meio Brain Heart Infusion ágar (BHIIa, Difco Laboratories, Detroit, MI, USA), previamente distribuído em tubos de ensaio e esterilizado a 121° C, durante 20 minutos. Decorridas 24 horas de incubação, à temperatura de 37° C e em condições respiratórias adequadas aos microrganismos indicadores, células microbianas foram suspensas em solução fisiológica a 0,5%[®] (Halex Istar, Goiânia, GO, Brasil) esterilizada. Em todos os casos, a suspensão teste foi ajustada, com auxílio do mesmo diluente, ao tubo número 1 da escala de MacFarland, na concentração aproximada de 3×10^8 células por mL.

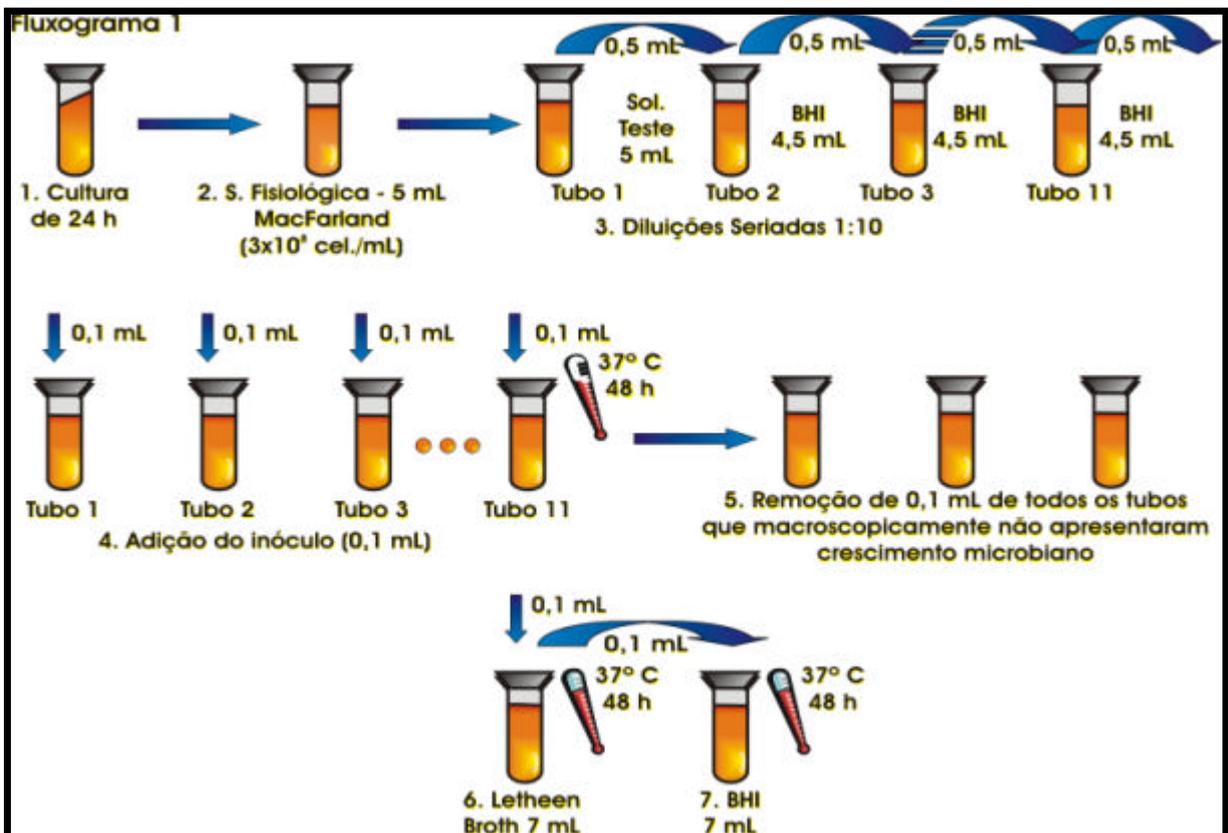
Para o preparo da mistura, uma alíquota de 1 mL foi retirada das suspensões puras e transferida para um tubo de ensaio, obtendo-se, portanto, a mistura experimental contendo *S. aureus* + *E. faecalis* + *P. aeruginosa* + *B. subtilis* + *C. albicans*.

4.4 Determinação da Concentração Inibitória Mínima

A determinação da concentração inibitória mínima das soluções estudadas, foi realizada através de diluições seriadas na razão de 10, empregando-se 4,5 mL de Brain Heart Infusion (BHI, Difco Laboratories, Detroit, MI, USA) como meio de cultura. Para o repique empregou-se 7,0 mL de Lethen Broth (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA). É importante ressaltar que ao Lethen Broth adicionou-se os inibidores Tiosulfato de Sódio P.A. (Art Laboratories, Campinas, SP, Brasil) e Tween 80 (Vetec Química Final Ltda, Rio de Janeiro, RJ, Brasil), ambos nas concentrações de 1%, neutralizantes, respectivamente, das soluções de hipoclorito de sódio e digluconato de clorexidina. Para todas as soluções analisadas o Lethen Broth estava acrescido destes inibidores, uma vez que para ser possível e coerente a comparação da concentração inibitória mínima de diferentes soluções irrigadoras, os meios de cultura empregados no experimento deveriam apresentar os mesmos constituintes.

Dois grupos controles, positivo e negativo, constituídos, respectivamente, pelo meio de cultura (BHI) acrescido de 0,1 mL das suspensões microbianas, e deste meio de cultura sem a adição do inóculo foram utilizados. Estes grupos controles apresentaram por função, testar a viabilidade dos microrganismos e a esterilidade dos meios, respectivamente. A água destilada e uma série de diluições de cada solução estudada, sem a adição do inóculo, foram usadas como soluções controles, com o objetivo de facilitar a leitura dos resultados, considerando-se que algumas das soluções analisadas alteravam a coloração do meio, dificultando a leitura visual dos resultados. O Fluxograma 1 expressa a seqüência de eventos seguida na presente investigação.

Em todas as etapas experimentais, sem exceção, a técnica asséptica foi valorizada, os ensaios foram conduzidos segundo a recomendação de duplo cego e os testes foram efetuados em duplicata.



Fluxograma 1

4.4 Determinação da Ação Antimicrobiana Por Exposição Direta

Objetivando a determinação da ação antimicrobiana, 420 cones de papel absorventes de número 50 (Tanari, Tanariman Indústria, Ltda, Manacaru, AM, Brasil), foram esterilizados por autoclavagem e, posteriormente, imersos nas suspensões microbianas experimentais, durante 5 minutos, objetivando o processo de contaminação. Decorrido esse período, os cones de papel foram distribuídos em placas de Petri contendo 10 mL das diferentes soluções analisadas, considerando-se os cinco períodos de tempo estudados e o grupo controle.

A intervalo de 5, 10, 15, 20 e 30 minutos, 84 cones de papel absorventes foram removidos do contato com as soluções ensaiadas e transportados, individualmente, para 10 mL de Letheen Broth (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA) acrescido dos inibidores Tiosulfato de Sódio P.A. (Art Laboratories[®], Campinas, SP, Brasil) e Tween 80 (Vetec Química Final Ltda, Rio de Janeiro, RJ, Brasil), ambos nas concentrações de 1% . O apêndice 1 expressa a composição do Letheen Broth.

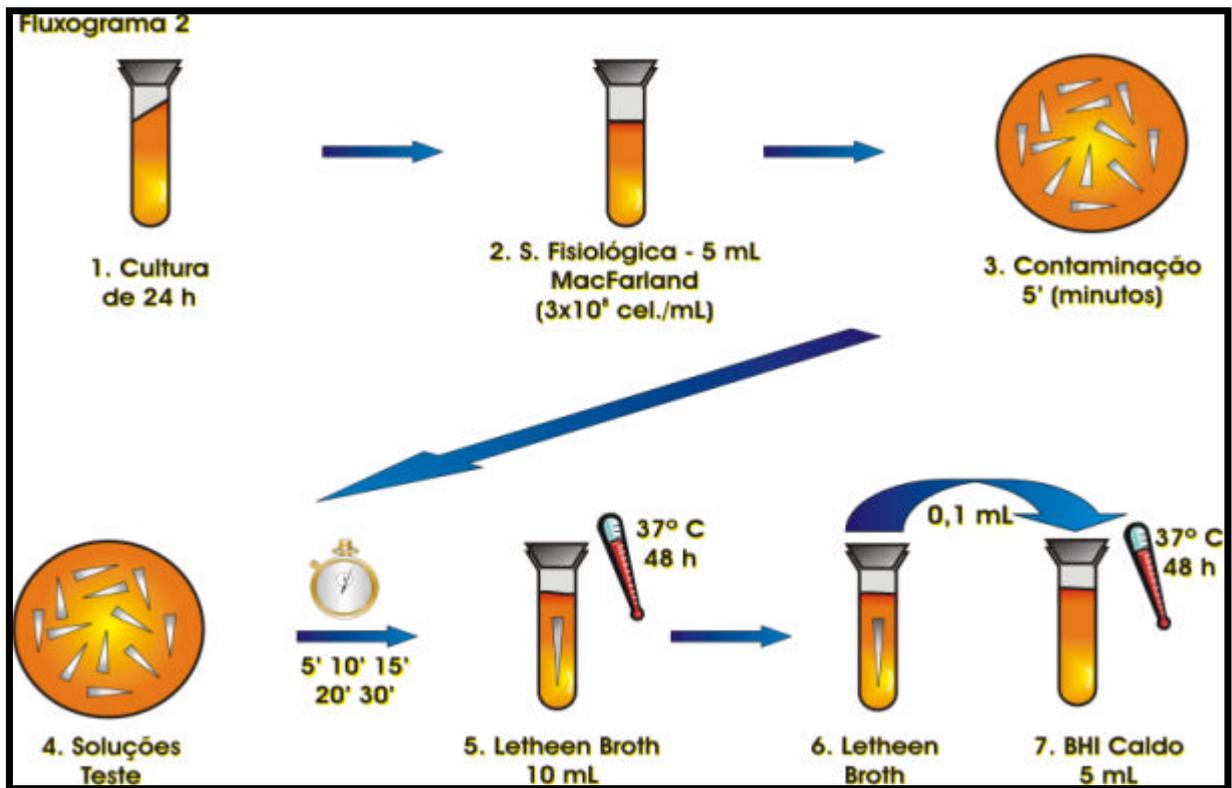
Na seqüência, o material foi incubado a 37° C por 48 horas, em ambiente favorável às exigências respiratórias dos microrganismos indicadores e, então, analisado, macroscopicamente, quanto à presença ou ausência de turvação, indicativa, ou não, de crescimento de microrganismos. Foram empregados dois grupos controles, um negativo e um positivo. O controle negativo foi feito com 7,0 mL de Letheen Broth, enquanto o controle positivo foi feito com a inoculação de 0,1 mL dos microrganismos em 7,0 mL de Letheen Broth, para se analisar se os microrganismos utilizados no experimento estavam, ou não, viáveis.

Todos os tubos foram selecionados para a confirmação dos resultados macroscópicos. Assim, inóculo de 0,1 mL, obtido a partir do Letheen Broth , foi transferido para 5 mL de BHI, procedendo-se às mesmas condições de incubação. A leitura final foi, também, macroscópica e, em caso de dúvida, complementada pela observação microscópica, tendo como parâmetro a coloração de Gram. Os ingredientes do Brain Heart Infusion (BHI), e as suas respectivas concentrações/litro de meio, estão listados no apêndice 2.

Em todas as etapas experimentais, sem exceção, a técnica asséptica foi valorizada, os ensaios foram conduzidos segundo a recomendação de duplo cego e os testes foram efetuados em duplicata.

O apêndice 3 mostra a distribuição dos cones de papel absorvente, em função das soluções estudadas e controle, e dos tempos experimentais, enquanto o Fluxograma 2

expressa a metodologia obedecida na presente investigação.



Fluxograma 2

5. RESULTADOS

5. RESULTADOS

Os resultados das concentrações inibitórias mínimas das soluções irrigadoras experimentais: hipoclorito de sódio a 1%, 2%, 5%, solução de digluconato de clorexidina a 2%, solução de hidróxido de cálcio a 1% e solução de hidróxido de cálcio e detergente (HCT 20) sobre os microrganismos indicadores *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *Candida albicans* e a mistura destes microrganismos estão demonstrados nas Tabelas 1 e 2.

As Tabelas 3 a 7 descrevem os resultados do efeito antimicrobiano das soluções irrigadoras experimentais sobre os microrganismos indicadores, por exposição direta, nos períodos de 5, 10, 15, 20 e 30 minutos.

Mediante os resultados dos grupos controle, pôde-se observar, no grupo controle positivo, cuja finalidade foi avaliar a viabilidade dos microrganismos, o crescimento evidenciado através da análise macroscópica e microscópica com a coloração de Gram. Da mesma forma, no grupo controle negativo, representado por tubos de ensaio contendo os meios de cultura esterilizados e sem a adição de microrganismos e/ou soluções testadas, evidenciou-se microscopicamente e macroscopicamente a ausência de crescimento dos microrganismos indicadores, assegurando a esterilização dos meios de cultura empregados neste experimento. Verificou-se ainda, na água destilada esterilizada, empregada como solução controle, o crescimento de todos os microrganismos utilizados nos dois testes.

Tabela 1 - Concentração inibitória mínima das soluções estudadas (%)

Soluções Microrganismos	Hipoclorito de sódio a 1%, 2% e 5%	Digluconato de clorexidina a 2%
<i>S. aureus</i>	0,1	0,000002
<i>E. faecalis</i>	0,1	0,02
<i>P. aeruginosa</i>	0,1	0,002
<i>B. subtilis</i>	1	0,02
<i>C. albicans</i>	0,1	0,02
Mistura	1	0,02

Tabela 2 – Concentração inibitória mínima das soluções estudadas (%).

Soluções Microrganismos	Solução de hidróxido de cálcio a 1%	Solução de hidróxido de cálcio e detergente (HCT20)
<i>S. aureus</i>	> 1	4,5
<i>E. faecalis</i>	> 1	> 4,5
<i>P. aeruginosa</i>	1	4,5
<i>B. subtilis</i>	> 1	4,5
<i>C. albicans</i>	> 1	4,5
Mistura	> 1	4,5

Tabela 3 - Efeito antimicrobiano por exposição direta às soluções de hipoclorito de sódio a 1%, 2% e 5%

Tempo Microrganismos	5 minutos	10 minutos	15 minutos	20 minutos	30 minutos
<i>S. aureus</i>	-	-	-	-	-
<i>E. faecalis</i>	-	-	-	-	-
<i>P. aeruginosa</i>	-	-	-	-	-
<i>B. subtilis</i>	-	-	-	-	-
<i>C. albicans</i>	-	-	-	-	-
Mistura	-	-	-	-	-

(+) resultado positivo = presença de crescimento

(-) resultado negativo = ausência de crescimento

Tabela 4 - Efeito antimicrobiano por exposição direta ao digluconato de clorexidina a 2%.

Tempo Microrganismos	5 minutos	10 minutos	15 minutos	20 minutos	30 minutos
<i>S. aureus</i>	-	-	-	-	-
<i>E. faecalis</i>	-	-	-	-	-
<i>P. aeruginosa</i>	+	+	+	+	+
<i>B. subtilis</i>	+	+	+	+	+
<i>C. albicans</i>	-	-	-	-	-
Mistura	+	+	+	+	+

(+) resultado positivo = presença de crescimento

(-) resultado negativo = ausência de crescimento

Tabela 5 - Efeito antimicrobiano por exposição direta à solução de hidróxido de cálcio a 1%

Tempo Microrganismos	5 minutos	10 minutos	15 minutos	20 minutos	30 minutos
<i>S. aureus</i>	+	+	+	+	-
<i>E. faecalis</i>	+	+	+	+	-
<i>P. aeruginosa</i>	+	+	+	+	-
<i>B. subtilis</i>	+	+	+	+	+
<i>C. albicans</i>	+	+	+	+	+
Mistura	+	+	+	+	+

(+) resultado positivo = presença de crescimento

(-) resultado negativo = ausência de crescimento

Tabela 6 - Efeito antimicrobiano por exposição direta à solução de hidróxido de cálcio e detergente (HCT 20)

Tempo Microrganismos	5 minutos	10 minutos	15 minutos	20 minutos	30 minutos
<i>S. aureus</i>	+	+	+	-	-
<i>E. faecalis</i>	+	+	+	+	-
<i>P. aeruginosa</i>	+	+	+	+	+
<i>B. subtilis</i>	+	+	+	+	+
<i>C. albicans</i>	+	+	+	+	+
Mistura	+	+	+	+	+

(+) resultado positivo = presença de crescimento

(-) resultado negativo = ausência de crescimento

Tabela 7 - Efeito antimicrobiano por exposição direta à água destilada esterilizada

Tempo Microrganismos	5 minutos	10 minutos	15 minutos	20 minutos	30 minutos
<i>S. aureus</i>	+	+	+	+	+
<i>E. faecalis</i>	+	+	+	+	+
<i>P. aeruginosa</i>	+	+	+	+	+
<i>B. subtilis</i>	+	+	+	+	+
<i>C. albicans</i>	+	+	+	+	+
Mistura	+	+	+	+	+

(+) resultado positivo = presença de crescimento

(-) resultado negativo = ausência de crescimento

6. DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

Os mecanismos de controle de infecção têm sido alvo de profundas investigações científicas nas diferentes áreas da saúde. Na endodontia a busca de esclarecimentos acerca dos processos de agressão e cura tem envolvido estudos minuciosos sobre as reações biológicas, mantendo frente a frente a microbiologia, a patologia e a endodontia.

A identificação dos microrganismos presentes e predominantes nas infecções endodônticas possibilita a adoção de medidas destinadas ao controle microbiano e, conseqüentemente, o favorecimento ao processo de reparação tecidual. O conhecimento dos fatores de virulência microbiana (representando o grau de patogenicidade) permitiu alcançar agentes antimicrobianos eficazes desprovidos ou com efeitos secundários mínimos.

O moderno conceito da quimioterapia antimicrobiana foi introduzido na virada do século, por um microbiologista alemão, Paul Ehrlich, que propôs que as doenças infecciosas podem ser curadas ou controladas por drogas que apresentam toxicidade seletiva para microrganismos infectantes (WALKER, 1992; NISENGARD & NEWMAN, 1994).

Os agentes antimicrobianos, normalmente, atuam pela supressão do crescimento de microrganismos ou pela destruição destes. Os critérios necessários para a utilização de quaisquer agentes antimicrobianos para o tratamento de microrganismos patogênicos são: a suscetibilidade do microrganismo ao agente antimicrobiano; a penetração deste agente no sítio de infecção; o alcance e manutenção de concentrações adequadas do agente no sítio de infecção; a baixa toxicidade do agente antimicrobiano às células do hospedeiro, porém, deve haver inibição do crescimento ou morte dos microrganismos; o não desenvolvimento, pelos microrganismos, de resistência a este agente rapidamente. Esses critérios requerem o conhecimento dos microrganismos envolvidos na infecção, a suscetibilidade dos microrganismos aos diferentes agentes antimicrobianos e a farmacocinética deste agente (WALKER, 1992).

Outro fator importante a ser considerado é o não desenvolvimento de resistência microbiana ao agente antimicrobiano. Os microrganismos podem apresentar resistência ou não serem afetados. A resistência pode ser natural (presente antes do contato com o antibiótico) ou adquirida (desenvolvendo-se durante a exposição à droga). A resistência adquirida por meio de um plasmídeo é o resultado de uma troca no DNA do microrganismo, o qual é geneticamente herdado pelas gerações subsequentes (CIANCIO, 1994).

As infecções endodônticas, características de canais radiculares com polpas necrosadas e periodontites apicais, são polimicrobianas, cujos componentes são dotados de acentuado potencial patogênico, predominando bactérias anaeróbias Gram- negativas. Assim, pode-se observar a interação parasita-hospedeiro, responsável por diversas reações que potencializam a infecção; determina a inibição da quimiotaxia dos neutrófilos e fagocitose; garante a migração de enzimas lisossômicas; participa da resposta imunológica por ativação do sistema complemento (C 3 e C 5); induz a produção de anticorpos; e interfere com a sensibilidade antibiótica, resultando na permanência de lesões periapicais dolorosas (SUNDQVIST, 1992, 1994; SELTZER & FARBER, 1994; NISENGARD & NEWMAN, 1994).

O estabelecimento de métodos de controle microbiano favorece a neutralização de todas as formas de agressão, possibilitando a completa sanificação do sistema de túbulos dentinários. Essa sanificação tem sido delegada à fase do preparo químico- mecânico do canal radicular. A obtenção da forma do canal radicular, a partir do esvaziamento, com a conseqüente neutralização do conteúdo séptico-tóxico, proporciona a eliminação de restos de matéria orgânica e de grande contingente de microrganismos. Todavia, foi demonstrado que a instrumentação isoladamente, não garante a sua completa remoção (BYSTROM & SUNDQVIST, 1981, 1983; BYSTROM et al., 1987; SYDNEY & ESTRELA, 1996).

É fundamental considerar que a anatomia interna é extremamente complexa, muitas vezes inacessível à ação mecânica do instrumento endodôntico, o que impõe, nestas ocasiões, uma efetiva ação antimicrobiana e neutralizante, acompanhada pela dissolução tecidual, proporcionada pela substância química em associação com a medicação intracanal (BYSTROM et al., 1981, 1983, 1985; HARRISON & HAND, 1981; HOLLAND et al., 1992; PÉCORÁ et al., 1993, 1997a, b; 1998, 1999; ESTRELA et al., 1998, 1999, 2000a,b,c). A substância química irrigante auxiliar na modelagem do canal radicular constitui emprego essencial para o estabelecimento do saneamento durante o preparo químico-mecânico, frente à ação antimicrobiana, favorecendo a ação de dissolução tecidual, facilitando a ação de remoção de componentes orgânicos e inorgânicos da cavidade pulpar, permitindo a lubrificação do instrumento endodôntico. Assim, é importante que a solução irrigadora rapidamente mantenha contato íntimo com a estrutura a ser sanificada (paredes dentinárias e tecidos pulpares), remova a contaminação das paredes dentinárias, mantendo-as em suspensão ou dissolvendo-as, impeça a compactação apical e aumente a permeabilidade dentinária.

Em relação à análise da metodologia experimental empregada neste estudo alguns fatores merecem ser abordados.

Os microrganismos utilizados nesta pesquisa constituíram-se daqueles presentes

em canais radiculares infectados, com distintas características morfo-tinto-respiratórias (cocos e bastonetes; Gram positivos e negativos; aeróbios facultativos indiferentes e aeróbios facultativos verdadeiros; além de uma levedura). A escolha procedeu-se também com base em microrganismos estudados em outros experimentos, sendo estes constituídos *Staphylococcus aureus* (ZERLOTI, 1959; PUPO et al., 1994; MARQUES, 1997; AYHAN et al., 1999; ESTRELA et al., 1998, 1999, 2000a,b), *Enterococcus faecalis* (WINKLER, 1959; FERREIRA et al., 1978; HARRISON & HAND, 1981; BYSTROM & SUNDQVIST, 1985; ORSTAVIK & HAAPASALO, 1990; HARRISON et al., 1990; HELING et al., 1992; VAHDTY et al., 1993; PUPO et al., 1994; AYHAN et al., 1999; HAAPASALO et al., 2000; ESTRELA et al., 1998, 1999, 2000a), *Pseudomonas aeruginosa* (RANTA et al., 1988; ORSTAVIK & HAAPASALO, 1990; CERVONE et al., 1990; ESTRELA et al., 1998, 1999, 2000a), *Bacillus subtilis* (BARBOSA & ALMEIDA, 1987; D'ARCANGELO et al., 1999; ESTRELA et al., 1998, 1999, 2000a) e *Candida albicans* (ZERLOTTI, 1959; BARBOSA & ALMEIDA, 1987; MARQUES, 1997; HARRISON et al., 1990; AYHAN et al., 1999; D'ARCANGELO et al., 1999; SEN et al., 1999; ESTRELA et al., 1998, 1999, 2000a,b,c).

Especificamente, entre os fatores relativos ao meio de cultura, pode-se salientar que os meios utilizados no experimento suportam as exigências nutritivas de microrganismos exigentes e, portanto foram empregados para estas avaliações (BURNETT & SCHUSTER, 1982; SLOTS & TAUBMAN, 1992; NISENGARD & NEWMAN, 1994; BAMMANN & ESTRELA, 1999; ESTRELA et al., 2000b).

O estabelecimento dos períodos de estudo de 5, 10, 15, 20 e 30 minutos, deve-se ao fato de que, tem sido o tempo em que normalmente se espera a sua efetividade antimicrobiana como solução irrigadora auxiliar do preparo do canal radicular. Nesse período, por exposição direta, a substância química deveria expressar sua completa e real efetividade. Geralmente, uma sessão de tratamento endodôntico demanda um intervalo de tempo que varia de 5 minutos a 1 hora. Deve-se ressaltar que durante esse período a substância deverá ser renovada várias vezes. Este intervalo de tempo, também foi investigado em outras pesquisas em que os períodos de estudo variaram até 1 hora (FOLEY et al., 1983; BARBOSA et al., 1987; NIKOLAUS et al., 1988; HARRISON et al., 1981, 1990; ORSTAVIK & HAAPASSALO, 1990; SOUZA et al., 1992; BRISENO et al., 1992; HELING et al., 1992a; OHARA et al., 1993; GEORGOPOULOU et al., 1994; PUPO et al., 1994; SEN et al., 1999; HAAPASALO et al., 2000).

O estabelecimento do espectro de atividade de qualquer agente antimicrobiano é útil para melhorar o processo de controle da infecção. Em geral, há três técnicas *in vitro* que podem ser empregadas para este propósito – o método de diluição, que permite a conclusão da

quantidade de agente antimicrobiano necessária; o teste de difusão em ágar, que permite a observação de zonas de inibição adjacentes aos discos que contêm o agente antimicrobiano, que podem estar relacionadas ao seu efeito; e o método de exposição direta, que fornece informações qualitativas a respeito das substâncias. Todas as técnicas apresentam vantagens e desvantagens. Por exemplo, o método de diluição só pode ser empregado para substâncias que são solúveis no meio de cultura. Com relação ao método de difusão em ágar, o tamanho da zona de inibição microbiana, depende da solubilidade e da difusibilidade da substância testada e, portanto, pode não expressar efetivamente todo o seu potencial. O método de exposição direta está relacionado à efetividade da substância e à sua exposição direta com o microrganismo; parece ser independente de outras variáveis e parece ser um teste laboratorial prático (ESTRELA et al., 2000b).

A metodologia empregada em alguns experimentos também deveria ser analisada. O teste de difusão em ágar (ADT) que adota o tamanho das zonas de inibição do crescimento microbiano como parâmetro de referência, freqüentemente não oferece condições de igualdade para a comparação de algumas substâncias com solubilidade e difusibilidade distintas e a correta execução da técnica microbiológica. Fatores como pré-incubação, ressecamento do meio de cultura, manutenção por períodos que excedam o tempo ideal permitido para a correta análise podem levar a resultados questionáveis.

A análise de medicações que apresentam diferentes capacidades de dissociação e difusão através de modelos experimentais empregando meio de cultura líquido (caldo), parece ser melhor que os testes de difusão que utilizam o ágar como meio de cultura. Isto ocorre porque algumas substâncias apresentam dificuldade de dissociação e difusão em ágar. Há vários problemas relacionados ao teste de difusão em ágar, sendo a maior desvantagem a ausência de distinção entre propriedades bactericidas e bacteriostáticas de materiais dentários, além de não fornecer qualquer informação a respeito da viabilidade do microrganismo indicador, ainda possui a limitação em medir a atividade de componentes solúveis. O teste de difusão em ágar requer cuidadosa padronização da densidade do inóculo, conteúdo de meio, viscosidade do ágar, número e tamanho dos espécimes contidos em cada placa (TOBBIAS, 1988; ORSTAVIK, 1988; WEISS et al., 1996 ; ESTRELA et al., 2000a,b).

O método de avaliação nos testes de difusão em ágar tem a sua validade e tem sido largamente empregado na microbiologia, entretanto, não estabelece parâmetros confiáveis para se comparar substâncias com características químicas diferentes, tais como a capacidade de dissociação e difusão em meio sólido. A metodologia empregada pode influenciar os resultados e, por esta razão, o modelo experimental deve ser cuidadosamente selecionado, com a finalidade de não favorecer qualquer associação. O tamanho das zonas de

inibição microbiana expressas no método de difusão em ágar pode não expressar o real potencial antimicrobiano da substância.

A suscetibilidade dos microrganismos a diversas substâncias antimicrobianas de uso endodôntico foram verificadas em diferentes trabalhos por metodologias variadas, em que se empregou teste de exposição direta e concentração inibitória mínima (EMILSON, 1977; HARRISON & HAND, 1981; SOUZA et al., 1992; OHARA et al., 1993; ESTRELA et al., 1998, 2000a, b), teste de difusão em ágar (CERVONE et al., 1990; YESILSOY et al., 1995; MARQUES, 1997; SIQUEIRA et al., 1998; SANTA CECÍLIA, 1999), método de diluição (BARBOSA et al., 1987, 1994), análise microbiana em dentina contaminada *in vivo* (BYSTROM & SUNDQVIST, 1981, 1983, 1985; SAFAVI et al., 1985; NIKOLAUS et al., 1988; RANTA et al., 1988; ORSTAVIK & HAAPASALO, 1990; SYDNEY & ESTRELA, 1996) e teste em dentina contaminada *in vitro* (HAAPASALO & ORSTAVIK, 1987; HELING et al., 1992a,b; VAHDATY et al., 1993; ESTRELA et al., 1999; BUCK et al., 1999).

Baseado em justificativas discutidas anteriormente, a preferência recaiu no emprego do teste para a análise inicial da concentração inibitória mínima da solução, seguido pelo teste de exposição direta. Todavia, outros estudos, também, empregaram estes métodos de avaliação (EMILSON et al., 1977; HARRISON & HAND, 1981; SOUZA et al., 1992; OHARA et al., 1993; ESTRELA et al., 1998, 2000a, b).

A concentração inibitória mínima (CIM) é a mínima concentração de um agente antimicrobiano requerida para inibir, *in vitro*, o crescimento de determinado microrganismo. A concentração inibitória mínima deve ser única para uma mesma substância independente de sua concentração, considerando-se o mesmo microrganismo, porém a concentração inibitória mínima pode variar dependendo do microrganismo analisado.

Baseado nos resultados obtidos, verificou-se que a concentração inibitória mínima das soluções de hipoclorito de sódio a 1%, 2% e 5% para *S. aureus*, *E. faecalis*, *P. aeruginosa* e *C. albicans* foi igual a 0,1% e para *B. subtilis* e a mistura foi igual a 1%. Todos os microrganismos foram inativados por estas soluções em todos os períodos de observação (5, 10, 15, 20 e 30 minutos). O digluconato de clorexidina a 2% apresentou concentração inibitória mínima igual a 0,000002% para *S. aureus*; 0,002% para *P. aeruginosa*; 0,02% para *E. faecalis*, *B. subtilis*, *C. albicans* e para a mistura. A efetividade antimicrobiana por exposição direta foi evidenciada em todos os períodos experimentais para *S. aureus*, *E. faecalis* e *C. albicans*, havendo inefetividade sobre *P. aeruginosa*, *B. subtilis* e a mistura de microrganismos em todos os períodos analisados. A solução de hidróxido de cálcio a 1% apresentou concentração inibitória mínima igual a 1% para *P. aeruginosa* e, para os demais

microrganismos e a mistura, a concentração inibitória mínima foi maior que 1%. Sua ação antimicrobiana por exposição direta foi evidenciada somente sobre *S. aureus*, *E. faecalis* e *P. aeruginosa* no período de 30 minutos, sendo que sobre *B. subtilis*, *C. albicans* e a mistura de microrganismos foi inefetiva em todos os períodos experimentais. A solução de hidróxido de cálcio e detergente (HCT20) apresentou concentração inibitória mínima igual a 4,5 mL para *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *B. subtilis*, *C. albicans* e a mistura, sendo que a concentração inibitória mínima desta substância foi superior a 4,5 mL para *E. faecalis*. Considerando-se que o HCT20 apresenta em sua composição, duas substâncias que podem exercer efeito antimicrobiano, o detergente, Tergentol (lauril dietilenoglicol éter sulfato de sódio a 0,125%) (20 mL) e, a solução de hidróxido de cálcio a 0,2% (80 mL), não se pôde determinar, frente à metodologia empregada neste experimento, qual dos componentes do HCT20 apresentou ação antimicrobiana ou se os dois componentes foram expressivos para os resultados obtidos neste estudo. A efetividade antimicrobiana por exposição direta foi verificada no período de 20 minutos para *S. aureus* e no período de 30 minutos para *E. faecalis*. Sobre os demais microrganismos (*P. aeruginosa*, *B. subtilis*, *C. albicans* e a mistura) apresentou inefetividade antimicrobiana. Mediante os resultados dos grupos controle, pôde-se observar, no grupo controle positivo, que os microrganismos estavam viáveis, sendo possível se evidenciar o crescimento microbiano através da análise macroscópica e microscópica com a coloração de Gram. Da mesma forma, no grupo controle negativo, representado por tubos de ensaio contendo os meios de cultura esterilizados e sem a adição de microrganismos e/ou soluções testadas, evidenciou-se microscopicamente e macroscopicamente a ausência de crescimento dos microrganismos indicadores, assegurando a esterilização dos meios de cultura empregados neste experimento, por último, quanto à solução controle, a água destilada esterilizada, verificou-se o crescimento de todos os microrganismos empregados neste estudo.

Frente ao exposto, percebe-se que a maior efetividade antimicrobiana, entre as soluções analisadas em intervalos de 5, 10, 15, 20 e 30 minutos, foi verificada no grupo do hipoclorito de sódio, independente da concentração de 1%, 2% e 5%, seguido do digluconato de clorexidina a 2%. A solução de hidróxido de cálcio a 1% exibiu atividade no período de tempo de 30 minutos sobre *S. aureus*, *E. faecalis* e *P. aeruginosa*, sendo inefetiva para *B. subtilis*, *C. albicans* e a mistura. O HCT20 inibiu após 20 minutos de exposição direta *S. aureus*, e 30 minutos *E. faecalis*, sendo completamente inefetivo sobre *P. aeruginosa*, *B. subtilis*, *C. albicans* e a mistura.

É fundamental esclarecer que as principais propriedades que as substâncias químicas devem apresentar, para favorecer o processo de sanificação em canais radiculares infectados, são o efeito antimicrobiano, a capacidade de dissolução tecidual e a

biocompatibilidade. Desta maneira, a velocidade (o tempo) para se efetivar a completa eliminação dos microrganismos presentes na luz do canal radicular constitui um importante fator a ser considerado. Por este motivo, a preferência durante a seleção de uma solução irrigadora, deve recair naquelas que se mostram efetivas e atuam mais rapidamente, como o emprego do hipoclorito de sódio. Deve-se destacar que a duração do tratamento endodôntico deveria ser a menor possível. Assim, quanto mais rápido a solução manifestar seu efeito antimicrobiano, melhor apresenta-se. Esses resultados estão de acordo com outros discutidos na literatura, caracterizando a superioridade antimicrobiana do hipoclorito de sódio comparado a outras substâncias (SHIH et al., 1970; SENIA et al., 1971; RINGEL et al., 1982; BYSTROM & SUNDQVIST, 1985; HARRISON & HAND, 1981; HARRISON et al., 1990; SOUZA et al., 1992; VAHDATY et al., 1993; JEANSONE & WHITE, 1994; ESTRELA et al., 1996; SYDNEY & ESTRELA, 1996; HELING & CHANDLER, 1998; AYHAN et al., 1999).

Desta forma, cabe destacar RINGEL et al. (1982), que analisando a eficácia antimicrobiana do gluconato de clorexidina a 0,2% e do hipoclorito de sódio a 2,5%, puderam observar que o hipoclorito de sódio a 2,5% foi mais efetivo que o gluconato de clorexidina a 0,2%. BYSTROM & SUNDQVIST (1985), investigando a eficácia antimicrobiana do hipoclorito de sódio a 0,5%, do hipoclorito de sódio a 5% e do hipoclorito de sódio a 5% associado ao EDTA, concluíram que o emprego do hipoclorito de sódio 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 hipoclorito de sódio a 5%. Quanto ao emprego isolado do hipoclorito de sódio a 0,5% e do hipoclorito de sódio a 5%, não foi possível observar nenhuma diferença clínica significativa. ESTRELA et al. (1996) observaram clinicamente a influência do emprego de hipoclorito de sódio a 1% alternado nas duas irrigações finais com EDTA, na prevalência de dor em quadros clínicos de periodontite apical traumática, em dentes com vitalidade pulpar. Os resultados demonstram elevados valores (85,74% a 88,60%) de ausência total de dor pós-operatória, quando da utilização desta associação. HELING & CHANDLER (1998), estudando o papel do hipoclorito de sódio, clorexidina e peróxido de hidrogênio em várias concentrações, isoladas e combinadas, sobre *Enterococcus faecalis* verificaram que o emprego do hipoclorito de sódio isoladamente é a solução de escolha para a irrigação de canais radiculares.

É oportuno considerar que independentemente da concentração, 1%, 2% e 5%, houve efetiva ação antimicrobiana sobre todos microrganismos indicadores, em todos períodos de observação (5, 10, 15, 20 e 30 minutos). Todavia, deve-se admitir que soluções menos concentradas apresentam-se com melhor tolerância tecidual.

Outro fator a acrescentar, é que ao comparar a capacidade de dissolução tecidual, observa-se em diferentes experimentos, a expressiva ação solvente do hipoclorito de sódio. GROSSMANN & MEIMAN (1941), analisando *in vitro* a capacidade solvente do hipoclorito de sódio a 5% (soda clorada) sobre polpas dentárias recentemente extraídas, concluíram que sua efetiva dissolução em alguns casos ocorria em período inferior a 1 hora.

BARBIN (1999) estudou a adição de um detergente às soluções de hipoclorito de sódio (0,5%, 1%, 2,5% e 5%), sobre a velocidade de dissolução da polpa bovina. Os resultados demonstraram que a adição de tensoativo reduziu a velocidade de dissolução pulpar e promoveu nesses casos ligeira elevação da tensão superficial, interrompendo o processo de saponificação de gorduras, além de reduzir o percentual de cloro remanescente, após o processo de dissolução do tecido pulpar. A velocidade de dissolução do tecido pulpar bovino é diretamente proporcional à concentração da solução de hipoclorito de sódio; a velocidade de dissolução do tecido pulpar é maior nas soluções de hipoclorito de sódio sem a adição do tensoativo lauril dietilenoglicol éter sulfato de sódio; a velocidade de dissolução pulpar foi tão maior quanto maior a disponibilidade de íons hidroxila e de íons hipoclorito na solução de hipoclorito de sódio, o que promoveu nesses casos maior redução da tensão superficial por saponificação de gorduras e um maior percentual de cloro remanescente após o processo de dissolução respectivamente; a adição de tensoativo reduziu a velocidade de dissolução pulpar e promoveu nesses casos uma ligeira elevação da tensão superficial, interrompendo o processo de saponificação de gorduras, além de reduzir o percentual de cloro remanescente, após o processo de dissolução do tecido pulpar; a variação da tensão superficial é maior nas soluções sem tensoativos; as soluções sem tensoativos apresentaram redução da tensão superficial e, as soluções com tensoativo, elevação; quanto maior a redução da tensão superficial tanto maior a velocidade de dissolução do tecido pulpar o que indica a maior frequência da reação de saponificação, que parece ser mais rápida que as demais, nesse processo; os menores teores de cloro remanescente ocorreram com a solução de hipoclorito de sódio a 0,5% e, os maiores, com o grupo formado pelas soluções a 1%, 2,5% e 5%; quanto menor o teor de cloro remanescente tanto menor a velocidade de dissolução do tecido pulpar, o que sugere que nas soluções menos concentradas a reação de formação de cloraminas, que parece ser mais lenta que as demais, é mais frequente.

Por conseguinte, ao se avaliar a propriedade antimicrobiana de uma determinada substância química, torna-se oportuno analisá-la em conjunto a outras propriedades, como dissolução tecidual, biocompatibilidade, e propriedades físico-químicas (densidade, tensão superficial, pH, viscosidade, condutividade, e capacidade de umectação). Isto posto, mesmo a clorexidina mostrando-se eficaz contra alguns microrganismos, o hipoclorito merece destaque

devido à sua expressiva capacidade de dissolução tecidual.

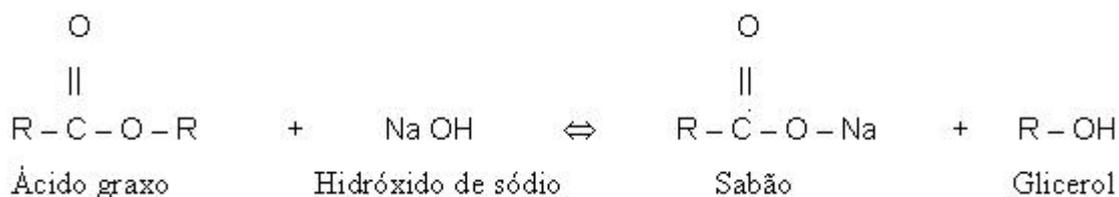
Nesse sentido, JEANSONE & WHITE (1994) analisaram a ação do hipoclorito de sódio a 5,25% e gluconato de clorexidina a 2% em 62 dentes humanos. A análise dos resultados revelou que tanto a clorexidina a 2% quanto o hipoclorito de sódio a 5,25% foram eficazes na redução da microbiota do canal radicular, porém, como o hipoclorito de sódio tem a capacidade de dissolução tecidual é a solução mais indicada para a irrigação de canais radiculares.

A compreensão do mecanismo de ação antimicrobiana do hipoclorito de sódio requer o esclarecimento de algumas reações químicas e o conhecimento mais detalhado desta solução. PÉCORA et al., (1999) salientam que a solução de hipoclorito de sódio com pH elevado é mais estável, sendo mais lenta a liberação de cloro. A instabilidade da solução com conseqüente e rápida perda de cloro e pequeno tempo de vida útil, ocorre quando se reduz o pH da solução por meio do ácido bórico ou do bicarbonato de sódio. Outros fatores, como a elevação da temperatura e a luz solar também alteram a liberação de cloro, favorecendo a ineficácia da solução. A solução de hipoclorito de sódio, devido ao seu equilíbrio dinâmico pode estar demonstrada pela seguinte reação química:

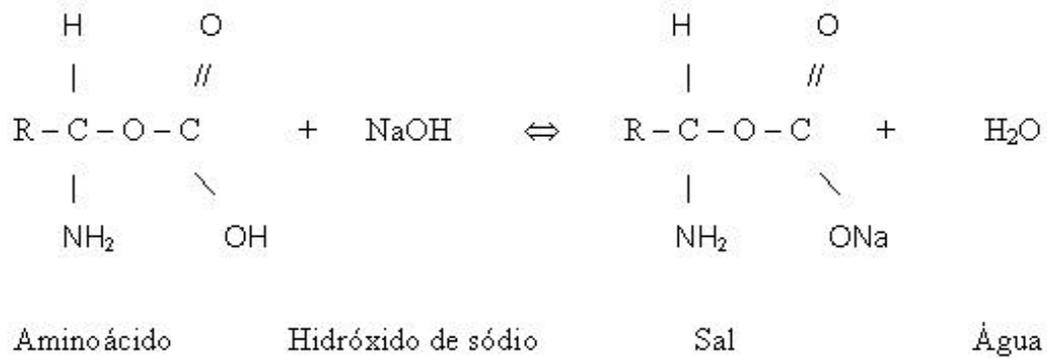


O hipoclorito de sódio não existe em estado de pó, somente em solução aquosa. Considerando-se esta reação, tem-se o NaOCl (hipoclorito de sódio, sal), H₂O (molécula de água), NaOH (hidróxido de sódio, base forte), HOCl (ácido hipocloroso, ácido fraco), Na⁺ (cátion sódio), OH⁻ (ânion hidroxila), H⁺ (cátion hidrogênio) e OCl⁻ (ânion hipoclorito).

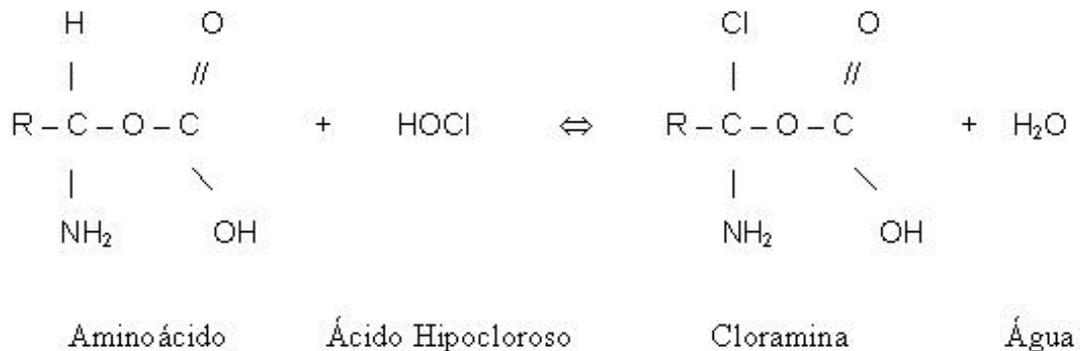
BARBIN (1999) reporta que no momento em que o hipoclorito de sódio entra em contato com a matéria orgânica, observa-se algumas reações químicas, entre elas a reação de saponificação, a reação de neutralização e a reação de cloraminação, descritas a seguir:



1 - Reação de saponificação



2 - Reação de neutralização de aminoácidos



3 - Reação de cloraminação

Interpretando estas reações químicas, observa-se que o hidróxido de sódio atua como solvente orgânico e de gordura, formando sabão (reação de saponificação). O hidróxido de sódio neutraliza aminoácidos e degrada ácidos graxos. O ácido hipocloroso, além de solvente orgânico, por liberar cloro nascente, que se combina com o grupo amina das proteínas formando as cloraminas, age como efetivo antimicrobiano. Desta forma, o ácido hipocloroso (HOCl) e os íons hipoclorito (OCl) apresentam atividade de hidrolizar e degradar aminoácidos.

A reação de cloraminação entre o cloro e o grupamento amina (NH) dos aminoácidos, com a formação de cloraminas interferem no metabolismo celular. O cloro (oxidante forte) apresenta ação antimicrobiana através da inibição enzimática bacteriana, a partir de uma oxidação irreversível dos grupos SH (sulfidrina) de enzimas bacterianas essenciais.

ESTRELA et al. (1998) estudaram o efeito biológico do pH na atividade

enzimática de bactérias anaeróbias. A membrana citoplasmática das bactérias é responsável pelo metabolismo, crescimento e divisão celular, sede de importantes sistemas enzimáticos, envolvidos nos estágios de formação da parede celular, biossíntese de lipídeos, transporte de elétrons e enzimas envolvidas no processo de fosforilação oxidativa. Assim, o efeito do elevado pH do hidróxido de cálcio altera a integridade da membrana citoplasmática através de injúrias químicas aos componentes orgânicos e fosfolipídeos ou ácidos graxos insaturados, a partir de uma reação de saponificação.

De modo similar, acresça-se às influências antimicrobianas do hidróxido de sódio, que o elevado pH do hipoclorito de sódio interfere na integridade da membrana citoplasmática, a partir de uma inibição enzimática irreversível, com alterações biossintéticas, no metabolismo celular, na destruição de fosfolipídios observados pelo processo de peroxidação lipídica.

O hipoclorito de sódio pode afetar alguns eventos da adesão de fungos. Um exemplo é a *Candida albicans*, microrganismo encontrado nas infecções de origem endodôntica. Sabe-se que o primeiro passo da infecção é a adesão deste microrganismo às superfícies bucais, seguido do crescimento e invasão tecidual. Desta forma, substâncias que previnam a adesão e invasão podem funcionar como agentes antifúngicos eficazes (WEBB et al., 1995).

Relativamente à clorexidina, frente aos resultados analisados, pode-se perceber que o *Staphylococcus aureus* foi muito sensível à clorexidina, uma vez que não só a concentração inibitória mínima requerida foi a menor, comparada aos outros microrganismos, como também, no teste por exposição direta, sua efetividade foi notada em todos os períodos. Este fato está de acordo com HENNESSEY (1973), que verificando as propriedades antimicrobianas da clorexidina, relatou que essa substância apresenta eficiente ação, sendo que os microrganismos Gram positivos são mais sensíveis que os Gram negativos, e que *Staphylococcus sp.* mostraram-se mais resistentes que *Streptococcus sp.*

EMILSON (1977) procurou determinar a capacidade inibitória da clorexidina por meio da determinação de sua concentração inibitória mínima (CIM), bem como a presença de zonas de inibição através de provas de difusão em ágar com discos contendo 5 µg de clorexidina. Os resultados encontrados permitiram concluir que existe uma correlação positiva entre os valores das zonas de inibição encontrados, com os valores da CIM, a qual se mostrou baixa para as amostras de *Staphylococcus*, *S. mutans* e *S. salivarius*, dentre outras. Porém, a sensibilidade de *S. sanguis* se apresentou intermediária.

A clorexidina constitui-se de molécula catiônica que ao se unir a compostos aniônicos, como sulfatos livres, radicais fosfatos e carboxílicos da película e glicoproteínas

salivares, promove redução na adsorção de proteínas à superfície dentária que é requerida para a formação da película adquirida. Em virtude de sua natureza altamente catiônica, apresenta elevada afinidade pela parede celular bacteriana, alterando as estruturas da superfície dessa parede. Consequentemente, o equilíbrio osmótico é perdido, a membrana citoplasmática fica extruída, havendo formação de vesículas e precipitação do citoplasma, com alteração no equilíbrio osmótico celular. Estas precipitações inibem o reparo da parede celular, fazendo com que as bactérias não se recuperem (ROLLA & MELSEN, 1975; LINDHE, 1995).

A ação da clorexidina pode ocorrer por diferentes formas: ela pode se ligar através de forças eletrostáticas aos grupos de proteínas ácidas como fosfato, sulfatos e íons carboxílicos, encontrados nos tecidos bucais e saliva, evitando que haja a formação de película adquirida; pode ser adsorvida à cápsula de polissacarídeos extracelulares ou glicocálice; a clorexidina pode competir com os íons cálcio, prevenindo a formação de pontes de cálcio entre a bactéria e as superfícies, bem como das bactérias entre si; pode interferir no metabolismo das bactérias por vários mecanismos (inibição da produção de ácido e inibição da proteólise) (VINHOLIS et al., 1996).

HELGELAND et al. (1971), analisando o mecanismo de ação antimicrobiano da clorexidina em função da concentração, reportaram que o aumento desta conduz a um decréscimo na atividade intracelular dos microrganismos patogênicos, o que levaria à liberação e/ou desnaturação das enzimas proteolíticas que constituem a membrana celular microbiana.

ROLLA & MELSEN (1975) analisaram *in vitro* a ligação da clorexidina com diversos componentes orgânicos e inorgânicos presentes na saliva, tais como: grupos carboxílicos, sulfatos, fosfatos e extratos proteicos das glândulas salivares maiores. Sabendo-se que, cátions bivalentes podem desalojar a clorexidina de grupos fosfatos e grupos carboxílicos, os autores sugerem que a substantividade da clorexidina seja explicada pela liberação da mesma droga advinda dos vários sítios de ligação, por ação do cálcio salivar. Outros mecanismos inibidores de placa são citados, o exemplo da redução dos microrganismos disponíveis na saliva e ligações subletais da clorexidina com grupos fosfatos da superfície bacteriana que reduzem a adsorção de bactérias ao dente.

VAHDATY et al. (1993) investigaram a eficácia do gluconato de clorexidina a 0,2% e a 2% e do hipoclorito de sódio a 0,2% e 2% sobre *Enterococcus faecalis* em túbulos dentinários de incisivos de bovinos. Os resultados indicaram que tanto a clorexidina quanto o hipoclorito de sódio em concentrações iguais, reduziram o número de microrganismos.

WHITE et al. (1997), avaliando a atividade antimicrobiana residual de soluções irrigadoras de

canais radiculares (gluconato de clorexidina a 2% e gluconato de clorexidina a 0,12%), mostraram que para todos os períodos analisados a atividade antimicrobiana residual do gluconato de clorexidina a 2% foi significativamente maior.

KOMOROWSKI et al. (2000), analisando a substantividade de algumas substâncias empregadas na irrigação de canais radiculares, como o hipoclorito de sódio a 5,25% e a clorexidina 0,2%, verificaram que após 5 minutos de contato com a dentina, nenhuma das soluções analisadas conseguiu eliminar *Enterococcus faecalis* do interior de túbulos dentinários bovinos. Porém, quando empregadas como medicação intracanal, em que o período de contato da solução com os túbulos dentinários foi igual a 7 dias, a clorexidina a 0,2% apresentou efeito sobre o microrganismo analisado enquanto o hipoclorito de sódio não foi capaz de eliminar os microrganismos que ainda permaneceram no interior dos túbulos dentinários. Portanto os autores indicam o emprego da clorexidina a 0,2% como medicação intracanal, e não como solução irrigadora dos canais radiculares.

A solução de hidróxido de cálcio e o HCT20 não se mostraram eficazes para os objetivos que se pretendem alcançar como solução irrigadora durante o processo de desinfecção do canal radicular.

Sabe-se que o hidróxido de cálcio apresenta duas expressivas propriedades enzimáticas, uma inibindo as enzimas microbianas, gerando o efeito antimicrobiano, e outra ativando as enzimas teciduais, levando ao efeito mineralizador, favorecendo o processo de reparação tecidual. Todavia, para que seu mecanismo de ação aconteça torna-se necessário a dissociação e a difusão, em íons hidroxila e íons cálcio. A pasta de hidróxido de cálcio quando empregada como medicação intracanal mantém condições que lhe propicia expressar seus mecanismos ideais, uma vez que requer um período de tempo maior. O emprego de soluções de hidróxido de cálcio, irrigadoras auxiliares do preparo do canal radicular, geralmente, demanda um intervalo de tempo pequeno. Este fato pode explicar sua ineficácia como solução irrigadora, e sua efetividade como medicação intracanal, caracterizando dois pontos, o tempo para atuação e a concentração da substância (ESTRELA, 1997).

A escolha do veículo composto pela solução de detergente (lauril sulfato de sódio), partiu do referencial de sua influência no abaixamento da tensão superficial, o que poderia influenciar em sua difusão através da membrana da célula bacteriana, bem como no número de moléculas que entrariam em contato com esta membrana (ZERLOTTI, 1959). FEIRER & LEONARD (1927) reportaram que a diminuição da tensão superficial determinaria uma maior difusão do medicamento através da membrana celular das bactérias, aumentando, conseqüentemente, seu poder bactericida. Provavelmente, em decorrência destes fatores, BARBOSA & ALMEIDA (1987) sugeriram a associação de detergente (lauril-

dietileno-glicol éter sulfato de sódio a 0,125% - Tergentol[®]) (20 mL) com hidróxido de cálcio a 0,2% (80 mL), como solução irrigadora para canais radiculares de dentes humanos.

Baseado nos resultados apresentados pela metodologia descrita no presente experimento a solução de hidróxido de cálcio associada ao detergente (HTC20) apresentou diluição inibitória máxima (DIM) superior a 4,5 mL para *E. faecalis*, e diluição inibitória máxima igual a 4,5 mL sobre os demais microrganismos. A efetividade por exposição direta foi verificada no intervalo de 20 minutos para *S. aureus* e no intervalo de 30 minutos para *E. faecalis*. Sobre os demais microrganismos (*P. aeruginosa*, *B. subtilis*, *C. albicans* e a mistura) apresentou inefetividade antimicrobiana. É oportuno realçar, que o tempo é fator a ser considerado quando se avalia o teste por exposição direta quando comparado com outras análises.

É prudente lembrar que detergentes e sabões podem se apresentar com contaminação microbiana e são desprovidos de efeitos antimicrobianos (NAGEM FILHO & VIEIRA PINTO, 1978).

Em relação à velocidade da atividade antimicrobiana, ESTRELA et al. (2000a), analisando o controle antimicrobiano de pastas de hidróxido de cálcio, não observaram diferenças quando o veículo foi a solução fisiológica ou o detergente. É oportuno realçar que neste experimento foi utilizada uma solução e não uma pasta. Neste estudo, o objetivo do emprego da pasta de hidróxido de cálcio vinculou-se à aplicação como medicação intracanal, que necessariamente possibilita um maior tempo para que a medicação possa expressar sua completa efetividade.

Mediante os fatores analisados e discutidos, quando da adequada seleção de uma solução irrigadora auxiliar do preparo de canais radiculares, deve-se admitir situações clínicas que requerem sua utilização. Em uma primeira condição depara-se com tecido vital (inflamado ou sadio) em que presume-se ausência de microrganismos. Numa segunda condição, observa-se tecido infectado (com presença de microrganismos). Considerando-se atividade da substância irrigadora, em ambas situações, mantendo a cadeia asséptica, expressando o potencial antimicrobiano, a capacidade de dissolução orgânica e a tolerância tecidual, destaca-se o hipoclorito de sódio em menor concentração, como a 1%, uma solução irrigadora universalmente utilizada.

Em face dos resultados obtidos, embora em condições experimentais *in vitro*, necessita-se de devidos cuidados ao extrapolar para aferições *in vivo*, tornando-se necessários mais estudos para se definir outras variáveis que merecem ser investigadas.

7. CONCLUSÃO

7. CONCLUSÃO

Com base nos métodos experimentais empregados e nos resultados obtidos, pode-se concluir que:

A concentração inibitória mínima do hipoclorito de sódio[®] a 1%, 2% e 5% para *S. aureus*, *E. faecalis*, *P. aeruginosa* e *C. albicans* foi igual a 0,1%, e 1% para *B. subtilis* e a mistura. Todos os microrganismos foram inativados por estas soluções em todos os períodos de observação (5, 10, 15, 20 e 30 minutos).

O digluconato de clorexidina[®] a 2% apresentou concentração inibitória mínima de 0,000002% para *S. aureus*; 0,002% para *P. aeruginosa*; 0,02% para *E. faecalis*, *B. subtilis*, *C. albicans* e a mistura. A efetividade antimicrobiana por exposição direta foi evidenciada em todos os períodos para *S. aureus*, *E. faecalis* e *C. albicans*, havendo inefetividade sobre *P. aeruginosa*, *B. subtilis* e a mistura de microrganismos em todos os períodos analisados.

A solução de hidróxido de cálcio a 1% apresentou concentração inibitória mínima igual a 1% para *P. aeruginosa* e, para os demais microrganismos e a mistura, a concentração inibitória mínima foi maior que 1%. Sua ação antimicrobiana por exposição direta foi evidenciada somente sobre *S. aureus*, *E. faecalis* e *P. aeruginosa* no período de 30 minutos, sendo que sobre *B. subtilis*, *C. albicans* e a mistura foi inefetiva em todos os períodos experimentais.

A solução de hidróxido de cálcio associada ao detergente (HCT20) mostrou concentração inibitória mínima igual a 4,5 mL para *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *B. subtilis*, *C. albicans* e a mistura de microrganismos, e concentração inibitória mínima maior que 4,5 mL para o *E. faecalis*. A efetividade antimicrobiana por exposição direta foi verificada no período de 20 minutos para *S. aureus* e no período de 30 minutos para *E. faecalis*. Sobre os demais microrganismos (*P. aeruginosa*, *B. subtilis*, *C. albicans* e a mistura) apresentou inefetividade antimicrobiana.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABOU-RASS, M.; OGLESBY, S. W. The effects of temperature, concentration, and tissue type on ability of sodium hypochlorite. **J Endod**, v. 7, n. 8, p. 376-377, Aug. 1981.
- ANDERSEN, M.; ANDREASEN, J.O.; ANDREASEN, F.M. *In vitro* solubility of human pulp tissue in calcium hydroxide and sodium hypochlorite. **Endod Dent Traumatol**, v. 8, n. 3, p. 104-08, June, 1992.
- AYHAN, H.; SULTAN, M.; ÇIRAK, M.; RUHI, M.Z. et al. Antimicrobial effects of various endodontic irrigants on selected microorganisms. **Int Endod J**, v. 32, n. 2, p. 99-102, Mar. 1999.
- BAMMANN, L. L. ; ESTRELA, C. Aspectos microbiológicos em Endodontia. In: ESTRELA, C.; FIGUEIREDO, J. A. P. **Endodontia: princípios biológicos e mecânicos**. São Paulo: Artes Médicas, 1999. Cap. 6 : p. 168-189
- BARBIN, E.L. **Estudo *in vitro* do efeito da adição de lauril dietileno glicol éter sulfato de sódio nas soluções de hipoclorito de sódio sobre suas propriedades físico-químicas anteriores e posteriores à dissolução do tecido pulpar bovino**. Ribeirão Preto, 1999. 108 p. (Dissertação de Mestrado) - Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.
- BARBOSA, S.V. ; ALMEIDA, D. HCT 20 - uma solução irrigadora para canais radiculares humanos. Análise *in vitro*. **Rev Bras Odontol**, v. 44, n. 5, p. 21- 28, set./out. 1987.
- BARBOSA, S.V.; SPANGBERG, L.S.W.; ALMEIDA, D. Low surface tension calcium hydroxide solution is an effective antiseptic. **Int Endod J**, v. 27, n. 1, p. 6-10, Jan. 1994.
- BARRET, M.T. The Dakin-carrel antisept solution. **Dent Cosmos**, v. 59, n. 44, p. 446 - 448, Apr. 1917.
- BAUMGARTNER, J.C.; CUENIN, P.R. Efficacy of several concentrations of sodium hypochlorite for root canal irrigation. **J Endod**, v. 18, n. 12, p. 605- 612, Dec. 1992.
- BAUMGARTNER, J.C.; IBAY, A.C. The chemical of irrigants used for root canal debridement. **J Endod**, v. 13, n. 2, p. 47-51, Feb. 1987.

- BERUTTI, E.; MARINI, R. ; ANGERETTI, A. Penetration ability of different irrigants into dentinal tubules. **J Endod**, v. 23, n. 12, p. 725 - 727, Dec. 1997.
- BRISEÑO, B. M.; WIRTH, R.; HAMM, G. et al. Efficacy of different methods and concentrations of root canal irrigations on bacteria in the root canal. **Endod Dent Traumatol**, v. 8, n. 1, p. 6-11, Feb. 1992.
- BOUCHER, N. M. A tool to improve the biocidal efficacy of sterilands of disinfectants in hospital or dental practice. **Can J Pharm Scien**, v. 14, p. 1-12, 1979.
- BUCK, R.; ELEASER, P.D. ; STAAT, R.H. *In vitro* disinfection of dentinal tubules by various endodontics irrigants. **J Endod** , v. 25, n. 12, p. 786-788, Dec. 1999.
- BURNET, G.W. ; SCHUSTER, G. S. **Microbiologia oral e enfermidades infecciosas**. Buenos Aires: Panamericana, 1982. p. 31-70.
- BUTTLER, T. K. ; CRAWFORD, J. J. The detoxifying effect of varying concentrations of sodium hypochlorite on endotoxins. **J Endod**, v. 8, n. 2, p. 59- 66, Feb. 1982.
- BYSTROM, A.; HAPPONEN, R.P.; SJOGREN, U. et al. Healing of periapical lesions of pulpless teeth after endodontic treatment with controlled asepsis. **Endod Dent Traumatol**, v. 3, n. 2, p. 58-63, Apr. 1987.
- BYSTRON, A.; SUNDQVIST, G. Bacteriologic evaluation of the efficacy of mechanical root canal instrumentation in endodontic therapy. **Scand J Dent Res**, v. 89, n. 4, p. 321-328, Aug. 1981.
- BYSTRON, A.; SUNDQVIST, G. Bacteriologic evaluation of the effects of 0,5% sodium hypochlorite in endodontic therapy. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**, v. 55, n. 3, p. 307- 12, Mar. 1983.
- BYSTRON, A.; SUNDQVIST, G. The antibacterial action of sodium hypochlorite and EDTA in 60 cases of endodontic therapy. **Int Endod J**, v. 18, n. 1, p. 35- 40, Jan. 1985.
- CALAS, P., ROCHD, T.; DRUILHET, P.; AZAIS, J. *In vitro* adhesion of two strains of *Prevotella nigrescens* to the dentin of the root canal: the part played by different irrigation solutions. **J Endod**, v. 24, n. 2, p. 112-115, Feb. 1998.
- CERVONE, F. ; TRONSTAD, L. ; HAMMOND, B. Antimicrobial effect of chlorhexidine in a controlled release delivey system. **Endod Dent Traumatol**, v. 6, n.1, p. 33-36, Feb. 1990.

- CIANCIO, S. G. Antimicrobianos e Antibióticos. In: NISENGARD, R. J. ; NEWMAN, M. G. **Microbiologia oral e imunologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2. ed. 1994. Cap. 33 : p. 364–372
- CVEK, M. ; HOLLENDER, L.; NORD, C.E. Treatment of nonvital permanent incisors with calcium hydroxide VI. A clinical, microbiological and radiological evaluation of treatment in one sitting of teeth with mature or imature root. **Odont Rev**, v. 27, p. 93-108, 1976.
- COOLIDGE, E.D. The diagnosis and treatment of conditions from diseased dental pulps. **J Am Dent Assoc**, v. 6, p. 337-349, 1919.
- COOLIDGE, E.D. Studies of germicides for the treatment of root canals. **J Am Dent Assoc**, v. 16, n. 4, p. 698-712, 1929.
- CUNNINGHAM, W.T. ; BALEJIAN, A.Y. Effect of temperature on collagen dissolving ability of sodium hypochlorite endodontic irrigant. **Oral Surg Oral Méd Oral Pathol**, v. 49, n. 2, p. 175-177, Feb. 1980.
- CUNNINGHAM, W.T. ; JOSEPH, S.W. Effect of temperature on the bactericidal action of sodium hypochlorite endodontic irrigant. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**, v. 50, n. 6, p. 569 - 571, Jun. 1980.
- D'ARCANGELO, C.; VARVARA, G.; DE FAZIO, P. An evaluation of the action of different root canal irrigants on facultative aerobic-anaerobic, obligate anaerobic and microaerophilic bacteria. **J Endod**, v. 25, n. 5, p. 351-353, May, 1999.
- DAKIN, H. D. On the use of certain antiseptic substances in the treatment of infected wounds. **Br Med J**, v. 2, p. 318-320, 1915a.
- DAKIN, H. D. The antiseptic action of hypochlorites: the ancient history of the “new antiseptic”. **Br Med J**, v. 2, p. 809 - 810, 1915b.
- EMILSON, C.G. Susceptibility of various microorganisms to chlorhexidine. **Scand J Dent Res**, v. 85, n. 4, p. 255-265, May 1977.
- ESTRELA, C. **Efeito antimicrobiano de pastas de hidróxido de cálcio**. Ribeirão Preto, 1997. 142p. (Tese de Livre-Docência) - Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Univerisdade de São Paulo.
- ESTRELA, C. ; BAMMANN, L. L.; PIMENTA, F.C. et al. Control of microorganisms in vitro by calcium hydroxide pastes. **Int Endod J**, 2000a (In Press)

- ESTRELA, C. ; ESTRELA, C. R. A. ; MOURA, J.; BAMMANN, L.L. Testing calcium hydroxide antimicrobial potential by different methods. **J Dent Res**, v. 79, p.529 (IADR Abstract 3081), 2000b.
- ESTRELA, C. ; PÉCORÁ, J. D. ; SILVA, R. S. Study of molar conductivity of calcium hydroxide pastes. **Braz Dent J**, 2000c. (No Prelo)
- ESTRELA, C. ; PIMENTA, F.C. ; ITO, I.Y.; BAMMANN, L.L. *In vitro* determination of direct antimicrobial effect of calcium hydroxide. **J Endod**, v. 24, n. 1, p. 15-17, Jan. 1998.
- ESTRELA, C. ; PIMENTA, F.C. ; ITO, I.Y.; BAMMANN, L.L. Antimicrobial evaluation of calcium hydroxide in infected dentinal tubules. **J Endod**, v. 25, n. 6, p. 416-418, June, 1999.
- ESTRELA, C. ; SIQUEIRA, R.M.G.; RESENDE, E.V. et al. Influência da substância química, do cimento obturador e do número de sessões na incidência de pericementite traumática. **Rev. Odontol. Brasil Central**, v. 6, n. 20, p. 9-13, 1996.
- FEIRER, W. A. ; LEONARD, V. Hexylresorcinol in oral antiseptics with special reference to solution 37. **Dent Cosmos**, v. 69, n. 9, p. 882-892, 1927.
- FERREIRA, A.C.S. ; ALMEIDA, D. ; FONSECA, G. Avaliação do poder bacteriostático e bactericida do hidróxido de cálcio utilizado como curativo de demora nos canais radiculares. **Rev. Bras. Odontol.**, v. 35, n. 2, p. 15-21, mar./abr. 1978.
- FERREIRA, C.M., BONIFÁCIO, K.C.; FRONNER, I.C.; ITO, I.Y. Evaluation of the antimicrobial activity of three irrigants solutions in teeth with pulpal necrosis. **Braz Dent J**, v. 10, n. 1, p. 15-21, 1999.
- FOLEY, D. B. ; WEINE, F.S. ; HAGEN, J.C. ; DEOBARRIO, J. J. Effectiveness of selected irrigants in the elimination of *Bacteroides melaninogenicus* from the root canal system: an *in vitro* study. **J Endod**, v. 9, n. 6, p. 236-241, June, 1983.
- GAMBARINI, G.; DELUCA, M.; GEROSA, R. Chemical stability of heated sodium hypochlorite endodontic irrigants. **J Endod**, v. 24, n. 6, p. 432-434, June, 1998.
- GEORGOPOULOU, M.; KONTAKIOTIS, E. ; NAKOU, M. Evaluation of the antimicrobial effectiveness of citric acid and sodium hypochlorite on the anaerobic flora of the infected root canal. **Int Endod J**, v. 27, n. 3, p. 139- 143, May, 1994.

- GERHARDT, D. E. ; WILLIAMS, H. N. Factors affecting the stability of sodium hypochlorite solutions used to disinfect dental impressions. **Quintessence Int**, v. 22, n. 7, p. 587- 591, July, 1991.
- GORDON, T. M. ; DAMATO, D.; CHRISTINE, P. Solvent of various dilutions of sodium hypochlorite on vital and necrotic tissue. **J Endod**, v. 7, n. 10, p. 466- 469, Oct. 1981.
- GROSSMAN. L. I. Irrigating of root canals. **J Am Dent Assoc**, v. 30, n. 13, p. 1915 - 1917, Dec. 1943.
- GROSSMAN, L. I.; MEIMAM, B. W. Solution of pulp tissue by chemical agent. **J Amer Dent Ass**, v. 28, p. 223-225, Feb. 1941.
- GUERISOLI, D. M. Z. ; SILVA, R. S. ; PÉCORÁ, J. D. Evaluation of some physico-chemical properties of diferent concentrations of sodium hypochorite solutions. **Braz Endod J**, v. 3, n. 2, p. 21-23, 1998a.
- GUERISOLI, D. M. Z. ; SOUZA NETO, M. D.; PÉCORÁ, J. D. Ação do hipoclorito de sódio em diversas concentrações sobre a estrutura dentinária. **Rev Odont UNAERP.**, v. 1, n. 1, p. 7-11, 1998b.
- GUIMARÃES, L. F. L. ; ROBAZZA, C.R.C.; MURGEL, C.A.F. et al. Tensão superficial de algumas soluções irrigantes de canais radiculares. **Rev Odontol Univ São Paulo.**, v. 2, n. 1, p. 6-9, jan./fev. 1988.
- GUTIERREZ, J.H.; JOFRE, A.; VILLENA, F. Scanning electron microscope study on the action of endodontic irrigants on bacteria invading the dentinal tubules. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**, v. 69, n. 4, p. 491- 501, Apr. 1990.
- HAAPASALO, M. P. P. ; ORSTAVIK, D. “In vitro” infection and disinfection of dentinal tubules. **J Dent Res**, v. 66, p. 1375- 1379, 1987.
- HAAPASALO, H. K.; SIRÉN, E. K.; WALTIMO, T.M.T.et al. Inactivation of local root canal medicaments by dentine; an *in vitro* study. **Int Endod J**, v. 33, n. 2, p. 126-131, Mar. 2000.
- HAND, R.E.; SMITH, M.L.; HARRISON, J.W. Analysis of the effect of dilution on the necrotic tissue dissolution property of sodium hypochlorite. **J Endod**, v. 4, n. 2, p. 60-64, Feb. 1978.
- HARRISON, J.W.; HAND, R.E. The effect of dilution and organic matter on the antibacterial property of 5.25% sodium hypochlorite. **J. Endod.**, v. 7, n. 3, p. 128-132, 1981.

- HARRISON, J. W. ; WAGNER, G. W. ; HENRY, C.A. Comparison of the antimicrobial effectiveness of regular and fresh scent clorox. **J Endod**, v. 16, n. 7, p. 328-330, July, 1990.
- HASSELGREN, G. ; OLSSON, B. ; CVEK, M. Effect of calcium hydroxide and sodium hypochlorite on the dissolution of necrotic porcine muscle tissue. **J Endod**, v. 14, n. 3, p. 125- 27, Mar. 1988.
- HELGELAND, K.; HEYDEN, G.; ROLLA, G. Effect of chlorhexidine on animals cells "*in vitro*". **Scand J Dent Res**, v. 79, n.3, p. 209-215, 1971.
- HELING, I. ; CHANDLER, N. P. Antimicrobial effect of irrigant combinations within dentinal tubules. **Int Endod J**, v. 31, n. 1, p. 8-14, Jan. 1998.
- HELING, I.; SOMMER, M.; STEINBERG, D.et al. Microbiological evaluation of the efficacy of chlorhexidine in a sustained-release devise for dentine sterilization. **Int Endod J**, v. 25, n. 1, p. 15 - 19, Jan. 1992a.
- HELING, I.; STEINBERG, D.; KENIG, S. Et al. Efficacy of a sustained-release devise containing chlorhexidine and calcium hydroxide in preventing secondary infection of dentinal tubules. **Int Endod J**, v. 25, n. 1, p. 20 - 24, 1992b.
- HENNESSEY, T.D. Some antibacterial properties of chlorhexidine. **J Periodontol Res**, v. 12, p. 61-67, 1973.
- HOLLAND, R.; SOARES, I. J.; SOARES, I. M. Influence of irrigation and intracanal dressing on the healing process of dog's teeth with apical periodontitis. **Endod Dent Traumatol**, v. 8, n. 4, p. 223 - 229, Dec. 1992.
- JEANSONNE, M. J.; WHITE, R. R. A comparison of 2.0% chlorhexidine gluconate and 5.25% sodium hypochlorite as antimicrobial irrigants. **J Endod**, v. 20, n. 6, p. 276 - 278, June, 1994.
- JOHNSON B. R.; REMEIKIS, N. A. Effective shelf-life of prepared sodium hypochlorite solution. **J Endod**, v. 19, n. 1, p. 40-43, Jan. 1993.
- KAKEHASHI, S. ; STANLEY, H. R. ; FITZGERALD, R. J. The effects of surgical exposures of dental pulps in germ-free and conventional laboratory rats. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**, v. 20, p. 340 - 349, 1965.
- KOMOROWSKI, R. ; GRAD, H. ; WU, X.Y. Antimicrobial substantivity of chlorhexidine–treated bovine root dentin. **J Endod**, v. 26, n. 6, p. 315–317, June 2000.

- KOSKINEN, K. P. ; MEURMAN, J. H. ; STENVAL, H. Appearance of chemically treated root canal walls in the scanning electron microscope. **Scand J Dent Res**, v. 88, n. 5, p. 397-405, Oct. 1980.
- KURUVILLA, J. R. ; KAMATH, P. Antimicrobial activity of 2.5% sodium hypochlorite and 0.2% chlorhexidine gluconate separately and combined, endodontic irrigants. **J Endod**, v. 24, n. 7, p. 472-476, July, 1998.
- LAMERS, A. C. ; VANMULLEN, P. J. ; SIMON, M. Tissue reactions to sodium hypochlorite and iodine potassium iodine under clinical conditions in monkey teeth. **J Endod**, v. 6, n. 10, p. 788 - 792, Oct. 1980.
- LANA, M.A. **Avaliação microbiológica de canais radiculares com necrose pulpar em três etapas do tratamento endodôntico**. Belo Horizonte, 1999. (Dissertação de Mestrado do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais) 142 p.
- LAWRENCE, C.A. Antimicrobial activity *in vitro* of chlorhexidine. **J Amer Pharmaceut Ass**, v. 49, n. 11, p. 731-374, 1960.
- LEONARDO, M. R. ; FILHO, M. T. ; SILVA, L. A. B. ; FILHO, N. In vivo antimicrobial activity of 2% chlorhexidine used as root canal irrigating solution. **J Endod**, v. 25, n. 3, p.167-171, Mar. 1999.
- LINDHE, G. Antissépticos e antibióticos em periodontia. In: LINDHE, J. **Tratado de periodontologia clínica**. Rio de Janeiro:Guanabara Koogan, 1995. p. 270
- MARQUES, A.M.C. **Estudo comparativo da atividade antimicrobiana de soluções irrigadoras à base de clorexidina em diferentes concentrações sobre microorganismos freqüentemente encontrados no canal radicular. Estudo *in vitro***. Salvador, 1997. 101 p. (Dissertação de Mestrado) - Faculdade de Odontologia, Universidade Federal da Bahia.
- MACHTOU, P.P.L Irrigation en endodontie. **Actual Odonto Stomatol.**, v. 34, n. 131, p. 387-394, Sept. 1980.
- MARTIN, H.; SPRING, S. Quantitative bactericidal effectiveness of na old and new endodontic irrigant. **J Endod**, v. 1, n. 5, p. 164-167, May. 1975.
- MORGAN, R.W. ; CANES, D. L. ; MONTGOMERY, S. The solvent effects of calcium hydroxide irrigating solution on bovine pulp tissue. **J Endod**, v. 17, n. 4, p. 165-168, Apr. 1991.

- MOORER, W. R. ; WESSELINK, P. R. Factors promoting the tissue dissolving capability of sodium hypochlorite. **Int Endod J**, v. 15, n. 4, p. 187-196, Oct. 1982. 1982.
- NAGEM FILHO, H.; VIEIRA PINTO, L. Compatibilidade biológica do tergentol e do texapon k 12. **Rev. Ass. Paul. Cir. Dent.**, v. 32, n. 1, p. 27-30, 1978.
- NAKAMURA, H.; ASAI, K.; FUJITA, H.; NAKAZATO, et al. The solvent action of sodium hypochlorite on bovine tendon collagen, bovine pulp and bovine gingiva. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**, v. 60, n. 3, p. 322-326, Sept. 1985.
- NAIR, P.N.R. Apical periodontitis: a dynamic encounter between root canal infection and host response. **Periodontology 2000**, v. 13, p. 29-39, 1997.
- NETUSCHIL, L.; REICH, E.; BRECX, M. Direct measurement of the bactericidal effect of chlorhexidine on dental plaque. **J Clin Periodontol**, v. 16, p. 484- 488, 1998.
- NERY, M. J. ; HOLLAND, R.; SOUZA, V. Eficiência de diferentes técnicas de irrigação e soluções irrigadoras na remoção de detritos do interior dos canais radiculares. **Ass.Paul. Cir.Dent.**, v. 3, n. 1, p. 21-27, 1982.
- NIKOLAUS, B. E. ; WAYMAN, B. E.; ENCINAS, E. The bactericidal effect of citric acid and sodium hypochlorite on anaerobic bacteria. **J Endod**, v. 14, n.1, p. 31-34, Jan. 1988.
- NISENGARD, R .J.; NEWMAN, M. G. **Microbiologia oral e imunologia**. 2 ed. Rio de Janeiro:Guanabara Koogan, 1994.
- OHARA, P. K.; TORABINEJAD, M.; KETTERING, J. D. Antibacterial effects of various endodontic irrigants on selected bacteria. **Endod Dent Traumatol**, v. 9, n. 3, p. 95-100, June, 1993.
- ORSTAVIK, D. ; HAAPASALO, M. Disinfection by endodontic irrigants and dressing of experimentally infected dentinal tubules. **Endod Dent Traumatol**, v. 6, n. 4, p. 142-149, Aug. 1990.
- ORSTAVIK, D. Antibacterial properties of endodontic materials. **Int Endod J** v. 2, n. 21, p. 161-169, 1988.
- PAIVA, J. G. ; GUTZ, I. ; SAMPAIO, J. M. P. et al. Determinação do teor de cloro livre nas soluções de hipoclorito de sódio. **Rev. Bras. Odontol.**, v. 56, n. 1, p. 10-16, jan./fev., 1989.

- PADER, M. Cosmetic science and technology series. Products components: therapeutic agents. **New York Marcell Dekker Incorporation**, v. 6, n. 10, p. 313-81, 1988.
- PASHLEY, E. L. ; BIRDSONG, N. L. ; BOWMAN, K. et al. Cytotoxic effects of NaOCl on vital tissue. **J Endod**, v. 1, n. 12, p. 525- 528, Dec. 1985.
- PÉCORA, J. D. ; BARBIN, E. L. ; SPANÓ, J. C. et al.. In Vitro analysis of gas released using different concentrations of sodium hypochlorite with 3% hydrogen peroxide. **Braz Endod J**, v. 2, n. 1, p. 16-18, 1997a.
- PÉCORA, J. D. ; GUERISOLI, D. M. Z. ; SILVA, R.G. Shelf-life of 5% sodium hypochlorite solutions. **Braz Endod J**, v. 2, n. 1, p. 43-45, 1997b.
- PÉCORA, J.D. ; SOUZA NETO, M. D.; ESTRELA, C. Soluções auxiliares do preparo do canal radicular. In: ESTRELA, C. ; FIGUEIREDO, J. A. P. **Endodontia: princípios biológicos e mecânicos**. São Paulo:Artes Médicas, 1999. Cap. 16 : p. 553-569.
- PÉCORA, J.D.; SOUZA NETO, M.D.; SAQUY, P.C. et al. Effect of Dakin's and EDTA solutions on dentin permeability of root canals. **Braz Dent J**, v. 4, n. 2, p.79-84, 1993.
- PÉCORA, J. D.; SOUZA-NETO, M.D.; GUERISOLI, D.M.Z. et al. Effect of reduction of the surface tension of different concentrations of sodium hypochlorite solutions on radicular dentine permeability. **Braz. Endod. J.**, v. 3, n. 2, p. 38 - 40, 1998.
- PUPO, J. ; BIRAL, R. R. ; ALMEIDA, O. P. Atividade antimicrobiana de soluções para irrigação de canais radiculares. **Rev. Gaúcha Odontol.**, v. 42, n. 1, p. 17-19, 1994.
- RANTA, K. ; HAAPASALO, M.; RENTA, H. Monoinfection of root canal with *Pseudomonas aeruginosa*. **Endod Dent Traumatol**, v. 4, n. 4, p. 269-272, Set. 1988.
- RAPHAEL, D.; WONG, T. A.; MOODNIK, R. et al. The effect of temperature on the bactericidal efficiency of sodium hypochlorite. **J Endod**, v. 7, n. 7, p. 330- 334, July, 1981.
- RINGEL, A. M.; PATTERSON, S. S. ; NEWTON, C.W. In vivo evaluation of chlorhexidine gluconate solution and sodium hypochlorite solution as root canal irrigants. **J Endod**, v. 8, n. 5, p. 200-204, May, 1982.
- ROLLA, G. ; MELSEN, B. On the mechanism of the plaque inhibition by chlorhexedine. **J Dent Res**, v. 54, p. 57-62, 1975.

- ROSENFELD, E. F. ; JAMES, G. A. ; BURCH, B. S. Vital pulp tissue response to sodium hypochlorite. **J Endod**, v. 4, n. 5, p. 140- 46, May, 1978.
- SAFAVI, K.E.L. ; DOWDEN, W.E. ; INTROCASO, J. H. et al. A comparison of antimicrobial effects of calcium hydroxide and iodine-potassium iodine. **J Endod**, v. 11, n. 10, p. 454-456, Oct. 1985.
- SAFAVI, K.E. ; SPANGBERG, L. S. W. ; LANGELAND, K. Root canal dentinal tubule disinfection. **J Endod**, v. 16, n. 5, p. 207 - 210, May, 1990.
- SANTA-CECÍLIA, M. **Avaliação de algumas propriedades físico-químicas e biológicas de um solução clorada experimental, para a irrigação de canais radiculares.** Bauru, 1999. 164 p. (Tese de Doutorado) - Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo
- SANTOS, T.C. **Estudo *in vitro* do aumento da temperatura das soluções de hipoclorito de sódio sobre duas propriedades físico-químicas anteriores e posteriores à dissolução do tecido pulpar bovino.** Ribeirão Preto, 1999. 108 p. (Dissertação de Mestrado) - Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo
- SELTZER, S. ; FARBER, P. A. Microbiologic factors in endodontology. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**, v. 78, n. 4, p. 634-645, Nov. 1994.
- SEN, B. H.; SAFAVI, K. E. ; SPANGBERG, L. S. W. Antifungal effects of sodium hypochlorite and chlorhexidine in root canals. **J Endod**, v. 25, n. 4, p. 235-238, Apr. 1999.
- SENIA, E. S.; MARSHALL, F. J.; ROSEN, S. The solvent action of sodium hypochlorite on pulp tissue of extracted teeth. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**, v. 31, n. 1, p. 96 - 103, Jan. 1971.
- SHIH, M.; MARSHALL, F. J.; ROSEN, S. The bactericidal efficiency of sodium hypochlorite as an endodontic irrigant. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**, v. 29, n. 4, p. 613-619, Apr. 1970.
- SHOVELTON, D.S. The presence and distribution of microorganisms within Non-vital Teeth. **British Dent J**, v. 117, p.101-107, 1964.
- SILVA, C.H.F.P.; LIMA, K.C.; SIQUEIRA Jr., J.F. et al. Dentinal tubule disinfection by chlorhexidine solutions: na in vitro study. **Braz Endod J**, v. 2, n. 1, p. 55 - 57, 1997.

- SIQUEIRA JUNIOR, J. F. ; BATISTA, M. D. M. ; FRAGA, R.C. et al. Antibacterial effects of endodontic irrigants on black-pigmented Gram-negative anaerobes and facultative bacteria. **J Endod**, v. 23, n. 6, June, 1998.
- SLOTS, J. ; TAUBMAN, M. A. **Contemporary oral microbiology and immunology**. Philadelphia: Mosby, 1992. 649 p.
- SOUZA, M. M. ; SOUZA, M. C. M. G. ; SAQUY, P. C. et al. Ação antimicrobiana do hipoclorito de sódio em diferentes concentrações e tempos de contato. **Odonto**, v. 2, n. 4, p. 302-306, 1992.
- SPANÓ, J.C.E. **Estudo *in vitro* das propriedades físico-químicas das soluções de hipoclorito de sódio em diferentes concentrações antes e após a dissolução de tecido pulpar bovino**. Ribeirão Preto, 1999. 93 p. (Dissertação de Mestrado) - Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.
- SUNDQVIST, G. **Bacteriological studies of necrotic dental pulps**. Umea, 1976. 94p. (Dissertation Master) - University of Umeo, Sweden.
- SUNDQVIST, G. Ecology of the root canals flora. **J Endod**, v. 18, n. 9, p. 427-430, Sept. 1992.
- SUNDQVIST, G. Taxonomy, ecology, and pathogenicity of the root canal flora. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**, v. 78, n. 4, p. 522-530, Oct. 1994.
- SYDNEY, G. B. ; ESTRELA, C. Influence of root canal preparation on anaerobic bacteria in teeth with asymptomatic apical periodontitis. **Braz Endod J**, v. 1, n. 1, p. 7-10, 1996.
- THÉ, S. D. The solvent actions of sodium hypochlorite on fixed and unfixed necrotic tissue. **Oral Surg. Oral Med Oral Pathol.**, v. 47, n. 6, p. 558-561, 1979.
- THÉ, S. D. ; MALTHA, J.C. ; PLASCHART, A. J. M. Reactions of guinea pig subcutaneous connective tissue following exposure to sodium hypochlorite. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**, v. 49, n. 5, p. 460-466, 1980.
- TOBIAS, R.S. Antibacterial properties of dental restorative materials: a review: **Int Endod J** v. 2, n. 21, p. 155-160, 1988.
- TREPAGNIER, C. M. MADEN, R. M.; LAZZARI, E. P. Quantitative study of sodium hypochlorite as on *in vitro* endodontic irrigant. **J Endod**, v. 3, n. 5, p. 194 -196, May, 1977.

- TURKUN, M.; GENGIZ, T. The effects of sodium hypochlorite and calcium hydroxide on tissue dissolution and root canal cleanliness. **Int Endod J**, v. 30, p. 335-342, 1997.
- VAHDATY, A.; PITT FORD, T.R.; WILSON, R.F. Efficacy of chlorhexidine in disinfecting dentinal tubules *in vitro*. **Endod Dental Traumatol**, v. 9, n. 4, p. 243 -248, Sept. 1993.
- VINHOLIS, A. H C. ; GONÇALVES, P. C. ; MARCANTONIO, R.A.G. et al. Mecanismo de ação da clorexidina. **Rev Periodontol**, p. 281-283, jan./jun. 1996.
- WADACHI, R. ; ARAKI, K. ; SUDA, H. Effect of calcium hydroxide on the dissolution of soft tissue on the root canal wall. **J Endod**, v. 24, n. 5, p. 326- 330, May, 1998.
- WALKER, A. A definiter and dependable therapy for pulpless teeth. **J Am Dent Ass**, v. 23, n. 2, p. 1418-1425, 1936.
- WALKER, C. Antimicrobial Agents and Chemoterapy I. In: SLOTS, J.; TAUBMAN, M.A. **Oral microbiology and immunology**. St. Louis: Mosby Year Book, 1992. Cap. 15 : p. 5242-5264
- WEBB, B.C.; WILLCOX, M.D.P.; THOMAS, C.J. et al. The effect of sodium hypochlorite on potential patogenic traits of *Candida albicans* and other *Candida* species. **Oral Microbiol Immunol**, v. 10, p. 334 - 341, 1995.
- WEISS, E. I. ; SHALHAV, M. ; FUSS, Z. Assesment of antibacterial activity of endodontic sealers by a direct contact test. **Endod Dent Traumatol**, v.12, n. 4, p. 179 -184, 1996.
- WHITE, R.R.; HAYS, G.L.; JANER, L.R. Residual antimicrobial activity after canal irrigation with chlorhexidine. **J Endod**, v. 23, n. 4, p. 229-231, Apr. 1997.
- WINKLER, K.C. Bacteriologic results from 4000 root canal cultures. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**, v. 12, n. 7, p. 857-875, July, 1959.
- YANG, S. F.; RIVERA, E. M. ; BAUGARDNER, K. R.; WALTON, R. E. Anaerobic tissue-dissolving abilities of calcium hidroxide and sodium hypochlorite. **J Endod**, v. 21, n. 12, p. 613-616, Dec. 1995.
- YANG, S. F. ; RIVERA, E. M. ; WALTON, R. E. et al. Canal debridement: Effectiveness of sodium hypochlorite and calcium hidroxide as medicaments. **J Endod**, v. 22, n. 10, p. 521-525, Oct. 1996.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

YESILSOY CWHITAKER, E. ; CLEVELAND, D.; PHILLIPS, E.et al. Antimicrobial and toxic effects of established and potencial root canal irrigants. **J Endod**, v. 21, n. 10, p. 513-515, Oct. 1995.

ZERLOTTI, E. **Contribuição à terapêutica dos condutos radiculares**. Campinas, 1959. 87 p. (Tese de Doutorado) - Faculdade de Odontologia de Campinas, São Paulo.

APÊNDICE

APÊNDICE

Apêndice 1 - Composição do Letheen Broth

Letheen Broth	
<i>Bacto peptamin</i>	10g
<i>Bacto beef extract</i>	5g
<i>Lecithin</i>	0,7g
<i>Tween 80</i>	5g
<i>Sodium chloride</i>	5g

Apêndice 2 - Composição do Brain Heart Infusion

Brain Heart Infusion	
<i>Calf brains, infusion from</i>	200 g
<i>Beef heart, infusion from</i>	250 g
<i>Bacto proteose peptone</i>	10 g
<i>Bacto dextrose</i>	2 g
<i>Disodium phosphate</i>	2,5 g
<i>Sodium chloride</i>	5 g

Apêndice 3 - Distribuição das pontas de papel em função das pastas e do tempo

<i>Microorganismos</i>	<i>Soluções</i>	<i>Tempo</i>	<i>5 min</i>	<i>10 min</i>	<i>15 min</i>	<i>20 min</i>	<i>30 min</i>
<i>Staphylococcus aureus</i>	1	2	2	2	2	2	2
	2	2	2	2	2	2	2
	3	2	2	2	2	2	2
	4	2	2	2	2	2	2
	5	2	2	2	2	2	2
	6	2	2	2	2	2	2
	7	2	2	2	2	2	2
<i>Enterococcus faecalis</i>	1	2	2	2	2	2	2
	2	2	2	2	2	2	2
	3	2	2	2	2	2	2
	4	2	2	2	2	2	2
	5	2	2	2	2	2	2
	6	2	2	2	2	2	2
	7	2	2	2	2	2	2
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1	2	2	2	2	2	2
	2	2	2	2	2	2	2
	3	2	2	2	2	2	2
	4	2	2	2	2	2	2
	5	2	2	2	2	2	2
	6	2	2	2	2	2	2
	7	2	2	2	2	2	2
<i>Bacillus subtilis</i>	1	2	2	2	2	2	2
	2	2	2	2	2	2	2
	3	2	2	2	2	2	2
	4	2	2	2	2	2	2
	5	2	2	2	2	2	2
	6	2	2	2	2	2	2
	7	2	2	2	2	2	2
<i>Candida albicans</i>	1	2	2	2	2	2	2
	2	2	2	2	2	2	2
	3	2	2	2	2	2	2
	4	2	2	2	2	2	2
	5	2	2	2	2	2	2
	6	2	2	2	2	2	2
	7	2	2	2	2	2	2
<i>Mistura</i>	1	2	2	2	2	2	2
	2	2	2	2	2	2	2
	3	2	2	2	2	2	2
	4	2	2	2	2	2	2
	5	2	2	2	2	2	2
	6	2	2	2	2	2	2
	7	2	2	2	2	2	2