

UNIVERSIDADE DE LISBOA  
FACULDADE DE MEDICINA DENTÁRIA



Comparação do efeito bactericida da activação manual e da activação ultrassónica do  
NaOCl a 5,25% contra *Enterococcus faecalis*

Ana Patrícia Senra Basto

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA

2011



UNIVERSIDADE DE LISBOA  
FACULDADE DE MEDICINA DENTÁRIA



Comparação do efeito bactericida da activação manual e da activação ultrassónica do  
NaOCl a 5,25% contra *Enterococcus faecalis*

Ana Patrícia Senra Basto

Dissertação orientada pela  
**Professora Doutora Iva Martins**

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA

2011



## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço ao Professor António Ginjeira, pela ajuda em desenvolver e concretizar este estudo, pela sua amizade e confiança no meu trabalho.

Agradeço à Professora Iva Martins pelo ensino dos procedimentos laboratoriais e na orientação dos mesmos, e pela sua simpatia e dedicação.

Agradeço à Doutora Marise Almeida pelo seu esforço, e sua dedicação para realização do estudo, especialmente nos procedimentos laboratoriais.

Agradeço à Doutora Cláudia Cavaco Martins pela transmissão de conhecimentos e de experiência laboratorial.

Agradeço às Amigas, colegas de trabalho e curso Susana Furão, Bruna Loureiro, Diana Costa, Daniela Bensimon Brito e Maria Joana Domingues.

Agradeço a todas as pessoas com quem partilhei os melhores e piores momentos na RUEM, especialmente à Maria José Barroso.

Agradeço à minha Mãe, Pai e Irmãos por suportarem a minha “ausência”, pelo amor e felicidade que me porpocionam.

Agradeço a Ti, Alexandre Leitão, por me fazeres sorrir a cada segundo da minha vida.

## RESUMO

**Introdução:** Neste estudo propomos-nos a estudar a irrigação, por ser a fase mais importante na remoção de microrganismos do sistema canal, permitindo uma limpeza e desinfecção intracanal compatível com sucesso endodôntico. Comparámos entre si, técnicas de activação manual e de activação mecânica, ambas com o NaOCl a 5,25% na sua capacidade bactericida contra *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*) ATCC 51299.

**Materiais e Métodos:** Uma amostra de 66 dentes unirradiculares foi preparada com instrumentos rotativos da ProTaper Universal®. A *smear layer* foi removida com ácido cítrico a 10% e NaOCl a 5,25%. Esterilizaram-se os dentes em autoclave com um ciclo de 15 minutos a 121° C. Cada grupo experimental foi constituído por 20 dentes e dois grupos de controlo (positivo e negativo) cada um constituído por 3 dentes. Inocularam-se os dentes dos grupos experimentais e os do controlo positivo com com uma suspensão bacterina de *E. faecalis*. De seguida trataram-se os dentes de cada grupo da seguinte forma. Grupo1: Irrigação com NaOCl a 5,25% activação manual com seringa. Grupo 2: Irrigação com NaOCl a 5,25% com agitação manual-dinâmica. Grupo 3: Irrigação com NaOCl a 5,25% com ProUltra® PiezoFlow™ Ultrasonic Irrigation. A desinfecção foi avaliada pela presença ou ausência de turvação, após colheita da amostra com cones de papel e introduzidos em meio BHI estéril, durante 72 horas.

**Resultados:** Podemos verificar que a agitação manual dinâmica tem valores de eficácia superiores a ambas as técnicas, e que a irrigação ultrassónica passiva tem eficácia superior à activação manual com seringa e inferior eficácia que a agitação manual dinâmica.

**Conclusão:** Neste estudo não conseguimos verificar se as nossas hipóteses foram rejeitadas ou não, devido à contaminação proveniente de uma fonte externa desconhecida, revelando-se ser necessária a realização de um novo ensaio laboratorial para se obterem resultados conclusivos.

Palavras-chave: Irrigação, Agitação Manual Dinâmica, Irrigação Ultrassónica, *Enterococcus faecalis*, Insucesso endodôntico.

## ABSTRACT

**Introduction:** In this study, we propose to examine the irrigation process, the most important phase in the removal of microorganisms from the channel system, allowing the cleaning and disinfection of the intracanal compatible with endodontic success. We compared with each other, manual activation techniques and mechanical activation, both with 5.25% NaOCl in their bactericidal ability against ATCC 51299 *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*).

**Materials and Methods:** A sample of 66 single-rooted teeth were prepared with rotary instruments with ProTaper Universal®. The smear layer was removed with 10% (m/v) citric acid and NaOCl 5.25%. Teeth were sterilized in an autoclave with a cycle of 15 minutes at 121°C. Each experimental group consisted of 20 teeth and two control groups (positive and negative) consisted of 3 teeth. Both the experimental groups and the positive control group teeth were inoculated with *Enterococcus faecalis*. Then, each teeth's group was treated following the next scheme. Group 1: Irrigation with NaOCl 5.25% with manual activation with a syringe. Group 2: Irrigation with NaOCl 5.25% with manual-dynamic irrigation. Group 3: Irrigation with NaOCl 5.25% (m/v) with ProUltra PiezoFlow ®™ Ultrasonic Irrigation. The disinfection was evaluated by sampling with paper cones that were incubated in sterile BHI media for 72 hours.

**Results:** We found that the manual-dynamic irrigation has superior efficacy values for both techniques, and the passive ultrasonic irrigation has superior efficacy to the manual activation using a syringe and less effective as manual-dynamic irrigation.

**Conclusion:** In this study we could not verify that our hypotheses were right, due to a contamination from an unknown outside source, being necessary to perform new laboratory tests in order to achieve our objectives.

**Keywords:** Irrigation, manual-dynamic irrigation, Ultrasonic Irrigation, *Enterococcus faecalis*, Endodontic Failure.

## ÍNDICE

INTRODUÇÃO.....	1
Preparação Químico-mecânica.....	1
Técnicas de irrigação.....	2
Insucesso no tratamento pulpar.....	4
OBJECTIVOS DO ESTUDO E HIPÓTESES DE TRABALHO.....	6
MATERIAIS E MÉTODOS.....	7
Preparação da amostra.....	7
Preparação da suspensão bacteriana.....	8
Inoculação da suspensão bacteriana no canal radicular.....	8
Procedimentos de desinfecção experimental.....	9
Análise da desinfecção experimental.....	10
RESULTADOS.....	11
DISCUSSÃO.....	12
CONCLUSÃO.....	18
BIBLIOGRAFIA.....	19
Anexo I – Conceitos Teóricos.....	a
Ilustração 1 - Resumo de sistemas de activação do irrigante.....	a
Ilustração 2 – Fenómeno de <i>vapor lock</i> .....	a
Ilustração 3 - Vibração acústica em torno de uma ponta ultrassónica em água (esquerda) e numa vista esquemática (direita). .....	b
Ilustração 4 - Fenómeno de cavitação produzido por ponta ultrassónica ao início da activação (esquerda) e a alta rotação (direita).....	b
Anexo II – Metodologias e Resultados.....	c
Ilustração 1 - Destartarização dos dentes.....	c
Ilustração 2 – Corte dos dentes pela JAC.....	c
Ilustração 3 – Verificação do comprimento radicular dos dentes.....	c



Ilustração 4 – Dentes excluídos do estudo .....	d
Ilustração 5 – Aspecto dos tubos após procedimento de desinfecção. ....	d
Ilustração 6 – Aspecto dos tubos após 72h:.....	d
Anexo III – Características do meio de crescimento de <i>Enterococcus faecalis</i> ....	e

## **LISTAS DE ABREVIATURA**

ATCC - American Type Culture Collection

BHI - Brain Heart Infusion

EDTA - Ácido etilenodiaminotetracético

JAC - Junção amelo-cementária

MTA - Agregado Trióxido Mineral

PUI - Irrigação Ultrassónica Passiva

UI - Instrumentação Ultrassónica

UV - raios ultravioleta

## INTRODUÇÃO

A endodontia é uma especialidade da medicina dentária que visa a limpeza, desinfecção e modelagem canalar seguidas de obturação e selamento (Sabins *et al.*, 2003; Borin *et al.*, 2007; Munley e Goodell, 2007), sendo constituída por 3 fases principais: a abertura coronária, a preparação química-mecânica e a obturação (de Gregorio *et al.*, 2009). Destas destaca-se, durante todo o tratamento, a fase da preparação químico-mecânica, onde se procura a eliminação de bactérias, detritos e o alargamento do canal, através da interacção de uma substância química com os instrumentos endodônticos (Kahn *et al.*, 1995; Borin *et al.*, 2007; Desai *et al.*, 2009; Jiang *et al.*, 2010). Todavia, a remoção de remanescentes pulpares, dentinários e dos microrganismos no terço apical do canal é o passo mais crítico para o sucesso endodôntico (Kahn *et al.*, 1995; Shen *et al.*, 2010).

### Preparação Químico-mecânica

A preparação mecânica actua apenas no canal principal não atingido a complexa anatomia dos canais radiculares (canais acessórios, istmos, etc). Sendo assim, é necessária a utilização de uma substância química auxiliar à preparação mecânica, o irrigante. A sua acção física facilita a acção dos instrumentos através da lubrificação das paredes do canal e pela sua capacidade de penetração em todo o sistema canalar (Tasdemir *et al.*, 2008; van der Sluis *et al.*, 2010). A sua acção química permite a dissolução dos tecidos orgânicos e inorgânicos, assim como a destruição de bactérias e neutralização das toxinas presentes no canal radicular (Borin *et al.*, 2007; Munley e Goodell, 2007; de Gregorio *et al.*, 2009; van der Sluis *et al.*, 2010).

A eficácia do irrigante é influenciada por vários factores tais como a configuração do sistema canalar, o volume, a pressão de inserção no canal, o tipo de irrigante, o tipo de calibre e profundidade de inserção da agulha de irrigação e o tempo de contacto com os tecidos. Para que os objectivos da irrigação sejam cumpridos, o tamanho e o alargamento correctos do canal são essenciais (Kahn *et al.*, 1995; Nadalin *et al.*, 2009; Rödiger *et al.*, 2010).

Estudos recentes demonstram a importância de uma lavagem final com o irrigante como parte essencial da terapia pulpar (Gu *et al.*, 2009; Jiang *et al.*, 2010).

O irrigante mais amplamente usado em endodontia é o hipoclorito de sódio (NaOCl), utilizando-se no intervalo de concentrações de 0,5% (m/v) até 5,25% (m/v), sendo esta última a mais comumente usada (Berber *et al.*, 2006; Chopra *et al.* 2008; Monteiro *et al.*, 2008; Tasdemir *et al.*, 2008). Desde 1937 que o NaOCl a 5% (m/v) é indicado como coadjuvante da preparação dos canais radiculares, pois auxília na descontaminação dos instrumentos, e melhor manipulação dos canais radiculares (Borin *et al.*, 2007).

O NaOCl apresenta várias propriedades, nomeadamente: capacidade de dissolver tecidos orgânicos, promover o branqueamento e a saponificação, possuir baixa tensão superficial e pH alcalino, ser biocompatível e apresentar uma acção antimicrobiana (Plotino *et al.*, 2007; Nadalin *et al.*, 2009; Aubut *et al.*, 2010; Haapasalo *et al.*, 2010).

### Técnicas de irrigação

Walton e Torabinejad postularam acerca da irrigação que “talvez o factor mais importante seja o sistema de aplicação e não o próprio irrigante” (Walton e Torabinejad, 1988 citado em Kahn *et al.*, 1995). Desta forma, têm-se desenvolvido técnicas de irrigação assistida para melhorar a efectividade do irrigante, especialmente no terço apical. Estas técnicas podem ser divididas em duas categorias: técnicas com activação manual (seringa, escovas, e agitação manual dinâmica) e com activação mecanicamente assistida (técnica ultrassónica, sónica, pressão negativa e terapia fotodinâmica)(de Gregorio *et al.*, 2009; Gu *et al.*, 2009) (Anexo I Ilustração 1).

Nas técnicas por activação manual o irrigante é colocado dentro do canal com uma seringa e agulha, com pequenos movimentos oscilatórios. No entanto, é difícil atingir os últimos milímetros apicais pela formação de uma pequena bolha de ar, fenómeno conhecido por *vapor lock* (Anexo I Ilustração 2). Para eliminar este fenómeno introduziu-se a técnica agitação manual dinâmica, na qual se coloca um cone de gutta-percha perfeitamente adaptado ao canal (cone principal), e aplicam-se movimentos suaves ascendentes e descendentes de 2-3 mm após prévia colocação do irrigante com seringa e agulha (Gu *et al.*, 2009; Caron *et al.*, 2010).

Os ultrassons foram introduzidos na endodontia por Richman na terapia pulpar em 1957 (Richman, 1957 citado em Sabins *et al.*, 2003). Em 1980, uma unidade

ultrassónica foi preparada para o uso endodôntico por Martin e colaboradores (Martin *et al.*, 1980 citado em Gu *et al.*, 2009).

As unidades ultrassónicas transferem ondas ultrassónicas para um instrumento endodôntico de frequências entre os 25 e 40 kHz (Kahn *et al.*, 1995; Plotino *et al.*, 2007; Gu *et al.*, 2009).

As aplicações dos ultrassons em endodontia são variadas, tais como: na remoção de instrumentos fracturados no canal, na condensação do agregado mineral trióxido (MTA), no acesso a canais calcificados, na condensação ultrassónica de gutta-percha, na cirurgia endodôntica, na preparação do canal radicular e no aumento da acção de soluções irrigantes (Plotino *et al.*, 2007).

Dois tipos de irrigação ultrassónica estão descritos na literatura, a instrumentação ultrassónica (UI) e a irrigação ultrassónica passiva (PUI). A UI é uma combinação de instrumentação e irrigação, enquanto na PUI usa-se apenas a irrigação e o instrumento endodôntico colocado dentro do canal não toca nas suas paredes (van der Sluis *et al.*, 2007; Tasdemir *et al.*, 2008; Gu *et al.*, 2009).

A UI revelou-se menos eficaz que a instrumentação manual não se conseguindo controlar a quantidade de tecido dentinário que é removido, no entanto a PUI mostrou-se superior às técnicas de irrigação manuais, continuando a ser utilizada na terapia pulpar (van der Sluis *et al.*, 2007; Gu *et al.*, 2009).

Existem duas subdivisões da PUI; a de fluxo contínuo com unidades ultrassónicas e de fluxo intermitente com seringa manual (Gu *et al.*, 2009). Na técnica de fluxo intermitente o irrigante é injectado no canal radicular com uma seringa e recolocado após cada ciclo de activação ultrassónica. A quantidade de irrigante que flui através da região apical do canal pode ser controlada, pois a profundidade de penetração da seringa e do volume de irrigante administrados são conhecidas, o que não acontece na técnica de fluxo contínuo (Gu *et al.*, 2009).

A transmissão de ondas ultrassónicas leva a dois efeitos: vibração acústica e cavitação (Anexo I, Ilustrações 3 e 4). A vibração acústica consiste na formação de remoínhos no irrigante atingindo com mais facilidade zonas de difícil acesso, removendo mais detritos dentinários e bactérias plantónicas ou em biofilme das paredes. A cavitação consiste na formação de bolhas no irrigante que ao expandirem rebentam, libertando um fluxo de energia que leva à desagregação de biofilmes bacterianos, e assim tornando as bactérias mais susceptíveis ao efeito bactericida do irrigante (van der Sluis *et al.*, 2007; Tasdemir *et al.*, 2008; Gu *et al.*, 2009).

Vários estudos demonstram que o NaOCl associado à PUI, durante 3 minutos, é mais eficaz na limpeza e desinfecção do canal, assim como na remoção de detritos dentinários, bactérias e tecido pulpar com uma menor extrusão apical. Estas vantagens podem tornar esta técnica fundamental na irrigação final (Tasdemir *et al.*, 2008; Gu *et al.*, 2009).

### Insucesso no tratamento pulpar

Apesar dos avanços na terapia pulpar, a taxa de insucesso ainda é elevada pela persistência da periodontite apical, sendo necessário recorrer a retratamento, cirurgia apical, e por vezes exodontia (Garcez *et al.*, 2007; Lana *et al.*, 2009; Barone *et al.*, 2010; Givol *et al.*, 2010).

O insucesso deve-se à dificuldade de eliminar a totalidade de microrganismos durante o tratamento (Lana *et al.*, 2009; de Gregorio *et al.*, 2009; Givol *et al.*, 2010). A flora do canal radicular é constituída por mais de 700 espécies, sendo a maioria bactérias anaeróbias Gram negativas, existindo ainda espécies por identificar (Karim e Kennedy, 2007; Valera *et al.*, 2009).

O microrganismo mais frequentemente encontrado nos casos de reinfecção/persistência da lesão é o *Enterococcus faecalis*, o qual se classifica como um coco Gram positivo anaeróbio facultativo, ovóide com 0,5 a 1µm de diâmetro (Lana *et al.*, 2009; Valera *et al.*, 2009; Suchitra e Kumdabala, 2006). Alguns estudos também documentam a presença do fungo *Candida albicans* nestes casos (Karim e Kennedy, 2007; Valera *et al.*, 2009).

Sherman (1937) descreveu que *E. faecalis* podia crescer num intervalo de temperatura de 10 a 45°C, num pH de 9,6, numa solução de NaCl a 6,5% (m/v), e ainda resistir a uma temperatura de 60°C durante 30 minutos (Sherman, 1937 citado em Kayaoglu e Ørstavik, 2004).

As características das células de *E. faecalis* tornam este microrganismo muito resistente e com capacidade de se adaptar a condições ambientais menos favoráveis, permitindo que sobreviva mesmo após o tratamento pulpar. A sua resistência traduz-se em resistência à radiação UV, ao calor e a inúmeras substâncias nas quais se destacam o NaOCl, o peróxido de hidrogénio, o etanol, o hidróxido de cálcio e antibióticos (Kayaoglu e Ørstavik, 2004; Lana *et al.*, 2009).

Os factores de virulência mais estudados para estas bactérias incluem: substâncias de agregação bacteriana, adesinas de superfície, ácido lipoproteico, ião superóxido extracelular, enzimas tais como a gelatinase e a hialuronidase, citolisinas, bactericinas (Kayaoglu e Ørstavik, 2004; Suchitra e Kumdabala, 2006).

Neste estudo propomos testar um protocolo de irrigação final, por ser uma das fases importantes na remoção de microrganismos do sistema canal, permitindo uma limpeza e desinfecção intracanal compatível com sucesso endodôntico (Berber *et al.*, 2006). Devido à inexistência na literatura de estudos que comparem tal como propomos, este estudo pretende testar a capacidade bactericida de uma solução de NaOCl a 5,25% contra *E. faecalis* ATCC 51299 activada por técnicas de activação manual e de activação mecânica.

## **OBJECTIVOS DO ESTUDO E HIPÓTESES DE TRABALHO**

### Objectivo principal:

Observar se a irrigação com uma solução de NaOCl a 5,25% (m/v) activada com ultrassons, tem uma capacidade bactericida superior a uma solução de NaOCl a 5,25% (m/v) com activação manual contra *E. faecalis*.

### Objectivos Secundários

a) Avaliar a eficácia bactericida de uma solução de NaOCl a 5,25% (m/v) activada manualmente com seringa e agulha 28G, em raízes de dentes infectados com *E. faecalis*.

b) Avaliar a eficácia bactericida de uma solução de NaOCl a 5,25% (m/v) activada com agitação manual dinâmica, em raízes de dentes infectados com *E. faecalis*.

c) Avaliar a eficácia bactericida de uma solução de NaOCl a 5,25% (m/v), activada por ultrassons, em raízes de dentes infectados com *E. faecalis*.

d) Comparar a eficácia bactericida dos procedimentos anteriores.

### Hipotese alternativa (H1):

A irrigação com activação manual dinâmica de uma solução de NaOCl a 5,25% (m/v) no interior de canais infectados com *E. faecalis*, tem uma eficácia bactericida superior que a mesma solução, activada por ultrassons ou com seringa e agulhaProUltra® PiezoFlow™ Ultrasonic Irrigation®.

### Hipotese nula (H0):

A irrigação com activação manual dinâmica de uma solução de NaOCl a 5,25% no interior de canais infectados com *E. faecalis*, tem uma eficácia bactericida igual ou inferior que a mesma solução, activada por ultrassons ou com seringa e agulha.



## MATERIAIS E MÉTODOS

### Preparação da amostra

Neste estudo foram utilizados 66 dentes unirradiculares, sem curvaturas radiculares, e com um único canal. Após exodontia foram mantidos em água destilada e a sua superfície radicular foi limpa com pontas destartarizadoras (Anexo II, Ilustração1).

Seguidamente os dentes foram esterilizados em autoclave a 121° C durante 15 min.

Após esterilização, cortaram-se as coroas numa peça de mão com um disco de carbide pela sua junção amelo-cementária (JAC) (Anexo II, Ilustração 2).

Seguidamente verificou-se a permeabilidade e o número de canais em cada dente. Caso não houvesse permeabilidade e/ou um número superior a um canal na raiz, esses dentes eram excluídos do estudo.

Estabeleceu-se o comprimento de trabalho colocando uma lima K 10 (Dentsply-Maillefer, Ballaigues, Suíça) até esta ultrapassar o apex; recuou-se a mesma até já não ser vista a ultrapassar-lo. Ajustou-se o respectivo *stop* da lima ao topo da raiz, e anotou-se o valor (Anexo II, Ilustração 3). O comprimento de trabalho foi determinado subtraindo 1mm a esta medida. Uniformizou-se toda a amostra a um comprimento de trabalho de 12 mm. Dentes com comprimento de trabalho superior a 12 mm foram novamente cortados na peça de mão com o disco de carbide com a finalidade de ficarem com este valor. Dentes com comprimento inferior a 12 mm foram excluídos do estudo (Anexo II, Ilustração 4).

Iniciou-se a instrumentação com a obtenção de uma via de permeabilidade com limas manuais K 8, K10, K 15 e K 20 (Dentsply-Maillefer, Ballaigues, Suíça).

Utilizou-se o sistema da ProTaper Universal® (Dentsply-Maillefer, Ballaigues, Suíça), segundo as instruções do fabricante (S1,Sx,S1,S2,F1,F2,F3), com o motor ATR® ((Dentsply-Maillefer, Ballaigues, Suíça).

Os canais foram irrigados com 0,2 mL de NaOCl a 5,25% (m/v), entre cada instrumento, usando seringa e agulha de 28 G de saída apical (BD Microlance 3, Becton Dickinson SA, Espanha).

Seguidamente procedeu-se à eliminação da *smear layer* irrigando com 1 mL de uma solução de ácido cítrico a 10% (m/v) durante 60 segundos (s), e depois com 1 mL

de água destilada durante 30 s. De seguida secaram-se os canais com cones de papel de diâmetro 30.

Os dentes foram distribuídos aleatoriamente pelos vários grupos, selaram-se os ápices, e restante superfície radicular com duas camadas de verniz de cores diferentes para cada grupo, num suporte feito com este propósito.

Posteriormente os dentes foram colocados em embalagens individuais de esterilização e colocados num autoclave a 121° C, durante 15 min.

#### Preparação da suspensão bacteriana

Neste estudo foi utilizada uma estirpe de *E. faecalis* (ATCC 51299) crescida inicialmente em meio Slanetz & Bartley (Oxoid, Ltd Basingstoke Hampshire, Inglaterra) durante 18 horas a 37° C. Posteriormente as células de *E. faecalis* foram transferidas para meio Brain Heart Infusion (BHI) (Oxoid, Ltd Basingstoke Hampshire, Inglaterra) e foram incubadas a 37 °C. As características e preparação dos meios de cultura utilizados estão descritas no Anexo III.

Após 24 horas de crescimento, determinou-se a densidade óptica da suspensão a 600 nm num espectrofotómetro Camspec M501 e ajustou-se para uma densidade óptica de 0,5 com meio BHI estéril tal como utilizado em estudos prévios (Mercade *et al.*, 2009)

Todos os procedimentos foram realizados à chama, de forma a garantir a não existência de contaminação.

#### Inoculação da suspensão bacteriana no canal radicular

Procedeu-se à inoculação de 10 microlitros (µL) da suspensão de *E. faecalis* preparada anteriormente no canal radicular utilizando micropipetas estéreis, numa câmara de fluxo laminar. No caso dos dentes que constituíam o controlo negativo inoculou-se 10 µL de BHI estéril. Estes foram introduzidos em microtubos que continham 30 µL de água destilada esterilizada no fundo de cada, colocada previamente com micropipeta estéril. Posteriormente incubaram-se a 37° C, durante 48 h, em atmosfera húmida confinada, para permitir o crescimento bacteriano.

### Procedimentos de desinfecção experimental

Depois da incubação, os dentes foram irrigados, segundo o padrão de irrigação do respectivo grupo. Todos os procedimentos foram efectuados em condições e com procedimentos assépticos, em câmara de fluxo laminar.

#### **Grupo1: Irrigação com NaOCl a 5,25% (m/v) com activação manual com seringa**

20 dentes previamente inoculados com *E. faecalis* foram irrigados através de seringa convencional e agulha 28G com 2,5 mL de NaOCl a 5,25% (m/v) , fazendo movimentos de vai-e-vem de pequena amplitude (1 a 2mm) e actuando durante 1 min. Seguidamente, inactivou-se o NaOCl irrigando com 1 mL de tiosulfato de sódio 5% (m/v) deixando-se actuar durante 1min.

#### **Grupo 2: Irrigação com NaOCl a 5,25% (m/v) com agitação manual-dinâmica**

20 dentes previamente inoculados com *E. faecalis* foram irrigados através de seringa convencional e agulha 28 G com 2,5 mL de NaOCl a 5,25% (m/v) , agitando-se manualmente com um cone de gutta-percha desinfectado de diâmetro F3 com movimentos verticais de vai-e-vem de pequena amplitude (1 a 2mm) até ao comprimento de trabalho e actuando durante 1 min.. Seguidamente, inactivou-se o NaOCl irrigando com 1 mL de tiosulfato de sódio 5% (m/v) deixando-se actuar durante 1 min.

Os cones de gutta-percha foram preparados previamente cortando-se os 3 mm apicais, após o qual se procedeu à sua desinfecção em banho de NaOCl (m/v), a 40° C.

#### **Grupo 3: Irrigação com NaOCl a 5,25% (m/v) com ultra-sons.**

20 dentes previamente inoculados com *E. faecalis* foram irrigados através de sistema ultrassónico com ponta de diâmetro 20 (ProUltra® PiezoFlow™ Ultrasonic Irrigation) com 2,5mL de NaOCl a 5,25% (m/v), colocado na unidade piezo-elétrica (Spartan, USA) com o valor 2 do motor da mesma unidade, actuando durante 1min. Seguidamente, inactivou-se o NaOCl irrigando com 1 mL de tiosulfato de sódio 5% (m/v) deixando-se actuar durante 1min.

#### **Grupo 4. Controlo Negativo**

Irrigaram-se 3 dentes esterilizados, aos quais foi previamente incorporado no interior do canal BHI estéril, com 1 mL de tiosulfato de sódio 5% (m/v) com seringa convencional e agulha esterilizada, 28 G com saída apical (BD Microlance 3, Becton Dickinson SA, Espanha) e deixou-se actuar durante 1 min.

### **Grupo 5. Controlo Positivo**

Irrigaram-se 3 dentes esterilizados e previamente inoculados com *E. faecalis* com 1 mL de tiosulfato de sódio 5% (m/v) com seringa convencional e agulha esterilizada, 28 G com saída apical (BD Microlance 3, Becton Dickinson SA, Espanha) e deixou-se actuar durante 1 min.

#### Análise da desinfeção experimental

Terminados os procedimentos de irrigação, foi introduzido um cone de papel esterilizado de diâmetro F3 no canal, procedimento feito em triplicado. Cada cone foi introduzido num tubo de ensaio que com 5 mL de BHI estéril.

Os mesmos tubos foram colocados em estufa, a 37° C, durante 72 h para se avaliar um eventual crescimento bacteriano, dado pela turvação do meio.

Os tubos foram centrifugados a cada 24 h de forma a permitir uma difusão do oxigénio, nutrientes e metabolitos.

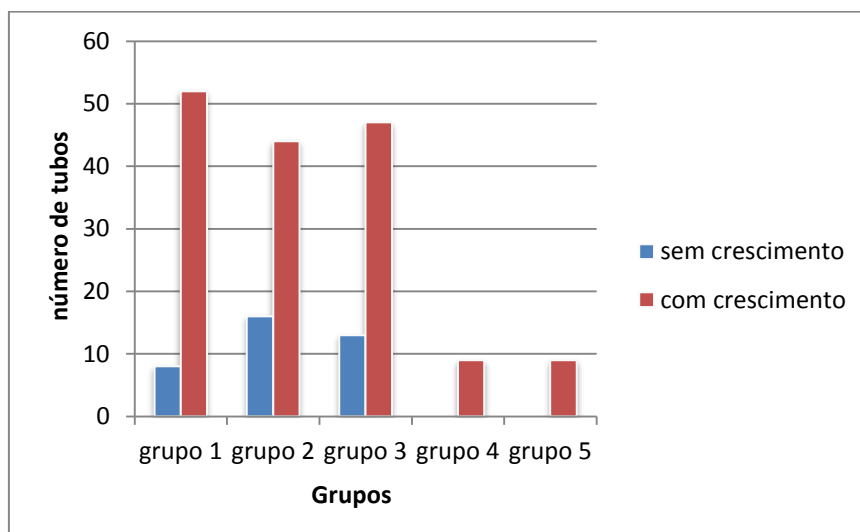
## RESULTADOS

Todos os grupos de controlo negativo e positivo apresentavam crescimento bacteriano. O não crescimento bacteriano indica-nos os dentes livres de bactérias ou que foram desinfectados.

Os resultados obtidos para a desinfeção de cada grupo experimental realizada durante o 1º ensaio laboratorial estão representados na Tabela 1 e no Figura 1.

**Tabela 1** - Resultados dos grupos experimentais e respectiva percentagem da desinfeção experimental (n = 198)

	<b>Tubos sem crescimento (%)</b>	<b>Tubos com crescimento(%)</b>
<b>grupo 1</b>	8 (13)	52 (87)
<b>grupo 2</b>	16 (27)	44(73)
<b>grupo 3</b>	13 (22)	47(78)
<b>grupo 4</b>	0	9 (100)
<b>grupo 5</b>	0	9 (100)



**Figura 1** - Resultados dos grupos experimentais em número de tubos (n = 198)

Como não validámos o primeiro ensaio, procedemos à realização de um segundo, mas, contudo, houve em ambos contaminação proveniente de uma fonte externa desconhecida. Pelos resultados da desinfeção e assépsia não terem sido validados, os resultados não podem ser considerados (e por isso não se procedeu à análise estatística).

## DISCUSSÃO

A preparação químico-mecânica deve, idealmente, obter um sistema canalar totalmente limpo e desinfectado. Tem sido demonstrado que o alargamento e a irrigação apical são necessários para o sucesso endodôntico (Berber *et al.*, 2006; Caron *et al.*, 2010).

A eficácia da irrigação, especialmente na irrigação final, depende da preparação mecânica anteriormente realizada, assim como do irrigante usado (Haapasalo *et al.*, 2010; Jiang *et al.*, 2010).

Alguns factores estão descritos na literatura científica como variáveis importantes para o sucesso da irrigação tais como: volume e concentração de irrigante, tempo de actuação do mesmo, calibre e profundidade de inserção da seringa no comprimento de trabalho (Machado-Silveiro *et al.*, 2004; Berber *et al.*, 2006; Haapasalo *et al.*, 2010).

Agulhas mais finas (28 G, 30 G) conseguem aproximarem-se do apex, sem tocar nas paredes do canal, e assim sendo, remove-se uma maior quantidade de partículas do canal (Chow, 1983).

Existe alguma controvérsia relativamente ao volume usado de irrigante, Baker e os seus colaboradores verificaram que volumes superiores obtinham melhores resultados, concluíram também que a acção do fluxo é mais importante que a dissolução do tecido (Baker *et al.*, 1975). No entanto, outros estudos não revelam diferenças na desinfecção relativamente ao volume usado (Lee *et al.*, 2004; van der Sluis *et al.*, 2006). Verifica-se também um aumento do volume que atinge o terço apical quando este está preparado com diâmetros superiores a 35 (Brunson *et al.*, 2010).

O irrigante ideal deve ser antimicrobiano, lubrificante, desinfectante, atóxico para os tecidos perirradiculares, ser capaz de dissolver tecidos orgânicos e inorgânicos e de atingir toda a complexidade anatômica radicular (Haapasalo *et al.*, 2010). O NaOCl é o irrigante mais usado em endodôntia, pois reúne o maior número destas propriedades. É usado em concentrações desde 0,5% (m/v) até 5,25% (m/v), sendo a sua capacidade bactericida directamente proporcional à sua concentração, tal como a sua toxicidade (Berber *et al.*, 2006).

A maioria dos estudos recorre a um intervalo de 1 a 3 min de activação do irrigante, contudo Sabins e os seus colaboradores demonstraram que o uso de irrigação

durante 30-60 segundos produzia canais radiculares mais limpos que uma irrigação sem activação (Sabins *et al.*, 2003; Townsend e Maki, 2009).

A capacidade bactericida da solução de NaOCl resulta sobretudo da sua transformação em ácido hipocloroso (HOCl) quando contacta com tecidos orgânicos, e liberta cloro. Este oxida os grupos de sulfidriolo, pela sua ligação aos grupos amino (NH), alterando o metabolismo das bactérias e promovendo a morte celular. Por outro lado, o pH alcalino do NaOCl desintegra a membrana plasmática, levando à lise das bactérias (Berber *et al.*, 2006; Haapasalo *et al.*, 2010)

Apesar das suas propriedades, quando usado isoladamente o NaOCl não consegue dissolver eficazmente a *smear layer* (Haapasalo *et al.*, 2010). Esta resulta da acção da instrumentação nas paredes do canal, e é constituída por componentes orgânicos e inorgânicos funcionando, desta forma, como um local de penetração bacteriano, favorecendo o seu crescimento e diminuindo a acção da medicação intracanal (Scelza *et al.*, 2003; Zehnder, 2006; Lin *et al.*, 2007).

Deste modo, é necessária a associação de outros irrigantes para melhorar a desinfecção do canal, como o ácido cítrico ou o EDTA (Haapasalo *et al.*, 2010). O modo de acção destas soluções quelantes baseia-se na alteração da estrutura dentária, removendo iões cálcio e iões fosfato da dentina por formação de compostos de coordenação com estes iões (Scelza *et al.*, 2003; Machado-Silveiro *et al.*, 2004; Caron *et al.*, 2010).

O ácido cítrico é usado em várias concentrações, desde 1% (m/v) até 50% (m/v), sendo usado mais frequentemente a 10% (m/v). Aplica-se no canal radicular, após o término da instrumentação mecânica, deixando actuar de 1 a 3min, sendo o seu efeito dependente do tempo de actuação (Scelza *et al.*, 2003; Lin *et al.*, 2007; Haapasalo *et al.*, 2010;).

Neste estudo usámos dentes unirradiculares, com um único canal e sem curvaturas para minimizar as diferenças e a complexidade anatómicas da amostra, pois estudos recentes demonstram que as técnicas de instrumentação e de irrigação disponíveis não são capazes de eliminar todas as bactérias presentes na anatomia radicular complexa (Lin *et al.*, 2007; Gu *et al.*, 2009).

A instrumentação com instrumentos rotativos promove uma preparação mais uniforme, mais cónica e maior preservação da anatomia do canal, e assim facilita a chegada do irrigante aos milímetros apicais do canal (Araquam *et al.*, 2009).

Instrumentaram-se todos os dentes até uma lima F3 do sistema ProTaper Universal® que tem um diâmetro na ponta de 0,30mm, e conicidade de 9% nos 5mm terminais. Outros autores utilizaram o diâmetro apical de 30 nos seus estudos (Chow, 1983; Caron *et al.*, 2010). No entanto, a maioria dos estudos refere uma instrumentação até um diâmetro de 40 em apical (Mercade *et al.*, 2009; Brunson *et al.*, 2010; Caron *et al.*, 2010) se bem que a maioria destes também realizaram preparações com instrumentos de conicidade 2% contrastando assim com a preparação que realizámos. Com o intuito, de assegurar que o irrigante atingisse a porção apical do canal, irrigou-se com o auxílio de uma seringa e agulha 28 G de saída apical (Chow, 1983; Kahn *et al.*, 1995).

Após a instrumentação realizámos o protocolo para remoção da *smear-layer*, com ácido cítrico a 10% (m/v) tal como usado no estudo de Machado-Silveiro (Machado-Silveiro *et al.*, 2004).

No nosso estudo, tentámos simular a situação clínica em que os dentes se encontram *in vivo*; para tal envernizámos com duas camadas de verniz toda a superfície radicular, dando especial atenção ao apex. Assim garantimos um sistema fechado, tal como o existente entre a raiz e o osso perirradicular e também evitamos a extrusão do da suspensão bacteriana inoculada e do irrigante pelo apex (de Gregorio *et al.*, 2009; Caron *et al.*, 2010; Tay *et al.*, 2010).

Ao simularmos um sistema fechado, vamos produzir o fenómeno conhecido por *vapor lock*, isto é, a formação de uma bolha ou coluna de ar nos últimos milímetros da porção apical do canal radicular, dificultando a chegada do irrigante ao mesmo local (Gu *et al.*, 2009; de Gregorio *et al.*, 2009; Caron *et al.*, 2010).

Para contornar esta situação desenvolveu-se a técnica de agitação manual dinâmica, pois ao colocar o cone de gutta-percha na porção apical; este destrói a bolha formada e permite que o irrigante chegue a todo o comprimento de trabalho (Haapasalo *et al.*, 2010).

Na realização dos protocolos de desinfecção final tínhamos como objectivo verificar a eficácia dos mesmos na eliminação da bactéria *E. faecalis* previamente inoculada em todos os dentes à excepção dos dentes do grupo 4 (controlo negativo).

A *E. faecalis* é um coco Gram positivo anaeróbio facultativo, sendo o microrganismo mais persistente em situações de insucesso endodôntico, encontra-se também em infecções por monocultura (Berber *et al.*, 2006). Esta tem grande capacidade de crescimento mesmo em ambientes desfavoráveis, e com capacidade para



se aderir a inúmeros substratos (Townsend e Maki, 2009). Pelo apresentado, por já ter sido bastante estudado, e usado em vários estudos de microbiologia em endodontia, foi também usado por nós (Berber *et al.*, 2006; Mercade *et al.*, 2009; Townsend e Maki, 2009).

Neste estudo usámos três diferentes técnicas de activação do irrigante: activação manual com seringa e agulha, agitação manual dinâmica, e activação por irrigação ultrassónica com fluxo intermitente. Em todas as técnicas usámos o mesmo volume e concentração de irrigante, assim como o mesmo tempo de activação. Após a lavagem final com NaOCl a 5,25% (m/v), procedeu-se à neutralização do mesmo com tiosulfato de sódio 5% (m/v) (Valera *et al.*, 2009).

A activação manual com seringa é a técnica convencional mais amplamente usada na clínica de endodontia, colocando-se o irrigante dentro do canal com o auxílio de uma seringa e uma agulha podendo esta ter vários calibres, e tipos de saída (Gu *et al.*, 2009).

A agitação manual dinâmica foi desenvolvida para eliminar o *vapor lock*, e possibilitar que o irrigante contacte com a porção apical, melhorando a sua eficácia. Esta técnica tem sido defendida como simples, rápida, e com uma óptima relação custo/eficácia, no entanto, ainda existem poucos estudos a verificar a sua eficácia (Gu *et al.*, 2009; Caron *et al.*, 2010).

A PUI tem demonstrado melhores resultados de limpeza e desinfeção do sistema canal ar relativamente às técnicas de activação manual (Sabins *et al.*, 2003; van der Sluis *et al.*, 2007; Araquam *et al.*, 2009; Gu *et al.*, 2009). A activação ultrassónica promove um maior fluxo, e maior renovação do irrigante dentro do canal e assim promove uma melhor limpeza e efeito bactericida mais eficaz. Estes fenómenos são conhecidos por vibração acústica e cavitação (Lee *et al.*, 2004; Plotino *et al.*, 2007; van der Sluis *et al.*, 2010). Durante a PUI preconiza-se o uso de uma ponta ultrassónica de diâmetro 10/20, para evitar contacto com as paredes canulares e por consequência formação de *smear-layer* (Sabins *et al.*, 2003; van der Sluis *et al.*, 2007; Caron *et al.*, 2010). No nosso estudo, usámos uma ponta ultrassónica de diâmetro 20 com o intuito de não provocar estas alterações no canal radicular.

Para recolha de amostras microbiológicas usámos cones de papel esterilizados, tendo sido utilizados 3 cones por dente (Anexo II, Ilustração 5). Cada cone foi colocado no meio de cultura líquido para se verificar a existência de crescimento bacteriano pela turvação do meio, passadas 72h. O uso de cones de papel é uma técnica simples, que

pode ser usada *in vivo*, no entanto, apenas recolhe amostras do canal principal, não atingindo todo o sistema canalar (Berber *et al.*, 2006; Mercade *et al.*, 2009; Valera *et al.*, 2009).

O objectivo do controlo positivo foi garantir que as bactérias inoculadas se encontravam viáveis e que a solução inactivadora do NaOCl não tinha por si só efeito bactericida. O objectivo do controlo negativo efectuado foi garantir a esterilidade dos procedimentos.

Após as 72 horas de incubação, foi verificado que os controlos negativos estavam com turvação do meio, isto é, com crescimento bacteriano. Sendo assim, não conseguimos comprovar a eficácia dos protocolos de desinfecção e assépsia, não garantindo a validade dos nossos resultados.

Realizámos novamente os ensaios laboratoriais, após limpeza e desinfecção dos dentes previamente inoculados, com um volume abundante de NaOCl a 5,25% (m/v) e de água destilada. Verificámos a selagem do apex e restante superfície radicular, voltando a cobrir os mesmos com uma camada de verniz. Após estes secarem ao ar, realizámos um novo ciclo em autoclave a 121° C durante 15 min, em embalagens individuais.

Num segundo e novo ensaio, seguimos o mesmo protocolo, mas todos os tubos ficaram com turvação, incluindo os controlos positivos e negativos, assim como o frasco de BHI estéril que apenas foi aberto na câmara de fluxo laminar.

Nos tubos encontram-se 3 tipos de aspecto do meio de cultura: os límpidos, sem qualquer turvação, indicativos de ausência de qualquer microrganismo; os turvos indicativos de crescimento bacteriano com a *E. faecalis*; e uns turvos com uma camada espessa, esbranquiçada à superfície do BHI, indicativos do crescimento de um microrganismo diferente da *E. faecalis* (Anexo II, Ilustração 6).

As causas possíveis para a contaminação podem ser: erro de manipulação do material durante os procedimentos por falta de experiência laboratorial, ou contaminação da câmara de fluxo laminar.

Ainda assim, observando os resultados obtidos no 1º ensaio laboratorial, podemos verificar que a agitação manual dinâmica tem valores de eficácia superiores às outras técnicas, e que a PUI tem eficácia superior à activação manual com seringa e inferior eficácia que a agitação manual dinâmica. Não podemos, no entanto, extrapolar estes resultados, pois não conseguimos saber o efeito da contaminação nos mesmos.

Será necessário refazer um novo ensaio laboratorial, após confirmação da contaminação ou não da câmara de fluxo laminar, averiguação esta que está a decorrer.

Novos estudos terão de ser realizados para verificar a eficácia da agitação manual dinâmica, pelas características de simplicidade de realização, sem custos adicionais nem riscos para o tratamento, podendo ser utilizado como uma optimização da irrigação e assim garantir o melhor prognóstico do tratamento endodôntico.

## **CONCLUSÃO**

Este estudo não verifica se as nossas hipóteses estão rejeitadas ou não devido à contaminação proveniente de uma fonte externa desconhecida, sendo necessária a realização de um novo ensaio laboratorial.

## BIBLIOGRAFIA

1. Araquam KR, Britto ML, Nabeshima CK. *Evaluation of apical extrusion of debris during ultrasonic versus rotary instrumentation*. Rev. odonto ciênc. 2009;24(1):32-5.
2. Barone C, Dao TT, Basrani BB, Wang N, Friedman S. *Treatment Outcome in Endodontics: The Toronto Study—Phases 3, 4, and 5: Apical Surgery*. J Endod. 2010;36(1):28-35.
3. Baker NA, Eleazer PD, Averbach RE. *Scanning electron microscopic study of the efficacy of various irrigation solutions*. J Endodon. 1995;1:127-35.
4. Berber VB, Gomes BP, Sena NT, Vianna ME, Ferraz CC, Zaia AA, Souza-Filho FJ. *Efficacy of various concentrations of NaOCl and instrumentation techniques in reducing Enterococcus faecalis within root canals and dentinal tubules*. Int Endod J. 2006;39(1):10-7.
5. Borin G, Becker A, Oliveira E. *A HISTÓRIA DO HIPOCLORITO DE SÓDIO E A SUA IMPORTÂNCIA COMO SUBSTÂNCIA AUXILIAR NO PREPARO QUÍMICO MECÂNICO DE CANAIS RADICULARES*. Revista de Endodontia Pesquisa e Ensino On Line. 2007;3(5):1-5.
6. Brunson M, Heilborn C, Johnson DJ, Cohenca N. *Effect of Apical Preparation Size and Preparation Taper on Irrigant Volume Delivered by Using Negative Pressure Irrigation System*. J Endod. 2010;36(4):721-4.
7. Caron G, Nham K, Bronnec F, Machtou P. *Effectiveness of Different Final Irrigant Activation Protocols on Smear Layer Removal in Curved Canals*. J Endod. 2010;36(8):1361-6.
8. Chopra S, Murray PE, Namerow KN. *A Scanning Electron Microscopic Evaluation of the Effectiveness of the F-file versus Ultrasonic Activation of a K-file to Remove Smear Layer*. J Endod. 2008;34(10):1243-5.

9. Chow TW. *Mechanical effectiveness of root canal irrigation*. J Endod. 1983;9(11):475-9.
10. Desai P, Himel V. *Comparative Safety of Various Intracanal Irrigation Systems*. J Endod. 2009;35(4):545-9.
11. Garcez AS, Ribeiro MS, Tegos GP, et al. *Antimicrobial Photodynamic Therapy Combined With Conventional Endodontic Treatment to Eliminate Root Canal Biofilm Infection*. Lasers in Surgery and Medicine. 2007;39:59-66.
12. Givol N, Rosen E, Taicher S, Tsesis I. *Risk Management in Endodontics*. J Endod. 2010;36(6):982-984.
13. de Gregorio CD, Estevez R, Cisneros R, Heilborn C, Cohenca N. *Effect of EDTA, Sonic, and Ultrasonic Activation on the Penetration of Sodium Hypochlorite into Simulated Lateral Canals: An In Vitro Study*. J Endod. 2009;35(6):891-5.
14. Gu L, Kim JR, Ling J, et al. *Review of Contemporary Irrigant Agitation Techniques and Devices*. J Endod. 2009;35(6):791-804.
15. Haapasalo M, Shen Y, Qian W, Gao Y. *Irrigation in endodontics*. Dent Clin North Am. 2010 Apr;54(2):291-312.
16. Jiang L, Verhaagen B, Versluis M, van der Sluis LW. *Influence of the Oscillation Direction of an Ultrasonic File on the Cleaning Efficacy of Passive Ultrasonic Irrigation*. J Endod. 2010;36(8):1372-6.
17. Kahn FH, Rosenberg PA, Gliksberg J. *An In Vitro Evaluation of the Irrigating Characteristics of Ultrasonic and Subsonic Handpieces and Irrigating Needles and Probes*. Journal of Endodontics. 1995;21(5):277-280.
18. Karim E, Kennedy J. *The antimicrobial effects of root canal irrigation and medication*. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2007;103:560-9.

19. Kayaoglu G, Ørstavik D. *VIRULENCE FACTORS OF ENTEROCOCCUS FAECALIS: RELATIONSHIP TO ENDODONTIC DISEASE*. *Critical Reviews in Oral Biology e Medicine*. 2004;15(5):308-320.
20. Lana PE, Scleza MF, Silva LE, Mattos-Guaraldi AL, Júnior RH. *Antimicrobial Activity of Calcium Hydroxide Pastes on Enterococcus faecalis Cultivated in Root Canal Systems*. *Braz Dent J*. 2009;20(1):32-6.
21. Lee SJ, Wu MK, Wesselink PR. *The effectiveness of syringe irrigation and ultrasonics to remove debris from simulated irregularities within prepared root canal walls*. *Int Endod J*. 2004;37(10):672-8.
22. Lin LM, Lin J, Rosenberg PA. *One-appointment endodontic therapy Biological considerations*. *JADA*. 2007;138:1456-62.
23. Machado-Silveiro LF, González-López S, González-Rodríguez MP. *Decalcification of root canal dentine by citric acid, EDTA and sodium citrate*. *Int Endod J*. 2004;37(6):365-9.
24. Mercade M, Duran-sindreu F, Roig M, Durany N. *Antimicrobial efficacy of 4.2% sodium hypochlorite adjusted to pH 12, 7.5, and 6.5 in infected human root canals*. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2009;107(2):295-8.
25. Monteiro PG, Bombana A, Santos MD, Zaragoza RA. *Análise da limpeza dentinária em canais radiculares preparados com um sistema rotatório e diferentes substâncias químicas*. *RGO*. 2008;56(1):7-15.
26. Munley PJ, Goodell GG. *Comparison of Passive Ultrasonic Debridement Between Fluted and Nonfluted Instruments in Root Canals*. *J Endod*. 2007;33(5):578-80.

27. Nadalin MR, Perez DE, Vansan LP, Paschoalato C, Sousa-Neto MD, Saquy PC. *Effectiveness of Different Final Irrigation Protocols in Removing Debris in Flattened Root Canals*. Braz Dent J. 2009;20(3):211-4.
28. Plotino G, Pameijer CH, Grande NM, Somma F. *Ultrasonics in Endodontics: A Review of the Literature*. J Endod. 2007;33(2):81-95.
29. Rödiger T, Bozkurt M, Konietschke F, Hülsmann M. *Comparison of the Vibrating System with Syringe and Passive Ultrasonic Irrigation in Removing Debris from Simulated Root Canal Irregularities*. J Endod. 2010;36(8):1410-3.
30. Sabins RA, Johnson JD, Hellstein JW. *A Comparison of the Cleaning Efficacy of Short-Term Sonic and Ultrasonic Passive Irrigation after Hand Instrumentation in Molar Root Canals*. J Endod. 2003;29(10):674-8.
31. Scelza MF, Teixeira AM, Scelza P. *Decalcifying effect of EDTA-T, 10% citric acid, and 17% EDTA on root canal dentin*. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2003;95(2):234-6.
32. Shen Y, Gao Y, Qian W, et al. *Three-dimensional Numeric Simulation of Root Canal Irrigant Flow with Different Irrigation Needles*. J Endod. 2010;36(5):884-9.
33. Suchitra U, Kundabala M. *Enterococcus Faecalis: An Endodontic Pathogen*. ENDODONTOLOGY. 2006;18(2):11-13.
34. Tasdemir T, Er K, Celik D, Yildirim T. *Effect of Passive Ultrasonic Irrigation on Apical Extrusion of Irrigating Solution*. European Journal of Dentistry. 2008;2:198-203.
35. Tay FR, Gu LS, Schoeffel GJ, Wimmer C, Susin L, Zhang K, Arun SN, Kim J, Looney SW, Pashley DH. *Effect of vapor lock on root canal debridement by using a side-vented needle for positive pressure irrigant delivery*. J Endod. 2010;36(4):745-50.



36. Townsend C, Maki J. *An in vitro comparison of new irrigation and agitation techniques to ultrasonic agitation in removing bacteria from a simulated root canal.* J Endod. 2009;35(7):1040-3.

37. Valera MC, Silva KC, Maekawa LE, et al. *Antimicrobial activity of sodium hypochlorite Candida albicans and Enterococcus faecalis inoculated in root canals.* J Appl Oral Sci. 2009;17(6):555-9.

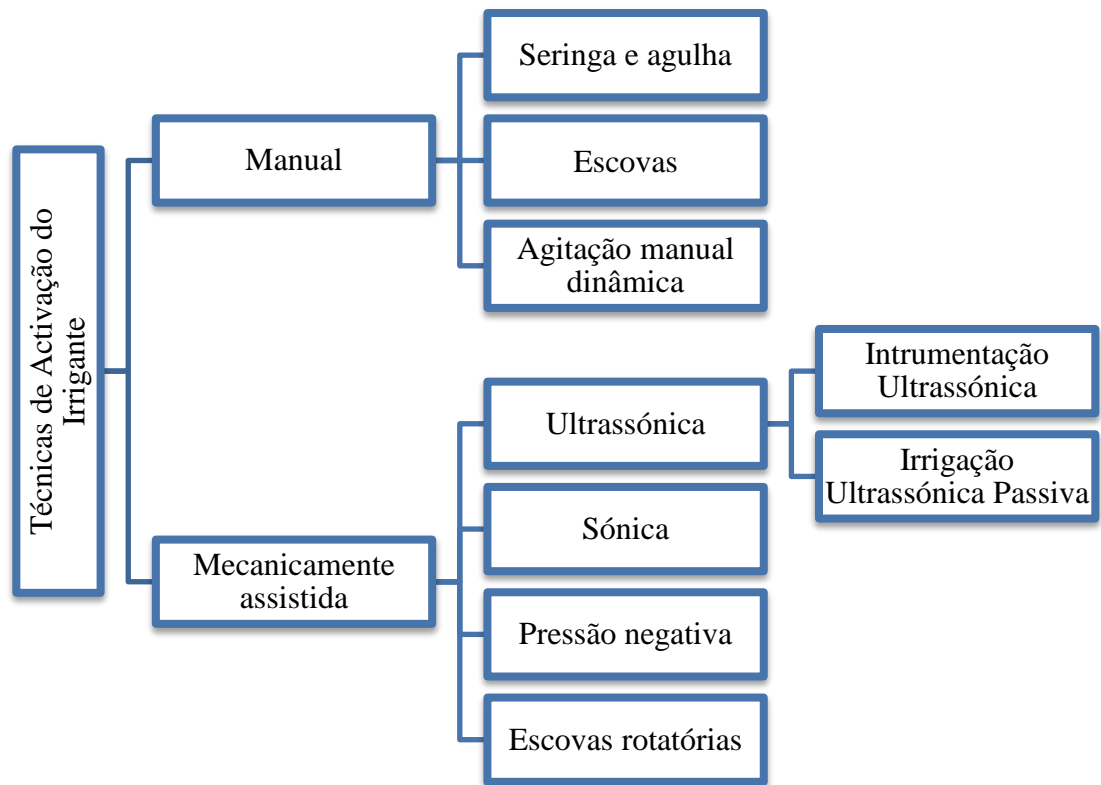
38. van der Sluis LW, Gambarini G, Wu MK, Wesselink PR. *The influence of volume, type of irrigant and flushing method on removing artificially placed dentine debris from the apical root canal during passive ultrasonic irrigation.* Int Endod J. 2006;39(6):472-6.

39. van der Sluis LW, Versluis M, Wu MK, Wesselink PR. *Passive ultrasonic irrigation of the root canal: a review of the literature.* International Endodontic Journal. 2007;40:415-26.

40. van der Sluis LW, Vogels MP, Verhaagen B, Macedo R, Wesselink PR. *Study on the Influence of Refreshment/Activation Cycles and Irrigants on Mechanical Cleaning Efficiency During Ultrasonic Activation of the Irrigant.* J Endod. 2010;36(4):737-40.

41. Zehnder M. *Root canal irrigants.* J Endod. 2006;32(5):389-98.

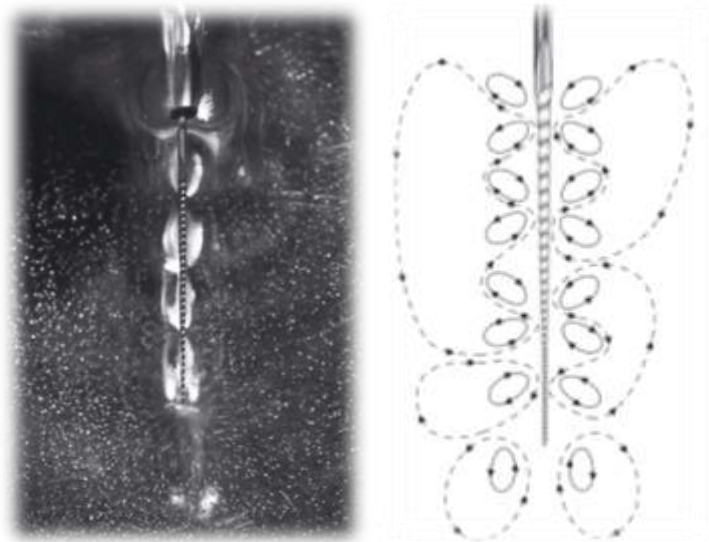
## Anexo I – Conceitos Teóricos



**Ilustração 1** - Resumo de sistemas de activação do irrigante, esquema adaptado de: Gu L *et al.*, 2009



**Ilustração 2** – Fenómeno de *vapor lock*, imagem reproduzida de: de Gregorio *et al.*, 2009.



**Ilustração 3** - Vibração acústica em torno de uma ponta ultrassónica em água (esquerda) e numa vista esquemática (direita). Imagens reproduzidas de: van der Sluis et al., 2007



**Ilustração 4** - Fenómeno de cavitação produzido por ponta ultrassónica ao início da activação (esquerda) e a alta rotação (direita). Imagens reproduzidas de van der Sluis *et al.*, 2007

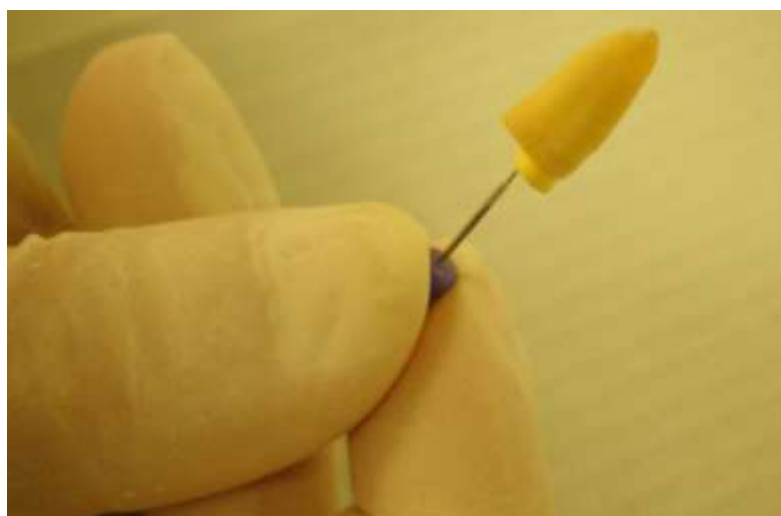
## Anexo II – Metodologias e Resultados



**Ilustração 1** - Destartarização dos dentes



**Ilustração 2** – Corte dos dentes pela JAC



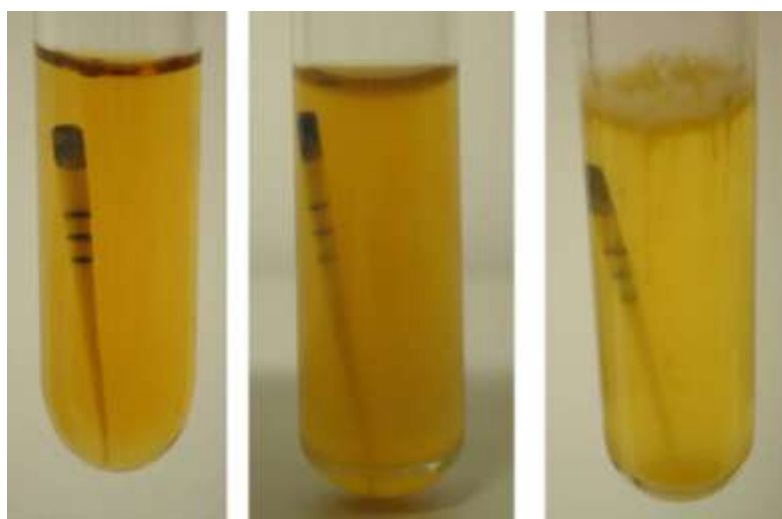
**Ilustração 3** – Verificação do comprimento radicular dos dentes



**Ilustração 4** – Dentes excluídos do estudo



**Ilustração 5** – Aspecto dos tubos após procedimento de desinfecção de um grupo.



**Ilustração 6** – Aspecto dos tubos após 72h: sem turvação, com turvação e com contaminação

### Anexo III – Características do meio de crescimento de *Enterococcus faecalis*

#### Brain Heart Infusion (BHI)

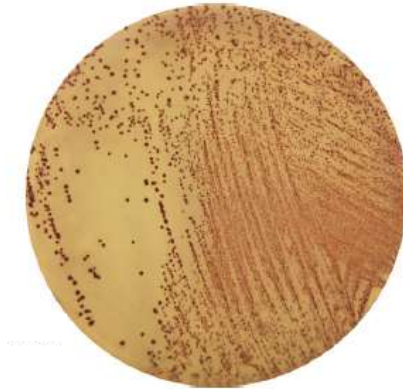
1. Composição química:

	Composição (g/L)
Infusão de cérebro de borrego	12,5
Infusão de coração de boi	5
Peptona	10
Cloreto de sódio	5
D (+) – Glucose	2
Dihidrogenofosfato	2,5

2. pH final:  $7,4 \pm 0,2$ .

3. Preparação: De acordo com as instruções do fabricante, pesaram-se 37 g e dissolveram-se em 1 L de água destilada. A esterilização foi realizada a 121° C durante 15 minutos.

## Meio de Slanetz & Bartley



**Ilustração 1** – Características morfológicas e macroscópicas de *Enterococcus faecalis*

ATCC 11700

### 1. Composição química:

	<b>Composição (g/L)</b>
Triptose	20
Extrato de levedura	5
Fosfato dipotássico	4
Glucose	2
Azida de sódio	0,40
Cloreto de 2,3,5-Trifenil Tetrazolio (TTC)	0,10
Agar bacteriológico	10

### 2. pH final: 7,2 ± 0,1.

3. Preparação: De acordo com as instruções do fabricante, pesaram-se 41,5 gramas do meio num litro de água destilada. Misturaram-se bem e dissolveram-se por aquecimento com frequente agitação. Ferveram-se por um minuto até a completa dissolução. Misturou-se bem e dispensou-se em placas. O meio preparado foi ser armazenado a 15/08° C.