

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

DISSERTAÇÃO

Avaliação da ação antimicrobiana do Hipoclorito de Sódio e Hipoclorito de
Cálcio por meio de diferentes modelos experimentais

KAREN BAREA DE PULA

PORTO ALEGRE
2015

KAREN BAREA DE PAULA

Avaliação da ação antimicrobiana do Hipoclorito de Sódio e Hipoclorito de Cálcio por meio de diferentes modelos experimentais

Evaluation of the antimicrobial activity of sodium hypochlorite and calcium hypochlorite by means of different experimental models

Linha de Pesquisa

Biomateriais e Técnicas Terapêuticas em Odontologia

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Odontologia, Área de Concentração em Clínica Odontológica, Endodontia.

Orientador: Prof. Dr. Francisco Montagner

PORTO ALEGRE
2015

CIP - Catalogação na Publicação

Barea de Paula, Karen

Avaliação da ação antimicrobiana do Hipoclorito de Sódio e Hipoclorito de Cálcio por meio de diferentes modelos experimentais / Karen Barea de Paula. -- 2015.

61 f.

Orientador: Francisco Montagner.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Odontologia, Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Porto Alegre, BR-RS, 2015.

1. Hipoclorito de Cálcio. 2. Hipoclorito de Sódio . 3. Enterococcus faecalis. 4. Endodontia. I. Montagner, Francisco, orient. II. Título.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado

Avaliação da ação antimicrobiana do hipoclorito de sódio e hipoclorito de cálcio
por meio de diferentes modelos experimentais.

elaborada por
Karen Barea de Paula

como requisito parcial para obtenção do título de
Mestre em Clínica Odontológica com Ênfase em Endodontia

COMISSÃO EXAMINADORA:

Francisco Montagner, Dr. (UFRGS)
(presidente/orientador)

Flaviana Bombarda de Andrade, Dr^a. (FOB-USP)

Márcia da Silva Schimitz, Dr^a. (UFSM)

Régis Burmeister dos Santos, Dr. (UFRGS)

Porto Alegre, 10 de agosto de 2015.

Dedicatória

Dedico este trabalho ao meu pai Agenor Teixeira de Paula.

Agradecimentos

Agradeço a Deus por tudo! Por permitir que eu chegasse até este momento! Por todas as bênçãos em minha vida! Pelo propósito que Ele tem para a minha vida!

Agradeço aos meus amados pais Agenor Teixeira de Paula e Maria Saete Barea por tudo o que fui, o que sou e o que serei! Por terem me dado a melhor das ferramentas para conquistar os meus sonhos: a Educação! Por meio dela posso ir mais longe como pessoa, tanto por mim quanto por vocês.

Agradeço a minha irmã Raquel Silva de Paula Lopes, por todo apoio, incentivo e torcida. Não estaria completando mais uma etapa em minha vida, se não fosse pela insistência dela em fazer Odontologia e dar sequência na pós-graduação. Agradeço, também aos meus sobrinhos Carlos Eduardo Lopes e João Gabriel Lopes, por estar sempre torcendo por mim!

Agradeço ao amor da minha vida Antônio Rócir Gonçalves Duarte Junior! Pelo apoio incondicional nesta etapa. Por viver este momento comigo, do início ao fim! E por me escolher para estar ao seu lado pelo resto das nossas vidas!

Agradeço a minha avó Alzira Barea, pelo amor, carinho e orações!

Agradeço a todos os meus familiares e amigos, mesmo longe estiveram torcendo por mim!

Agradeço pelos amigos que a odontologia me deu: Leonardo S. da Silveira, Roberta Oliveira, Rosilaine Schena e Lisângela da Silva.

Aos meus amigos que entenderam a minha ausência nestes dois anos: Greice Souza, Melina Spinosa, Kelli Sensolo, Gabriela Sensolo e Selmira Marcolin!

Aos meus irmãos em Jesus: Daniel de Almeida, Michelly de Alemida, Ana Jordão, João Vitor Garcia, Ivana Wierenicz, Thais Catilho, Everton Vieira e Moa Nascimento. E aos meus queridos pastores Olavo Nunes e Antonella Bongarra. Por todos os nossos encontros de quinta feira, em que fortalecemos a nossa fé! Muito obrigada!

Agradeço aos colegas que viraram amigos durante o mestrado: Gabriela Rezende, Ariane Camargo e José Carlos Pereira.

Aos meus queridos colegas e companheiros de mestrado em Endodontia: Angela Longo, Gabriela Blattes, Israel Carlotto, Flávia Baldasso e Natália Leonardo. Por esses dois anos de convivência

harmoniosa e sincera. Dividimos alegrias e tristezas. Ficarão para sempre marcados em meu coração como grandes amigos com quem eu vive uma das melhores etapas da minha vida!

*Aos colegas de “Labendo”: **Ludmila Moraes, Pauline Lang, Letícia Mestieri, Ivana Zaccara**, em que compartilhamos alegrias, conversas e rodas de chimarrão! Sentirei saudade de vocês!*

*A minha futura madrinha de casamento **Manuela Santini**, que firmamos laços invisíveis dos quais quero perpetuar por toda a minha vida. Tenho uma grande admiração por ti!*

*Ao meu iniciação científica e “sombra” **Daniel Marconi**, por toda ajuda em sábados, domingos e feriados no calor de 30°. Muito obrigada pela tua ajuda e colaboração!*

*À aluna **Caroline Ló Guarineri** e ao aluno **Luiz Fernando Cavallini**, pela ajuda e colaboração na parte experimental deste trabalho!*

*Aos colegas **Alexander Jardine e Ramiro Quintana** que auxiliaram na execução da parte experimental deste trabalho. Muito obrigada pela ajuda e dedicação!*

*A técnica do LABIM, **Luisa Mercado** por toda ajuda, paciência e compreensão para me auxiliar em toda a etapa experimental deste trabalho.*

*A equipe de professores de Endodontia: **Renata Grazziotin, Fabiana Grecca, Patricia Kopper, Marcos Vinícius Reis Só e Simone Luisi**, por esses anos de convivência e aprendizado.*

*Aos professores **Régis Burmeister dos Santos e João Ferlini Filho**, por serem grandes referências em Endodontia no Brasil. Pela experiência que compartilham conosco. Por serem referências como professores e seres humanos. A Endodontia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul não será mais a mesma quando vocês não estiverem mais ali.*

*A secretária de especialização **Andréia Dill**, por ser além de uma excelente funcionária uma amiga que eu pude conquistar durante esse período a qui dentro.*

*A professora **Maria Beatriz Cardoso Ferreira**, por ser quem é. Por permitir que eu possa ser além de aluna uma amiga, na qual posso dividir meus maiores anseios e dúvidas. És uma mãe dentro da Odontologia para mim! Tenho uma grande admiração e carinho. Sentirei muita falta das nossas conversas nas terças de manhã.*

*Ao meu querido orientador, professor **Francisco Montagner**. Pela confiança para que eu pudesse realizar este lindo trabalho. Muito obrigada pela amizade, companheirismo e carinho. Foi muito bom trabalhar ao lado de uma pessoa tão competente e com um grande coração. Muito obrigada por tudo!*

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pelo incentivo financeiro.

A Faculdade de Odontologia da UFRGS por ser o local onde me formei como cirurgiã-dentista e por ser meu segundo lar.

*Confie no Senhor de todo o coração e não se apoie na sua própria inteligência.
Lembre-se de Deus em tudo o que fizer, e ele lhe mostrará o caminho certo.*

Provérbios 3 (5,6), Bíblia Sagrada

RESUMO

DE PAULA, K.B. **Avaliação da ação antimicrobiana do Hipoclorito de Sódio e Hipoclorito de Cálcio por meio de diferentes modelos experimentais.** 2015. 60f. Dissertação/mestrado - Faculdade de Odontologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2015.

A ação química, obtida pelo emprego de substâncias auxiliares de instrumentação, aliada à ação mecânica, promove a limpeza do sistema de canais radiculares. Determinadas propriedades das substâncias químicas, como a ação antimicrobiana, têm contribuído para a eliminação de microrganismos encontrados em dentes com necrose pulpar e infecção. O objetivo do estudo foi avaliar a ação antimicrobiana do hipoclorito de cálcio $[Ca(OCl)_2]$ em diferentes concentrações (0,5%, 1%, 2,5% e 5%) frente ao *Enterococcus faecalis* e compará-la com a ação do hipoclorito de sódio (NaOCl) pelos métodos de Difusão em Ágar e de Contato em Meio Líquido. A ampicilina 10 µg e água destilada foram utilizadas como controle positivo e negativo, respectivamente, no método de difusão em Ágar. No contato em meio líquido o microrganismo entrou em contato com a substância teste em períodos pré-determinados (15 segundos, 30 segundos, 1 minuto, 5 minutos e 10 minutos). O efeito da presença de dentina humana, albumina sérica bovina e endotoxina de *Escherichia coli* O55:B5 sobre as propriedades antimicrobianas das soluções foi avaliado. Os componentes teciduais e microbianos permaneceram em contato com a solução por 2 minutos, 30 minutos ou 6 horas. Os halos de inibição do crescimento microbiano verificados no Ágar foram mensurados. A presença ou ausência de turvação no meio líquido, indicando crescimento microbiano, foi determinada para cada tempo experimental, no método de contato em meio líquido. O número de unidades formadoras de colônia (UFC) por mililitro foi quantificado, após a exposição do microrganismo às substâncias químicas auxiliares, na presença dos componentes teciduais. Os resultados foram tabulados e realizou-se análise estatística. Observou-se que os maiores halos de inibição foram produzidos pelo $Ca(OCl)_2$ 5% (17,38 mm \pm 3,71), sendo inferior ao produzido pela ampicilina (30,35 mm \pm 1,64). Soluções de NaOCl e $Ca(OCl)_2$, na mesma concentração, não apresentaram diferenças significativas entre si. Os diâmetros dos halos de inibição produzidos por NaOCl ou $Ca(OCl)_2$ foram proporcionais ao aumento da concentração. O tempo de inibição para o crescimento do *E. faecalis*, em meio líquido, é menor em concentrações mais elevadas de $Ca(OCl)_2$ e NaOCl. As soluções de NaOCl 2,5%, NaOCl 5% e $Ca(OCl)_2$ 2,5% e $Ca(OCl)_2$ 5.0% foram iguais entre si. A dentina e a endotoxina de *E. coli* não interferiram na ação antimicrobiana das soluções de hipoclorito testadas. A soluções de NaOCl 0,5%, 1% e 2,5% e de $Ca(OCl)_2$ 0,5% quando expostas à albumina, por 2 minutos, apresentaram seu efeito antimicrobiano reduzido. Concluiu-se que soluções de hipoclorito de cálcio apresentaram ação antimicrobiana frente ao *E. faecalis*, em concentrações similares às do hipoclorito de sódio empregadas em Endodontia. O efeito antimicrobiano demonstrado pelas soluções é proporcional a sua concentração, podendo ser modulado pela albumina, em curtos períodos de exposição.

PALAVRAS-CHAVE: Hipoclorito de cálcio, Hipoclorito de sódio, Irrigantes do canal radicular, Bactéria, Endodontia.

ABSTRACT

DE PAULA, K.B. **Antimicrobial properties of calcium hypochlorite through several experimental *in vitro* approaches.** 2015. 60p. Master Thesis - Faculdade de Odontologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2015.

The chemical action produced by the auxiliary substances can promote the cleaning of the root canal system. Certain properties of chemical substances, such as their antimicrobial activity, have contributed to the elimination of microorganisms in infected pulp tissues. The aim of this study was to evaluate, *in vitro*, the antimicrobial activity of calcium hypochlorite [Ca(OCl)₂] in different concentrations (0.5%, 1%, 2.5% and 5%) over *Enterococcus faecalis* and compare it to sodium hypochlorite (NaOCl) through the *ágar* diffusion method and the broth dilution method. Ampicillin 10 µg and distilled water were used as positive and negative control, respectively in the *ágar* diffusion method. In the broth dilution method, *E. faecalis* cells were exposed to the auxiliary chemical substances for (15 sec, 30 sec, 1 min, 5 min or 10 min). The effect of human dentin powder, 18% bovine serum albumin and *Escherichia coli* O55:B5 endotoxin over the antimicrobial properties of the solutions was evaluated, after 2 minutes, 30 minutes or 6 hours. The inhibition zones were measured. The presence of broth turbidity was recorded, for each time period, after 24 hours, in the Broth dilution method. The colony forming units (CFU) per milliliter were counted after the exposure of the *E. faecalis* to the tested tissue or bacterial components. Statistical analysis was carried out. The Ca(OCl)₂ 5% had the largest inhibition zones (17.38 mm ±3.71), however they were shorter than ampicillin zones (30.35 mm ±1.64). There was no statistical difference between NaOCl and Ca(OCl)₂ solutions with the same concentration. It was observed that the highest the NaOCl or Ca(OCl)₂ concentration, the largest the inhibition zone. In the broth dilution method, the time required for *E. faecalis* growth inhibition was shorter in highly concentrated solutions than in low concentrated solutions. There was no statistical difference among 2.5% NaOCl, 5% NaOCl, 2.5% Ca(OCl)₂ and 5% Ca(OCl)₂. The human dentin powder and *E. coli* endotoxin were not able to modulate the antimicrobial effect of the tested irrigants. In a 2 minute-period, the antimicrobial effect of 0.5% NaOCl, 1% NaOCl, 2.5% NaOCl and 0.5% Ca(OCl)₂ was inhibited by bovine serum albumin. It was possible to conclude that calcium hypochlorite solutions were able to inhibit *E. faecalis* growth, *in vitro*, when diluted to concentrations that were usually employed in Endodontics. The antimicrobial effect of the solutions was proportional to their concentration and can be modulated by bovine serum albumin, in short periods of exposition.

KEY-WORDS: Calcium hypochlorite, Sodium hypochlorite, Root Canal Irrigants, Bacterial, Endodontics.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Colocação do papel filtro com a substância teste sobre MHA, previamente contaminado com <i>E. faecalis</i>	34
Figura 2	Placa com seis poços contendo BHI caldo.....	37
Figura 3	Zonas de inibição do <i>E. faecalis</i> nos grupos controles e experimentais.....	41
Figura 4	Controle dos inibidores no crescimento do <i>E. faecalis</i> em diferentes intervalos de tempo.....	44
Figura 5	Mediana, percentis 25 e 75 para o número de UFC/ml para as substâncias testes e controle em contato com a albumina por 2 minutos.....	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Propriedades físicas do Hipoclorito de Sódio e Hipoclorito de Cálcio.....	24
Tabela 2	Presença do crescimento de <i>E. faecalis</i> quando em contato com NaOCl ou Ca(OCl) ₂ , em diferentes tempos de exposição.....	42
Tabela 3	Comparação estatística (valores de <i>P</i>) entre as substâncias considerando os períodos de inibição do crescimento.....	43

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

Ca(OCl) ₂	Hipoclorito de Cálcio
LPS	Lipopolissacarídeos
NaOCl	Hipoclorito de Sódio
H ₂ O	Água
NaOH	Hidróxido de Sódio
HOCl	Ácido Hipocloroso
Na ⁺	Íon sódio
OH ⁻	Íons Hidroxila
H ⁺	Íon Hidrogênio
OCl	Hipoclorito
SH	Sulfidrina
H ₂ O ₂	Água Oxigenada
CHX	Clorexidina
CLSM	Microscopia Confocal a Laser
ATSDR	<i>Agency for Toxic Substances and Disease Registry</i>
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
BSA	Albumina Sérica Bovina
LABIM	Laboratório de Bioquímica e Microbiologia Oral
BHI caldo	Caldo de Infusão cérebro e coração
MHA	Mueller Hinton Ágar

ATCC *American Type Culture Collection*

EUCAST *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*

μl *Microlitros*

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	15
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	18
2.1	SUBSTÂNCIA QUÍMICA AUXILIAR.....	18
2.1.1	Hipoclorito de Sódio.....	18
2.1.2	Hipoclorito de Cálcio.....	23
2.2	EFEITO DOS COMPONENTES TECIDUAIS E DA CÉLULA MICROBIANA NAS PROPRIEDADES DAS SUBSTÂNCIAS QUÍMICAS AUXILIARES.....	26
3	OBJETIVOS.....	29
4	METODOLOGIA.....	30
4.1	Preparo das Soluções.....	30
4.2	Método de Difusão em Ágar.....	32
4.3	Método de Contato em Meio Líquido.....	35
4.4	Efeito de componentes teciduais e microbianos em soluções de hipoclorito de sódio e hipoclorito de cálcio.....	38
5	RESULTADOS.....	41
6	DISCUSSÃO.....	46
7	CONCLUSÃO.....	53
	REFERÊNCIAS.....	54

1 1 INTRODUÇÃO

2

3 Microorganismos e seus produtos são considerados os principais
4 agentes etiológicos das lesões pulpares e periapicais
5 (KAKEHASHI; STANLEY; FITZGERAL, 1965; BYSTROM, *et al.*, 1987). A
6 instrumentação mecânica e substâncias químicas auxiliares são utilizadas para
7 eliminar, tanto quanto possível, os microrganismos encontrados nos sistemas
8 de canais radiculares (SIQUEIRA, *et al.*, 2007).

9 A limpeza do canal radicular é lograda pela somatória de diferentes
10 eventos: ação mecânica de instrumentos endodônticos, ação das substâncias
11 químicas auxiliares sobre os componentes (tecidos orgânicos, inorgânicos e
12 microrganismos) presentes no interior do sistema de canais radiculares e
13 completada pela irrigação-aspiração e medicação intracanal, quando utilizada.
14 As substâncias químicas auxiliares podem ser empregadas no preparo dos
15 canais radiculares como auxiliares da instrumentação e como soluções
16 irrigadoras. Destacam-se dentre as propriedades das substâncias químicas
17 auxiliares alguns fatores que se mostram expressivos, como o efeito
18 antimicrobiano, a biocompatibilidade e a capacidade de dissolução tecidual.
19 Fatores que interferem nestas propriedades estão relacionados a concentração
20 da solução, a temperatura em que a substância se encontra, o volume
21 empregado e o tempo de permanência no canal para expressar o efeito
22 desejado (ESTRELA C, 2000; LOPES & SIQUEIRA, 2010). Frente aos
23 aspectos analisados, verifica-se a importância de se estudar o efeito
24 antimicrobiano das substâncias irrigadoras de canais radiculares.

25

26 O *E. faecalis* é um coco Gram-positivo, anaeróbio facultativo. Está
27 associado a várias infecções no corpo humano, como: infecção no sistema
28 urinário, na vesicular biliar, endocárdio e feridas por queimaduras (USHA;
29 KAIWAR; MEHTA, 2010). Está presente em infecções no sistema de canais
30 radiculares, e também tem sido encontrado em patologias periapicais crônicas
31 e casos de insucesso no tratamento endodôntico (SIQUEIRA, *et al.* 1997;

1 MOLANDER, *et al.* 1998; SIQUEIRA, *et al.* 1998; HAAPASALO, *et al.*, 2000;
2 DAHLÉN *et al.*, 2000).

3 A ação antimicrobiana do hipoclorito de sódio foi extensivamente
4 descrita na literatura (SIQUEIRA, *et al.*, 1997; SIQUEIRA, *et al.*, 1998; GOMES,
5 *et al.*, 2001; ESTRELA, *et al.*, 2002; BERBER *et al.*, 2006; ZEHNDER M., 2006;
6 MOHAMMADI Z., 2008). A membrana citoplasmática das bactérias é
7 responsável pelo metabolismo, crescimento e divisão celular, sede de
8 importantes sistemas enzimáticos, envolvidos nos estágios de formação da
9 parede celular, biossíntese de lipídeos, transporte de elétrons e enzimas
10 envolvidas no processo de fosforilação oxidativa. Quando em meio aquoso, o
11 hipoclorito de sódio se dissocia em ácido hipocloroso e hidróxido de sódio. As
12 influências antimicrobianas do hidróxido de sódio são determinadas pelo seu
13 elevado pH. Ocorre alteração da integridade da membrana citoplasmática,
14 inibição enzimática irreversível, alterações biossintéticas e no metabolismo
15 celular, destruição de fosfolipídios observados na peroxidação lipídica
16 (ESTRELA, *et al.*, 1998; ESTRELA C., 2000) .

17 O hipoclorito de cálcio $[Ca(OCl)_2]$ é um composto halogenado,
18 disponível na forma de um pó branco, que se decompõe rapidamente em água
19 ou quando aquecido (AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE
20 REGISTRY, 2013). Inicialmente foi utilizado para esterilização industrial,
21 tratamento e purificação da água (WHITTAKER & MOHLER, 1911).
22 Recentemente, alguns estudos *in vitro* propuseram seu uso como substância
23 química auxiliar em Endodontia (de ALMEIDA, *et al.*, 2013; DUTTA &
24 SAUDERS, 2012). A sua forma de apresentação pode favorecer o preparo de
25 substâncias químicas auxiliares cloradas, permitindo a obtenção de soluções
26 com concentrações mais precisas, não influenciadas pela degradação inicial da
27 solução de estoque.

28 O efeito das substâncias químicas auxiliares no interior do canal
29 radicular pode ser modulado por componentes teciduais da dentina,
30 inorgânicos e orgânicos, como demonstrado por diversos estudos *in vitro*
31 (HAAPASALO, *et al.* 2000; PORTENIER, *et al.*, 2002; PORTENIER, *et al.*,
32 2006; HAAPASALO, *et al.*, 2007; PAPPEN, *et al.*, 2010; SHRESTHA; KISHEN,

1 2012; MORGENTAL, *et al.*, 2013) . A presença da albumina pode inibir ou
2 retardar a ação das soluções irrigadoras (PORTENIER, *et al.*, 2006; PAPPEN,
3 *et al.*, 2010; SHRESTHA; KISHEN, 2012). Efeitos similares foram observados
4 quando componentes das células microbianas, tais como os
5 lipopolissacarídeos, presentes nas bactérias Gram-negativas, entraram em
6 contato com os irrigantes (SHRESTHA; KISHEN, 2012).

7 Existem poucos estudos na literatura que avaliaram a capacidade
8 antimicrobiana do hipoclorito de cálcio frente ao *Enterococcus faecalis* e o
9 efeito de componentes teciduais e microbianos em suas propriedades. A partir
10 destas constatações, se observa a relevância da avaliação e análise destas
11 propriedades para que sejam fornecidas evidências que indiquem a utilização
12 deste composto como uma substância química auxiliar alternativa durante o
13 preparo do sistema de canais radiculares.

14

15

16

17

18

19

20

21

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Substâncias químicas auxiliares

As substâncias químicas auxiliares podem ser empregadas no preparo dos canais radiculares como auxiliares da instrumentação e como soluções irrigadoras. (LOPES & SIQUEIRA, 2010)

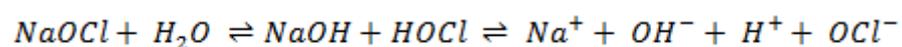
Zehnder (2006) propôs em sua revisão sobre substâncias químicas auxiliares que algumas propriedades são fundamentais, tais como:

- a) ter um amplo espectro antimicrobiano e alta eficácia frente a microrganismos anaeróbios estritos e facultativos, bem como microrganismos organizados em biofilme.
- b) dissolver polpa necrótica e seus remanescentes teciduais.
- c) inativação de endotoxinas.
- d) Prevenir a formação de *smear layer* durante a instrumentação ou dissolve-lá após formada.

2.1.1 Hipoclorito de Sódio

O uso de hipoclorito de sódio em todo o mundo como uma substância química auxiliar do canal radicular ocorre principalmente devido a sua eficácia para dissolução pulpar e atividade antimicrobiana (ESTRELA, *et al.*, 2002).

O mecanismo de ação do Hipoclorito de Sódio tem sido estudado por muitos autores. A reação química desta substância, quando em solução, é mostrada abaixo:



1
2 Em contato com a matéria orgânica, observa-se uma reação de
3 saponificação formando ácidos graxos (sabão) e glicerol (álcool), reduzindo a
4 tensão superficial da solução remanescente (LOPES E SIQUEIRA, 2010).

5 Na reação de neutralização, o hipoclorito de sódio neutraliza os
6 aminoácidos formando água e sal. Com a saída de íons hidroxila, há uma
7 redução de pH. O ácido hipocloroso, quando em contato com tecido orgânico
8 age como um solvente, liberando o cloro, que combinado com o grupamento
9 amina, forma cloraminas (reação de cloraminação). O ácido hipocloroso
10 (HOCl) e íons hipoclorito (OCl^-) levam a degradação dos aminoácidos e
11 hidrólise. A reação de cloraminação interfere no metabolismo celular. O cloro,
12 que é um oxidante forte, apresenta ação antimicrobiana pela inibição de
13 enzimas bacterianas essenciais, levando a uma oxidação irreversível de grupos
14 SH (Grupo sulfidril). O hipoclorito de sódio é uma base forte ($\text{pH} > 11$), seu
15 efeito antimicrobiano, baseado neste dado, é semelhante ação do hidróxido de
16 cálcio. O pH elevado do NaOCl interfere na integridade da membrana
17 citoplasmática com uma irreversível inibição enzimática, alterações
18 biossintéticas no metabolismo celular e a degradação na membrana de
19 fosfolipídios. A quantidade de cloro disponível é dependente do pH da solução.
20 Acima de um valor de pH de 7,6 a forma predominante é o hipoclorito, abaixo
21 deste valor é o ácido hipocloroso. Ambas as formas são oxidantes
22 extremamente reativos. As soluções de hipoclorito empregadas em endodontia
23 devem apresentar um pH próximo a 12. (ESTRELA, *et al.*, 2002; MOHAMMADI
24 Z., 2008).

25 Existe controvérsia sobre qual concentração das soluções de
26 hipoclorito de sódio deve ser empregada em Endodontia. A eficácia
27 antimicrobiana e capacidade de dissolução tecidual estão associadas à
28 concentração da substância química utilizada. Alguns autores recomendam o
29 uso da concentração entre 0,5% e 5,25% de hipoclorito de sódio (SIM *et al.*
30 2001). No entanto, irritações graves têm sido relatadas quando há o
31 extravazamento da substância para os tecidos apicais. Observa-se uma
32 alteração na estrutura dentinária, provavelmente devido à ação proteolítica do
33 hipoclorito mais concentrado sobre a matriz de colágeno, presente na dentina

1 (SIM, *et al.*, 2001; MOREIRA *et al.*, 2009). Em revisão de literatura, Zehnder
2 (2006) descreve que soluções de hipoclorito a 1% são efetivas na dissolução
3 tecidual da polpa em uma sessão de tratamento endodôntico, sugerindo que
4 não há nenhuma justificativa para o uso de hipoclorito de sódio em
5 concentrações superiores a 1%.

6 Brystrom & Sudqvist (1983) propuseram avaliar o efeito
7 antimicrobiano de solução de hipoclorito de sódio 0,5% em 15 dentes
8 permanentes monorradiculares com polpa necrosada. Quando foi utilizado
9 hipoclorito de sódio 0,5%, não houve crescimento bacteriano em doze dos
10 quinze canais radiculares estudados. Quando foi utilizada a solução salina,
11 não houve crescimento de microrganismos em oito dos quinze dentes. Estes
12 resultados sugerem que o emprego de solução de hipoclorito de sódio a 0,5%
13 potencializa a redução microbiana no sistema de canais radiculares.

14 Yesiloy *et al.* (1995) estabeleceram os efeitos antimicrobianos e
15 tóxicos das substâncias químicas auxiliares no preparo do canal radicular.
16 Foram testados NaOCl (0,5%, 2,5% e 5,25%), gluconato de clorexidina (0,12%)
17 e TheraSol, frente a diferentes microrganismos (*Streptococcus mutans*,
18 *Peptostreptococcus micros*, *Prevotella intermedius*, e *Porphyromonas*
19 *gingivalis*), utilizando-se o método de difusão em ágar. As placas de Petri foram
20 incubadas aerobicamente e anaerobicamente, de acordo com cada
21 microrganismo. Os resultados encontrados mostraram eficácia do Hipoclorito
22 de Sódio 5,25% contra todos os microrganismos acima citados, por apresentar
23 uma zona substancial de inibição. A diminuição da concentração de NaOCl,
24 (0,5% ou 2,5%) promoveu uma diminuição do efeito testado.

25

26 Siqueira *et al.* (1998) compararam o efeito antimicrobiano do
27 Hipoclorito de Sódio, clorexidina, EDTA e ácido cítrico, frente a quatro
28 microrganismos anaeróbios (*Porphyromonas endodontalis*, *Porphyromonas*
29 *gingivalis*, *Prevotella intermedia*, e *Prevotella nigrescens*) e quatro facultativos
30 (*Enterococcus faecalis*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguis*, e
31 *Streptococcus sobrinus*) comumente encontradas em infecções endodônticas.
32 O diâmetro da zona de inibição do NaOCl 4% apresentou um resultado

1 superior, sendo estatisticamente significativo, quando comparado com as
2 outras soluções, exceto para 2,5% de NaOCl. Os autores sugeriram ainda que
3 o teste de difusão em ágar é método aceito para avaliar atividade
4 antimicrobiana de materiais dentários e medicamentos.

5 Gomes *et al.* (2001) utilizaram a metodologia da diluição em caldo
6 para avaliar a atividade antimicrobiana do NaOCl (0,5%, 2,5%, 4% e 5,25%) e
7 duas formas de gluconato de clorexidina (gel e líquido) em três concentrações
8 (0,2%, 1% e 2%) frente ao *E. faecalis*. O tempo para eliminar o microrganismo
9 foi dependente da concentração e do tipo de irrigante utilizado. A clorexidina
10 na forma líquida, em todas as concentrações, e o NaOCl 5,25% foram as
11 substâncias mais efetivas. Pode-se observar que a forma líquida de clorexidina
12 foi mais efetiva, do que apresentação em gel. Isto provavelmente é explicado,
13 porque o líquido da clorexidina mistura-se muito bem com a suspensão
14 bacteriana, exercendo imediatamente sua ação antimicrobiana. A formulação
15 em gel é de difícil dissolução, impedido assim o contato direto entre células
16 bacterianas e a clorexidina. Assim, requerer um tempo mais longo para agir
17 contra os microrganismos. No método de difusão em ágar, os autores
18 indicaram que a formulação de gel mantém o agente em contato com o meio
19 inoculado para um tempo mais longo, produzindo as maiores zonas de inibição.

20 Ferraz *et al.* (2007) compararam a ação antimicrobiana da
21 clorexidina (gel e solução) e do hipoclorito de sódio por meio de difusão em
22 ágar frente aos microrganismos: *S. aureus*, *E. faecalis*, *S. sanguis*, *S. sobrinus*,
23 *A. naeslundii*, *P. gingivalis*, *P. endodontalis*, *P. intermedia* e *P. denticola*.
24 Todos os microrganismos testados foram inibidos pela diferentes
25 concentrações de gluconato de clorexidina, sob a forma de solução ou gel.
26 Resultados semelhantes não foram observados para NaOCl, especialmente em
27 baixas concentrações. As maiores zonas de inibição de crescimento foram
28 produzidas quando as bactérias testadas entraram em contato com gel de
29 gluconato de clorexidina 2%.

30 Vianna *et al.* (2009) avaliaram a eficácia do hipoclorito de sódio
31 (NaOCl) e clorexidina (CHX), em diferentes concentrações frente ao
32 *Enterococcus faecalis*. Os autores empregaram os métodos de difusão em ágar

1 e de diluição em caldo. Observou-se que o tempo de inibição do crescimento
2 microbiano foi inversamente proporcional à concentração da solução.

3 Mercade *et al* (2009) determinaram a eficácia antimicrobiana de
4 soluções de hipoclorito de sódio, com diferentes valores de pH (12, 7.5 e 6.5)
5 em canais radiculares infectados por *Enterococcus faecalis*. Os dentes foram
6 divididos em três grupos experimentais de acordo com o padrão de irrigação
7 utilizado: grupo 1 = NaOCl 4,2%, pH 12; grupo 2 = NaOCl 4,2%, pH 7.5; e
8 grupo 3 = NaOCl 4,2%, pH 6.5. O efeito antimicrobiano foi analisado pela
9 turvação do meio de cultura. Nenhuma das soluções utilizadas demonstrou
10 100% de eficácia contra *E. faecalis*. A atividade bactericida da solução de
11 NaOCl 4,2% foi intensificada pela acidificação da solução (pH 6.5).

12 Wong & Cheung (2014) determinaram o grau de desinfecção das
13 paredes dentinárias promovido por duas concentrações de hipoclorito de sódio
14 (0,5 e 3%). As raízes foram analisadas por microscopia confocal de varredura a
15 laser. Ambas as concentrações de hipoclorito de sódio reduziram a quantidade
16 de bactérias viáveis na camada mais superficial (0,1 mm) da dentina do canal
17 radicular. Na camada mais profunda (0,1-0,3 mm), a irrigação com hipoclorito
18 de sódio 3% resultou em valores significativamente mais baixos de bactérias
19 viáveis do que hipoclorito de sódio a 0,5% ou solução salina. Os autores
20 indicaram que o aumento da concentração do hipoclorito de sódio potencializa
21 a sua penetração e ação antimicrobiana nos túbulos dentinários, mas parece
22 incapaz de erradicar completamente as bactérias que ali se estabeleceram.

23 Carpio-Perochena *et al* (2015) investigaram se a variação do pH de
24 soluções de NaOCl aumentou a sua capacidade antibacteriana e a dissolução
25 de biofilmes polimicrobianos formados *in situ*. Os espécimes foram irrigados
26 com NaOCl 2,5% com pH 5, 7, ou 12 durante 20 min. O grupo controle foi
27 irrigado com água destilada. A viabilidade celular e o volume bacteriano no
28 biofilme foram medidos pré- e pós-irrigação. Cinco áreas das amostras foram
29 escolhidas e analisadas com microscopia confocal de varredura a laser
30 (CLSM). Os resultados mostraram que todas as soluções experimentais foram
31 capazes de diminuir a biomassa microbiana ($P < 0,05$), exceto para o NaOCl a

1 1% com valor de pH 5. A capacidade antibacteriana do NaOCl foi dependente
2 da concentração e acidificação da solução. A acidificação do NaOCl favorece
3 a sua ação antibacteriana, mas o efeito de dissolução do irrigante é diminuída.

4 2.1.2 **Hipoclorito de Cálcio**

5

6 O hipoclorito de cálcio é um composto amplamente utilizado em
7 piscinas, banheiras de água quente, e para tratamento de água e esgoto,
8 sendo utilizado como um padrão para testes de comparação com outros
9 produtos químicos de higienização (PPG Industries, 1999).

10 Um dos primeiros empregos de soluções de hipoclorito de cálcio foi
11 relatado por Whittaker & Mohler, em 1911. Um dos problemas encontrados
12 pelo produtor e pelo distribuidor de leite era a esterilização dos utensílios
13 utilizados na coleta e distribuição do produto. Sem dúvida, o método ideal é por
14 esterilização a vapor. Na época, o elevado preço dos aparelhos e do custo da
15 utilização da esterilização a vapor, fez com que soluções de hipoclorito de
16 cálcio fossem utilizadas para a desinfecção das garrafas, antes do
17 acondicionamento do leite. Os autores propuseram a imersão das garrafas em
18 soluções contendo hipoclorito de cálcio e realizaram a contagem bacteriana
19 antes e após o tratamento. A contagem do número de colônias formadas foi
20 feita em meio *Ágar* padrão, incubada durante 24 horas a 37,5°C. A avaliação
21 realizada nas garrafas, antes do tratamento mostrou um amplo número de
22 microrganismos presentes. Após o tratamento, houve uma diminuição de mais
23 de 99,9% dos microrganismos. A partir destes resultados, os autores
24 demonstraram a eficácia do método empregado.

25

26

27

28

29

1 Conforme indicado por Swain et al (2012), o hipoclorito de cálcio é
2 um agente antimicrobiano de largo espectro, com ação rápida, apresenta
3 facilidade de uso, solubilidade em água, estabilidade relativa, não produz
4 resíduos tóxicos ou coloração, sendo ainda de baixo custo.

5 Swain *et al* (2012) incorporaram hipoclorito de cálcio em gesso
6 pedra Tipo V, e avaliaram *in vitro* suas propriedades. Amostras de gesso pedra
7 Tipo V foram divididos em dois grupos de 80 amostras. Foi testada a
8 resistência à compressão e à tração, em condições secas e úmidas. Além
9 disso, foram separados em subgrupos: 10 amostras sem adição de qualquer
10 desinfetante e grupos contendo diferentes percentuais em peso de hipoclorito
11 de cálcio (0,5%, 1,0% e 1,5%). Os autores concluíram, que mesmo dentro das
12 limitações de um estudo *in vitro*, o gesso pedra tipo V com adição de $\text{Ca}(\text{OCl})_2$,
13 como desinfetante, tem resistência à compressão e à tração adequada. Estas
14 amostras exerceram ação antimicrobiana significativa frente a uma cepa
15 resistente de *Bacillus subtilis*. Nenhum efeito deletério sobre resistência à
16 compressão ou tração foi encontrado após a colocação das amostras
17 selecionadas em contato com hipoclorito de cálcio.

18 De acordo com informações do fabricante, o $\text{Ca}(\text{OCl})_2$ apresenta-se
19 na forma de grânulos, contém elevado teor de cloro ativo, e mantém as suas
20 características originais por tempo prolongado, viabilizando o armazenamento
21 por um período de até 12 meses. A taxa de decomposição é de 3-5% ao ano
22 enquanto que para o hipoclorito de sódio a taxa é de 0,3% ao dia. (HYPOCAL,
23 2015).

24 A **Tabela 1** descreve as propriedades físicas do hipoclorito de sódio
25 e do hipoclorito de cálcio, de acordo com ATSDR (Agency for Toxic Substances
26 and Disease Registry, 2002).

27

28

29

30

1 **Tabela 1** - Propriedades físicas do Hipoclorito de Sódio e Hipoclorito de Cálcio.

2

	Ca(OCl) ₂	NaOCl
Descrição	Pó branco	Líquido amarelo
Propriedades de alerta	Odor forte	Odor forte
Peso molecular	142,98 daltons	74,44 daltons
Ponto de Ebulição (760 mmHg)	100°C	> 40°C
Ponto de congelamento	Não aplicável	6°C
Gravidade específica	2,35	1,21 (NaOCl 14%)
Solubilidade em água	21,4% a 25°C	29,3g/100g a 0°C
Inflamável	Não	Não

3

4

5 Poucos são os estudos que avaliaram as propriedades das soluções
6 de hipoclorito de cálcio e sua aplicação em Endodontia. A capacidade de
7 dissolução tecidual de soluções de Ca(OCl)₂ em diferentes concentrações foi
8 avaliada por Dutta e Saunders (2012) e também por Taneja *et al.* (2014) em
9 que NaOCl foi mais efetivo na dissolução do tecido em ambas as
10 concentrações e em ambos os intervalos de tempo. Dissolução de tecido por
11 Ca(OCl)₂ aumentou gradualmente com o tempo e com o aumento da sua
12 concentração média. Oliveira *et al.* (2014) avaliaram o efeito dessas soluções
13 na rugosidade do tecido dentinário e concluiu que Ca(OCl)₂ modificou a
14 rugosidade da dentina do canal radicular sendo similar ao NaOCl, nas mesmas
15 concentrações e combinações de EDTA usado neste estudo.

16 Até o presente momento, apenas De Almeida *et al.* (2014)
17 reportaram a avaliação de propriedades antimicrobianas de soluções de
18 hipoclorito de cálcio, quando aplicadas como irrigantes no sistema de canais

1 radiculares, em um estudo *in vitro*. Esta solução foi associada à irrigação
2 ultrassônica passiva em canais radiculares de dentes bovinos infectados com
3 *E. faecalis*. Os resultados obtidos foram similares àqueles observados para
4 soluções de hipoclorito de sódio. Entretanto, os autores sugerem que novos
5 estudos devem ser realizados para analisar outras propriedades desejáveis de
6 $\text{Ca}(\text{OCl})_2$, a fim de consolidar esta substância como uma alternativa de
7 irrigante endodôntico.

8

9

2.2 Efeito dos Componentes teciduais e da célula microbiana nas propriedades das substâncias químicas auxiliares.

As substâncias químicas utilizadas como agentes de desinfecção têm a capacidade de eliminar, rapidamente, até mesmo os microrganismos mais resistentes em estudos *in vitro*. No entanto, a eficácia das mesmas substâncias parece ser modificada nas condições *in vivo* (HAAPASALO, *et al.*, 2007).

O efeito da matéria orgânica na propriedade antimicrobiana do Hipoclorito de Sódio tem sido estudado desde o início dos anos 80. Recentes estudos avaliaram a interação de substâncias químicas auxiliares com dentina, proteínas séricas, hidroxiapatita, colágeno e biomassa microbiana. Como resultado de tais interações, a eficácia de várias substâncias-chave pode ser enfraquecida, ou mesmo eliminada, sob certas circunstâncias (HAAPASALO *et al.*, 2007).

Harrison & Hand (1981) avaliaram, em um estudo piloto e depois em estudo *in vitro*, o efeito do sangue, albumina humana e uma levedura solúvel em água sobre o NaOCl 5,25%. Os autores concluíram que a presença da levedura inibiu significativamente a ação do NaOCl em todos os intervalos de tempo. No entanto, nem o sangue e nem a albumina foram capazes de alterar a ação da solução testada.

Haapasalo *et al.* (2000) desenvolveram metodologia para avaliar o efeito inibidor que a dentina exerce em várias substâncias químicas auxiliares utilizadas no canal radicular. Foram utilizados terceiros molares extraídos para a produção de dentina em pó. As substâncias testadas foram: solução saturada de hidróxido de cálcio, NaOCl 1%, acetato de clorexidina 0,5% e 0,05% e soluções de iodeto de potássio a 2/4% e 0,2/0,4% frente ao *E. faecalis*. Os resultados mostraram que a dentina em pó teve um efeito inibitório sobre todas as substâncias testadas. O efeito era dependente da concentração da substância testada, bem como sobre o tempo em que a substância ficava em contato com a dentina. Na ausência da dentina, todas as substâncias foram

1 efetivas contra o *E. faecalis*. Os autores concluíram que o modelo de dentina
2 em pó pode oferecer uma ferramenta nova e eficaz para estudar as interações
3 locais entre as substâncias químicas auxiliares, dentina e microrganismos.

4 Portenier *et al.* (2002) avaliaram a ação antimicrobiana do
5 digluconato de clorexidina e do iodeto de potássio frente ao *Enterococcus*
6 *faecalis* na presença de dentina em pó, matriz de dentina, dentina com
7 tratamento prévio por EDTA ou ácido cítrico e colágeno tipo I. Células de
8 *Enterococcus faecalis* e *Candida albicans* inativadas por calor foram também
9 testados como inibidores. Os intervalos de avaliação estabelecidos eram de 1
10 ou 24 horas. O efeito antimicrobiano da clorexidina 0,02% foi fortemente inibido
11 pela matriz de dentina e células microbianas mortas pelo calor. Pode-se
12 observar que a dentina, previamente tratada por ácido cítrico ou EDTA,
13 exerceu discreto efeito de inibição. A dentina e o colágeno tipo I exerceram
14 inibição pouco intensa no intervalo de 1 hora, o que não foi observado em 24
15 horas. O iodeto de potássio foi efetivamente inibido por dentina, matriz de
16 dentina e células microbianas mortas por calor. Colágeno tipo I e a dentina
17 previamente tratada por EDTA ou por ácido cítrico não apresentaram efeito
18 inibitório sobre o iodeto de potássio.

19 Sassone *et al.* (2003) avaliaram o crescimento dos microrganismos
20 *Staphylococcus aureus*, *E. faecalis*, *Escherichia coli*, *Porphyromonas gingivalis*
21 e *Fusobacterium nucleatum*, em contato com as soluções de NaOCl (1% e 5%)
22 e clorexidina (0,12%, 0,5% e 1%) com ou sem a adição de albumina sérica
23 bovina a 0,5%. Os momentos de avaliação foram imediatamente após a
24 exposição, 5, 15 e 30 minutos de contato. A solução de CHX 0,12% não
25 eliminou *E. faecalis* em todos os intervalos de tempo. No caso de *E. coli* e *P.*
26 *gingivalis*, a CHX 0,12% não foi capaz de eliminar os microrganismos em
27 contato imediato e após 5 minutos, na presença de BSA. Os autores
28 concluíram que, mesmo com as limitações de um estudo *in vitro*, a solução de
29 clorexidina 0,12% foi ineficaz frente ao *E. faecalis*. Nas concentrações de CHX
30 1%, de hipoclorito de sódio 1% e 5% observou-se atividade antimicrobiana
31 sobre todas as cepas testadas. A presença de albumina não interferiu na
32 atividade antimicrobiana das soluções testadas.

1 Pappen *et al.* (2010) avaliou o efeito de componentes teciduais
2 sobre a ação antimicrobiana do NaOCl frente ao *E. faecalis*, *Candida albicans*,
3 *S. epidermidis* e *E. coli*. As concentrações de NaOCl utilizadas foram: 0,03%,
4 0,06%, 0,12%, 0,25%, 0,5%, 1% e 2%. Já as concentrações de BSA foram:
5 0,10%, 0,21%, 0,42%, 0,83%, 1,67%, 3,33% e 6,66%. Todos os
6 microrganismos foram eliminados após 30 segundos, por NaOCl 0,03%,
7 quando da ausência de albumina bovina. Observou-se que o efeito inibidor da
8 albumina é dependente da concentração de NaOCl utilizada.

9 Em 2013, Morgental *et al.* utilizaram metodologia similar às
10 anteriores, comparando apenas a dentina em pó como possível inibidor das
11 substâncias: NaOCl 1%, NaOCl 6%, clorexidina 2%, EDTA 17% e QMiX. Na
12 ausência de dentina, após 10 segundos de contato, o NaOCl 6% gerou as
13 menores contagem de microganimos. Após 1 minuto, as duas concentrações
14 de hipoclorito de sódio não permitiram crescimento bacteriano. Neste período
15 de tempo, o QMiX reduziu o número de colônias, porém o EDTA e a CHX
16 mantiveram número de colônias semelhantes ao controle negativo. A dentina
17 demonstrou um efeito inibidor significativo sobre NaOCl 6% em 10 segundos,
18 sobre o NaOCl 1% em 10 segundos e 1 minuto, e sobre o QMiX em 10
19 segundos e 1 minuto. Após 6 horas, ambas as concentrações de NaOCl, QMiX,
20 e CHX eliminaram todas as células microbianas, independente da presença ou
21 não de dentina.

22 Quintana e colaboradores (2014) avaliaram a eficácia, *in vitro*, de
23 novas soluções irrigadoras, BioPure MTAD e QMiX, sobre *E. faecalis* e o
24 potencial de inibição por pó de dentina humana, albumina sérica bovina e LPS.
25 Os autores concluíram que, após 2 minutos de contato com *E. faecalis*, a
26 albumina inibe ação antimicrobiana das soluções testadas, com exceção do
27 NaOCl 5%. Nos demais períodos experimentais a albumina, a dentina e o LPS
28 não influenciaram a ação dos irrigantes.

29

30 Considerando-se que:

1 a) há carência de dados relativos às propriedades antimicrobianas
2 de soluções de hipoclorito de cálcio em concentrações passíveis de serem
3 empregadas durante o preparo do canal radicular; e,

4 b) poucos são os dados relativos aos efeitos dos componentes
5 teciduais frente às propriedades destas soluções, torna-se necessário realizar
6 estudos que caracterizem as propriedades do Ca(OCl)_2 , a fim de consolidar
7 esta substância como uma alternativa de irrigante endodôntico.

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26

1 3 OBJETIVOS

2

3 O objetivo geral do presente estudo foi avaliar a ação antimicrobiana
4 das substâncias químicas Hipoclorito de Sódio e Hipoclorito de Cálcio nas
5 diferentes concentrações (0,5%, 1%, 2,5% e 5%).

6 Os objetivos específicos foram:

7 a) Avaliar a ação antimicrobiana de soluções de hipoclorito de cálcio,
8 nas concentrações de 0,5%, 1%, 2,5% e 5%, utilizando o método de
9 difusão em ágar e em contato em meio líquido;

10 b) Comparar a ação antimicrobiana das soluções de hipoclorito de sódio
11 e hipoclorito de cálcio nas concentrações de 0,5%, 1%, 2,5% e 5%;

12 c) Avaliar se a presença de pó de dentina humana, albumina sérica
13 bovina e endotoxina alteram a ação antimicrobiana das soluções de
14 hipoclorito de sódio e hipoclorito de cálcio em diferentes intervalos de
15 tempo.

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26

27

28

29

30

31

1 4 METODOLOGIA

2

3 O presente estudo foi aprovado pela Comissão de Pesquisa da
4 Faculdade de Odontologia da UFRGS e pelo Comitê de Ética da mesma
5 universidade (Protocolos número 26070, CAAE 26676514.7.0000.5347 e CAAE
6 35289314.0.0000.5347). Os experimentos foram realizados no Laboratório de
7 Bioquímica e Microbiologia Oral (LABIM) da Faculdade de Odontologia,
8 Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

9

10

11 4.1 Preparo das Soluções

12

13 As soluções de hipoclorito de sódio testadas foram preparadas no
14 momento da sua utilização a partir de uma solução de hipoclorito de sódio 12%
15 (Farmaquímica S.A. Produtos Químicos, Porto Alegre, RS, Brasil), diluída em
16 água destilada esterilizada. Para o preparo de 10 mL de cada solução, foram
17 seguidos os protocolos abaixo descritos:

18

19 a) Solução de hipoclorito de sódio 0,5%:

$$20 \quad \%inicial \times Vinicial = \%final \times Vfinal$$

$$21 \quad 12 \% \times Vinicial = 0,5\% \times 10 \text{ mL}$$

$$22 \quad Vinicial = 5 / 12$$

$$23 \quad Vinicial = 0,417 \text{ mL de solução de NaOCl } 12\%$$

24 Para o preparo da solução de NaOCl 0,5%, foram necessários 0,417
25 mL de solução de NaOCl 12% adicionados em 9,583 mL de água destilada
26 esterilizada.

27

28 b) Solução de hipoclorito de sódio 1%:

$$29 \quad \%inicial \times Vinicial = \%final \times Vfinal$$

$$30 \quad 12 \% \times Vinicial = 1\% \times 10 \text{ mL}$$

$$31 \quad Vinicial = 10 / 12$$

1 Vinicial = 0,834 mL de solução de NaOCl 12%

2 Para o preparo da solução de NaOCl 1%, foram necessários 0,834
3 mL de solução de NaOCl 12% adicionados em 9,166 mL de água destilada
4 esterilizada.

5

6 c) Solução de hipoclorito de sódio 2,5%:

7 $\%inicial \times Vinicial = \%final \times Vfinal$

8 $12 \% \times Vinicial = 2,5\% \times 10 \text{ mL}$

9 $Vinicial = 25 / 12$

10 $Vinicial = 2,083 \text{ mL de solução de NaOCl } 12\%$

11 Para o preparo da solução de NaOCl 2,5%, foram necessários 2,083
12 mL de solução de NaOCl 12% adicionados em 7,917 mL de água destilada
13 esterilizada.

14

15 d) Solução de hipoclorito de sódio 5%:

16 $\%inicial \times Vinicial = \%final \times Vfinal$

17 $12 \% \times Vinicial = 5\% \times 10 \text{ mL}$

18 $Vinicial = 5/12$

19 $Vinicial = 4,166 \text{ mL de solução de NaOCl } 12\%$

20 Para o preparo da solução de NaOCl 5%, foram necessários 4,375
21 mL de solução de NaOCl 12% adicionados em 5,834 mL de água destilada
22 esterilizada.

23

24 As soluções de hipoclorito de cálcio foram produzidas pela diluição
25 de porções de pó de Ca(OCl)_2 (Farmaquímica S.A. Produtos Químicos, Porto
26 Alegre, RS, Brasil), com 65% de pureza, em 100mL de água destilada
27 esterilizada, conforme segue:

28 a) Solução de hipoclorito de cálcio 0,5% - para o preparo da solução
29 de Ca(OCl)_2 0,5%, foram diluídos 0,7692g de pó de Ca(OCl)_2 em
30 100 mL de água destilada esterilizada, sob agitação constante, em
31 um frasco de plástico tipo Becker, em agitador durante 5 minutos.

1 b) Solução de hipoclorito de cálcio 1% - para o preparo da solução
2 de $\text{Ca}(\text{OCl})_2$ 1%, foram diluídos 1,5384g de pó de $\text{Ca}(\text{OCl})_2$ em 100
3 mL de água destilada esterilizada, sob agitação constante, em um
4 frasco de plástico tipo Becker, em agitador durante 5 minutos.

5 c) Solução de hipoclorito de cálcio 2,5% - para o preparo da solução
6 de $\text{Ca}(\text{OCl})_2$ 2,5%, foram diluídos em 3,8461g de pó de $\text{Ca}(\text{OCl})_2$
7 em 100 mL de água destilada esterilizada, sob agitação constante,
8 em um frasco de plástico tipo Becker, em agitador durante 5
9 minutos.

10 d) Solução de hipoclorito de cálcio 5% - para o preparo da solução
11 de $\text{Ca}(\text{OCl})_2$ 5,%, foram diluídos em 7,6923g de pó de $\text{Ca}(\text{OCl})_2$ em
12 100 mL de água destilada esterilizada, sob agitação constante, em
13 um frasco de plástico tipo Becker, em agitador durante 5 minutos.

14 As soluções foram utilizadas imediatamente após o seu preparo.

17 4.2 Método de Difusão em Ágar

18
19 A ação antimicrobiana das substâncias químicas auxiliares foi
20 avaliada pelo método de difusão em ágar, adaptado daquele descrito pelo
21 *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST, 2014).

22 O número de repetições foi determinado por meio do pacote
23 estatístico BioEstat 5.0 (Fundação Mamirauá, Belém, Pará, Brasil),
24 considerando os seguintes parâmetros:

- 25 ■ teste estatístico: Teste ANOVA e Teste de Tukey post hoc ou
- 26 Kruskal-Wallis;
- 27 ■ diferença mínima entre as médias dos tratamentos = 1,33 mm;
- 28 ■ desvio-padrão do erro = 0,1;
- 29 ■ número de tratamentos = 5;
- 30 ■ poder do teste = 0,80;

1 ▪ nível de significância = 0,05.
2 Considerando estas informações, o número de repetições
3 necessárias para cada grupo foi de 5.

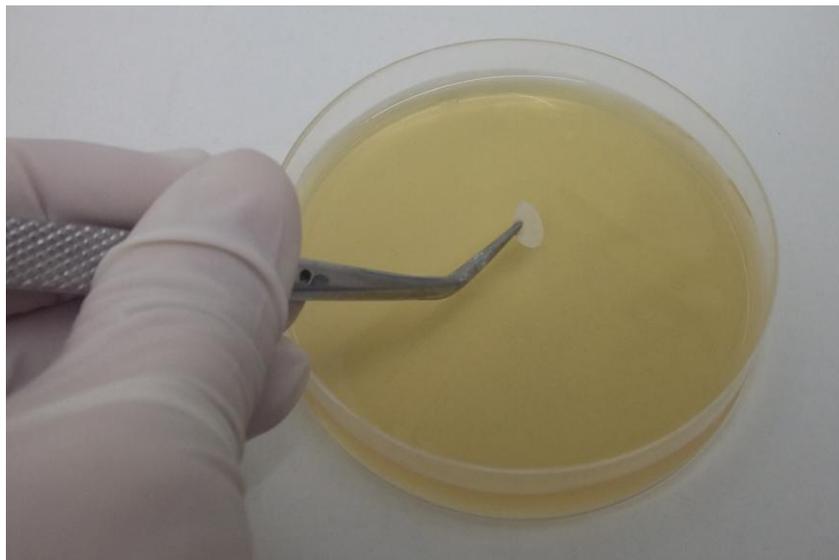
4 Os grupos de estudo foram estabelecidos, conforme a solução a ser
5 testada:

- 6 ▪ Grupo 1 – Água destilada (controle negativo)
- 7 ▪ Grupo 2 – Disco de ampicilina 10 µg (Cefar Diagnostica LTDA,
8 São Paulo, Brasil) (controle positivo)
- 9 ▪ Grupo 3 – Solução de NaOCl 0,5%
- 10 ▪ Grupo 4 – Solução de NaOCl 1%
- 11 ▪ Grupo 5 – Solução de NaOCl 2,5%
- 12 ▪ Grupo 6 - Solução de NaOCl 5%
- 13 ▪ Grupo 7 – Solução de Ca(OCl)₂ 0,5%
- 14 ▪ Grupo 8 – Solução de Ca(OCl)₂ 1%
- 15 ▪ Grupo 9 – Solução de Ca(OCl)₂ 2,5%
- 16 ▪ Grupo 10 – Solução de Ca(OCl)₂ 5%

17

18 O microrganismo *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 foi sub-
19 cultivado em placas de Muller-Hinton ágar (MHA, Himedia Laboratories Limited,
20 Ghatkopar West, Mumbai, India) e incubado por 18-24h a 37°C em estufa
21 microbiológica. Após o crescimento em meio sólido, colônias isoladas foram
22 suspensas em tubos contendo 5 mL do meio de cultura BHI Caldo. Após
23 agitação mecânica, a suspensão foi ajustada em espectrofotômetro com valor
24 de absorbância igual a 0.036, atingindo a concentração equivalente a 0.5 da
25 escala de McFarland ($1,5 \times 10^8$ bactérias/mL).

26 O meio de cultura empregado para o teste de difusão em ágar foi o
27 Muller Hinton Ágar (Himedia Laboratories Limited, Ghatkopar West, Mumbai,
28 India). No interior da câmara de fluxo laminar, após a dispersão do inóculo com
29 um swab sobre o meio de cultura, discos de papel filtro, previamente
30 esterilizados foram dispostos sobre a superfície do ágar utilizando-se pinças
31 estéreis, com vinte microlitros das soluções testadas.



1
2 Figura 1 – Colocação do papel filtro com a substância teste sobre MHA,
3 previamente contaminado com *E. faecalis*.

4 As placas foram incubadas a 37°C em estufa microbiológica. A
5 leitura dos resultados foi feita após 24 horas de incubação em estufa
6 microbiológica. As medidas das zonas de inibição de crescimento microbiano
7 corresponderam à distância entre a superfície externa do disco de papel filtro
8 contendo a substância química auxiliar e o início da região de crescimento
9 microbiano, os quais foram medidos com auxílio de paquímetro digital
10 (DIGIMESS Instrumentos de Precisão Ltda, São Paulo, SP, Brasil).

11 Os resultados obtidos foram analisados estatisticamente através do programa
12 SPSS 20.0 for Windows (IBM SPSS v 20.0, SPSS; SPSS, Chicago, IL). O nível
13 de significância estabelecido foi 5%. Foi realizado o teste de Shapiro-Wilk em
14 que $P \leq 0,05$, rejeitando-se a hipótese nula.

15 As hipóteses nulas consideradas foram:

- 16 a) Não há diferença estatisticamente significativa entre a ação
17 antimicrobiana de uma mesma solução, quando em diferentes
18 concentrações. Para testar esta hipótese, foi utilizado o teste de
19 Kruskal-Wallis, seguido do teste de múltiplas comparações de Dunn.

1 b) Não há diferença estatisticamente significativa entre ação
2 antimicrobiana de soluções de hipoclorito de sódio e hipoclorito de
3 cálcio em uma mesma concentração. O teste estatístico empregado
4 para testar esta hipótese foi o teste de Kruskal-Wallis, seguido do teste
5 de múltiplas comparações de Dunn.

8 **4.3 Método de Contato em Meio Líquido**

9
10 O método empregado foi adaptado de Gomes *et al.* (2001). Foram
11 utilizadas 7 placas para cultura de células (Corning Cell Culture Cluster,
12 Corning, EUA), cada uma contendo seis poços. Os testes foram realizados em
13 triplicata para cada solução, conforme indicado por Gomes *et al.* (2001) e
14 Vianna *et al.* (2004). Assim:

- 15 ▪ Grupo 1 – Água destilada (controle negativo) (n=3);
- 16 ▪ Grupo 2 – Solução de NaOCl 0,5% (n=3);
- 17 ▪ Grupo 3 – Solução de NaOCl 1% (n=3);
- 18 ▪ Grupo 4 – Solução de NaOCl 2,5% (n=3);
- 19 ▪ Grupo 5 - Solução de NaOCl 5% (n=3);
- 20 ▪ Grupo 6 – Solução de Ca(OCl)₂ 0,5% (n=3);
- 21 ▪ Grupo 7 – Solução de Ca(OCl)₂ 1% (n=3);
- 22 ▪ Grupo 8 – Solução de Ca(OCl)₂ 2,5% (n=3); e,
- 23 ▪ Grupo 9 – Solução de Ca(OCl)₂ 5% (n=3).

24
25 Foram preparados 250 mL de BHI caldo (Himedia Laboratories
26 Limited, Ghatkopar West, Mumbai, India) contendo tiosulfato de sódio em
27 concentração de 0,5% para que este meio atue como neutralizador do
28 hipoclorito de sódio e hipoclorito de cálcio, após este exercer a sua ação no
29 período de tempo determinado.

1 O microrganismo *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 foi
2 subcultivado em placas de MHA (Himedia Laboratories Limited, Ghatkopar
3 West, Mumbai, India) e incubado por 18-24h a 37°C em estufa microbiológica.
4 Após o crescimento em meio sólido, colônias isoladas foram suspensas em
5 tubos contendo 5 mL do meio BHI Caldo (Himedia Laboratories Limited,
6 Ghatkopar West, Mumbai, India). Após a agitação mecânica, a suspensão foi
7 ajustada em espectrofotômetro com comprimento de onda de 540 nm a um
8 valor de absorvância de 0.036, com o objetivo de atingir a concentração
9 equivalente a 0,5 da escala de McFarland ($1,5 \times 10^8$ bactérias/mL).

10 No primeiro poço de cada placa, foi colocado 3 mL de BHI caldo
11 contendo o microrganismo viável e foi adicionado 3 mL da substância química
12 auxiliar teste. Nos demais poços, estavam presentes 2 mL do meio de cultura
13 BHI caldo suplementado com tiosulfato de sódio 0,5%.

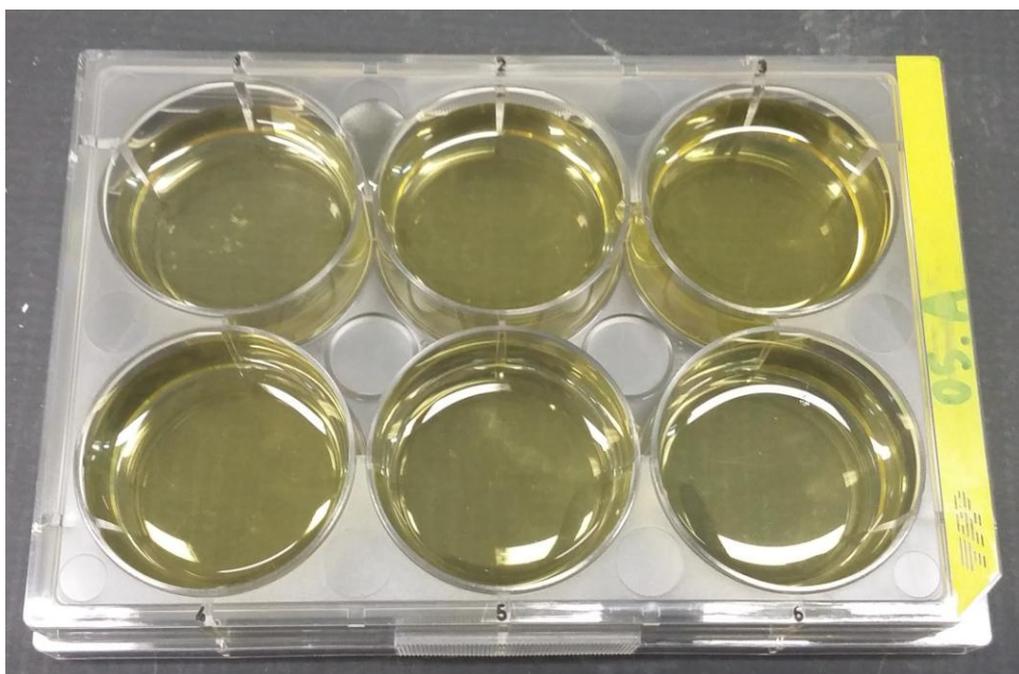
14 Assim, as placas de cultura de células contendo 6 poços receberam
15 quantidades diferenciadas de meios de cultura (contendo ou não o
16 microrganismo) e substância química auxiliar, conforme segue:

- 17 ■ Poço 1 - 3 mL de BHI caldo contendo *E. faecalis* + 3 mL da
18 substância química auxiliar teste.
- 19 ■ Poço 2 – 2 mL de BHI caldo contendo tiosulfato de sódio 0,5%
20 (destinado verificar o efeito do agente antimicrobiano sobre o
21 microrganismo após 15 segundos).
- 22 ■ Poço 3– 2 mL de BHI caldo contendo tiosulfato de sódio 0,5%
23 (destinado verificar o efeito do agente antimicrobiano sobre o
24 microrganismo após 30 segundos).
- 25 ■ Poço 4 – 2 mL de BHI caldo contendo tiosulfato de sódio 0,5%
26 (destinado verificar o efeito do agente antimicrobiano sobre o
27 microrganismo após 1 min).
- 28 ■ Poço 5 – 2 mL de BHI caldo contendo tiosulfato de sódio 0,5%
29 (destinado verificar o efeito do agente antimicrobiano sobre o
30 microrganismo após 5 minutos).

- 1 ▪ Poço 6 – 2 mL de BHI caldo contendo tiosulfato de sódio 0,5%
2 (destinado verificar o efeito do agente antimicrobiano sobre o
3 microrganismo após 10 minutos).

4
5 Cada poço representou um tempo de avaliação. Após 15 segundos
6 do contato da substância química auxiliar com os microrganismos (poço
7 número 1), foram retirados 1 mL deste e adicionado ao poço 2, com o objetivo
8 de verificar o efeito da substância química auxiliar teste neste período de tempo
9 (15 segundos). Alíquotas de 1 mL do poço 1 foram retiradas após 30 s, 1 min,
10 5 min e 10 min. Após, todas as placas foram incubadas em estufa
11 microbiológica, durante 24 horas, a 37°C em estufa microbiológica.

12



13

14 Figura 2 – Placa com seis poços contendo BHI caldo.

15

16

17 Os resultados foram analisados conforme a presença ou ausência
18 de turvação dos poços. Foram determinados os tempos mínimos de contato
19 entre o microrganismo e a solução avaliada para que se pudesse verificar a
 ação antimicrobiana, representada pela ausência de turvação. O valor de

1 tempo representativo para cada grupo correspondeu à moda. As hipóteses
2 nulas testadas foram:

3 a) Não há diferença estatisticamente significativa entre o tempo necessário
4 para inibir o crescimento microbiano entre as diferentes concentrações
5 de uma mesma solução. Empregou-se o teste de Kruskall-Wallis.

6 b) Não há diferença estatisticamente significativa entre o tempo necessário
7 para inibir o crescimento microbiano de uma mesma concentração de
8 hipoclorito de sódio e hipoclorito de cálcio. Empregou-se o teste de
9 Kruskall-Wallis para testar esta hipótese.

10 Para todos os testes, o nível de significância estabelecido foi de 5%.

11

12 4.4 Efeito de componentes teciduais e microbianos no efeito de 13 soluções de hipoclorito de sódio e hipoclorito de cálcio

14

15 Pó de dentina, albumina sérica bovina (BSA 18%; Sigma Aldrich, St.
16 Louis, MO, EUA) e endotoxina de *Echerichia coli* na concentração de 1 µL/mL
17 (LPS; Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA), foram testados como potenciais
18 inibidores das soluções irrigadoras.

19 O pó de dentina foi preparado conforme descrito previamente por
20 Morgental *et al.* (2013), a partir de cinco raízes distais de molares inferiores
21 humanos extraídos. As coroas dos dentes e o cimento das raízes foram
22 removidos. A dentina radicular foi esmagada e moída utilizando um moedor
23 elétrico (Modelo DCG-20, Cuisinart, East Windsor, NJ, EUA) e o pó de dentina
24 foi suspenso em água destilada, 28 mg por alíquota de 50µL, como
25 preconizado por Haapasalo *et al.* (2000). As alíquotas foram colocadas em
26 tubos teste Eppendorf e esterilizadas em autoclave (HA-300 MII, Hirayama
27 Manufacturing Co, Saitama, Japão) e mantidas a 4°C até o momento do uso.

28 As substâncias avaliadas foram: Hipoclorito de Sódio e de Cálcio
29 dispostas em grupos:

- 1 ▪ Grupo 1 – Água destilada (controle negativo) (n=3);
- 2 ▪ Grupo 2 – Solução de NaOCl 0,5% (n=3);
- 3 ▪ Grupo 3 – Solução de NaOCl 1% (n=3);
- 4 ▪ Grupo 4 – Solução de NaOCl 2,5% (n=3);
- 5 ▪ Grupo 5 - Solução de NaOCl 5% (n=3);
- 6 ▪ Grupo 6 – Solução de Ca(OCl)₂ 0,5% (n=3);
- 7 ▪ Grupo 7 – Solução de Ca(OCl)₂ 1% (n=3);
- 8 ▪ Grupo 8 – Solução de Ca(OCl)₂ 2,5% (n=3); e,
- 9 ▪ Grupo 9 – Solução de Ca(OCl)₂ 5% (n=3).

10

11 O microrganismo *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 foi
12 subcultivado em placas de MHA (Himedia Laboratories Limited, Ghatkopar
13 West, Mumbai, India) e incubado por 18-24h a 37°C em estufa microbiológica.
14 Após o crescimento em meio sólido, colônias isoladas foram suspensas em
15 tubos contendo 5 mL do meio BHI Caldo (Himedia Laboratories Limited,
16 Ghatkopar West, Mumbai, India). Após a agitação mecânica, a suspensão foi
17 ajustada em espectrofotômetro com comprimento de onda de 540 nm a um
18 valor de absorvância de 0.036, com o objetivo de atingir a concentração
19 equivalente a 0,5 da escala de McFarland ($1,5 \times 10^8$ bactérias/mL).

20 Foi utilizado o teste de contato direto em meio líquido, adaptado de
21 Portenier *et al.* (2006). Após ajustada a suspensão bacteriana, em 27 tubos tipo
22 Falcon (um para cada solução com cada um dos inibidores), alíquotas de 450
23 µL da suspensão de pó de dentina, albumina sérica bovina ou LPS foram
24 completamente misturadas com 450 µL de uma das soluções irrigadoras e 450
25 µL da suspensão bacteriana, representando um volume total de 1350 µL. Para
26 o controle negativo, água destilada esterilizada foi adicionada, substituindo-se
27 as soluções irrigantes, mantendo-se o mesmo volume final.

28 Após incubação durante 2 minutos, 30 minutos ou 6 horas, alíquotas
29 de 100 µL foram removidas e diluídas de forma seriada até 10.000 vezes (10^{-4}).

1 Os primeiros dois tubos da sequência de diluição continham um neutralizador
2 para reduzir o efeito *carry-over* das soluções irrigadoras, conforme descrito por
3 Pappen *et al.* (2010). Três alíquotas de 20 µL de cada tubo de diluição foram
4 semeadas em placas de MHA e incubadas a 37°C durante 24 horas. O número
5 de unidades formadoras de colônia foi contado, sendo todos os experimentos
6 realizados em triplicata.

7 Para determinar o efeito do pó de dentina, da albumina bovina sérica
8 e da endotoxina sobre o crescimento do *E. faecalis*, foram produzidos tubos
9 contendo cada um dos componentes teciduais ou microbianos, sem as
10 substâncias químicas auxiliares. Os períodos de exposição foram 2min, 30min
11 e 6 horas. O mesmo protocolo de semeadura e contagem de unidades
12 formadoras de colônia foi realizado.

13 As hipóteses nulas testadas foram:

- 14 a) Não há diferença estatisticamente significativa entre a ação
15 antimicrobiana de ambos os hipocloritos na presença de inibidores
16 teciduais;
- 17 b) Não há diferença estatisticamente significativa entre o tempo de ação
18 antimicrobiana das substâncias químicas testadas na presença de
19 inibidores teciduais;

20 Os dados foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis, seguido
21 pelo teste de múltiplas comparações de Dunn. Foi estabelecido um nível de
22 significância de 5%.

23

24

25

26

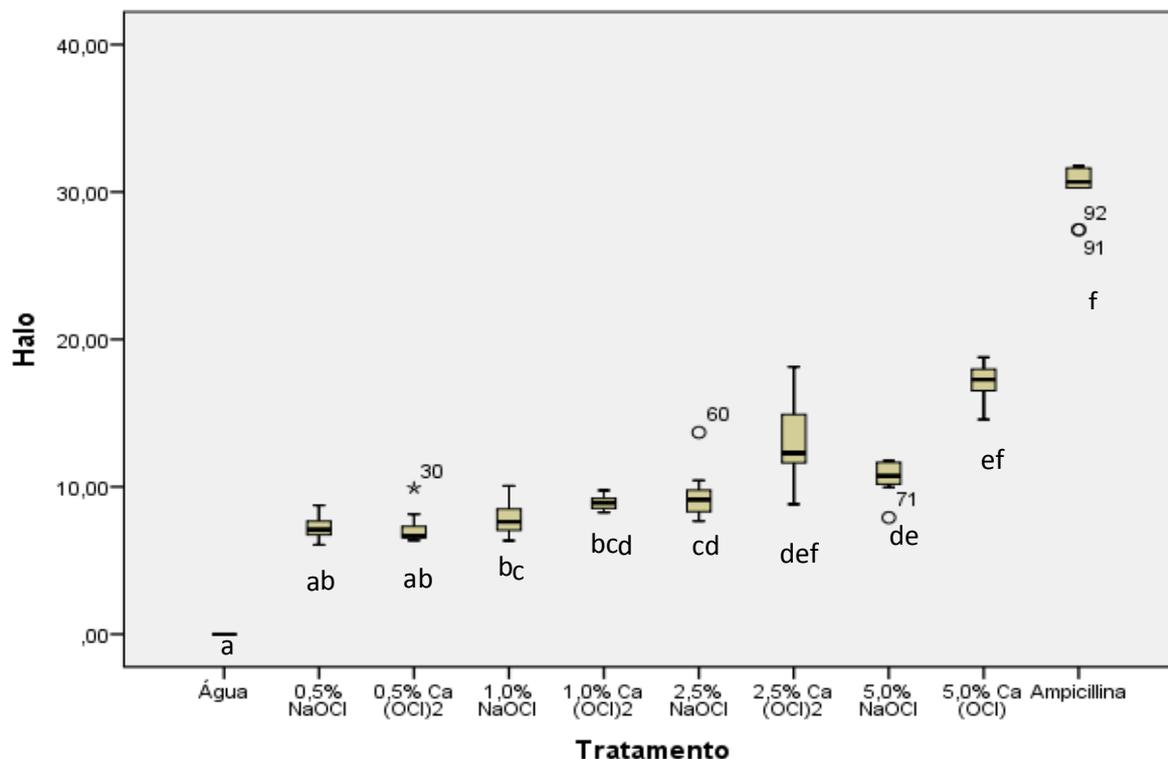
27

1 5 RESULTADOS

2

3 Os valores das zonas de inibição encontrados por meio método de
 4 difusão em ágar estão descritos na **Figura 3**. Observou-se diferença
 5 estatisticamente significativa entre as diferentes concentrações de uma mesma
 6 substância química ($P<.05$), rejeitando assim a hipótese nula. Os grupos do
 7 hipoclorito de sódio e hipoclorito de cálcio, na mesma concentração, não
 8 apresentaram diferenças significativas entre si (Teste de Kruskal-Wallis,
 9 seguido do teste de múltiplas comparações de Dunn, $P>0.05$). Observou-se
 10 que o hipoclorito de cálcio nas concentrações 2,5% e 5% não apresentou
 11 diferença estatisticamente significativa, quando comparado com o controle
 12 positivo ampicilina ($P=0.001$). O mesmo não aconteceu com NaOCl nas
 13 mesmas concentrações.

14



15

16 **Figura 3.** Zonas de inibição do *E. faecalis* nos grupos controles e experimentais. A
 17 mesma letra indica similaridade estatisticamente significativa (Kruskal-Wallis, seguido
 18 de múltiplas comparações).

1 O tempo necessário para a inibição do crescimento do *E. faecalis*,
 2 para cada uma das substâncias, está descrito na **Tabela 2**. Observou-se que o
 3 tempo para a inibição do crescimento do *E. faecalis* é menor nas
 4 concentrações mais elevadas de hipoclorito de sódio e de hipoclorito de cálcio
 5 (2,5% e 5,25%). O efeito inverso ocorreu em soluções menos concentradas.
 6 ($P < 0,05$) (Teste de Kruskal-Wallis, seguido do teste de múltiplas comparações
 7 de Dunn). A **Tabela 3** apresenta os valores de significância estatística para a
 8 comparação entre diferentes concentrações de hipoclorito de sódio e
 9 hipoclorito de cálcio.

10

11 **Tabela 2** – Presença do crescimento de *E. faecalis* quando em contato com
 12 NaOCl ou $\text{Ca}(\text{OCl})_2$, em diferentes tempos de exposição.

13

Solução	Tempos de exposição				
	15 seg	30 seg	1 min	5 min	10 min
NaOCl 0,5%	+	+	+	+	+
NaOCl 1%	+	+	-	-	-
NaOCl 2,5%	-	-	-	-	-
NaOCl 5%	-	-	-	-	-
$\text{Ca}(\text{OCl})_2$ 0,5%	+	+	+	+	+
$\text{Ca}(\text{OCl})_2$ 1%	+	-	-	-	-
$\text{Ca}(\text{OCl})_2$ 2,5%	-	-	-	-	-
$\text{Ca}(\text{OCl})_2$ 5%	-	-	-	-	-

14

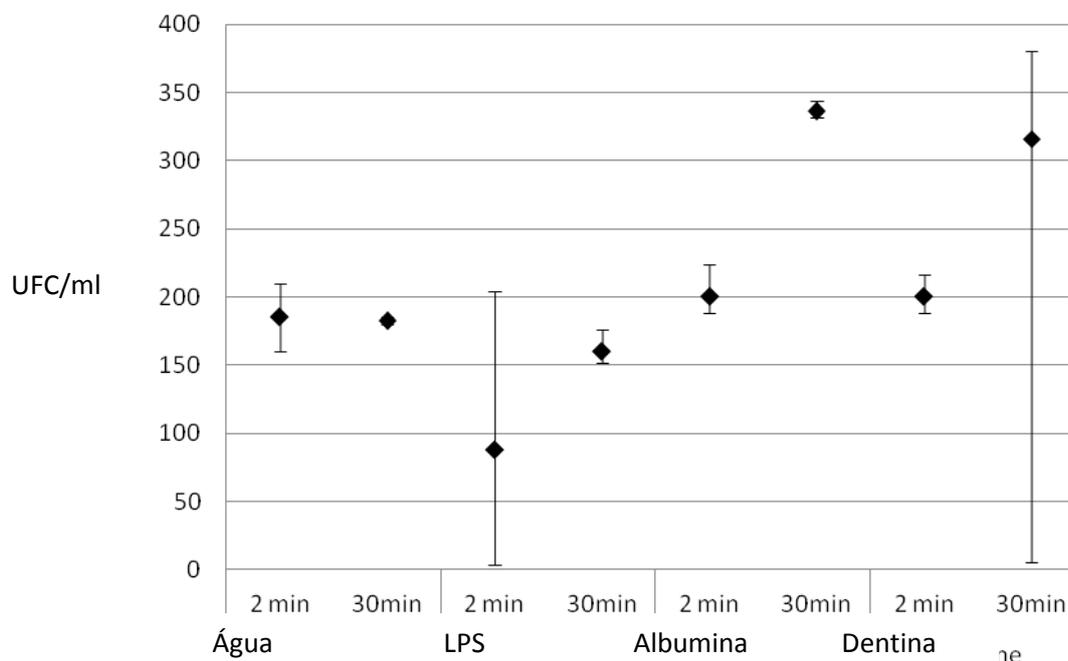
15 * (+) indica crescimento microbiano; (-) indica ausência de crescimento
 16 microbiano.

Tabela 3 – Comparação estatística (valores de *P*) entre as substâncias considerando os períodos de inibição do crescimento.

	NaOCl 0,5%	NaOCl 1%	NaOCl 2,5%	NaOCl 5%	Ca(OCl) ₂ 0,5%	Ca(OCl) ₂ 1%	Ca(OCl) ₂ 2,5%	Ca(OCl) ₂ 5%
NaOCl 0,5%		0,129	0,004	0,004	1,0	0,191	0,045	0,014
NaOCl 1%			0,162	0,162	0,129	0,832	0,627	0,346
NaOCl 2,5%				1,0	0,004	0,107	0,362	0,649
NaOCl 5%					0,004	0,107	0,362	0,649
Ca(OCl) ₂ 0,5%						0,191	0,045	0,014
Ca(OCl) ₂ 1%							0,485	0,248
Ca(OCl) ₂ 2,5%								0,649
Ca(OCl) ₂ 5%								

* Resultado em negrito indica diferença estatística entre as substâncias correspondentes na coluna e na linha.

1 A presença dos componentes teciduais e microbianos, na ausência
 2 da substância química auxiliar, não influenciou o crescimento do *E. faecalis* nos
 3 diferentes tempos testados (**Figura 4**).

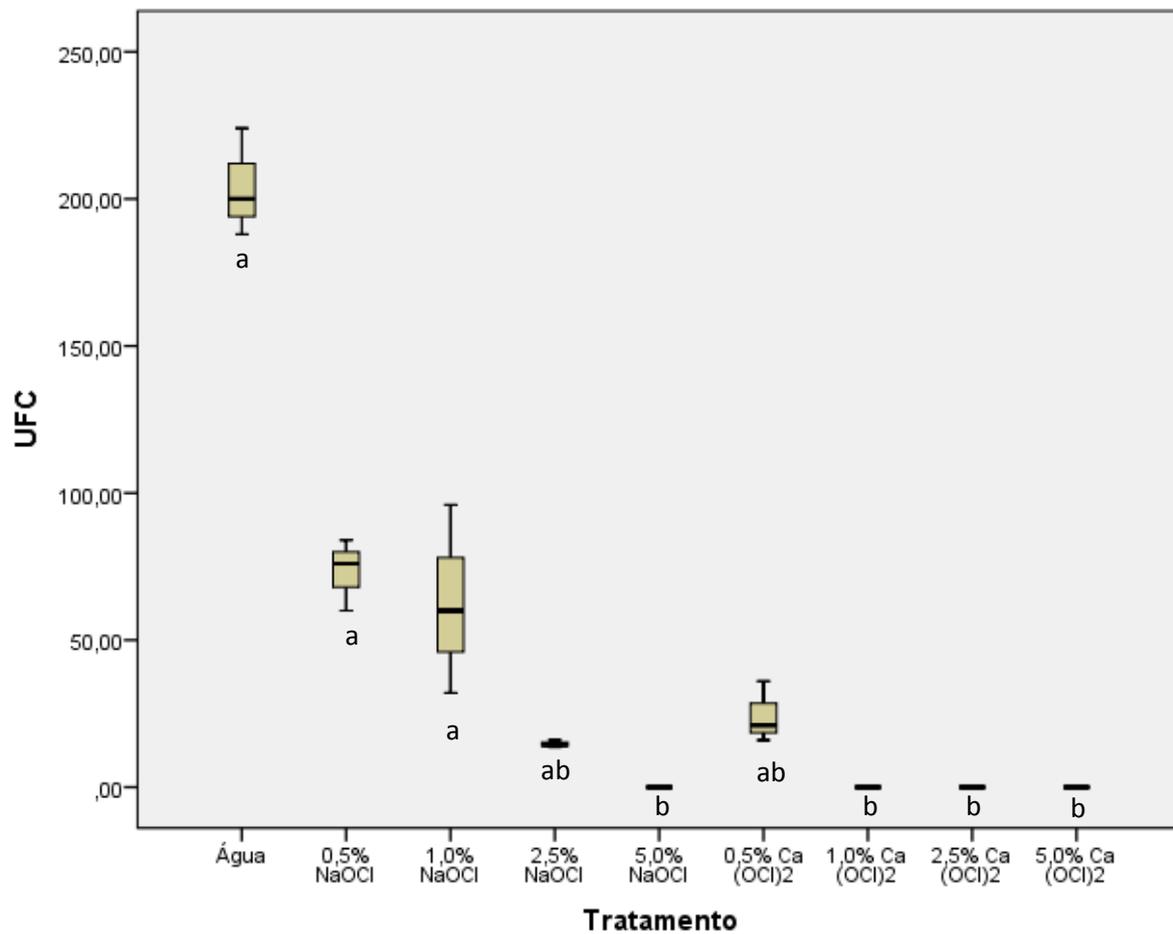


4

5 **Figura 4** – Efeito dos componentes teciduais e microbianos sobre o
 6 crescimento do *E. faecalis* em diferentes intervalos de tempo.

7

8 A ação antimicrobiana das substâncias testadas não foi alterada na
 9 presença de pó de dentina, albumina e endotoxina em 30 minutos e seis horas.
 10 Apenas a albumina foi capaz de diminuir a ação antimicrobiana do NaOCl nas
 11 concentrações de 0,5%, 1% e 2,5%. Apenas $\text{Ca}(\text{OCI})_2$ 0,5% apresentou
 12 diminuição da sua ação antimicrobiana, sendo igual à da água. A **Figura 5**
 13 apresenta a mediana, os percentis 25 e 75 para o número de UFC/ml para
 14 cada solução irrigadora quando em contato com a albumina, após 2 minutos.
 15 Houve diferença estatisticamente significativa entre o NaOCl 5%, $\text{Ca}(\text{OCI})_2$ 1%,
 16 2,5% e 5% em relação ao controle, mesmo na presença da albumina em 2
 17 minutos.



1
 2 **Figura 5** – Mediana, percentis 25 e 75 para o número de UFC/ml para as
 3 substâncias testes e controle em contato com a albumina por 2 minutos. Letras
 4 diferentes nas colunas indicam diferença estatisticamente significativa (Kruskal-
 5 Wallis, seguido de múltiplas comparações).

6

1 6 DISCUSSÃO

2

3 Embora já se tenha extensivamente estudado a ação antimicrobiana
4 e demais propriedades do hipoclorito de sódio (SIQUEIRA, *et al.*, 1997,
5 SIQUEIRA, *et al.*, 1998, GOMES, *et al.*, 2001, ESTRELA, *et al.*, 2002,
6 BERBER, *et al.*, 2006, ZEHNDER M., 2006, MOHAMMADI Z., 2008.) há
7 poucos dados relativos a propriedades para soluções de hipoclorito de cálcio,
8 especialmente em concentrações usualmente empregadas em Endodontia.

9 Neste estudo, avaliou-se o efeito antimicrobiano das soluções de
10 hipocloritos cálcio por meio de testes laboratoriais, frente à cepa de
11 *Enterococcus faecalis*. Este microrganismo foi selecionado, pois suas células
12 estão associadas ao insucesso em dentes tratados endodonticamente. Da
13 mesma forma, estas bactérias podem invadir túbulos dentinários e permanecer
14 viáveis (LOVE R, 2001). Além disso, o *E. faecalis* é uma das espécies mais
15 resistentes que estão presentes na cavidade oral. Assim, torna-se importante
16 testar sua suscetibilidade antimicrobiana para substâncias químicas de uso
17 endodôntico (SIQUEIRA, *et al.*, 1997).

18 O método de difusão em ágar é uma das técnicas mais antigas
19 empregadas para determinar sensibilidade aos antimicrobianos, sendo
20 amplamente utilizado em rotinas de laboratórios de microbiologia clínica. O
21 método é versátil e adequado para testar a suscetibilidade da maioria dos
22 microrganismos patogênicos, sendo também preciso e reprodutível (KAUSHIK,
23 *et al.*, 2013 EUCAST, 2014, MATUSCHEK, BROWN, KAHLMETER, 2014).
24 Devido às características inerentes de cada substância, existem limitações que
25 estão diretamente relacionadas à habilidade da substância de difundir pelo
26 ágar, o número de microrganismos inoculados, o pH dos substratos nas placas,
27 a viscosidade do ágar, as condições de armazenamento das placas, o tempo
28 incubação e a atividade metabólica dos microrganismos. Portanto, a
29 observação de zonas de inibição pode ser influenciada pela capacidade de
30 difusão da substância no Ágar e não representar a sua real eficácia contra os
31 microrganismos (GOMES, *et al.*, 2006; POGGIO, *et al.*, 2010).

1 O método de contato direto em meio líquido baseia-se no contato da
2 substância química com o microrganismo suspenso. Permite estabelecer o
3 tempo necessário para inibir o crescimento microbiano e comparar com
4 achados obtidos em outros testes (GOMES *et al.*, 2006). Porém, a aplicação
5 clínica dos resultados obtidos por meio dos métodos descritos apresentam
6 limitações, pois há no interior do sistema de canais radiculares uma infecção
7 polimicrobiana, geralmente organizada em biofilmes aderidos às paredes
8 dentinárias. Entretanto, a realização destes testes permite selecionar
9 características desejáveis de cada irrigante que podem ser exploradas
10 posteriormente por meio de métodos laboratoriais e clínicos mais complexos e
11 dispendiosos.

12 De Almeida e colaboradores (2014) compararam a eficácia
13 antimicrobiana do $\text{Ca}(\text{OCl})_2$ e do NaOCl associados irrigação ultrassônica
14 passiva em dentes bovinos infectados por *E. faecalis*. No entanto, até o
15 presente momento não foram feitos os testes iniciais, comparando-se com
16 padrões conhecidos.

17 No presente estudo utilizamos as concentrações de 0,5%, 1%, 2,5%
18 e 5%, para ambas as substâncias testadas. Todas as concentrações estudadas
19 demonstraram algum efeito antimicrobiano. Entretanto, os resultados mais
20 expressivos de ação antimicrobiana foram observados nas maiores
21 concentrações (2,5% e 5%), independentemente do método empregado. Estes
22 resultados concordam com os achados de Yesilsoy *et al.* (1995), Ayahan *et al.*
23 (1999), e Vianna *et al.* (2004). Todos estes estudos concluíram que a
24 diminuição das concentrações de NaOCl refletiu-se em proporcional redução
25 dos efeitos antimicrobianos. Vianna *et al.* (2004) concluíram que o NaOCl 0,5%
26 e 1% necessitaram um período de tempo similar entre si, mas maior do que as
27 soluções mais concentradas para inibir o crescimento microbiano.

28 No presente estudo, o NaOCl 5% mostrou um menor período de
29 tempo para inibir o crescimento do microrganismo testado. O mesmo
30 comportamento foi observado em soluções de hipoclorito de cálcio. As
31 concentrações mais elevadas apresentaram uma ação antimicrobiana mais
32 intensa e rápida, nos métodos de difusão em *Ágar* e no método de contato

1 direto em líquido, respectivamente. Observou-se que os halos de inibição do
2 crescimento microbiano das soluções de hipoclorito de Cálcio a 2,5% e 5%
3 foram estatisticamente similares aos da ampicilina. A ação antimicrobiana do
4 hipoclorito de sódio a 2,5% e a 5% não foi similar à da ampicilina. Entretanto,
5 não foi observada diferença estatisticamente significativa entre soluções de
6 hipoclorito de sódio e hipoclorito de cálcio a 2,5% e a 5%.

7 O uso de NaOCl a 0,5% ou a 1% exerceu pouco ou nenhum efeito
8 sobre *E. faecalis*, concordando com o relatado por Abou-Rass & Piccinino
9 (1982) e Baugartner & Cuenin (1992). Não se observou também diferença
10 estatisticamente significativa quando comparados à água destilada. Entretanto,
11 Brystrom & Sundqvist (1983) sugeriram que o emprego clínico de solução de
12 hipoclorito de sódio a 0,5% potencializou a redução microbiana no sistema de
13 canais radiculares, quando comparada à água destilada. Siqueira *et al* (2000)
14 observou que a redução microbiana proporcionada por NaOCl 1%, 2,5% ou
15 5,25% foi similar após o preparo de raízes contaminadas com *E. faecalis*.
16 Câmara *et al* (2009) observaram o mesmo comportamento quando diferentes
17 concentrações de hipoclorito de sódio foram empregadas, em conjunto com o
18 Sistema Pro Taper Universal, para o preparo de canais radiculares
19 contaminados com *C. albicans*, *P. aeruginosa*, *E. faecalis* e *S. aureus*. Embora
20 as soluções menos concentradas de NaOCl, e possivelmente as de $\text{Ca}(\text{OCl})_2$,
21 apresentem um efeito antimicrobiano limitado, elas demonstram uma
22 citotoxicidade inferior à das soluções mais concentradas (AUBUT *et al.*, 2010;
23 ALKAHTANI *et al.*, 2014). Siqueira *et al* (2000) ressaltam que a troca constante
24 da solução de hipoclorito 1% e o uso de um grande volume de irrigante pode
25 manter a efetividade do NaOCl, compensando os efeitos da concentração.

26 Atualmente, o tempo de preparo dos canais radiculares reduziu de
27 forma abrupta, especialmente devido ao emprego de sistemas de preparo
28 motorizados e de instrumento único. Câmara *et al.* (2009) indicam que o tempo
29 para o preparo *in vitro* de dentes utilizando-se o Sistema Pro Taper Universal
30 variou entre 1,5 e 4,2 minutos. Assim, a substância química auxiliar permanece
31 um menor período de tempo em contato com o sistema de canais radiculares.
32 Foi observado que, no método de contato em meio líquido, as concentrações

1 mais elevadas, tanto do hipoclorito de Sódio quanto do hipoclorito de Cálcio
2 apresentaram um efeito mais rápido de inibição do crescimento microbiano. Na
3 concentração de 0.5%, o provável tempo para inibir o crescimento do
4 microrganismo foi superior a 10 minutos. Gomes *et al.* (2001) relataram que o
5 NaOCl 0,5% necessitou de 30 min para destruir as células bacterianas. Em
6 relação às maiores concentrações de ambos os hipocloritos, pode-se observar
7 que não houve diferença estatisticamente significativa entre eles, sendo o
8 tempo de inibição do crescimento do *E. faecalis* de 15 segundos. Outros
9 estudos demonstraram resultados similares ao encontrado, quando analisaram
10 tempo de permanência de diferentes substâncias químicas auxiliares (GOMES
11 *et al.*, 2001; VIANNA *et al.*, 2004).

12 Cabe salientar ainda que embora o diâmetro dos halos de inibição
13 do $\text{Ca}(\text{OCl})_2$ a 0,5% e a 1% sejam similares, o tempo necessário para a
14 inibição do crescimento microbiano foi superior a 10 minutos e de 30 segundos
15 para as soluções, respectivamente. Porém, soluções de hipoclorito de cálcio a
16 2,5% e 5% demonstraram halos e tempos de inibição de crescimento similares.
17 Este comportamento foi observado também para soluções de hipoclorito de
18 sódio.

19 Componentes teciduais da dentina e do exsudato inflamatório
20 (albumina) podem desempenhar efeito inibitório na ação antimicrobiana das
21 substâncias químicas auxiliares (HAAPASALO, *et al.*, 2000. PORTENIER, *et*
22 *al.*, 2002, HAAPASALO, *et al.*, 2007, PAPPEN, *et al.*, 2010. MORGENTAL, *et*
23 *al.*, 2013). A metodologia utilizada no presente trabalho é similar às descritas
24 previamente na literatura, em que raízes de dentes extraídos são trituradas
25 formando pequenas partículas de dentina em pó, sendo utilizadas quantidades
26 padronizadas, permitindo estudos das interações entre dentina, medicamentos,
27 soluções irrigadoras e microrganismos. Também foi utilizada a albumina,
28 representando a proteína que mais se encontra no soro humano. Ela está
29 presente no exsudato inflamatório, fluido gengival, e fluido de dentinário
30 (PAPPEN, *et al.*, 2010).

31 Ao se avaliar o efeito dos inibidores teciduais sobre a ação
32 antimicrobiana de soluções de NaOCl e $\text{Ca}(\text{OCl})_2$, observou-se que a dentina

1 em pó e o LPS não inibiram a ação antimicrobiana das substâncias testadas.
2 Porém, a albumina no intervalo de 2 minutos retardou a ação do NaOCl a
3 0,5%, 1% e 2,5% e do $\text{Ca}(\text{OCl})_2$ a 0,5%. Observou-se que a água, o LPS, a
4 albumina e a dentina em pó, não inibiram o crescimento do *Enterococcus*
5 *faecalis* em todos os períodos experimentais. Pappen *et al.* (2010) concluíram
6 que a ação antimicrobiana do NaOCl é dependente da sua concentração e da
7 quantidade de albumina presente. A concentração total da proteína no soro
8 humano é entre 5,5% e 7,5%, no presente trabalho foi utilizada uma solução de
9 BSA 18% de BSA, conforme sugerido por Portainer *et al.* (2001). Um dos
10 mecanismos propostos que explicaria essa diminuição da ação antimicrobiana
11 do hipoclorito pela albumina é que há uma reação química entre a proteína e o
12 NaOCl (BAKER R, 1947). A reação resulta na degradação da proteína e a
13 redução no efeito do hipoclorito. Além disso, estudos sobre o mecanismo de
14 inflamação têm mostrado que a albumina pode reduzir a ação de degradação
15 causada pelo ácido hipocloroso (WASIL *et al.* 1987).

16 Morgental *et al.* (2013) observaram que o NaOCl 6% foi mais efetivo
17 frente ao *E. faecalis* que a solução salina e EDTA. Estes não demonstraram
18 nenhum efeito antibacteriano mensurável. Os autores relataram ainda que a
19 dentina promoveu um retardo na atividade antimicrobiana do NaOCl e QMiX,
20 mas não houve um impedimento completo da sua ação. Este dado não foi
21 verificado no presente estudo. Uma das justificativas poderia estar associada à
22 manipulação recente do NaOCl e o $\text{Ca}(\text{OCl})_2$, utilizados imediatamente após
23 serem preparados, sendo que os autores adquiriram o produto pronto para o
24 seu uso.

25 Infere-se que, na presença de albumina, é necessário um tempo de
26 contato superior a 2 minutos, uma concentração mais elevada e provavelmente
27 uma renovação constante da substância teste para que não se altere a ação
28 antimicrobiana das soluções, especialmente do NaOCl. Foram propostos
29 tempos para avaliação os tempos de 30 minutos e 6 horas. O período de 6
30 horas foi adotado para que se estabelecesse comparação com os resultados
31 obtidos para substâncias como CHX e QMiX que, por apresentarem
32 propriedade de substantividade, podem atuar por períodos mais longos no

1 interior do sistema de canais radiculares (ZEHNDER M., 2006; MORGENTAL,
2 *et al.*, 2013).

3 Fatores adicionais podem contribuir para a modulação do efeito
4 antimicrobiano das soluções químicas auxiliares. Dentre elas, destaca-se a
5 forma de organização dos microrganismos no sistema de canais radiculares.
6 Abdullah *et al.* (2005) indicam que existe uma diferença entre a capacidade de
7 eliminação das células de *Enterococcus faecalis* quando em biofilme, na forma
8 planctônica ou formando pellet.

9 A avaliação da ação antimicrobiana do hipoclorito de Sódio frente a
10 um biofilme de origem multi-especies já tem sido alvo de estudos,
11 principalmente utilizando microscopia eletrônica de varredura e confocal
12 (ORDINOLA-ZAPATA R., 2013, CARPIO-PEROCHENA, *et al.*, 2015). Os
13 mesmos achados para o hipoclorito de cálcio ainda não estão descritos na
14 literatura, até o presente momento. São necessários estudos que avaliem a
15 ação antimicrobiana do $\text{Ca}(\text{OCl})_2$ frente a biofilmes induzidos *in vitro*, *in situ*,
16 além de estudos clínicos.

17 Estudos adicionais devem ser realizados empregando-se
18 equipamentos e técnicas que potencializem o efeito das substâncias químicas
19 auxiliares, compensando eventuais perdas associadas às suas concentrações.
20 De Almeida *et al* (2014) sugeriu que a irrigação ultrassônica passiva pode
21 contribuir para uma maior eliminação de células de *E. faecalis*. Observou-se
22 que o hipoclorito de cálcio 2,5% associado à ativação ultrassônica passiva
23 conseguiu eliminar uma maior quantidade de *E. faecalis*, quando comparado ao
24 NaOCl 2,5%, associado ou não a ativação ultrassônica passiva.

25 Avaliados em conjunto, os achados do presente estudo demonstram
26 o efeito antimicrobiano das soluções de hipoclorito de cálcio, nas
27 concentrações similares àquelas do hipoclorito de sódio que são empregadas
28 clinicamente. Da mesma forma, observou-se que o efeito antimicrobiano destas
29 soluções foi pouco afetado por componentes teciduais e microbianos, como a
30 albumina e o pó de dentina.

31

7 CONCLUSÃO

Considerando-se os resultados obtidos e as limitações experimentais do presente estudo, pode-se concluir que:

- a) soluções de hipoclorito de cálcio apresentaram ação antimicrobiana frente ao *Enterococcus faecalis*, em concentrações similares às do hipoclorito de sódio empregadas em Endodontia;
- b) quanto maior a concentração da solução de hipoclorito de cálcio, maior a intensidade da ação antimicrobiana e menor o tempo necessário para a inibição do *Enterococcus faecalis*;
- c) a ação antimicrobiana do NaOCl e do $\text{Ca}(\text{OCl})_2$ nas mesmas concentrações foram similares entre si, tanto na metodologia do disco-difusão quanto no contato direto;
- d) a dentina e a endotoxina de *E. coli* não exerceram efeito modulador na ação antimicrobiana de soluções de hipoclorito de sódio e hipoclorito de cálcio;
- e) em períodos curtos de exposição, a albumina exerceu efeito inibitório da ação antimicrobiana em soluções de NaOCl 0,5%, 1% e 2,5% e também para a solução de $\text{Ca}(\text{OCl})_2$ a 0,5%.

1 REFERÊNCIAS

2

3 Abdullah M, Ng YL, Gulabivala K, Moles R, Spratt DA.
4 Susceptibilities of two *Enterococcus faecalis* phenotypes to root canal
5 medications. J Endod. 2005 Jan;31(1):30-6.

6

7 Abou-Rass M, Piccinino MV. The effectiveness of four clinical irrigation methods
8 on the removal of root canal debris. Oral Surg Oral Med Oral
9 Pathol. 1982 Sep;54(3):323-8.

10

11 Alkahtani A, Alkahtany SM, Anil S. An in vitro evaluation of
12 the cytotoxicity of varying concentrations of sodium hypochlorite on human
13 mesenchymal stem cells. J Contemp Dent Pract. 2014 Jul 1;15(4):473-81.

14

15 Aubut V, Pommel L, Verhille B, Orsière T, Garcia S, About I, Camps J.
16 Biological properties of a neutralized 2.5% sodium hypochlorite solution. Oral
17 Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2010 Feb;109(2):e120-5.

18

19 Ayhan H, Sultan N, Cirak M, Ruhi MZ, Bodur H. Antimicrobial effects of
20 various endodontic irrigants on selected microorganisms. Int Endod J. 1999
21 Mar;32(2):99-102.

22

23

24 Baker RW. Studies on the reaction between sodium hypochlorite and proteins;
25 physico-chemical study of the course of the reaction. Biochem
26 J. 1947;41(3):337-42.

27

28 Baumgartner JC, Cuenin PR. Efficacy of Several Concentrations of Sodium
29 Hypochlorite for Root Canal Irrigation. J Endod 1992 Dec. V18 (12);605-12.

30

31

32 Berber VB, Gomes BPF, Sena NT, Vianna ME, Ferraz CCR, Zaia AA, Souza-
33 Filho FJ. Efficacy of various concentrations of NaOCl and instrumentation
34 techniques in reducing *Enterococcus faecalis* within root canals and dentinal
35 tubules. Inter End Journal 2006; V39, 10-7.

36

37

38 Bystrom A, Sundqvist G. Bacteriologic evaluation of the effect of 0.5 percent
39 sodium hypochlorite in endodontic therapy. Oral Sug. 1983 March: 307-12.

40

41

- 1 Bystrom A & Sundqvist G. The antibacterial action of sodium hypochlorite and
2 EDTA in 60 cases of endodontic therapy. *Inter End Journal* 1985 18, 35-40.
3
- 4 Bystrom A, Happonen RP, Sjogren U, Sundqvist G. Healing of periapical
5 lesions of pulpless teeth after endodontic treatment with controlled asepsis.
6 *Endod Dent Traumatol.* 1987 Apr;3(2):58-63.
7
- 8 Calcium Hypochlorite (CaCl₂O₂)/Sodium Hypochlorite (NaOCl) CAS 7778-54-
9 3/7681-52-9; UN 1748/1791. ATSDR 2002 April.
10
- 11 Câmara AC, de Albuquerque MM, Aguiar CM, de Barros Correia AC.
12 In vitro antimicrobial activity of 0.5%, 1%,
13 and 2.5% sodium hypochlorite in root canals instrumented with the
14 ProTaper Universal system. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*
15 *Endod.* 2009 Aug;108(2):e55-61.
16
17
- 18 Carpio-Perochena A, Bramante CM, Andrade FB, Maliza AGA, Cavenago BC,
19 Marciano MA, Amoroso-Silva P, Duarte MH. Antibacterial and dissolution ability
20 of sodium hypochlorite in different pHs on multi-species biofilms. *Clin Oral*
21 *Invest* 2015 Feb; 1431-6.
22
- 23 Dahlén G, Samuelsson W, Molander A, Reit C. Identification and antimicrobial
24 susceptibility of enterococci isolated from the root canal. *Oral Microbiol Immunol*
25 2000; 15: 309–312.
26
- 27 de Almeida AP, Souza MA, Miyagaki DC, Bello YD, Cecchin D, Farina AP.
28 Comparative Evaluation of Calcium Hypochlorite and Sodium Hypochlorite
29 Associated with Passive Ultrasonic Irrigation on Antimicrobial Activity of a Root
30 Canal System Infected with *Enterococcus faecalis*: An In Vitro Study. *J Endod.*
31 2014; Dec;40(12):1953-7.
32
- 33 Dutta A, Saunders WP. Comparative evaluation of calcium hypochlorite and
34 sodium hypochlorite on Soft-tissue dissolution. *J Endod.* 2012; 38(10): 1395-8.
35
- 36 European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Version 4.0, valid
37 from 2014-01-01.
38
- 39 Estrela C, Pimenta FC, Ito IY, Bammann LL. *In Vitro* Determination of Direct
40 Antimicrobial Effect of Calcium Hydroxide. *J Endod*, 1998 Jan. V. 24(1); 15-7.
41

- 1
2 Estrela CRA. Eficácia antimicrobiana de soluções irrigadoras de canais
3 radiculares. Goiânia. Dissertação [Mestrado em Medicina Tropical] -
4 Universidade Federal de Goiás, 2000.
5
6 Estrela C, Estrela CRA, Barbin EL, Spanó JLC, Marchesan MA, Pécora JD.
7 Mechanism of action of sodium hypochlorite. Braz Dent J. 2002 13(2): 113-7.
8
9 Ferraz CCR, Gomes BPFA, Zaia AA, Teixeira FB, Souza-Filho FJ.
10 Comparative Study of the Antimicrobial Efficacy of Chlorhexidine Gel,
11 Chlorhexidine Solution and Sodium Hypochlorite as Endodontic Irrigants. Braz
12 Dent J 2007; 18(4): 294-98.
13
14
15 Gomes BPFA, Ferraz CCR, Vianna ME, Berber VB, Teixeira FB, Souza-Filho
16 FJ. *In vitro* antimicrobial activity of several concentrations of sodium
17 hypochlorite and chlorhexidine gluconate in the elimination of *Enterococcus*
18 *faecalis*. Int End Journal, 2001;34: 424–8.
19
20
21 Gomes BP, Vianna ME, Sena NT, Zaia AA, Ferraz CC, de Souza Filho FJ. In
22 vitro evaluation of the antimicrobial activity of calcium hydroxide combined with
23 chlorhexidine gel used as intracanal medicament. Oral Surg Oral Med Oral
24 Pathol Oral Radiol Endod. 2006 Oct;102(4):544-50.
25
26 Haapasalo HK, Sirén EK, Waltimo TMT, Ørstavik D, Haapasalo MPP.
27 Inactivation of local root canal medicaments by dentine: an *in vitro* study. Int
28 End Journal, 2000; 33:126-31.
29
30
31 Haapasalo M, Qian W, Portenier I, Waltimo T. Effects of dentin on the
32 antimicrobial properties of endodontic medicaments. J Endod 2007;33:917-25.
33
34 Harrison W, Hand RE. The effect of dilution and organic matter on the
35 antibacterial property of 5.25% sodium hypochlorite. J Endod 1981 Mar; V
36 7(3):128-32.
37
38 Hülsmann M & Hahn W. Complications during root canal irrigation –literature
39 review and case reports. Interl Endod Journal 2000. 33;186–193.
40
41

- 1 Hypocal - Tratamento para todas as águas. Hypocal® X Hipoclorito de sódio.
2 Disponível em: <<http://www.hypocal.com.br/hypocal-x-hipoclorito-de-sodio/>>.
3 Acesso em: 20 maio, 2015.
4
- 5 Kakehashi S, Stanley HR, Fitzgerald RJ. The effects of surgical exposures of
6 dental pulps in germ-free and conventional laboratory rats. Oral Surg Oral Med
7 Oral Pathol. 1965 Sep;20:340-9.
8
- 9 Lopes HP, Siqueira Jr JF. Endodontia - Biologia e Técnica. 3 Ed. Rio de Janeiro.
10 Guanabara Koogan. 2010.
11
- 12 Kaushik N, Rehani U, Ágarwal A, Kaushik M, Adlakha V. Antimicrobial Efficacy
13 of Endodontic Irrigants against *Enterococcus faecalis* and *Escherichia Coli*: An
14 in vitro study. Int J Clin Pediatr Dent. 2013 Sep;6(3):178-82.
15
- 16 Love RM. *Enterococcus faecalis* – a mechanism for its role in endodontic
17 failure. Int End Journal, 2001; 34:399–405.
18
- 19 Matuschek E, Brown DF, Kahlmeter G. Development of the EUCAST disk
20 diffusion antimicrobial susceptibility testing method and its implementation in
21 routine microbiology laboratories. Clin Microbiol Infect. 2014 Apr;20(4):O255-66.
22
- 23 Mercade M, Duran-Sindreu F, Kuttler S, Roig M, Durany N. Antimicrobial
24 efficacy of 4.2% sodium hypochlorite adjusted to pH 12, 7.5, and 6.5 in infected
25 human root canals. Oral Surg OralMed Oral Pathol Oral Radiol Endod
26 2009;107:295-8.
27
- 28 Mohammadi Z. Sodium hypochlorite in endodontics: an update review. Int Dent
29 J 2008;58:329-41.
30
- 31 Molander A, Reit C, Dahlén G, Kvist T. Microbiological status of root-filled teeth
32 with apical Periodontitis. Inter Endod Journal 1998 31, 1–7.
33
34
- 35 Moreira DM, Almeida JF, Ferraz CC, Gomes BP, Line SR, Zaia AA.
36 Structural analysis of bovine root dentin after use
37 of different endodontics auxiliary chemical substances. J Endod. 2009
38 Jul;35(7):1023-7.
39
40

- 1 Morgental RD, Singh A, Sappal H, Kopper PMM, Vier Pelisser FV, Peters OV.
2 Dentin Inhibits the Antibacterial Effect of New and Conventional Endodontic
3 Irrigants. J Endod 2013 Mar; V 39 (3): 406-10.
4
5
6 Oliveira *et al.* Quantitative assessment of root canal roughness with calcium-
7 based hypochlorite Irrigants by 3D CLSM. Brazilian Dental Journal, Sept 2014,
8 Vol.25(5), 409-415.
9
10 Ordinola-Zapata R. Efeito da irrigação e medicação endodôntica em dentina
11 infectada por biofilmes orais. Bauru Tese [Doutorado em Ciências
12 Odontológicas Aplicadas/Endodontia] - Universidade de São Paulo, 2013.
13
14 Pappen FG, Qian W, Aleksejūniene J, Leonardo RT, Leonardo MR, Haapasalo
15 M. Inhibition of sodium hypochlorite antimicrobial activity in the presence of
16 bovine serum albumin. J Endod 2010;36:268-71.
17
18
19 Poggio C, Arciola CR, Dagna A, Chiesa M, Sforza D, Visai L. Antimicrobial
20 activity of sodium hypochlorite-based irrigating solutions. Int J Artif Organs
21 2010; 33 (9): 654-659
22
23
24 Portenier I, Haapasalo H, Rye A, Waltimo T, Ørstavik D, Haapasalo M.
25 Inactivation of root canal medicaments by dentine, hydroxylapatite and bovine
26 serum albumin. Int Endod J. 2001 Apr;34(3):184-8.
27
28
29 Portenier I, Haapasalo H, Orstavik D, Yamauchi M, Haapasalo M. Inactivation
30 of the antibacterial activity of iodine potassium iodide and chlorhexidine
31 digluconate against *Enterococcus faecalis* by dentin, dentin matrix, type-I
32 collagen, and heat-killed microbial whole cells. J Endod 2002;28:634-7.
33
34 Portenier I, Waltimo T, Orstavik D, Haapasalo M. Killing of *Enterococcus*
35 *faecalis* by MTAD and chlorhexidine digluconate with or without cetrimide in the
36 presence or absence of dentine powder or BSA. J Endod 2006;32:138-41.
37
38 PPG Industries, Inc. One PPG Place Pittsburgh, PA 15272, 1999).
39
40 Sassone LM, Fidel R, Fidel S, Vieira M, Hirata R Jr.
41 The influence of organic load on the antimicrobial activity of different
42 concentrations of NaOCl and chlorhexidine in vitro. Int Endod J. 2003
43 Dec;36(12):848-52.
44

1 Spangberg L, Engström B, Langeland K. Biologic effects of dental materials.
2 Toxicity and antimicrobial effect of endodontic antiseptics in vitro. Oral Surg
3 Oral Med Oral Pathol. 1973 Dec;36(6):856-71.

4
5
6 Shrestha A, Kishen A. The effect of tissue inhibitors on the antibacterial activity
7 of chitosan nanoparticles and photodynamic therapy. J Endod 2012;38:1275–8.

8
9 Sim TPC, Knowles JC, Ng Y-L, Shelton J, Gulabivala K. Effect of sodium
10 hypochlorite on mechanical properties of dentine and tooth surface strain. Inter
11 Endod J, 2001; 34: 120–32.

12
13 Sirtes G, Waltimo T, Schaetzle M, Zehnder M. The Effects of Temperature on
14 Sodium Hypochlorite Short-Term Stability, Pulp Dissolution Capacity, and
15 Antimicrobial Efficacy. J Endod 2005;31:669-71.

16
17
18 Siqueira JF JR, Machado AG, Silveira RM, Lopes HP, De Uzeda M.
19 Evaluation of the effectiveness of sodium hypochlorite used with three irrigation
20 methods in the elimination of *Enterococcus faecalis* from the root canal, in vitro.
21 Int Endod J 1997; 30:279–282.

22
23
24 Siqueira JF Jr, Batista MMD, Fraga RC, de Uzeda M. Antibacterial Effects of
25 Endodontic Irrigants on Black-Pigmented Gram-Negative Anaerobes and
26 Facultative Bacteria. J Endod 1998 Jun; V24(6): 414-6.

27
28
29 Siqueira JF Jr, Rôças IN, Favieri A, Lima KC. Chemomechanical reduction of
30 the bacterial population in
31 the root canal after instrumentation and irrigation with 1%, 2.5%,
32 and 5.25% sodium hypochlorite. J Endod. 2000 Jun;26(6):331-4.

33
34
35 Siqueira JF Jr, Rôças IN, Paiva SSM, Guimarães-Pinto T, Magalhães KM,
36 Lima KC. Bacteriologic investigation of the effects of sodium hypochlorite and
37 chlorhexidine during the endodontic treatment of teeth with apical periodontitis.
38 Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2007 Jul; V 104(1): 122-9.

39
40
41 Swain PK¹, Nágaral SC, Kamalapurker PK, Damineni R.
42 Promising role of calcium hypochlorite as a disinfectant: an
43 *in vitro* evaluation regarding its effect on type V dental stone. J Contemp Dent
44 Pract. 2012 Nov 1;13(6):856-66.

45

1
2 Taneja S, Mishra N, Malik S. Comparative evaluation of human pulp tissue
3 dissolution by different concentrations of chlorine dioxide, calcium hypochlorite
4 and sodium hypochlorite: An in vitro study. J Conserv Dent. 2014
5 Nov;17(6):541-5.

6
7
8 Usha HL, Kaiwar A, Mehta D. Biofilm In Endodontics: New Understanding To
9 An Old Problem. IJCD 2010 Dec; 1(3):44-51.

10
11
12 Vianna ME, Gomes BPFA, Berber VB, Zaia AA, Ferraz CCR, Souza-Filho FJ. In
13 vitro evaluation of the antimicrobial activity of chlorhexidine and sodium
14 hypochlorite. Oral Surg, Oral Med, Oral Pathology, 2004 Jan; V97(1):79-84.

15
16
17 Vianna ME, Gomes BP. Efficacy of sodium hypochlorite combined with
18 chlorhexidine against *Enterococcus faecalis in vitro*. Oral Surg Oral Med Oral
19 Pathol Oral Radiol Endod. 2009 Apr;107(4):585-9.

20
21 Wasil M, Halliwell B, Hutchison DC, Baum H.
22 The antioxidant action of human extracellular fluids. Effect of human serum and
23 its protein components on the inactivation of alpha 1-
24 antiproteinase by hypochlorous acid and by hydrogen peroxide. Biochem. J.
25 (1987) 243, 219-223.

26
27
28 Whittaker HA, Mohler BM. The sterilization of milk bottles with calcium
29 hypochlorite. Laboratory Section of the American Public Health Association.
30 Havana, Cuba. 1911 December: 282-7.

31
32
33 Wong DTS, Cheung GSP. Extension of Bactericidal Effect of Sodium
34 Hypochlorite into Dentinal Tubules. J Endod 2014;40:825–829.

35
36
37 Yesilsoy C, Whitaker E, Cleveland D, Phillips E, Trope M. Antimicrobial and
38 Toxic Effects of Established and Potential Root Canal Irrigants. J Endod. 1995
39 21(10):513-5.

40
41 Zehnder M. Root canal irrigants. J Endod 2006;32:389-98.

42