

Ana Raquel Cordeiro Moreno

**Protocolo experimental para desinfeção imediata “Chairside” de cones de  
Guta-percha**

Universidade Fernando Pessoa

Faculdade Ciências da Saúde

Porto, 2014



Ana Raquel Cordeiro Moreno

**Protocolo experimental para desinfeção imediata “Chairside” de cones de  
Guta-percha**

Universidade Fernando Pessoa

Faculdade Ciências da Saúde

Porto, 2014

Ana Raquel Cordeiro Moreno

**Protocolo experimental para desinfeção imediata “Chairside” de cones de  
Guta-percha**

*Trabalho apresentado à Universidade Fernando Pessoa  
como parte dos requisitos para a obtenção do grau de Mestre em  
Medicina Dentária*

Atestando a originalidade do trabalho,

---

(Ana Raquel Cordeiro Moreno)

## Resumo

**Objetivo:** Este estudo teve como principal objetivo propor um protocolo de desinfecção de cones de guta-percha prévia ao seu uso na obturação canalar. Deste modo, avaliou-se a eficiência de três agentes desinfetantes, sendo eles o hipoclorito de sódio 5,25%, a clorhexidina 2% e o etanol 70%, em diferentes períodos de tempo de exposição aos mesmos. Os cones foram contaminados previamente com as bactérias de *Enterococcus faecalis*, o fungo *Candida albicans* e ambos em associação.

**Material e Métodos:** O presente estudo experimental é constituído por duas fases, uma primeira fase de revisão bibliográfica e uma segunda pela realização de um protocolo experimental. Na primeira fase da revisão foi efetuada com base numa pesquisa *on-line*, nos motores de busca *b-On*, *National Library of Medicine's PubMed Database* e *Scielo*, com as palavras-chave: “*gutta percha*”; “*decontamination in endodontics*”; “*disinfection in endodontics*”; “*root canal irrigants*”; “*endodontics microbiology*”; “*Candida albicans*”; “*Enterococcus faecalis*”, “*sodium hypochlorite*”, “*chlorhexidine*” e “*alcohol*”. Foram selecionados artigos publicados em inglês e português, com os limites temporais entre 2000 e 2014. A segunda parte consistiu num estudo experimental com principal propósito, sugerir um protocolo de desinfecção imediata dos cones de guta-percha, de modo a ser incorporado no tratamento endodôntico.

**Resultados/Conclusões:** No trabalho realizado, conclui-se que as soluções desinfetantes que apresentam melhores resultados, segundo os factores em estudo, são o hipoclorito de sódio 5,25% por um período de sessenta segundos e a clorhexidina 2% durante os períodos de tempo de 15s e 60s. A solução irrigante, que apresentou resultados menos favoráveis na desinfecção de cones de guta-percha foi o etanol 70%, com todos os intervalos de tempo estudados.

## Abstract

**Objectives:** The aim of this study was to propose a protocol for disinfection of gutta-percha cones prior its use in canal filling. Thus, the effectiveness of three disinfectants were evaluated, namely 5,25% sodium hypochlorite, 2% chlorhexidine and 70% alcohol, in different time periods of exposure to them. The gutta-percha cones were previously contaminated with the *Enterococcus faecalis* bacteria, the *Candida albicans* fungus, and both in combination.

**Materials and methods:** This experimental study consists of two phases, first the phase of literature review and second the phase of performing an experimental protocol. The literature review was conducted based on a search online through *b-On*, *National Library of Medicine's PubMed Database* e *SciELO*, using the following key words: "gutta percha"; "decontamination in endodontics"; "disinfection in endodontics"; "root canal irrigants"; "endodontics microbiology"; "Candida albicans"; "Enterococcus faecalis", "sodium hypochlorite", "chlorhexidine" e "alcohol". Articles published in portuguese and english, between 2000 and 2014 were accepted. The second part consisted of an experimental study with a main propose, suggest a protocol of immediate disinfection of gutta-percha cones to be incorporated in the endodontic treatment.

**Results/Conclusion:** In this study it is concluded that the disinfectant solutions that provide best results, in accordance with the factors under study, are 5.25% sodium hypochlorite for a period of sixty seconds and and 2% clorohexidine during time periods of 15 seconds and 60 seconds. The irrigating solution that showed less favorable results in desinfection of gutta-percha cones was 70% ethanol, in every studied times.

## **Dedicatória**

Dedico este trabalho aos meus Pais e Irmão. Pela força e apoio, que sempre me deram e dão, pois sem eles não teria alcançado esta etapa da minha vida.

## **Agradecimentos**

Aos meus Pais, muito obrigada pelo vosso apoio incondicional durante todos momentos da minha vida, especialmente nesta fase, e pelo amor e valores que sempre me transmitiram.

Ao meu Irmão, que será sempre um exemplo, um grande obrigada por estar presente tanto nos bons como nos maus momentos, e ter sempre bons conselhos para dar.

Ao meu orientador, Mestre Luís França Martins, pela a ajuda na escolha deste tema, por toda a paciência e apoio durante a realização deste trabalho.

Ao Dr. Ricardo Dias, pela disponibilidade e ajuda numa parte importantíssima deste trabalho.

A Filipa e ao João, por toda a amizade e por se tornarem como uma família ao longo destes anos.

A minha Binómia Ana Catarina, pela amizade, apoio e paciência.

A todas as minhas amigas e amigos de faculdade que me acompanharam durante este percurso, em especial a Joana e a Maria Teresa, por todo o apoio, amizade e carinho.

Á Ana Luísa, Joana, Andreia, Barbara e Inês pela sua amizade ao longo destes anos e em especial a Isabel pelo apoio na realização deste trabalho.

A todos os Docentes e Funcionários da Universidade Fernando Pessoa, que contribuíram de alguma forma para a minha formação académica e pessoal.

## Índice

Lista de Abreviaturas .....	X
Índice de Figuras.....	XI
Índice de Quadros .....	XII
Índice de Gráficos.....	XIII
Índice de Tabelas .....	XIV
I. Introdução .....	1
II. Desenvolvimento .....	3
1. A importância da desinfecção em Endodontia .....	3
2. Soluções desinfetantes em Endodontia.....	4
i. Hipoclorito de sódio .....	4
ii. Clorohexidina.....	6
iii. Álcool .....	7
3. Principais agentes microbiológicos no insucesso do TENC.....	8
i. O papel do <i>E. faecalis</i> e da <i>C. albicans</i> no insucesso do TENC.....	9
4. Principais características dos cones de Guta-Percha .....	12
i. Efeitos provocados pela desinfecção dos cones de guta-percha.....	14
5. Desinfecção rápida dos cones de guta-percha .....	15
6. Trabalho de Investigação .....	16
i. Objetivo do estudo <i>in vitro</i> .....	16
ii. Material e Métodos.....	17
iii. Tipologia de estudo e caracterização da amostra .....	18
iv. Hipóteses em Estudo .....	19
v. Protocolo Experimental .....	19
v.i Preparação de meios de cultura.....	19
v.ii Identificação e protocolo de pureza.....	21
v.iii Contaminação dos cones de guta-percha.....	24
v.iv Descontaminação dos cones de guta-percha.....	25
v.v Análise quantitativa microbiana das amostras pós-desinfecção .....	26
vi. Análise estatística dos resultados .....	26
vii. Resultados .....	28
7. Discussão .....	33

III.	Conclusão .....	38
IV.	Bibliografia .....	41

## **Lista de Abreviaturas**

API- Automatic Profile Index

ATTC- American Type Culture Collection

BHI- Brain Heart Infusio

*C. albicans- Candida albicans*

CFU's- Colony Forming Units

CHX- Clorohexidina

EDTA- Ácido etilenodiamino tetra-acético

*E. faecalis- Enterococcus faecalis*

ml- mililitros

MTAD- Mistura desinfetante de tetraciclina

NaOCl- Hipoclorito de Sódio

TENC- Tratamento Endodontico Não Cirurgico

s- segundos

## Índice de Figuras

Figura 1 – A) <i>E. faecalis</i> em meio BHI agar B) <i>C. albicans</i> em meio BHI agar.....	20
Figura 2 – Inoculação das culturas microbianas: <i>E. faecalis</i> , <i>C. albicans</i> , ambas associadas e controlo negativo em meio BHI liquido.....	20
Figura 3 – Fotografias de coloração Gram.....	21
Figura 4 – Teste de Bile-esculina para o <i>E. faecalis</i> .....	23
Figura 5 – Densitómetro e Contaminação dos cones com <i>E. faecalis</i> .....	24
Figura 6 – Desinfetantes.....	25
Figura 8 – Cones de guta-percha colocados em Eppendorfs com soro fisiológico após homogeneizados no vortex.....	26
Figura 9 – Fotografaria do plaqueamento para contagem de CFU.....	26

## Índice de Quadros

Quadro 1- Características principais de um irrigante endodôntico. ....	4
Quadro 2- Vantagens e Desvantagens das soluções irrigantes.....	8
Quadro 3 - Composição dos cones de guta-percha no tratamento endodôntico.....	13
Quadro 4 – Equivalência Standards McFarland para CFU's .....	24

## Índice de Gráficos

Gráfico 1 – Número médio de colónias por desinfetante.....	32
Gráfico 2 – Número médio de colónias por tempo .....	33

## **Índice de Tabelas**

Tabela 1 – Média do nº de colónias .....	28
Tabela 2 – Média do nº de colónias da espécie E. Faecalis .....	29
Tabela 3 – Média do nº de colónias da espécie C. Albicans .....	30
Tabela 4 – Média do nº de colónias da espécie E. faecalis e C. Albicans .....	30
Tabela 5 – Média do nº de colónias do grupo de controlo negativo.....	31
Tabela 6 – Comparações múltiplas entre desinfetantes .....	32
Tabela 7 – Comparações múltiplas entre tempos .....	33

## I. Introdução

A Endodontia é o ramo da Medicina Dentária que estuda a morfologia, a fisiologia e a patologia da polpa dentária e dos tecidos perirradiculares, bem como a prevenção e o tratamento das mesmas (ESE, 2006).

Um dos principais propósitos do tratamento endodôntico não cirúrgico (TENC) consiste na terapia de desinfecção dos canais radiculares e da rede tridimensional de estruturas associadas ao substrato dentinário radicular (Haapasalo *et al.*, 2010).

A maioria dos estudos longitudinais ou de *follow-up* acerca do TENC regista taxas de sucesso variáveis entre os 86% e os 98%, dependendo do diagnóstico e sendo a permanência de microrganismos patogénicos no interior dos canais radiculares e nos túbulos dos substratos dentinários radiculares, reportada como a principal causa de fracasso desta terapia canalar (Song *et al.*, 2011).

Segundo Pinheiro (2000) *...vários fatores estão envolvidos no insucesso do tratamento endodôntico, sendo que no entanto as bactérias são os seus principais agentes etiológicos.* Estas provocam infeções endodônticas tipificadas em: primárias e secundárias ou persistentes tendo em conta as bactérias que as promovem. Uma infeção endodôntica primária é provocada pela invasão da polpa dentária por microrganismos após a necrose da mesma. Este tipo de infeção é normalmente polimicrobiana predominando as bactérias anaeróbias *gram* negativas, tais como as pertencentes aos géneros *Fusobacterium*, *Phorphyromonas*, *Prevotella* e *Campylobacter* (Chaves 2007). Por sua vez, uma infeção endodôntica persistente pode surgir associada a procedimentos de desinfecção dos canais radiculares insuficientes durante a preparação biomecânica, à contaminação dos canais durante o decorrer do tratamento ou entre sessões de tratamento, ou ainda por um deficiente selamento coronal após a finalização do TENC (Sahlin & Aguadé 2001).

Assim, estas infeções são geralmente caracterizadas pela presença de bactérias resistentes e persistentes, que não se conseguiram eliminar com os procedimentos de

desinfeção e descontaminação habitualmente realizados durante o TENC (Siqueira *et al.* 2002).

Outro factor relevante no insucesso do TENC, muitas vezes negligenciado prende-se ao preenchimento dos canais radiculares com cones de guta-percha não esterilizados. Este será, por isso, o objeto deste estudo experimental que implica uma prévia e minuciosa revisão bibliográfica do estado da arte neste campo específico, e que visa sugerir um protocolo de descontaminação imediato, de modo a ser incorporado no protocolo de tratamento endodôntico.

Tema muito importante dada a relevância da desinfeção e manutenção da cadeia asséptica, durante o TENC. Realizada uma pesquisa sobre a temática constatamos ser um tema que carece de pesquisa e estudos científicos. Este facto aliado ao meu gosto e interesse pessoal sobre a temática, foram a minha motivação para a escolha deste tema.

## II. Desenvolvimento

### 1. A importância da desinfecção em Endodontia

A prática de uma técnica asséptica correta é imprescindível para o sucesso do tratamento endodôntico, mas esta deve ser considerada combinada com uma boa preparação dos canais radiculares e desinfecção dos mesmos. Deste modo, soluções irrigantes, são necessárias para a preparação dos canais, sendo que as soluções ideais dependem de fatores como a sua ação antibacteriana e do seu efeito sobre os tecidos periapicais. Deste modo, os irrigantes mais comumente utilizados em endodontia são: hipoclorito de sódio, soluções de iodo, clorhexidina, EDTA (ácido etilenodiaminotetacético), ácido cítrico e MTAD (mistura desinfetante de tetraciclina) (Rhodes, 2006; Estrela *et al.*, 2014).

No processo de desinfecção em endodontia, as soluções irrigantes assumem um papel relevante. Assim devem reunir um conjunto de características, de forma a serem o mais eficazes possível, tais como: ter um amplo espectro antimicrobiano e uma elevada eficácia contra microrganismos anaeróbios facultativos e biofilmes organizados. Devem dissolver os tecidos orgânicos remanescentes, inativar toxinas e produtos de metabolismo bacteriano e prevenir a formação/eliminar a *smear layer*, durante a instrumentação. No entanto, os irrigantes podem extravasar para os tecidos vitais, por isso os seus componentes devem ser meticulosamente equilibrados de modo a não provocar irritações, não danificar os tecidos periapicais e nem enfraquecer a estrutura do dente (Zehnder, 2006; Haapasalo *et al.*, 2010).

**Quadro 1- Características principais de um irrigante endodôntico (Hargreaves & Cohen, 2011).**

1. Deve ser um germicida e um fungicida eficaz.
2. Não deve ser irritante para os tecidos periapicais.
3. Deve permanecer estável em solução.
4. Deve ter um efeito antimicrobiano prolongado.
5. Deve ser ativo na presença de derivados sanguíneos, séricos e proteicos dos tecidos.
6. Deve ter baixa tensão superficial.
7. Não deve interferir no reparo dos tecidos periapicais.
8. Não deve manchar a estrutura dos dentes.
9. Deve ser capaz de inativação num meio de cultura.
10. Não deve induzir uma resposta imune celularmente mediada.
11. Deve ser capaz de remover completamente a camada de esfregaço e desinfetar a dentina subjacente e seus túbulos.
12. Não deve ser antigenico, tóxico e carcinogenico para células teciduais circundando o dente.
13. Não deve ter efeitos adversos sobre as propriedades físicas da dentina exposta.
14. Não deve ter efeitos adversos sobre a capacidade selante de materiais obturadores.
15. Deve ter uma aplicação conveniente.
16. Deve ser relativamente barato.

Antes de dar início ao tratamento endodôntico, todo o material envolvido deve passar por um processo de desinfecção ou esterilização, de forma a garantir a assepsia do mesmo. Neste ponto, julgamos pertinente diferenciar termos comumente usados para caracterização deste processo. A esterilização define-se como, a ausência de formas de vida, incluindo endoesporos. Por outro lado, a desinfecção tem como principal característica a eliminação da maioria dos agentes patogênicos, excluindo os esporos. Por último, a descontaminação resulta de uma redução de microrganismos, em que se considera seguro o manuseamento sem equipamento de proteção (Murray *et al.*, 2007; Hargreaves & Cohen, 2011).

## **2. Soluções desinfetantes em Endodontia**

### **i. Hipoclorito de sódio**

O hipoclorito de sódio é a solução irrigante mais utilizada no tratamento endodôntico, dadas as suas diversas qualidades, entre as quais se destacam o ser um ótimo agente

antimicrobiano (elevada atividade em eliminar Gram positivo e negativo e um excelente antifúngico); agente proteolítico com capacidade de dissolver tecidos necrosados e tecidos pulpares vitais; dos melhores irrigantes na destruição de biofilmes microbianos; ser uma solução irrigante de fácil obtenção bem como economicamente de baixo custo (Zahed, 2009; Bergenholtz *et al.*, 2010 ;Hargreaves & Cohen,2011).

Segundo Vianna *et al.* (2004), a ação antimicrobiana depende da concentração do ácido hipocloroso não dissociado (HClO) em solução, que tem um efeito germicida por ação oxidativa nos grupos de sulfridril das enzimas bacterianas. Com a inibição destas enzimas, são interrompidas as reações metabólicas resultando na morte celular.

Não existe ainda na literatura científica atual, um consenso em relação à concentração ideal de hipoclorito de sódio a utilizar na desinfecção, podendo esta variar entre os 0,5% (solução de DAKIN) e os 5,25%. Os valores de 0,5% são os mais aconselhados em relação a biossegurança dos nossos tratamentos, devido à sua baixa citotoxicidade, mas esta concentração necessita de, pelo menos, 30 minutos para inibir o crescimento de microorganismos. Por outro lado, a concentração de 5,25% apenas exige alguns segundos para eliminar os mesmos microorganismos (Gomes *et al.*, 2005).

Dadas as suas características, este irrigante é extremamente relevante como desinfetante de cones de guta-percha. A sua ação esterilizante em cones contaminados de forma artificial, foi eficaz principalmente quando usado numa concentração de 5,25% (Estrela *et al.*, 2008; Topuz, 2011).

Porém podem surgir algumas complicações quando usado o hipoclorito de sódio de forma inapropriada, como por exemplo, o injetar desta solução para além do ápice radicular, ocasionando reações tecidulares. Também tem efeitos deteriorantes na composição química da dentina, apesar desta ter capacidade de reduzir a sua atividade microbiana. Ainda há a ter em conta o cheiro e sabor desagradável deste irrigante bem como a sua toxicidade para os tecidos envolventes e conseqüentemente a sua associação a efeitos alérgicos (Zahed, 2009; Eldeniz & Guneser, 2013).

## ii. Clorhexidina

A clorhexidina pertence à família da medicação antibacteriana, as polibiguanídeas, é constituída por dois anéis quatro-clorofenil simétricos e dois grupos bis-guanida, ligados por uma cadeia central de hexametileno. Esta é uma molécula básica e estável com um sal, o sal de digliconato de CHX que por sua vez, é facilmente solúvel em água (Hargreaves & Cohen,2011).

A eficácia do seu mecanismo de ação, ocorre devido a interação da carga positiva da molécula de clorhexidina e as cargas negativas das paredes microbianas, provocando uma alteração do equilíbrio osmótico das células, pois aumenta a permeabilidade da parede celular e a molécula de clorhexidina entra nas células. Numa concentração de 2%, a clorhexidina leva a uma precipitação dos conteúdos citoplasmáticos, ocorrendo a lise celular (Mohammadi & Abbott, 2009).

Este irrigante é utilizado de forma frequente na medicina dentária, como um colutório bucal na prevenção e no tratamento da doença periodontal e da cárie. Tem uma eficiente atividade antimicrobiana em algumas bactérias resistentes como o *Enterococcus faecalis* e fungos. A substantividade é uma das suas principais características, que consiste na capacidade de se ligar a dentina quimicamente e manter a sua capacidade de desinfecção, após ser removida do sistema de canais radiculares. A clorhexidina tem uma citotoxicidade inferior ao NaOCl, contudo, não o pode substituir, devido à sua incapacidade de dissolver restos orgânicos. Embora a CHX seja aceite como menos abrasiva em relação ao NaOCl, têm sido descritas irritações a nível cutâneo, assim como o seu efeito citotóxico em osteoblastos humanos que podem prejudicar o potencial regenerativo dos tecidos periapicais (Haapasalo *et al.*, 2005; Royal *et al.*, 2007; Luddin & Ahmed, 2013).

A nível clínico a clorhexidina pode aplicar-se como agente antimicrobiano, durante todas as fases do tratamento endodôntico, incluindo a desinfecção do campo operatório, durante a instrumentação dos canais; na remoção de tecidos necrosados; na preparação química-mecânica; como medicação intracanal, sozinho ou combinado; na desinfecção

dos cones de guta-percha, aquando da obturação e na remoção dos cones de guta-percha, durante o retratamento (Gomes *et al.*, 2013).

### **iii. Álcool**

Os álcoois, nomeadamente o etanol, são outro tipo de irrigantes conhecidos pela sua rápida ação num amplo espectro de atividade microbiana, contra bactérias, leveduras, fungos e alguns vírus, por isso são também utilizados em endodontia. No entanto, este agente químico tem pouco efeito contra esporos bacterianos. Para além desta característica os álcoois têm: boa solubilidade na água e nos lípidos, estabilidade, reduzido odor, baixa toxicidade e compatibilidade com a pele e superfícies inanimadas (Ferreira *et al.*, 2010; Yuan *et al.*, 2014).

O mecanismo, utilizado pelos álcoois para eliminar microrganismos, não está completamente compreendido. Contudo, a explicação mais plausível, encontra-se no facto de a sua ação antimicrobiana desnaturar proteínas e solubilizar lípidos, desencadeando uma rotura das membranas celulares (Murray *et al.*, 2010).

Todavia os álcoois são frequentemente utilizados como desinfetantes em diferentes formulações, devido à sua rápida atividade antimicrobiana, em que as concentrações ótimas variam entre os 60% e os 70%. Aquando da utilização de uma concentração de 70%, é necessário trinta segundos para se observar atividade bactericida e de dois minutos para a eliminação de fungos e vírus. Apesar de não serem ativos em esporos bacterianos, os álcoois inibem a sua germinação, por isso, são esporostáticos. Como este agente desinfetante desidrata a pele e as superfícies inanimadas, o seu uso continuado, deve ser evitado (Ferreira *et al.*, 2010).

**Quadro 2- Vantagens e Desvantagens das soluções irrigantes.**

	Vantagens	Desvantagens
<b>Hipoclorito de sódio</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Agente antimicrobiano (elimina Gram positivo e negativo e um excelente antifúngico);</li> <li>▪ Destrói biofilmes microbianos;</li> <li>▪ Dissolução de tecidos necrosados/pulpaes vitais;</li> <li>▪ Agente proteolítico;</li> <li>▪ Fácil obtenção;</li> <li>▪ Economicamente de baixo custo;</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Provocar reações tecidulares quando se injecta para além do ápice radicular;</li> <li>▪ Efeitos deteriorantes na composição química da dentina;</li> <li>▪ Cheiro e sabor desagradável;</li> <li>▪ Pode ter associação com efeitos alergénicos;</li> </ul>
<b>Clorohexidina</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Eficiente atividade microbiana em bactérias e fungos;</li> <li>▪ Substantividade;</li> <li>▪ Menos abrasiva que o NaOCl;</li> <li>▪ Pode aplicar-se em todas as fases do tratamento endodôntico;</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Incapacidade de dissolver tecidos orgânicos;</li> <li>▪ Associada a irritações a nível cutâneo;</li> </ul>
<b>Álcool</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Boa actividade microbiana;</li> <li>▪ Boa solubilidade com água e nos lípidos;</li> <li>▪ Estabilidade;</li> <li>▪ Baixa toxicidade;</li> <li>▪ Compatibilidade com a pele e superfícies inanimadas;</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Pouco efeito contra esporos bacterianos;</li> </ul>

### 3. Principais agentes microbiológicos no insucesso do TENC

Cerca de 500 espécies bacterianas são identificadas na cavidade oral, mas apenas um número limitado consegue colonizar o sistema de canais radiculares. Apesar do ambiente hostil dos canais radiculares, existem ainda microrganismos que conseguem sobreviver a estas condições. A maioria destes microrganismos são bactérias, mas também se podem encontrar fungos (Iqbal, 2012).

No desenvolvimento das lesões perirradiculares os principais factores etiológicos são as bactérias e as infeções dos canais radiculares. Estas têm uma natureza polimicrobiana,

em que os microrganismos anaeróbios são mais predisponentes a encontrarem-se após o tratamento endodôntico (Siqueira & Rôças, 2008).

As infecções endodônticas podem classificar-se consoante a sua localização antômica: infecções intrarradiculares ou extrarradiculares. Por sua vez, as infecções intrarradiculares podem subdividir-se em três tipos: infecções primárias que são causadas por microrganismos que invadem primeiramente o tecido pulpar necrosado; infecções secundárias são colonizadas por microrganismos diferentes das primárias, e ocorrem após a intervenção do médico dentista; infecções persistentes são causadas por microrganismos das infecções primárias e secundárias, que resistiram aos processos antimicrobianos do TENC. Por fim, a infecção extrarradicular caracteriza-se pela invasão microbiana dos tecidos perirradiculares inflamados e pode ser consequência de uma infecção intrarradicular (Hargreaves & Cohen, 2011).

A bactéria *E. faecalis* e o fungo *C. albicans* são repetidamente encontrados e identificados, durante os retratamentos. Estas espécies encontram-se presentes em casos de tratamento endodôntico fracassado e nas infecções persistentes nos canais radiculares. Dada a sua relevância estes dois microrganismos serão referenciados em maior detalhe, seguidamente (subcapítulo 3.1) (Aravind *et al.*, 2006; Narayanan & Vaishnavi, 2010).

## **i. O papel do *Enterococcus faecalis* e da *Candida albicans* no insucesso do TENC**

### ***i.i Enterococcus faecalis***

*Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*) é uma bactéria Gram positiva, de morfologia coccus e aneróbia facultativa, presente na flora dos seres humanos. Em endodontia, raramente se encontra na periodontite apical primária, mas é predominante no ecossistema microbiano, que engloba as lesões perirradiculares após o TENC. Esta bactéria tem a capacidade de sobreviver em condições adversas, devido aos seus polimorfismos genéticos, formar biofilmes e sobreviver como monocultura (Oliveira *et al.*, 2007; Dornelles-Morgental *et al.*, 2011; Atila-Pektas *et al.*, 2013; Luddin & Ahmed, 2013).

Segundo Love (2001), a presença de *Enterococcus faecalis* em dentes já tratados endodonticamente ocorre devido à sua capacidade de invadir os túbulos dentinários e permanecer vital dentro dos mesmos, podendo assim provocar o insucesso do tratamento endodôntico.

Esta bactéria tem diversas características que a tornam uma sobrevivente excepcional no canal radicular, já que tem a capacidade de sobreviver em ambientes pobres em nutrientes, utilizando o fluido dos tecidos que advêm do ligamento periodontal. Também resiste à medicação intracanal (hidróxido de cálcio) e irrigantes (hipoclorito de sódio) e forma biofilmes em canais medicados. Pode ainda invadir e metabolizar fluidos dentro dos túbulos dentinários aderindo ao colagénio e adquirir resistência aos antibióticos. Para além disso sobrevive, em ambientes extremos, onde o pH é baixo e a salinidade e as temperaturas elevadas (Vianna et al, 2009; Narayanan & Vaishnavi, 2010).

Existem alguns fatores de virulência que caracterizam a *E. faecalis*, incluindo-se nestes as enzimas líticas, as citolisinas, os feromônios, as substâncias de agregação, a produção de superóxido extracelular, a gelatinase, os polissacarídeos capsulares e o ácido lipoteicoico, por isso esta bactéria é capaz de diminuir a ação dos linfócitos, contribuindo para o fracasso do tratamento endodôntico. (Portenier *et al.*, 2003; Stuart *et al.*, 2006; Estrela *et al.*, 2008).

Como foi referido anteriormente, a capacidade de organização em biofilmes é uma das formas que o *E. faecalis* tem de sobreviver no sistema de canais radiculares. Esta forma de organização protege as bactérias de alterações de pH e agentes antimicrobianos. Além disto, a formação de biofilmes, pode ser reforçada pela agregação e adesão de duas ou mais espécies bacterianas. Isto permite-lhe: um mecanismo de defesa 1000 vezes superior; maior resistência à fagocitose, aos anticorpos e a agentes antimicrobianos (Chaves 2007; Williamson *et al.*, 2009).

Num estudo realizado por Subba *et al.* 2013, demonstrou que o hipoclorito numa concentração de 5,25% e a clorohexidina numa concentração de 2% têm actividade antimicrobiana contra o *E. faecalis*, por períodos de um e de cinco minutos.

i.ii *Candida albicans*

O insucesso do tratamento endodôntico também se encontra relacionado com a presença de *C. albicans* de forma isolada nos canais radiculares de dentes obturados. Contudo, alguns estudos também referem outras espécies do mesmo gênero como: *C. glabrata*, *C. guilliermondii*, *C. inconspicua* e *Geotrichium candidum* (Valera *et al.*, 2001; Siqueira *et al.*, 2003).

A presença de fungos em canais infetados pode variar dos 1% aos 17% e podem encontrar-se numa infecção primária, mas aparecem de forma mais frequente em infecções secundárias e nas persistentes. As infecções secundárias são causadas por microrganismos diferentes dos das primárias, visto que, invadem o canal durante o tratamento, ou entre consultas, ou ainda no final do TENC. Por outro lado, as infecções persistentes resultam de microrganismos que resistiram aos procedimentos de desinfecção (Baumgarther, 2000; Lana *et al.*, 2001; Siqueira *et al.*, 2001; Mohammadi *et al.*, 2012).

Os fungos *C. albicans*, como células eucarióticas, têm uma constituição celular complexa que engloba diversos constituintes: um núcleo definido, as mitocôndrias, o complexo de Golgi, os ribossomas, o retículo endoplasmático e a parede celular. A parede celular deste microrganismo confere-lhe rigidez, tendo um papel essencial a nível biológico na sua patogenicidade, pois esta é constituída principalmente por três polissacarídeos (β-gluconato, quitina e mannoпротеínas), proteínas e uma pequena quantidade de lípidos (Siqueira *et al.*, 2004).

Os fatores de virulência, que caracterizam o fungo *C. albicans*, dependem de mecanismos patogénicos, tais como: capacidade de adaptação em condições ambientais distintas, adesão em diferentes superfícies, evasão e modulação da defesa do hospedeiro, produção de enzimas hidrolíticas, transcrição morfológica e formação de biofilme (Siqueira *et al.*, 2004).

Um estudo, realizado por Ferguson *et al.* (2002), teve como principal objetivo avaliar a suscetibilidade da *Candida albicans* com irrigantes intracanales, como: hipoclorito de

sódio, o peróxido de hidrogénio e a clorohexidina, em diferentes concentrações. Os resultados deste estudo demonstram que os dois irrigantes (NaOCL e CHX) são eficazes a eliminar este fungo, todavia o peróxido de hidrogénio não alcançou os resultados esperados independentemente da concentração utilizada.

#### **4. Principais características dos cones de Guta-Percha**

A guta-percha é um polímero, principalmente constituído por 1,4-poli-isopropeno e extraído de uma árvore tropical. À temperatura ambiente, 60% da sua constituição é cristalina, e a restante constituição tem estrutura amorfa. Como polímero, tem característica viscoelástica, que lhe confere alguma elasticidade, mas também pode ter característica viscosa. Quando aquecida a temperaturas superiores a 65° sofre deformação e fica em estado líquido (Tronstad, 2003).

A forma cristalina deste material existe em duas fases:  $\alpha$  e  $\beta$ . A fase  $\alpha$  é a forma natural em que o material é extraído da árvore e a fase  $\beta$  é a forma processada da guta-percha que é utilizada para obturação dos canais radiculares na técnica convencional. Quando não é aquecida, na fase  $\beta$ , a guta-percha caracteriza-se num material sólido e compactável, por outro lado quando aquecido, torna-se maleável e viscoso, esta fase tem como desvantagem a contração da guta-percha quando endurece. A fase  $\alpha$  está mais associada a técnicas termoplásticas, pois quando aquece não sofre tanta contração em relação a fase  $\beta$  (Hargreaves & Cohen, 2011).

A composição dos cones de guta-percha pode variar ligeiramente dependendo do fabricante. Mas os seus principais componentes são: guta-percha, óxido de zinco, sulfatos de metal (bário e strónio) e ceras ou resinas. O sulfato de bário é responsável pela radiopacidade, pois este componente é facilmente reconhecido no raio-x (Castelucci, 2005).

**Quadro 3 - Composição dos cones de guta-percha no tratamento endodôntico (Castelucci,2005)**

<b>Materiais</b>	<b>Porcentagem</b>	<b>Função</b>
Guta-percha	(18% - 22%)	Matriz
Óxido de zinco	(59% - 76%)	Enchimento
Sulfatos de metal	(1% - 18%)	Radiopacidade
Cera ou resina	(1% - 4%)	Plasticidade

As principais vantagens da guta-percha são: a sua plasticidade, a facilidade de manipulação (devido a ser um material semi-sólido), toxicidade mínima e fácil de remover através de calor ou solventes (clorofórmio). Como desvantagens podem referir-se a não aderência à dentina e a contração ao arrefecer (Hargreaves & Cohen, 2011).

A guta-percha não pode ser utilizada de forma exclusiva no processo da obturação endodôntica, pois não possui a qualidade de aderência necessária para selar o espaço do canal radicular, sendo por isso imprescindível o uso de um cimento obturador, para o selamento final. Para além disto, durante a obturação, a guta-percha requer alguma forma de compactação, de forma a obter-se um preenchimento trimendimensional completo do canal radicular (Hargreaves & Cohen, 2011).

A maioria dos instrumentos utilizados no TENC podem esterilizar-se através de métodos convencionais, tais como, o calor seco e a autoclave. Como os cones de guta-percha são um material termoplástico, ou seja, não toleram elevadas temperaturas sem alteração da sua forma, os métodos de esterilização anteriormente referidos são inviáveis para garantir a sua assepsia (Motta *et al.*, 2001; Sahinkesen, 2011).

Apesar de os cones de guta-percha serem fabricados em condições assépticas, os fabricantes não garantem que estes estejam estéreis, pois assim que uma caixa é manipulada pela primeira vez são susceptíveis à contaminação pelo próprio meio ambiente, sendo necessário não prescindir da desinfecção *chairside* (Pereira & Siqueira, 2010; Sahinkesen, 2011).

### **i. Efeitos provocados pela desinfecção dos cones de guta-percha**

As soluções desinfetantes, embora eficazes, provocam alterações físicas nos cones de guta-percha, que podem modificar a relação entre os cones e os cimentos endodônticos. Esta relação inclui a molhabilidade (capacidade de o cimento manter contacto com a superfície do cone de guta-percha) e a adesão entre o cimento e os cones de guta-percha (Ferreira *et al.*, 2012).

Num estudo realizado por Prado *et al.* (2011) avaliaram-se os efeitos do NaOCl a 5,25% e da CHX a 2% durante um minuto, na superfície dos cones de guta-percha pela energia livre (capacidade de uma superfície sólida se molhar) e a molhabilidade de cimentos endodônticos em contacto com as superfícies. Quando os materiais foram submetidos ao processo de desinfecção, os valores de energia livre aumentam, por consequência, diminui o valor do ângulo de contacto da superfície do cone em relação aos cimentos obturadores, e assim alcança-se uma melhor molhabilidade, especialmente quando se utiliza a clorohexidina. O mesmo estudo demonstrou que as soluções utilizadas para desinfecção de cones promovem a interação entre a guta-percha e os cimentos de obturação, quando comparados com as superfícies sem desinfecção.

O hipoclorito de sódio a 5,25% e MTAD estão associados a alterações locais da rugosidade da superfície dos cones de guta-percha, por outro lado, na clorohexidina a 2% não se observa alterações da superfície dos cones (Prado *et al.*, 2012).

Segundo Short *et al.* (2003) após a desinfecção de cones de guta-percha com hipoclorito de sódio, pode ocorrer a formação de cristais de cloreto de sódio na superfície dos cones de guta-percha. Também foi demonstrado neste estudo que os cristais de cloreto de sódio podem ser removidos da superfície dos cones pela lavagem com álcool etílico a 96%, álcool a 70% ou água destilada. No entanto, não é relevante formação de cristais no processo de obturação.

## 5. Desinfecção rápida dos cones de guta-percha

A contaminação dos canais radiculares é um aspeto importante da terapêutica endodôntica, a guta-percha é utilizada para a obturação dos mesmos, embora seja fabricada em condições assépticas, pode ser contaminada por manipulação, aerossóis, e meios físicos durante o processo de armazenamento, justificando assim a sua desinfecção (Ferreira *et al.*, 2011).

O método de desinfecção define-se como a limpeza que assegura a redução de microrganismos existentes no material e tem como objetivo uma correta aplicação do desinfetante ou esterilizante. Os cones de guta-percha não podem ser esterilizados pelos meios convencionais, devido às suas características termoplásticas, daí emergir a necessidade de se adotar uma desinfecção rápida *chairside*, com agentes como o hipoclorito de sódio, clorhexidina e MTAD que devem ser protocoladas na prática endodôntica (Gomes *et al.*, 2005; Royal *et al.*, 2007; Prado *et al.*, 2012).

A imersão dos cones de guta-percha em agentes químicos como hipoclorito de sódio a 5,25% e a clorhexidina a 2%, deve ser de cerca de um minuto, pois quando utilizados por longos períodos de tempo podem danificar a estrutura do material (Ferreira *et al.*, 2011). Vários estudos também têm mostrado que este período de tempo é suficiente para estas soluções desinfetarem os cones (Pang *et al.*, 2007; Royal *et al.*, 2007).

Para além dos três agentes desinfetantes empregues na realização deste estudo, outros foram testados na desinfecção dos cones de guta-percha, nomeadamente:

- O ácido peracético (PAA), desde a sua introdução nos mercados, foi indicado para desinfecção e esterilização de equipamentos e dispositivos hospitalares, também foi estudado para desinfecção de resinas acrílicas em medicina dentária. PAA é uma peroxidase e age de forma eficaz contra todos os microrganismos (bactérias gram-positivas e gram-negativas, fungos e leveduras), mesmo em baixas concentrações. Este desinfetante químico, não deixa qualquer tipo de resíduo e não produz subprodutos nocivos, também tem boa capacidade de dissolução, tendo potencial como irrigante final de canais radiculares. Apesar da sua eficácia na desinfecção dos cones de guta-

percha, ainda são necessários estudos acerca da toxicidade do PAA, dado que a sua utilização repetida pode ser tóxica (Salvia *et al.*, 2011; Subba *et al.*, 2013).

- O MTDA (mistura de um isómero de tetraciclina, um ácido e um detergente) pode ser utilizado na desinfecção de canais, devido à sua capacidade de eliminar o *Enterococcus faecalis*. Este tem resultado na desinfecção dos cones de guta-percha após imersão durante 1 minuto. Segundo Prado *et al.* (2011), depois da desinfecção com MTDA há uma alteração da superfície dos cones, criando uma camada que os recobre, desta forma este só deve ser utilizado, após limpeza, de modo a esta camada, não prejudicar o contacto entre o cone e o cimento obturador.
- Os compostos de iodo (PVPI) são utilizados há décadas na desinfecção de superfícies, sendo conhecidos pela sua ação rápida e eficiente na eliminação de bactérias, fungos, e esporos. O iodo molecular é responsável pela atividade antimicrobiana. Para eliminar o *Enterococcus faecalis*, os cones de guta-percha necessitam de ser emersos por um período de 10 minutos (Nabeshima *et al.*, 2011).
- O glutaraldeído a 2% necessita de um período entre oito a dez horas para descontaminar os cones de guta-percha, como comprovado num estudo realizado por Ozalp *et al.* (2006) no qual se testou a capacidade do glutaraldeído a 2% durante quinze minutos tendo-se concluído ser ineficaz na desinfecção.

## **6. Trabalho de Investigação**

### **i. Objetivo do estudo *in vitro***

O sucesso do tratamento endodôntico depende de uma boa desinfecção dos canais radiculares, assim como do uso de técnicas assépticas ao longo do mesmo. Durante a obturação podem ser reintroduzidos nos canais radiculares microrganismos através dos materiais obturadores, como a guta-percha, dado que ao serem retirados da embalagem podem ser facilmente contaminadas (Subba *et al.*, 2013).

As bactérias como *Enterococcus faecalis* e os fungos como *Candida albicans* conseguem sobreviver ao tratamento endodôntico, estando associados ao fracasso do mesmo (Rhodes, 2006).

Face ao apresentado, este estudo tem como principal objetivo propor um protocolo de desinfecção de cones de guta-percha prévia ao seu uso na obturação canalar. Deste modo, avaliou-se a eficiência de três agentes desinfetantes, sendo eles o hipoclorito de sódio, a clorhexidina e o etanol, em diferentes períodos de tempo, contaminados previamente com as bactérias de *Enterococcus faecalis*, o fungo *Candida albicans* e ambos associados.

## ii. Material e Métodos

O presente estudo experimental é composto por duas fases, uma primeira fase de revisão bibliográfica e uma segunda pela realização de um protocolo experimental.

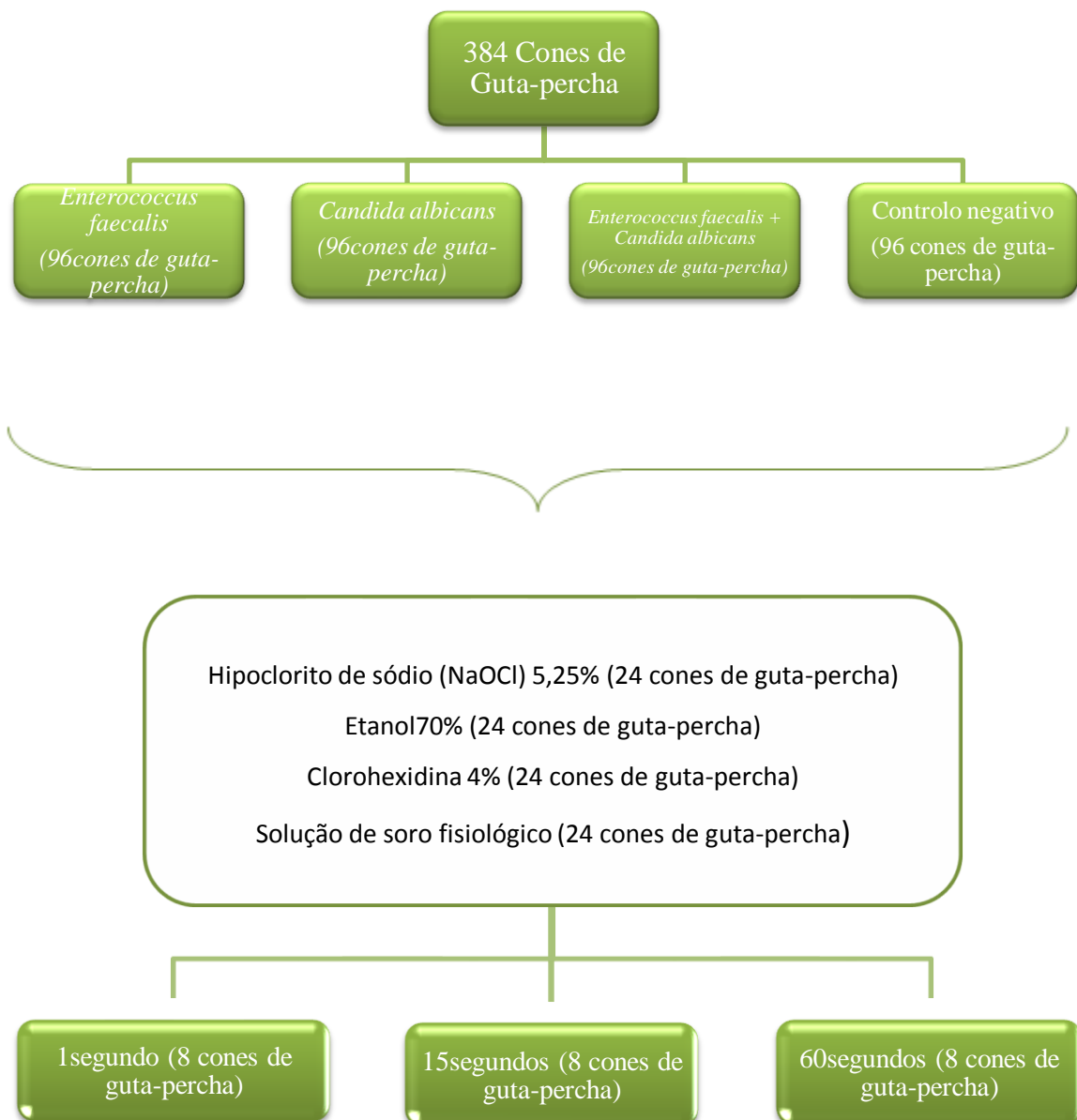
Na primeira fase da revisão foi efetuada com base numa pesquisa *on-line*, nos motores de busca *b-On*, *National Library of Medicine's PubMed Database* e *Scielo*, com as palavras-chave: “*gutta percha*”; “*decontamination in endodontics*”; “*disinfection in endodontics*”; “*root canal irrigants*”; “*endodontics microbiology*”; “*Candida albicans*”; “*Enterococcus faecalis*”, “*sodium hypochlorite*”, “*chlorhexidine*” e “*alcohol*”. Foram selecionados artigos publicados em inglês e português, com os limites temporais entre 2000 e 2014, que se encontravam disponíveis, nas bibliotecas da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade Fernando Pessoa (FCS-UFP) e na biblioteca da Faculdade de Medicina Dentária da Universidade do Porto (FMDUP). Também foi realizada uma pesquisa em livros desde o ano 2001 até 2011. A pesquisa decorreu entre Maio de 2014 e Julho de 2014. Como critérios de exclusão foram considerados artigos de modelo experimental animal, ou que o seu foco principal não se encontrava diretamente relacionados com o tema em questão.

A segunda parte consistiu num estudo experimental com principal propósito, sugerir um protocolo de desinfecção imediata dos cones de guta-percha, de modo a ser incorporado no tratamento endodôntico. Assim este ensaio de investigação *in vitro*, avaliou o efeito de três diferentes desinfetantes químicos, como o hipoclorito de sódio a 5,25%, a

cloro-hexidina a 2% e o etanol a 70%, na bactéria *Enterococcus faecalis* e o fungo *Candida albicans*, em diferentes períodos de tempo, que variam entre o um segundos e o um minuto.

### iii. Tipologia de estudo e caracterização da amostra

Este estudo *in vitro* é do tipo experimental controlado e foi realizado nos laboratórios da FCS-UFP. Assim foram utilizados, 384 cones de guta-percha de calibre 80 e da marca Dentsply.



#### **iv. Hipóteses em Estudo**

O presente estudo teve como principal objetivo avaliar a capacidade de desinfecção do hipoclorito de sódio 5,25%, da clorhexidina 2% e do etanol 70%, nos cones de guta-percha, depois de contaminados *Enterococcus faecalis*, *Candida albicans* e ambos os microrganismos associados.

Foram equacionadas as seguintes hipóteses:

1) Para os desinfectantes:

- H0: Não há diferenças significativas na capacidade de desinfecção do hipoclorito 5,25%; Etanol 70%; Clorhexidina 2% e do soro fisiológico.
- H1: Há diferenças significativas na capacidade de desinfecção usando o Hipoclorito de sódio 5,25%; Etanol 70%; Clorhexidina 2% e soro fisiológico.

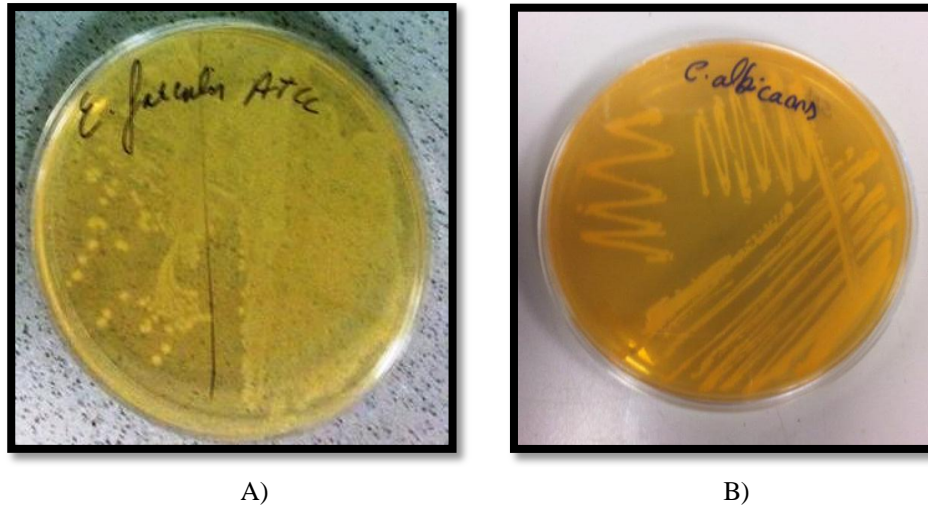
2) Para os tempos de desinfecção:

- H0: Não diferenças significativas nos tempos de desinfecção 1s; 15s e 60s.
- H1: Há diferenças significativas tempos de desinfecção 1s; 15s e 60s.

#### **v. Protocolo Experimental**

##### **v.i Preparação de meios de cultura**

A primeira fase deste estudo caracterizou-se pela obtenção de diferentes culturas microbianas onde se vão cultivar a bactéria *Enterococcus faecalis* e o fungo *Candida albicans*, utilizou-se o meio BHI (*Brain Heart Infusion*) agar para crescimento, controlados através do sistema API. Estas culturas, tiveram um período de incubação de 72h, numa estufa a 37°C.



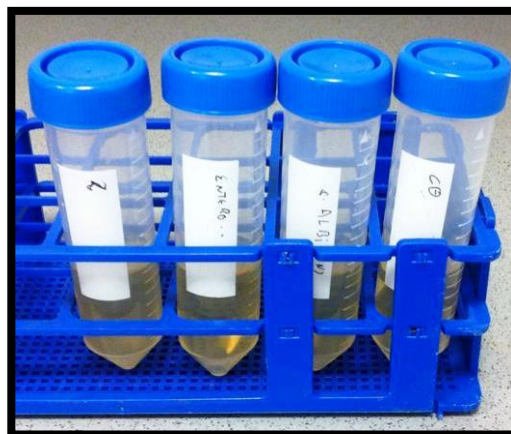
**Figura 1** – A) *E. faecalis* em meio BHI agar B) *C. albicans* em meio BHI agar.

▪ **Meios de cultura em BHI líquido:**

Após o crescimento das culturas, preparam-se quatro tubos de ensaio, para a inoculação das diferentes culturas (em meio BHI líquido):

- a bactéria *Enterococcus faecalis* ATCC n°29212;
- o fungo *Candida albicans* isolado clínico;
- a bactéria *Enterococcus faecalis* e o fungo *Candida albicans*;
- Controlo negativo;

Estes tiveram um período de incubação de 24h, para posteriormente contaminar os cones de guta-percha.



**Figura 2** – Inoculação das culturas microbianas: *E. faecalis*, *C. albicans*, ambas associadas e controlo negativo em meio BHI líquido.

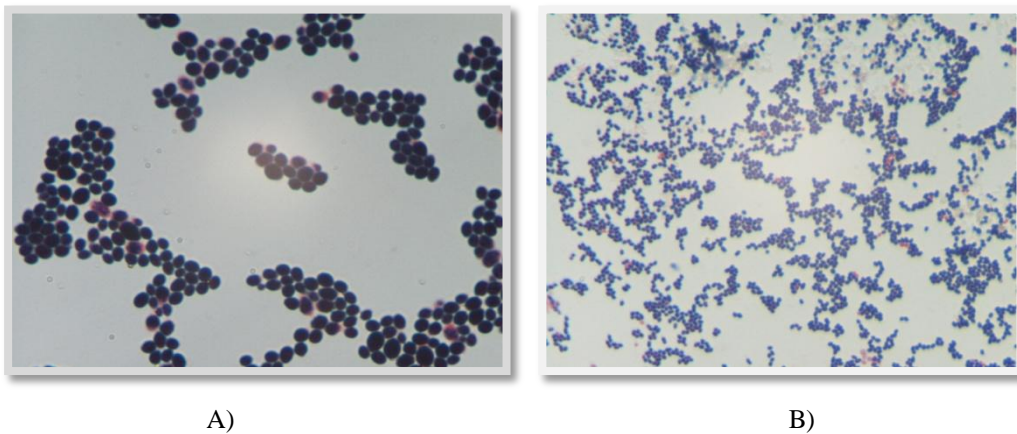
## v.ii Identificação e protocolo de pureza

Durante esta fase realizou-se um teste de identificação de espécie e controlo. Para tal foram retirados 200 microlitros de cada uma das culturas. Fez-se o crescimento de cada espécie em placa.

Os testes confirmativos foram realizados, utilizando, Bile-esculina para *E.faecalis* e o teste API 20 STREP. O do tubo germinativo para *C.albicans* e o API ID 32C. Realizaram-se também colorações Gram, testes de oxidase e catalase para identificação.

### ▪ Testes de Gram

A coloração de Gram, é uma técnica de identificação bacteriana que tem dois grandes grupos de reação a coloração (bactérias Gram-positivo e Gram-negativo), estas associadas a sua morfologia, permite uma orientação para a sua identificação. Esta técnica utiliza principalmente dois tipos de corantes diferentes o cristal violeta/safranina ou a fucsina básica, sendo que os grupos bacterianos que coram de roxo são Gram positivo e os que coram de vermelho Gram negativo (Ferreia *et al.*, 2010).



**Figura 3** – Fotografias de coloração Gram A) Coloração de gram com *Candida Albicans*  
B) *Enterococcus faecalis* (gram negativo)

- **Prova de Oxidase e Catalase**

Este é um teste de elevada importância para a identificação de bactérias. A deteção da catalase realiza-se ao mergulhar as células bacterianas numa gota de peróxido de hidrogénio a 3% (10 volumes), em que ocorre a libertação gasosa de O<sub>2</sub> (catalase positivo), caso não ocorra libertação (catalase negativo).

Enquanto que a deteção da *oxidase* (citocromo c oxidase) faz-se ao colocar as células bacterianas em contacto com uma solução de um indicador de óxido – redução (tetramil-p-fenildiamina). Este indicador é incolor na forma reduzida e ao ser oxidado pelo citocromo oxidase adquire a cor púrpura, ou seja, oxidase (+). O não aparecimento desta cor, significa oxidase (-) (Sousa *et al.*, 2005).

- **API (automatic profile index)**

O sistema API é um teste de identificação semi-automática de estrirpes, que tem como vantagem utilizar um número elevado de substratos, tornado possível identificar espécies (Ferreia *et al.*, 2010).

Os diversos meios de cultura estão introduzidos em diferentes cúpulas de uma galeria plástica, no estado desidratado. Prepara-se uma suspensão bacteriana que vai ser dispensada em cada poço da galeria. As galerias ficam a incubar por um período de 24h a 37°C. Ocorre uma metabolização dos substratos, que se tornam evidentes por reações colorimétricas ou por turvação, consoante o tipo de galerias. As leituras podem ser feitas manualmente ou automaticamente. E o perfil numérico dos resultados obtidos é reconhecido em computador com *software* adequado, tornando possível a identificação de enterobactérias (Sousa *et al.*, 2005).

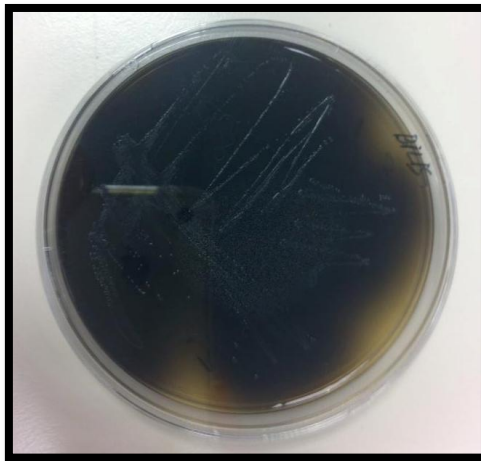
- **Teste do tubo germinativo**

O tubo germinativo é um método laboratorial padrão para a identificação de *Candida albicans*. Este é executado suspendendo-se uma pequena porção da colónia num tubo com 0,5 ml de soro fisiológico. O teste leva a produção de um tubo germinativo por um

período de duas a três horas a uma temperatura de 37°C. Posteriormente observa-se ao microscópio, e o resultado é positivo quando há a formação de blastósporos em forma de globo ou ovais, apresentando tubos germinativos (Siqueira *et al.*, 2004).

#### ▪ **Teste de Bile-esculina**

O Agar Bile-Esculina é um meio diferencial para isolamento de *Enterococcus*. Para realizar este teste inocula-se o meio por espalhamento e incuba-se a cerca de 37°C por um período de dezoito a vinte e quatro horas. Quando o resultado é positivo os organismos hidrolisam o glicosídeo esculina para esculetina e dextrose. Assim a esculetina reage com o citrato férrico e formam um complexo marrom escuro ou preto (Ferreia *et al.*, 2010).



**Figura 4** – Teste de Bile-esculina para o *E. faecalis*

#### ▪ **Escala de Macfarland**

A equivalência Standards McFarland é utilizada para ajustar as densidades de suspensões bacterianas.

Os tubos de McFarland padrão contêm partículas de látex em suspensão num tampão especial que são ajustadas para uma faixa de transmissão aceitável utilizando um espectrofotômetro a um comprimento de onda de 600 ou seja 625 nm. A suspensão bacteriana, uma vez ajustado para o mesmo turbidez de um padrão McFarland produz

esperado contagens de placas bacterianas e pode ser usada em uma variedade de identificação ou de susceptibilidade conjuntos e métodos (Pro-Lab Diagnostics, 2012).

**Quadro 4** – Equivalência Standards McFarland para CFU's  
(Pro-Lab Diagnostics, 2012)

McFarland Standard	Approximate Cell Count Density (x10 <sup>8</sup> cells)
0.5	1.5
1.0	3.0
2.0	6.0
3.0	9.0
4.0	12.0

### v.iii Contaminação dos cones de guta-percha

Posteriormente, as amostras dos 4 grupos em estudo, (*Enterococcus faecalis*, *Candida albicans* e uma terceira cultura em que ambas estão associadas) e um grupo de controlo, foram ajustados a uma concentração de 0,5 Macfarland com soro fisiológico. Cada grupo foi composto por um total de 96 cones, colocados em tubos cónicos de 50 ml.

Mantiveram-se os cones em contacto com os meios bacterianos por um período de 48h, numa estufa a 37°C.



A)

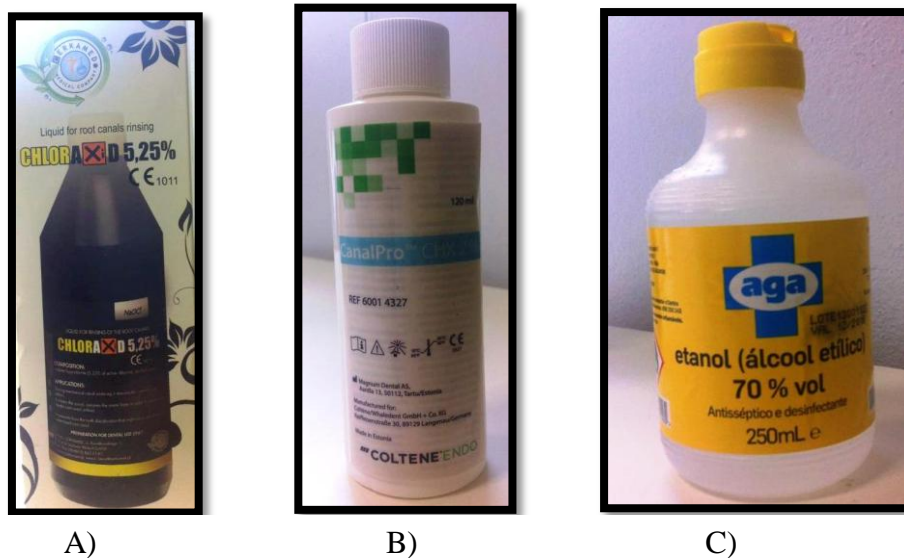


B)

**Figura 5** – A) Densitómetro (aparelho para determinar [] em escala McFarland B) Contaminação dos cones com *E.faecalis*, num tubo cónico de 50ml.

#### v.iv Descontaminação dos cones de guta-percha

O principal propósito foi descontaminar os cones de guta-percha com três diferentes soluções desinfetantes: hipoclorito de sódio (NaOCl) 5,25%, etanol 70%, clorohexidina 2%. Usou-se como solução de controlo positivo soro fisiológico.



**Figura 6** – Desinfetantes. A) Hipoclorito de sódio 5,25% CERKAMED; B) Clorohexidina 2% CanalPro; C) Etanol 70% aga.

Estes constituíram os quatro grupos de estudo, onde foram incluídos as culturas: *Enterococcus faecalis*, *Candida albicans*, uma terceira cultura em que ambas estão associadas e o grupo de controlo negativo. Cada cultura tem 96 cones, sendo que estes se dividem em 24 cones por cada um dos desinfetantes acima referidos. No total foram utilizados 384 cones de guta-percha.

Os cones foram submergidos, nos diferentes desinfetantes, em diferentes períodos de tempo: 1, 15 e 60 segundos e utilizaram-se 8 cones de guta-percha para cada um destes. De seguida, estes foram colocados em tubos Eppendorfs com soro fisiológico e homogeneizados no vortex durante 60 segundos. Após este processo, foram retirados 200 microlitros de cada Eppendorf, e procedeu-se ao seu espalhamento em placas de crescimento com meio BHI, e conseguinte incubação por um período de 48h, numa estufa a 37°C.



**Figura 8** – Cones de guta-percha colocados em Eppendorfs com soro fisiológico após homogeneizados no vortex

#### **v.v Análise quantitativa microbiana das amostras pós-desinfecção**

Por último, realizou-se a contagem de CFU's (Colony Forming Units) em cada uma das placas, de forma a concluir a eficácia de cada um dos desinfetantes.



**Figura 9** – Fotografaria do plaqueamento para contagem de CFU's

#### **vi. Análise estatística dos resultados**

A análise de dados foi elaborada com recurso ao Software Microsoft Excel 2010® e IBM® SPSS Statistics versão 22.0.

A descrição de variáveis foi realizada através de contagens absolutas (n) e médias. Note-se que foram assumidos valores próximos de 0 quando o nº de colônias era

inexistente e valores próximos de 300 sempre que o nº de colónias era elevado e impossível de ser contabilizado de acordo com o protocolado em estudos microbiológicos para metodologia experimental com estas características.

Foi aplicado o teste de Kolmogorov-Smirnov para testar a normalidade dos dados. Uma vez que estes seguem distribuição não normal, foram usados testes não paramétricos: teste de Kruskal-Wallis (mais de dois grupos) e Mann-Whitney (comparação de dois grupos). Todas as comparações foram efetuadas para um nível de significância 0,05.

**vii. Resultados**

**Tabela 1 – Média do nº de colónias**

Espécie			Tempo			Total	
			1 segundo	15 segundos	60 segundos		
<i>E. faecalis</i>	Hipoclorito 5,25%	Média	0,1	0,1	0,1	0,1	
		N	8	8	8	24	
	Etanol 70%	Média	10,0	0,1	0,1	3,4	
		N	8	8	8	24	
	Clorohexidina 2%	Média	0,1	0,1	0,1	0,1	
		N	8	8	8	24	
	Soro Fisiológico	Média	300,0	300,0	300,0	300,0	
		N	8	8	8	24	
	Total	Média	77,6	75,1	75,1	75,9	
		N	32	32	32	96	
	<i>C. albicans</i>	Hipoclorito 5,25%	Média	9,9	0,7	0,1	3,5
			N	8	8	8	24
Etanol 70%		Média	75,5	3,9	0,1	26,5	
		N	8	8	8	24	
Clorohexidina 2%		Média	1,9	0,1	0,1	0,7	
		N	8	8	8	24	
Soro Fisiológico		Média	300,0	300,0	300,0	300,0	
		N	8	8	8	24	
Total		Média	96,8	76,2	75,1	82,7	
		N	32	32	32	96	
<i>E. faecalis e C. Albicans</i>		Hipoclorito 5,25%	Média	43,3	9,9	0,1	17,7
			N	8	8	8	24
	Etanol 70%	Média	300,0	54,3	19,5	124,5	
		N	8	8	8	24	
	Clorohexidina 2%	Média	33,6	0,3	0,1	12,3	
		N	8	8	8	24	
	Soro Fisiológico	Média	300,0	300,0	300,0	300,0	
		N	8	8	8	24	
	Total	Média	160,8	91,1	79,9	110,6	
		N	32	32	32	96	
	Controlo	Hipoclorito 5,25%	Média	0,1	0,1	0,1	0,1
			N	8	8	8	24
Etanol 70%		Média	0,1	0,1	0,1	0,1	
		N	8	8	8	24	
Clorohexidina 2%		Média	0,1	0,1	0,1	0,1	
		N	8	8	8	24	
Soro Fisiológico		Média	0,1	0,1	0,1	0,1	
		N	8	8	8	24	
Total		Média	0,1	0,1	0,1	0,1	
		N	32	32	32	96	

▪ Análise descritiva

Os resultados obtidos, indicam que os melhores desinfetantes para descontaminação de cones de guta-percha são o hipoclorito de sódio 5,25% e a clorohexidina 2% (Gráfico 1).

Quanto à tabela 2, verifica-se que, para a espécie bacteriana *Enterococcus faecalis* os desinfetantes com melhor resultado são o hipoclorito de sódio 5.25% e a clorohexidina 2% (média=0,1), em todos os intervalos de tempo testados. Quanto ao etanol 70% apresenta contaminação no período de tempo de 1s (média=10,0) e de 0,1 nos períodos de tempo de 15s e 60s. De notar que quanto menor for o valor médio do nº de colónias, mais descontaminada se encontra a amostra.

**Tabela 2 – Média do nº de colónias da espécie *E. Faecalis***

		Tempo			
		1 segundo	15 segundos	60 segundos	Total
<b>Hipoclorito 5,25%</b>	Média	0,1	0,1	0,1	0,1
	N	8	8	8	24
<b>Etanol 70%</b>	Média	10,0	0,1	0,1	3,4
	N	8	8	8	24
<b>Clorohexidina 2%</b>	Média	0,1	0,1	0,1	0,1
	N	8	8	8	24
<b>Soro Fisiológico</b>	Média	300,0	300,0	300,0	300,0
	N	8	8	8	24
<b>Total</b>	Média	77,6	75,1	75,1	75,9
	N	32	32	32	96

Relativamente à tabela 3, verifica-se que, quando analisado o microorganismo *Candida albicans* o melhor desinfetante é a clorohexidina 2% nos tempos de 15s e 60s (média=0,1), assim como o hipoclorito de sódio 5,25% e o etanol 70% no tempo de 60s (média=0,1). Pode também verificar-se o nº médio de colónias diminui ao longo do tempo nos restantes tempos e desinfetantes. No total o agente desinfetante que obtém melhores resultados é a clorohexidina 2% (média= 0,7).

**Tabela 3 – Média do nº de colónias da espécie *C. Albicans***

		Tempo			Total
		1 segundo	15 segundos	60 segundos	
<b>Hipoclorito 5,25%</b>	Média	9,9	0,7	0,1	3,5
	N	8	8	8	24
<b>Etanol 70%</b>	Média	75,5	3,9	0,1	26,5
	N	8	8	8	24
<b>Clorohexidina 2%</b>	Média	1,9	0,1	0,1	0,7
	N	8	8	8	24
<b>Soro Fisiológico</b>	Média	300,0	300,0	300,0	300,0
	N	8	8	8	24
<b>Total</b>	Média	96,8	76,2	75,1	82,7
	N	32	32	32	96

Quando à análise para o melhor desinfetante, na associação das espécies *E. faecalis* e *C. albicans*, é a clorohexidina 2% e o hipoclorito de sódio 5,25% no período de tempo de 60s (média=0,1) que obtém melhores resultados. Deve-se ter em conta que a clorohexidina 2% aos 15s também obtém bons resultados (média=0,3). Relativamente ao hipoclorito de sódio 5,25% apresenta alguma contaminação no período de 1s (média=43,3) e de 15s (média=9,9). Quanto ao etanol a 70% o número médio de colónias é bastante elevado, nos três períodos de tempo testados, sendo a sua média total de 124,5. Apesar de este grupo apresentar resultados menos favoráveis, denota-se uma diminuição do número médio de colónias com o passar do tempo.

**Tabela 4 – Média do nº de colónias da espécie *E. faecalis* e *C. Albicans***

		Tempo			Total
		1 segundo	15 segundos	60 segundos	
<b>Hipoclorito 5,25%</b>	Média	43,3	9,9	0,1	17,7
	N	8	8	8	24
<b>Etanol 70%</b>	Média	300,0	54,3	19,5	124,5
	N	8	8	8	24
<b>Clorohexidina 2%</b>	Média	33,6	0,3	0,1	12,3
	N	8	8	8	24
<b>Soro Fisiológico</b>	Média	300,0	300,0	300,0	300,0
	N	8	8	8	24
<b>Total</b>	Média	160,8	91,1	79,9	110,6
	N	32	32	32	96

Relativamente à tabela 4, que nos serve de controlo negativo, pode verificar-se que em todos os desinfetantes, o número de colónias é aproximadamente zero, tal como seria de esperar.

**Tabela 5 – Média do nº de colónias do grupo de controlo negativo**

		Tempo			
		1 segundo	15 segundos	60 segundos	Total
<b>Hipoclorito 5,25%</b>	Média	0,1	0,1	0,1	0,1
	N	8	8	8	24
<b>Etanol 70%</b>	Média	0,1	0,1	0,1	0,1
	N	8	8	8	24
<b>Clorohexidina 2%</b>	Média	0,1	0,1	0,1	0,1
	N	8	8	8	24
<b>Soro Fisiológico</b>	Média	0,1	0,1	0,1	0,1
	N	8	8	8	24
<b>Total</b>	Média	0,1	0,1	0,1	0,1
	N	32	32	32	96

▪ Verificação de hipóteses em estudo

A aplicação do teste de Kruskal-Wallis revela que há diferenças estatisticamente significativas para os diferentes desinfetantes ( $p < 0,0001$ ). Feitas as comparações múltiplas recorrendo ao teste de Mann-Whitney (tabela 6) verifica-se que as diferenças estatisticamente significativas se encontram entre todos os desinfetantes ( $p < 0,0001$ ).

Verificam-se diferenças estatisticamente significativas entre o hipoclorito de sódio 5,25% e o etanol 70%. Pelas tabelas acima pode verificar-se que, ao fim de 1s, o etanol 70% é muito pouco eficaz enquanto que o hipoclorito de sódio 5,25% mostra uma eficácia maior. Relativamente à diferença estatisticamente significativa entre o hipoclorito de sódio 5,25% e a clorohexidina 2%, embora pelas tabelas acima se possa verificar que ao fim de 60s, o hipoclorito de sódio a 5,25% e a clorohexidina 2% sejam igualmente eficazes, nos tempos anteriores a clorohexidina 2% apresenta melhores resultados.

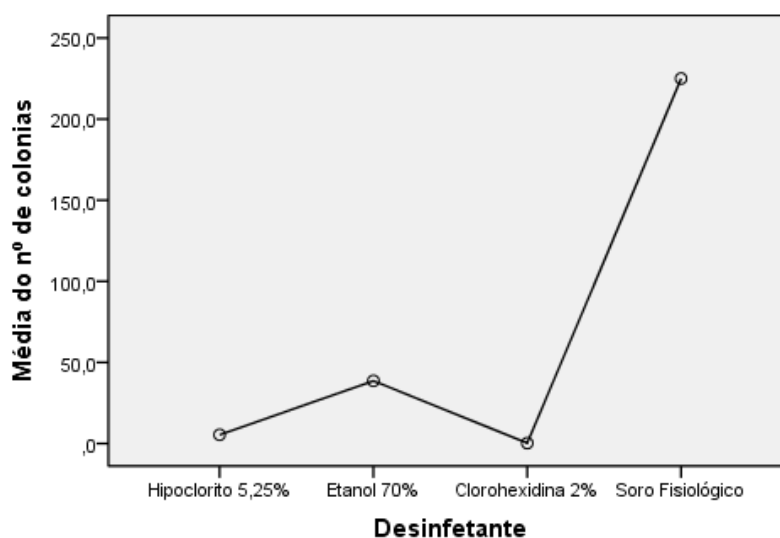
No que se refere à diferença estatisticamente significativa entre a clorohexidina 2% e o etanol 70%, pode observar-se igualmente que, ao fim de 1s, o nível de eficácia do etanol 70% é muito baixo em comparação com a clorohexidina.

Por fim, existem diferenças estatisticamente significativas entre o soro fisiológico e todos os outros desinfetantes, uma vez que o soro fisiológico apenas serviu de controlo

positivo e como se queria mostrar, o número de colônias ao fim de 60s continua exactamente igual.

**Tabela 6 – Comparações múltiplas entre desinfetantes**

Desinfetantes	Hipoclorito 5,25%	Etanol 70%	Clorohexidina 2%	Soro Fisiológico
Hipoclorito 5,25%	-	0,0001	0,0001	0,0001
Etanol 70%		-	0,0001	0,0001
Clorohexidina 2%			-	0,0001
Soro Fisiológico				-



**Gráfico 1 – Número médio de colónias por desinfetante**

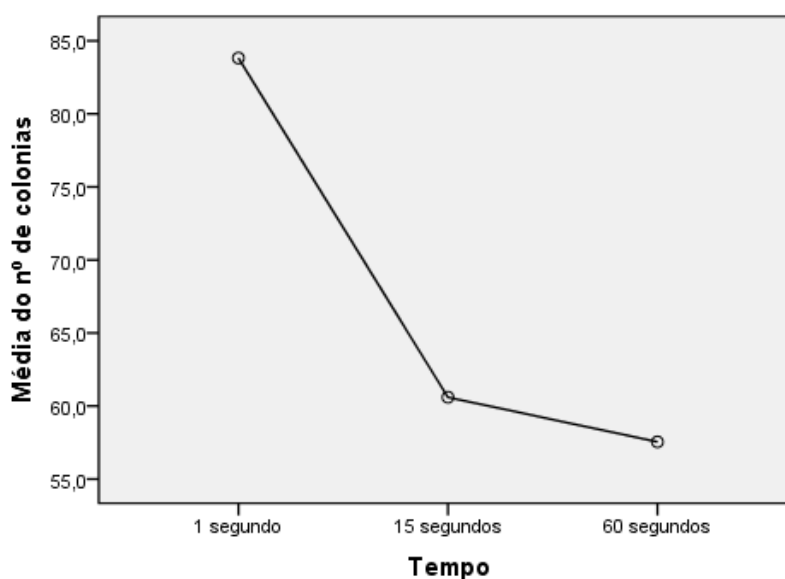
Tal como já comentado anteriormente, a figura acima mostra que o hipoclorito de sódio 5,25% e a clorohexidina 2% são os mais eficazes. Pode, desta forma, rejeitar-se a hipótese nula colocada de que os desinfetantes não apresentam diferenças estatisticamente significativas.

Relativamente ao fator tempo, após aplicado o teste de Kruskal-Wallis, verificam-se diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,001$ ). Feitas as comparações múltiplas recorrendo ao teste de Mann-Whitney (tabela 7), verifica-se que as diferenças se encontram entre todos os tempos estudados, sendo mais notória a diferença entre 1s e 60s. As diferenças estatisticamente significativas encontradas entre o 1s e os 15s e os 15s e 60s, têm em conta um intervalo de  $p < 0,05$ .

**Tabela 7 – Comparações múltiplas entre tempos**

Tempo	1 s	15 s	60 s
1 s	-	0,01	0,0001
15 s		-	0,04
60 s			-

Pela figura 2 pode verificar-se que quanto maior for o tempo de desinfeção, menor é o nº de colónias observadas.



**Gráfico 2** – Número médio de colónias por tempo

Com o presente estudo pode rejeitar-se as hipóteses nulas colocadas. Neste sentido, conclui-se que o hipoclorito de sódio 5,25% e o clorhexidina 2% são os desinfetantes mais eficazes e que quanto maior for o tempo de desinfeção, menos contaminação apresentará a amostra.

## 7. Discussão

O presente estudo teve como principal objetivo avaliar de forma quantitativa o efeito bactericida da *E.faecalis*, *C. albicans* e de ambas associadas, em cones de guta-percha, utilizando diferentes soluções irrigantes: o hipoclorito de sódio 5,25%, a clorhexidina

2% e o etanol 70%. Em cada uma destas soluções, os cones de gutapercha estiveram a descontaminar em três períodos de tempo: 1s, 15s e 60s.

Em primeiro lugar, vamos explicar a metodologia aplicada para realizar este estudo *in vitro*. Em seguida, estabelecer comparações com os resultados obtidos pelo nosso estudo e os resultados obtidos por outros autores.

A amostra utilizada, foi constituída no total por 384 cones de gutapercha, em primeiro lugar, esta dividiu-se em quatro grupos diferentes com 96 cones de gutapercha, que foram contaminados com *E. faecalis*, *C.albicans*, ambas associadas e um grupo controlo. Em seguida, subdividiu-se em 16 grupos de 24 cones de gutapercha, para cada uma das soluções irrigantes: o hipoclorito 5,25%, a clorhexidina 2%, o etanol 70% e soro fisiológico. Por ultimo, cada solução foi testada em três tempos diferentes: 1s, 15s e 60s, formando 48 grupos de 8 cones de gutapercha.

Nos estudos com metodologia semelhante a este, não há um consenso quanto ao número de cones gutapercha, necessários a utilizar, em que os valores das amostras variam, entre os 3042 e os 60 cones de gutapercha (Cardoso *et al.*, 2000; Souza *et al.*,2003; Gomes *et al.*, 2005; Nabeshima *et al.*, 2010; Salvia *et al.*, 2010; Subba *et al.*, 2013).

Os microrganismos como a *E. faecalis* e o *C.albicans*, estão associados a infeções persistentes no sistema de canais radiculares, deste modo caracterizam-se pela sobrevivência ao TENC, estando por isso associadas ao fracasso do mesmo (Aravind *et al.*, 2006; Rhodes, 2006; Narayanan & Vaishnagi, 2010)

Para além da *E. faecalis* e do *C. albicans*, vários microrganismos estão associados ao insucesso do tratamento endodôntico não cirúrgico, por esse motivo, os estudos relacionados com a desinfecção dos cones de gutapercha utilizam diferentes microrganismos, tais como: *E. faecalis*, *B. subtilis*, *C. albicans*, *S. aureus*, *S. sanguis*, *S. mutans*, *B. subtilis* e *E. coli* (Cardoso *et al.*, 2000; Souza *et al.*, 2003; Gomes *et al.*, 2005; Nabeshima *et al.*, 2010; Salvia *et al.*, 2010; Subba *et al.*, 2013).

As soluções irrigantes são imprescindíveis durante o tratamento endodôntico, devido ao seu efeito antimicrobiano. A escolha da solução ideal depende da sua ação contra os agentes microbiotas presentes no canal radicular e do seu efeito biológico nos tecidos periapicais. De forma a reduzir as infecções endodônticas e contribuir para a desinfecção dos canais radiculares, pode se ter em conta as seguintes soluções irrigantes: hipoclorito de sódio, clorohexidina, EDTA, ácido cítrico e MTAD. No entanto, o hipoclorito de sódio e a clorohexidina são os agentes antimicrobianos mais indicados nos protocolos do TENC, de acordo com a informação presente na literatura científica atual. (Estrela *et al.*, 2013).

Para se realizar o protocolo de descontaminação de cones de guta-percha *chair side*, são necessárias soluções irrigantes, assim os vários estudos testaram soluções em diversas concentrações, tais como: gluteraldaído, hipoclorito de sódio, etanol, clorohexidina, peróxido de hidrogénio, ácido periacético e idopovidona (Cardoso *et al.*, 2000; Souza *et al.*, 2003; Gomes *et al.*, 2005; Nabeshima *et al.*, 2010; Salvia *et al.*, 2010; Subba *et al.*, 2013).

Quanto ao fator tempo, os estudos semelhantes revelam resultados de descontaminação no período de um minuto, principalmente com hipoclorito de sódio a 5,25% e com clorohexidina 2%, no entanto os intervalos de tempo testados, variaram em períodos desde os três segundos aos 45 minutos (Cardoso *et al.*, 2000; Souza *et al.*, 2003; Gomes *et al.*, 2005; Nabeshima *et al.*, 2010; Salvia *et al.*, 2010; Subba *et al.*, 2013).

Num estudo realizado por Subba *et al.* (2013), foram contaminados 128 cones de guta-percha, com *E.faecalis* e *Bacillus subtilis*, no qual não se registaram diferenças significativas na descontaminação das amostras. Quanto aos desinfetantes utilizados, tanto no período de um minuto como de cinco minutos, a clorohexidina a 2% foi o agente desinfetante que apresentou melhores resultados. Este estudo corrobora os resultados em relação a utilizar a clorohexidina a 2% na descontaminação de cones de guta-percha, pois esta foi eficaz em eliminar todas as culturas utilizadas neste estudo, incluindo *E.faecalis*, num período de um minuto com um significado estatístico de  $p < 0,001$ .

Segundo Nabeshima *et al.* (2010) a clorohexidina a 2% não demonstrou crescimento bacteriano em cones de guta-percha, quando contaminados com *E.faecalis* e saliva no período de um e dez minutos. Neste estudo utilizou-se o teste de Kruskal-wallis que revelou uma significância entre grupos ( $P=0,01$ ). No que diz respeito a utilização da clorohexidina a 2%, no período de um minuto para descontaminar os cones de guta-percha com *E.faecalis*, este estudo encontra-se de acordo com o nosso, contudo os nossos resultados apresentam uma significância  $p<0,001$ .

Gomes *et al.* (2005), comparou a utilização de clorohexidina (nas concentrações de 0,2%; 1,0% e 2,0%) e hipoclorito de sódio (nas concentrações de 0,5%; 1,0%; 2,5% e 5,25%) e concluiu que o NaOCl a 5,25% elimina espécies esporuladas dos cones de guta-percha no período de um minuto. Neste estudo constatou-se, também, que o hipoclorito a 5,25% consegue eliminar *C. albicans* e *E.faecalis* em 45 segundos, e que a clorohexidina 2% consegue eliminar os mesmos microrganismos num período de 15s, com uma significância de  $p <0,05$ . Isto corrobora os resultados apresentados pelo nosso estudo em que a clorohexidina 2% aos 15 segundos consegue eliminar a *E.faecalis* e o *C.albicans*, com uma significância de  $p<0,001$ .

Num estudo realizado por Souza *et al.* (2003), constatou-se que o hipoclorito de sódio com concentração de 5,25% descontamina os cones de guta-percha de forma eficiente, na presença de *E.faecalis* e *C.albicans*, num período de quinze e quarenta e cinco segundos. Quanto ao *E.faecalis* este estudo encontra-se de acordo com o nosso relativamente ao período de 15s, ao contrário de *C. albicans* em que os cones de guta-percha apresentam ligeira contaminação.

No que diz respeito ao etanol a 70%, num estudo de Cardoso *et al.* (2000), conclui-se que após um minuto em contacto com os cones de guta-percha, este apresenta características bactericidas. No entanto, quando os cones estão contaminados com microrganismos com esporos, este desinfetante não os elimina, mesmo actuando durante 15 minutos. Assim como no nosso estudo, os cones de guta-percha quando contaminado com a bactéria *E.faecalis*, depois de descontaminados por um período de um minuto pela solução de etanol a 70%, apresenta efeitos bactericidas.

No presente estudo verificou-se que ambos os agentes desinfetantes conseguem eliminar a bactéria *E.faecalis*, nos períodos de tempo de 1s, 15s e 60s. Com a exceção do etanol 70%, que no 1s apresentou uma ligeira contaminação bacteriana, como demonstrado na tabela 2.

Quanto ao fungo *C. albicans*, o hipoclorito de sódio 5,25% e a clorohexidina 2% apresentam uma ligeira contaminação no período de 1s, enquanto que nos períodos de 15s e 60s não apresenta contaminação. No etanol 70% apenas apresenta completa descontaminação no período de 60s, como se pode ver na tabela 3.

Na associação de *E. faecalis* com *C. albicans*, apenas apresentam resultados de completa descontaminação o hipoclorito de sódio 5,25% nos 60s e a clorohexidina 2% nos 15s e 60s. O etanol 70% apresentou contaminação em todos os períodos de tempo, como se pode confirmar na tabela 4.

Todos os grupos controlo em que se utilizou o soro fisiológico, confirmam o crescimento dos microrganismos pretendido como se pode ver na tabela 1, 2 e 3. Na tabela 5 verifica-se que os cones de guta-percha posteriormente a sua contaminação, não tiveram crescimento de microrganismos, de modo a evitar a contaminação com outros agentes microbianos, que não os utilizados neste estudo.

Os agentes desinfetantes utilizados apresentam diferenças significativas de  $p < 0,001$ , no período de 60s hipoclorito de sódio 5,25% e a clorohexidina 2% foram igualmente eficazes, nos tempos anteriores a clorohexidina 2% apresentou melhores resultados.

O factor tempo neste estudo apresenta diferenças significativas, quando se faz a comparação entre o 1 s e os 60s com um  $p < 0,001$ . Em relação aos 15 s entre o 1s e os 60s, há uma diferença significativa de  $p < 0,05$ .

### III. Conclusão

No que diz respeito à conclusão, esta consistirá numa auto-crítica, na sua parte inicial, referente às limitações inerentes a este trabalho e, seguidamente abordar-se-à os principais objetivos deste estudo e as conclusões retiradas.

Relativamente às limitações inerentes a este estudo, estas estão principalmente relacionadas com o facto de existir um número mais abrangente de bactérias associadas ao insucesso do TENC, utilizar diferentes períodos de tempo, assim como outros desinfetantes em diversas concentrações. A análise de microorganismos associados a cones de guta-percha já utilizados em ambiente clínico iria fornecer uma informação mais fiável acerca das bactérias associadas aos cones de guta-percha no momento da sua colocação nos canais radiculares.

Quanto à metodologia aplicada no protocolo laboratorial, estão associadas algumas complicações, como um controlo rigoroso dos tempos aplicados, a adsorção de descontaminantes nos cones de guta-percha e os erros inerentes ao operador.

A contagem de colónias selecionada, foi executada através do método de espalhamento. Este não permite detetar a presença de microorganismos agregados aos cones de guta-percha diretamente dos mesmos após sujeitos ao processo de desinfecção, pelo que foi necessário recorrer ao dito método de espalhamento em placas.

Tendo em conta os principais objetivos deste estudo e os parâmetros utilizados para a realização do mesmo, parece poder-se concluir que:

- Os cones de guta-percha quando contaminados com *E.faecalis* todas as soluções utilizadas no estudo, os desinfetaram nos diferentes tempos com exceção no etanol no período de 1s que apresentou uma ligeira contaminação.
- Quando os cones de guta-percha são contaminados com *C.albicans* , no período de 1s todos as soluções apresentam uma ligeira contaminação, no período de 15s e 60s os resultados são aproximadamente 0 o que significa que estas soluções são eficazes na desinfecção.

- Os resultados apresentados quando se associam os dois microrganismos *E. faecalis* e *C.albicans*, apenas apresentam completa desinfecção no hipoclorito aos 60s e na clorohexidina nos 15s e 60s, quanto aos restantes tempos apresenta ligeira contaminação. É de notar que o etanol 70% é ineficaz quando utilizado para desinfetar esta amostra, pois apresentou valores elevados de contaminação.
- Quanto as soluções utilizadas há diferenças significativas ( $p < 0,0001$ ) entre o hipoclorito de sódio 5,25%, clorohexidina 2%, etanol a 70% e em relação ao grupo controlo (soro fisiológico).
- Nos tempos utilizados estatisticamente apresentaram-se diferenças significativas ( $p < 0,001$ ) entre utilizar 1s e os 60s. E existem diferenças significativas de  $p < 0,05$  entre utilizar os 1s e os 15s assim como em utilizar os 15s e os 60s.

Face ao exposto podemos concluir que o tempo de 60s é o mais eficaz na desinfecção de cones de guta-percha, assim como as soluções mais indicadas para o mesmo são a clorohexidina a 2% e o hipoclorito de sódio a 5,25%, pois quando associado o *C. albicans* e a *E. faecalis*, foi com estes factores que apresentou melhores resultados.

Tendo em conta que a as infeções persistentes, são um dos fatores mais relevantes para o insucesso do TENC, torna-se pertinente tornar todo este protocolo o mais asséptico possível, deste modo a descontaminação dos cones de guta-percha antes de se realizar a obturação pode diminuir a probabilidade de insucesso do TENC.

Apesar das limitações do estudo, o objetivo principal passou pelo conhecimento dos desinfetantes assim como pela interferência que o fator tempo tem na desinfecção de cones de guta-percha, na presença de *C.albicans*, *E.faecalis* e ambas as culturas associadas.

A desinfecção dos cones guta-percha ainda não está adequadamente esclarecida, pelo que é fundamental a realização de futuras investigações sobre o tema. Associando mais fatores em estudo como: desinfetantes em diferentes concentrações, e os efeitos que estes podem provar nos cones de guta-percha, também deviam ser utilizados outras espécies microbianas associadas ao insucesso do TENC, assim como testar outros

períodos de tempo, de forma a concluir-se qual o tempo mínimo e a solução mais indicada para o processo de desinfecção dos cones de guta-percha.

#### IV. Bibliografia

1. Aravind, V., Kandaswamy, D., Jeyavel, R. (2006). Comparative evaluation of the antimicrobial efficacy of five endodontic root canal sealers against *Enterococcus faecalis* and *Candida albicans*. *Journal of Conservative Dentistry*, volume 9, nº1, pp.2-12.
2. Atila-Pektaş, B. *et al.* (2013). Antimicrobial effects of root canal medicaments against *Enterococcus faecalis* and *Streptococcus mutans*. *International Endodontic Journal*, volume 46, nº5, pp. 413-418.
3. Baumgartner, J., Watts, C., Xia, T. (2000). Occurrence of *Candida albicans* in infections of endodontic origin. *Journal of Endodontic*, volume 26, nº12, pp. 695-698.
4. Bergenholtz, G., Bindslev, P. e Reit, C. (2010). *Textbook of Endodontology*. Reino Unido, Wiley-Blackwell.
5. Cardoso, C. *et al.* (2000). Effectiveness of different chemical agents in rapid decontamination of gutta-percha cones. *Brazilian Journal of Microbiology*, volume 31, nº1, pp. 67-71.
6. Castellucci, A. (2005). *Endodontics, Volume 2*. Florence, IL Tridente.
7. Chávez, L. (2007). Redefining the persistent infection in root canals: possible role of biofilm communities. *Journal of Endodontics*, volume 33, nº6, pp.652-662.
8. Dornelles-Morgental, R. *et al.* (2011). Antibacterial efficacy of endodontic irrigating solutions and their combinations in root canals contaminated with *Enterococcus faecalis*. *Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology and Endodontics*, volume 112, nº3, pp.396-400.
9. European Society of Endodontology (2006), Quality guidelines for endodontic treatment:consensus report of the European Society of Endodontology.*International Endodontic Journal*, volume 39, pp. 921–930.
10. Eldeniz, A., Guneser, M., Akbulut, M. (2013). Comparative antifungal efficacy of light-activated disinfection and octenidine hydrochloride with contemporary endodontic irrigants. *Lasers in Medical Science*. [Em Linha]. Disponível em <http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs10103-013-1387-1> [Consultado em 04/07/2014].
11. Estrela, C. *et al.* (2014). Characterization of successful root canal treatment. *Brazilian Dental Journal*, volume 25, nº1, pp.3-11.

12. Estrela, C. *et al.* (2008). Efficacy of sodium hypochlorite and chlorhexidine against *Enterococcus faecalis*-a, systematic review. *Journal of Applied Oral Science*, volume 16, nº6, pp. 364-368.
13. Ferguson, J., Hatton, J., Gillespie, M. (2002). Effectiveness of intracanal irrigants and medications against the yeast *Candida albicans*. *Journal of Endodontics*, volume 28, nº2, pp.68-71.
14. Ferreira, D., Prado, M. & Simão, R. (2012). Effect of Desinfection Solutions on the Adhesion Force of Root Canal Filing Materials. *Journal of Endodontics*, volume 38, nº6, pp. 853-855.
15. Ferreira, W., Sousa J. & Lima, N. (2010). *Microbiologia*. Lisboa, LIDEL.
16. Gomes, B. *et al.* (2005). Disinfection of gutta-percha cones with chlorhexidine and sodium hypochlorite. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*, volume 100, pp. 512-517.
17. Gomes, B. *et al.* (2013). Chlorhexidine in endodontics. *Brazilian Dental Journal*, volume 24, nº2, pp. 89-102.
18. Haapasalo, M. *et al.* (2005). Eradication of endodontic infection by instrumentation and irrigation solutions. *Endodontic Topics*, volume 10, nº 1, pp. 77-102.
19. Haapasalo, M. *et al.* (2010). Irrigation in endodontics. *Dental Clinics of North America*, volume 54, nº2, pp.291-312.
20. Hargreaves, K. & Cohen, S. (2011). *Cohen Caminhos da Polpa, 10ª edição*. Rio de Janeiro, Mosby Elsevier.
21. Iqbal, A., (2012). Antimicrobial irrigants in the endodontic therapy. *International Journal of Health Sciences*, volume 6, nº 2, pp. 186-192.
22. Lana, M. *et al.* (2001). Microorganisms isolated from root canals presenting necrotic pulp and their drug susceptibility in vitro. *Oral Microbiology and Immunology*, volume 16, nº 2, pp.100-105.
23. Love, R. *et al.* 2001. *Enterococcus faecalis*-a mechanism for its role in endodontic failure. *Internacional Endodontic Journal*, volume 34, nº5, pp.399-405.
24. Luddin, N. & Ahmed, H. (2013). The antibacterial activity of sodium hypochlorite and chlorhexidine against *Enterococcus faecalis*: A review on agar diffusion and direct contact methods. *Journal of Conservative Dentistry*, volume 16, nº1, pp. 9-16.
25. Mohammadi, Z., (2008). Sodium hypochlorite in endodontics: an update review. *International Dental Journal*, volume 58, nº6, pp. 329-341.
26. Mohammadi, Z. & Abbott, P. (2009). The properties and applications of

- chlorhexidine in endodontics. *International Endodontic Journal*, volume 42, nº4, pp. 288-302.
27. Mohammadi, Z., Shalavi, S., Yazdizadeh, M. (2012). Antimicrobial activity of calcium hydroxide in endodontics: a review. *Chonnam Medical Journal*, volume 48, nº3, pp. 133-140.
28. Motta, P. (2001). Efficacy of chemical sterilization and storage conditions of gutta-percha cones. *International Endodontic Journal*, volume 34, pp. 435-439.
29. Murray, P. *et al* (2007). *Manual of Clinical Microbiology*, 9<sup>th</sup> edition. Washington, Library of Congress Cataloging .
30. Nabeshima, C. *et al.* (2011). Effectiveness of different chemical agents for disinfection of gutta-percha cones. *Australian Endodontic Journal*, volume 37, nº3, pp. 118-121.
31. Narayanan, L. & Vaishnavi, C. (2010). Endodontic microbiology. *Journal of Conservative Dentistry*, volume 13, nº4, pp. 233-239.
32. Oliveira, D. *et al.* (2007). In vitro antibacterial efficacy of endodontic irrigants against *Enterococcus faecalis*. *Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology and Endodontics*, volume 103, nº5, pp. 702–706.
33. Ozalp, N., Okte, Z. & Ozcelik, B., (2006). The rapid sterilization of gutta-percha cones with sodium hypochlorite and glutaraldehyde. *Journal of Endodontics*, volume 32, nº 12, pp. 1202-1204.
34. Pang, N. *et al.* (2007). Effects of short-term chemical disinfection of gutta-percha cones: identification of affected microbes and alterations in surface texture and physical properties. *Journal of Endodontics*, volume 33, nº5, pp.594-598.
35. Pinheiro, E. *et al.* (2000). *Investigação de bacterias associadas ao insucesso do tratamento endodontico*. Piracicaba SP.
36. Pereira, O. & Siqueira, J. (2010). Contamination of gutta-percha and Resilon cones taken directly from the manufacturer. *Clinical Oral Investigations*, volume 14, pp. 327-330.
37. Portenier, I., Waltimo, T. & Haapasalo, M. (2003). *Enterococcus faecalis*– the root canal survivor and “star” in post-treatment disease. *Endodontic Topics*, volume 6, nº1, pp. 135-159.
38. Prado, M. *et al.* (2011). Effect of disinfectant solutions on the surface free energy and wettability of filling material. *Journal of Endodontics*, volume 37, nº7, pp. 980-982.

39. Prado, M. *et al.* (2011). The importance of final rinse after disinfection of gutta-percha and Resilon cones. *Oral Surgery Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontics*, volume 111, nº6, pp.21–24.
40. Prado, M. *et al.* (2012). Effect of disinfectant solutions on gutta-percha and resilon cones. *Microscopy Research and Technique*, volume 75, nº 6, pp.791–795.
41. Pro-Lab Diagnostics (2012). Mcfarland Standards [em linha]: <http://www.pro-lab.com/inserts/McFarland.pdf>. [Consultado em 04/07/2014].
42. Rhodes, J. (2006). *Advanced Endodontics Clinical Retreatment and Surgery*. Reino Unido, Taylor & Francis.
43. Royal, M., Williamson, A. & Drake, D. (2007). Comparison of 5.25% sodium hypochlorite, MTAD, and 2% chlorhexidine in the rapid disinfection of polycaprolactone-based root canal filling material. *Journal of Endodontics*, volume 33, nº1, pp. 42–44.
44. Sahinkesen, G. *et al* (2011). Evaluation of Residual Antimicrobial Effects and Surface Changes of Gutta-Percha disinfected with Different Solutions. *The Journal of Contemporary Dental Practice*, volume 12, nº1, pp. 47-51.
45. Sahli, C. & Aguadé, E. (2001). *Endodoncia Técnicas Clínicas y Bases Científicas*, 2ª edição. Masson Elsevier.
46. Short, R., Dorn, S. & Kuttler, S. (2003). The crystallization of sodium hypochlorite on gutta-percha cones after the rapid-sterilization technique: an SEM study. *Journal of Endodontics*, volume 29, nº10, pp. 670-673.
47. Salvia, A. *et al.* (2011). Effectiveness of 2% peracetic acid for the disinfection of gutta-percha cones. *Brazilian Oral Research*, volume 25, nº1, pp.23 -27.
48. Siqueira, J. *et al.* (2001). Antifungal effects of endodontic medicaments. *Australian Endodontic Journal*, volume 27, nº3, pp. 112-114.
49. Siqueira, J. *et al.* (2002). Actinomyces species, streptococci, and Enterococcus faecalis in primary root canal infections. *Journal of Endodontics*, volume 28, nº3, pp. 168-172.
50. Siqueira, J. *et al.* (2003). Elimination of Candida albicans infection of the radicular dentin by intracanal medications. *Journal of Endodontics*, volume 29, nº8, pp. 501-504.
51. Siqueira, J. & Sen, B. (2004). Fungi in endodontic infections. *Oral Surgery Oral Medicine, Oral Pathology Oral Radiology and Endodontics*, volume 97, nº5, pp. 632-641.

52. Siqueira, J. & Rôças, I. (2008). Clinical Implications and Microbiology of Bacterial Persistence after treatment Procedures. *Journal of Endodontics*, volume 34, nº11, pp. 1291-1301.
53. Song, M. *et al.*(2011). Analysis of the Cause of Failure in Nonsurgical Endodontic Treatment by Microscopic Inspection during Endodontic Microsurgery. *Journal of Endodontics*, volume 37, nº11, pp. 1516-1519.
54. Sousa, J., Cerqueira F. & Abreu, C. (2005). *Microbiologia protocolos laboratorias*. Porto, edições Universidade Fernando Pessoa.
55. Souza, R. *et al.* (2003). In vitro evaluation of different chemical agents for the decontamination of gutta-percha cones. *Brazilian Oral Research*, volume 17, nº1, pp. 75-77.
56. Stuart, C. *et al.* (2006). Enterococcus faecalis: its role in root canal treatment failure and current concepts in retreatment. *Journal of Endodontics*, volume 32, nº 2, 93-98.
57. Subha, N., *et al.* (2013). Efficacy of peracetic acid in rapid disinfection of Resilon and gutta-percha cones compared with sodium hypochlorite, chlorhexidine, and povidone-iodine. *Journal of Endodontics*, volume 39, nº10, pp.1261–1264.
58. Topuz, Ö., *et al* (2011). Effects of sodium hypochlorite on gutta-percha and Resilon cones: an atomic force microscopy and scanning electron microscopy study. *Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology and Endodontics*, volume 112, nº4, pp. 21–26.
59. Tronstad, L.(2003). *Clinical Endodontics A Textbook*, second revised edition. Nova Iorque, Thiene.
60. Valera, M., Rego, J. & Jorge, A. (2001). Effect of sodium hypochlorite and five intracanal medications on *Candida albicans* in root canals. *Journal of Endodontics*, volume 27, nº6, pp. 401-403.
61. Vianna, E. & Gomes,A. (2009). Efficacy of sodium hypochlorite combined with chlorhexidine against *Enterococcus faecalis* in vitro. *Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology and Endodontics*, volume 107, nº4, pp. 585-589.
62. Vianna, E. *et al.* (2004). In vitro evaluation of the antimicrobial activity of chlorhexidine and sodium hypochlorite. *Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology and Endodontics*, volume 97, nº1, pp. 79–84.
63. Williamson, A., Cardon, J. & Drake, D., (2009). Antimicrobial susceptibility of monoculture biofilms of a clinical isolate of *Enterococcus faecalis*. *Journal of Endodontics*, volume 35, nº1, pp.95–97.

64. Yuan, G. *et al.* (2014). Synergistic sporicidal effect of ethanol on a combination of orthophthalaldehyde and Didecyldimethylammonium chloride. *Letters in Applied Microbiology*, volume 59, n°5, pp. 272-277.
65. Zehnder, M. (2006). Root canal irrigants. *Journal of Endodontics*, volume 32, n°5, pp 389–398.