



CATÓLICA  
FACULDADE DE MEDICINA DENTÁRIA

---

VISEU

Mestrado Integrado em Medicina Dentária

2020-2021

# AVALIAÇÃO DE NOVOS COMPOSTOS PARA DESINFEÇÃO INTRACANALAR EM ENDODONTIA

Dissertação apresentada à Universidade Católica Portuguesa para  
obtenção do grau de Mestre em Medicina Dentária

Por:

Rúben Filipe Gonçalves de Sousa

Viseu, 2021





CATÓLICA  
FACULDADE DE MEDICINA DENTÁRIA

VISEU

Mestrado integrado em Medicina Dentária

2020-2021

# AVALIAÇÃO DE NOVOS COMPOSTOS PARA DESINFEÇÃO INTRACANALAR EM ENDODONTIA

Dissertação apresentada à Universidade Católica Portuguesa para  
obtenção do grau de Mestre em Medicina Dentária

Por:

Rúben Filipe Gonçalves de Sousa

Orientador: Professora Doutora Rita Noites

Coorientador: Professora Doutora Ana Sofia Duarte

**Área disciplinar:** Endodontia

**Linha Estratégica do CIIS:** Oral e-Health Lab

Viseu, 2021



## Dedicatória

À Mãe ao Pai e aos avós!  
Foi todo o vosso esforço e dedicação que me trouxeram aqui hoje!



## Agradecimentos

Aos meus pais, por permitirem que tudo isto fosse possível, por terem sempre acreditado em mim e por todos os esforços que sempre fizeram para me dar a melhor vida e educação.

À Professora Doutora Rita Noites, orientadora deste projeto, por toda a dedicação, todo o esforço, o constante ensinamento e pela paciência.

À Professora Doutora Ana Sofia Duarte, coorientadora deste projeto, todo o tempo e paciência e dedicação para levar toda a investigação a bom porto.

À Maria Teresa por acompanhar e fazer parte deste percurso, por ser a pessoa tão especial que é e por me apoiar em todas as minhas decisões.

Ao meu trinómio, Benedito Reis e Carolina Pereira, juntos conseguimos aprender sempre mais e ser cada vez melhores, obrigado pelo apoio.

Às alunas do Curso de Ciências Biomédicas, Daniela Devesas e Bruna Correia, por todos os ensinamentos e por toda a disponibilidade durante a investigação.



## Resumo

O tratamento endodôntico tem como objetivo, otimizar a desinfecção do canal radicular e prevenir a reinfeção. Os microrganismos predominantes em dentes tratados com sintomatologia são *Enterococcus faecalis*, *Fusobacterium nucleatum* e do reino *Fungi* a *Candida albicans*.

Os oceanos contêm inúmeros habitats específicos diferentes, sendo necessário que os microrganismos desenvolvam diferentes mecanismos de adaptação para sobreviverem. Alguns destes são a produção de moléculas e enzimas específicas que lhes conferem propriedades antibacterianas, antifúngicas, anti-inflamatórias, antiprotozoárias, antivirais, anticancerígenas...

Este trabalho tem como objetivo determinar se extratos de fungos marinhos, (extratos de *Penicillium lusitanum* e de *Aspergillus affinis*) são eficazes na eliminação de *Enterococcus faecalis* e de *Candida albicans* durante o processo de irrigação endodôntica. Três concentrações dos dois extratos de fungos marinhos foram preparadas e testadas. Protocolos de produção, extração, difusão em disco e de viabilidade celular foram seguidos de forma a obter resultados quanto à inibição e à viabilidade celular que estes extratos de fungos são capazes de produzir em *E. faecalis* e *C. albicans*.

Analisando os resultados, é perceptível que os extratos de fungos de *P. lusitanum* e *A. affinis* se mostraram eficazes quando usados de forma isolada na inibição de *C. albicans* e de *E. faecalis*, respetivamente, o que são resultados animadores para a continuação desta investigação. Com esta investigação foi ainda possível abrir novos possíveis caminhos para a utilização dos extratos de fungos de *P. lusitanum* noutras áreas da medicina, como por exemplo no tratamento de Candidíase.

**Palavras-chave:** Endodontia; Irrigação; Desinfecção intracanal; Fungos marinhos



## Abstract

Endodontic treatment aims to optimize root canal disinfection and prevent reinfection. The predominant microorganisms in teeth treated with symptoms are *Enterococcus faecalis*, *Fusobacterium nucleatum* and from the kingdom *Fungi* to *Candida albicans*.

The oceans contain many different specific habitats, requiring microorganisms to develop different adaptation mechanisms to survive. Some of these are the production of specific biomolecules and enzymes that give them antibacterial, antifungal, anti-inflammatory, antiprotozoal, antiviral, anticancer properties...

This work aims to determine whether extracts of marine fungi (*Penicillium lusitanum* and *Aspergillus affinis* extracts) during the irrigation process are effective in eliminating *Enterococcus faecalis* and *Candida albicans*. Three concentrations of the two marine fungus extracts were prepared and tested. Production, extraction, disk diffusion and cell viability protocols were followed in order to obtain results regarding the inhibition and cell viability that these fungal strata are capable of producing in *E. faecalis* and *C. albicans*.

Analysing the results, it is noticeable that the fungal extracts of *P. lusitanum* and *A. affinis* proved to be effective when used alone in inhibiting *C. albicans* and *E. faecalis*, respectively, which are encouraging results for the continuation of this investigation. With this research it was also possible to open new possible ways for the use of fungal extracts of *P. lusitanum* in other areas of medicine, such as in the treatment of Candidiasis.

**Keywords:** Endodontics; Irrigation; Intracanal disinfection; Marine fungi



## Índice

I.	Introdução.....	1
1.	Introdução.....	3
1.1.	Soluções utilizadas na irrigação em endodontia.....	3
1.1.2.	Propriedades do NaOCl.....	4
1.2.	Microbiologia das infeções endodônticas.....	5
1.3.	Fungos marinhos.....	8
1.4.	Objetivos da irrigação:.....	10
1.5.	Citotoxicidade e Genotoxicidade de irrigantes endodônticos.....	12
II.	MATERIAIS E MÉTODOS.....	17
2.	Materiais e métodos.....	21
2.1.	Produção de extratos brutos e extração de fungos marinhos.....	21
2.2.	Método de difusão em disco.....	23
2.3.	Teste de viabilidade celular.....	30
III.	RESULTADOS.....	35
3.	Resultados.....	37
3.1.	Atividade antimicrobiana associada aos extratos de <i>A. affinis</i> e <i>P. lusitanum</i> ...	37
3.2.	Avaliação citotóxica dos extratos de fungos e dos grupos controlo.....	46
IV.	DISCUSSÃO.....	49
4.	Discussão.....	51
4.1.	Capacidade inibitória dos extratos de fungos.....	51
4.2.	Avaliação da citotoxicidade dos extratos de fungos e dos controlos.....	57
V.	CONCLUSÃO.....	59
5.	Conclusão.....	61
	Bibliografia.....	63
	Anexos:.....	71
	Anexo 1: Produção de extratos brutos e extração de fungos marinhos.....	71
	Anexo 2: Método de difusão em disco.....	78
	Anexo 3 – Protocolo de avaliação da eficácia dos extratos de fungos <i>ex vivo</i> .....	81



## Índice de Figuras:

Figura 1 – Esquema representativo do percurso dos microrganismo até invadirem a camara pulpar e posteriormente o surgimento de uma resposta inflamatória por parte do hospedeiro Adaptado de “Life as an endodontic pathogen. Ecological differences between the untreated and root-filled root canals” (19). .....	6
Figura 2 – Prevalência de microrganismos em endodontia; Adaptado de “Influence of microbiology on endodontic failure” (25).....	7
Figura 3 – Viabilidade celular das soluções irrigantes usadas no estudo de G.Botton et al (41).....	14
Figura 4 –Percentagem (%) de dano causado no DNA em células individuais (41).....	15
Figura 5 – Placas de Petri inoculadas com <i>C. albicans</i> , duas replicas (R1,1 e R1,2); Teste de eficácia de <i>A. affinis</i> .....	24
Figura 6 - Placas de Petri inoculadas com <i>C. albicans</i> , duas replicas (R2,1 e R2,2); Teste de eficácia de <i>P.lusitanum</i> .....	25
Figura 7 – Placas de Petri inoculadas com <i>C. albicans</i> , grupo controlo (Controlo 1 e Controlo 2).....	26
Figura 8 - Placas de Petri inoculadas com <i>E. faecalis</i> , duas replicas (R1,1 e R1,2); Teste de eficácia de <i>A. affinis</i> .....	27
Figura 9 - Placas de Petri inoculadas com <i>E. faecalis</i> , duas replicas (R2,1 e R2,2); Teste de eficácia de <i>P.lusitanum</i> .....	28
Figura 10 - Placas de Petri inoculadas com <i>E. faecalis</i> , grupo controlo (Controlo 1 e Controlo 2).....	29
Figura 11 – Figura representativa da medição do halos formados por cada substância inoculada nos discos .....	29
Figura 12 - Divisão dos quadrados da grelha do hemocitómetro. ....	31
Figura 13 – Antibiogramas de <i>A. affinis</i> e <i>P. lusitanum</i> em placas inoculadas com <i>C. albicans</i> . R1,1 e R2,2 ( <i>A. affinis</i> 500mg/ml, 250mg/ml, 50mg/ml, <i>A. affinis</i> + <i>P. lusitanum</i> 250mg/ml), R2,1 e R2,2 ( <i>P. lusitanum</i> 500mg/ml, 250mg/ml, 50mg/ml, <i>P. lusitanum</i> + <i>A. affinis</i> 250mg/ml).....	37

Figura 14 – Antibiogramas controlo da inibição de <i>C. albicans</i> , Controlo 1 ( Discos com NaOCl 2,5%, 1,25% e 0,25%) e Controlo 2 (Discos com, Cicloheximida 20 µl / disco, Clorexidina 2%, Fluconazol 50mg/ml e H2O).....	40
Figura 15 – Antibiogramas de <i>A. affinis</i> e <i>P. lusitanum</i> em placas inoculadas com <i>E. faecalis</i> . R1,1 e R1,2 ( <i>A. affinis</i> 500mg/ml, 250mg/ml, 50mg/ml, <i>A. affinis</i> + <i>P. lusitanum</i> 250mg/ml), R2,1 e R2,2 ( <i>P. lusitanum</i> 500mg/ml, 250mg/ml, 50mg/ml, <i>P. lusitanum</i> + <i>A. affinis</i> 250mg/ml).....	42
Figura 16 – Antibiogramas controlo da inibição de <i>E. faecalis</i> , Controlo 1 ( Discos com NaOCl 2,5%, 1,25% e 0,25%) e Controlo 2 (Discos com, Cicloheximida 20 µl / disco, Clorexidina 2%, Fluconazol 50mg/ml e H2O).....	44
Figura 17 - Viabilidade celular dos extratos de fungo <i>P. lusitanum</i> e <i>A. affinis</i> nas concentrações de 50mg/ml e 250mg/ml. O controlo corresponde a células Vero não expostas a extratos. Two-way ANOVA e Šídák's multiple comparisons test para a significância estatística. (****p<0,0001).....	46
Figura 18 - Viabilidade celular dos grupos controlo (Cicloheximida, Clorexidina 2%, Fluconazol 50mg/ml, NaOCl 2,5%, NaOCl 1,25%, NaOCl 0,25%. O controlo corresponde a células Vero não expostas a extratos. Unpaired t test para a significância estatística. (****p<0,0001).....	47
Figura 19 – Figura representativa da dimensão dos halos de cada composto testado na inibição de <i>C. albicans</i> .....	51
Figura 20 – Comparação da média dos halos de cada composto testado na inibição de <i>C. albicans</i> .....	53
Figura 21 - Figura representativa da dimensão dos halos de cada composto testado na inibição de <i>E. faecalis</i> .....	54
Figura 22 – Comparação da média dos halos de cada composto testado na inibição de <i>E. faecalis</i> .....	55

## Índice de tabelas:

Tabela 1 - Características de um irrigante ideal em endodontia .....	11
Tabela 2 – Soluções de irrigação e associações farmacológicas usados no estudo de G.Botton et al.(41). .....	13
Tabela 3 - Resultados obtidos através de medição dos halos dos antibiograma de <i>A. affinis</i> na inibição de <i>C. albicans</i> .....	38
Tabela 4 - Resultados obtidos através de medição dos halos dos antibiograma de <i>P. lusitanum</i> na inibição de <i>C. albicans</i> .....	39
Tabela 5 – Resultados obtidos através de medição dos halos dos antibiograma de <i>A. affinis</i> na inibição de <i>E. faecalis</i> .....	43
Tabela 6 - Resultados obtidos através de medição dos halos dos antibiograma de <i>P. lusitanum</i> na inibição de <i>E. faecalis</i> .....	43
Tabela 7 - Resultados obtidos através de medição dos halos dos antibiograma Controlo1 na inibição de <i>E. faecalis</i> .....	44
Tabela 8 - Resultados obtidos através de medição dos halos dos antibiograma Controlo2 na inibição de <i>E. faecalis</i> .....	45



## Abreviaturas:

Ácido cítrico - CA

Ácido etilendiamina tetra-acético - EDTA

*Brain Heart Infusion* - BHI

Gluconato de clorexidina - CHX

Hipoclorito de sódio - NaOCl

*Mueller Hinton Agar* - MHA

Ocratoxina A - OTA

*Potato Dextrose Broth* - PDB

*Potato dextrose agar* - PDA

*Sabouraud Dextrose Agar* - SDA



## I. Introdução



## 1. Introdução

A endodontia é o ramo da Medicina Dentária que estuda a forma, função e integridade do complexo dentino-pulpar. Esta integridade pode ser comprometida por fatores, externos ou internos como é o caso de traumatismos ou de patologias pulpares respetivamente, contudo na maioria das situações este comprometimento deve-se a infeções por microrganismos (1).

Sendo o complexo dentino-pulpar estéril em condições normais, o estabelecimento de biofilmes nos sistemas de canais radiculares irá progredir diretamente para uma resposta inflamatória. A principal contribuição dos microrganismos na iniciação e perpetuação das doenças pulpares e periapicais foi claramente demonstrada em modelos animais e estudos em humanos (1,2).

O tratamento endodôntico, idealmente, deve suprimir todos os microrganismos vivos e neutralizar qualquer componente microbiano presente no sistema de canais radiculares. No entanto, nem sempre é possível devido à complexa anatomia dos canais, como istmos e canais laterais (3).

A eliminação de microrganismos do sistema de canais radiculares infetados é um procedimento complexo que envolve o recurso a técnicas de instrumentação, regimes de irrigação e medicação intracanal (4).

Evidências clínicas e *ex vivo* revelaram que a instrumentação mecânica deixa zonas significativas das paredes do canal radicular inalteradas e a eliminação completa de bactérias apenas por instrumentação é improvável de ocorrer. Assim sendo, a irrigação e desinfeção é necessária para remover o tecido residual e eliminar os microrganismos (4).

A preparação químico-mecânica é uma parte essencial do tratamento endodôntico radical bem-sucedido, pois cumpre funções mecânicas, químicas e (micro) biológicas importantes. A irrigação também é a única forma de aceder às áreas da parede do canal radicular que não são alcançadas por instrumentação mecânica (5).

A irrigação possui várias funções importantes, que podem variar de acordo com o irrigante utilizado. Este deve reduzir o atrito entre o instrumento e a dentina, melhorar a eficácia de corte das limas, dissolver o tecido, evitar o

aquecimento da lima e do dente e, além disso, deve ter efeito de limpeza e ação antimicrobiana / antibiofilme (5).

Diferentes meios de distribuição são usados para irrigação de canais radiculares, desde distribuição tradicional, com seringa e agulha até vários sistemas acionados por máquinas, incluindo bombas automáticas, ponteiras vibratórias e ultrassom. O objetivo destas diferentes técnicas é garantir uma distribuição mais eficiente dos irrigantes por todo o sistema de canais radiculares de forma a promover uma limpeza mais eficaz das áreas de difícil acesso (5).

Este trabalho teve como objetivo determinar se extratos de fungos marinhos, *Penicillium lusitanum* e *Aspergillus affinis*, são eficazes na eliminação de *Enterococcus faecalis* e de *Candida albicans* durante o processo de irrigação endodôntica. Três concentrações destes dois extratos de fungos marinhos foram preparadas, testadas e comparadas com outras soluções e produtos farmacêuticos disponíveis no mercado.

## 1.1. Soluções utilizadas na irrigação em endodontia

Atualmente sabe-se que os microrganismos, que permanecem no espaço do canal radicular após o tratamento ou capazes de recolonizar o sistema de canais obturados, constituem a principal causa de insucesso em endodontia. O objetivo primário do tratamento endodôntico deve ser, portanto, otimizar a desinfecção do canal radicular e prevenir a reinfeção (6).

Várias substâncias desinfetantes têm sido recomendadas para utilização em combinação com a preparação do canal, incluindo Hipoclorito de sódio (NaOCl), Gluconato de clorexidina (CHX), Ácido etilenodiamina tetra-acético (EDTA) e Ácido cítrico (CA) (7).

De todas as substâncias utilizadas atualmente, o NaOCl parece ser o ideal, uma vez que reúne um maior número de propriedades em comparação com qualquer outro composto conhecido (Tabela 1). Tem a capacidade única de dissolver tecido necrótico (8) e os componentes orgânicos, *smear layer* (9).

Embora o NaOCl seja o irrigante mais comumente utilizado em endodontia, este não é capaz de dissolver as partículas inorgânicas de dentina e, assim, evitar a formação de uma camada de *smear layer* durante a instrumentação. (10)

Outra questão, que tem chamado a atenção de muitos investigadores, é a adversidade e os efeitos secundários promovidos por alguns dos irrigantes mais usados, como NaOCl, EDTA e CHX na composição mineral da dentina (11). Estudos demonstraram a capacidade dessas soluções causarem danos mecânicos e estruturais à dentina radicular, resultando em uma estrutura de dentina quebradiça que é mais suscetível a fraturas (12). Além disso, a natureza ácida de alguns agentes quelantes como o ácido acético e o CA, usados durante a remoção do *smear layer* podem contribuir para a dissolução dos minerais do dente (4).

### 1.1.2. Propriedades do NaOCl

O NaOCl, é um excelente agente proteolítico e antimicrobiano não específico, é a solução de irrigação mais usada durante o tratamento endodôntico radical (13).

Como já foi referido anteriormente o uso de diferentes técnicas de instrumentação por si só não é eficaz na eliminação dos microrganismos do interior dos canais radiculares (14). Grandes áreas de dentina podem permanecer intocadas pelos instrumentos, o que enfatiza a importância de meios químicos de limpeza e desinfecção do sistema de canais radiculares (15).

A irrigação remove todos os detritos e tecidos, necróticos ou contaminados do canal radicular antes de serem empurrados para os tecidos apicais (15).

O NaOCl, um composto halogenado, é usado rotineiramente para irrigar o canal radicular durante os tratamentos endodônticos. Na água ioniza-se em Sódio e Hipoclorito, o que favorece a sua ação antimicrobiana (16).

Entre os valores de pH 4 e 7, o cloro existe como ácido hipocloroso enquanto que, em pH acima de 9, o  $\text{OCl}^-$  predomina. O HClO tem uma forte ação antibacteriana em comparação com o OCl devido à sua capacidade de interromper a fosforilação oxidativa e outras atividades associadas à membrana. O HClO também exerce um efeito inibitório rápido na função mitocondrial e na síntese do DNA de bactérias. Além da sua ação antibacteriana, o NaOCl tem a capacidade de dissolver os remanescentes pulpares (17).

A capacidade de dissolução do tecido e propriedades de desbridamento podem ser significativamente melhoradas pelo aumento da temperatura e concentração de NaOCl (15, 16). A capacidade de penetração na área não instrumentada dos sistemas de canais radiculares pode ser aumentada diminuindo a tensão superficial do NaOCl (17).

## 1.2. Microbiologia das infecções endodônticas

As bactérias são as principais causadoras de lesões pulpares e periapicais, diretamente ou pelas toxinas por elas produzidas (18).

Na fase inicial de uma infecção do canal radicular, o número de espécies geralmente é baixo. Se a forma de invasão for provocada por cárie, as bactérias que estão na frente do processo cariogénico são as primeiras a atingir a polpa. Nos casos em que não há comunicação aparente com a cavidade oral e as bactérias penetram pelos túbulos dentinários, como nos traumatismos sem exposição pulpar, não há um padrão claro de invasores bacterianos primários (19).

A incapacidade do sistema imunológico de atingir o sistema de canais radiculares leva à ineficiência desse sistema em erradicar infecções endodônticas (18).

O grau de inflamação periapical e os sintomas dependem da quantidade de células microbianas presentes no canal radicular, da capacidade das mesmas em causar danos no hospedeiro, da duração da infecção, bem como das respostas do hospedeiro (19,20).

Restringir a disseminação da infecção depende das respostas do hospedeiro nos tecidos periapicais. Se estas forem suprimidas ou desafiadas por uma alta carga microbiana, mesmo uma infecção assintomática do canal radicular tem o potencial de se disseminar ainda mais para os tecidos extraradiculares. Por outro lado, canais necróticos sem circulação estão fora do alcance das respostas imunológicas dos hospedeiros (20).

Na ausência de respostas imunológicas do hospedeiro, a virulência e a patogenicidade das espécies microbianas e a proliferação microbiana são reguladas pela competição entre espécies e fatores ambientais, o que pode levar ao supercrescimento de algumas espécies microbianas (19,20).

Em 1894, WD Miller observou que a flora era diferente no terço coronal, médio e apical do sistema de canais o que atualmente é percebido através das diferenças na disponibilidade de nutrientes e de oxigênio na região apical em comparação com o restante canal radicular, sendo estas as principais razões

para o predomínio de bactérias anaeróbias obrigatórias de crescimento lento, na região apical (19,21).

Estudos sobre a dinâmica das infecções de canais radiculares mostraram que a quantidade relativa de microrganismos anaeróbios e de células bacterianas aumentam com o tempo de exposição e que as bactérias facultativamente anaeróbias são superadas em número quando os canais foram infectados durante 3 meses ou mais. Bactérias anaeróbias facultativas crescem com facilidade em condições de anaerobiose, no entanto, a sua principal fonte de energia são os hidratos de carbono. Uma diminuição na disponibilidade de hidratos de carbono no canal radicular ocorre quando não há comunicação direta com a cavidade oral, o que limita severamente as oportunidades de crescimento para anaeróbios facultativos (19,22).

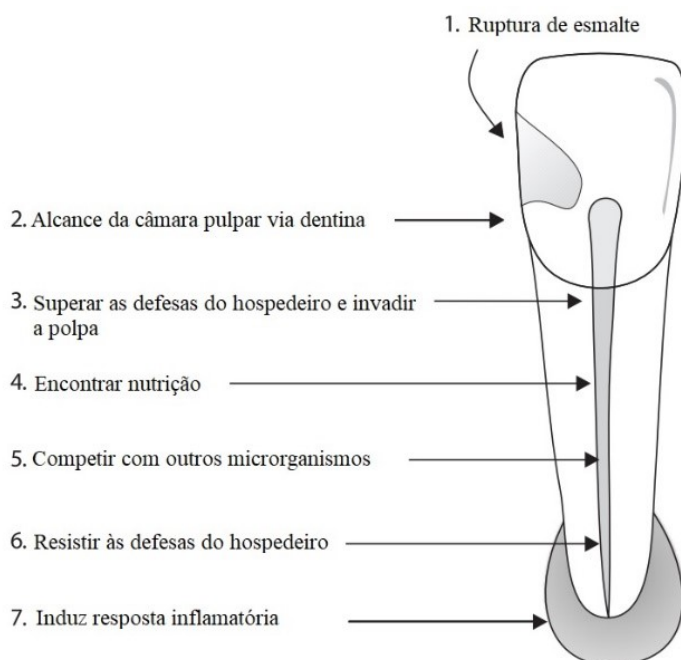


Figura 1 – Esquema representativo do percurso dos microrganismo até invadirem a câmara pulpar e posteriormente o surgimento de uma resposta inflamatória por parte do hospedeiro Adaptado de “Life as an endodontic pathogen. Ecological differences between the untreated and root-filled root canals” (19).

O biofilme fornece aos microrganismos um habitat mais favorável para se viver e uma diversidade metabólica mais eficiente. Além disso, essas comunidades funcionais coordenadas oferecem proteção às bactérias contra outros microrganismos competitivos, agentes antimicrobianos e defesas do hospedeiro, aumentando, portanto, a sua patogenicidade (Figura 1) (23).

Em infecções primárias, os organismos comumente isolados são bastonetes Gram-negativos anaeróbicos (*Fusobacterium nucleatum*, *Cambylobacter rectus*, *Tannerella forsythia*, *Prevotella* e *Porfiromonas spp.*), espiroquetas (*Treponema spp.*), cocos e bastonetes Gram-positivos anaeróbios facultativos (*Peptostreptococcus spp.*, *Eubacterium spp.*, *Propionibacterium spp.*, *Actinomyces spp.*, *Streptococcus spp.*, *Lactobacillus spp.*) (24).

As espécies bacterianas detetadas em maior número em dentes com sintomatologia dolorosa após tratamento podem variar das encontradas em dentes com infecções primárias. Segundo *Jensen PR et al.*, os microrganismos predominantes em dentes tratados com sintomatologia são o *Enterococcus faecalis*, o *Fusobacterium nucleatum* e do reino *Fungi* a *Candida albicans* (Figura 2) (25).

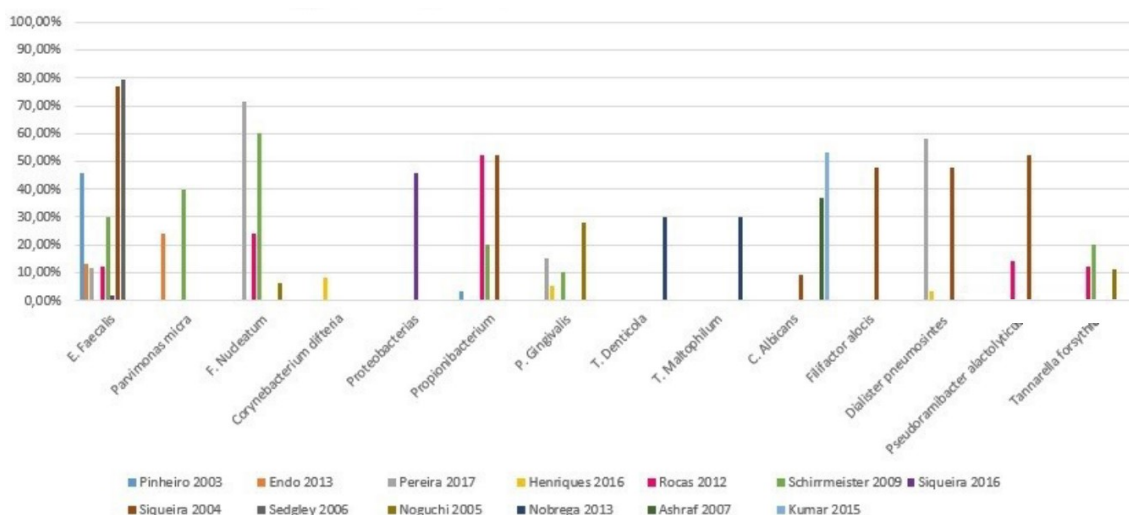


Figura 2 – Prevalência de microrganismos em endodontia; Adaptado de “Influence of microbiology on endodontic failure” (25)

A prevalência de *Enterococcus* tem sido um achado conspícuo em todos os estudos que investigaram a microbiota em dentes com tratamento endodôntico prévio, os *Streptococcus* também são frequentemente identificados nestes dentes. Outros microrganismos que também são frequentes devido à sua associação com doenças endodônticas pós-tratamento são espécies de *Actinomyces* e *Candida* (Figura 2) (25).

### 1.3. Fungos marinhos

A maioria dos compostos bioativos são derivados de microrganismos terrestres e, embora este ambiente seja uma abundante fonte de produtores bioativos, a descoberta de novos metabólitos está a diminuir. Nesse sentido, a enorme biodiversidade presente nos ecossistemas marinhos oferece um recurso promissor para encontrar novos compostos com inúmeras atividades biológicas valiosas (26,27).

Os oceanos contêm inúmeros habitats específicos diferentes, caracterizados por uma ampla variação de temperaturas, pressões hidrostáticas e níveis de salinidade. Para sobreviver em tais ecossistemas únicos, os microrganismos marinhos desenvolveram diferentes mecanismos de adaptação, incluindo a produção de biomoléculas específicas. Conseqüentemente, os microrganismos marinhos parecem ter um potencial considerável de produção de compostos bioativos não encontrados em ambientes terrestres (27,28).

Para além dos fungos, também as bactérias marinhas devem possuir propriedades fisiológicas, bioquímicas e moleculares que são diferentes dos seus equivalentes terrestres e, portanto, podem produzir compostos diferentes. Como tal, as bactérias marinhas são provavelmente os microrganismos mais promissores para a deteção de novas moléculas com propriedades antibacterianas, especialmente porque a maioria dos produtos naturais com estas propriedades vêm de um grupo de bactérias terrestres, os *Actinobacteria* (29,30).

Uma ampla gama de propriedades está associada a fungos marinhos e às suas enzimas, incluindo propriedades antibacterianas, antidiabéticas, antifúngicas, anti-inflamatórias, antiprotozoárias, antituberculose, antivirais, anticancerígenas, antioxidantes e inseticidas. Por esta razão, encontram-se aplicações na indústria farmacêutica, agroquímica, indústria alimentar, indústria têxtil e tratamento de resíduos (27,31).

Espécies pertencentes ao gênero *Aspergillus*, *Chaetomium*, *Cladosporium*, *Penicillium* e *Trichoderma* são comumente encontrados em ambientes marinhos como fungos marinhos facultativos que se originam de

ambientes terrestres e desenvolveram características morfológicas e fisiológicas que lhes permitem adaptar às condições marinhas (32).

Espécies marinhas de *Penicillium* estão entre os fungos mais comumente isolados em vários ambientes, terrestres ou marinhos, incluindo substratos marinhos, como esponjas, corais, algas e areia. Várias espécies marinhas de *Penicillium* são económica, biotecnológica e clinicamente importantes. As espécies marinhas de *Penicillium* são produtores de metabólitos secundários potencialmente úteis como fármacos incluindo os antibióticos (33,34). Esses metabólitos frequentemente apresentam bioatividade farmacêutica relevante e podem ser candidatos ao desenvolvimento de novos medicamentos (35).

Espécies marinhas de *Penicillium* em Portugal são pouco estudadas e, por isso, a sua diversidade é basicamente desconhecida. Durante um extenso levantamento da diversidade de fungos em ambientes marinhos costeiros em Portugal, foi obtida uma coleção de *Penicillium* isolados incluindo uma espécie nova putativa, denominada de *Penicillium lusitanum* (*P. lusitanum*) (35).

*Aspergillus affinis* (*A. affinis*) é uma nova espécie produtora de *Ocratoxina A* (OTA), encontrados no microbioma fluvial e relacionados com a decomposição da serapilheira (36).

Neste sentido, diversos investigadores têm vindo a focar a sua atenção nas propriedades dos fungos marinhos, tendo alguns já demonstrado efeitos benéficos e concretos na eliminação de *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*) e de *Candida albicans* (*C. albicans*) (37).

#### 1.4. Objetivos da irrigação:

A irrigação do canal radicular desempenha um papel importante no desbridamento e desinfecção do sistema de canais radiculares e é parte integrante dos procedimentos de preparação químico-mecânica (38), antes, durante e após a instrumentação a irrigação deve estar presente de forma a facilitar a eliminação e remoção de microrganismos, de tecido necrótico e inflamatório bem como da *smear layer*.

Os objetivos a serem alcançados com a irrigação em endodontia são principalmente três:

Efeito químico: dissolução de tecido orgânico e inorgânico, remoção de resíduos de dentina e *smear layer*. Estes objetivos podem ser alcançados apenas por irrigantes quimicamente ativos (NaOCl, EDTA) (10).

Efeito mecânico: lubrificação do canal, remoção mecânica de microrganismos / biofilme, restos de tecido pulpar, bem como restos de dentina devido às forças aplicadas pelo fluxo do irrigante. Esses efeitos podem ser esperados tanto de irrigantes quimicamente ativos (NaOCl) quanto de irrigantes inertes (água, solução salina) (10).

Efeito biológico: eficácia sobre microrganismos anaeróbios e facultativos, eliminação de biofilme ou na inativação de endotoxinas (39).

Como referido anteriormente até agora, nenhuma outra solução alcançou a eficácia do NaOCl. No entanto, a atividade citotóxica é uma limitação bem conhecida que pode causar efeitos lesivos agudos se atingir a área periapical, como dor intensa, edema, ulcerações, sensação de queimadura ou necrose dos tecido adjacentes (40).

Na Tabela 1 podemos ver descritas as propriedades que um irrigante ideal deveria possuir.

Tabela 1 – Características de um irrigante ideal em endodontia, adaptado de “Irrigantes em endodontia” (41)

**Tabela 1 - Características de um irrigante ideal em endodontia**

a. Ser germicida e fungicida;
b. Não ser tóxico para os tecidos periapicais;
c. Manter-se estável em solução;
d. Ter efeito antimicrobiano prolongado (substantividade);
e. Não perder atividade na presença de sangue;
f. Ter baixa tensão superficial;
g. Não ser tóxico para os tecidos periapicais;
h. Não manchar nem enfraquecer a estrutura dentária;
i. Não induzir resposta imune nas células mediadoras;
j. Ser capaz de remover eficazmente o Smear layer;
k. Não ser antigénico ou carcinogénico para os tecidos circundantes do dente;
l. Não deve interferir na capacidade selante dos materiais obturadores;
m. Ser fácil de aplicar;
n. Ter baixo custo;

## 1.5. Citotoxicidade e Genotoxicidade de irrigantes endodônticos

As soluções de irrigação quando em contacto íntimo com os tecidos periapicais podem ser usadas em pulpectomias, principalmente quando a identificação do ápice é complexa (42).

O NaOCl e a CHX são amplamente utilizados como irrigantes principais com eficácia demonstrada na capacidade antimicrobiana e propriedades específicas, como dissolução de tecido (NaOCl) e substantividade (CHX) (43).

Para estabelecer a biocompatibilidade e segurança no uso de tais soluções e combinações farmacológicas, é desejável realizar uma variedade de testes que analisem vários parâmetros, como citotoxicidade e genotoxicidade (42).

A citotoxicidade está relacionada com o grau em que um agente tem ação destrutiva específica sobre certas células (44), enquanto a genotoxicidade é o dano potencial de certas substâncias ao DNA (45).

G.Botton *et al.*, avaliaram a citotoxicidade e a genotoxicidade das soluções irrigantes principais e auxiliares e associações entre elas (Tabela 2) concluindo que todas as soluções irrigantes testadas e associações farmacológicas demonstraram algum nível de citotoxicidade ou genotoxicidade (42).

Na tabela 2 estão identificados os grupos experimentais usados neste estudo de G.Botton *et al.* (42).

Tabela 2 – Soluções de irrigação e associações farmacológicas usados no estudo de G.Botton *et al.*(42).

<b>Grupo</b>	<b>Soluções de irrigação e associações farmacológicas</b>
<b>Controlo</b>	Células em ambiente de cultura e solução salina tamponada com fosfato (PBS)
<b>1% NaOCl</b>	Hipoclorito de sódio a 1%
<b>2,5% NaOCl</b>	Hipoclorito de sódio 2,5%
<b>2% CHX</b>	2% digluconato de clorexidina
<b>6% CA</b>	6% de ácido cítrico
<b>17% EDTA</b>	17% de ácido etilenodiamino tetra-cético
<b>1% NaOCl + 6% CA</b>	1% de hipoclorito de sódio e 6% de ácido cítrico
<b>1% NaOCl + 17% EDTA</b>	1% de hipoclorito de sódio e 17% de ácido etilenodiamino tetra-cético
<b>2,5% NaOCl + 6% CA</b>	2,5% de hipoclorito de sódio e 6% de ácido cítrico
<b>2,5% NaOCl + 17% EDTA</b>	2,5% de hipoclorito de sódio e 17% de ácido etilenodiamino tetra-cético
<b>2% CHX + 6% CA</b>	2% de digluconato de clorexidina e 6% de ácido cítrico
<b>2% CHX + 17% EDTA</b>	2% de digluconato de clorexidina e 17% de ácido etilenodiamino tetra-cético

Este estudo avalia a citotoxicidade por ensaio de MTT em PBMCs após exposição a soluções irrigantes e associações farmacológicas. As culturas de células foram expostas por 24 e 72 h. As barras representam as diferentes exposições. Diferenças significativas entre as culturas de células não tratadas (controlo) e tratadas são indicadas por asteriscos (42). (Figura 3).

O ensaio MTT avalia a viabilidade celular de uma amostra e o nível de atividade metabólica mitocondrial de células viáveis (46).

No estudo de G.Botton *et al.*, verificou-se também uma redução da viabilidade celular em ambos os períodos com as principais soluções irrigantes 1% e 2,5% NaOCl e 2% CHX, o que segundo os autores está de acordo com outros estudos de avaliação de citotoxicidade anteriormente realizados. (Figura 3).

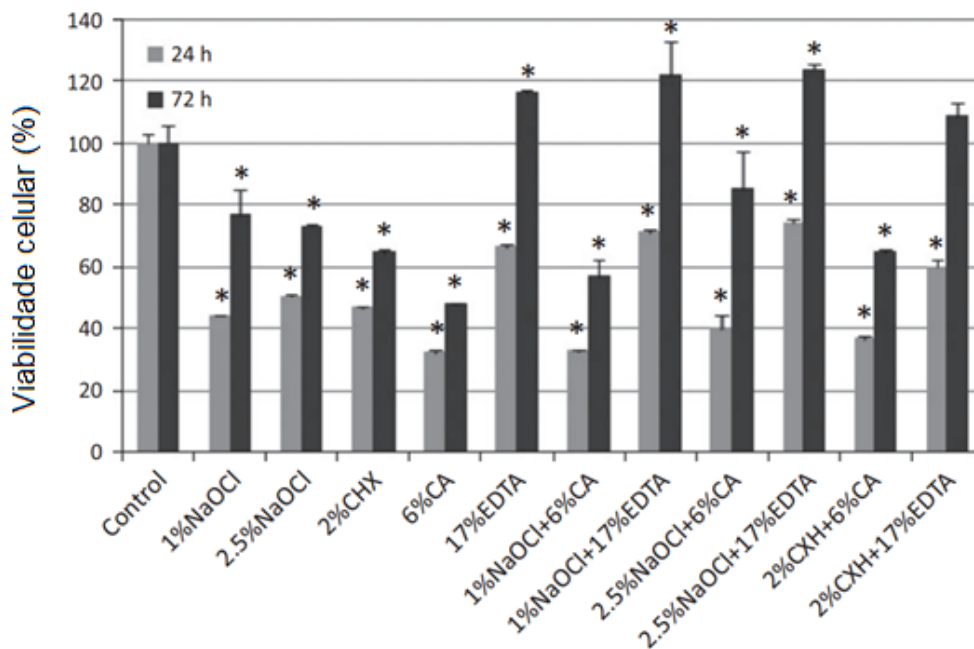


Figura 3 – Viabilidade celular das soluções irrigantes usadas no estudo de G.Botton *et al* (42)

Na Figura 4 podemos observar a genotoxicidade pelo Ensaio do Cometa Alcalino em PBMCs após exposição a soluções irrigantes e associações farmacológicas. As culturas de células foram expostas por 24 e 72 h. As barras representam os meios. Diferenças significativas entre as culturas de células não tratadas (Controlo) e tratadas são indicadas por asteriscos (42).

O ensaio do cometa alcalino é um método padrão para avaliação de danos ao DNA, de execução simples e alta sensibilidade (47).

As três soluções principais (1% e 2,5% NaOCl e 2% CHX) apresentaram potencial genotóxico (42).

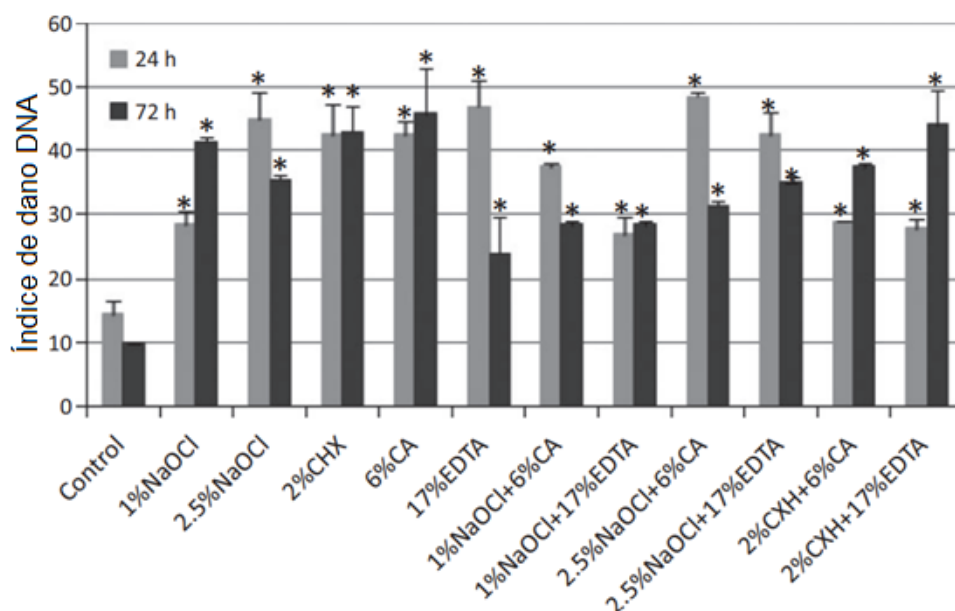


Figura 4 –Percentagem (%) de dano causado no DNA em células individuais (42).

Neste estudo de G.Botton *et al.*, todas as soluções irrigantes testadas e associações farmacológicas demonstraram algum nível de citotoxicidade ou genotoxicidade. Porém, ao comparar os resultados obtidos, observou-se que, entre as principais soluções, a CHX apresentou menor potencial citotóxico (Figura 4) (42).



## II. MATERIAIS E MÉTODOS



## 2. Materiais e métodos

Este trabalho tem como objetivo determinar se extratos de fungos marinhos (*P. lusitanum* e *A. affinis*), são eficazes na eliminação de *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*) e de *Candida albicans* (*C. albicans*). Três concentrações de dois extratos de fungos marinhos foram preparadas, testadas e comparadas com outras soluções e produtos farmacêuticos disponíveis no mercado.

### 2.1. Produção de extratos brutos e extração de fungos marinhos

O seguinte protocolo permite a obtenção de compostos bioativos derivados dos fungos, para posterior avaliação do seu potencial de desinfecção.

A produção de extratos brutos de fungos marinhos, a ser testada, foi assegurada em colaboração com a Daniela Devesas aluna da Licenciatura em Ciências Biomédicas da Faculdade de Medicina Dentária da UCP. O procedimento de produção de extratos brutos e extração de fungos marinhos divide-se em cinco etapas.

A primeira etapa, consistiu em recuperar isolados de fungos marinhos. Para isso, prepararam-se 150 mL de meio *Potato Dextrose Agar* (PDA), 6,3g de meio e 150 mL de água destilada. O meio foi posteriormente esterilizado em autoclave a 121°C durante 15 minutos. As placas de Petri foram devidamente preparadas e identificadas. Em condições de assepsia (à chama), usaram-se dois discos ( $\pm$  0,5 cm de diâmetro) de micélio para inocular novas placas de PDA com o auxílio da base de uma ponta azul (estéril) de micropipeta e palitos estéreis. Os discos de micélio foram retirados, com o auxílio da ponta azul estéril, dando preferência ao micélio que estava a crescer na periferia da cultura. Posteriormente as placas foram celadas e incubadas a 25°C por um período de 7-14 dias sem agitação e no escuro. Durante a incubação foi observado e registado o crescimento dos isolados.

A segunda etapa, consistiu em preparar meio *Potato Dextrose Broth* (PDB). O meio líquido foi preparado a partir de PDA, 10,5g de meio e adicionou-se 250 mL de água destilada, agitou-se o frasco até obter uma mistura homogénea, de seguida deixou-se sedimentar o agar e filtrou-se o meio. O meio filtrado foi posteriormente colocado em frascos Erlenmeyer de 1 L, estes frascos foram

tampados com rolha de algodão e gaze coberta com papel de alumínio. O Erlenmeyer com o meio foi esterilizado a 121°C durante 15 minutos. Para cada isolado de fungo marinho foram necessários 250 mL de meio PDB sem sal.

A terceira etapa consistiu no crescimento dos isolados de fungos marinhos por fermentação líquida, para este crescimento inoculou-se 250 mL de meio PDB em frasco Erlenmeyer de 1L com dois discos de micélio, os frascos foram tapados com rolha de algodão e incubados a 25°C durante 15 dias sem agitação no escuro.

A quarta etapa consistiu na preparação de extratos brutos de meio de cultura. Após o período de incubação, o micélio foi filtrado em papel de filtro estéril, de forma a obterem-se filtrados da cultura. O micélio que ficou no papel de filtro, foi posteriormente retirado com uma pinça estéril e armazenado em tubo Falcon a -80°C. Depois disso o meio de cultura foi filtrado com membrana de celulose de 0,45 µm seguindo-se as membranas de nitrato de celulose 0,2 µm num sistema a vácuo.

O meio de cultura foi liofilizado e foi pesado a seco de forma a transferir 2g para cada tubo falcon. De seguida adicionaram-se 20ml de MeOH 80% (Metanol 80%) e levou-se ao vortex durante 5 min. Cada mistura foi centrifugada a 14000g durante 10 minutos a 4°C, de forma a remover as proteínas precipitadas, o pellet foi descartado e o sobrenadante coletado. O processo de extração foi repetido mais uma vez. Após a extração, os extratos metanólicos foram filtrados usando um filtro de microfibras de vidro de 0,47 µm, foram seguidamente evaporados usando um evaporador rotativo com temperatura de banho maria a 40°C. O frasco foi deixado aberto *overnight* de forma a que o MeOH remanescente evaporasse. Os extratos foram armazenados a -80°C.

A quinta etapa, referente à produção de extratos brutos do micélio iniciou-se com a liofilização do micélio separado do meio, até que este esteja seco. O micélio seco é depois transferido para tubos falcon e posteriormente para um almofariz onde é macerado até ser reduzido a pó, a este pó são adicionados 80mL de etanol a 22% e continua-se a macerar, filtra-se com filtro de microfibras de 0,47µm. De seguida evapora-se o etanol com a ajuda de um evaporador rotativo em banho maria a 40°C e armazena-se a -80°C até à sua

utilização. O protocolo da produção de extratos brutos e extração de fungos marinhos encontra-se em forma de síntese como Anexo 1.

## 2.2. Método de difusão em disco

De forma a detetar a atividade antimicrobiana dos extratos de fungos marinhos realizou-se o seguinte processo de difusão em disco.

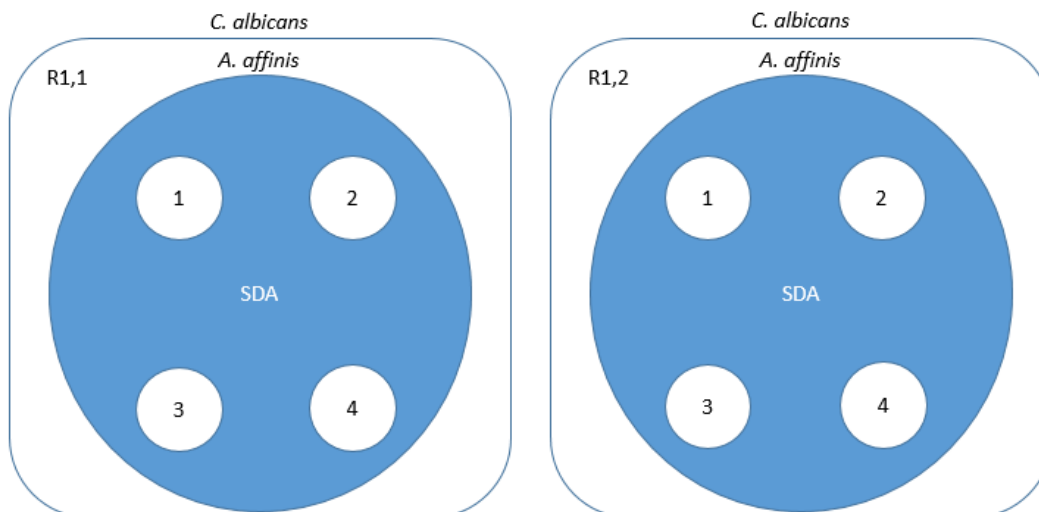
Prepararam-se duas suspensões a partir de culturas de células puras com 24 horas, uma de *E. faecalis* ATCC29212 e outra de *C. albicans* ATCC90028. As suspensões foram preparadas em solução salina estéril (NaCl 0,9%), e ajustada para turbidez na escala 0,5 de McFarland.

O inóculo foi espalhado de forma uniforme numa placa com meio Sabouraud Dextrose Agar (SDA) e Mueller Hinton Agar (MHA). A placa foi riscada exaustivamente com o inóculo, primeiro numa direção e depois foi virada e riscada exaustivamente na outra direção. Com uma pinça estéril, os discos brancos e o disco de antibiótico foram colocados na placa e impregnados.

Os extratos crus secos foram dissolvidos em água estéril a uma concentração de 500 mg/ml, de seguida o extrato foi pipetado por cima dos discos. O ensaio foi realizado em duplicado.

A Figura 5 representa os discos colocados na placa de Petri com meio SDA de forma a testar a eficácia dos irrigantes na inibição de *C. albicans*, os discos testados foram os seguintes:

- Disco 1 - Extrato de *A. affinis* numa concentração de 500mg/ml
- Disco 2 - Extrato de *A. affinis* numa concentração de 250mg/ml
- Disco 3 - Extrato de *A. affinis* numa concentração de 50mg/ml
- Disco 4 - Extrato MIX (*A. affinis* + *P.lusitanum*) numa concentração de 250mg/ml



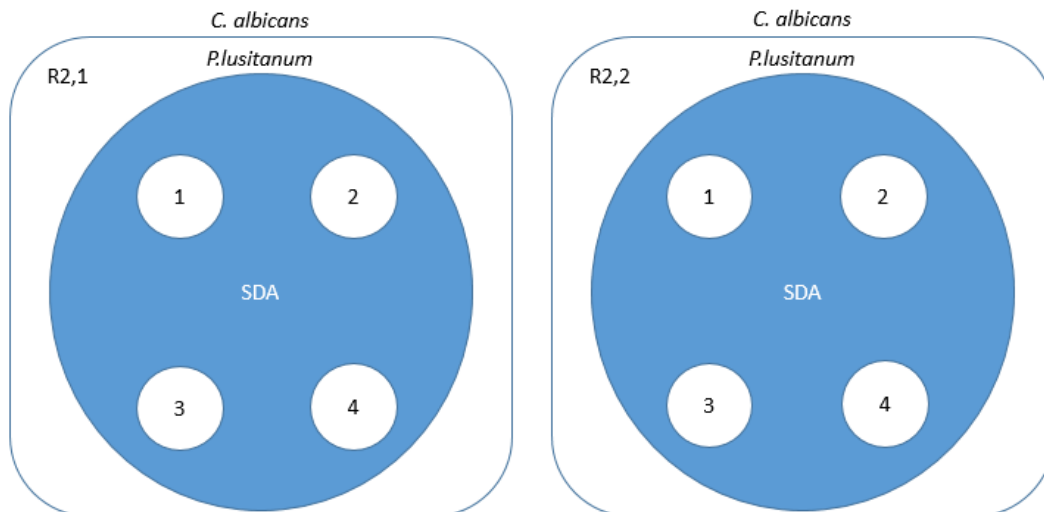
Legenda:

- 1- Extrato *A.affinis* sem sal 500mg/ml
- 2- Extrato *A.affinis* sem sal 250mg/ml
- 3- Extrato *A.affinis* sem sal numa 50mg/ml
- 4- Extrato MIX (*A.affinis* + *P. lusitanum*) 250mg/ml

Figura 5 – Placas de Petri inoculadas com *C. albicans*, duas replicas (R1,1 e R1,2); Teste de eficácia de *A. affinis*

A Figura 6 representa os discos colocados na placa de Petri com meio SDA de forma a testar a eficácia dos irrigantes contra *C. albicans*, os discos testados foram os seguintes:

- Disco 1 - Extrato de *P. lusitanum* numa concentração de 500mg/ml
- Disco 2 - Extrato de *P. lusitanum* numa concentração de 250mg/ml
- Disco 3 - Extrato de *P. lusitanum* numa concentração de 50mg/ml
- Disco 4 - Extrato MIX (*P. lusitanum* + *A. affinis*) numa concentração de 250mg/ml



- Legenda:
- 1- Extrato *P. lusitanum* sem sal 500mg/ml
  - 2- Extrato *P. lusitanum* sem sal numa 250mg/ml
  - 3- Extrato *P. lusitanum* sem sal numa 50mg/ml
  - 4- Extrato MIX (*P. lusitanum* + *A. affinis*) 250mg/ml

Figura 6 - Placas de Petri inoculadas com *C. albicans*, duas replicas (R2,1 e R2,2); Teste de eficácia de *P. lusitanum*

Os discos dos controlos positivo e negativo no meio SDA foram os seguintes: Controle positivo, CHX 2%, NaOCl 2,5%, F (Fluconazol) e CHG (cicloheximida), controle negativo, água estéril.

A Figura 7 representa as placas com os discos controlo. O controlo foi dividido em duas placas (Controlo 1 e Controlo 2) de forma a impedir que o NaOCl (Controlo 2) ficasse sobreposto aos halos dos restantes irrigantes testados.

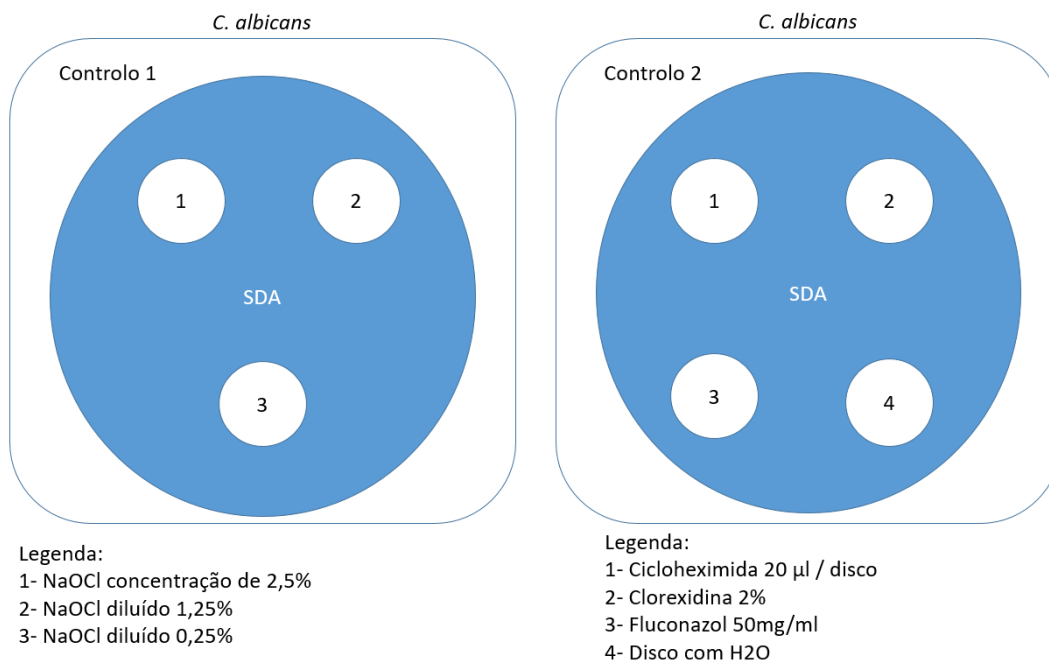
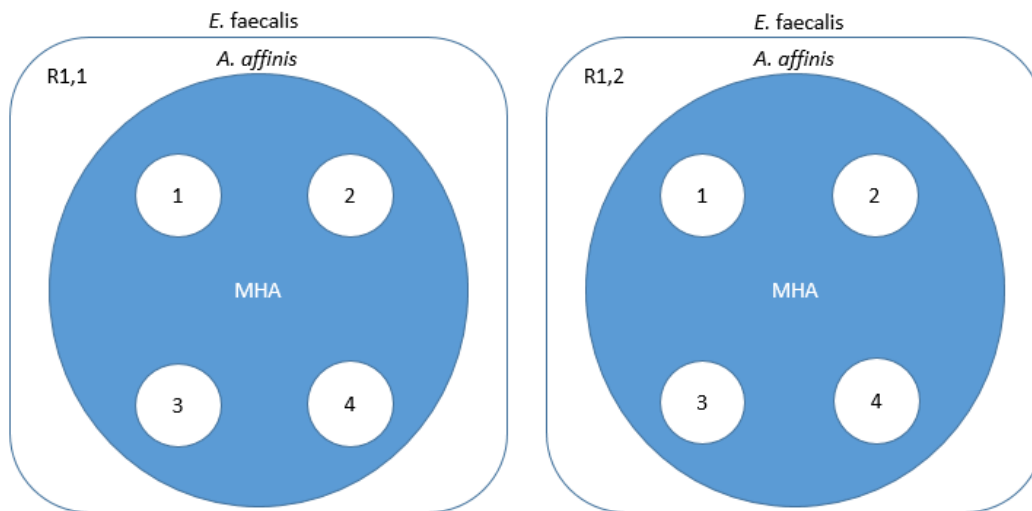


Figura 7 – Placas de Petri inoculadas com *C. albicans*, grupo controlo (Controlo 1 e Controlo 2)

A Figura 8 representa os discos colocados na placa de Petri com meio MHA de forma a testar a eficácia dos irrigantes contra *E. faecalis*, os discos testados foram os seguintes:

- Disco 1 - Extrato de *A. affinis* numa concentração de 500mg/ml
- Disco 2 - Extrato de *A. affinis* numa concentração de 250mg/ml
- Disco 3 - Extrato de *A. affinis* numa concentração de 50mg/ml
- Disco 4 - Extrato MIX (*A. affinis* + *P.lusitanum*) numa concentração de 250mg/ml

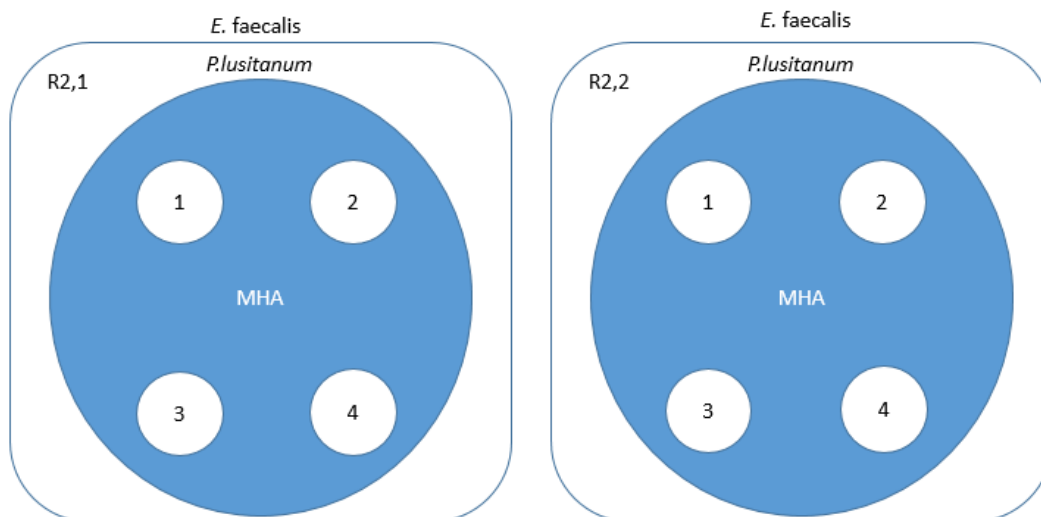


Legenda:  
 1- Extrato *A.affinis* sem sal 500mg/ml  
 2- Extrato *A.affinis* sem sal 250mg/ml  
 3- Extrato *A.affinis* sem sal 50mg/ml  
 4- Extrato MIX (*A.affinis* + *P. lusitanum*) 250mg/ml

Figura 8 - Placas de Petri inoculadas com *E. faecalis*, duas replicas (R1,1 e R1,2); Teste de eficácia de *A. affinis*

A Figura 9 representa os discos colocados na placa de Petri com meio SDA de forma a testar a eficácia dos irrigantes contra *E. faecalis*, os discos testados foram os seguintes:

- Disco 1 - Extrato de *P. lusitanum* numa concentração de 500mg/ml
- Disco 2 - Extrato de *P. lusitanum* numa concentração de 250mg/ml
- Disco 3 - Extrato de *P. lusitanum* numa concentração de 50mg/ml
- Disco 4 - Extrato MIX (*P. lusitanum* + *A. affinis*) numa concentração de 250mg/ml



Legenda:  
 1- Extrato *P.lusitanum* sem sal 500mg/ml  
 2- Extrato *P.lusitanum* sem sal 250mg/ml  
 3- Extrato *P.lusitanum* sem sal 50mg/ml  
 4- Extrato MIX (*P. lusitanum* + *A.affinis*) 250mg/ml

Figura 9 - Placas de Petri inoculadas com *E. faecalis*, duas replicas (R2,1 e R2,2); Teste de eficácia de *P.lusitanum*

No meio MHA os discos dos controlos positivo e negativo foram os seguintes: Controle positivo, amoxicilina + ácido clavulânico 30g/disco, CHX 2%, NaOCl 2,5% e controle negativo, água estéril. Após 15 minutos à temperatura ambiente as placas foram incubadas a 37°C durante 24 horas.

A Figura 10 representa as placas com os discos controlo. O controlo foi dividido em duas placas (Controlo 1 e Controlo 2) de forma a impedir que o NaOCl (Controlo 2) ficasse sobreposto aos halos dos restantes irrigantes testados.

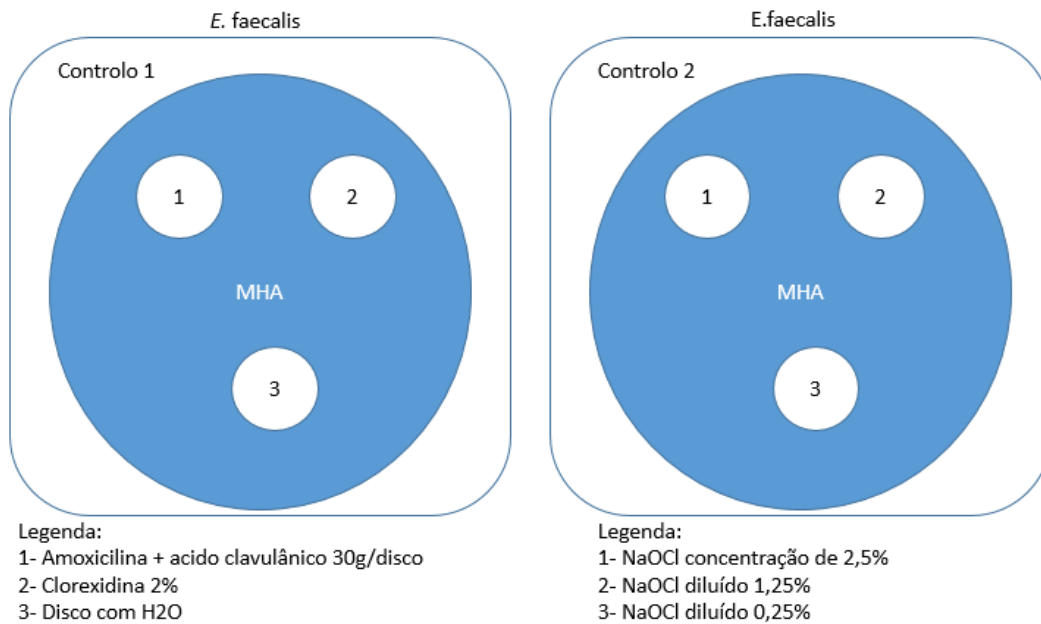


Figura 10 - Placas de Petri inoculadas com *E. faecalis*, grupo controlo (Controlo 1 e Controlo 2)

O diâmetro da zona de inibição é medido em milímetros (Figura 11), sendo o ensaio realizada duas vezes para cada estripe.

O protocolo do método de difusão em disco encontra-se em forma de síntese como Anexo 2.

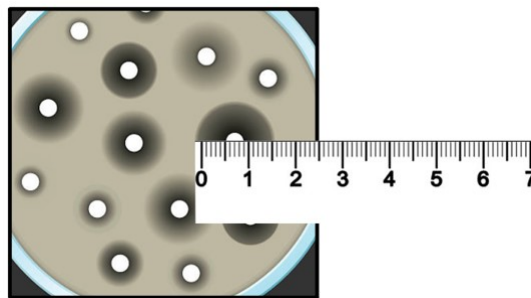


Figura 11 – Figura representativa da medição do halos formados por cada substância inoculada nos discos

### 2.3. Teste de viabilidade celular

O teste de viabilidade celular foi executado com células VERO. O mesmo procedimento foi executado de forma igual para o teste de citotoxicidade dos extratos de fungos marinhos e para os grupos controlos, de forma a permitir uma posterior comparação.

As células VERO encontravam-se inicialmente aderidas ao fiasco de cultura que continha uma cultura antiga, desse modo o processo iniciou-se por descartar o meio de cultura antigo e lavarem-se as células duas vezes com 5 mL de PBS. Após retirar o PBS adicionou-se 2ml de Trypsin-EDTA (37°C) e incubou-se por 2 min. A tripsinização foi parada com a adição de 6ml de meio (DMEM + 10%FBS + 1%A. A).

Pipetaram-se 30 $\mu$ L de 0,4% Trypan-Blue para um microtubo de 1,5mL, adicionou-se a este microtubo 30 $\mu$ L da suspensão de células. Numa câmara de hemocítmetro adicionou-se 10 $\mu$ L da suspensão celular com Trypan-Blue de forma a visualizar e contabilizar as células no microscópio.

Contaram-se as células nos cinco quadrados (Figura 12) nos extremos e no centro da grelha do hemocítmetro. Calculou-se a média do numero de células presentes por quadrado.

No frasco de cultura onde se retirou a suspensão celular colocou-se o mesmo volume de meio (DMEM+10%FBS+1%A.A).

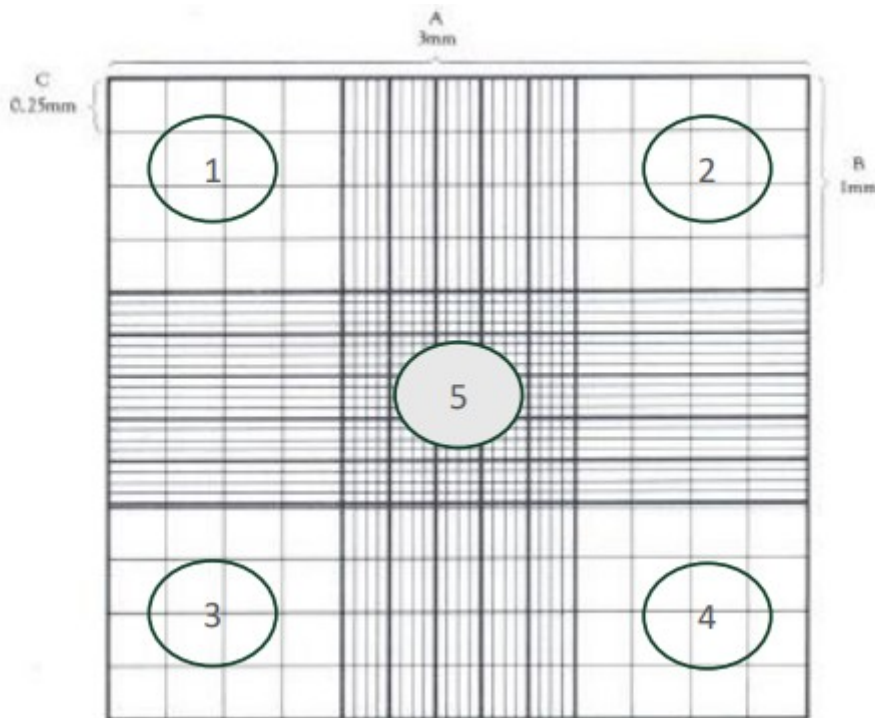


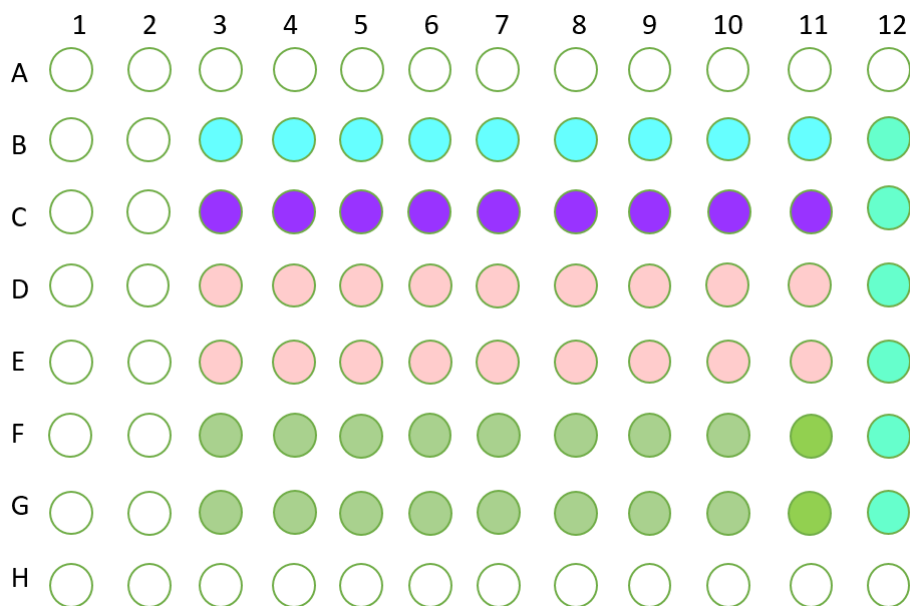
Figura 12 - Divisão dos quadrados da grelha do hemocitômetro.

Volume de cada quadrado:  $1\text{mm} \times 1\text{mm} \times 0.1\text{mm} = 0.1\text{mm}^3 = 0.1 \mu\text{l}$

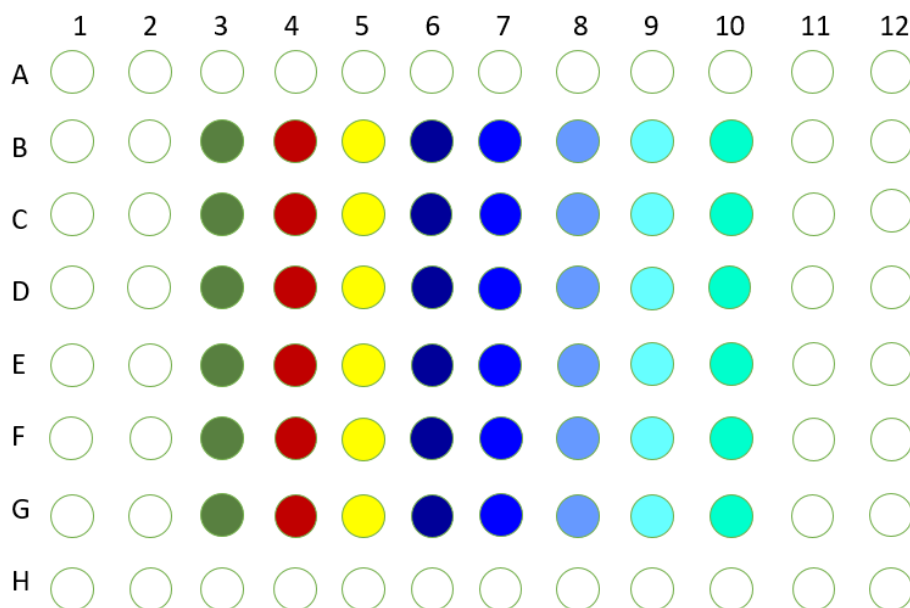
Pipetaram-se 50 $\mu\text{L}$  da suspensão celular em cada poço das placas de microtitulação com 60 poços (Esquema 1), para os extratos de fungos e 48 poços, para os grupos controlo (Esquema 2) e incubou-se por 24h (37°C, 5% CO<sub>2</sub>). Após 24h adicionou-se 10 $\mu\text{L}$  de cada substância a testar em cada poço de acordo com o Esquema 1 e 2, e incubou-se por 24h (37°C, 5% CO<sub>2</sub>).

Foram testados dois extratos de fungos diferentes e cada um destes estava diluído em duas concentrações distintas. Os extratos foram diluídos em H<sub>2</sub>O a partir da solução *stock* de 500mg/ml. A partir desta solução foram preparadas soluções com concentrações de 250mg/ml e 50mg/ml para *P. lusitanum* e para *A. affinis*.

Nos grupos controlo foram testados seis diferentes compostos, Cicloheximida, Clorexidina 2%, Fluconazol 50mg/ml, NaOCl 2,5 %, NaOCL 1,25% e NaOCl 0,25%.



Esquema 1 - Esquema dos 60 poços usados para testar a citotoxicidade de cada extrato de fungo usado na investigação. Legenda: B-3 até B-11 (controlo positivo) células VERO, C-2 até C-11 Controlo PBS, D-3 até D-11 *P. lusitanum* 50mg/ml, E-3 até E-11 *P. lusitanum* 250mg/ml, F-3 até F-11 *A. affinis* 50mg/ml, G-3 até G-11 *A. affinis* 250mg/ml, B-12 até G-12 (controlo negativo) H<sub>2</sub>O.



Esquema 2 – Esquema dos 48 poços usados para testar a citotoxicidade de cada substância do grupo controlo. Legenda: B-3 até G-3 Cicloheximida. B-4 até G-4 Clorexidina 2%. B-5 até G-5 Fluconazol 50mg/ml, B-6 até G-6 Hipoclorito de Sódio 2,5%, B-7 até G-7 Hipoclorito de Sódio 1,25%, B-8 até G-8 Hipoclorito de Sódio 0,25%, B-9 até G-9 (controlo positivo) células VERO, B-10 até G-10 (controlo negativo) H<sub>2</sub>O.

Após 24h retirou-se todo o meio de cultura de cada poço com uma bomba de vácuo incubou-se durante 3 horas (37°C, 5% CO<sub>2</sub>). Foi feita a leitura e registada a absorbância do meio a 570 e 600 nm, num espectrofotómetro.

## 2.4. Local da realização do estudo

A componente experimental do estudo foi realizada no laboratório de microbiologia associado ao SalivaTec e no CellTec, Centro de Investigação Interdisciplinar em Saúde (CIIS), da Universidade Católica Portuguesa – Viseu.

## 2.5. Análise estatística

A análise estatística foi efetuada utilizando o programa informático de estatística GraphPad Prism 9.1.1 (GraphPad Software, San Diego, USA).

A análise comparativa é feita através da medição dos halos formados por cada substância testada. A comparação é feita entre substâncias em teste e posteriormente com os grupos de controlo positivo.

Para a análise estatística da viabilidade celular dos extratos de fungos foi utilizada “Two-way ANOVA” e “Šídák’s multiple comparisons test” para a significância estatística. Para analisar a viabilidade celular dos grupos controlo foi utilizada “Unpaired t test” para a significância estatística.



### III. RESULTADOS



### 3. Resultados

#### 3.1. Atividade antimicrobiana associada aos extratos de *A. affinis* e *P. lusitanum*

Os resultados foram obtidos através da medição dos halos formados por cada substância inoculada nos discos.

A Figura 13 corresponde a uma fotografia dos resultados obtidos ao fim de 24 horas, onde podemos encontrar quatro antibiogramas.

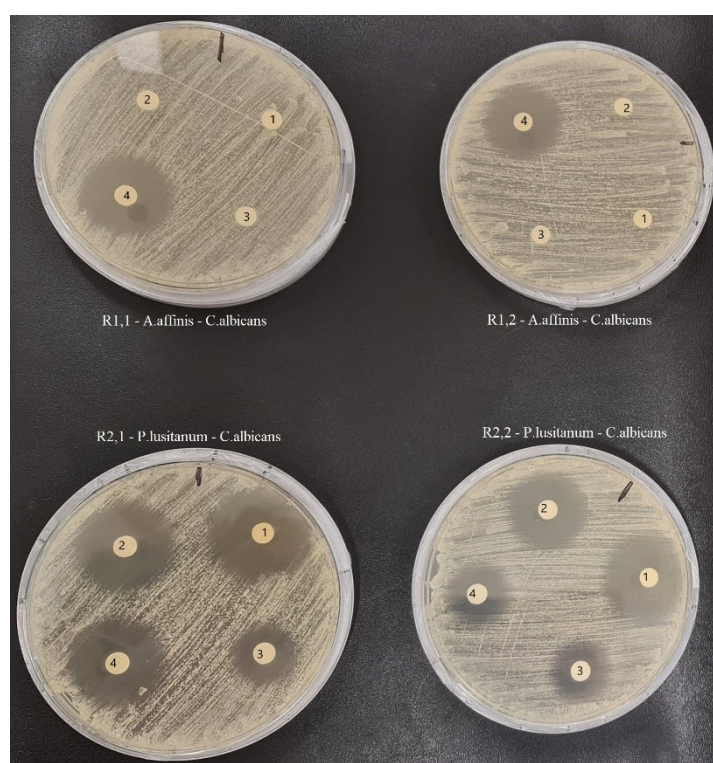


Figura 13 – Antibiogramas de *A. affinis* e *P. lusitanum* em placas inoculadas com *C. albicans*. R1,1 e R2,2 (*A. affinis* 500mg/ml, 250mg/ml, 50mg/ml, *A. affinis* + *P. lusitanum* 250mg/ml), R2,1 e R2,2 (*P. lusitanum* 500mg/ml, 250mg/ml, 50mg/ml, *P. lusitanum* + *A. affinis* 250mg/ml)

Os antibiogramas R1,1 e R1,2 (*A. affinis* – *C. albicans*) constituídos por quatro discos, tal como representado na Figura 5 (materiais e métodos) são os seguintes:

Legenda:

- 1- Extrato *A. affinis* sem sal 500mg/ml
- 2- Extrato *A. affinis* sem sal numa diluição 250mg/ml
- 3- Extrato *A. affinis* sem sal numa diluição 50mg/ml
- 4- Extrato MIX (*A. affinis* + *P. lusitanum*) numa diluição de 250mg/ml

Analisando a Figura 13 é possível observar que nos antibiogramas R1,1 e R1,2 (*A. affinis* – *C. albicans*) apenas o disco 4 apresenta um halo de inibição com uma dimensão de 24 e 25 mm respetivamente, o que sugere, portanto que apenas o Extrato MIX que contem *A. affinis* + *P. lusitanum* se mostrou eficaz na inibição de *C. albicans*.

Tabela 3 - Resultados obtidos através de medição dos halos dos antibiograma de *A. affinis* na inibição de *C. albicans*

<i>A. affinis</i> – <i>C. albicans</i>			
R1,1	Halo (mm)	R1,2	Halo(mm)
Disco 1	0	Disco 1	0
Disco 2	0	Disco 2	0
Disco 3	0	Disco 3	0
Disco 4	24	Disco 4	25

Os antibiogramas presentes na Figura 13, R2,1 e R2,2 (*P. lusitanum* - *C. albicans*) constituídos por quatro discos, tal como esquematizado na Figura 6 são os seguintes:

Legenda:

- 1- Extrato *P. lusitanum* sem sal 500mg/ml
- 2- Extrato *P. lusitanum* sem sal numa diluição 250mg/ml
- 3- Extrato *P. lusitanum* sem sal numa diluição 50mg/ml
- 4- Extrato MIX (*P. lusitanum* + *A. affinis*) numa diluição 250mg/ml

Analisando a Figura 13 é possível observar que no antibiograma R2,1 (*P. lusitanum* - *C. albicans*) todas as concentrações dos extratos de fungos *P. lusitanum* testadas apresentam halo de inibição. No antibiograma R2,1 o halo do disco de *P. lusitanum* com a concentração de 500mg/ml foi de 30mm, o halo do disco com a concentração de 250mg/ml foi de 28 mm, o halo do disco com a concentração de 50mg/ml foi de 20 mm e o halo do disco MIX (*P. lusitanum* + *A. affinis*) numa diluição 250mg/ml foi de 25 mm. Estes resultados sugerem que os extratos de *P. lusitanum* na concentração de 500mg/ml apresentam maior eficácia na inibição de *C. albicans*, contudo, todas as concentrações testadas apresentam eficácia.

No antibiograma R2,2 (*P. lusitanum* - *C. albicans*; réplica) todos os discos mostraram também halo de inibição. O disco com a concentração de 500mg/ml mostrou um halo de 30 mm, o disco com a concentração de 250mg/ml mostrou um halo de 25 mm, o disco com a concentração de 50mg/ml mostrou um halo de 18 mm e o halo MIX (*P. lusitanum* + *A. affinis*) numa diluição 250mg/ml foi de 20 mm, apresentando resultados compatíveis com o ensaio no disco R2,1.

Tabela 4 - Resultados obtidos através de medição dos halos dos antibiograma de *P. lusitanum* na inibição de *C. albicans*

<i>P. lusitanum</i> – <i>C. albicans</i>			
R2,1	Halo (mm)	R2,2	Halo(mm)
Disco 1	30	Disco 1	30
Disco 2	28	Disco 2	25
Disco 3	20	Disco 3	18
Disco 4	24	Disco 4	20

O grupo controlo dos antibiogramas de inibição de *C. albicans* está representado na Figura 14.

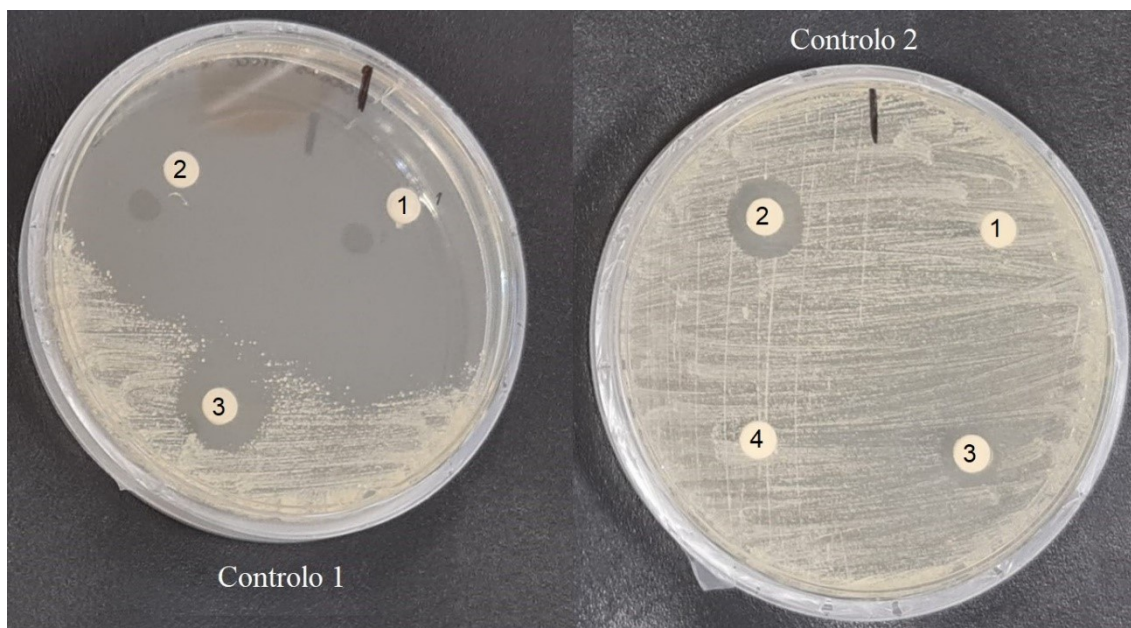


Figura 14 – Antibiogramas controlo da inibição de *C. albicans*, Controlo 1 ( Discos com NaOCl 2,5%, 1,25% e 0,25%) e Controlo 2 (Discos com, Cicloheximida 20 µl / disco, Clorexidina 2%, Fluconazol 50mg/ml e H2O)

O grupo controlo está dividido em dois antibiogramas, o antibiograma de Controlo 1 contem os seguintes discos

Legenda:

- 1- NaOCl concentração de 2,5%
- 2- NaOCl diluído 1,25%
- 3- NaOCl diluído 0,25%

Analisando o Controlo 1 é possível verificar que os disco de NaOCl 2,5% e 1,25% mostraram halo de inibição tão grande que não é possível serem quantificados uma vez que há cruzamento entre ele, o disco de NaOCl 0.25% apresenta um halo de inibição inferior, com diâmetro de 16 mm.

Tabela 5 - Resultados obtidos através de medição dos halos dos antibiogramas Controlo 1 na inibição de *C. albicans*

Controlo 1	Halo (mm)
Disco 1	Cruzamento de dados
Disco 2	Cruzamento de dados
Disco 3	16

O Controlo 2 contem os seguintes discos:

Legenda:

1- Cicloheximida 20 µl / disco

2- Clorexidina 2%

3- Fluconazol 50mg/ml

4- Disco com H<sub>2</sub>O

Analisando o Controlo 2 é possível verificar que apenas o disco de Clorexidina 2% e o disco de Fluconazol 50mg/ml apresentam halo de inibição de 13 e de 10 mm respetivamente, os disco de Cicloheximida 20 µl / disco e de H<sub>2</sub>O não apresentam qualquer halo de inibição.

*Tabela 6 - Resultados obtidos através de medição dos halos dos antibiogramas Controlo2 na inibição de C. albicans*

Controlo 2	Halo (mm)
Disco 1	0
Disco 2	13
Disco 3	10
Disco 4	0

A Figura 15, apresenta os resultados obtidos ao fim de 24 hora. Nesta figura encontramos quatro antibiogramas.

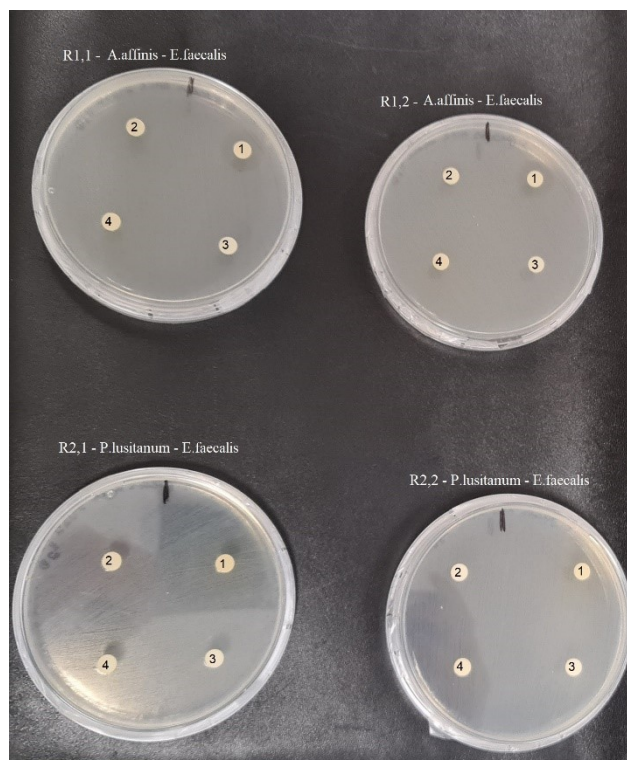


Figura 15 – Antibiogramas de *A. affinis* e *P. lusitanum* em placas inoculadas com *E. faecalis*. R1,1 e R1,2 (*A. affinis* 500mg/ml, 250mg/ml, 50mg/ml, *A. affinis* + *P. lusitanum* 250mg/ml), R2,1 e R2,2 (*P. lusitanum* 500mg/ml, 250mg/ml, 50mg/ml, *P. lusitanum* + *A. affinis* 250mg/ml)

Os antibiogramas R1,1 e R1,2 (*A. affinis* – *E. faecalis*) constituídos por quatro discos, tal como esquematizados na Figura 8 são os seguintes:

Legenda:

- 1- Extrato *A. affinis* sem sal 500mg/ml
- 2- Extrato *A. affinis* sem sal numa diluição 250mg/ml
- 3- Extrato *A. affinis* sem sal numa diluição 50mg/ml
- 4- Extrato MIX (*A. affinis* + *P. lusitanum*) numa diluição de 250mg/ml

Analisando os antibiogramas R1,1 e R1,2 (*A. affinis* – *E. faecalis*) da Figura 15 é possível observar que os disco que contêm extratos de *A. affinis* nas concentrações de 500mg/ml e 250mg/ml mostram halo de inibição de 14 e 9 mm no antibiograma R1,1 e de 14 e 8 mm no antibiograma R1,2

Tabela 5 – Resultados obtidos através de medição dos halos dos antibiograma de *A. affinis* na inibição de *E. faecalis*

<i>A. affinis – E. faecalis</i>			
R1,1	Halo (mm)	R1,2	Halo(mm)
Disco 1	14	Disco 1	14
Disco 2	9	Disco 2	8
Disco 3	0	Disco 3	0
Disco 4	0	Disco 4	0

Os antibiogramas R2,1 e R2,2 (*P. lusitanum –E. faecalis*) constituídos por quatro discos, tal como esquematizados na Figura 9 são os seguintes:

Legenda:

- 1- Extrato *P. lusitanum* sem sal 500mg/ml
- 2- Extrato *P. lusitanum* sem sal numa diluição 250mg/ml
- 3- Extrato *P. lusitanum* sem sal numa diluição 50mg/ml
- 4- Extrato MIX (*P. lusitanum + A. affinis*) numa diluição 250mg/ml

Analisando a Figura 14 é possível observar que nenhum dos antibiogramas R2,1 e R2,2 teve qualquer halo de inibição.

Tabela 6 - Resultados obtidos através de medição dos halos dos antibiograma de *P. lusitanum* na inibição de *E. faecalis*

<i>P. lusitanum – E. faecalis</i>			
R2,1	Halo (mm)	R2,2	Halo(mm)
Disco 1	0	Disco 1	0
Disco 2	0	Disco 2	0
Disco 3	0	Disco 3	0
Disco 4	0	Disco 4	0

O grupo controlo dos antibiogramas inoculados com *E. faecalis* está representado na Figura 16

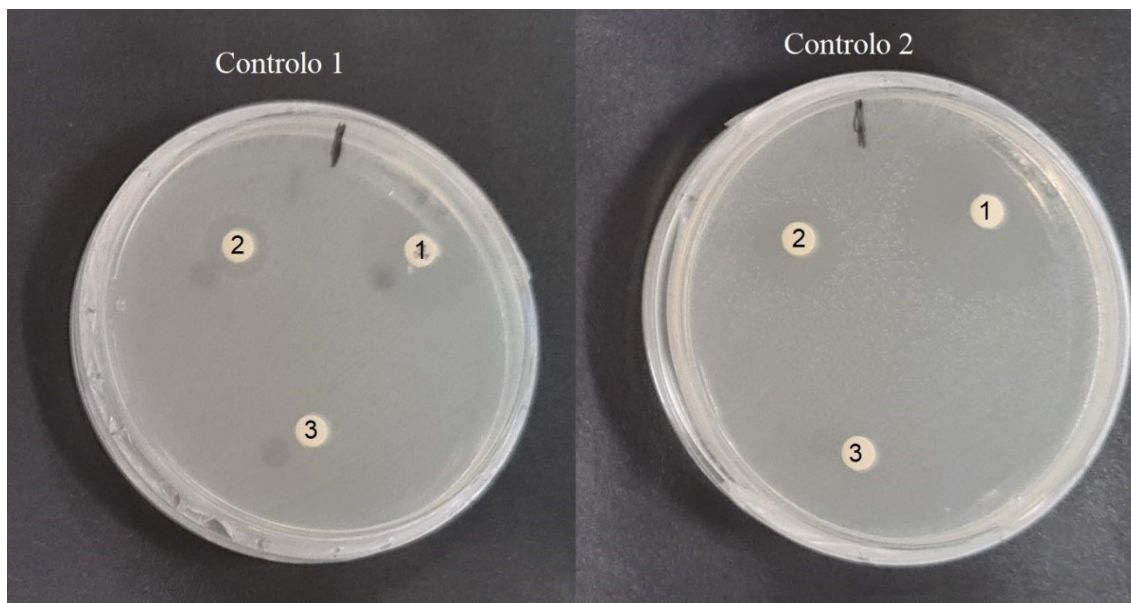


Figura 16 – Antibiogramas controlo da inibição de *E. faecalis*, Controlo 1 ( Discos com NaOCl 2,5%, 1,25% e 0,25%) e Controlo 2 (Discos com, Cicloheximida 20 µl / disco, Clorexidina 2%, Fluconazol 50mg/ml e H<sub>2</sub>O)

O grupo controlo está dividido em dois antibiogramas, o antibiograma de Controlo 1 contém os seguintes discos:

Legenda:

- 1- Amoxicilina + ácido clavulânico 30g/disco
- 2- Clorexidina 2%
- 3- Disco com H<sub>2</sub>O

Analisando o Controlo 1 é possível verificar que o disco de Amoxicilina + ácido clavulânico 30g/disco e o disco de Clorexidina 2% mostram halo de inibição de 23 e de 13 mm respetivamente e o disco de H<sub>2</sub>O não apresenta qualquer halo de inibição.

Tabela 7 - Resultados obtidos através de medição dos halos dos antibiograma Controlo1 na inibição de *E. faecalis*

Controlo 1	Halo (mm)
Disco 1	23
Disco 2	13
Disco 3	0

O antibiograma do Controlo 2 contem os seguintes discos:

Legenda:

1- NaOCl concentração de 2,5%

2- NaOCl diluído 1,25%

3- NaOCl diluído 0,25%

Analisando o Controlo 2 é possível verificar que o disco de NaOCl 2,5% e 1,25% mostraram halo de inibição de 29 e 16 mm respetivamente e o disco de NaOCl 0,25% não apresenta qualquer halo de inibição.

*Tabela 8 - Resultados obtidos através de medição dos halos dos antibiograma Controlo2 na inibição de E. faecalis*

Controlo 2	Halo (mm)
Disco 1	29
Disco 2	16
Disco 3	0

### 3.2. Avaliação citotóxica dos extratos de fungos e dos grupos controlo

A determinação da citotoxicidade dos extratos de fungos *P. lusitanum* e de *A. affinis* foi feita em células VERO, assim como a determinação da citotoxicidade dos grupos controlo.

#### Avaliação citotóxica dos extratos de fungos

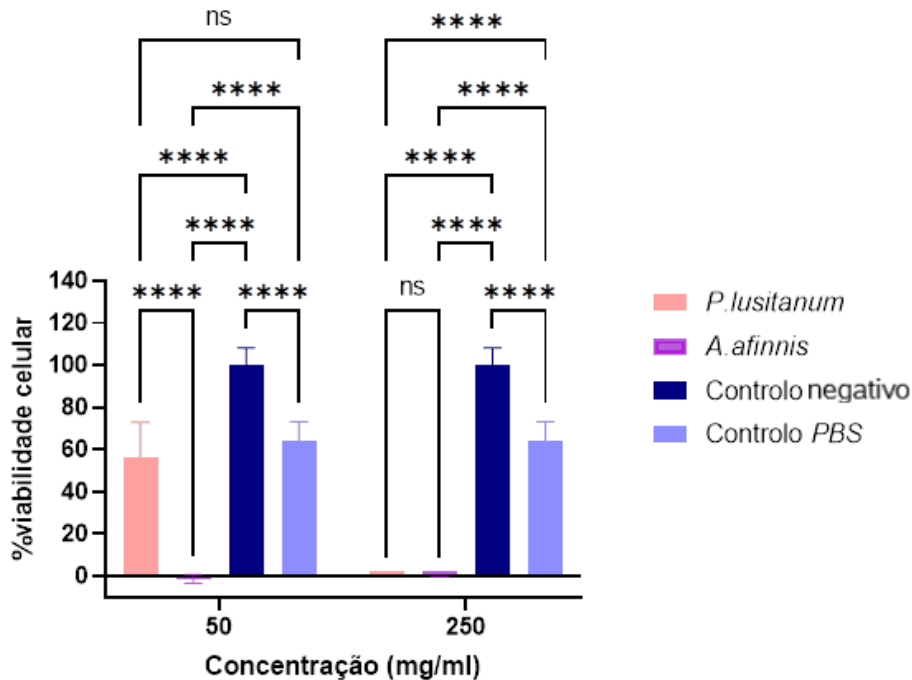


Figura 17 - Viabilidade celular dos extratos de fungo *P. lusitanum* e *A. affinis* nas concentrações de 50mg/ml e 250mg/ml. O controlo corresponde a células Vero não expostas a extratos. Two-way ANOVA e Šídák's multiple comparisons test para a significância estatística. (\*\*\*\* $p < 0,0001$ )

Analisando a Figura 17, que contem os resultados da avaliação citotóxica dos extratos de fungos *P. lusitanum* e *A. affinis* nas diferentes concentrações testadas (50mg/ml e 250mg/ml), é possível perceber que os extratos de fungos *P. lusitanum*, na concentração de 50mg/ml, promovem apenas 56,59%  $\pm$  16,4% de viabilidade. O extrato de fungo *A. affinis* não permite qualquer viabilidade celular em nenhuma das concentrações testadas.

Comparando os extratos de *P. lusitanum* com o Controlo positivo é possível perceber que existe significância estatística com um valor de  $P < 0,0001$ .

Analisando a Figura 18, é possível aferir que apenas a Cicloheximida apresenta resultados de viabilidade celular, apesar de estes se mostrarem diminuídos,  $17,26\% \pm 5,79\%$ . Nenhuma viabilidade celular é detetada para os restantes compostos testados.

Comparando a Cicloheximida com o Controlo negativo é possível perceber que existe elevada significância estatística com um valor de  $p < 0,0001$ .

### Avaliação citotóxica dos grupos controlo

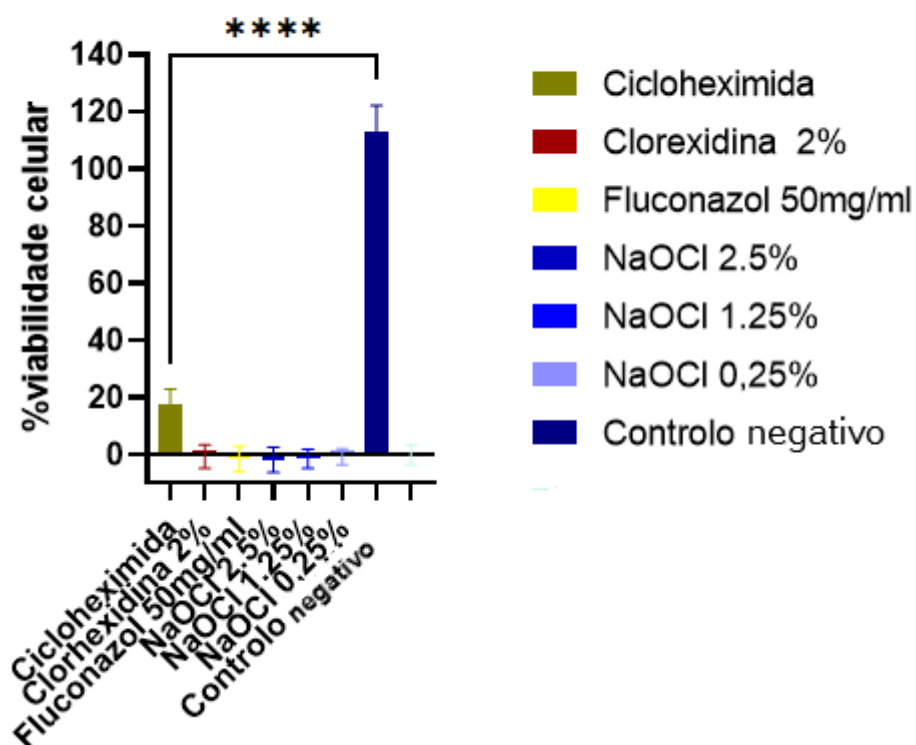


Figura 18 - Viabilidade celular dos grupos controlo (Cicloheximida, Clorexidina 2%, Fluconazol 50mg/ml, NaOCl 2,5%, NaOCl 1,25%, NaOCl 0,25%). O controlo corresponde a células Vero não expostas a extratos. Unpaired t test para a significância estatística. (\*\*\*\* $p < 0,0001$ )



## IV. DISCUSSÃO



## 4. Discussão

### 4.1. Capacidade inibitória dos extratos de fungos

Ao observar os resultados é possível perceber que algumas concentrações dos extratos de fungos marinhos testados se mostraram eficazes na inibição de *C. albicans* ou de *E. faecalis*.

A Figura 19 representa os halos de inibição medido nos antibiogramas nas diferentes concentrações testadas.

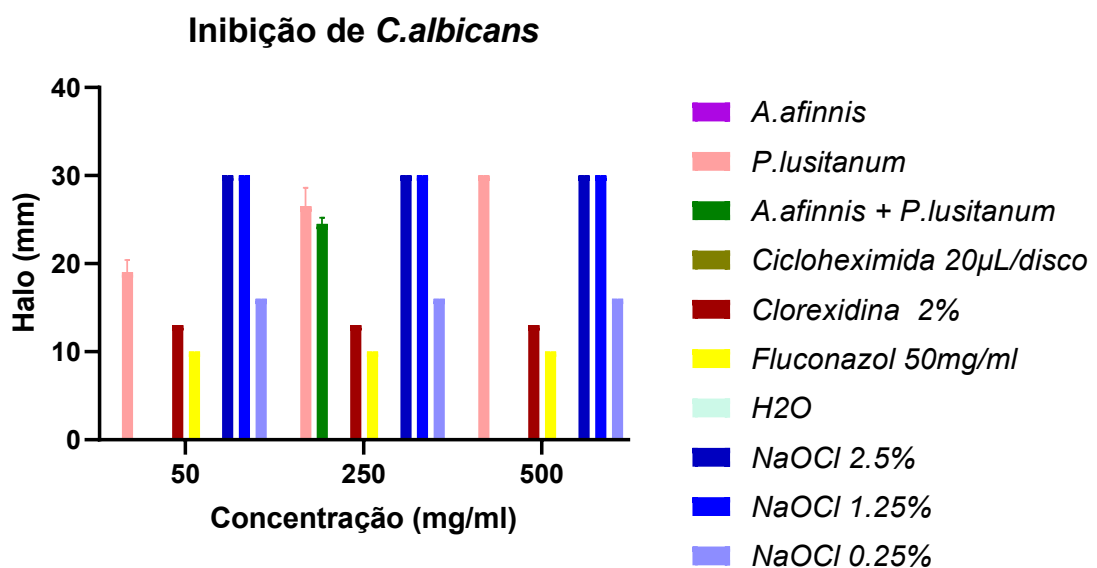


Figura 19 – Figura representativa da dimensão dos halos de cada composto testado na inibição de *C. albicans*.

Iniciando a análise pelos resultados dos antibiogramas de *A. affinis* na inibição de *C. albicans* R1,1 e R1,2 (Figura 13) é possível aferir que os extratos de fungo *A. affinis* não causa qualquer inibição no crescimento de *C. albicans*.

Pelo contrário os extratos de fungo *P. lusitanum* mostraram uma excelente eficácia na inibição de *C. albicans*, sendo que a concentração que mostrou maior eficácia foi a concentração de 500mg/ml com um halo de 30 mm, mas também as concentrações de 250mg/ml e de 50mg/ml mostraram boa eficácia, o que são resultados muito animadores para este estudo.

Os dados das duas réplicas R2,1 e R2,2 apresentam bastante semelhança o que leva os investigadores a aferir com maior certeza a veracidade destes resultados.

No que respeita à combinação dos fungos (*A. affinis* + *P. lusitanum*) na inibição de *C. albicans*, o halo de inibição também mostra resultados muito promissores, contudo uma observação atenta mostra que a combinação, na concentração de 250mg/ml de *P. lusitanum* + 250mg/ml de *A. affinis* é menos eficaz quando comparado apenas com o fungo *P. lusitanum* de forma isolada na concentração de 250mg/ml.

Os grupos controlo em geral mostraram-se eficazes, a Cicloheximida não mostrou qualquer halo de inibição o que leva a deduzir que não se mostrou eficaz na inibição de *C. albicans*, a Clorexidina e o Floconazol mostram halos muito semelhante, mostrando-se a Clorexidina mais eficaz na inibição de *C. albicans*, como era expectável o NaOCl mostrou-se o grupo controlo mais eficaz em todas as concentrações testadas, mostrando menor eficácia na concentração de 0,25% mas mesmo assim uma eficácia superior aos restantes compostos do grupo controlo.

Comparando os extratos de fungo *P. lusitanum* na concentração de 500mg/ml e de 250mg/ml, com o grupo controlo que se mostrou mais eficaz, o NaOCl 2,5%, é possível constatar que apresentam halos de inibição idênticos, significando que o *P. lusitanum* é um bom inibidor de *C. albicans*.

## Inibição de *C. albicans*

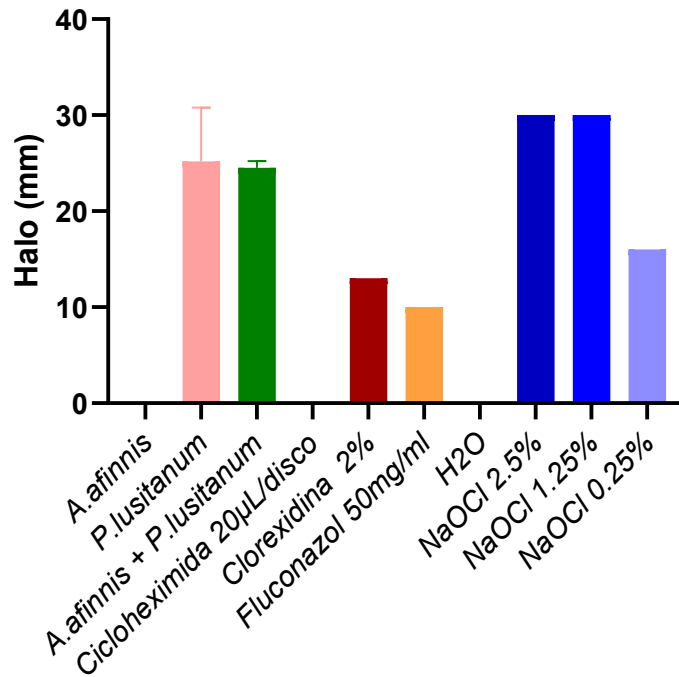


Figura 20 – Comparação da média dos halos de cada composto testado na inibição de *C. albicans*

A Figura 20 compara a média da dimensão dos halos obtidos em cada composto testado para inibição de *C. albicans*. É também possível perceber que os extratos de fungos de *P. lusitanum* tal como a combinação de *A. affinis* + *P. lusitanum* se mostraram eficazes na inibição de *C. albicans* e que comparativamente aos grupos controlo a eficácia é semelhante à obtida com concentrações de 2,5 e 1,25 de NaOCl. Comparativamente aos restantes grupos controlos, é mais uma vez bastante perceptível que o *P. lusitanum* apresenta maior eficácia. Quanto aos extratos de fungos de *A. affinis* não apresentaram eficácia na inibição de *C. albicans*.

A Figura 21 representa a dimensão dos halos de inibição de *E. faecalis* medidos nos antibiogramas com os vários compostos nas diferentes concentrações testadas.

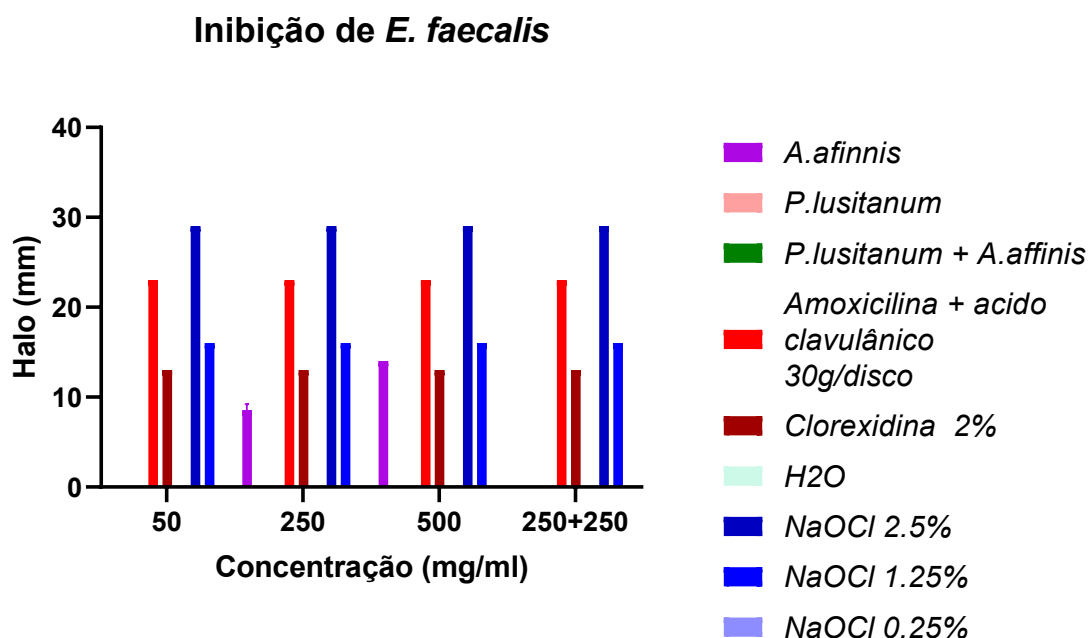


Figura 21 - Figura representativa da dimensão dos halos de cada composto testado na inibição de *E. faecalis*.

No que respeita à eficácia dos extratos de fungos de *A. affinis* na inibição de *E. faecalis*, os antibiogramas R1,1 e o R1,2, Figura 15, é possível perceber que na concentração de 500mg/ml de *A. affinis* mostrou eficácia na inibição de *E. faecalis*, também a concentração de 250mg/ml se mostrou eficaz, de forma mais diminuta, mas ainda assim eficaz.

No que respeita aos resultados dos antibiogramas de *P. lusitanum* na inibição de *E. faecalis* não há qualquer halo de inibição, o que revela, portanto que nenhuma das concentrações dos extratos de fungos de *P. lusitanum* testadas é capaz de inibir o crescimento de *E. faecalis*.

Comparando os resultados dos extratos de fungos *A. affinis* com os resultados dos grupos controlo, obtém-se que a concentração mais eficaz dos extratos de *A. affinis* 500mg/ml se mostra mais eficaz do que Clorexidina 2%.

Quando comparado com as restantes substâncias dos grupos controlo mostra-se menos eficaz na inibição de *E. faecalis*.

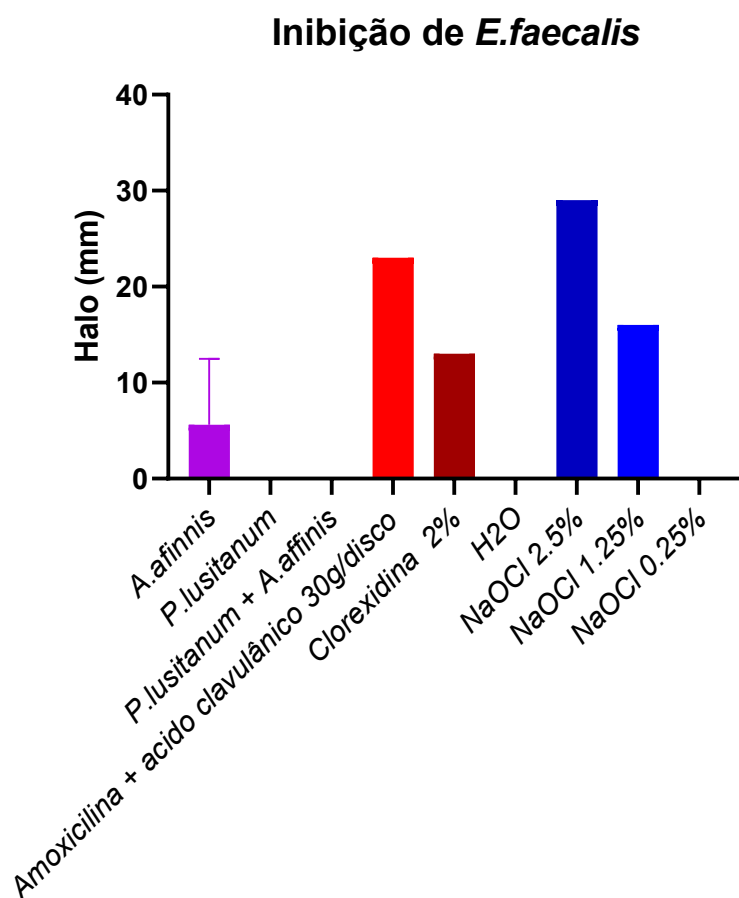


Figura 22 – Comparação da média dos halos de cada composto testado na inibição de *E. faecalis*

A Figura 22 compara a média da dimensão dos halos obtidos em cada composto testado para inibição de *E. faecalis*. Os extratos de *P. lusitanum* e a combinação de *P. lusitanum* + *A. affinis* não apresentam qualquer eficácia na inibição de *E. faecalis*.

Havendo resultados positivos quanto à eficácia dos extratos de fungos de *P. lusitanum* na inibição de *C. albicans* e havendo resultados positivos na inibição de *E. faecalis* por parte dos extratos de fungos de *A. affinis*, seria expectável que a combinação dos dois extratos de fungos demonstrasse resultados positivos na inibição quer de *C. albicans* quer de *E. faecalis*, o que não se demonstrou.

A junção dos dois extratos de fungos mostrou eficácia na inibição de *C. albicans* mas não mostrou qualquer eficácia na inibição de *E. faecalis*, o que leva a querer que a combinação dos dois irrigantes não é tão eficaz em comparação com a sua utilização individualmente.

Analisando os resultados de forma geral é perceptível que os extratos de fungos de *P. lusitanum* e *A. affinis* se mostraram eficazes quando usados de forma isolada na inibição de *C. albicans* e de *E. faecalis*, respetivamente, o que são resultados animadores para a continuação desta investigação.

## 4.2. Avaliação da citotoxicidade dos extratos de fungos e dos controlos

Analisando os resultados da avaliação citotóxica dos extratos de fungos (Figura 17), é possível perceber que os dois extratos de fungos em concentrações mais elevadas apresentam níveis de citotoxicidade elevada.

Os extratos de fungos de *A. affinis* não mostra qualquer percentagem (%) de viabilidade celular o que significa que é altamente citotóxico.

Os extratos de fungos de *P. lusitanum* numa concentração de 50mg/ml mostram viabilidade celular de  $56,59\% \pm 16,4\%$  com uma significância estatística de  $p < 0,0001$ . Estes resultados podiam ser animadores se os extratos de fungos *P. lusitanum* se mostrassem eficazes na inibição de *C. albicans* ou de *E. faecalis* na concentração de 50mg/ml. Contudo os extratos de fungos de *P. lusitanum* só apresentam resultados favoráveis na concentração de 250mg/ml e 500mg/ml, e nestas concentrações os extratos de fungos apresentam viabilidade celular nula.

No que respeita aos grupos controlo, à exceção da Cicloheximida, todos os compostos testados apresentam viabilidade celular nula, o que nos leva a deduzir que os extratos de fungos testados neste estudo não apresentam resultados mais negativos em comparação com as substâncias comercializadas e usadas atualmente na desinfeção de canais radiculares.

Com esta investigação foi ainda possível abrir novos possíveis caminhos para a utilização dos extratos de fungos de *P. lusitanum* noutras áreas da medicina, como por exemplo no tratamento de Candidíase.



## V. CONCLUSÃO



## 5. Conclusão

Com este trabalho verificou-se que as concentrações mais elevadas dos extratos de fungos marinhos são eficazes na inibição de *C. albicans* ou *E. faecalis*.

Os extratos de fungos de *P. lusitanum* demonstraram eficácia na inibição de *C. albicans* e os extratos de fungos de *A. affinis* demonstraram eficácia na inibição de *E. faecalis*.

Os resultados menos positivos no que respeita a viabilidade celular por parte da *A. affinis*, não são um fator limitante uma vez que comparativamente aos produtos e soluções farmacêuticas usados na medicina dentária atualmente, a viabilidade celular é idêntica.

Os extratos de *P. lusitanum*, nos testes de viabilidade celular, quando comparado com as soluções farmacêuticas usadas atualmente mostrou resultados positivos na concentração de 50mg/ml.

As concentrações eficazes e a citotoxicidade associada estão agora bem definidos, o que significa que o objetivo de criar um irrigante endodôntico à base de fungos marinhos está agora mais próximo.

É expectável que num futuro próximo se explorem novos fungos, para que de forma isolada ou em combinação com *P. lusitanum* possam ser usados como irrigantes endodônticos. Neste sentido, foi desenvolvido um protocolo que permitirá avaliar a eficácia destes novos desinfetantes num modelo *ex vivo* (Anexo 3 - Protocolo de avaliação da eficácia dos extratos de fungos *ex vivo*).

Com os resultados obtidos é previsível a utilização dos extratos de fungos de *P. lusitanum* noutras áreas da medicina dentária para além da endodontia, como por exemplo na medicina oral, mais concretamente no tratamento de Candidíase oral.

Este tipo de investigações é essencial para o desenvolvimento e avanço da medicina, na medida em que substâncias mais eficazes capacitam o médico para uma melhor resolução das patologias dos seus pacientes.



## Bibliografia

1. Ordinola-Zapata R, Bramante CM, Brandão Garcia R, Bombarda De Andrade F, Bernardineli N, Gomes De Moraes I, et al. The antimicrobial effect of new and conventional endodontic irrigants on intra-orally infected dentin. *Acta Odontol Scand.* 2013;71(3–4):424–31.
2. Sundqvist G. Ecology of the root canal flora. *J Endod.* 1992;18(9):427–30.
3. Siqueira JF, Rôças IN. Clinical Implications and Microbiology of Bacterial Persistence after Treatment Procedures. *J Endod.* 2008;34(11).
4. Baras BH, Melo MAS, Thumbigere-Math V, Tay FR, Fouad AF, Oates TW, et al. Novel bioactive and therapeutic root canal sealers with antibacterial and remineralization properties. *Materials (Basel).* 2020;13(5).
5. Haapasalo M, Shen Y, Wang Z, Gao Y. Irrigation in endodontics. *Br Dent J [Internet].* 2014;216(6):299–303. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/sj.bdj.2014.204>
6. 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(5):297–306.
7. Gomes BPF, Vianna ME, Zaia AA, Almeida JFA, Souza-Filho FJ, Ferraz CCR. Chlorhexidine in endodontics. *Braz Dent J.* 2013;24(2):89–102.
8. Rita C, Nikhil V. Emerging trends in Endodontic Irrigants: Who will write the last line? *Endodontology.* 2014;26(2).
9. HAIKEL Y, GORCE F, ALLEMANN C, VOEGEL J -C. In vitro efficiency of endodontic irrigation solutions on protein desorption. *Int Endod J.* 1994;27(1):16–20.
10. Zehnder M. Root Canal Irrigants. *J Endod.* 2006;32(5):389–98.
11. Mohammadi Z, Jafarzadeh H, Shalavi S, Kinoshita JI. Unusual root canal irrigation solutions. *J Contemp Dent Pract.* 2017;18(5):415–20.

12. Baldasso FER, Roletto L, Silva VD da, Morgental RD, Kopper PMP. Effect of final irrigation protocols on microhardness reduction and erosion of root canal dentin. *Braz Oral Res.* 2017;31:e40.
13. E Nuzzolese, M M Lepore, I Cukovic-Bagic FM, Vella and G Di. Forensic sciences and forensic odontology. *Int Dent J.* 2008;58(2009):342–8.
14. Haapasalo M, Endal U, Zandi H, Coil JM. Eradication of endodontic infection by instrumentation and irrigation solutions. *Endod Top.* 2005;10(1):77–102.
15. Peters OA, Schönenberger K, Laib A. Effects of four Ni-Ti preparation techniques on root canal geometry assessed by micro computed tomography. *Int Endod J.* 2001;34(3):221–30.
16. Siqueira 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.* 1997;30(4):279–82.
17. Abuhaimed TS, Neel EAA. Sodium Hypochlorite Irrigation and Its Effect on Bond Strength to Dentin. *Biomed Res Int.* 2017;2017.
18. Piracicaba O De, Campinas E De. Mariane Fernandez Batista Diniz; Dor na prática endodôntica : Revisão de Literatura. 2014;1–35.
19. Sundqvist G, Figdor D. Life as an endodontic pathogen. Ecological differences between the untreated and root-filled root canals. *Endod Top.* 2003;6(1):3–28.
20. Sakko M, Tjäderhane L, Rautemaa-Richardson R. Microbiology of Root Canal Infections. *Prim Dent J.* 2016;5(2):84–9.
21. Miller WD. An introduction to the study of the bacterio-pathology of the dental pulp.pdf. *Dent Cosm* [Internet]. 1894;36:505–28. Available from: <https://collections.nlm.nih.gov/ext/dw/101496944/PDF/101496944.pdf>
22. Fabricious I, Dahlen g, Ohman ae, Möller ajr. Predominant indigenous oral bacteria isolated from infected root canals after varied times of closure. *Eur J Oral Sci.* 1982;90(2):134–44.

23. Ricucci D, Siqueira JF. Biofilms and apical periodontitis: Study of prevalence and association with clinical and histopathologic findings. *J Endod.* 2010;36(8):1277–88.
24. Jr JFS, Rôças IN. Present status and future directions in endodontic microbiology. 2014;3–22.
25. Prada I, Micó-Muñoz P, Giner-Lluesma T, Micó-Martínez P, Collado-Castellano N, Manzano-Saiz A. Influence of microbiology on endodontic failure. Literature review. *Med Oral Patol Oral y Cir Bucal.* 2019;24(3):e364–72.
26. Jensen PR, Fenical W. Marine Microorganisms and Drug Discovery: Current Status and Future Potential. *Drugs from Sea.* 2004;6–29.
27. Ameen F, AlNadhari S, Al-Homaidan AA. Marine microorganisms as an untapped source of bioactive compounds. *Saudi J Biol Sci [Internet].* 2021;28(1):224–31. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2020.09.052>
28. Xie CL, Xia JM, Wang JS, Lin DH, Yang XW. Metabolomic investigations on *nesterenkonia flava* revealed significant differences between marine and terrestrial actinomycetes. *Mar Drugs.* 2018;16(10).
29. Siddharth S, Vittal R. Evaluation of Antimicrobial, Enzyme Inhibitory, Antioxidant and Cytotoxic Activities of Partially Purified Volatile Metabolites of Marine *Streptomyces* sp.S2A. *Microorganisms.* 2018;6(3):72.
30. Butler MS, Blaskovich MA, Cooper MA. Antibiotics in the clinical pipeline in 2013. *J Antibiot (Tokyo).* 2013;66(10):571–91.
31. Mayer AMS, Rodríguez AD, Tagliatela-Scafati O, Fusetani N. Marine pharmacology in 2009-2011: Marine compounds with antibacterial, antidiabetic, antifungal, anti-inflammatory, antiprotozoal, antituberculosis, and antiviral activities; affecting the immune and nervous systems, and other miscellaneous mechanisms of . *Mar Drugs.* 2013;11(7):2510–73.
32. Cantrell SA, Casillas-Martínez L, Molina M. Characterization of fungi from

- hypersaline environments of solar salterns using morphological and molecular techniques. *Mycol Res.* 2006;110(8):962–70.
33. Frisvad JC, Smedsgaard J, Larsen TO, Samson RA. Mycotoxins, drugs and other extrolites produced by species in *Penicillium* subgenus *Penicillium*. *Stud Mycol.* 2004;2004(49):201–41.
  34. Deshmukh SK, Prakash V, Ranjan N. Marine fungi: A source of potential anticancer compounds. *Front Microbiol.* 2018;8(JAN):1–24.
  35. Gonçalves MFM, Santos L, Silva BM V., Abreu AC, Vicente TFL, Esteves AC, et al. Biodiversity of *Penicillium* species from marine environments in Portugal and description of *Penicillium lusitanum* sp. nov., a novel species isolated from sea water. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2019;69(10):3014–21.
  36. Davolos D, Pietrangeli B. A molecular and bioinformatic study on the ochratoxin A (OTA)-producing *Aspergillus affinis* (section *Circumdati*). *Mycotoxin Res.* 2014;30(2):113–22.
  37. Minh H, Le T, Do QT, Huong M, Doan T, Vu QT. Metabolites from the Marine Fungi *Penicillium* sp . *MDPI.* 2019;1–11.
  38. Hahn W, Hülsmann M. Complications during root canal irrigation – literature review and case reports. *Int Endod J.* 2000;33:186–93.
  39. Prada I, Micó-Muñoz P, Giner-Lluesma T, Micó-Martínez P, Muwaquet-Rodríguez S, Albero-Monteagudo A. Update of the therapeutic planning of irrigation and intracanal medication in root canal treatment. A literature review. *J Clin Exp Dent.* 2019;11(2):e185–93.
  40. Guivarc’h M, Ordioni U, Ahmed HMA, Cohen S, Catherine JH, Bukiet F. Sodium Hypochlorite Accident: A Systematic Review. *J Endod.* 2017;43(1):16–24.
  41. Alves VB. Irrigantes em Endodontia Universidade Fernando Pessoa Faculdade Ciências da Saúde. 2015;
  42. Botton G, Pires CW, Cadoná FC, Machado AK, Azzolin VF, Cruz IBM, et al. Toxicity of irrigating solutions and pharmacological associations used in pulpectomy of primary teeth. *Int Endod J.* 2016;49(8):746–54.

43. Ercan E, Özekinci T, Atakul F, Gül K. Antibacterial activity of 2% chlorhexidine gluconate and 5.25% sodium hypochlorite in infected root canal: In vivo study. *J Endod.* 2004;30(2):84–7.
44. Peters OA. Research that matters-biocompatibility and cytotoxicity screening. *Int Endod J.* 2013;46(3):195–7.
45. Article O. *Mammalian Cells in Vitro.* 2012;9(4):393–8.
46. Ciapetti G, Cenni E, Pratelli L. In vitro evaluation of cell / biomaterial interaction by MTI ' assay O ". 1993;14(5).
47. Garc O, Mandina T, Lamadrid AI, Diaz A, Remigio A, Gonzalez Y, et al. Sensitivity and variability of visual scoring in the comet assay Results of an inter-laboratory scoring exercise with the use of silver staining. 2004;556:25–34.
48. Gonçalves M, Paço A, Rocha-Santos T, Esteves C AA. Bioprospecting of fungi isolated from marine and estuarine environments as sources of bioactivities. 2021;
49. Noites RP, Malheiros LF, Carvalho MF VI. Effect of calcium hydroxide and sodium hypochlorite in dentin resistance: in vitro study. *Dent Press Endod.* 2018;29–33.
50. Noites R, Pina-Vaz C, Rocha R, Fontes Carvalho M, Rodrigues A P-VI. Synergistic Antimicrobial Action of Chlorhexidine and Ozone in Endodontic Treatment. *Biomed Res Int.* 2014;2014:1–6.
51. Sandhu S V., Tiwari R, Bhullar RPK, Bansal H, Bhandari R, Kakkar T, et al. Sterilization of extracted human teeth: A comparative analysis. *J Oral Biol Craniofacial Res [Internet].* 2012;2(3):170–5. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jobcr.2012.09.002>
52. Vidana R, Sullivan A, Billström H, Ahlquist M, Lund B. *Enterococcus faecalis* infection in root canals - host-derived or exogenous source? *Lett Appl Microbiol.* 2011;52(2):109–15.



ANEXOS



## Anexos:

### Anexo 1: Produção de extratos brutos e extração de fungos marinhos

#### Equipamentos:

- Hotte
- - 80 °C
- Balança
- Autoclave
- Estufa
- Evaporador rotativo
- Banho Maria
- Sistema a vácuo
- Vórtex
- Centrífuga
- Liofilizador

#### Materiais usados:

- Isolados de fungos marinhos
- Meio de cultura Potato Dextrose Agar (PDA) (Ref. 1.10130.0500, Merck)
- Sais marinhos (Ref. S9883-1KG, Sigma-Aldrich, Germany).
- Frascos Erlenmeyer de 1 L
- Papel de filtro estéril
- Membranas de celulose de 0,45 µm (Ref. Z269360, Merck)
- Membranas de celulose de nitrato de 0,2 µm (Ref. 114H6-47----ACN, Sartorius Stedim Biotech, Germany)
- Filtro de microfibras de vidro de 0,47 µm (Ref. WHA1825047, Merck)
- Funil de vidro
- Frascos estéreis (para recolher os filtrados).
- Tubos de falcon 45 mL
- Placas de Petri 90 mm de diâmetro
- Lamparina
- Almofariz
- Parafilm

- Palitos estéreis
- Pontas azuis estéreis de micropipeta

Reagentes usados:

- Metanol 80% (frio)
- Etanol 22%

Procedimento por tópicos (48):

- **1º recuperar isolados de fungos marinhos:**
  - Preparar 150 mL de meio PDA: pesar 6,3 g de meio e adicionar 150 mL de água destilada.
  - Esterilizar a 121 °C durante 15 minutos.
  - Preparar as placas com o meio (este passo deve ser feito com antecedência, porque as placas precisam estar totalmente secas para os passos seguintes).
  - Identificar as placas.
  - Desinfetar as mãos e a bancada de trabalho com álcool 70%.
  - Em condições de assepsia (na câmara ou à chama), usar dois discos ( $\pm 0,5$  cm de diâmetro) de micélio para inocular novas placas de PDA com o auxílio da base de uma ponta azul (estéris) de micropipeta e palitos estéreis. Os discos de micélio devem ser retirados, com o auxílio da ponta azul estéris, preferencialmente da periferia do micélio que está a crescer na placa. Com a ajuda de um palito estéris, os discos são usados para inocular uma placa nova com PDA.

- Incubar as placas, com as tampas viradas para cima, celadas com *parafilm*, a 25 °C por 7-14 dias sem agitação, no escuro.
- Durante a incubação, será necessário observar o crescimento dos isolados, efetuando, diariamente, o registo do diâmetro de crescimento dos mesmos.

**Nota:** Se tiver crescimento, será feita novamente um passo de repicagem em duplicado: uma placa fica para os trabalhos e outra fica apenas armazenada, para evitar possíveis contaminações.

- **2º preparar meio Potato Dextrose Broth (PDB):**

Para cada isolado de fungo marinho são necessários 250 mL de meio PDB sem sal e/ou 250 mL de meio PDB com 3% de sais marinhos.

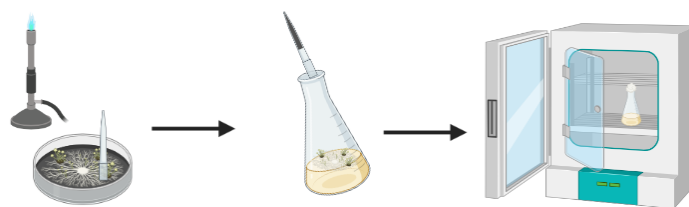
- O meio líquido é preparado a partir de PDA: pesar 10,5 g de meio e adicionar 250 mL de água destilada, agitar o frasco para homogeneizar, deixar sedimentar o agar e filtrar o meio.
- Para os meios com 3% de sais marinhos: preparar o meio, filtrar e adicionar 7,5 g de sal marinho ao meio.
- Passar o meio filtrado para frascos Erlenmeyer de 1 L.
- Colocar rolha de algodão e gaze no bocal dos frascos Erlenmeyer e cobrir com papel de alumínio.
- Esterilizar a 121 °C durante 15 minutos.

- **3º crescer os isolados de fungos marinhos por fermentação líquida (Esquema A):**

- Determinar quanto tempo o micélio fica a crescer em placa antes de ser inoculado em meio líquido.
- Desinfetar as mãos e a bancada de trabalho com álcool 70%.
- Na bancada, com a lamparina acesa, inocular 250 mL de meio PDB (em frascos Erlenmeyer de 1 L) com dois discos de micélio (os pedaços de micélio devem ser sempre retirados da periferia do micélio que está a crescer em PDA, como referido anteriormente), para as duas condições de cultura: com e sem 3% de sais marinhos.

**Notas:**

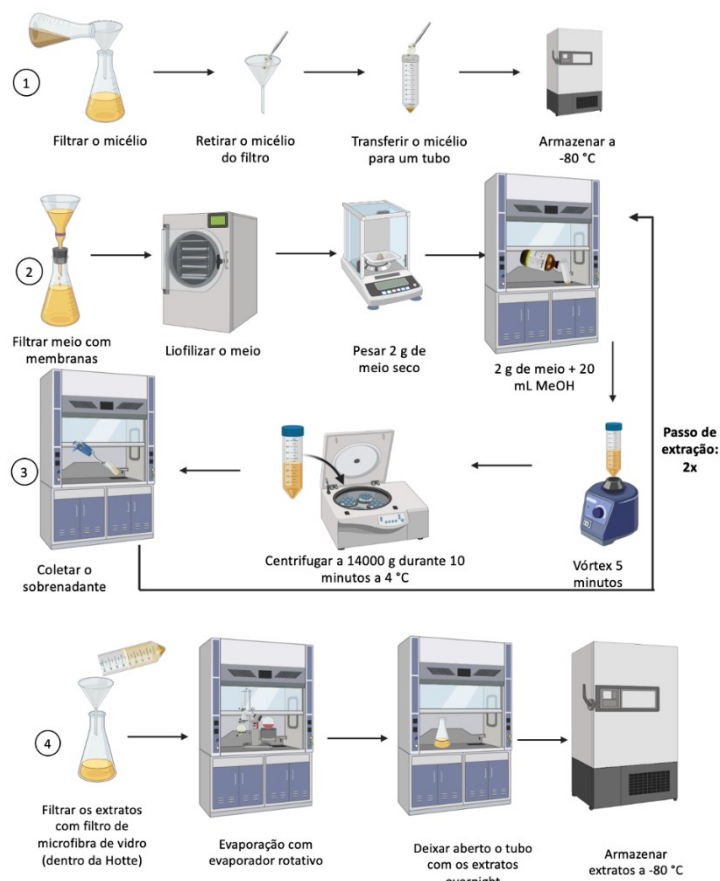
- Não esquecer de identificar os frascos;
- Fungos cultivados em meio PDA sem sal são inoculados em meio PDB sem sal e fungos cultivados em meio PDA com sal são inoculados em meio PDB com sal.
- Tapar os frascos inoculados com rolhas de algodão/gaze.
- Incubar a 25 °C durante 15 dias sem agitação, no escuro.



Esquema A

- **4º Produção de extratos brutos do meio de cultura (Esquema B):**

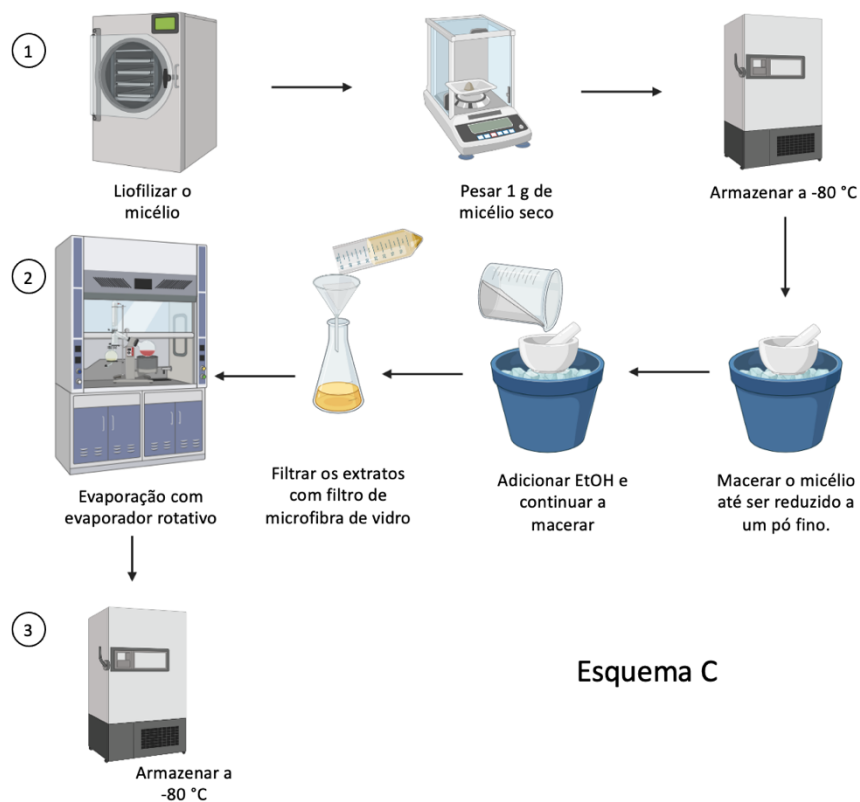
- Após o período de incubação, filtrar o micélio em papel de filtro estéril, para se obter os filtrados da cultura: usar um frasco com um funil de vidro e com papel de filtro estéril e despejar o meio com cuidado.
- O micélio ficará no papel de filtro e deve ser retirado com pinça estéril e armazenado num tubo falcon estéril a -80 °C. (Esquema B-1)
- De seguida, filtrar o meio de cultura com membranas de celulose de 0,45 µm, seguido por membranas de nitrato de celulose 0,2 µm num sistema a vácuo.
- Liofilizar o meio de cultura (caso este passo não possa ser feito mesmo dia, a seguir a filtração, o meio deve ser armazenado a -80 °C até a liofilização).
- Pesar o meio de cultura seco e transferir para tubos falcon, cada um contendo 2 g de amostra liofilizada. (Esquema B-2)
- Adicionar em cada tubo falcon 20 ml de MeOH 80% frio (-80 °C), e levar ao vortex por 5 min: dentro da Hotte.
- Centrifugar cada mistura, a 14000 g durante 10 minutos a 4 °C, para remover as proteínas precipitadas.
- Descartar o *pellet*, coletar o sobrenadante e repetir o processo de extração mais uma vez (passo a vermelho). (Esquema B-3)
- Após a extração, filtrar os extratos metanólicos usando um filtro de microfibras de vidro de 0,47 µm e evaporar usando um evaporador rotativo com temperatura do banho maria a 40 °C (ter cuidado com a velocidade da rotação e não deixar ferver). (Esquema B-4)



Esquema B

- Marcar o frasco até ao limite dos extratos e deixar aberto *overnight* dentro da Hotte, para deixar que algum metanol remanescente evapore.
  - Armazenar os extratos a -80 °C até utilização.
- **5º Produção de extratos brutos do micélio (Esquema C):**
    - Liofilizar o micélio separado do meio, até que este esteja seco.
    - Pesar o micélio seco e transferi-lo para tubos falcon: para cada 1 g de micélio liofilizado (reservar, pelo menos durante uma noite a -80 °C). (Esquema C-1)

- Transferir o micélio seco para um almofariz (em gelo) e macerar até ser reduzido a um pó fino. Adicionar, pouco a pouco, 80 mL de etanol a 22% e continuar a macerar. (Esquema C-2)
- Após a extração, filtrar com filtro de microfibras de vidro de 0,47 µm.
- Evaporar o etanol usando um evaporador rotativo com temperatura do banho maria a 40 °C (ter cuidado com a rotação e não deixar ferver).
- Armazenar a -80 °C até utilização. (Esquema C-3)



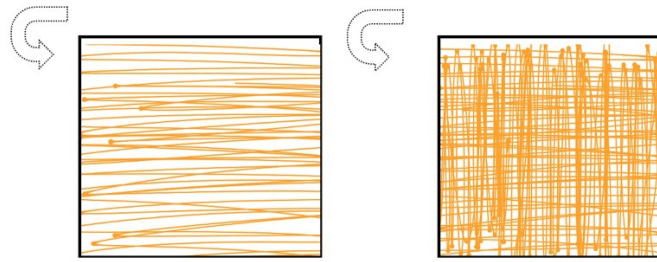
## Anexo 2: Método de difusão em disco

### **Materiais**

- NaCl 0.9% estéril
- Discos brancos (discos circulares de papel de filtro estéril de 6 mm de diâmetro)
- Placas quadradas 120 X 120
- Cicloheximida (20 µg/disco)
- Discos amoxicilina/ácido clavulânico (30 g/disco)
- NaOCl 2,5%
- CHX 2%
- Fluconazol
- Meio de cultura (para bactérias Mueller-Hinton agar e para fungos Sabouraud Dextrose agar)

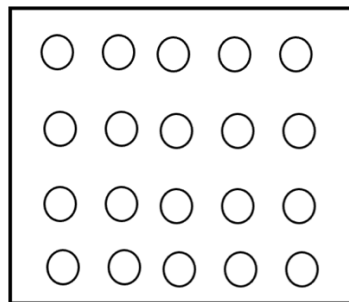
### **Procedimento**

- Preparar uma suspensão, a partir de uma cultura (bacteriana ou fúngica) pura com 24 horas, em solução salina estéril (NaCl 0.9%), e ajustadas para turbidez na escala 0,5 de McFarland.
- Agitar brevemente em vortex.
- Usar a zaragatoa para espalhar o inóculo numa placa com meio, de modo uniforme (riscar exaustivamente na mesma direção e depois virar a placa e riscar exaustivamente na outra direção - esquema A) e deixar secar as placas (não esquecer de identificar as placas).



Esquema A

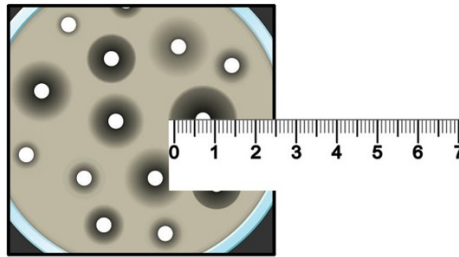
- Com uma pinça estéril (passar a pinça na chama), colocar os discos brancos ou os discos impregnados com os antibióticos (amoxicilina/ácido clavulânico) na placa (de acordo com o esquema B).



Esquema B

- Dissolver os extratos crus secos em água estéril a uma concentração de 500 mg/mL (podendo ter que ser ajustada).
- Em seguida, pipetar 10  $\mu$ L do extrato dissolvido por cima dos discos (sem tocar nos discos).
- Como controlo positivo, usar discos comerciais com antibiótico (amoxicilina/ácido clavulânico), CHG (cicloheximida) (20  $\mu$ g/disco), NaOCl 2,5%, CHX 2%)

- Após 15 minutos à temperatura ambiente, as placas devem ser incubadas a 37 °C durante 24 horas.
- Após a incubação, o diâmetro da zona de inibição é medido em milímetros (esquema C) e o ensaio deve ser realizado duas/três vezes para cada estirpe.



Esquema C

Esquema representativo dos discos usados em cada placa.

## 1. Recolha e conservação da amostra para ensaio *ex vivo*

A amostra deverá ser composta por um total de 30 dentes (n=30), com canal radicular único (incisivos, caninos e pré-molares) que possuam ápices completamente formados, e que tenham sido extraídos por razões clínicas como doença periodontal ou motivos ortodônticos. Os dentes da amostra devem ser preservados em solução salina por um período máximo de 4 meses e mantidos a uma temperatura de  $5^{\circ}\text{C} \pm 1$ .

## 2. Seleção e preparação da amostra para ensaio *ex vivo*

As superfícies externas das raízes devem ser desbridadas com uma cureta e todos os dentes irão ser recolhidos na clinica universitária da FMD-UCP (49,50).

A preparação dos canais radiculares inicia-se com a execução da cavidade de acesso, para este processo usa-se uma broca esférica diamantada de 1 mm de diâmetro (Modelo 801 e 801L PROCLINIC) montada em turbina com irrigação. Seguidamente determina-se o comprimento de trabalho de cada canal inserindo-se uma lima K nº10 (Dentsply Maillefer, Ballaigues, Switzerland) no canal radicular de cada dente até que seja visível no forame apical, subtraindo 1 mm deste ponto (49,50).

A limpeza e instrumentação dos canais radiculares é feita usando o sistema de instrumentação recíprocante, Reciproc Blue® (RB #25/0.08, VDW®, Munique, Alemanha), de acordo com as instruções do fabricante, usando Glyde Prep Canal (Dentsply Maillefer, Ballaigues, Suíça). Entre a instrumentação, os canais são irrigados com solução de NaOCl a 3% (Parcan, Septodent Healthcare India Pvt. Ltd, Índia). Após a instrumentação, os canais são irrigados com solução de ácido etilenodiaminotetracético 17% (Dentocloro, Ammdent Índia) por 3 min e NaOCl também por 3 min de forma a remover o *smear layer* e permitir que microorganismos e medicamentos possam penetrar nos túbulos dentinários. A irrigação final do canal é feita com 10 mL de solução salina fisiológica. Para a irrigação utiliza-se seringa descartável com ponta tipo Luer Lock, de 3ml e agulha de saída lateral de calibre 27G usada solta no canal e colocada até um máximo de 2mm do ápex. Os canais radiculares são posteriormente secos com cones de

papel, e o foramen apical de todos os dentes foi selado com um material restaurador Filtek Z250 (3M ESPE, St. Paul, MN, USA) (49,50).

As superfícies radiculares devem ser pinceladas com verniz de unhas esmaltado, duas camadas, de forma a evitar a evaporação dos inóculos e contaminação microbiana externa, pelos canalículos dentinários, canais laterais e/ou canais acessórios (49,50).

Os dentes da amostra são colocados em tubos Falcon 15ml de Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline (D-PBS (1X, pH 7.4) e posteriormente autoclavados a 121 °C 1 atm durante 20min. (51).

Para confirmar a eficácia do processo de esterilização, o D-PBS dos tubos Falco é aspirado sob condições estéreis e inoculado em caldo *Brain Heart Infusion* (BHI), em seguida, semeado em placas de ágar sangue e incubado a 37 ° C por 24 h e verificado quanto a qualquer crescimento microbiano (52).

### 3. Inoculação da estirpe microbiana no ensaio *ex vivo*

As estirpes microbianas *E. faecalis* (ATCC®29212) e *C. albicans* (DSM11225), cultivadas em ágar *Brain Heart Infusion* (Liofilchem, Roseto degli Abruzzi, Itália) e agar *Sabouraud dextrose* (Liofilchem, Roseto degli Abruzzi, Itália), respetivamente. As placas são incubadas durante 24 horas em estufa a 37±1°C (49,50).

A partir dessa cultura prepara-se uma suspensão de células microbianas de cada estirpe em *Brain Heart Infusion* (BHI) e Sabouraud dextrose. A suspensão foi ajustada com o auxílio do espectrofotómetro para obter uma concentração microbiana de 10<sup>8</sup> unidades formadoras de colónias (UFC) por ml. Posteriormente os 30 dentes, são divididos aleatoriamente em dois grupos, 15 dentes inoculados com o *E. faecalis* e outros 15 com a *C. albicans*. Cada canal radicular é inoculado com 30 µl da suspensão de células com o uso de pipeta e os dentes incubados aerobicamente a 37±1°C durante oito dias, para permitir a colonização da dentina radicular. O crescimento bacteriano é observado pela contagem de unidades formadoras de colónias (49,50).

#### 4. Grupo de irrigação ensaio *ex vivo*

Essas amostras são divididas aleatoriamente para serem comparados os desinfetantes, à base extratos de fungos marinhos e de NaOCl. A eficácia de ambos os desinfetantes é testada contra *E. faecalis* e *C. albicans*. O seguinte diagrama representa os diferentes grupos testados.

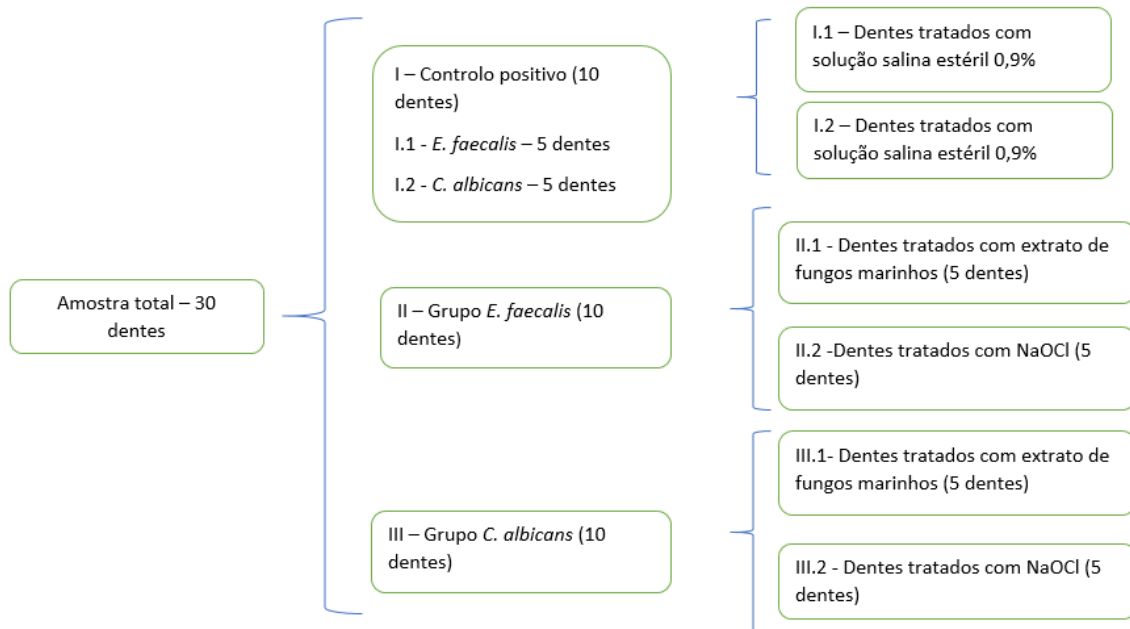


Diagrama 1 – Diferentes grupos testados e número de dentes usado em cada grupo.

#### 5. Avaliação da eficácia das soluções testadas

Após o tratamento, todos os dentes irrigados são lavados com 10 ml de solução salina de forma a remover o irrigante. Para avaliar a presença de microrganismos viáveis, os canais radiculares são incubados com 30 µl de *Brain Heart Infusion* (ou SD) e incubados a 37±1°C durante 24h. Os microrganismos viáveis devem ser quantificados através da determinação do número de unidades formadoras de colónias (49,50).