



Concordância do Orientador

Declaro que o aluno Jorge Enrique Durand Ramirez sob o RA 094605 esteve sob minha orientação para a realização do Trabalho de Conclusão de Curso intitulado “Influência do uso do ultrassom durante o preparo químico-mecânico na desinfecção dos canais radiculares” no ano de 2012.

Concordo com a submissão do trabalho apresentado à Comissão de Graduação pelo aluno, como requisito para aprovação na disciplina DS833 - Trabalho de Conclusão de Curso.

Piracicaba, 08 de Outubro de 2012.

A handwritten signature in black ink, consisting of several loops and flourishes, positioned above a horizontal dashed line.

Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes



Universidade Estadual de Campinas
Faculdade de Odontologia de Piracicaba



CURSO DE GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA
Monografia de Final de Curso

***Influência do uso de Ultrassom durante o Preparo Químico-
Mecânico na Desinfecção dos Canais Radiculares***

O material contido no presente estudo foi
devidamente corrigido.

08 de Outubro de 2012

Aluno: Jorge Enrique Durand Ramíerez
enriquedurand7@hotmail.com

Orientadora: Profa. Dra. Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes.

bpgomes@fop.unicamp.br

Ano de Conclusão do Curso

2012

JORGE ENRIQUE DURAND RAMÍREZ

***Influência do uso de Ultrassom durante o Preparo
Químico-Mecânico na Desinfecção dos Canais
Radiculares***

Monografia apresentada ao curso de Odontologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, FOP-UNICAMP, para obtenção do diploma de Cirurgião Dentista.

Orientadora: Profa. Dra. Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes
Co-orientador: Daniel Rodrigo Herrera Morante

PIRACICABA

2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
JOSIDELMA F COSTA DE SOUZA – CRB8/5894 - BIBLIOTECA DA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA DA UNICAMP

Durand Ramirez, Jorge Enrique 1990-

D931i Influência do uso do ultrassom durante o preparo químico
mecânico na desinfecção dos canais radiculares / Jorge
Enrique Durand Ramirez. -- Piracicaba, SP: [s.n.], 2012.

Orientador: Brenda Paula Figueiredo Almeida Gomes.

Coorientador: Daniel Rodrigo Herrera Morante.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) –
Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de
Odontologia de Piracicaba.

1. Clorexidina. I. Gomes, Brenda Paula Figueiredo de
Almeida, 1961- II. Morante, Daniel Rodrigo Herrera. III.
Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de
Odontologia de Piracicaba. IV. Título.

Dedicatória

À minha Mãe:

Juana del Rosario Ramírez Riveros, que sempre acreditou em mim, e a apesar das complicações me ajudou a seguir e conquistar meu objetivo.

Agradecimentos

Agradeço em primeiro lugar a Deus que me deu forças para continuar mesmo nos momentos difíceis e por tudo o que conquistei.

Aos meus pais, irmãos, e a toda minha família que, com muito carinho e apoio, não mediram esforços para que eu chegasse até esta etapa de minha vida.

À Professora Dra. Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes pela paciência na orientação e incentivo que tornaram possível a conclusão desta monografia.

Ao meu Co-orientador Daniel Rodrigo Herrera Morante que além de me coorientar neste trabalho e contribuir na minha formação, se tornou um grande amigo.

A todos os professores e funcionários desta prestigiosa faculdade.

E finalmente agradeço aos meus colegas e amigos que compartilharam comigo momentos de felicidade e tristeza e que nos momentos difíceis me deram o seu apoio.

*“Los sueños sin riesgos producen
conquistas sin mérito”*

RESUMO

Para que sejam atingidos os objetivos da terapia endodôntica é importante a utilização de substâncias químicas auxiliares (SQA) e protocolos de irrigação que permitam a limpeza e desinfecção dos canais radiculares. Assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar a influência da irrigação e do uso do ultrassom na desinfecção de canais radiculares contaminados com *Enterococcus faecalis*, in vitro. Foram selecionados 40 pré-molares humanos unirradiculares, com canais retos e ápices formados. Após padronização dos espécimens, estes foram contaminados por 21 dias (*E. faecalis* ATCC 29212) e divididos aleatoriamente em 8 grupos segundo a SQA utilizada durante o preparo químico-mecânico e o protocolo de irrigação final: G1: água destilada (AD) sem ativação ultrassônica (US); G2: AD com US; G3: AD e ácido etilenodiamino-tetra-acético (EDTA) 17%; G4: AD e EDTA com US; G5: clorexidina gel 2% (CHX) e AD; G6: CHX e AD com US; G7: CHX e EDTA; G8: CHX e EDTA com US. Foram realizadas coletas microbiológicas iniciais (S1), após PQM (S2), após irrigação final (com AD ou EDTA com ou sem US) (S3) e após 7 dias de incubação (S4). A contagem das unidades formadoras de colônia (UFC/mL) foi analisada estatisticamente pelo teste de Kruskal-Wallis e teste de Mann-Whitney ($p < 0,05$). Após o PQM (S2) e após o uso de EDTA (S3) não foi possível recuperar *E. faecalis* em nenhum dos grupos avaliados. A carga microbiana isolada após a irrigação final foi superior nos grupos que receberam AD durante o PQM e EDTA no final, sem influência da ativação ($p > 0,05$). Já nos grupos onde foi utilizada CHX durante o PQM não foi possível detectar microrganismos. Conclui-se que a utilização do ultrassom na irrigação final promoveu a remoção de smear layer. Esta favoreceu a recontaminação do canal quando foi utilizada água destilada durante o PQM, devido à capacidade do *E. faecalis* de contaminar os tubulos dentinários.

Palavras chave: *Enterococcus faecalis*, ultrassom, clorexidina, Ácido Edético

ABSTRACT

To achieve the goals of endodontic therapy is mandatory to use auxiliary chemical substances (ACS) and irrigation protocols in order to reach cleanliness and disinfection of the root canal systems. Thus, the aim of this study was to evaluate the influence of irrigation and the use of ultrasonics in the disinfection of root canals contaminated with *Enterococcus faecalis*, in vitro. Forty single-rooted human premolars with straight and formed apices were selected. After standardization of the specimens, they were contaminated for 21 days (*E. faecalis* ATCC 29212) and randomly divided into 8 groups according to SQA used during chemomechanical preparation and the final irrigation protocol: G1: distilled water (AD) without ultrasonic activation (US); G2: AD with US; G3: AD and 17% ethylenediamine-tetraacetic acid (EDTA); G4: AD and EDTA with US; G5: 2% chlorhexidine gel (CHX) and AD; G6: CHX and AD with US and G7: CHX and EDTA; G8: CHX and EDTA with US. Microbial samples were collected before treatment (S1), after PQM (S2), after final irrigation (with AD or with or without EDTA and US) (S3) and after 7 days of incubation (S4). The colony forming units count (CFU / mL) was statistically analyzed using the Kruskal-Wallis and Mann-Whitney test ($p < 0.05$). After PQM (S2) and after the use of EDTA (S3) it was not possible to recover *E. faecalis* from any of the groups tested. The microbial load recovered after the final irrigation was higher in the groups receiving AD during the PQM and EDTA in the end, without the influence of activation ($p > 0.05$). In the groups where CHX was used during the PQM no microorganism was recovered. It was concluded that the use of a final irrigation with ultrason promotes smear layer removal. This favoured the recontamination of the root canals when distilled water was used during PQM, due to the ability of *E. faecalis* to contaminate the dentinal tubules.

Key Words: *Enterococcus faecalis*, ultrasonics, chlorhexidine, edetic acid

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AD -----	Água destilada;
CHX -----	Clorexidina gel;
EDTA -----	Ácido etilendiamino-tetra-acético;
PQM -----	Preparo químico-mecânico;
SCR -----	Sistema de canais radiculares;
SL -----	Smear layer;
SQA -----	Substâncias químicas auxiliares;
UFC -----	Unidades formadoras de colônia;
US -----	Ativação ultrassônica.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO
2. REVISÃO DA LITERATURA
3. PROPOSIÇÃO
4. MATERIAL E MÉTODOS
5. RESULTADOS
6. DISCUSSÃO
7. CONCLUSÃO

REFERÊNCIAS

1. INTRODUÇÃO

A importância das bactérias no desenvolvimento e na perpetuação das doenças pulpares e perirradiculares foi confirmada através do estudo clássico de Takehashi et al. (1965).

O tratamento endodôntico consiste na prevenção e no tratamento das infecções pulpares e periapicais. Este tratamento consiste principalmente da limpeza e modelagem do sistema de canais radiculares com instrumentos endodônticos e substâncias químicas auxiliares. Esta limpeza, que consiste na remoção de microorganismos e seus produtos tóxicos, de remanescentes pulpares e raspas de dentina resultantes do preparo do canal, conjuntamente com a modelagem, irão favorecer uma obturação tridimensional do sistema de canais radiculares (SCR) a mais hermética possível (Schilder 1974).

A etiologia associada ao insucesso endodôntico pode ser multifatorial. Embora os casos de fracasso do tratamento endodôntico possam estar associados a fatores não microbianos, endógenos ou exógenos, são os microorganismos e seus produtos os principais responsáveis pelo mesmo (Sjögren et al. 1997, Molander et al. 1998).

Infelizmente, a complexa anatomia dos canais radiculares favorece a permanência de restos orgânicos, inorgânicos e de microorganismos (Byström, Sundqvist 1981, Byström et al. 1985, Peters 2004). A espécie bacteriana mais frequentemente associada ao insucesso do tratamento endodôntico é *Enterococcus faecalis* (Gomes et al. 1996, Sena et al. 2006).

Durante o preparo químico-mecânico (PQM) é importante a utilização de substâncias químicas auxiliares (SQA) com capacidade antimicrobiana no intuito de se promover uma significativa redução dos depósitos bacterianos nos canais radiculares e túbulos dentinários, além de auxiliar na lubrificação do canal radicular durante a ação de corte dos instrumentos e na remoção de smear layer (SL) (Byström, Sundqvist 1983). Sendo assim, a seleção da SQA é importante, pois deve apresentar compatibilidade clínica e propriedades físico-químicas capazes de promover ação antibacteriana, permitir dissolução do tecido, possuir efeito de limpeza, ação quelante, e ser biocompatível com tecidos orais (Cruz Filho et al. 2001). Sendo assim, substâncias como a

clorexidina têm sido descritas na literatura como uma SQA com ampla capacidade antimicrobiana, substantividade e menor citotoxicidade quando comparada a outras SQA (Denaly et al. 1982; White, Hays e Janer 1997; Tanomaru-Filho et al. 2002; Dametto et al. 2005; Ferraz et al. 2007).

A necessidade de remover a SL formada durante o PQM obriga o profissional a utilizar alguma SQA com capacidade quelante (Di Lenarda et al. 2000). Assim, muitas substâncias têm sido testada no intuito de remover a SL, sendo o ácido etilenodiamino-tetra-acético (EDTA) quem se tem mostrado mais eficaz (Pérez-Heredia et al. 2008; Prado et al. 2011). Recentemente tem sido descrita a potencialização da atividade quelante do EDTA quando ativado com ultrassom dentro do SCR. Porém não existe um protocolo estabelecido quanto ao tempo ideal de sua aplicação.. Assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar a influência da irrigação e do uso do ultrassom na desinfecção de canais radiculares contaminados com *Enterococcus faecalis*, in vitro.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Microrganismos e infecções endodônticas.

Os agentes microbianos são essenciais para a propagação e perpetuação de doenças inflamatórias periapicais (Takehashi et al. 1965, Möller 1966, Sundqvist 1976, Möller et al. 1981).

Miller (1894) foi o primeiro em descrever a presença de bactérias no canal radicular. Após examinar esfregaços obtidos de canais radiculares com câmara pulpar aberta e polpas necróticas, observou os três tipos morfológicos básicos de células bacterianas, cocos, bacilos e espirilos. Da variedade de formas bacterianas observadas, algumas se localizavam na câmara pulpar, associadas a patologias pulpares, e outras no interior do canal radicular, associadas a patologias perirradiculares.

Após os achados de Miller (1894), Takehashi et al. (1965) expuseram a polpa dental de molares de ratos “germ-free” e convencionais à cavidade bucal, observando a resposta do tecido por meios histológicos. Foi observada a presença de necrose pulpar e lesão perirradicular apenas nos ratos convencionais, mostrando assim a importância das bactérias no desenvolvimento das doenças pulpares e perirradiculares.

Sundqvist (1976) avaliou as condições bacteriológicas de 32 canais radiculares de dentes hígidos unirradiculares com polpas necrosadas como consequência de trauma dentário. Radiograficamente foi detectada lesão periapical em 19 dos 32 dentes avaliados. Destes 19 dentes com lesão periapical, 18 apresentavam canais infectados, sendo que 94,3% das cepas isoladas eram de bactérias anaeróbias estritas. Assim foi confirmada a importância da infecção bacteriana nas patologias pulpares e perirradiculares e descartada a idéia de que a polpa necrosada sem infecção poderia ser um irritante para os tecidos periapicais.

Möller et al. em 1981 induziram necrose pulpar em nove macacos (*Macaca fascicularis*), de forma asséptica. Dos 78 dentes escolhidos para o estudo, a câmara pulpar de 26 foi selada, ficando livre de bactérias, enquanto as 52 restantes foram expostas à microbiota bucal por 7 dias, seguido do

selamento. Foi feito o acompanhamento clínico, radiográfico e microbiológico depois de 6-7 meses. Os resultados mostraram que as polpas necróticas não infectadas não induziram reação inflamatória periapical alguma, enquanto que 23,1% dos dentes com polpas infectadas apresentaram reação inflamatória perceptível clinicamente e 90,4% radiograficamente.

Lin et al. (2006) induziram necrose pulpar em 48 dentes de 4 cães de raça beagle, dividindo-os em dois grupos. Grupo A (24 dentes), caracterizado por necrose asséptica com câmara pulpar selada. Grupo B (24 dentes), com câmara pulpar exposta à microbiota bucal por 7 dias, seguido do selamento coronal. Os animais foram sacrificados após 1 ano do tratamento para análise histológica dos tecidos perirradiculares. Os autores concluíram que os dentes não infectados não têm uma liberação constante de mediadores químicos da inflamação por isso não desenvolveram nenhuma reação inflamatória periapical. Por outro lado, os dentes que foram expostos à microbiota bucal desenvolveram diversos graus de inflamação.

2.2. Microbiota dos casos de insucesso endodôntico

A etiologia associada ao insucesso endodôntico pode ser multifatorial; mas são os microrganismos e seus produtos os principais responsáveis pelo insucesso do tratamento. O objetivo do tratamento endodôntico é a eliminação da infecção através do PQM e obturação dos canais radiculares, propiciando um ambiente favorável à manutenção da saúde periapical ou ao reparo de lesões periapicais pré-existent. Assim, nos casos de insucesso endodôntico, procedimentos inadequados e insatisfatórios nas diferentes etapas do tratamento não permitem atingir estes objetivos, propiciando o desenvolvimento de infecção, reinfecção ou persistência de infecção nos tecidos periapicais (Nair et al. 1999).

As infecções endodônticas primárias são polimicrobianas, dominadas principalmente pelos anaeróbios estritos. Os anaeróbios estritos são geralmente eliminados durante o preparo químico-mecânico (PQM). Porém, os microrganismos facultativos como *Enterococcus* spp. e *Lactobacillus* spp. uma vez estabelecidos, se apresentam mais resistentes ao PQM e à medicação intracanal (MIC) (Gomes et al. 1996; Chávez de Paz et al. 2003).

A microbiota de dentes com fracasso do tratamento endodôntico difere de modo marcante daquela encontrada em canais radiculares de dentes com polpas necrosadas e não tratados endodônticamente (Sundqvist et al. 1989, Gomes et al. 1996; 2004).

As bactérias anaeróbias facultativas, geralmente se apresentam mais resistentes à atividade antimicrobiana das substâncias auxiliares do que os anaeróbios estritos, podendo persistir em canais radiculares após o tratamento endodôntico. Os microrganismos anaeróbios facultativos podem permanecer em fase latente, com uma baixa taxa metabólica, e assim na presença de mudanças ambientais, como uma infiltração coronária, pode-se gerar a ativação destes microrganismos e a conseqüente proliferação dos mesmos (Molander et al. 1998).

Sundqvist et al., em 1998, avaliaram 54 dentes tratados endodonticamente que apresentavam lesão periapical persistente. Após a remoção da obturação foram coletadas amostras microbiológicas do canal, os dentes receberam retratamento endodôntico e foi feito o acompanhamento por 5 anos. Os resultados mostraram a prevalência de infecções monobacterianas, predominando microrganismos Gram-positivos. A espécie mais comumente encontrada foi *E. faecalis*. Os autores concluíram que a microbiota dos canais radiculares associados a insucesso endodôntico é muito diferente da apresentada em infecções primárias.

Molander et al., (1998) avaliaram 100 dentes tratados endodônticamente que apresentavam imagem radiolúcida periapical (Grupo P) e 20 dentes tratados endodonticamente sem sinais de patologia periapical (Grupo T). No grupo P, as espécies bacterianas mais predominantes foram anaeróbias facultativas (69% das espécies isoladas), principalmente *Enterococcus*. Com base em seus achados, os autores concluíram que a microbiota de canais obturados difere da apresentada por canais com polpa necrótica não tratados, tanto quantitativa quanto qualitativamente.

Peciulienė et al., em 2000, avaliaram 25 dentes sem sintomatologia clínica que apresentavam lesão periapical persistente. Foi feito o retratamento utilizando NaOCl e EDTA durante o PQM. Foram feitas coletas para análise microbiológica antes e depois do PQM. Os resultados mostraram que 20 dos 25 dentes (80%) apresentavam cultura positiva, sendo que em 70% delas foi

isolado como cultura pura. As coletas feitas após o PQM foram positivas em 7 dos 20 dentes (35%) e em 71,5% (5) destas *E. faecalis* também estava presente como cultura pura. Concluiu-se que são as condições próprias dos dentes que determinam a presença de *E. faecalis*. Os mesmos autores, em 2001 (Peciulienė et al.), após avaliarem 40 dentes sem sintomatologia clínica que apresentavam periodontite apical crônica encontraram culturas positivas de microrganismos em 82,5% dos dentes, nos quais *E. faecalis* foi isolado no 63,7% dos casos, sendo mais da metade (52%) como cultura pura. Após o PQM, 25% dos dentes tiveram culturas positivas, sendo 60% delas apenas para *E. faecalis*. Os autores relatam a alta incidência de *E. faecalis* nos casos de insucesso endodôntico.

Pinheiro *et al.* (2003) identificaram a microbiota nos casos de insucesso endodôntico e associaram as características clínicas com a presença dessas bactérias. Foram realizadas coletas microbiológicas após a desobturação de 60 canais radiculares, e detectaram 51 (85%) culturas positivas, 1 ou 2 espécies por canal, havendo predominância de bactérias Gram-positivas (83,3%) anaeróbias facultativas (57,4%). *E. faecalis* foi a espécie mais frequentemente identificada. O gênero *Peptostreptococcus* spp., esteve associado com sintomatologia clínica ($p < 0,01$). Foram encontradas associações significantes entre dor ou história de dor e infecção polimicrobiana ou anaeróbios ($p < 0,05$); dor a percussão e *Prevotella intermedia/Prevotella nigrescens* ($p < 0,05$); fístula e *Streptococcus* spp. ($p < 0,001$) ou *Actinomyces* spp. ($p < 0,01$); ausência de selamento coronário e *Streptococcus* spp. ou *Candida* spp. (ambos com $p < 0,01$).

Utilizando a técnica de reação em cadeia de polimerase (PCR) para identificação de espécies de microrganismos em casos de insucesso endodôntico, Siqueira e Rôças (2004) coletaram amostras de 22 dentes com lesão periapical persistente. Todas as amostras foram positivas pelo menos para um dos microrganismos alvos do estudo, sendo *E. faecalis* o de maior prevalência (77%).

Por outro lado, Gomes *et al.* (2008) investigaram através da PCR nove espécies bacterianas em 45 dentes tratados endodonticamente com lesão periapical, e correlacionaram essas espécies com sintomatologia clínica. A espécie mais prevalente foi *E. faecalis* (77,8%), seguido por

Peptostreptococcus micros (51,1%). *Porphyromonas gingivalis*, *Porphyromonas endodontalis*, *Prevotella intermedia* e *Prevotella nigrescens* foram detectadas em 35,6%, 22,2%, 11,1% e 11,1% das amostras, respectivamente. Além disso, do total das amostras detectaram *Filifactor alocis* em 26,7%, *Treponema denticola* em 24,4% e *Tannerella forsythia* em 4,4%. *T. denticola* e *P. micros* apresentaram associação com dor à percussão ($p < 0,05$). *P. nigrescens* esteve associada com dor espontânea e abscesso ($p < 0,05$). *P. endodontalis* e *P. nigrescens* mostraram associação com exsudato purulento ($p < 0,05$).

2.3. Clorexidina como substância química auxiliar ao tratamento endodôntico

A ação mecânica dos instrumentos endodônticos é incapaz de promover a completa desinfecção de algumas áreas de complexa anatomia dentro dos canais. Daí a importância na utilização de substâncias auxiliares com capacidade antimicrobiana para promover uma significativa redução da carga bacteriana nos canais radiculares; além de auxiliar na lubrificação do canal, prevenindo a fratura dos instrumentos durante a ação de corte; promover a remoção de smear layer; a dissolução do exsudado, do tecido pulpar necrosado e da pré-dentina (Spangberg et al. 1973, Byström, Sundqvist 1983).

A ação mecânica dos instrumentos endodônticos associada ao fluxo contínuo de uma substância irrigadora promove uma significativa redução bacteriana (Byström, Sundqvist 1983), inclusive se a substância utilizada não tiver capacidade antimicrobiana, porém esta situação facilitaria a recontaminação do canal pela presença de microrganismos no interior dos túbulos dentinários (Berber et al. 2006).

Dametto et al. (2005) avaliaram, in vitro, o efeito antibacteriano da CHX em gel 2% sobre *E. faecalis*, comparado à da CHX em solução 2% e ao NaOCl 5,25%. Foram utilizadas 80 raízes de dentes humanos que receberam instrumentação para padronização do canal, autoclavação e contaminação por 7 dias com *E. faecalis*. As raízes foram divididas em 5 grupos de acordo com a substância auxiliar a ser utilizada durante o PQM. Foram realizadas três coletas microbiológicas, inicial (antes do PQM); pós-tratamento (imediatamente depois do PQM); e final (7 dias após o PQM). A CHX em gel e solução reduziram

consideravelmente as unidades formadoras de colônias (UFC) de *E. faecalis* nas coletas pós-tratamento e final. O NaOCl também reduziu as UFC na coleta pós-tratamento, mas não foi eficaz para manter o canal livre de *E. faecalis* na coleta final. Os autores concluíram que a CHX a 2% (gel ou solução) foi mais efetiva que o NaOCl 5,25 na redução de *E. faecalis* após 7 dias do PQM.

Sena et al. (2006) avaliaram *in vitro* a capacidade antimicrobiana do NaOCl a 2,5% e 5,25% e da CHX gel e solução a 2% como irrigantes endodônticos, sobre biofilme experimental de *E. faecalis*, *S. aureus*, *C. albicans*, *Prevotella intermedia*, *Porphyromonas gingivalis*, *Porphyromonas endodontalis* e *Fusobacterium nucleatum* formados sobre filtros de membrana. Os biofilmes foram imersos nas substâncias irrigantes por 30 s e por 5, 10, 15, 30 e 60 min, com e sem agitação mecânica. Após cada período experimental os filtros de membrana foram transferidos para tubos contendo 2mL de caldo nutriente adicionado de neutralizadores específicos de cada substância irrigadora usada, para evitar qualquer efeito residual. Após homogeneização e diluição seriada, amostras foram semeadas para determinação do número de UFC de cada microrganismo recuperado dos filtros. Os resultados mostraram que a agitação mecânica aumenta a ação das substâncias irrigadoras, sendo necessário um tempo menor para a eliminação do mesmo microrganismo. Os autores concluíram que a agitação mecânica melhora as propriedades antimicrobianas das substâncias testadas no modelo experimental de biofilme.

Ferraz et al. (2007) avaliaram pelo método de difusão em ágar, a atividade antimicrobiana da CHX gel como irrigante endodôntico, comparando-a ao NaOCl e a CHX em solução. As zonas de inibição de crescimento bacteriano produzidas pela CHX gel a 0,2%; 1% e 2% foram observados frente a 5 espécies de bactérias anaeróbias facultativas (*S. aureus*, *E. faecalis*, *Streptococcus sanguis*, *S. sobrinus*, *Actinomyces naeslundii*) e 4 espécies de anaeróbios estritos, Gram-negativos e produtores de pigmento negro (*P. gingivalis*, *P. endodontalis*, *P. intermedia* e *P. denticola*); e comparados com os resultados obtidos com NaOCl e CHX líquida. As maiores zonas de inibição foram produzidas quando as bactérias testadas ficaram em contato com a CHX a 2% em gel (11,79 mm), apresentando diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) quando comparadas às zonas de inibição de crescimento bacteriano produzidas por todas as concentrações avaliadas de NaOCl (0.5% ,1%, 2.5%,

4% e 5,25%) (9,54 mm). No entanto, não houve diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$) comparando-se as zonas produzidas por concentrações equivalentes de CHX líquida ou gel. Os resultados indicaram que a CHX em gel tem grande potencial para ser usada como substância química auxiliar quanto às suas propriedades antimicrobianas.

Oliveira et al. (2007) compararam a atividade antimicrobiana, *in vitro*, da CHX gel a 2 % sobre *E. faecalis*, com a atividade do NaOCl em duas concentrações (1,5% e 5,25%). Foram preparados 80 pré-molares humanos inferiores unirradiculares, autoclavados e infectados por 7 dias com cultura pura da bactéria. As raízes foram separadas em 5 grupos de acordo com a solução a ser utilizada como irrigante durante o PQM. Foram coletadas 3 amostras microbiológicas dos canais radiculares: Inicial (S1), pós tratamento (imediatamente após o PQM) (S2), e final (7 dias após o PQM) (S3). Os resultados mostraram uma redução significativa nas UFC dos grupos CHX gel e NaOCl a 5,25% para as coletas S2. O número de UFC de *E. faecalis* aumentou em S3, não mostrando diferenças significativas com S1. Concluiu-se, com estes resultados, que a CHX gel e o NaOCl 5,25 são efetivos na eliminação de *E. faecalis* até 7 dias após o PQM, sendo que com a maior concentração de NaOCl observou-se maior atividade antimicrobiana.

2.4. EDTA na remoção de smear layer

O termo *smear layer* foi utilizado, primeiramente por Boyde e Stewart em 1963. Mas foram McComb e Smith em 1975, quem a detetaram após o PQM do SCR, com aparência semelhante à SL formada após o preparo de cavidades coronárias. Entretanto, esses autores observaram que diferentemente da SL coronária, composta basicamente por dentina, a SL do SCR possuía uma porção inorgânica de tecido calcificado, proveniente da dentina, e era composta, ainda por remanescentes dos processos odontoblásticos, tecido pulpar e microrganismos.

Cameron em 1983 denominou a camada que recobre as paredes dentinárias como “SL superficial”, enquanto que aquela que é observada no interior dos túbulos dentinários foi denominada “*smear plug*”. Neste estudo foi analisada a SL em magnitudes que variam de 1.000 a 5.000X, observando que

a SL superficial encontra-se ligada frouxamente à dentina adjacente, com cerca de 1 a 2 μm e a *smear plug* pode penetrar nos túbulos dentinários a uma profundidade de até 40 μm .

Quanto à composição, Sabet et al. em 2008 relataram que a composição da SL difere de acordo com a estrutura a partir da qual ela se origina, podendo assim ser composta de dentina orgânica e inorgânica, fragmentos celulares da polpa (como restos de processos odontoblásticos, enzimas citoplasmáticas e organelas), componentes sanguíneos residuais, restos fibrosos de colágeno, proteínas desnaturadas, produtos e resíduos necróticos (quando de necrose pulpar se trata) ou microrganismos.

Uma revisão de literatura foi feita por Torabinejad et al. em 2002, a respeito das implicações clínicas da SL em endodontia. De acordo com estes autores, os métodos de instrumentação dos canais radiculares produzem uma camada de material orgânico e inorgânico (SL) a qual pode conter bactérias e seus subprodutos. Esta camada cobre as paredes instrumentadas podendo impedir a penetração da medicação intracanal nos túbulos dentinários, além de afetar a íntima adaptação entre o material de preenchimento radicular e as paredes da dentina radicular. Considerando as observações acima, os autores relataram que seria razoável a remoção da SL, pois resultaria em uma maior desinfecção dos sistemas dos canais radiculares e dos túbulos dentinários, o qual promoveria uma melhor adaptação entre o material de obturação e as paredes dos canais radiculares. Assim, SL deve ser considerada como um cocktail patogênico que potencialmente abriga remanescentes dos tecidos pulpare, microrganismos e irritantes a ela relacionados (Ruddle, 2007).

Os quelantes foram introduzidos na Endodontia com o objetivo de ajudar a preparação de canais radiculares estreitos e calcificados, assim como para promover a remoção da SL, (McComb e Smith 1975; Di Lenarda et al. 2000; Scelza et al. 2000).

De acordo com a literatura, o EDTA é o agente de ação quelante mais utilizado para remover o conteúdo inorgânico do SCR (Mc Comb e Smith, 1975; Goldman et al. 1981).

Nygaard-Østby em 1957 foi quem introduziu o EDTA na Endodontia, com a finalidade de auxiliar na instrumentação de canais atresicos, sob a forma de uma solução aquosa (Hulsmann, Heckendorff e Lennon, 2003).

Sendo a dentina um complexo molecular composto, basicamente, por hidroxiapatita, o mecanismo de ação do EDTA se baseia em sequestrar os íons cálcio bivalentes presentes nos cristais de hidroxiapatita, formando associações estáveis até a completa saturação da ação quelante, o que confere à solução sua característica auto-limitante (Leonardo, 1998).

Em relação ao tempo de aplicação do EDTA, Çalt e Serper em 2002, mostraram que os espécimes tratados com EDTA a 17% por 1 minuto, seguido por irrigação com NaOCl a 5%, apresentam a completa remoção desta camada nas superfícies radiculares instrumentadas, sendo que os túbulos dentinários parecem estar abertos. Todavia nos espécimes tratados com EDTA a 17%, durante 10 minutos, seguindo-se da aplicação do NaOCl a 5%, embora resulte na remoção integral da camada residual promove excessiva erosão da dentina peritubular e intertubular. De acordo com estes achados, para inibir a erosão dentinária, a solução de EDTA deve ser aplicada, no máximo, por 1 minuto, principalmente em dentes jovens nos quais a dentina encontra-se com túbulos dentinários mais abertos.

No entanto um estudo realizado por Malvar et al. em 2009, revelou que a atividade quelante do EDTA (3%, 5%, 10% e 17%), nos tempos de 1 e 3 min não tiveram diferenças estatísticas. Sugerindo que a aplicação clínica do EDTA durante 1 minuto leva em consideração não só a eficácia do produto, como também a redução do tempo de contato entre esta solução, a superfície dentinária e as áreas adjacentes, minimizando qualquer efeito adverso.

2.5. Ativação ultrassônica

Para Jadaa et al. 2009, quando um instrumento é ativado no interior do canal, ocorre a produção de um fenômeno denominado corrente hidrodinâmica. Esta corrente é um dos mecanismos que fornecem um desbridamento superior produzindo forças de cisalhamento capazes de romper biofilmes e remover debris.

Instrumentos endodônticos de ativação ultrassônica têm sido indicados para promoverem uma melhora do desbridamento do SCR. Dispositivos ultrasônicos foram introduzidos na endodontia por Richman em 1957. Um equipamento ultrasônico comercial projetado por Cunningham e

Martin foi designado para uso endodôntico em 1982. Assim, dispositivos ultrassônicos têm sido desenvolvidos para a irrigação do SCR (Jensen et al. 1999; Fukumoto et al. 2006).

Em um estudo realizado por Burleson et al. em 2007, foi verificada a eficiência do desbridamento de canais radiculares comparando dois grupos: um grupo com instrumentação manual e rotatória e outro grupo com as mesmas instrumentações seguido de 1 minuto de irrigação ultrassônica. Os autores concluíram que a completa remoção de debris, tecidos e biofilmes bacterianos apenas pela técnica de instrumentação manual ou manual associada à rotatória foi impossível. Afirmaram ainda que, 1 minuto de irrigação ativada pelo ultrassom após instrumentação manual conjugada com a instrumentação rotatória aumentou os valores de limpeza do SCR de 83% para 91% em todos os terços avaliados.

A técnica mais efetiva no desbridamento do SCR pode ser a ativação da lima sônica ou ultrassônica dentro de um canal como um passo final de sua preparação. Essa ativação implica em criar o movimento do fluido sem que o instrumento entre em contato com as paredes do canal. Os instrumentos ultrassônicos operam em frequências que variam de 25-40 kHz (Jensen 1999; Gu et al. 2009).

Para Ruddle 2007, a irrigação de forma ativa é desejável para iniciar a hidrodinâmica fluida e detém a promessa de melhorar a limpeza do SCR em todos os aspectos. Existe um aumento das evidências endodônticas que suportam que a ativação do fluido em canais bem formatados possui papel estratégico no desbridamento e anti-sepsia do sistema, incluindo os túbulos dentinários, canais laterais, ramificações e anastomoses. O maior foco hoje em dia está em como ativar uma determinada solução para maximizar o fenômeno hidrodinâmico. Os métodos tradicionais têm incluído o aquecimento de reagentes utilizando dispositivos de transferência de calor, vibração ativa e instrumentos metálicos não ativos (superfície lisa) com energia ultrassônica, utilização de soluções eletroquimicamente ativadas ou o suave bombeamento com cones de gutta-percha, de calibres apropriados, para levar e trocar um determinado reagente (Caron et al. 2010).

Um estudo feito por Jiang et al. em 2010, avaliou a remoção de detritos de dentina do canal radicular por ativação sonora ou ultrassom do

irrigante e os mecanismos físicos de ativação sonora, visualizando as oscilações da ponta sônica, tanto dentro como fora do confinamento da raiz canal. Os autores concluíram que a ativação do irrigante resultou na remoção de detritos mais significativa sendo a ativação ultrassônica mais eficiente do que a sonora. A amplitude de oscilação das pontas sonoras é de $1,2 \pm 0,1$ mm, resultando em contato com a parede sem cavitação.

3. PROPOSIÇÃO

As soluções irrigadoras intracanais e os diferentes protocolos na seqüência de uso são fatores determinantes para a limpeza e desinfecção. Sendo assim torna-se imprescindível o estabelecimento de protocolos de irrigação e ativação das substâncias irrigadoras para reduzir os níveis de contaminação.

Assim, a formulação desta pesquisa *in vitro* envolveu procedimentos de PQM com limas rotatorias associadas à CHX gel a 2% ou AD (controle) com diferentes protocolos de irrigação e ativação final no intuito de descontaminar o SCR.

Objetivo geral

Avaliar a influência da irrigação e do uso do ultrassom na desinfecção de canais radiculares contaminados com *Enterococcus faecalis*, *in vitro*.

Objetivos específicos

1. Avaliar a influência do EDTA, após PQM utilizando CHX, na diminuição de UFC de *E. faecalis*.
2. Comparar a influência do EDTA, associado ou não à ativação ultrassônica, na eliminação de *E. faecalis*.

MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Local da Pesquisa

Laboratório de Endodontia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas.

4.2. Fontes de Obtenção do Material de Pesquisa

Todo o material permanente para o preparo das amostras encontrava-se no Laboratório de Endodontia da FOP-UNICAMP, sendo o material de consumo obtido com verbas do pesquisador responsável.

Os dentes humanos utilizados nesta pesquisa, foram doados por cirurgiões dentistas como registrado no termo de doação.

4.3. Seleção e padronização dos dentes

Após a aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Piracicaba (CEP/FOP-UNICAMP/Protocolo 149/2009/Anexo 1), foram utilizados 40 pré-molares humanos permanentes, uniradiculares, com canal reto e ápice formado, conferido radiograficamente (Fig. 1).

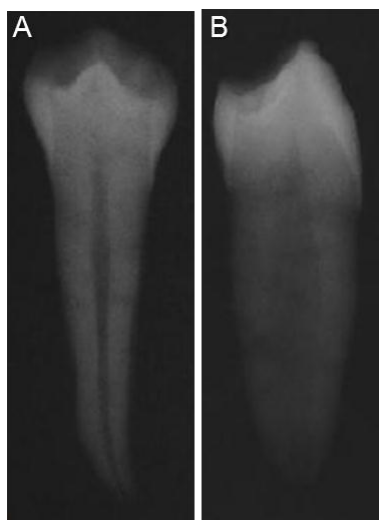


Figura 1. Radiografia em sentido vestibulo-lingual (A) e mesio-distal (B) de pré-molar inferior, confirmando a presença de canal radicular único.

Os elementos dentários selecionados foram esterilizados seguindo o protocolo descrito por Gomes et al. 2009, e armazenados sob refrigeração em solução timol 0,2%, até a realização dos procedimentos laboratoriais.

Utilizando uma máquina de corte (Isomet 1000, Buehler, IL, EUA) e um disco de diamante (Diamond Wafering Blade, Series 15LC, Buehler, EUA) a 350 rpm sob irrigação aquosa constante, as coroas foram removidas e o comprimento das raízes padronizado em 15 mm (Fig. 2). Os canais radiculares

e o forame apical foram alargados com a utilização de limas tipo K (Maillefer Instruments, Ballaigues, Suíça) até o nº 25 sob irrigação com água destilada. A fim de se evitar a desidratação, os dentes foram mantidos em gazes estéreis umedecidas durante toda a instrumentação (Fig. 3).

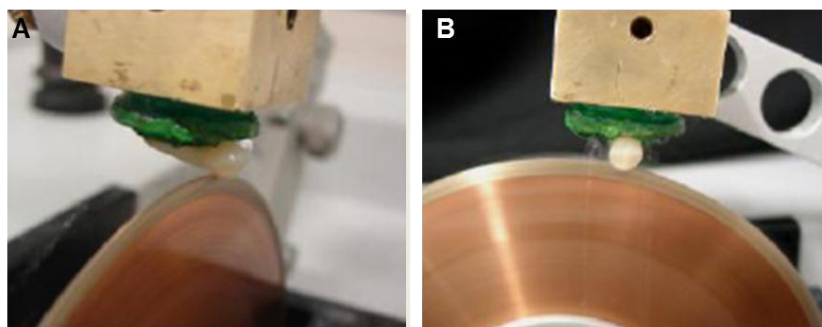


Figura 2. Máquina de corte calibrada a 350 rpm para o corte dos dentes padronizando o comprimento em 15 mm. Vista frontal (A) e lateral (B).

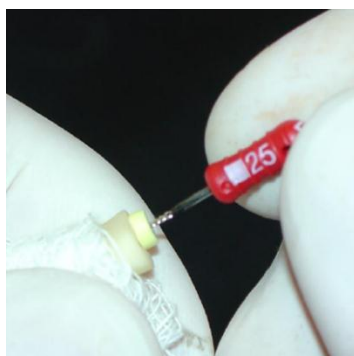


Figura 3. Os canais radiculares e o foramen apical foram alargados até a lima K nº 25. Os dentes foram mantidos em gazes umedecidas com água destilada a fim de se evitar a desidratação.

Para a remoção de SL formada pela instrumentação nas paredes do canal durante a padronização dos espécimes, as raízes foram imersas em cuba ultra-sônica contendo EDTA a 17% por 10 min, seguido de NaOCl a 5,25% por 10 min e então receberam banho por mais 10 min com tiosulfato de sódio a 5%, e finalmente água destilada por 1 h, segundo o protocolo descrito por Perez et al. 1993 e Ferraz et al. 2001.

4.4. Grupos experimentais

Após padronização, os 40 espécimes foram divididos aleatoriamente (<http://www.randomizer.org>) em 8 grupos segundo a SQA utilizada durante o preparo químico-mecânico e o protocolo de irrigação final: G1: água destilada (AD) sem ativação ultrassônica (US); G2: AD com US; G3: AD e ácido etilenodiamino-tetra-acético (EDTA) 17%; G4: AD e EDTA com US; G5: clorexidina gel 2% (CHX) e AD; G6: CHX e AD com US; G7: CHX e EDTA; G8: CHX e EDTA com US.

4.5. Contaminação dos espécimes

A partir de culturas de 24h de *E. faecalis*, foram preparadas suspensões em 5 mL de caldo BHI com concentração equivalente a 0.5 da escala de McFarland (1.5×10^8 UFC/mL). Os espécimes, previamente preparados e esterilizados, foram então transferidos para estas suspensões, sendo 5 espécimes em cada tubo, perfazendo um total de 8 tubos e 40 espécimes. Os tubos contendo os espécimes foram homogeneizados em aparelho Vortex e incubados a 37°C/21dias. A cada dois dias, e dentro da câmara de fluxo laminar, 2,0 mL do caldo contaminado era substituído por 2,0 mL de caldo fresco evitando assim a saturação do meio (Figura 4).



Figura 4. Dentro da câmara de fluxo laminar, os tubos contendo 5 espécimes cada, foram abertos a cada dois dias durante o período de contaminação para substituir 2mL do caldo contaminado por 2 mL de caldo fresco.

4.6. Coleta microbiológica inicial

Após a contaminação e sempre dentro da câmara de fluxo laminar, os espécimes foram dispostos em uma plataforma de aço inoxidável estéril (Procind Mecânica e Instalações Industriais Ltda, Piracicaba, SP-Brasil), onde cada raiz foi irrigada com 1,0 mL de solução AD estéril e a seguir foram coletadas as primeiras amostras microbiológicas dos canais radiculares contaminados (S1). Primeiramente foram utilizados tantos cones de papel (estéreis) quantos fossem necessários para absorver o líquido do canal, porém mantendo-o úmido, seguido de mais um cone de papel # 25 (Dentsply Ind. e Com. Ltda, RJ-Brasil) que foi inserido no comprimento total do canal, permanecendo por 1 min (Fig. 5). A seguir, estes cones foram transferidos individualmente para tubos estéreis tipo eppendorf contendo 1,0 mL de caldo BHI. Os tubos foram agitados em aparelho Vortex por 1 minuto e as suspensões obtidas foram diluídas em série 1/10, 1/100 em caldo BHI estéril. Cem μL da diluição 10^{-2} foram semeados em duplicata, em ágar BHI-sangue e incubados em estufa de CO_2 a $37^\circ\text{C}/48$ h. Após o período de incubação, foi feita a contagem de colônias de microrganismos presentes nas placas, determinando-se assim o número de UFC/mL recuperado de cada microrganismo. Após S1 foi realizado o preparo químico mecânico (PQM) dos espécimes, como descrito a seguir.

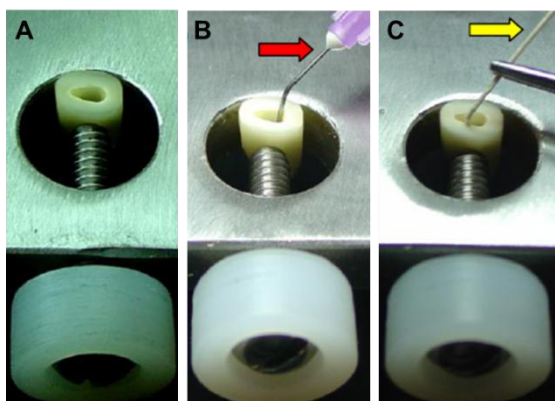


Figura 5. Espécimen disposto na plataforma de aço inoxidável (A). Irrigação com 1 mL de AD (B). Coleta microbiológica com cone de papel (C).

4.7. Preparo Químico-Mecânico

Para a realização dos procedimentos do PQM com utilização de limas rotatórias. Inicialmente foi feito um pré-alargamento dos terços cervicais e medio utilizando brocas Gates-Glidden na sequência 5, 4, 3 e 2 e em seguida os espécimes foram instrumentados até o comprimento de trabalho (15 mm) utilizando o sistema de limas rotatórias Mtwo (VDW, Munich, Alemanha) na sequência 10.04/15.05/20.06/25.06 (Fig. 6).



Figura 6. De esquerda à direita a sequência 10.04/15.05/20.06/25.06 das limas rotatórias do sistema Mtwo utilizadas durante o PQM.

4.8. Protocolos de Irrigação

A cada troca de brocas ou limas os canais foram irrigados com 1,0 mL de AD seguido de 0,5 ml de AD (G1-G4) ou CHX (G5-G8, Endogel, Essencial Pharma, Itapetininga, SP-Brasil). Após a última lima (25.06) todos os espécimes receberam irrigação com 5 mL de AD antes dos diferentes protocolos de irrigação e ativação final.

4.9. Protocolos de Irrigação e Ativação Final

A irrigação final seguiu de acordo com cada grupo experimental (AD ou EDTA, com US ou sem US). Após o PQM todos os espécimes receberam irrigação com mais 5 mL de AD. Assim o volume total de irrigação final foi padronizado para todos os grupos em 13 mL. (5 mL AD + 3 mL da SQA quelante + 5 mL AD).

4.10. Coleta microbiológica após PQM

Os espécimes que foram instrumentados com CHX receberam irrigação com solução de Tween-80 a 0,5% + lecitina de soja a 0,07%, que é neutralizador específico da CHX, por 1 min, a fim de se evitar sua ação residual nas coletas microbiológicas. Por fim, 1,0 mL de SS foi utilizado para irrigação final, antes de realizar a segunda coleta microbiológica do canal radicular (S2). Para S2, primeiramente foram utilizados tantos cones de papel quanto fossem necessários para absorver o líquido do canal, porém mantendo-o úmido, seguido de mais um cone de papel M que foi inserido no comprimento total do canal, permanecendo 1 min. Este cone é o que foi utilizado na análise microbiológica, sendo processado como já descrito para S1.

4.11. Coleta microbiológica após irrigação e ativação final

Para esta coleta (S3), primeiramente foi sugada a AD do canal de todos os grupos. Seguidamente, foram realizados os procedimentos de irrigação final e ativação segundo cada grupo experimental:

G1, G5- irrigação com 1 mL de AD renovada a cada minuto por mais duas vezes, totalizando 3 mL.

G3, G7- irrigação com EDTA como descrito para os grupos anteriores

G2, G6- irrigação com AD, sendo que a mesma foi ativada por 30 s com ponta de ultrassom inserida 2 mm aquém do comprimento de trabalho na potência de 30%. Com cada renovação o irrigante foi ativado novamente.

G4, G8- irrigação com EDTA, sendo que a mesma foi ativada e renovada como descrito para os grupos G2 e G6.

Finalmente todos os grupos receberam irrigação com 5 mL de AD. Seguidamente foram utilizados tantos cones de papel quanto fossem necessários para absorver o líquido do canal, porém mantendo-o úmido, seguido de mais um cone de papel M que foi inserido no comprimento total do canal, permanecendo 1 min, cone este que foi usado para a análise microbiológica, sendo processado como já descrito para S1 e S2.

4.12. Coleta após 7 dias

Após S2, as raízes foram mantidas em seus respectivos grupos para o preenchimento do canal com AD. Após o preenchimento total do canal, os

espécimes foram fixados em placas de 24 poços de fundo plano (Corning Cell Culture, Corning, EUA), contendo cera utilidade no fundo de cada poço para fixação dos espécimes. O orifício de entrada do canal foi selado também com cera utilidade previamente desinfetada com NaOCl 5,25% por 1 min, e este neutralizado com tiosulfato de sódio 0,6% por mais 1 min. Os poços foram preenchidos com caldo BHI até a superfície dos espécimes (Figura 7) e a seguir foi colocada uma gaze estéril umedecida em AD, e a placa tampada e vedada para ser levada à estufa a 37°C/7 dias.

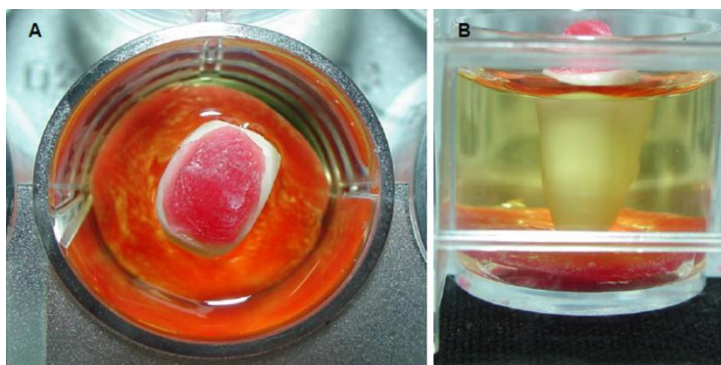


Figura 7. Vista superior (A) e lateral (B) do espécime fixado com cera utilidade no fundo do poço. O orifício de entrada do canal foi selado também com cera utilidade e os poços foram preenchidos com caldo BHI até a superfície dos espécimes.

Após os 7 dias de incubação foi realizada a última coleta (S4) e processada como já descrito para S1, S2 e S3.

4.13. Análise estatística

Antes da submissão dos dados obtidos nas diferentes coletas (S1, S2, S3 e S4) a uma análise estatística apropriada, a normalidade da distribuição dos dados foi verificada pelo teste Kolmogorov-Smirnov.

Como não houve normalidade, os dados foram submetidos à análise estatística não-paramétrica. Foi aplicado o teste de Kruskal-Wallis para cada um dos grupos comparando-se os tempos e para cada tempo, variando os grupos. Para a comparação par-a-par, foi utilizado o teste de Mann-Whitney. O nível de significância aplicado foi de 5%. Toda análise estatística foi realizada no programa BioEstat 5.3 (Belém, Pará-Brasil).

4. RESULTADOS

As médias e desvio padrão de UFC/mL em cada uma das coletas e para cada grupo são apresentados na Tabela 1.

A carga microbiana inicial dos espécimes (S1) foi semelhante para cada grupo experimental ($p > 0,05$). Após o PQM (S2) e após o uso de EDTA (S3) não foi possível recuperar *E. faecalis* de nenhum dos grupos.

A carga microbiana recuperada após irrigação final foi superior nos grupos que receberam AD durante o PQM e EDTA no final sem influência da ativação ($p > 0,05$). Já nos grupos onde foi utilizada CHX durante o PQM não foi possível recuperar microrganismos.

5. DISCUSSÃO

Um dos principais objetivos da terapia endodôntica é a desinfecção do sistema de canais radiculares, o que promoverá o reparo dos tecidos periodontais (Gomes et al. 1996, Gomes et al. 2004, Peters et al. 2001).

A escolha do microrganismo facultativo *E. Faecalis* justifica-se no fato de ser considerado por muitos autores como a espécie mais resistente da cavidade bucal e uma das possíveis causas do insucesso no tratamento endodôntico (Gomes et al. 1996, Cheung, Stock 1993).

Diversos modelos experimentais em dentina infectada têm sido propostos. A grande maioria deles utilizando dentina bovina, sendo que os túbulos dentinários dos dentes bovinos apresentam maior diâmetro comparado à dentina humana, o que poderia influenciar na capacidade de contaminação dos túbulos dentinários pelos microrganismos (Berber et al. 2006, Dametto et al. 2005). Assim, para o desenvolvimento deste estudo foi escolhido um modelo experimental em dentina radicular humana.

Após o PQM todos os grupos experimentais conseguiram deixar o canal livre de microrganismos, inclusive os que receberam AD durante o PQM. O que está de acordo com os resultados de Berber et al. (2006), onde independentemente da substância auxiliar utilizada durante o PQM, sempre será possível diminuir significativamente a carga bacteriana após PQM, sempre que seja utilizada uma quantidade importante do irrigante, porém o que nem sempre será possível é evitar a recontaminação do canal pelos microrganismos capazes de colonizar os túbulos dentinários, perpetuando assim a infecção.

Tabela 1. Média e desvio padrão de UFC/mL em cada uma das coletas para cada grupo experimental.

	S1	S2	S3	S4
G1 (AD + AD)	$1,18 \times 10^3 \pm 0,71 \times 10^3$ Aa	$0,00 \pm 0,00$ Ab	$0,00 \pm 0,00$ Ab	$1,08 \times 10^2 \pm 0,21 \times 10^3$ Ac
G2 (AD + AD + US)	$1,09 \times 10^3 \pm 0,83 \times 10^3$ Aa	$0,00 \pm 0,00$ Ab	$0,00 \pm 0,00$ Ab	$1,57 \times 10^2 \pm 0,11 \times 10^3$ Ac
G3 (AD + EDTA)	$1,26 \times 10^3 \pm 0,25 \times 10^3$ Aa	$0,00 \pm 0,00$ Ab	$0,00 \pm 0,00$ Ab	$1,31 \times 10^4 \pm 0,64 \times 10^4$ Bc
G4 (AD + EDTA + US)	$1,13 \times 10^3 \pm 0,28 \times 10^3$ Aa	$0,00 \pm 0,00$ Ab	$0,00 \pm 0,00$ Ab	$1,12 \times 10^4 \pm 0,33 \times 10^4$ Bc
G5 (CHX + AD)	$1,31 \times 10^3 \pm 0,17 \times 10^3$ Aa	$0,00 \pm 0,00$ Ab	$0,00 \pm 0,00$ Ab	$0,00 \pm 0,00$ Cb
G7 (CHX + AD + US)	$1,10 \times 10^3 \pm 0,59 \times 10^3$ Aa	$0,00 \pm 0,00$ Ab	$0,00 \pm 0,00$ Ab	$0,00 \pm 0,00$ Cb
G8 (CHX + EDTA)	$1,21 \times 10^3 \pm 0,52 \times 10^3$ Aa	$0,00 \pm 0,00$ Ab	$0,00 \pm 0,00$ Ab	$0,00 \pm 0,00$ Cb
G9 (CHX + EDTA + US)	$1,27 \times 10^3 \pm 0,21 \times 10^3$ Aa	$0,00 \pm 0,00$ Ab	$0,00 \pm 0,00$ Ab	$0,00 \pm 0,00$ Cb

AD- água destilada; US- ativação com ultrassôm; CHX- clorexidina gel 2%; EDTA- ácido etildiamino tetra-acético 17%; S1- coleta inicial; S2- coleta após o preparo químico-mecânico; S3- coleta após o uso de EDTA; S4- coleta após 7 dias. Letras maiúsculas diferentes mostram diferencia estatisticamente significatica entre os grupos para cada coleta; letras minúsculas diferentes mostram diferencia estatisticamente diferente entre as diferentes coletas dentro do mesmo grupo.

Após os 7 dias de incubação, foram coletadas UFC de todos os grupos que receberam AD durante o PQM, independente do protocolo utilizado na irrigação final, o que confirma a capacidade do *E. faecalis* de contaminar os túbulos dentinários e recontaminar a luz do canal principal.

Nossos resultados mostram que a irrigação final com EDTA e ativação US nos grupos que onde foi utilizada AD durante o PQM, provocou uma maior carga microbiana que aqueles grupos onde este protocolo não foi utilizado. Isto poderia ser explicado pelo fato de que os protocolos de irrigação e ativação final removem SL permitindo a proliferação dos microrganismos presentes nos tubulos dentinarios. Porém, os grupos que utilizaram CHX durante o PQM não apresentaram nível de carga microbiana alguma, o que pode ser explicado pela substantividade que esta substância apresenta. Nestes grupos a irrigação e ativação final mostram-se como um aliado na limpeza e remoção de SL.

6. CONCLUSÃO

Dentro das limitações da metodologia empregada e a partir dos resultados obtidos podemos concluir que:

- A utilização do US na irrigação final promoveu a remoção de SL, o que favoreceu a recontaminação do canal quando utilizada AD durante o PQM.
- A utilização de uma substância inerte durante o PQM favorece a recontaminação do canal devido à capacidade do *E. faecalis* de contaminar os tubulos dentinarios.

REFERÊNCIAS

1. 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.
2. Boyde A, Stewart AD. Scanning electron microscopy of the surface of developing mammalian dental enamel. *Nature* 1963; 198: 1102-3.
3. Burlison A, Nusstein J, Al Reader, Beck M. The in vivo evaluation of hand/rotary/ultrasound instrumentation in necrotic, human mandibular molars. *J. Endod* 2007; 33: 782-7.
4. Bystrom A, Claesson R, Sundqvist G. The antibacterial effect of camphorated paramonochlorophenol, camphorated phenol and calcium hydroxide in the treatment of infected root canals. *Endod Dent Traumatol* 1985; 1(5):170-5.
5. Byström A, Sundqvist G. Bacteriologic evaluation of the efficacy of mechanical root canal instrumentation in endodontic therapy. *Scand J Dent Res* 1981; 89(4):321-8.
6. Byström A, Sundqvist G. Bacteriologic evaluation of the effect of 0.5 percent sodium hypochlorite in endodontic therapy. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1983; 55(3):307-12.
7. Çalt S, Serper A. Time-dependent effects of EDTA on dentin structures. *J Endod* 2002; 28: 17-9.
8. Cameron JA. The use of ultrasonics in the removal of smear layer: a scanning electron microscope study. *J. Endod* 1983; 9: 289-92.
9. 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: 1361-6.
10. Chávez De Paz LE, Dahlén G, Molander A, Möller A, Bergenholtz G. Bacteria recovered from teeth with apical periodontitis after antimicrobial endodontic treatment. *Int Endod J* 2003; 36(7):500-8.
11. Cheung GS, Stock CJ. In vitro cleaning ability of root canal irrigants with and without endosonics. *Int Endod J* 1993; 26(6):334-43.

12. Spangberg L, Engström B, Langeland K. Biologic effects of dental materials 3. Toxicity and antimicrobial effect of endodontic antiseptics in vitro. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1973;36(6):856-71.-4.
13. Dametto FR, Ferraz CC, de Almeida Gomes BP, Zaia AA, Teixeira FB, de Souza-Filho FJ. In vitro assessment of the immediate and prolonged antimicrobial action of chlorhexidine gel as an endodontic irrigant against *Enterococcus faecalis*. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2005; 99: 768-72.
14. Denaly GM, Patterson SS, Miller CH, Newton CW. The effect of chlorhexidine gluconate irrigation on the root canal flora of freshly extracted necrotic teeth. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1982; 53: 518-522.
15. Di Lenarda R, Cadenaro M, Sbaizero O. Effectiveness of 1 mol L⁻¹ citric acid and 15% EDTA irrigation on smear layer removal. *Int Endod J* 2000; 33: 46-52.
16. Ferraz CCR. et al. In vitro assessment of the antimicrobial action and the mechanical ability of chlorhexidine gel as an endodontic irrigant. *J Endod* 2001; 27:452-5.
17. Ferraz CC, Gomes BP, Zaia AA, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. Comparative study of the antimicrobial efficacy of chlorhexidine gel, chlorhexidine solution and sodium hypochlorite as endodontic irrigants. *Braz Dent J* 2007; 18: 294-8.
18. Fukumoto Y, Kikuchi I., Yoshioka C., Kobayashi C, Suda H. An ex vivo evaluation of a new root canal irrigation technique with intracanal aspiration. *Int Endod J* 2006; 39: 93-99.
19. Goldman LB, Goldman M, Kronman JH, Lin PS. The efficacy of several irrigating solutions for endodontics: a scanning electron microscopic study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1981; 52: 197-204.
20. Gomes BP, Lilley JD, Drucker DB. Variations in the susceptibilities of components of the endodontic microflora to biomechanical procedures. *Int Endod J.* 1996;29(4):235-41.
21. Gomes BP, Montagner F, Berber VB, Zaia AA, Ferraz CC, de Almeida JF, Souza-Filho FJ. Antimicrobial action of intracanal medicaments on the external root surface. *J Dent.* 2009; 37:76-81.

22. Gomes BP, Pinheiro ET, Gadê-Neto CR, Sousa EL, Ferraz CC, Zaia AA, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. Microbiological examination of infected dental root canals. *Oral Microbiol Immunol* 2004; 19(2):71-6.
23. Gomes BPFA, Pinheiro ET, Jacinto RC, Zaia AA, Ferraz CC, Souza-Filho FJ. Microbial analysis of canals of root-filled teeth with periapical lesions using polymerase chain reaction. *J Endod.* 2008; 34: 537– 40.
24. Gomes BP, Vianna ME, Sena NT, Zaia AA, Ferraz CC, de Souza Filho FJ. In vitro evaluation of the antimicrobial activity of calcium hydroxide combined with chlorhexidine gel used as intracanal medicament. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2006; 102(4):544-50.
25. Gu LS, Kim JR, Ling J, Choi KK, Pashley DH, Tay FR. Review of contemporary irrigant agitation techniques and devices. *J Endod* 2009; 35: 791-804.
26. Hulsmann M, Heckendorff M, Lennon A. Chelating agents in root canal treatment: mode of action and indications for their use. *Int Endod J* 2003; 36:810-30.
27. Hulsmann M, Rummelin C, Schafers F. Root canal cleanliness after preparation with different endodontic handpieces and hand instruments: a comparative SEM. *J Endod* 1997; 23: 301–6.
28. Jadaa AA, Paqué F, Attin T, Zehnder M. Necrotic pulp tissue dissolution by passive ultrasonic irrigation in simulated accessory canals: impact of canal location and angulation. *Int Endod J* 2009; 42:59-65.
29. Jensen SA, Walker TL, Hutter JW, Nicoll BK. Comparison of the cleaning efficacy of passive sonic activation and passive ultrasonic activation after hand instrumentation in molar root canals. *J Endod* 1999; 25: 735-8.
30. Jiang LM, 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: 1372-6.
31. Kakehashi S, Stanley HR, Fitzgerald RJ. The effects of surgical exposures of dental pulps in germ-free and conventional laboratory rats. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1965; 20(3):340-9.
32. Leonardo MR. Preparo biomecânico dos canais radiculares. In: Leonardo MR, Leal JM. *Endodontia – Tratamento de canais radiculares*. 3.ed. São Paulo: Panamericana, 1998;15: 333-358.

33. Lin LM, Di Fiore PM, Lin J, Rosenberg PA. Histological study of periradicular tissue responses to uninfected and infected devitalized pulps in dogs. *J Endod* 2006; 32(1):34-8.
34. McComb D, Smith DC. A preliminary scanning electron microscopic study of root canals after endodontic procedures. *J endod* 1975; 1: 238-42.
35. Malvar G, Albergaria SJ; Lenzi HP; Pires SO; Correia A. Estudo da Ação do Edta Sobre a Camada Residual no Tempo de 1 e 3 Minutos Pesquisa Brasileira em Odontopediatria e Clínica Integrada, 2009; 9 : 367-372.
36. Molander A, Reit C, Dahlén G, Kvist T. Microbiological status of root-filled teeth with apical periodontitis. *Int Endod J* 1998; 31(1):1-7.
37. Möller AJ. Microbiological examination of root canals and periapical tissues of human teeth. Methodological studies. *Odontol Tidskr* 1966; 74(5):Suppl:1-380.
38. Möller AJ, Fabricius L, Dahlén G, Ohman AE, Heyden G. Influence on periapical tissues of indigenous oral bacteria and necrotic pulp tissue in monkeys. *Scand J Dent Res* 1981; 89(6):475-84.
39. Nair PN, Sjögren U, Figdor D, Sundqvist G. Persistent periapical radiolucencies of root-filled human teeth, failed endodontic treatments, and periapical scars. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1999; 87(5):617-27.
40. Oliveira DP, Barbizam JV, Trope M, Teixeira FB. In vitro antibacterial efficacy of endodontic irrigants against *Enterococcus faecalis*. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2007;103(5):702-6.
41. Peciuliene V, Reynaud AH, Balciuniene I, Haapasalo M. Isolation of yeasts and enteric bacteria in root-filled teeth with chronic apical periodontitis. *Int Endod J*. 2001;34(6):429-34.
42. Perez F, Rochd T, Lodter JP, Calas P, Michel G. In vitro study of the penetration of three bacterial strains into root dentine. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1993;76(1):97-103.
43. Pérez-Heredia M, Ferrer-Luque CM, González-Rodríguez MP, Martín-Peinado FJ, González-Lopez S. Decalcifying effect of 15% EDTA, 15% citric acid, 5% phosphoric acid and 2.5% sodium hypochlorite on root canal dentine. *Int Endod J* 2008; 41: 418-23.

44. Peters OA. Current challenges and concepts in the preparation of root canal systems: a review. *J Endod* 2004; 30(8):559-67.
45. Peters LB, Wesselink PR, Buijs JF, Van Wilkelhoff AJ. Viable bacteria in root dentinal tubules of teeth with apical periodontitis. *J Endod* 2001; 27(2):76-81.
46. Pinheiro ET, Gomes BP, Ferraz CC, Sousa EL, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. Microorganisms from canals of root-filled teeth with periapical lesions. *Int Endod J* 2003b; 36: 1–11.
47. Prado M, Gusman H, Gomes BP, Simão RA. Scanning electron microscopic investigation of the effectiveness of phosphoric acid in smear layer removal when compared with EDTA and citric acid. *J Endod* 2011; 37: 255-8.
48. Ruddle CJ. Hydrodynamic disinfection: tsunami endodontics. *Dent Today* 2007; 26:110-7.
49. Sabet NE, Lutfy RA. Ultrastructural morphologic evaluation of root canal walls prepared by two rotary nickel-titanium systems: a comparative study. *Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology & Endodontics* 2008; 106: 59-66.
50. Scelza MFZ, Antoniazzi JH, Scelza P. Efficacy of final irrigation-a scanning electron microscopic evaluation. *J Endod* 2000; 26: 355-8.
51. Schilder H. Cleaning and shaping the root canal. *Dent Clin North Am* 1974; 18: 269-296.
52. Sena NT, Gomes BP, Vianna ME, Berber VB, Zaia AA, Ferraz CC, Souza-Filho FJ. In vitro antimicrobial activity of sodium hypochlorite and chlorhexidine against selected single-species biofilms. *Int Endod J* 2006; 39(11):878-85.
53. Siqueira JF Jr, Rôças IN. Polymerase chain reaction-based analysis of microorganisms associated with failed endodontic treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2004; 97(1):85-94.
54. Sundqvist G, Figdor D, Persson S, Sjögren U. Microbiologic analysis of teeth with failed endodontic treatment and the outcome of conservative re-treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1998; 85(1):86-93.

55. Sundqvist G, Johansson E, Sjögren U. Prevalence of black-pigmented bacteroides species in root canal infections. *J Endod* 1989; 15(1):13-9.
56. Sundqvist G. Bacteriologic studies of necrotic dental pulps. Dissertation. Umea, Sweden, University of Sweden, 1976.
57. Sjögren U, Figdor D, Persson S, Sundqvist G. Influence of infection at the time of root filling on the outcome of endodontic treatment of teeth with apical periodontitis. *Int Endod J* 1997; 30(5):297-306.
58. Spangberg L, Engström B, Langeland K. Biologic effects of dental materials 3. Toxicity and antimicrobial effect of endodontic antiseptics in vitro. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1973; 36(6):856-71.
59. Spangberg L, Engström B, Langeland K. Biologic effects of dental materials 3. Toxicity and antimicrobial effect of endodontic antiseptics in vitro. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1973;36(6):856-71.
60. Torabinejad M, Handysides R, Khademi AA, Bakland LK. Clinical implications of the smear layer in endodontics: a review. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2002; 94: 658-66.
61. White RR, Hays GL, Janer LR. Residual antimicrobial activity after canal irrigation with chlorhexidine. *J. Endod* 1997; 23: 229-31.

ANEXO 1

Protocolo N° 128/2011 CEP/FOP-UNICAMP



**COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS**



CERTIFICADO

O Comitê de Ética em Pesquisa da FOP-UNICAMP certifica que o projeto de pesquisa "**Influencia das substancias químicas auxiliares e do protocolo de irrigação e ativação final na remoção de smear layer dos canais radiculares**", protocolo nº 128/2011, dos pesquisadores Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes, Daniel Rodrigo Herrera Morante e Zarina Tátia Barbosa Vieira dos Santos, satisfaz as exigências do Conselho Nacional de Saúde - Ministério da Saúde para as pesquisas em seres humanos e foi aprovado por este comitê em 25/11/2011.

The Ethics Committee in Research of the School of Dentistry of Piracicaba - State University of Campinas, certify that the project "**Assessment of auxiliary chemical substances and activation protocols in smear layer removal from root canals**", register number 128/2011, of Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes, Daniel Rodrigo Herrera Morante and Zarina Tátia Barbosa Vieira dos Santos, comply with the recommendations of the National Health Council - Ministry of Health of Brazil for research in human subjects and therefore was approved by this committee at 11/25/2011.

Profa. Dra. Livia Maria Andaló Tenuta
Secretária
CEP/FOP/UNICAMP

Prof. Dr. Jacks Jorge Junior
Coordenador
CEP/FOP/UNICAMP

Nota: O título do protocolo aparece como fornecido pelos pesquisadores, sem qualquer edição.
Notice: The title of the project appears as provided by the authors, without editing.

