

Universidade de Lisboa
Faculdade de Medicina Dentária



Avaliação in vitro e ex vivo da eficácia antimicrobiana de nanopartículas de MgO na eliminação de *Enterococcus faecalis*

Jory Gabriel Salgado Mendieta Romani

Orientadores:

Professor Doutor António Ginjeira

Professora Doutora Manuela Oliveira

Dissertação

Mestrado Integrado em Medicina Dentária

2021

Universidade de Lisboa
Faculdade de Medicina Dentária



Avaliação in vitro e ex vivo da eficácia antimicrobiana de nanopartículas de MgO na eliminação de *Enterococcus faecalis*

Jory Gabriel Salgado Mendieta Romani

Orientadores:

Professor Doutor António Ginjeira

Professora Doutora Manuela Oliveira

Dissertação

Mestrado Integrado em Medicina Dentária

2021

“A voz o chama... Voz poderosa como nenhuma outra. Porque é uma voz que chama para lutar por todos, pelo destino de todos, sem exceção... Voz que traz o bem maior do mundo, bem que é igual ao sol, mesmo maior que o sol: a liberdade.”

Jorge Amado, *Capitães da Areia*, 10.^a ed., Lisboa, Dom Quixote, 2012

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Doutor António Ginjeira, pela confiança, disponibilidade, paciência, motivação e boa disposição que sempre teve para comigo ao longo da realização deste trabalho. A quem dedico as seguintes palavras:

- “Por vezes sorrimos, e por outras choramos.
Se há algo em comum é que somos todos Humanos.
Humano não é apenas ser...um ser pensante.
É sorrir, chorar, acordar e adormecer, momentaneamente, e não eternamente.
É sentir sentimentos e sentidos.
Morrer ao adormecer, e ao despertar nascer.
Pensar perante acontecimentos. Mover perante sentimentos.
E caminhar, Sempre, à fé de viver.”

À Professora Manuela Oliveira pela constante disponibilidade, dedicação, simpatia e colaboração fornecida durante a realização deste trabalho. O meu eterno obrigado.

Ao Professor Luís Tavares pela prontidão em disponibilizar as instalações da FMVUL, necessárias à realização do protocolo experimental do presente trabalho.

À Dra. Eva Cunha pela paciência, supervisão e constante disponibilidade durante a realização dos procedimentos laboratoriais.

À Dra. Karla Baumotte, Dra. Ana Louraço e Dr. Bernardo Romão de Sousa por terem colaborado na escolha do meu tema de dissertação.

À Dra. Ana Ferro e ao Dr. Pedro Rabaço por terem contribuído significativamente para a recolha da amostra de dentes do presente trabalho.

Aos meus pais, a quem eu tudo devo. Prometo não agradecer em falas, mas em atos. Não me vou perder em ter, mas em ser. Ser para quem me criou, para quem conheci, para quem reconheci, e para quem criarei. Obrigado por me fazerem sentir, sempre, como o vosso melhor momento. E ainda só vamos no começo...

Um agradecimento especial aos meus avós e aos restantes familiares por todo o apoio, carinho e afeto.

Aos amigos que fiz ao longo destes 5 anos de faculdade, em especial à Margarida Coelho, a quem confiei, e bem, os meus sisos (entenda-se também juízo), pela amizade, companheirismo, entreajuda e conhecimento partilhado (fomos, de longe, o melhor par/dupla, e que fique aqui publicamente registado). Espero que a vida vos reserve sucesso, mas acima de tudo, felicidade. Obrigado por tudo!

Aos restantes amigos, que a vida me permitiu conhecer e reconhecer, por me apoiarem e fazerem de mim o que sou hoje. A vitória não é minha, é nossa.

Muito obrigado a todos!

RESUMO

Objetivos: Avaliar o potencial bactericida de uma solução de nanopartículas de óxido de magnésio (Nano-MgO) contra *Enterococcus faecalis*, comparativamente à irrigação convencional com uma solução de hipoclorito de sódio (NaOCl), através de um modelo *in vitro* e *ex vivo*.

Material e Métodos: Foram preparados e esterilizados 54 dentes unirradiculares. Realizou-se a preparação de uma solução de Nano-MgO (5mg/L). Foi preparada uma suspensão bacteriana da estirpe referência *E. faecalis* ATCC 51299. Avaliou-se preliminarmente a atividade antimicrobiana das soluções teste com recurso à técnica *spot-on-lawn*. Inoculou-se 10µL da suspensão de *E. faecalis* no interior de cada canal radicular. Após um período de incubação (37°C, durante 24h), os dentes foram irrigados segundo o padrão de desinfecção canalar estabelecido para cada grupo experimental: no grupo 1 (n=9) testou-se uma solução comercial de hipoclorito de sódio a 5,25 %, enquanto que no grupo 2 (n=9) testou-se a solução de Nano-MgO. A análise do protocolo de desinfecção experimental foi realizada através de métodos de cultura bacteriológica, sendo que todas as alterações na turvação do meio foram avaliadas e registadas às 24, 48 e 72h. Os resultados obtidos foram analisados estatisticamente, com recurso à realização do teste exato de Fisher, com nível de significância de 5%.

Resultados: Obtiveram-se diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) entre os resultados obtidos para os dois grupos experimentais, com a solução de Nano-MgO (5mg/L) a apresentar uma eficácia bactericida inferior relativamente à irrigação convencional com uma solução de NaOCl a 5,25%.

Conclusões: A aplicação de uma solução aquosa de Nano-MgO como irrigante canalar não é recomendada do ponto de vista clínico. Contudo, as Nano-MgO apresentam uma elevada atividade antimicrobiana *in vitro* contra *E. faecalis*, pelo que se sugere a realização de estudos futuros que avaliem a sua utilização numa outra fase do tratamento endodôntico, nomeadamente no momento de obturação canalar.

Palavras-Chave: *Enterococcus faecalis*, NaOCl, Nano-MgO, irrigantes canulares, antimicrobianos

ABSTRACT

Aim: The aim of this study was to evaluate the *in vitro* and *ex vivo* bactericidal potential of nano-magnesium oxide (MgO) aqueous solution against *Enterococcus faecalis*, compared to conventional irrigation with a sodium hypochlorite solution (NaOCl).

Material and Methods: 54 single-rooted teeth were prepared and sterilized. A Nano-MgO solution (5mg/L) was prepared. A bacterial suspension of the reference strain *E. faecalis* ATCC 51299 was prepared. The antimicrobial activity of the test solutions was preliminarily evaluated using spot-on-lawn technique. A 10 μ L suspension of *E. faecalis* was inoculated inside each root canal. After an incubation period (37°C, for 24h), the teeth were irrigated according to the canal disinfection protocol established for each experimental group: group 1 (n=9) tested a commercial 5.25% sodium hypochlorite solution, while group 2 (n=9) tested the Nano-MgO solution. The experimental disinfection protocol was analyzed using bacteriological culture methods. All changes in the turbidity of the culture medium were evaluated and recorded at 24, 48 and 72h. The results obtained were statistically analyzed using Fisher's exact test with a level of significance at 5%.

Results: Statistically significant differences ($p < 0.05$) were obtained between the experimental groups, with the Nano-MgO solution (5mg/L) showing a lower bactericidal efficacy compared to conventional irrigation with a 5.25% NaOCl solution.

Conclusions: The application of a Nano-MgO aqueous solution as a canal irrigant is not clinically recommended. However, Nano-MgO shows a high antimicrobial activity *in vitro* against *E. faecalis*. So further investigations should be carried out to evaluate its use in other phases of the endodontic treatment, namely during canal filling.

Keywords: *Enterococcus faecalis*, NaOCl, Nano-MgO, canal irrigants, antimicrobial agents

ÍNDICE

RESUMO	vii
ABSTRACT	ix
ÍNDICE DE TABELAS	xiii
ÍNDICE DE GRÁFICOS	xiii
ÍNDICE DE FIGURAS	xiv
LISTA DE ABREVIATURAS	xv
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Preparação químico-mecânica	2
1.2 Irrigantes canulares – Hipoclorito de sódio	2
1.3 Insucesso endodôntico – <i>Enterococcus faecalis</i>	3
1.4 Nanopartículas - Nanopartículas de Óxido de Magnésio	6
2. OBJETIVOS	8
3. MATERIAL E MÉTODOS	9
3.1 Preparação da amostra de dentes	9
3.2 Preparação de soluções	11
3.3 Preparação da suspensão bacteriana de inoculação	11
3.4 <i>Screening</i> da atividade antimicrobiana das soluções	12
3.5 Inoculação da suspensão bacteriana nos dentes	12
3.6 Protocolo de desinfecção experimental	12
3.7 Análise da desinfecção experimental	13
3.8 Análise estatística	14
4. RESULTADOS	15
4.1 Avaliação preliminar do potencial inibitório da solução de nanopartículas	15

4.2 Avaliação do potencial de desinfecção da solução de nanopartículas através de um modelo experimental	15
5. DISCUSSÃO	19
6. CONCLUSÕES	26
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	27
ANEXOS	33
Anexo I	33
Anexo II	36

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Grupos experimentais e de controle	10
Tabela 2: Análise da multiplicação bacteriana a partir dos dentes e cones do Grupo 1 (NaOCl, a 5,25%)	17
Tabela 3: Relação entre os resultados positivos obtidos para as amostras de dentes e cones do Grupo 1 (NaOCl, a 5,25%)	17
Tabela 4: Análise da multiplicação bacteriana a partir dos dentes e cones do Grupo 2 (Nano-MgO, a 5mg/L)	17
Tabela 5: Relação entre os irrigantes (Grupo 1 e 2) na desinfecção dos cones da amostra	18
Tabela 6: Relação entre os irrigantes (Grupo 1 e 2) na desinfecção dos dentes da amostra	18

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1: Representação de todos os grupos de estudo, analisando a presença ou ausência de multiplicação bacteriana às 24, 48 e 72h, no meio de incubação dos cones	16
Gráfico 2: Representação de todos os grupos de estudo, analisando a presença ou ausência de multiplicação bacteriana às 24, 48 e 72h, no meio de incubação dos dentes	16

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: <i>Screening</i> preliminar, após 24h de incubação	15
Figura 2: Microtubos com meio sem turvação e com turvação	15
Figura I: Determinação do comprimento canalar (13mm) dos dentes	33
Figura II: Verificação do comprimento canalar dos dentes (<i>extrusão do stop</i>)	33
Figura III: Verificação do comprimento canalar dos dentes (<i>stop</i> ajustado ao limite apical)	33
Figura IV: Banho de ultrassons	34
Figura V: Sementeira de <i>E. faecalis</i> (ATCC 51299), após 24h de incubação	34
Figura VI: Câmara de fluxo laminar	34
Figura VII: Tubos de ensaio com meio sem turvação e com turvação	35
Figura VIII: Avaliação microscópica com coloração Gram da pureza da cultura de <i>E. faecalis</i>	36
Figura IX: <i>Red Congo Agar</i> , após 24h de incubação	36

LISTA DE ABREVIATURAS

NaOCl – Hipoclorito de Sódio

E. faecalis – *Enterococcus faecalis*

UFC – Unidades Formadoras de Colónia

Nano-MgO – Nanopartículas de óxido de magnésio

JAC - Junção amelocementária

G - Gauge

BHI - Brain Heart Infusion

1. INTRODUÇÃO

De acordo com a Associação Dentária Americana, a medicina dentária pode ser definida como a área da medicina que está relacionada com a avaliação, diagnóstico, prevenção, e/ou tratamento (não cirúrgico, cirúrgico ou de procedimentos relacionados) de doenças, distúrbios e/ou condições que afetem a cavidade oral, área maxilofacial e/ou estruturas adjacentes.⁽¹⁾

A preservação dos dentes naturais de cada paciente deve ser o principal objetivo do médico dentista. Qualquer profissional da área da saúde deve zelar pela conservação do corpo humano e das suas funções.⁽²⁾ Atualmente, a opção de tratamento mais comum de um dente não vital consiste na realização de um tratamento endodôntico, por forma a assegurar a preservação do dente natural.⁽³⁾ A Endodontia é o ramo da medicina dentária que estuda a morfologia, fisiologia e patologia da polpa dentária humana e dos tecidos perirradiculares, pelo que a sua prática clínica inclui o diagnóstico, prevenção e tratamento de doenças e/ou lesões da polpa e condições perirradiculares associadas.⁽⁴⁾

A realização de um tratamento endodôntico está indicado para dentes cuja polpa se encontre irreversivelmente danificada ou necrótica, com ou sem sinais clínicos e/ou radiológicos de periodontite apical, e para situações de desvitalização eletiva. O objetivo do tratamento é preservar ou restaurar a saúde dos tecidos perirradiculares e prevenir futuras infeções, através da remoção de todo o tecido pulpar e radicular, instrumentação e preenchimento dos canais radiculares com materiais biocompatíveis.⁽⁵⁻⁷⁾

O tratamento endodôntico deve, idealmente, eliminar todos os microrganismos vivos presentes em todo o sistema do canal radicular, através da ação mecânica do instrumento endodôntico, assim como da ação antibacteriana do irrigante selecionado.⁽⁸⁾

No entanto, a elevada complexidade e variabilidade anatómica do canal radicular, limita a previsibilidade do desbridamento químico-mecânico.⁽⁹⁾ Cerca de 35% ou mais das superfícies do canal radicular podem permanecer inalteradas, após a finalização da instrumentação mecânica.⁽¹⁰⁾ Por esta razão, os microrganismos podem permanecer nos túbulos dentinários, estabelecer um suporte ambiental adequado à sua sobrevivência, proliferar e reinfetar todo o sistema do canal radicular.⁽¹¹⁾

Os microrganismos desempenham um papel fundamental na etiologia de doenças pulpares e periapicais.⁽¹²⁻¹⁴⁾ Mais de 300 espécies microbianas diferentes podem ser encontradas em canais radiculares infetados.⁽¹⁵⁾

A irrigação assume-se, assim, como uma parte essencial do tratamento endodôntico, já que assegura um desbridamento para além do que poderia ser alcançado, apenas, com a instrumentação do canal radicular.⁽⁹⁾

1.1 Preparação químico-mecânica

Durante o tratamento endodôntico convencional, os principais objetivos da preparação químico-mecânica incluem a remoção do tecido pulpar remanescente, eliminação dos microrganismos, remoção de detritos e conformação do(s) canal(is) radicular(es), de modo a permitir uma adequada desinfecção e preenchimento pelo material obturador.^(5,14)

A fase da instrumentação pressupõe o desbridamento mecânico do sistema canal e a criação de espaço suficiente para a ação das substâncias antimicrobianas.⁽¹⁶⁾ Deste modo, a preparação mecânica deve cumprir com os seguintes pressupostos: manutenção da anatomia canal original; manutenção da constrição apical; terminação da preparação num estreitamento apical; e configuração cônica do canal de coronal para apical.⁽⁵⁾

A preparação deve ser sempre realizada com irrigação abundante e frequente, que assegure a eliminação de microrganismos e detritos, lubrificação do canal radicular e dissolução de resíduos orgânicos.^(5,14) Os procedimentos de desbridamento e desinfecção são altamente dependentes da ação mecânica e química dos irrigantes. Os efeitos mecânicos da irrigação são assegurados pelo fluxo e refluxo da solução irrigante, que se geram no interior do sistema canal. Sabe-se que a população bacteriana é significativamente reduzida pelos efeitos mecânicos da irrigação, independentemente do tipo de irrigante usado. No entanto, está comprovado que compostos químicos com efeitos antibacterianos têm uma eficácia claramente superior na eliminação dos microrganismos canulares, quando comparados com solução salina.^(14,17)

1.2 Irrigantes canulares – Hipoclorito de sódio

A solução irrigante deve, idealmente, apresentar: um amplo espectro antimicrobiano, com alta eficácia contra microrganismos anaeróbios; capacidade de dissolver tecidos orgânicos, inativar endotoxinas e impedir a formação de *smear layer*, decorrente da instrumentação.⁽¹⁶⁾ Para além disto, e uma vez que, a solução irrigante entra em contacto com tecidos vivos, esta não deve ser tóxica, do ponto de vista sistémico, nem deve ser cáustica para os tecidos periodontais.^(5,16)

Assim, de todas as substâncias utilizadas atualmente, o hipoclorito de sódio possui a maioria dos requisitos necessários para se assumir como o irrigante canalar de eleição, pois consegue dissolver o tecido necrótico e a componente orgânica da *smear layer*, como elimina agentes patogénicos sésseis, organizados em biofilme e localizados nos túbulos dentinários.⁽¹⁶⁾

Apesar do hipoclorito de sódio ser amplamente utilizado em Endodontia como irrigante canalar, ainda não há consenso relativamente à concentração ideal a ser usada. A relação risco-benefício deve ser sempre avaliada aquando a seleção de soluções irrigantes.⁽¹⁴⁾ Spangberg *et al.* comprovaram que uma solução de hipoclorito de sódio a 5,25% apresenta eficácia elevada na eliminação de espécies bacterianas normalmente encontradas em canais radiculares infetados.⁽¹⁸⁾

1.3 Insucesso endodôntico – *Enterococcus faecalis*

Na maioria dos casos, as infeções endodônticas respondem bem ao tratamento endodôntico convencional. De facto, estudos longitudinais comprovam que, quando o canal radicular está devidamente instrumentado, desinfetado e obturado, a taxa de sucesso ronda os 86% a 93%, indicando que entre 7% a 14% das lesões periapicais não respondem ao tratamento convencional.⁽¹⁹⁾

Apesar da falta de consenso na literatura relativamente à definição de “falha” no tratamento endodôntico, alguns estudos indicam como insucesso a permanência dos sinais e sintomas clínicos, associada à presença de uma radiolucidez periapical, após o tratamento.⁽²⁰⁻²¹⁾

Quando o dente é tratado endodonticamente, este deve ser avaliado quer clinicamente quer radiograficamente, para confirmar o sucesso do tratamento. De facto, o paciente deve ser submetido a um conjunto de consultas de acompanhamento por forma a verificar o sucesso do tratamento e avaliar a funcionalidade do dente em questão.⁽²⁰⁾

São vários os fatores que podem estar associados ao fracasso do tratamento endodôntico, entre eles: persistência de bactérias intra e extra-canal; obturação inadequada do canal; sobreobturação; selagem coronal inadequada; presença de canais não instrumentados; procedimento iatrogénicos, como por exemplo abertura coronária incorreta; complicações associadas à instrumentação, como por exemplo perfurações ou fratura de instrumentos.^(20,22)

Uma das principais causas de insucesso endodôntico é a infeção microbiológica persistente. A importância das bactérias no desenvolvimento de infeções perirradiculares está

bem documentado na literatura, que refere que a persistência de microrganismos no interior dos canais no momento da obturação irá estar associada a uma maior probabilidade de insucesso. Bactérias presentes em áreas específicas do canal radicular, como istmos, túbulos dentinários e ramificações, podem resistir à ação dos irrigantes.^(20,23) De facto, um estudo realizado por Lin *et al.*, no qual se analisaram 236 casos de tratamentos endodônticos falhados, estabeleceu uma correlação positiva entre a presença de bactérias no interior do canal radicular e o insucesso endodôntico.⁽²⁴⁾

Os fatores que podem contribuir para uma infecção perirradicular persistente, após tratamento endodôntico, incluem infecção intra-radicular, infecção extra-radicular, reação de corpo estranho e quistos que contêm cristais de colesterol.⁽²⁵⁻²⁶⁾ A principal causa de insucesso é a sobrevivência de microrganismos na porção apical da raiz do dente obturado.⁽²⁶⁾

Ao contrário das infecções endodônticas primárias, que apresentam uma natureza polimicrobiana e uma predominância de bastonetes gram-negativos anaeróbios, os microrganismos envolvidos nas infecções secundárias, correspondem apenas a uma ou algumas espécies bacterianas.⁽²⁶⁻²⁷⁾ De acordo com Sunde *et al.*, 75% das lesões periapicais refratárias são colonizadas por espécies de *Staphylococcus*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas*, *Sphingomonas*, *Enterococcus*, *Enterobacter* ou *Candida*. Estes organismos podem, inclusivamente, ser identificados em pacientes sujeitos a quimioterapia prolongada contra doenças infecciosas, apresentando resistência intrínseca contra substâncias antimicrobianas. De facto, as bactérias pertencentes ao género *Enterococcus* apresentam uma resistência intrínseca contra alguns antibióticos, como por exemplo, a penicilina. A espécie *E. faecalis* demonstrou, *in vitro*, capacidade de resistir ao efeito antibacteriano do hidróxido de cálcio.⁽²⁷⁻²⁸⁾

Ao longo do tempo, muitos destes organismos desenvolveram mecanismos de adaptação e sobrevivência a ambientes adversos, associados a uma elevada plasticidade genética, o que lhes permite ultrapassar qualquer evolução que ocorra em termos de abordagem clínica.⁽²⁸⁾

Para além disso, tem sido reportada a existência de material extracelular a envolver agregados bacterianos, em lesões periapicais. Nesta estrutura semelhante a um biofilme, as células sedentárias presentes nas camadas mais internas apresentam taxas metabólicas mais baixas, o que as torna mais resistentes à ação de substâncias antimicrobianas: as espécies que constituem estas comunidades polimicrobianas desenvolvem mecanismos de comunicação, que lhes permite ativar bombas de efluxo para eliminação de antibióticos quando necessário ou diminuir a produção de proteínas-alvo de antibióticos convencionais; a estrutura do biofilme

facilita a troca de material genético entre espécies bacterianas, incluindo a transferência de genes de resistência a antimicrobianos.^(27,29)

Enterococcus faecalis é uma das espécies comumente encontradas na cavidade oral. Trata-se de um coco gram-positivo, anaeróbio facultativo, de difícil erradicação que, apesar de representar uma pequena percentagem da microbiota dos canais radiculares não tratados, desempenha um papel fundamental na etiologia de lesões perirradiculares persistentes, já que a sua prevalência varia entre os 24 a 77%.^(25-26,30) *E. faecalis* apresenta características únicas, que lhe permite sobreviver no interior dos canais radiculares, como organismo único ou como componente importante da microbiota.⁽²⁵⁻²⁶⁾

E. faecalis apresenta o potencial de expressar diversos fatores de virulência, nomeadamente enzimas líticas, citolisinas, substâncias de agregação, feromonas e ácido lipoteicóico. Foi comprovado que possui serina protease, gelatinase e proteína-ligadora de colagénio, que potenciam a sua ligação à dentina. A sua pequena dimensão permite uma invasão proficiente dos túbulos dentinários. Para além disto, possui a capacidade de se aderir às células do hospedeiro, expressar proteínas que permitem a competição com outras células bacterianas e de alterar as respostas do hospedeiro. *E. faecalis* pode também suprimir a ação dos linfócitos, contribuindo consideravelmente para o insucesso endodôntico.^(26,31-32)

Por outro lado, este tipo de microrganismo não se limita, apenas, a expressar vários fatores de virulência, como também é capaz de partilhar essas características com outras espécies, quando presente em biofilme, estruturas resistentes à fagocitose, à ação dos anticorpos e dos antimicrobianos, promovendo assim a sua sobrevivência e a capacidade de causar doença.^(26,33)

Stuart *et al.* afirmam que os endodontistas têm como desafio a implementação de métodos que eliminem efetivamente este microrganismo durante e após o tratamento endodôntico.⁽²⁶⁾

São muitos os estudos que têm sido conduzidos, por forma a estabelecer um protocolo eficaz na erradicação de *E. faecalis* do espaço do canal radicular.^(26,31)

Atualmente, os métodos mais eficazes para eliminar *E. faecalis* incluem o uso de uma boa técnica asséptica, o aumento do tamanho da preparação apical e a utilização de hipoclorito de sódio a 6% e de clorexidina a 2%, como irrigantes canulares.⁽²⁶⁾

Contudo, o uso de hipoclorito de sódio como irrigante tem várias limitações: não remove a *smear layer* e não fornece uma desinfeção completa do canal radicular.⁽³⁴⁾ Além disso, a literatura reporta uma elevada resistência de *E. faecalis* face a diversas substâncias

antibacterianas habitualmente utilizadas em Endodontia, nomeadamente ao hipoclorito de sódio e a medicamentos intra-canales, como o hidróxido de cálcio e a clorexidina.⁽³⁵⁾ De facto, vários canais radiculares infetados por *Enterococcus faecalis in vitro* demonstraram conter bactérias viáveis após o uso de hipoclorito de sódio a 4%.⁽¹⁷⁾

Neglia *et al.* demonstram noutro estudo, que embora ocorra uma grande redução no número de unidade de formação de colónias (UFC) de *E. faecalis* imediatamente após a aplicação de hipoclorito de sódio a 5,25%, este microrganismo mantém a sua capacidade de multiplicação após 72h, sendo que às 96h se atingem valores de UFC tão elevados e semelhantes aos obtidos em canais radiculares que não foram submetidos a qualquer tratamento.⁽³⁴⁾

A diminuição da eficácia antibacteriana do hipoclorito de sódio a longo prazo pode ser explicada quer pela inativação que sofre por parte da dentina, colagénio e de outros componentes orgânicos presentes no canal radicular, quer pela fraca capacidade de penetração nos canalículos dentinários devido à sua elevada tensão superficial.⁽³⁴⁻³⁵⁾

Deste modo, a investigação contínua acerca dos métodos ou materiais que assegurem a eliminação de *E. faecalis* do aparelho dentário é extremamente relevante para o sucesso da Endodontia.⁽²⁶⁾

1.4 Nanopartículas - Nanopartículas de Óxido de Magnésio

Os avanços registados na área da nanotecnologia têm permitido a realização de estudos laboratoriais acerca da utilização de óxidos metálicos, de tamanho nanométrico, como agentes antimicrobianos.⁽³⁵⁾

O uso de nanopartículas de óxidos metálicos inorgânicos tem sido alvo de muitas investigações científicas, já que estas partículas apresentam, mesmo em baixas concentrações, uma atividade antimicrobiana promissora, assim como, biocompatibilidade com células de mamíferos.⁽³⁵⁻³⁶⁾

As nanopartículas de óxidos metálicos afetam principalmente a integridade da parede celular bacteriana. A maioria das bactérias patogénicas apresenta uma parede celular constituída, essencialmente, por peptidoglicano, que permite a defesa contra as células imunitárias do hospedeiro, e por proteínas de superfície, que asseguram a adesão e colonização. Uma vez que estes componentes correspondem a macromoléculas carregadas eletricamente, a interrupção da sua função principal, e até mesmo a alteração da sua localização, podem ser

alcançadas pela introdução de interações específicas com a superfície de nanopartículas de óxidos metálicos.^(35,37-39)

As nanopartículas de Óxido de Magnésio (Nano-MgO) são partículas funcionais de óxido metálico que demonstraram ter uma elevada atividade antimicrobiana contra bactérias gram-positivas e gram-negativas, esporos e vírus, por apresentarem uma grande área de superfície, abundância em defeitos cristalográficos e partículas com carga positiva, que irão interagir com as paredes celulares bacterianas, carregadas negativamente.^(35,37,40)

Comparativamente com as partículas de nano-TiO₂, nano-prata, nano-cobre e outros tipos de nanomateriais e substâncias bactericidas, as Nano-MgO têm sido reportadas como aquelas que apresentam o menor nível de toxicidade.^(35,40)

Para além disto, o ótimo desempenho das Nano-MgO, em ambiente aquoso, pode ser também explicado pela formação de aniões de superóxido (O₂⁻), que irão induzir alterações na permeabilidade das membranas bacterianas, e conduzir à acumulação dessas nanopartículas no citoplasma dos microrganismos.⁽⁴¹⁻⁴²⁾

Num estudo *ex vivo*, Monzavi *et al.* demonstraram que uma solução aquosa de Nano-MgO, com dimensões entre os 70 a 150 nanómetros apresentou uma atividade antimicrobiana mais eficiente e eficaz, a longo prazo, quando comparada com uma solução de hipoclorito de sódio a 5,25%. Isto pode ser explicado pelo facto de as nanopartículas possuírem a capacidade única de resistir a condições ambientais e temperatura adversas, pelo que podem permanecer ativas no canal radicular por longos períodos de tempo, e conseqüentemente manter o seu efeito antimicrobiano.^(35,43)

Huang *et al.* reportaram que a eficácia bactericida de Nano-MgO, com uma dimensão entre os 45 a 70 nanómetros, aumenta moderadamente com a diminuição da dimensão das partículas. Contudo, em nanopartículas com menos de 45 nanómetros, essa mesma eficácia bactericida aumenta significativamente com a diminuição da sua dimensão.⁽⁴¹⁾

A utilização de uma solução com nanopartículas de Óxido de Magnésio como irrigante canalar pode revelar-se vantajosa, tendo em conta as várias limitações do irrigante mais utilizado atualmente, o hipoclorito de sódio.⁽³⁵⁾

2. OBJETIVOS

Este estudo tem como principal objetivo avaliar o potencial bactericida de uma solução de nanopartículas de MgO (5mg/L) com 20 nanómetros de dimensão, comparativamente à irrigação convencional com uma solução de NaOCl a 5,25% (m/v).

Hipóteses de trabalho

Hipótese nula (H0): A solução de Nano-MgO (5mg/L), com 20 nanómetros de dimensão, no interior de canais infetados com *Enterococcus faecalis*, tem uma eficácia bactericida igual ou inferior à irrigação convencional com uma solução de NaOCl a 5,25% (m/v).

Hipótese alternativa (H1): A solução de Nano-MgO (5mg/L), com 20 nanómetros de dimensão, no interior de canais infetados com *Enterococcus faecalis*, tem uma eficácia bactericida superior à irrigação convencional com uma solução de NaOCl a 5,25% (m/v).

3. MATERIAL E METÓDOS

3.1 Preparação da amostra de dentes

Para a realização deste estudo, procedeu-se à recolha de 76 dentes unirradiculares, obtidos através da Clínica Externa da FMDUL e clínicas privadas de Lisboa. Os dentes foram mantidos em soro fisiológico após extração, até ao seu processamento.

Foi selecionada uma amostra homogénea de 54 dentes, de acordo com os seguintes critérios: dentes unirradiculares; com um só canal; sem grandes curvaturas; e comprimento radicular médio de 13mm (medido desde a junção amelocementária até ao ápex dentário). Assim, do total de 76 dentes obtidos, 22 foram rejeitados, pois não cumpriam os critérios de seleção definidos para a composição da amostra do presente estudo.

Terminada a seleção de dentes, procedeu-se à destarização minuciosa de toda a amostra, com recurso a ultrassons, e de seguida, à secção da coroa dentária, ao nível da junção amelocementária (JAC), com uma broca diamantada cilíndrica, colocada numa turbina.

Estabeleceu-se um comprimento canal de 13mm (Anexo I, Figura I), e um comprimento de trabalho de 12mm. Para determinar o comprimento de trabalho, foi introduzida uma lima *Kerr* nº10 (*Dentsply-Maillefer*, Suíça) até se visualizar a sua saída pelo ápex (Anexo I, Figura II). Recuou-se depois a lima até a um ponto em que esta deixou de ser visível (Anexo I, Figura III) e ajustou-se o respetivo *stop*. Retirou-se a lima e registou-se o respetivo comprimento canal. O comprimento de trabalho foi então determinado, ao subtrair um milímetro a esta medida.

Foram excluídos deste estudo os dentes que não foram possíveis de permeabilizar e os de comprimento canal inferior a 13mm. Os dentes cujo comprimento canal foi superior a 13mm foram novamente cortados até se obter esse valor.

Posteriormente, realizou-se a instrumentação dos dentes da amostra com limas *WaveOne Gold* (*Dentsply-Maillefer*, Suíça), iniciando o protocolo de instrumentação com o estabelecimento da via de permeabilidade com limas *K10*. A instrumentação definida incluiu limas de endodontia mecanizada *Small* (ISO 020) e *Primary* (ISO 025), utilizando-se um motor *WaveOne* (*Dentsply-Maillefer*, Suíça) para o efeito. Entre cada lima mecanizada, efetuou-se irrigação com Hipoclorito de Sódio a 5%, usando seringa e agulha de saída apical 27G (*BD Microlance 3*, Becton Dickinson SA, Espanha), e permeabilidade com limas *K10*.

Para promover a eliminação da *smear layer* e a exposição dos túbulos dentinários, recorreu-se à irrigação com 1mL de ácido cítrico a 10% (m/v) durante 1minuto⁽¹⁶⁾, e irrigação com 1mL de água destilada durante 30 segundos. Os dentes foram sempre conservados em água destilada para manter a hidratação dos mesmos.⁽⁴⁴⁾

Posteriormente, distribuíram-se, e de uma forma aleatória, os dentes pelos grupos experimentais e de controlo, e selaram-se os ápices e toda a superfície radicular das raízes com duas camadas de verniz de unhas⁽⁴⁴⁾, de diferentes cores, consoante o grupo onde se inseriam. Por fim, os dentes foram acondicionados em mangas individuais de esterilização, e esterilizados em autoclave a 121 °C durante 20 minutos.

Os 54 dentes selecionados e tratados foram divididos por 2 grupos experimentais (n=18) e por 2 grupos controlo (n=18), por cada grupo experimental (Tabela 1).

Cada grupo experimental teve como objetivo testar a eficácia de um método de desinfeção canalar diferente. O grupo 1 (n=9) foi utilizado para testar a eficácia de desinfeção de uma solução de NaOCl a 5,25% (m/v) (*PPH CERKAMED*, Polónia), enquanto que o grupo 2 (n=9) foi utilizado para testar a eficácia antimicrobiana de uma solução de Nano-MgO (5mg/L).

Constituíram-se dois grupos controlo (n=18) para cada grupo experimental, como método de averiguação da qualidade da progressão do estudo. Para tal, 9 dentes foram inoculados com meio *Brain Heart Infusion* (BHI, VWR, Bélgica) estéril, e irrigados com a solução neutralizadora correspondente (controlo A). Os restantes 9 dentes foram inoculados com a suspensão da estirpe bacteriana *E. faecalis*, estabelecida de acordo com o descrito no ponto 3.3, seguido de irrigação com a solução neutralizadora correspondente (controlo B).

O grupo controlo A (n=18) permitiu testar as condições de esterilidade do meio e das condições de incubação/manipulação. O grupo controlo B (n=18) permitiu avaliar se as soluções neutralizadoras (solução de Tiosulfato de Sódio, a 5%, e solução de Cloreto de Potássio, a 0.03M) não tinham qualquer ação letal sobre a estirpe, e se esta se mantinha viável durante as 72h do protocolo experimental.

Tabela 1 – Grupos experimentais e de controlo.

Grupos experimentais	
Grupo 1 (n=9)	Solução de NaOCl a 5,25%
Grupo 2 (n=9)	Solução de Nano-MgO (5mg/L)

Grupos controlo	
Grupo A1 (n=9)	Meio BHI estéril e Tiosulfato de Sódio (5%, m/v)
Grupo A2 (n=9)	Meio BHI estéril e Cloreto de Potássio (0.03M)
Grupo B1 (n=9)	Inoculado com <i>E. faecalis</i> e Tiosulfato de Sódio (5%, m/v)
Grupo B2 (n=9)	Inoculado com <i>E. faecalis</i> e Cloreto de Potássio (0.03M)

3.2 Preparação de soluções

Solução de Nano-MgO:

As nanopartículas de óxido de magnésio (MgO), com dimensão igual a 20nm, foram adquiridas à *GetNanoMaterials* (St-Cannat, França). Na preparação da solução, foram dissolvidos 2,5mg deste nanopó em 500mL de água ultrapura, obtida previamente através de um sistema Milli-Q (*Sistema Milli-Q® Integral*, Millipore, EUA), de modo a obter a concentração desejada (5mg/L).⁽³⁵⁾ A solução foi depois submetida a um banho de ultrassons (*Ultrasonic Bath*, Modelo MXB14, Grant Instruments, Reino Unido) (Anexo I, Figura IV), durante 15 minutos a 50 kHz.

Soluções neutralizadoras:

As duas soluções neutralizadoras, solução de Tiosulfato de Sódio e de Cloreto de Potássio, também foram preparadas, por forma a assegurar as concentrações pretendidas, 5% (m/v) e 0.03 (M), respetivamente.⁽³⁵⁾

Todas as soluções foram esterilizadas em autoclave a 121°C durante 15 minutos.

3.3 Preparação da suspensão bacteriana de inoculação

Para preparar a suspensão bacteriana de inoculação, a estirpe referência *E. faecalis* ATCC 51299 foi inoculada em meio não seletivo BHI, e sujeita a incubação durante 24 horas a 37°C (Anexo I, Figura V).

Após incubação, a pureza da cultura foi confirmada através de uma avaliação macroscópica e microscópica com coloração de Gram, e a capacidade de produção de biofilme foi determinada fenotipicamente com recurso à metodologia de *Red Congo Agar*.⁽⁴⁵⁾

De seguida, procedeu-se à realização de uma suspensão bacteriana em NaCl (0,9%), ajustada a uma turvação de 0,5 na escala de McFarland ($\approx 10^8$ CFU/mL), posteriormente diluída de 1:10 em BHI líquido.

3.4 Screening da atividade antimicrobiana das soluções

Por forma a realizar uma avaliação preliminar da atividade antimicrobiana das soluções teste efetuou-se uma sementeira por esgotamento em tapete da suspensão bacteriana de *E. faecalis*, em BHI agar. A atividade antimicrobiana foi avaliada através da técnica *spot-on-lawn*, baseada na aplicação de 10 μ L de cada solução sob o tapete bacteriano, seguida de incubação a 37°C, durante 24h. No final desse período a placa foi observada para identificação de halos de inibição microbiana.

3.5 Inoculação da suspensão bacteriana nos dentes

Os dentes foram introduzidos em microtubos estéreis de 2,5mL, que continham 100 μ L de água destilada esterilizada, de forma a assegurar um ambiente húmido. De seguida, cada canal radicular foi inoculado com 10 μ L da suspensão de *E. faecalis* preparada anteriormente, com exceção do controlo negativo, que foi inoculado com BHI estéril. Todo este processo foi realizado numa câmara de fluxo laminar (Anexo I, Figura VI), por forma a assegurar um ambiente estéril. Após inoculação, os microtubos foram incubados a 37°C, durante 24h, em atmosfera húmida confinada, para permitir a formação do biofilme bacteriano.

3.6 Protocolo de desinfeção experimental

Após o período de incubação, os dentes foram irrigados, segundo o padrão de desinfeção canal ar estabelecido para cada grupo. Todos os procedimentos foram realizados com condições e materiais assépticos, em câmara de fluxo laminar.

GRUPO 1: Irrigação com NaOCl a 5,25 % (m/v)

- 9 dentes, previamente inoculados com *E. faecalis*, foram irrigados com 1mL de NaOCl a 5,25% (m/v), deixando atuar durante 2min. Seguidamente, inativou-se o NaOCl, irrigando com 0,4mL de Tiosulfato de Sódio a 5% (m/v), deixando atuar durante 2min.

GRUPO 2: Irrigação com Nano-MgO (5mg/L)

- 9 dentes, previamente inoculados com *E. faecalis*, foram irrigados com 1mL de Nano-MgO (5mg/L), deixando atuar durante 2min. Seguidamente, inativou-se as Nano-MgO, irrigando com 0,4mL de Cloreto de Potássio (0.03M), deixando atuar durante 2min.

GRUPO A1: Controlo Negativo

- Irrigaram-se 9 dentes, que previamente tinham sido inoculados com 10µL de BHI estéril, com 0,4mL de Tiosulfato de Sódio a 5% (m/v) e deixou-se atuar durante 2min.

GRUPO A2: Controlo Negativo

- Irrigaram-se 9 dentes, que previamente tinham sido inoculados com 10µL de BHI estéril, com 0,4mL de Cloreto de Potássio (0.03M) e deixou-se atuar durante 2min.

GRUPO B1: Controlo Positivo

- Irrigaram-se 9 dentes, previamente inoculados com *E. faecalis*, com 0,4mL de Tiosulfato de Sódio a 5% (m/v) e deixou-se atuar durante 2min.

GRUPO B2: Controlo Positivo

- Irrigaram-se 9 dentes, previamente inoculados com *E. faecalis*, com 0,4mL de Cloreto de Potássio (0.03M) e deixou-se atuar durante 2min.

Todos os procedimentos de irrigação foram realizados com recurso a seringas convencionais e agulhas esterilizadas, 26G com saída apical (*Sterican*, Braun Melsungen, Alemanha).

3.7 Análise da desinfeção experimental

Logo após a realização dos procedimentos de irrigação, foi introduzido um cone de papel esterilizado de diâmetro *Primary* (ISO 025) no interior de cada canal.⁽⁴⁶⁾ De seguida, este cone foi introduzido num tubo de ensaio estéril que continha 5mL de BHI estéril.

Para além disso, e a seguir ao procedimento descrito anteriormente, cada dente foi realocado para um novo microtubo estéril de 2,5mL, que continha 1mL de BHI estéril.

Os tubos que continham os cones, assim como, os microtubos que continham os dentes foram incubados em estufa, a 37°C, durante 72h, de modo a avaliar uma eventual multiplicação bacteriana, conferida pela observação de turvação do meio (Anexo I, Figura VII).⁽⁴⁶⁾ Deste modo, os tubos foram sujeitos a homogeneização através de um Vortex a cada 24h, para permitir a difusão do oxigénio, nutrientes e metabolitos.

Para todos os grupos de estudo as alterações na turvação do meio foram avaliadas e registadas às 24, 48 e 72h.

3.8 Análise estatística

A análise estatística foi efetuada usando o programa SPSS (*Statistical Package for the Social Sciences*, SPSS Inc, versão 26, USA).

Compararam-se os resultados pelo cruzamento de variáveis utilizando o teste exato de Fisher, para avaliar eventuais diferenças entre os grupos experimentais. Os valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

4. RESULTADOS

4.1 Avaliação preliminar do potencial inibitório da solução de nanopartículas

O potencial inibitório de uma solução de nanopartículas de MgO (5mg/L) foi primeiramente confirmado através de um teste *spot-on-lawn* baseado na realização de uma sementeira em tapete da suspensão bacteriana de *E. faecalis*, no qual foram aplicados 10 μ L de cada solução.

Após 24h de incubação, observou-se a formação de um halo de inibição microbiana, com 12mm de diâmetro, correspondente ao local de aplicação da solução de Nano-MgO (5mg/L). As restantes soluções avaliadas não deram origem à formação de halos de inibição microbiana (Figura 1).

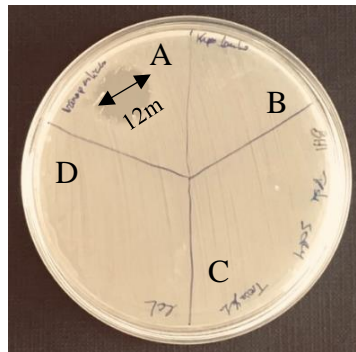


Figura 1: *Screening* preliminar, após 24h de incubação (A - Nano-MgO, 5 mg/L; B - NaOCl, 5,25%; C - Tiosulfato de Sódio, 5%; D - Cloreto de Potássio, 0.03M).

4.2 Avaliação do potencial de desinfecção da solução de nanopartículas através de um modelo experimental

O potencial de desinfecção da solução de nanopartículas e restantes soluções aplicadas em cada um dos grupos de estudo foi averiguada visualmente através da observação do grau de turvação do meio, onde foram incubados quer os cones quer os dentes (Figura 2). Os resultados encontram-se representados no Gráfico 1 e Gráfico 2, respetivamente, onde se podem observar os resultados obtidos correspondentes aos irrigantes usados em cada grupo, analisando a presença ou ausência de multiplicação bacteriana às 24, 48 e 72h.

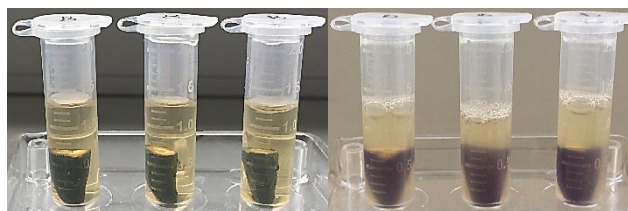


Figura 2: Microtubos com meio sem turvação, à esquerda, e com meio com turvação, à direita.

O meio das incubações correspondentes aos grupos de controlo negativo não apresentou turvação (Gráfico 1 e 2), permitindo confirmar que o ensaio foi realizado em condições de esterilidade, relativamente ao meio e às condições de incubação/manipulação. Por outro lado, o meio das incubações correspondentes aos grupos de controlo positivo apresentou turvação (Gráfico 1 e 2), demonstrando que as soluções neutralizadoras utilizadas nos ensaios (solução de Tiossulfato de Sódio, a 5%, e solução de Cloreto de Potássio, a 0.03M) não tiveram qualquer ação inibitória sobre a estirpe, e que esta se manteve viável durante as 72h do protocolo experimental.

Gráfico 1 - Representação de todos os grupos de estudo, analisando a presença ou ausência de multiplicação bacteriana às 24, 48 e 72h, no meio de incubação dos cones.

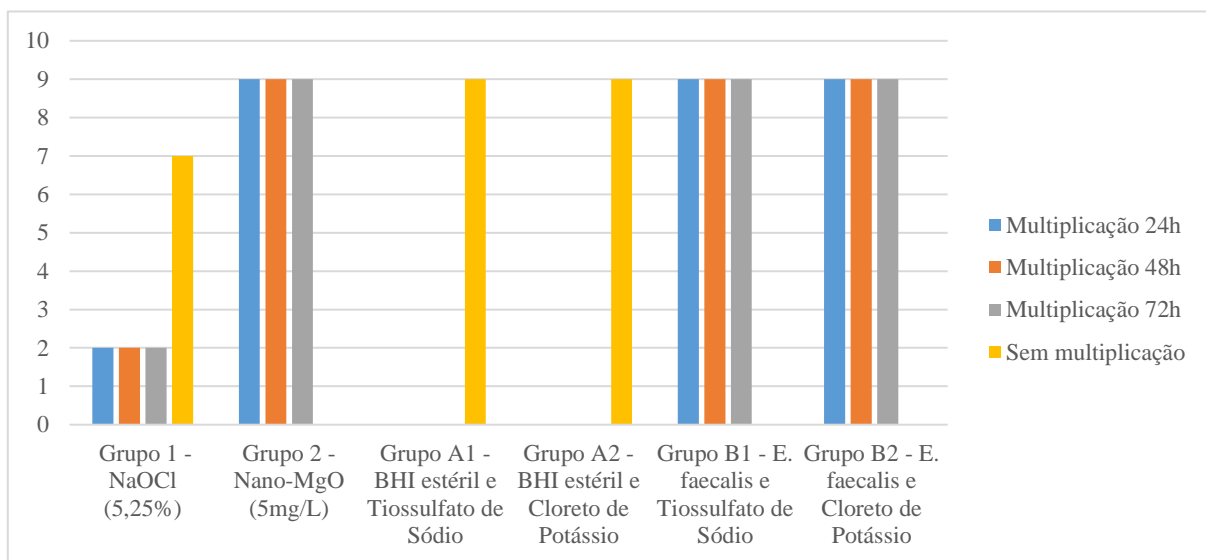
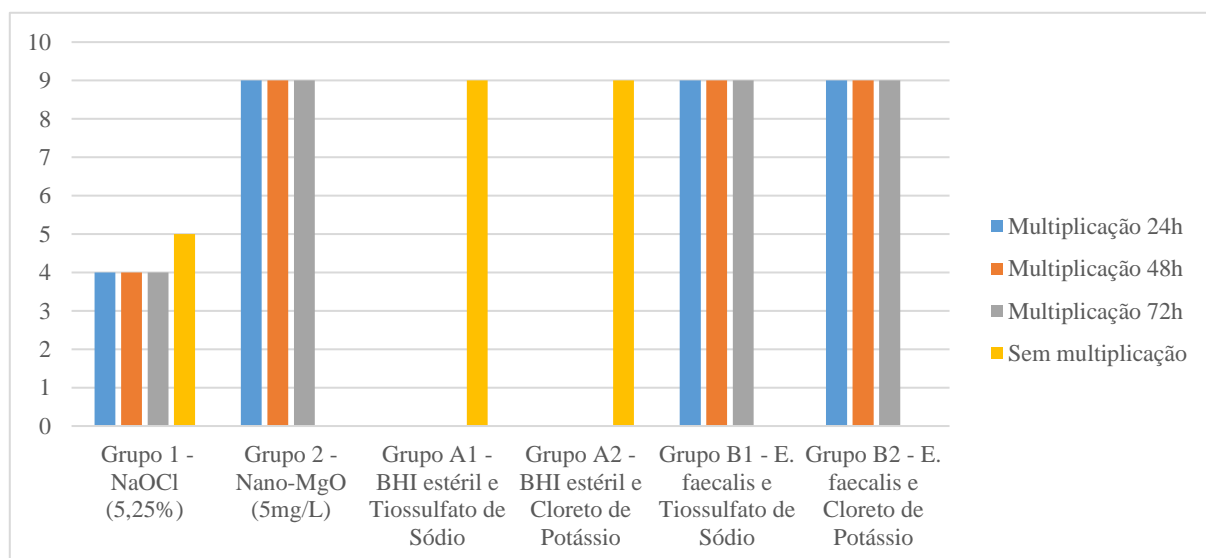


Gráfico 2 - Representação de todos os grupos de estudo, analisando a presença ou ausência de multiplicação bacteriana às 24, 48 e 72h, no meio de incubação dos dentes.



No grupo 1 (Tabela 2), foi possível observar a ocorrência de multiplicação bacteriana após 24h de incubação no meio de 2 dos cones, sendo que não se observou qualquer alteração até ao fim do período de incubação (72h). Em relação à incubação em meio de cultura dos dentes deste mesmo grupo (Tabela 2), nas primeiras 24h verificou-se multiplicação bacteriana a partir de um maior número de dentes, em comparação com a amostra de cones.

Tabela 2: Análise da multiplicação bacteriana a partir dos cones e dentes do Grupo 1 (NaOCl, a 5,25%).

Grupo 1 - NaOCl (5,25%)		Multiplicação 24h	Multiplicação 48h	Multiplicação 72h	Sem multiplicação
	Cones	2	2	2	7
Dentes	4	4	4	5	

Foi realizada a avaliação estatística dos resultados de modo a comparar o número de amostras positiva nos cones e nos dentes (Tabela 3), no final do período de incubação, tendo-se verificado que não existem diferenças estatisticamente significativas entre os grupos ($p>0,05$).

Tabela 3: Relação entre os resultados positivos obtidos para as amostras de cones e dentes do Grupo 1 (NaOCl, a 5,25%).

	Significância Sig. (2 lados)
Teste exato de Fisher	,620

No grupo 2 (Tabela 4), foi possível constatar multiplicação bacteriana às 24h a partir de todos os cones avaliados ($n=9$), assim como, em todos os dentes deste mesmo grupo.

Tabela 4: Análise da multiplicação bacteriana a partir dos cones e dentes do Grupo 2 (Nano-MgO, a 5mg/L).

Grupo 2 - Nano-MgO (5mg/L)		Multiplicação 24h	Multiplicação 48h	Multiplicação 72h	Sem multiplicação
	Cones	9	9	9	0
Dentes	9	9	9	0	

A análise estatística dos resultados permitiu constatar que não se verificaram diferenças estatísticas entre o número de amostras positivas de cones e dentes, no final do período de incubação.

Os resultados foram também comparados entre grupos, de modo a permitir a análise das diferenças de multiplicação bacteriana a partir dos cones e dos dentes, entre o grupo 1 e o grupo 2.

Assim, apresenta-se na Tabela 5 o valor da comparação entre os resultados obtidos após a utilização dos dois irrigantes na desinfecção dos cones da amostra, tendo sido possível verificar a existência de uma diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre os resultados obtidos para os dois grupos.

Tabela 5 - Relação entre os irrigantes (Grupo 1 e 2) na desinfecção dos cones da amostra.

	Significância Sig. (2 lados)
Teste exato de Fisher	,002

Na Tabela 6 consta o valor da comparação entre os resultados obtidos com a utilização dos dois irrigantes na desinfecção dos dentes da amostra, tendo sido possível verificar a existência de diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) entre os resultados obtidos para os dois grupos.

Tabela 6 - Relação entre os irrigantes (Grupo 1 e 2) na desinfecção dos dentes da amostra.

	Significância Sig. (2 lados)
Teste exato de Fisher	,029

5. DISCUSSÃO

A presença de bactérias no sistema canalar é um fator etiológico significativo no desenvolvimento de periodontites apicais^(12,23), pelo que o tratamento endodôntico contemporâneo tem como objetivo a eliminação dos microrganismos do canal radicular infetado, antes da colocação do material de obturação.⁽²³⁾ Contudo, em determinadas circunstâncias, as bactérias presentes podem sobreviver à preparação químico-mecânica canalar, e comprometer o sucesso do tratamento a longo prazo.^(20,23)

Num estudo com um *follow-up* de 5 anos, Sjögren *et al.* constataram que o tratamento endodôntico de dentes corretamente desinfetados apresentou uma taxa de sucesso igual a 94%, enquanto que, quando aplicado a dentes cuja desinfecção foi incompleta, apresentou uma taxa de 68%.⁽²³⁾ Assim, pode-se inferir que o sucesso do tratamento endodôntico é dependente do sucesso da desinfecção.

Os irrigantes canulares convencionais, como o hipoclorito de sódio, não são totalmente eficazes na eliminação dos microrganismos do sistema canalar.⁽³⁵⁾ Atualmente têm surgido novas substâncias, de tamanho nanométrico, que revelam uma atividade antimicrobiana promissora, mesmo em ambiente aquoso, e cuja aplicabilidade como solução irrigadora pode revelar-se vantajosa no tratamento endodôntico convencional.⁽³⁵⁾ Assim, a realização deste estudo teve como intuito avaliar o potencial bactericida de uma solução de nanopartículas de MgO (5mg/L), comparativamente à irrigação convencional com uma solução de NaOCl (5,25%).

Para o presente estudo obteve-se uma amostra de 54 dentes unirradiculares, com um só canal, sem grandes curvaturas e com um comprimento de trabalho estabelecido de 12mm, por forma a assegurar a uniformização da amostra.

O protocolo de preparação químico-mecânica da amostra incluiu instrumentação mecanizada, com limas *WaveOne Gold*, e irrigação com ácido cítrico a 10% (m/v), durante 1 minuto, de modo a permitir o estabelecimento de superfícies canulares regulares e homogêneas, e uniformizadas entre si, de modo a possibilitar a penetração e multiplicação bacteriana nos túbulos dentinários após inoculação, e a ação das soluções irrigadoras durante o protocolo de desinfecção experimental.^(35,47)

A utilização de ácido cítrico a 10% (m/v) durante 1 minuto, durante a preparação dos dentes, permitiu uma eliminação eficaz da *smear layer*⁽¹⁶⁾, uma vez que a presença de *smear layer* nas paredes dos canais radiculares poderia diminuir a eficácia dos irrigantes.⁽⁴⁷⁾

A aplicação de verniz de unhas sobre os ápices e sobre a superfície radicular das raízes possibilitou a oclusão dos túbulos dentinários existentes nestas superfícies.⁽⁴⁴⁾ Assim, foi possível prevenir a recontaminação dos canais radiculares através da superfície externa dentária, durante o protocolo experimental, e simular uma realidade próxima à da prática clínica.⁽⁴⁸⁾

A selagem dos ápices permitiu igualmente promover o fenómeno *vapor lock*. O *vapor lock* corresponde a um evento indesejável decorrente do ato clínico, e que pode ser descrito como o encarceramento de ar gerado pelo fluxo de uma solução irrigadora em direção a um canal estreito, e que impossibilita a progressão da própria solução irrigadora e o contacto desta com as paredes do canal radicular, na totalidade do seu comprimento.^(9,49)

No fim da preparação da amostra, a esterilização dos dentes em autoclave a 121°C durante 20 minutos e a manutenção de condições assépticas durante todo o ensaio experimental foi essencial na prevenção de qualquer contaminação.

A concentração das soluções irrigadoras utilizadas neste estudo foi definida com base em protocolos experimentais prévios e com o intuito de se avaliar condições próximas às da prática clínica.

Atualmente, o hipoclorito de sódio é considerado o irrigante canalar de eleição devido às suas propriedades físico-químicas e ação antibacteriana.⁽¹⁶⁾ Contudo, ainda não há consenso relativamente à concentração ideal a ser usada.⁽¹⁴⁾ A solução de hipoclorito de sódio tem sido utilizada em concentrações entre 0,5% a 5,25%⁽⁵⁰⁾, sendo que Spangberg *et al.* comprovaram que uma solução de hipoclorito de sódio a 5,25% é a mais eficaz na eliminação de microrganismos.⁽¹⁸⁾

Monzavi *et al.* demonstraram que soluções aquosas de Nano-MgO, com dimensões entre os 70 a 150 nanómetros, e concentrações iguais a 2,5, 5 e 10mg/L, não apresentaram qualquer efeito citotóxico em relação a células de mamíferos. Para além disso, os autores não observaram diferenças estatísticas significativas entre o potencial bactericida da solução de Nano-MgO a 5mg/L, comparativamente à solução de 10mg/L.⁽³⁵⁾ Huang *et al.* reportaram que nanopartículas com menos de 45 nanómetros apresentam um aumento significativo da eficácia bactericida com

a diminuição da dimensão das partículas.⁽⁴¹⁾ Deste modo, para este estudo foi preparada uma solução de Nano-MgO, com dimensão igual a 20 nanómetros, e concentração igual a 5mg/L.

A espécie bacteriana *E. faecalis* tem sido utilizada em vários estudos de avaliação do potencial bactericida de soluções irrigadoras⁽⁴⁶⁾, uma vez que é uma das espécies comumente encontradas na cavidade oral, de fácil multiplicação em meio laboratorial, e que desempenha um papel fundamental na etiologia de lesões perirradiculares persistentes, pois apresenta características únicas que conferem à espécie a capacidade de sobreviver no interior dos canais radiculares, mesmo após procedimentos de desinfeção canalar.^(25-26,30,46) Assim, para o presente estudo foi selecionada como modelo bacteriano a estirpe referência *E. faecalis* ATCC 51299, previamente inoculada em meio não seletivo BHI, e sujeita a incubação, durante 24h, a 37°C. Confirmou-se a pureza da cultura, através de avaliação macroscópica e microscópica com coloração Gram (Anexo II, Figura VIII). Para assegurar a inoculação da mesma quantidade de *E. faecalis* ajustou-se a concentração da suspensão bacteriana preparada, diluindo-a em BHI líquido, até se obter a concentração pretendida ($\approx 10^7$ CFU/mL).

A ativação e o potencial inibitório da solução de Nano-MgO (5mg/L) foram confirmados através de um teste *spot-on-lawn*, baseado na realização de uma sementeira em tapete da suspensão bacteriana de *E. faecalis*, tendo sido possível observar a formação de um halo de inibição microbiana com 12mm de diâmetro, após 24h de incubação. As nanopartículas de óxido de magnésio apresentam uma elevada atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas por apresentarem uma grande área de superfície, abundância em defeitos cristalográficos e partículas com carga positiva, que irão interagir com as paredes celulares bacterianas.^(35,37,40) O ótimo desempenho da solução de Nano-MgO pode ser explicado pela formação de aniões de superóxido (O₂⁻) em ambiente aquoso, que irão induzir alterações na permeabilidade das membranas bacterianas.⁽⁴¹⁻⁴²⁾ As soluções avaliadas como controlo não deram origem à formação de halos de inibição microbiana, confirmando-se a ausência de ação inibitória das soluções neutralizadoras sobre a estirpe. A solução de hipoclorito de sódio a 5,25% também não originou um halo de inibição microbiana. A literatura refere que o NaOCl é por vezes ineficaz na eliminação de microrganismos, mesmo após um contacto de 5 minutos, sugerindo que é necessário a aplicação de concentrações mais elevadas e tempos de exposição mais longos para assegurar uma eliminação completa de *E. faecalis*.⁽⁵¹⁻⁵³⁾

Após inoculação de 10µL da suspensão bacteriana nos canais radiculares, os dentes foram incubados a 37°C durante 24h em câmara húmida, com o objetivo de promover a formação de

biofilme bacteriano. Após 24h de incubação ocorreu a formação de biofilme, uma vez que foi possível observar fenotipicamente, e com recurso à metodologia *Red Congo Agar*, a formação de colónias pretas nas placas de agar inoculadas (Anexo II, Figura IX). Na metodologia *Red Congo Agar*, as colónias das espécies bacterianas não produtoras de biofilme permanecem com coloração avermelhada.⁽⁴⁵⁾

Comunidades polimicrobianas, organizadas em biofilme, apresentam maior resistência a substâncias antimicrobianas, sendo que as bactérias presentes nas camadas mais internas destas estruturas apresentam taxas metabólicas mais baixas.^(19,29) A constituição de um biofilme torna as bactérias 1000 vezes mais resistentes à fagocitose, aos anticorpos e aos antimicrobianos.^(26,33) Desta forma, o período de incubação definido permitiu a formação de biofilme no interior das paredes dos canais radiculares, simulando a infeção endodôntica.⁽⁴⁶⁾

Posteriormente ao período de incubação realizou-se o protocolo de desinfecção experimental. Os volumes das soluções irrigadoras e neutralizadoras utilizados foram definidos de modo a assegurar a uniformização dos volumes aplicados e mimetizar a quantidade utilizada na prática clínica. O tempo de atuação das soluções irrigadoras (2 minutos) foi padronizado tendo em conta estudos laboratoriais *in vitro* prévios.⁽³⁵⁾ Monzavi *et al.* verificaram que uma solução de hipoclorito de sódio a 5,25% (m/v) necessita, no máximo, de 2 minutos de atuação para induzir culturas bacterianas negativas.⁽³⁵⁾ A seleção do tempo de atuação (2 minutos) e a concentração das soluções neutralizadoras, Tiosulfato de Sódio (5%, m/v) e Cloreto de Potássio (0.03M), foi fundamental para assegurar igual tempo de atuação do NaOCl e das Nano-MgO, respetivamente, em todos os grupos experimentais.^(35,46)

A análise do protocolo de desinfecção experimental foi realizada através de métodos de cultura bacteriológica, pelo que após o período de contacto procedeu-se à recolha de amostras com recurso a cones de papel esterilizados, que permitiram a transferência do conteúdo presente no interior de cada canal radicular após os procedimentos de irrigação para meios de cultura ricos, sem presença de substâncias inibidoras. Câmara *et al.* afirmam que este método de recolha microbiológica tem como vantagem a possibilidade de ser utilizado quer *in vitro* quer *in vivo*. Porém, apenas os microrganismos que se encontram no canal radicular principal são passíveis de serem recolhidos, uma vez que o cone de papel não consegue alcançar o interior dos túbulos dentinários, ramificações apicais e canais acessórios.⁽¹¹⁾ A recolha dos próprios dentes para análise dos protocolos de desinfecção teve como objetivo colmatar as desvantagens

do método de recolha com cones de papel, por forma a assegurar uma análise mais fidedigna da desinfeção de todo o sistema do canal radicular.

Procedeu-se à colocação dos cones de papel e dos dentes em meio de cultura líquido estéril e à análise da turvação ótica do meio como indicador de multiplicação bacteriana, ao fim de 24, 48 e 72h de incubação.⁽⁴⁶⁾

No presente estudo, foram estabelecidos 2 grupos de controlo negativo (Grupo A1 e A2), de modo a comprovar as condições de esterilidade relativamente ao meio e às condições de incubação/manipulação em que o ensaio foi realizado, e 2 grupos de controlo positivo (Grupo B1 e B2), por forma a confirmar a ausência de ação inibitória das soluções neutralizadoras sobre a estirpe e a viabilidade desta durante as 72h do protocolo experimental. Todos os meios de incubação correspondentes aos grupos de controlo negativo não apresentaram turvação, enquanto que, todos os meios de incubação correspondentes aos grupos de controlo positivo apresentaram turvação, reveladora da ocorrência de multiplicação bacteriana.

O grupo 1 permitiu determinar a eficácia bactericida de uma solução de NaOCl a 5,25% (m/v), e no qual foi possível observar a ocorrência de amostras onde ocorreu multiplicação bacteriana em 2 dos cones e em 4 dos dentes. O hipoclorito de sódio consegue dissolver o tecido necrótico e a componente orgânica da *smear layer*, e eliminar agentes patogénicos sésseis organizados em biofilme e localizados nos túbulos dentinários.⁽¹⁶⁾ No entanto, não fornece uma desinfeção completa do canal radicular⁽³⁴⁾, sendo que tem sido reportada uma elevada resistência de *E. faecalis* face a diversas substâncias antibacterianas, nomeadamente, ao hipoclorito de sódio.⁽³⁵⁾ A diminuição da eficácia antibacteriana do hipoclorito de sódio pode dever-se quer pela inativação que sofre por parte de componentes orgânicos presentes no canal radicular, quer pela sua elevada tensão superficial⁽³⁴⁻³⁵⁾, o que pode explicar a presença de amostras positivas neste grupo. Por outro lado, a observação de um maior número de amostras positivas a partir da incubação de dentes, quando comparado com a amostra de cones, pode ser justificado pelo facto de o hipoclorito de sódio apresentar um reduzido alcance no interior dos túbulos dentinários.⁽⁵⁴⁾ De acordo com Wong *et al.*, *E. faecalis* consegue penetrar até >500µm, no interior dos túbulos dentinários.⁽⁵⁴⁾

No grupo 2, foi possível verificar multiplicação bacteriana a partir de todos os cones avaliados, assim como, a partir de todos os dentes deste mesmo grupo. Assim, obtiveram-se diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) entre os resultados obtidos para os dois grupos experimentais, com a solução de Nano-MgO (5mg/L) a apresentar uma eficácia

bactericida inferior relativamente à irrigação convencional com uma solução de NaOCl a 5,25% (m/v).

Estes resultados são contrários aos obtidos por Monzavi *et al.*, que demonstraram que uma solução aquosa de Nano-MgO com uma concentração igual a 5mg/L apresentava uma atividade antimicrobiana mais eficiente e eficaz a longo prazo, quando comparada com uma solução de hipoclorito de sódio a 5,25%.⁽³⁵⁾ Contudo, estes autores são omissos relativamente à utilização de soluções neutralizadoras após a aplicação das soluções irrigadoras utilizadas no protocolo de desinfeção canalar experimental por eles desenvolvido.

Segundo a Norma Europeia para desinfetantes químicos e antissépticos (EN 1656:2009), para a avaliação do potencial bactericida de qualquer produto, este deve ser imediatamente neutralizado ou suprimido com recurso a soluções neutralizadoras estéreis apropriadas, logo após o fim do seu tempo de atuação definido.⁽⁵⁵⁾

Através do método de contacto direto, Monzavi *et al.* verificaram *in vitro* que uma solução de Nano-MgO (5mg/L) necessita, no máximo, de 1 minuto de atuação para induzir culturas de *E. faecalis* negativas.⁽³⁵⁾ O presente estudo consistiu na realização de um modelo experimental *ex vivo*, por forma a assegurar que a metodologia experimental utilizada pudesse ter praticabilidade clínica. Para isso recorreu-se à utilização de soluções neutralizadoras apropriadas após a utilização das soluções irrigadoras teste, de modo a aferir o seu potencial bactericida contra *E. faecalis*. Perante os resultados obtidos, verificou-se que o tempo de atuação (2 minutos) da solução de Nano-MgO (5mg/L) não foi suficiente para assegurar a desinfeção completa do canal radicular. De facto, Monzavi *et al.* demonstraram que uma solução aquosa de Nano-MgO apresentou uma atividade antimicrobiana mais eficiente e eficaz do que uma solução de NaOCl, após 168h de incubação realizada posteriormente ao protocolo de irrigação, contudo esta não foi sujeita a qualquer procedimento de neutralização ou supressão.⁽³⁵⁾ Deste modo, a utilização de uma solução aquosa de Nano-MgO como irrigante canalar não parece ser viável do ponto de vista clínico, uma vez que nas concentrações utilizadas o tempo de atuação no interior do canal radicular teria que ser muito elevado, o que inviabilizaria o seu uso nesta etapa do tratamento endodôntico.

Para além disso, a suspensão bacteriana utilizada neste estudo apresentava uma concentração aproximada de 10^7 CFU/mL, superior à utilizada por Monzavi *et al.*, que apresentava uma concentração próxima de 10^5 CFU/mL.⁽³⁵⁾ Esta razão pode também explicar as diferenças verificadas relativamente ao estudo de Monzavi *et al.*⁽³⁵⁾

Os resultados obtidos na avaliação preliminar do potencial inibitório da solução de nanopartículas realizada no presente estudo, assim como os resultados determinados por Monzavi *et al.*, não devem ser menosprezados, uma vez que são reveladores da elevada atividade antimicrobiana das nanopartículas de óxido de magnésio contra *E. faecalis*. As nanopartículas possuem a capacidade única de resistir a condições ambientais e temperatura adversas, pelo que podem manter o seu efeito antimicrobiano no canal radicular por longos períodos de tempo.^(35,43)

Posto isto, sugere-se a realização de estudos futuros que avaliem a utilização de nanopartículas de óxido de magnésio numa outra etapa do tratamento endodôntico, na qual seja assegurada o contacto próximo das mesmas com a superfície radicular a desinfetar num longo período de tempo, como por exemplo, no ato de obturação canal. Têm sido incorporadas nanopartículas em vários cimentos obturadores com o objetivo de promover a desinfecção do canal radicular, sendo que, a adição das mesmas resulta numa redução significativa de *E. faecalis* e não altera a fluidez do cimento.⁽⁵⁶⁾ No entanto, são necessárias mais investigações *in vitro* e *in vivo* que considerem a toxicidade e os efeitos biológicos, a longo prazo, decorrente do uso de nanopartículas de óxidos metálicos inorgânicos.⁽³⁵⁾

Deste modo, devem-se estabelecer protocolos experimentais que avaliem o potencial bactericida de cimentos endodônticos reforçados com Nano-MgO, de cones de *gutta-percha* impregnados com Nano-MgO ou a viabilidade de se utilizarem as mesmas nanopartículas sob a forma de medicamentos intra-canalares.

6. CONCLUSÕES

A aplicação de uma solução de Nano-MgO (5mg/L), com 20 nanómetros de dimensão, no interior de canais infetados com *Enterococcus faecalis* tem uma eficácia bactericida inferior à irrigação convencional com uma solução de NaOCl a 5,25%.

Deste modo, a aplicação de uma solução aquosa de Nano-MgO como irrigante canalар não é recomendada do ponto de vista clínico.

Contudo, foi possível comprovar que as nanopartículas de óxido de magnésio apresentam uma elevada atividade antimicrobiana *in vitro* contra *E. faecalis*, ao fim de 24 horas.

Assim, sugere-se a realização de estudos futuros que avaliem a utilização de nanopartículas de óxido de magnésio numa outra fase do tratamento endodôntico, nomeadamente no momento de obturação canalар, e que analisem o potencial bactericida de cimentos endodônticos reforçados com Nano-MgO, de cones de *gutta-percha* impregnados com Nano-MgO ou que avaliem a viabilidade de se utilizarem as mesmas nanopartículas como medicação intra-canalар.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 - Chércoles-Ruiz A, Sánchez-Torres A, Gay-Escoda C. Endodontics, Endodontic Retreatment, and Apical Surgery Versus Tooth Extraction and Implant Placement: A Systematic Review. *J Endod.* 2017; 43(5):679–686.
- 2 - Markley M. Restorations of silver amalgam. *JADA.* 1951; 43(2):133-46.
- 3 - Torabinejad M, Lozada J, Puterman I, White SN. Endodontic therapy or single tooth implant? A systematic review. *J Calif Dent Assoc.* 2008; 36:429-37.
- 4 - Dowd F. *Mosby's Review for the NBDE Part II.* 2nd edn. St. Louis, Mo, USA: Mosby; 2007.
- 5 - European Society of Endodontology. Quality guidelines for endodontic treatment: consensus report of the European Society of Endodontology. *Int Endod J.* 2006; 39(12):921-30.
- 6 - Hargreaves KM, Cohen S. *Cohen's pathways of the pulp.* 10th edn. St. Louis, MO, USA: Elsevier; 2011.
- 7 - Gil A, Nakamura V, Lopes R, Lemos É, Calil E, Amaral K. Revisão Contemporânea da Obturação Termoplastificada, Valendo-se da Técnica de Compactação Termomecânica. *Rev Saúde.* 2009; 3(3):20-29.
- 8 - Siqueira Júnior JF, Rôças IN. Clinical implications and microbiology of bacterial persistence after treatment procedures. *J Endod.* 2008; 34:1291-1301.
- 9 - Gu LS, Kim JR, Ling J, Choi KK, Pashley DH, Tay FR. Review of contemporary irrigant agitation techniques and devices. *J Endod.* 2009; 35(6):791-804.
- 10 - Peters OA, Schönenberger K, Laib A. Effects of four Ni–Ti preparation techniques on root canal geometry assessed by micro computed tomo-graphy. *Int Endod J.* 2001; 34:221-30.
- 11 - Câmara AC, de Albuquerque MM, Aguiar CM, de Barros Correia AC. *In vitro* antimicrobial activity of 0.5 %, 1 %, and 2.5 % sodium hypochlorite in root canal instruments with the ProTaper Universal system. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2009; 108:55–56.

- 12 - Kakehashi S, Stanley HR, Fitzgerald RJ. The effects of surgical exposures of dental pulps in germ-free and conventional laboratory rats. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral RadiolEndod.* 1965; 20:340-9.
- 13 - Sundqvist G. Ecology of the root canal flora. *J Endod.* 1992; 18:427-30.
- 14 - Siqueira Júnior JF, Rôças IN, Favieri A, Lima KC. Chemomechanical reduction of the bacterial population in the root canal after instrumentation and irrigation with 1%, 2.5%, and 5.25% sodium hypochlorite. *J Endod.* 2000; 26:331-4.
- 15 - Turk BT, Ates M, Sen BH. The effect of treatment of radicular dentin on colonization patterns of *C. albicans*. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2008; 106:457-62.
- 16 - Zehnder M. Root canal irrigants. *J Endod.* 2006; 32:389–398.
- 17 - Siqueira Júnior JF, Machado AG, Silveira RM, Lopes HP, De Uzeda M. Evaluation of the effectiveness of sodium hypochlorite used with three irrigation methods in the elimination of *Enterococcus faecalis* from the root canal *in vitro*. *Int Endod J.* 1997a; 30:279-282.
- 18 - Spangberg L, Engstrom B, Langeland K. Biologic effects of dental materials. III. Toxicity and antimicrobial effect of endodontic antiseptics *in vitro*. *Oral Surg.* 1973; 36:856-71.
- 19 - Ng YL, Mann V, Gulabivala K. A prospective study of the factors affecting outcomes of nonsurgical root canal treatment: part 1: periapical health. *Int Endod J.* 2011; 44(7):583-609.
- 20 - Tabassum S, Khan FR. Failure of endodontic treatment: The usual suspects. *Eur J Dent.* 2016; 10(1):144–147.
- 21 - Ashley M, Harris I. The assessment of the endodontically treated tooth. *Dent Update.* 2001; 28:247-52.
- 22 - Siqueira Júnior JF. Aetiology of root canal treatment failure: Why well-treated teeth can fail. *Int Endod J.* 2001; 34:1-10.
- 23 - Sjögren U, Figdor D, Persson S, Sundqvist G. Influence of infection at the time of root filling on the outcome of endodontic treatment of teeth with apical periodontitis. *Int Endod J.* 1997; 30:297-306.
- 24 - Lin LM, Skribner JE, Gaengler P. Factors associated with endodontic treatment failures. *J Endod.* 1992; 18:625-7

- 25 - Evans M, Davies JK, Sundqvist G, Figdor D. Mechanisms involved in the resistance of *Enterococcus faecalis* to calcium hydroxide. *Int Endod J.* 2002; 35:221– 8.
- 26 - Stuart CH, Schwartz SA, Beeson TJ, Owatz CB. *Enterococcus faecalis*: its role in root canal treatment failure and current concepts in retreatment. *J Endod.* 2006; 32:93–98.
- 27 - Sunde PT, Olsen I, Debelian GJ, Tronstad L. Microbiota of periapical lesions refractory to endodontic therapy. *J Endod.* 2002; 28:304-10.
- 28 - Edwards DD. Enterococci attract attention of concerned microbiologists. *ASM News.* 2000; 66:540–5.
- 29 - Tronstad L, Cervone F, Barnett F. Periapical bacterial plaque in teeth refractory to endodontic treatment. *Endod Dent Traumatol.* 1990; 6:73–7.
- 30 - Gilmore MS *et al.* The Enterococci: pathogenesis, molecular biology, and antibiotic resistance. 1st ed. Washington, D.C.: ASM Press; 2002.
- 31 - Rôças IN, Siqueira JF, Santos KRN. Association of *Enterococcus faecalis* with different forms of periradicular diseases. *J Endod.* 2004; 30:315–20.
- 32 - Love RM. *Enterococcus faecalis*: a mechanism for its role in endodontic failure. *Int Endod J.* 2001; 34:399–405.
- 33 - Distel JW, Hatton JF, Gillespie MJ. Biofilm formation in medicated root canals. *J Endod.* 2002; 28:689 –93.
- 34 - Neglia R, Ardizzoni A, Giardino L, Ambu E, Grazi S, Calignano S, Rimoldi C, Righi E, Blasi E. Comparative *in vitro* and *ex vivo* studies on the bactericidal activity of Tetraclean, a new generation endodontic irrigant, and sodium hypochlorite. *NewMicrobiol.* 2008; 31:57–65.
- 35 - Monzavi A, Eshraghi S, Hashemian R, Momen-Heravi F. *In vitro* and *ex vivo* antimicrobial efficacy of nano-MgO in the elimination of endodontic pathogens. *Clin Oral Invest.* 2014; 19(2):349–356.
- 36 - Anagnostakos K, Hitzler P, Pape D, Kohn D, Kelm J. Persistence of bacterial growth on antibiotic-loaded beads: is it actually a problem? *Acta Orthop.* 2008; 79:302–307.
- 37 - Lin YJ, Li DQ, Wang G, Huang L, Duan X. Preparation and bactericidal property of MgO nanoparticles on gamma-Al₂O₃. *J Mater Sci Mater Med.* 2005; 16:53–56.

- 38 - Berry V, Gole A, Kundu S, Murphy CJ, Saraf RF. Deposition of CTAB-terminated nanorods on bacteria to form highly conducting hybrid systems. *J Am Chem Soc.* 2005; 127:17600–7601.
- 39 - Yamamoto O, Sawai J, Sasamoto T. Change in antibacterial characteristics with doping amount of ZnO in MgO–ZnO solid solution. *Int J Inorg Mater.* 2000; 2:451–455.
- 40 - Leung YH, Ng AM, Xu X, Shen Z, Gethings LA, Wong MT *et al.* Mechanisms of antibacterial activity of MgO: non-ROS mediated toxicity of MgO nanoparticles towards *Escherichia coli*. *Small.* 2014; 10(6):1171-83.
- 41 - Huang L, Li DQ, Lin YJ, Wei M, Evans DG, Duan X. Controllable preparation of Nano-MgO and investigation of its bactericidal properties. *J Inorg Biochem.* 2005; 9:986–993.
- 42 - Stankic S, Sternig A, Finocchi F, Bernardi J, Diwald O. Zinc oxide scaffolds on MgO nanocubes. *Nanotechnology.* 2010; 21(35):355603.
- 43 - Vidic J, Stankic S, Haque F, Ciric D, Le Goffic R, Vidy. A Selective antibacterial effects of mixed ZnMgO nanoparticles. *J Nanoparticle Res.* 2013; 15(5):1595.
- 44 - Haapasalo M, Orstavik D. *In vitro* infection and disinfection of dentinal tubules. *J Dent Res.* 1987; 66(8):1375-9.
- 45 - Oliveira M, Bexiga R, Nunes SF, Carneiro C, Cavaco LM, Bernardo F, Vilela CL. Biofilm-forming ability profiling of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis mastitis* isolates. *Vet Microbiol.* 2006; 118(1-2):133-40.
- 46 - Mercade M, Duran-Sindreu F, Kuttler S, Roig M, Durany N. Antimicrobial efficacy of 4.2% sodium hypochlorite adjusted to pH 12, 7.5, and 6.5 in infected human root canals. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2009; 107(2):295-8.
- 47 - Fonseca MB, Júnior POT, Pallota RC, Filho HF, Denardin OVP, Rapoport A, Dedivitis RA, Veronezi JF, Genovese WJ, Ricardo ALF. Photodynamic Therapy for Root Canals Infected with *Enterococcus faecalis*. *Photomed Laser Surg.* 2008; 26 (3):209-213.
- 48 - Gregorio C, Estevez R, Cisneros R, Paranjpe A, Cohenca N. Efficacy of Different Irrigation and Activation Systems on the Penetration of Sodium Hypochlorite into Simulated Lateral Canals and up to Working Length: An *In Vitro* Study. *J Endod.* 2010; 36(7):1216-21.

- 49 - Gregorio CD, Estevez R, Cisneros R, Heilborn C, Cohenca N. Effect of EDTA , Sonic , and Ultrasonic Activation on the Penetration of Sodium Hypochlorite into Simulated Lateral Canals : An *In Vitro* Study. *J Endod.* 2009; 35(6):891-5.
- 50 - Mohammadi Z. Sodium hypochlorite in endodontics: an update review. *Int Dent J.* 2008; 58(6):329-341.
- 51 - Ravinanthanan M, Hegde MN, Shetty VA, Kumari S. Antimicrobial assay of combination surfactant irrigant regimen on vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis*. An *in vitro* direct contact test. *Dent Res J.* 2018; 15(6):397-403.
- 52 - Radcliffe CE, Potouridou L, Qureshi R, Hababeh N, Qualtrough A, Worthington H, *et al.* Antimicrobial activity of varying concentrations of sodium hypochlorite on the endodontic microorganisms *Actinomyces israelii*, *A. naeslundii*, *Candida albicans* and *Enterococcus faecalis*. *Int Endod J.* 2004; 37:438–46.
- 53 - Retamozo B, Shabahang S, Johnson N, Aprecio RM, Torabinejad M. Minimum contact time and concentration of sodium hypochlorite required to eliminate *Enterococcus faecalis*. *J Endod.* 2010; 36:520–3.
- 54 - Wong DTS, Cheung GSP. Extension of Bactericidal Effect of Sodium Hypochlorite into Dentinal Tubules. *J Endod.* 2014; 40:825-829.
- 55 - EN 1656:2009, Chemical disinfectants and antiseptics. Quantitative suspension test for the evaluation of bactericidal activity of chemical disinfectants and antiseptics used in the veterinary area. Test method and requirements (phase 2, step 1). European Committee for Standardization. 2010.
- 56 - Abou Neel EA, Bozec L, Perez RA, Kim HW, Knowles JC. Nanotechnology in dentistry: prevention, diagnosis, and therapy. *Int J Nanomedicine.* 2015; 8(10):6371-94.

ANEXOS

Anexo I



Figura I - Determinação do comprimento canal (13mm) dos dentes.



Figura II - Verificação do comprimento canal dos dentes (extrusão do *stop*).



Figura III - Verificação do comprimento canal dos dentes (*stop* ajustado ao limite apical).



Figura IV – Banho de ultrassons.



Figura V – Sementeira de *E. faecalis* (ATCC 51299), após 24h de incubação.



Figura VI – Câmara de fluxo laminar.

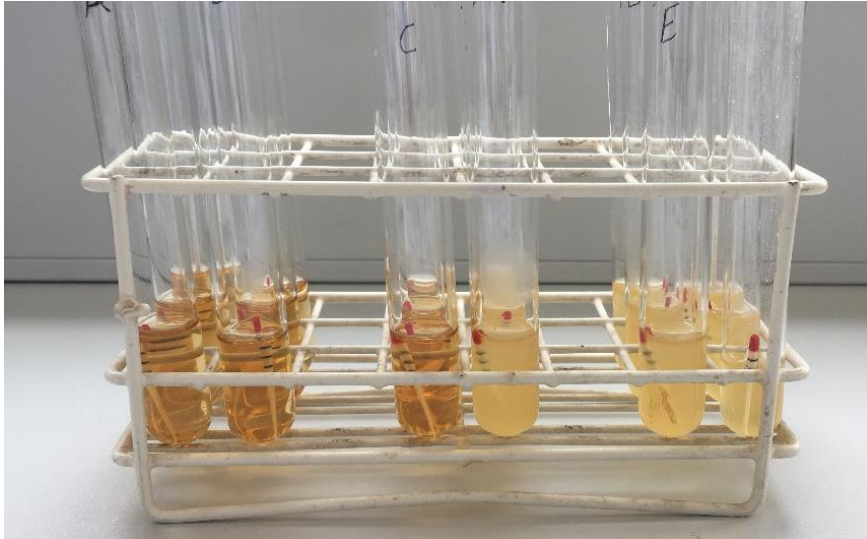


Figura VII – Tubos de ensaio com meio sem turvação, à esquerda, e com meio com turvação, à direita.

Anexo II

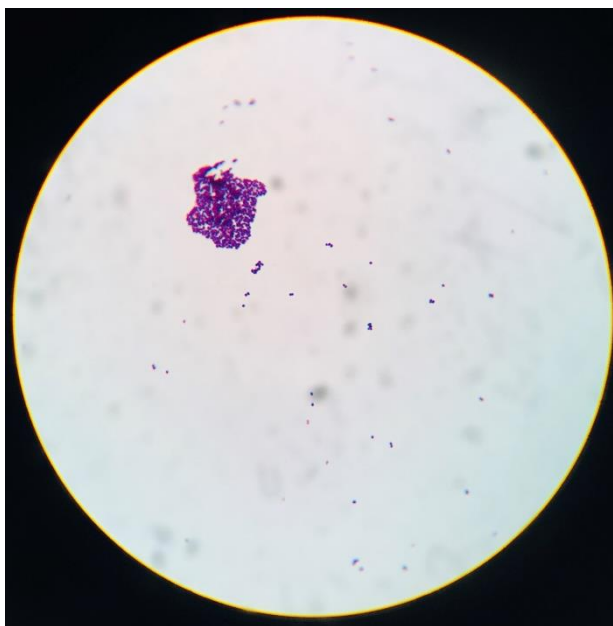


Figura VIII - Avaliação microscópica com coloração Gram da pureza da cultura de *E. faecalis*.

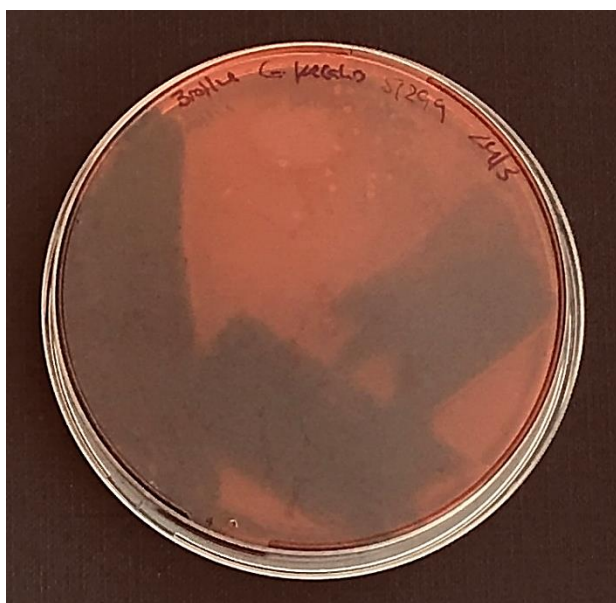


Figura IX - Red Congo Agar, após 24 de incubação (a formação de colónias pretas é indicadora da constituição de biofilme).