

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE ODONTOLOGIA**

ELISE FAGUNDES CAPPELETTI

***Avaliação in vitro* do desempenho do DIAGNOdent pen na detecção de
Enterococcus faecalis em canais radiculares de dentes bovinos infectados**

Porto Alegre

2012

ELISE FAGUNDES CAPPELETTI

Avaliação *in vitro* do desempenho do DIAGNOdent pen na detecção de *Enterococcus faecalis* em canais radiculares de dentes bovinos infectados

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Odontologia da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para obtenção do título de Cirurgião-Dentista.

Orientador: Prof. Dr. Francisco Montagner

Porto Alegre

2012

CIP – Catalogação na Publicação

Cappelletti, Elise Fagundes

Avaliação in vitro do desempenho do DIAGNOdent pen na detecção de *Enterococcus faecalis* em canais radiculares de dentes bovinos infectados / Elise Fagundes Cappelletti. – 2012. 50 f. : il.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Odontologia, Curso de Graduação em Odontologia, Porto Alegre, BR-RS, 2012.

Orientador: Francisco Montagner

1. DIAGNOdent pen. 2. *Enterococcus faecalis*. 3. Fluorescência
I. Montagner, Francisco II. Título.

Dedico este trabalho ao meus
pais Elisabeth e Fernando Cappelletti
e a minha avó Geny Fagundes por serem
minha maior fonte de força e perseverança.

Ao orientador Francisco Montagner pela
sabedoria na orientação e por sua compreensão
e auxílio ao longo desses anos de trabalho
para alcançarmos a primeira de
muitas vitórias.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais que me deram a vida e me ensinaram a vivê-la com dignidade, que iluminaram os caminhos obscuros com afeto e dedicação para que eu trilhasse sem medo e cheia de esperança. A vocês que se doaram inteiros e renunciaram aos seus sonhos, para que, muitas vezes, eu pudesse realizar os meus. Amo vocês.

Em especial, à minha mãe Elisabeth, pois confiou em mim e me deu a oportunidade de concretizar e encerrar mais uma caminhada da minha vida. Sei que não mediu esforços pra que isto se realizasse; sem o amor, a compreensão, ajuda e confiança dela nada disso seria possível.

Ao meu pai Fernando por seu apoio, ensinamentos e valores passados.

À minha amada avó Geny por sua dedicação, amor, cuidado e orações que me fazem mais forte e entender que sou capaz de ir mais além.

Ao meu professor orientador Francisco Montagner, que simplesmente deveria ser professor, mas foi um mestre, transmitindo seus conhecimentos e experiências. Além de mestre foi amigo, apoiando, compreendendo, inspirando, provocando e incentivando a seguir em frente. Mesmo sabendo que seremos colegas, tenho certeza de que jamais deixarei de ser sua discípula. Discípula que guardará na memória os ensinamentos, o desprendimento e a pessoa. E, no coração, a gratidão e o respeito.

Aos professores por dedicar seu tempo e sua sabedoria para que minha formação fosse um aprendizado de vida. Em especial, aos professores Régis Burmeister dos Santos e Jonas de Almeida Rodrigues.

À esta Universidade que me acolheu e me proporcionou um ensino superior de excelência.

Aos meus familiares pelo carinho e atenção; pelas palavras certas nos momentos certos, sempre olhando o meu futuro com fé e entusiasmo.

Aos meus amigos pelo apoio, compreensão, companheirismo e por sempre estarem ao meu lado durante esta longa caminhada, tornado-a mais fácil.

Acredito que mais vale a tentativa de fazer algo, do que a espera que alguém a faça por nós; na tentativa de acertar, muitas vezes erramos. Nesses momentos recebemos a compreensão e a incompreensão, a ajuda e a crítica. Tudo isso foi

válido para o crescimento. Agora, depois de tanto trabalho, vivencio este momento tão aguardado e especial. A todos aqueles que contribuíram com a concretização deste sonho, meu mais profundo e sincero agradecimento.

“Não deixe que a saudade sufoque, que a rotina acomode, que o medo impeça de tentar. Desconfie do destino e acredite em você. Gaste mais horas realizando que sonhando, fazendo que planejando, vivendo que esperando, porque, embora quem quase morre esteja vivo, quem quase vive já morreu.”

Luiz Fernando Veríssimo

RESUMO

CAPPELLETTI, Elise Fagundes. **Avaliação in vitro do desempenho do DIAGNOdent pen na detecção de *Enterococcus faecalis* em canais radiculares de dentes bovinos infectados.** 2012. 50f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Odontologia) – Faculdade de Odontologia – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2012.

Objetivos: O objetivo deste estudo foi avaliar o desempenho do DIAGNOdent pen na identificação de microrganismos em canais radiculares de dentes bovinos infectados artificialmente, bem como identificar a descontaminação desses canais radiculares utilizando solução de hipoclorito de sódio 5,25% e solução de clorexidina 2%.

Metodologia: Foram utilizadas 40 raízes de incisivos bovinos extraídos. Os dentes foram distribuídos em 4 grupos, de acordo com o período de contaminação e a substância química empregada para sanificação do canal radicular infectado. Previamente à contaminação, as amostras foram avaliadas em 3 regiões (3, 8 e 12mm) com o DIAGNOdent pen utilizando uma ponta de fibra de safira para a quantificação da fluorescência da dentina radicular. As raízes foram imersas em meio de cultura BHI líquido e autoclavadas. Foi realizada a contaminação dos canais radiculares com *E. faecalis* pelo período de 7 e 14 dias. Após cada período de contaminação, foram coletadas amostras do canal radicular e cultivadas em meio de cultura BHI Agar, para determinar o número de unidades formadoras de colônia (UFCs). Neste momento, foi realizada novamente a quantificação da fluorescência. Os canais radiculares foram irrigados com as substâncias químicas por 5 minutos e após a neutralização dos canais realizou-se uma nova coleta microbiológica e repetiu-se a quantificação da fluorescência. Os resultados obtidos foram analisados estatisticamente através do programa SPSS 10.0 for Windows (SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA) e do programa BioEstat 5.0 (Fundação Mamirauá, Belém, Pará, Brasil). O nível de significância estabelecido para os testes foi de 5%.

Resultados: Biofilmes formados em um período de contaminação de 14 dias, obtiveram maiores valores de fluorescência, quando comparados ao momento inicial (sem contaminação) e após 7 dias de contaminação ($P < 0,05$). Observou-se que a solução de hipoclorito de sódio 5,25% e a solução de clorexidina 2% reduziram os valores de fluorescência das amostras, não havendo diferença estatisticamente significativa entre elas, independente do terço radicular ($P > 0,05$). Para as amostras em que o biofilme de *E. faecalis* foi induzido em 14 dias, observou-se diferença estatisticamente significativa entre a fluorescência da dentina antes da contaminação, após a contaminação e também após a desinfecção, independente do terço radicular e do irrigante utilizado (Teste de Friedman, $P < 0,05$).

Conclusões: O DIAGNOdent pen apresentou potencial para quantificar níveis de fluorescência diferentes quando a dentina radicular bovina apresentava-se contaminada ou não. As soluções irrigantes foram efetivas na redução da população microbiana em biofilmes de *E. faecalis* induzidos em curtos períodos de tempo.

Palavras-chave: DIAGNOdent pen. *Enterococcus faecalis*. Fluorescência.

ABSTRACT

CAPPELLETTI, Elise Fagundes. ***In vitro* evaluation of DIAGNOdent pen to detect *Enterococcus faecalis* in infected bovine root canals.** 2012. 50f. Final Paper (Graduation in Dentistry). Dental School – Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2012.

Objectives: The aim of this study was to evaluate the performance of the DIAGNOdent pen on the detection and quantification of microorganisms in root canals of bovine teeth artificially infected and on the identification of the root canals decontamination by using 5.25% sodium hypochlorite and 2% chlorhexidine solutions.

Methodology: A total of 40 roots from extracted bovine incisors were used. The teeth were divided into four groups according to the contamination time and to the solution used for sanitizing the infected root canals. Prior to contamination, the samples were evaluated in three depths (3, 8, and 12mm) with DIAGNOdent pen and a sapphire fiber tip for determining the fluorescence of root dentine. The roots were immersed in liquid BHI medium and autoclaved. The root canals were then contaminated for 7 and 14 days with *E. faecalis*. After each period of contamination, samples were collected from the root canals and grown in culture medium BHI agar to determine the number of colony forming units (CFUs). Also at this time, DIAGNOdent measurements were performed in each group. The canals were irrigated with the chemical solutions for 5 minutes. Then, after neutralization a new microbiological collection and fluorescence measurements were performed. The results were statistically analyzed using SPSS 10.0 for Windows (SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA) and BioEstat 5.0 (Mamirauá Foundation, Belém, Pará, Brazil). The level of significance was set at 5%.

Results: Biofilms formed after a 7 and 14-days period of contamination got higher values of fluorescence when compared to baseline (no contamination). ($P < 0.05$). It was observed that 5.25% sodium hypochlorite and 2% chlorhexidine solutions decreased the fluorescence values of the samples with no statistically significant difference between them, independent of the root third ($P > 0.05$). For samples in which biofilms of *E. faecalis* was formed after 14 days, statistically significant difference between the fluorescence of dentin before contamination, after contamination and also after disinfection was observed, independent of the root third and the solution used (Friedman test, $P < 0.05$).

Conclusions: DIAGNOdent pen showed potential to detect and quantify different levels of fluorescence of contaminated or not bovine root dentin. Chemical solutions were effective in reducing microbial colonies in biofilms of *E. faecalis* induced during short periods of time.

Keywords: DIAGNOdent pen. *Enterococcus faecalis*. Fluorescence.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Dentes dispostos em mesa metálica para a execução dos procedimentos de preparo do canal radicular.....19
- Figura 2 – Leitura do nível de fluorescência utilizando-se o aparelho DIAGNOdent pen 2190..... 21
- Figura 3 – Contaminação das amostras com *E. faecalis* ATCC 29212.....23
- Figura 4 – Coleta das amostras.....27
- Figura 5 – Fluxograma das etapas contendo os procedimentos realizados durante o experimento.....28
- Figura 6 – Gráfico demonstrativo dos valores de fluorescência da dentina bovina nos momentos inicial, após 7 dias de contaminação ou após 14 dias de contaminação.....32
- Figura 7 – Gráfico demonstrativo dos valores de fluorescência da dentina bovina nos momentos inicial, após 7 dias de contaminação e após o protocolo de descontaminação com solução de hipoclorito de sódio ou clorexidina líquida.....33
- Figura 8 – Gráfico demonstrativo dos valores de fluorescência da dentina bovina nos momentos inicial, após 14 dias de contaminação e após o protocolo de descontaminação com solução de hipoclorito de sódio ou clorexidina líquida.....34

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Distribuição das amostras em grupos, de acordo com o tempo de contaminação e substância química auxiliar utilizada..... 24

Tabela 2 – Contagem do número de unidades formadoras de colônia (UFCs) e percentual de redução microbiana em cada amostra antes e após os protocolos de desinfecção com NaOCl 5,25% ou CHX 2%, considerando-se 7 dias de contaminação bacteriana..... 36

Tabela 3 – Contagem do número de unidades formadoras de colônia (UFCs) e percentual de redução microbiana em cada amostra antes e após os protocolos de desinfecção com NaOCl 5,25% ou CHX 2%, considerando-se 14 dias de contaminação bacteriana 37

LISTA DE ABREVIATURAS

BHI	Brain Heart Infusion
CHX	Clorexidina líquida
<i>E. faecalis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
NaOCl	solução de hipoclorito de sódio
UFCs	unidades formadoras de colônia

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
1.1	INFECÇÃO DO SISTEMA DE CANAIS RADICULARES	12
1.2	SANIFICAÇÃO DO SISTEMA DE CANAIS RADICULARES	13
1.3	VERIFICAÇÃO DA PRESENÇA DE MICRORGANISMOS EM CANAIS RADICULARES.....	15
2	OBJETIVOS	17
3	MATERIAL E MÉTODOS	18
3.1	PREPARO DOS DENTES BOVINOS	18
3.2	DETERMINAÇÃO DO PADRÃO DE PICO DE FLUORESCÊNCIA PARA A DENTINA BOVINA	20
3.3	CONTAMINAÇÃO DOS ESPÉCIMES COM <i>ENTEROCOCCUS FAECALIS</i> ..	22
3.4	GRUPOS EXPERIMENTAIS	23
3.5	QUANTIFICAÇÃO E VERIFICAÇÃO DA PRESENÇA DA CONTAMINAÇÃO BACTERIANA	25
3.5.1	Contagem das unidades formadoras de colônia (UFCs)	25
3.5.2	Fluorescência a laser	28
3.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA	29
4	RESULTADOS	30
4.1	DIAGNODENT PEN	30
4.2	CONTAGEM DO NÚMERO DE UNIDADES FORMADORAS DE COLÔNIA (UFCS)	35
5	DISCUSSÃO	38
6	CONCLUSÃO	42
	REFERÊNCIAS	43
	ANEXO- DOCUMENTO DE APROVAÇÃO DO PROJETO DE PESQUISA	50

1 INTRODUÇÃO

1.1 INFECÇÃO DO SISTEMA DE CANAIS RADICULARES

Em casos de lesão periapical crônica, a persistência microbiana no sistema de canais radiculares pode ocorrer devido a falhas como: controle asséptico inadequado, cirurgia de acesso deficiente, limpeza insuficiente, obturação inadequada, ou quando há uma infiltração coronária (NAIR, 2006). No entanto, existem casos que resultam em fracasso apesar do tratamento ter seguido os padrões e técnicas corretas, sendo estes, normalmente associados à complexidade anatômica do sistema de canais radiculares. Microrganismos resistentes à terapia endodôntica ou mesmo aqueles que invadem o sistema de canais radiculares após o tratamento endodôntico são considerados os principais agentes a sustentar ou desenvolver uma lesão perirradicular (NAIR, 2006).

Já foi bem estabelecido que bactérias viáveis podem permanecer no sistema de canais radiculares após o tratamento endodôntico com efetivo preparo químico-mecânico (BYSTRÖM; SUNDQVIST, 1981, 1983, 1985). O *Enterococcus faecalis* vem sendo citado em uma série de estudos por sua habilidade de invadir os túbulos dentinários e provavelmente estas bactérias são capazes de resistir ao preparo químico-mecânico e medicação intracanal, podendo reinfetar o canal radicular obturado (AKPATA; BLECHMAN, 1982; HAAPASALO; ORSTAVIK, 1987, ORSTAVIK; HAAPASALO, 1990; LOVE, 2001).

O *E. faecalis* que faz parte de um grupo de bactérias gram-positivas anaeróbias facultativas, é o responsável por 80-90% das infecções humanas por enterococcus (RUOFF et al., 1990) e geralmente a única espécie encontrada em canais radiculares obturados (SUNDQVIST et al., 1998; DAHLÉN et al., 2000). Essa espécie é encontrada em um percentual muito baixo em dentes que apresentam necrose pulpar (SUNDQVIST, 1992).

Pinheiro et al. (2003) avaliaram os microrganismos presentes em 60 dentes com lesão periapical persistente e submetidos ao retratamento endodôntico. Na amostra microbiológica realizada após a desobturação, em 51 dentes havia a presença de microrganismos. Dentre as espécies bacterianas isoladas, 57,4% eram anaeróbios facultativos e 83,3% eram bactérias Gram-positivos. O *Enterococcus faecalis* foi o microorganismo mais encontrado.

O *E. faecalis* tem a habilidade de resistir à ação de agentes antimicrobianos, invadir tecidos e formar um biofilme em difíceis condições de crescimento, sendo este o fator que mais contribui para a sua permanência no canal radicular após o tratamento endodôntico (CALAS et al., 1998, KISHEN et al., 2006).

Sundqvist et al. (1998) relataram que o *E. faecalis* demonstrou ter a capacidade de sobreviver em canais radiculares e túbulos dentinários sem o suporte de outras bactérias, se aderir as paredes destes, acumular e formar comunidades organizadas em biofilmes. Biofilme é uma população de microorganismos que está concentrada em uma interface e é normalmente envolvida por uma matriz de polissacarídeos extracelulares (PEC). A população de bactérias no biofilme são altamente resistentes, tanto à fagocitose, à ação dos anticorpos e dos antimicrobianos, quando comparadas àquelas células que não estão organizadas em biofilmes (STUART et al., 2006). Conforme Donlan et al. (2002) e Sandoe et al. (2006), o metabolismo lento dos microorganismos nos biofilmes, assim como a matriz extracelular do biofilme pode impedir a efetividade de muitos antimicrobianos.

O *Enterococcus faecalis* tem sido utilizado em estudos in vitro que avaliam a eficácia de soluções irrigantes e medicações intracanal, devido ao seu alto nível de resistência aos agentes antimicrobianos e também a sua facilidade de cultivo laboratorial (GOMES et al., 2001; GOMES et al., 2003).

1.2 SANIFICAÇÃO DO SISTEMA DE CANAIS RADICULARES

O preparo químico-mecânico tem como objetivo promover a limpeza e a modelagem do sistema de canais radiculares através da instrumentação e irrigação com diferentes substâncias químicas (LEONARDO, 2008). Dessa forma, consegue-se obter uma conformação cônica no sentido ápice-coroa, tornando mais fácil a introdução de medicações intracanal e preenchimento com materiais obturadores (LEONARDO, 2008).

Embora instrumentação mecânica reduza aproximadamente 50% das bactérias intracanal, substâncias auxiliares são necessárias para ajudar na remoção da microbiota em áreas que os instrumentos não conseguem alcançar (LEE et al., 1990).

As substâncias químicas auxiliares são soluções empregadas durante o tratamento endodôntico com o objetivo de dissolver tecidos vivos ou necrosados, eliminar ou reduzir os microrganismos que não são alcançados pela instrumentação mecânica, lubrificar, quelar íons cálcio, suspender detritos advindos da instrumentação, sem causar irritação aos tecidos apicais (LOPES; SIQUEIRA JÚNIOR, 2010).

Dentre as substâncias mais utilizadas, podem ser citadas as soluções de hipoclorito de sódio (NaOCl) em suas diversas concentrações e o digluconato de clorexidina (CHX) (LEONARDO, 2008; LOPES; SIQUEIRA JÚNIOR, 2010; FERRAZ et al., 2001; VIANNA et al., 2007).

O hipoclorito de sódio é a substância química auxiliar mais popular e largamente utilizada, devido a sua habilidade de atuar frente a uma ampla gama de microrganismos e de dissolver matéria orgânica. As maiores desvantagens do NaOCl são o seu efeito citotóxico, quando injetado nos tecidos periapicais (SPÄNGBERG et al., 1973, PASHLEY et al., 1985, SPÄNGBERG et al., 1988); mal cheiro e gosto; capacidade de manchar roupas; potencial para causar corrosão (NEAL et al., 1983) e causar reações alérgicas (KAUFMAN; KEILA, 1989). A ação antimicrobiana e a toxicidade desta solução são proporcionais a sua concentração. A eficiência da desinfecção do NaOCl depende da concentração de ácido Hipocloroso dissociado (HClO) na solução, o qual exerce um efeito germicida pela ação oxidativa nos grupos sulfídricos das enzimas das bactérias. Como enzimas essenciais são inibidas, uma importante reação metabólica é interrompida, resultando na morte das células bacterianas (DYCHDALA, 1991).

O ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) é frequentemente usado para remover a *smear layer*, agindo como quelante. O EDTA desnatura proteínas ricas em cisteína e também pode desnaturar colágeno humano tipo I em dentina. Como o NaOCl é incapaz de remover matéria inorgânica, a utilização do EDTA é recomendada previamente à aplicação de medicação intracanal ou obturação endodôntica.

O digluconato de clorexidina (CHX) também vem sendo utilizado como solução química auxiliar, baseado em seu efeito antimicrobiano, capacidade de absorção nos tecidos dentais com gradual e prolongada liberação em níveis

terapêuticos e a baixa citotoxicidade quando comparada ao NaOCl. O mecanismo de ação da CHX está relacionado a sua concentração. A clorexidina se liga as células da parede dos microrganismos e causa extravasamento dos componentes intracelulares, em baixa concentração tem efeito bacteriostático e em alta apresenta efeito bactericida (Fardal & Turnbull, 1986).

Sena et al. (2006), realizaram um estudo com o objetivo de investigar a atividade antimicrobiana de Hipoclorito de Sódio com concentrações de 2,5% e 5,25% , e Clorexidina à 2% na forma gel e líquida como substâncias endodônticas irrigantes contra biofilmes monoespécies formados por *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Prevotella intermedia*, *Porphyromonas gingivalis* ou *Porphyromonas endodontalis*. Os agentes antimicrobianos na apresentação líquida, principalmente o NaOCl 5,25% e a solução de clorexidina 2% eliminaram os microrganismos de forma mais rápida.

1.3 VERIFICAÇÃO DA PRESENÇA DE MICRORGANISMOS EM CANAIS RADICULARES

Atualmente são empregados critérios clínicos para determinar o momento final do preparo químico-mecânico do sistema de canais radiculares, tais como os padrões de ampliação e modelagem. Entretanto, esses critérios não são capazes de demonstrar a permanência de áreas com bactérias e produtos bacterianos. Os métodos de cultura microbiana e métodos que envolvem a quantificação de ácidos nucléicos têm sido empregados para avaliar a presença de microrganismos após os procedimentos de desinfecção (GOMES; MONTAGNER, 2012). Estes métodos são dispendiosos e exigem uma etapa laboratorial. Portanto, seria interessante a utilização de um método para avaliar a presença de bactérias em tempo real em canais radiculares durante os procedimentos endodônticos (SAINSBURY et al., 2009).

O método de fluorescência a laser tem sido empregado para a detecção de lesões de cárie oclusal e proximal e também para a avaliação da presença de cálculo subgingival. No mercado, estão disponíveis os aparelhos DIAGNOdent (KaVo, Biberach, Alemanha) e o DIAGNOdent Pen (KaVo). Ambos dispositivos utilizam luz vermelha visível no comprimento de onda de 655nm para induzir a

fluorescência que é emitida pelos tecidos dentários. A emissão de fluorescência está associada ao conteúdo orgânico presente nos tecidos e a principal molécula responsável pela emissão de fluorescência é a porfirina bacteriana. Estas moléculas produzidas por microrganismos são conhecidas como fluoróforos. Diversos trabalhos demonstram a utilização destes aparelhos como auxiliares no diagnóstico de cárie (IWAMI et al., 2004; BADER; SHUGARS, 2004; HEINRICH-WELTZIEN, 2003; YANG; DUTRA, 2005). Diferentes estudos clínicos indicam ainda que o DIAGNOdent é sensível a níveis muito baixos de produtos bacterianos em lesões brancas de esmalte (WALSH; CLIFFORD, 2008), bem como na dentina coronal de lesões de cárie (IWAMI et al., 2004) e lesões da superfície radicular (VLACIC et al., 2007).

Apenas um estudo descreve a utilização deste sistema para avaliar a presença microbiana no interior do sistema de canais radiculares. Sainsbury et al. (2009) utilizaram o sistema de emissão de fluorescência induzida por laser em um estudo *in vitro* para verificar os valores normais de fluorescência da dentina radicular humana antes e após a contaminação com espécies microbianas. Os autores demonstraram que os valores de fluorescência das amostras foram alterados após a contaminação com *E. faecalis*, em curtos períodos de tempo.

O DIAGNOdent pen já vêm sendo utilizado na detecção de lesões de cárie e da presença de cálculo subgingival, contudo seria interessante testar sua capacidade de detectar bactérias intracanal, antes e após o preparo químico-mecânico. Este método difere dos métodos de cultura microbiana e de métodos que envolvem a quantificação de ácidos nucleicos, pois não exige uma etapa laboratorial, podendo ser utilizado diretamente na clínica.

2 OBJETIVOS

O objetivo do presente estudo foi avaliar o desempenho do DIAGNODent pen na identificação da presença e na quantificação de microrganismos em canais radiculares bovinos infectados artificialmente. Objetivou-se também a comparação da capacidade de desinfecção da solução de hipoclorito de sódio 5,25% e da solução de clorexidina 2%, através dos métodos de cultura microbiana e do DIAGNODent pen.

3 MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo foi aprovado pela Comissão de Pesquisa em Odontologia da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (COMPESQ-ODO) sob o número 22709 (Anexo).

A pesquisa foi realizada no Laboratório de Bioquímica e Microbiologia Oral (LABIM) da Faculdade de Odontologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Para o cálculo amostral foi utilizado o pacote estatístico BioEstat 5.0 (Fundação Mamirauá, Belém, Pará, Brasil), considerando os descritos por Sainsbury *et al.* (2009), sendo necessários 10 dentes para cada grupo.

3.1 PREPARO DOS DENTES BOVINOS

Foram selecionados para o estudo 40 incisivos bovinos com formação radicular completa. Os dentes foram coletados e armazenados em solução fisiológica após a exodontia.

As coroas foram separadas das raízes utilizando máquina de corte de precisão com um disco diamantado sob refrigeração utilizando uma cortadora metalográfica (Isomet 1000, Buehler Ltda., Lake Bluff, IL, EUA) ao nível da junção amelo-cementária. As raízes foram padronizadas no comprimento de 15 milímetros, utilizando-se um paquímetro digital para a mensuração. Marcas delimitando os terços radiculares (apical, médio e cervical) foram intencionalmente confeccionadas com disco de carburundum (KG Sorensen Ind. Com. Ltda., Barueri, SP).

Cada amostra foi submetida à remoção do tecido pulpar por meio do uso de brocas de Gates-Glidden #5 e #6 (Maillefer, Ballaigues, VD, Switzerland), complementada por uma lima endodôntica #130 (Maillefer, Ballaigues, VD, Switzerland). Durante o preparo, a cada utilização de uma nova lima ou broca, 5 mL de soro fisiológico foi levado ao canal com auxílio de uma seringa descartável BD de 10mL e agulha 20 x 5,5.

A *smear layer* formada durante o preparo foi removida lavando-se os dentes em EDTA 17% por 10 minutos, em NaOCl 5,25% por mais 10 minutos sob agitação constante (Agitador-Aquecedor FANEM, São Paulo, Brasil). As amostras

foram submetidas a uma lavagem com água corrente por 1 hora para a remoção dos possíveis resíduos de EDTA e NaOCl (FERRAZ et al., 2001).

A região apical foi selada através da aplicação de uma cobertura com resina composta (Magicfill, Vigodent, São Paulo, SP, Brasil), após o condicionamento ácido da superfície externa com ácido fosfórico 17% (Magicfill, Vigodent, São Paulo, SP, Brasil) e aplicação de sistema adesivo (Magicfill, Vigodent, São Paulo, SP, Brasil). Todos os procedimentos foram realizados em uma mesa metálica, conforme ilustrado na figura 1.

Figura 1 – Dentes dispostos em mesa metálica para a execução dos procedimentos de preparo do canal radicular, previamente à contaminação com o microrganismo *E. faecalis* ATCC 29212.



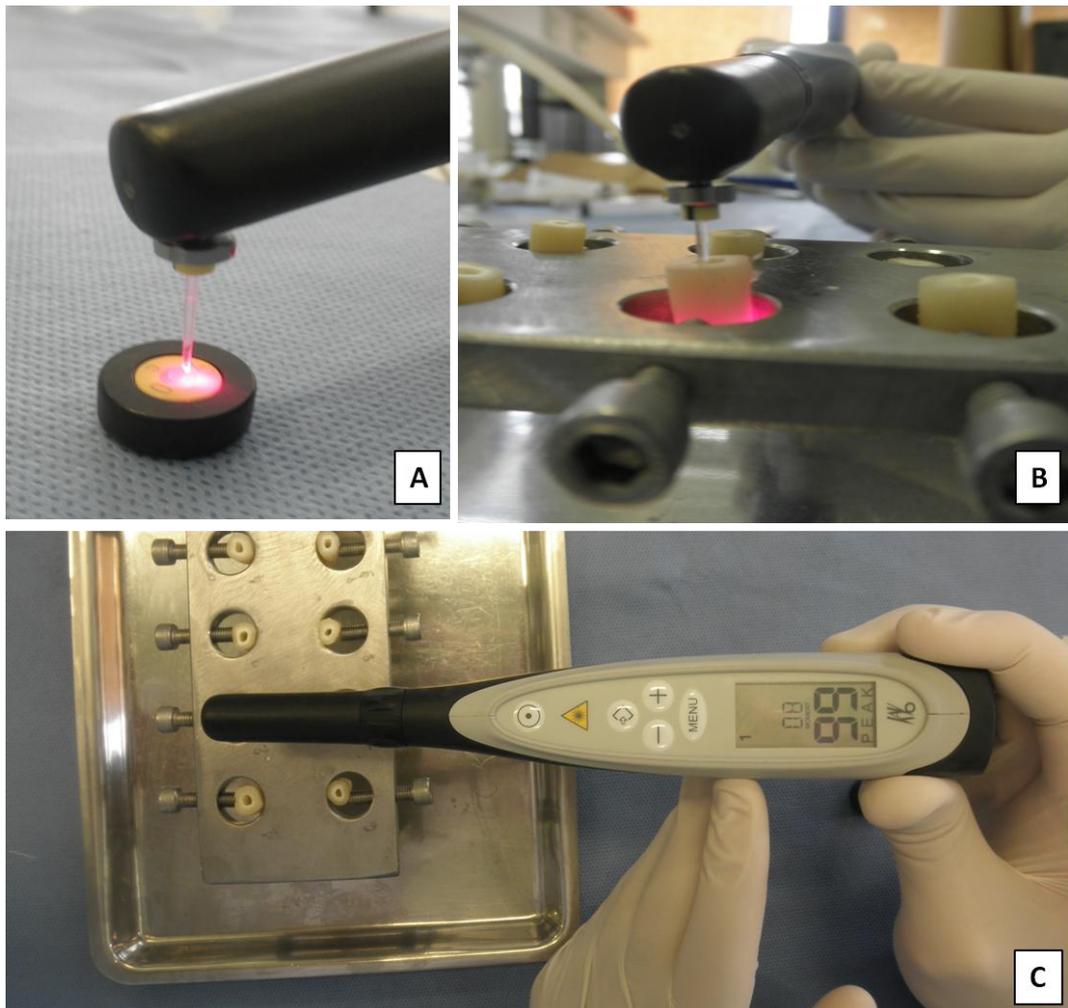
Fonte: do autor, 2012.

3.2 QUANTIFICAÇÃO DA FLUORESCÊNCIA DA DENTINA BOVINA

Previamente à contaminação com *Enterococcus faecalis*, todos os canais radiculares foram analisados utilizando o DIAGNOdent pen 2190 (DDpen, KaVo, Biberach, Alemanha) e um protótipo de uma ponta de fibra de safira, inicialmente designada para utilização em tecido periodontal, de acordo com as instruções do fabricante. Desta forma, foi quantificada a fluorescência para a dentina bovina não contaminada.

Para a análise de cada amostra, o aparelho foi calibrado utilizando um padrão cerâmico cuja fluorescência é conhecida, de acordo com as instruções do fabricante. Após a calibração, o excesso de umidade do canal radicular foi removido utilizando-se cones de papel esterilizados. A ponta de safira foi introduzida no canal radicular em 3 comprimentos distintos: 12 mm (correspondendo à medida do valor de fluorescência para o terço apical), 8 mm (correspondendo à medida para o valor de fluorescência para o terço médio) e 3 mm (correspondendo à medida do valor de fluorescência para o terço cervical). As leituras foram realizadas em triplicata. Foi registrado então o valor máximo de fluorescência para cada uma destas regiões (Figura 2). Previamente à leitura, a cada troca de amostra, a ponteira foi desinfetada utilizando-se solução de hipoclorito de sódio 5,25%, aplicada por 1 minuto.

Figura 2 – Leitura do nível de fluorescência utilizando-se o aparelho DIAGNOdent pen 2190: A) Calibração em bloco cerâmico de fluorescência conhecida; B) Leitura de fluorescência da dentina previamente à contaminação microbiana; C) Modo de visualização dos resultados no visor do aparelho DIAGNOdent pen.



Fonte: do autor, 2012.

3.3 CONTAMINAÇÃO DOS ESPÉCIMES COM *ENTEROCOCCUS FAECALIS*

As amostras foram autoclavadas por 30 minutos a 121°C e 1 atm em grupos de 5 dentes em frascos de vidro com tampas rosqueáveis contendo 5 mL do meio de cultura líquido de Brain Heart Infusion (BHI) (Difco BD, Sparks, MD, EUA). Finalmente, após a autoclavagem, os dentes foram mantidos por 48 horas em estufa de 10% de CO₂ a 37°C, para a comprovação da esterilidade dos mesmos (HAAPASALO; ØRSTAVIK, 1987).

Para a contaminação das raízes, foram utilizadas culturas puras de *E. faecalis* ATCC 29212 em meio de cultura líquido BHI (Difco BD, Sparks, MD, EUA). *E. faecalis* foi subcultivado em BHI Agar suplementado com 5% de sangue de carneiro desfibrinado e incubado a 37°C em estufa microbiológica 48 horas (Figura 3A). Decorrido o tempo de incubação, as colônias isoladas foram transportadas para um frasco de vidro contendo 60 mL de BHI Caldo, respeitando o padrão de concentração 0,5 da escala McFarland, com absorvância de 600 nm através do espectrofotômetro (FEMTO 432, Marconi, Piracicaba, SP) (Figura 3B e Figura 3C).

As amostras foram incubadas em estufa microbiológica a 37°C. A cada dois dias, na câmara de fluxo laminar, após a agitação do frasco de vidro contendo as amostras, 20 mL de BHI contendo a suspensão microbiana foi substituído por 20 mL de BHI esterilizado. Esta troca era realizada para evitar a saturação do meio de cultura. Os tempos de incubação em estufa a 37°C foram 7 ou 14 dias, dependendo do grupo que pertenciam.

O crescimento bacteriano foi verificado pela presença de turbidez do meio. A pureza das culturas foi confirmada através da morfologia das colônias plaqueadas em BHI Agar (Difco BD, Sparks, MD, EUA), coloração de Gram e teste de catalase.

Figura 3 – Contaminação das amostras com *E. faecalis* ATCC 29212: A) Colônias de *E. faecalis* ATCC 29212 em cultura pura, subcultivadas em meio BHI Ágar, a 37°C por 48 horas; B) Frasco contendo as amostras imersas em BHI Caldo com suspensão de *E. faecalis*; C) Amostra acondicionada em tubos plásticos individuais, contendo o código do grupo a que pertencia.



Fonte: do autor, 2012.

3.4 GRUPOS EXPERIMENTAIS

As 40 raízes bovinas foram divididas em 4 grupos experimentais, de acordo com o período de contaminação das amostras; e a substância química auxiliar utilizada. Estas informações estão descritas na Tabela 1.

Tabela 1- Distribuição das amostras em grupos, de acordo com o tempo de contaminação e substância química auxiliar utilizada.

Período de Contaminação	Substância	Grupo
7 dias (n=10)	NaOCl 5.25%	NaOCl-7d-c
		NaOCl-7d-m
		NaOCl-7d-a
14 dias (n=10)	NaOCl 5.25%	NaOCl-14d-c
		NaOCl-14d-m
		NaOCl-14d-a
7 dias (n=10)	CHX 2%	CHX-7d-c
		CHX-7d-m
		CHX-7d-a
14 dias (n=10)	CHX 2%	CHX-14d-c
		CHX-14d-m
		CHX-14d-a

* NaOCl-7d-c = biofilme de 7 dias após desinfecção com NaOCl, leitura do terço cervical; CHX-7d-c= biofilme de 7 dias após a desinfecção com Clorexidina, leitura do terço cervical; B-m = dentina não-infectada, leitura do terço médio; 7d-m = biofilme induzido em 7 dias, leitura do terço médio; NaOCl-7d-m = biofilme de 7 dias após desinfecção com NaOCl, leitura do terço médio; CHX-7d-m= biofilme de 7 dias após a desinfecção com Clorexidina, leitura do terço médio; B-a = dentina não-infectada, leitura do terço apical; 7d-a = biofilme induzido em 7 dias, leitura do terço apical; NaOCl-7d-a = biofilme de 7 dias após desinfecção com NaOCl, leitura do terço apical; CHX-7d-a= biofilme de 7 dias após a desinfecção com Clorexidina, leitura do terço apical.

* NaOCl-14d-c = biofilme de 14 dias após desinfecção com NaOCl, leitura do terço cervical; CHX-14d-c= biofilme de 14 dias após a desinfecção com Clorexidina, leitura do terço cervical; B-m = dentina não-infectada, leitura do terço médio; 14d-m = biofilme induzido em 14 dias, leitura do terço médio; NaOCl-14d-m = biofilme de 14 dias após desinfecção com NaOCl, leitura do terço médio; CHX-14d-m= biofilme de 14 dias após a desinfecção com Clorexidina, leitura do terço médio; B-a = dentina não-infectada, leitura do terço apical; 14d-a = biofilme induzido em 14 dias, leitura do terço apical; NaOCl-14d-a = biofilme de 7 dias após desinfecção com NaOCl, leitura do terço apical; CHX-14d-a= biofilme de 14 dias após a desinfecção com Clorexidina, leitura do terço apical

3.5 QUANTIFICAÇÃO E VERIFICAÇÃO DA PRESENÇA DA CONTAMINAÇÃO BACTERIANA

A quantificação e verificação da presença de contaminação bacteriana foi realizada através de contagem das unidades formadoras de colônias (UFCs) e através de fluorescência a laser, respectivamente.

3.5.1. Contagem das unidades formadoras de colônia (UFCs)

No interior da câmara de fluxo laminar, as amostras de cada grupo foram dispostas em uma plataforma metálica esterilizada. Cada raiz foi irrigada com 1,0 mL de solução salina estéril e a seguir foram coletadas amostras microbiológicas do canal radicular contaminado, com o auxílio de cones de papel absorventes esterilizados #45 (TANARI, Tanarian Industrial Ltda, Macapuru, AM).

Estes cones foram depositados individualmente em tubos esterilizados tipo Eppendorf (Elkay Products Inc.-Shrewsbury, USA) contendo 1 mL de BHI. Imediatamente após cada coleta, as amostras foram agitadas (Vortex MA 162, Marconi, Piracicaba) por 1 minuto e diluídas em série 1/10, 1/100, 1/1000 em BHI esterilizado. Vinte e cinco μL de cada diluição foram plaqueados em triplicata em BHI e incubados por 48 horas. Após o período de incubação, as colônias de microrganismos presentes nas placas foram contadas determinando-se as unidades formadoras de colônias (UFC). A pureza das culturas foi confirmada através da morfologia das colônias, coloração de Gram e teste de catalase.

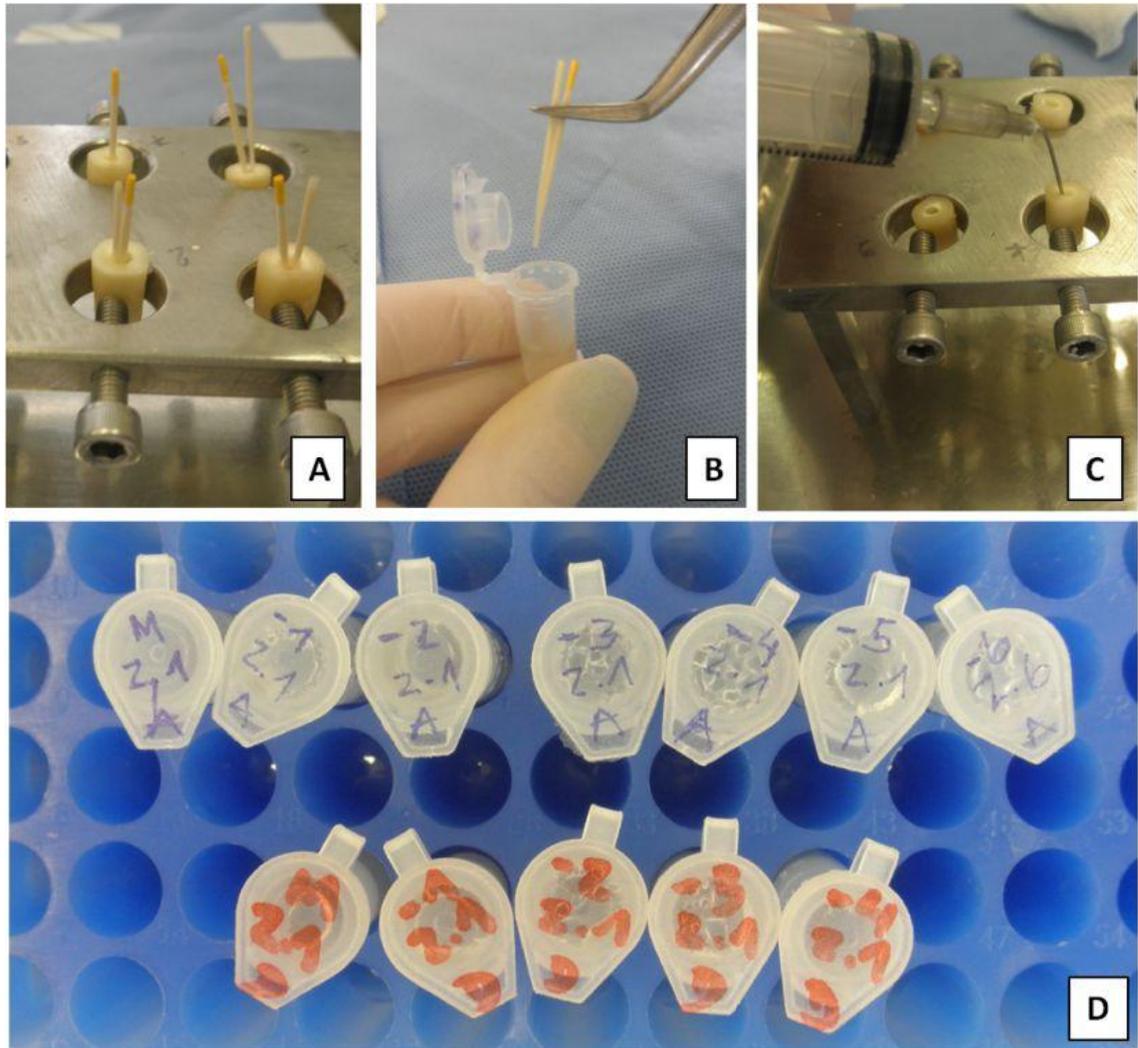
Para a obtenção do número de UFCs presentes na amostra por mL (amostra inicial) foi necessária a realização de cálculos. Como exemplo podemos citar a diluição de 1/100. Assim, considerando-se a diluição 10^{-2} , o valor correspondente a essa diluição é 100 vezes menor que o inicial (1,0 mL). A alíquota plaqueada foi de 25 μL , ou seja, 40 vezes menor que 1,0 mL. Portanto o fator de multiplicação do número de UFCs obtido seria 4.000.

A média do número de UFCs contado nas 3 diluições foi utilizada como valor final da contagem.

Os mesmos procedimentos adotados para contagem de UFCs foram realizados após a aplicação das substâncias químicas auxiliares (NaOCl ou CHX), considerando os dois períodos de contaminação (7 e 14 dias). Para a verificação da ação antimicrobiana da substância irrigadora, o canal radicular de cada amostra foi

preenchido com a substância irrigadora indicada, que permaneceu em seu interior por 5 minutos. A substância foi removida com 10mL de soro fisiológico esterilizado. Para a inativação do hipoclorito de sódio, foi empregada uma solução de tiosulfato de sódio 0,5% por 1 minuto, previamente à coleta microbiológica. Para a inativação de resíduos de clorexidina, foi empregada uma suspensão de lecitina 20% + tween 80 por 1 minuto, previamente à coleta microbiológica. Os procedimentos descritos acima estão representados na Figura 4.

Figura 4 – Coleta das amostras: A) Inserção de cones de papel esterilizados para coleta das amostras microbiológicas antes da inserção das substâncias químicas auxiliares; B) Acondicionamento dos cones de papel utilizados nas coletas em frascos de plástico contendo meio de cultura BHI Caldo (Amostra mãe); C) Inserção da substância auxiliar, seguida de aspiração e neutralização da mesma com agente apropriado; D) Após a coleta final, realizou-se a diluição da amostra-mãe para plaqueamento e contagem de UFCs.



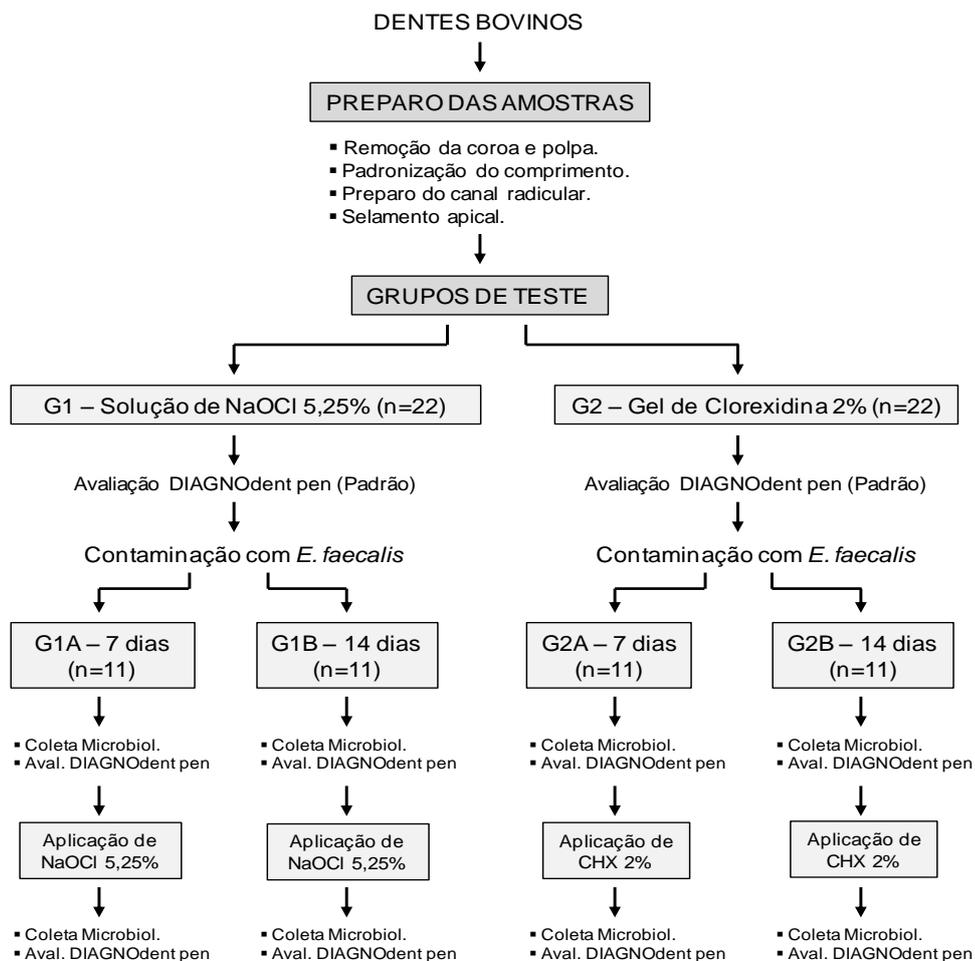
Fonte: do autor, 2012.

3.5.2 Fluorescência a laser

As amostras foram avaliadas com o DIAGNOdent pen utilizando a mesma ponta de fibra de safira após a contaminação com *E. faecalis* e também após a aplicação da solução química auxiliar, conforme descrito no item 3.2.

Abaixo, está ilustrado o fluxograma das etapas experimentais do presente estudo (Figura 5).

Figura 5 – Fluxograma das etapas contendo os procedimentos realizados durante o experimento.



Fonte: do autor, 2012.

3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos foram analisados estatisticamente através do programa SPSS 10.0 for Windows (SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA) e do programa BioEstat 5.0 (Fundação Mamirauá, Belém, Pará, Brasil). O nível de significância estabelecido para os testes foi de 5%.

Para a comparação da fluorescência dos terços cervical, médio e apical em amostras dos grupos onde a dentina não estava contaminada ou quando contaminada com biofilmes formados em 7 dias ou em 14 dias foi utilizado o Teste ANOVA de uma via.

A comparação entre a fluorescência entre os biofilmes formados considerando os períodos de 7 e 14 dias, considerando-se os terços individualmente, antes do preparo químico com NaOCl ou CHX foi avaliada através do Teste T para amostras independentes.

A comparação entre os valores de fluorescência inicial, após a contaminação e após a aplicação das substâncias químicas auxiliares em um mesmo período de tempo foi realizada através do Teste de Friedmann.

A comparação entre o percentual de redução microbiana obtido pelo NaOCl e pela CHX foi determinado pelo teste de ANOVA, seguido pelo teste de Tukey.

4 RESULTADOS

4.1 DIAGNODENT PEN

Foram obtidos valores de fluorescência semelhantes para dentina bovina, independente do terço radicular (One-way ANOVA, $P = 0,0106$). O valor médio de fluorescência para a dentina bovina não infectada foi de 2, para os terços cervical, médio e apical. Observou-se uma uniformidade na fluorescência da dentina radicular bovina, ao longo de toda a extensão do canal radicular.

Os biofilmes formados nos terços radiculares cervical, médio e apical foram similares quanto a sua fluorescência, sugerindo uma uniformidade ao longo de toda a extensão do canal radicular (One-way ANOVA, $P > 0,05$).

Biofilmes induzidos em 7 dias demonstraram valores de fluorescência de 6, 5 e 5 para os terços cervical, médio e apical, respectivamente. Os valores de fluorescência observados em amostras com biofilmes induzidos em 7 dias não foram diferentes dos observados para a dentina, previamente à contaminação, independentemente do terço radicular ($P > 0,05$) (Figura 6). Entretanto, quando o período de contaminação foi aumentado para 14 dias, observou-se valores maiores de fluorescência, quando comparados ao momento inicial (sem contaminação) e após 7 dias de contaminação ($P < 0,05$) (Figura 6). A média dos valores de fluorescência para biofilmes induzidos em 14 dias foram 28, 36 e 53 para os terços cervical, médio e apical, respectivamente.

Os valores de fluorescência obtidos em amostras de biofilme formado em 14 dias foram maiores que os observados para as amostras de 7 dias, em todos os terços do canal radicular.

Após a indução da formação do biofilme, as amostras foram divididas em dois grupos, que seriam submetidos à desinfecção com hipoclorito de sódio 5,25% ou clorexidina líquida 2%. Não foi observada diferença estatisticamente significativa entre os valores de fluorescência das amostras que compunham cada grupo antes do procedimento de desinfecção (Figura 6).

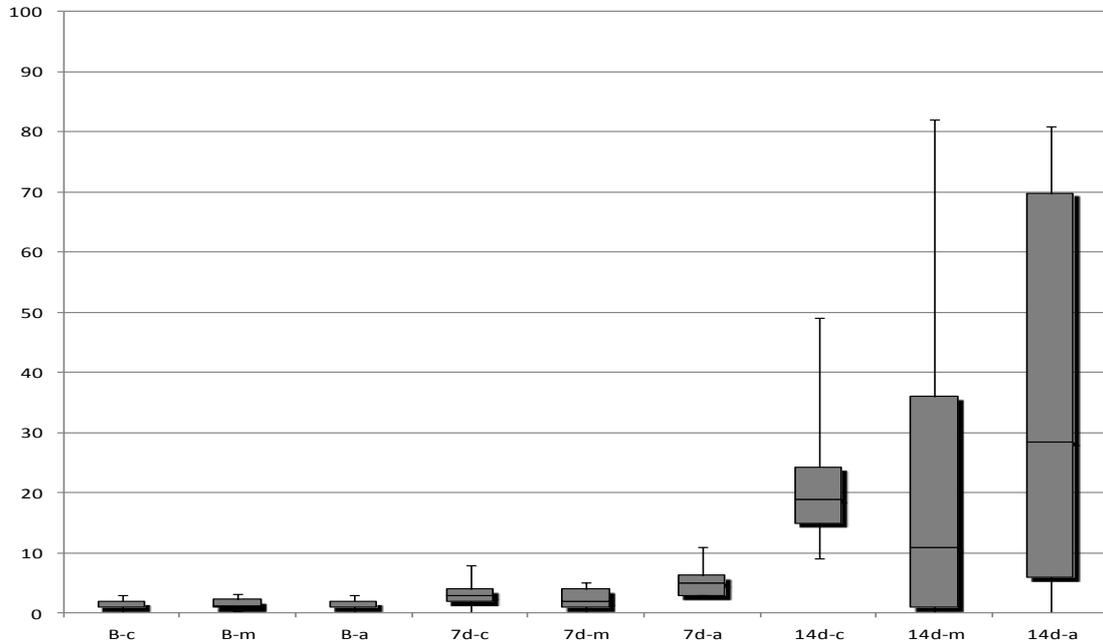
Após a exposição das amostras contendo biofilmes induzidos em 7 dias à solução de NaOCl 5,25%, obteve-se valores médios de fluorescência de 6, 6, e 4 para os terços cervical, médio e apical. Considerando este mesmo período, as amostras submetidas à irrigação com solução de clorexidina 2% demonstraram

valores médios de fluorescência de 3, 1 e 2 nos terços cervical, médio e apical. A redução da fluorescência promovida pela solução de clorexidina 2% foi superior àquela promovida pela solução de hipoclorito de sódio 5,25% em biofilmes induzidos em 7 dias, especialmente nos terços cervical e médio ($P < 0,05$) (Figura 7).

A média dos valores de fluorescência após o uso de NaOCl em biofilmes induzidos em 14 dias foi de 20, 13 e 15 para os terços cervical, médio e apical, respectivamente. Após a utilização da solução de clorexidina 2%, as médias de fluorescência nas amostras foram de 19, 17 e 28 nos terços cervical, médio e apical, respectivamente. Observou-se que tanto a solução de hipoclorito de sódio 5,25%, quanto a solução de clorexidina 2% reduziram os valores de fluorescência das amostras, não havendo diferença estatisticamente significativa entre elas, independente do terço radicular ($P > 0,05$) (Figura 8).

Para as amostras em que o biofilme de *E. faecalis* foi induzido em 14 dias, observou-se diferença estatisticamente significativa entre a fluorescência da dentina antes da contaminação, após a contaminação e também após a desinfecção, independente do terço radicular e do irrigante utilizado (Teste de Friedman, $P < 0,05$).

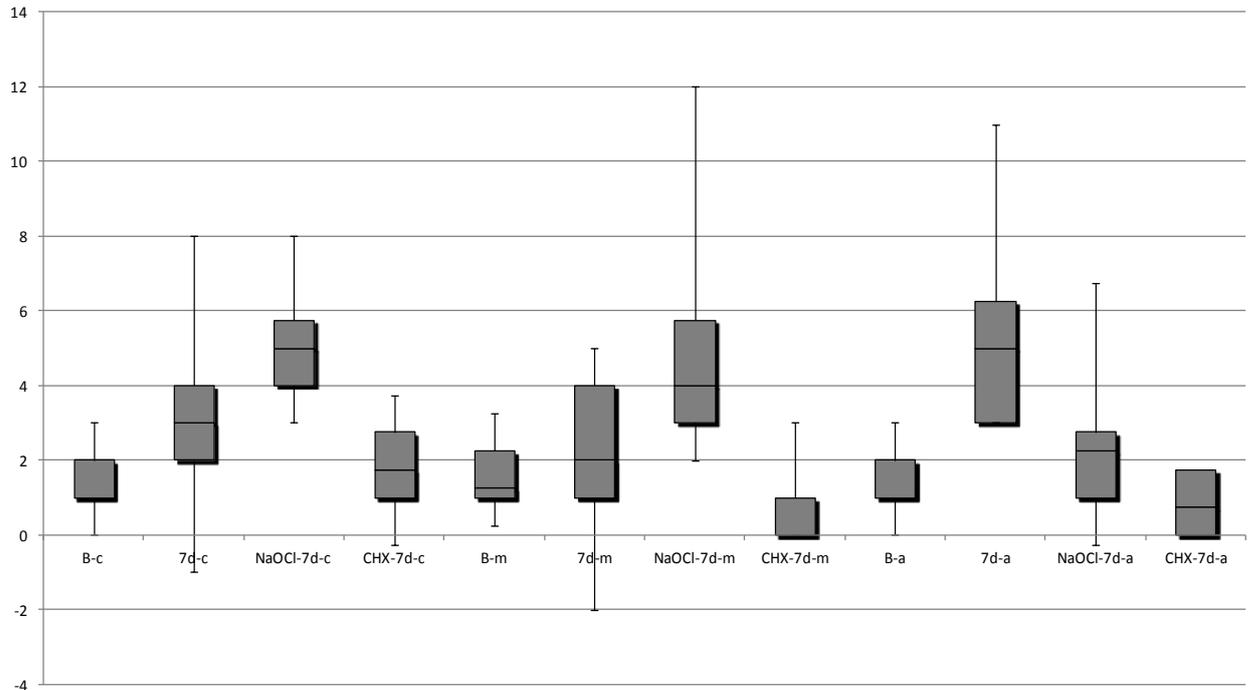
Figura 6 – Gráfico demonstrativo dos valores das medianas de fluorescência da dentina bovina nos momentos inicial (B), após 7 dias de contaminação (7d) ou após 14 dias de contaminação (14d), considerando-se os terços radiculares cervical (c), médio (m) e apical (a).



Fonte: do autor, 2012.

* B-c = dentina não-infectada, leitura do terço cervical; B-m = dentina não-infectada, leitura do terço médio; B-a = dentina não-infectada, leitura do terço apical; 7d-c = biofilme induzido em 7 dias, leitura do terço cervical; 7d-m = biofilme induzido em 7 dias, leitura do terço médio; 7d-a = biofilme induzido em 7 dias, leitura do terço apical; 14d-c = biofilme induzido em 14 dias, leitura do terço cervical; 14d-m = biofilme induzido em 14 dias, leitura do terço médio; 14d-a = biofilme induzido em 14 dias, leitura do terço apical.

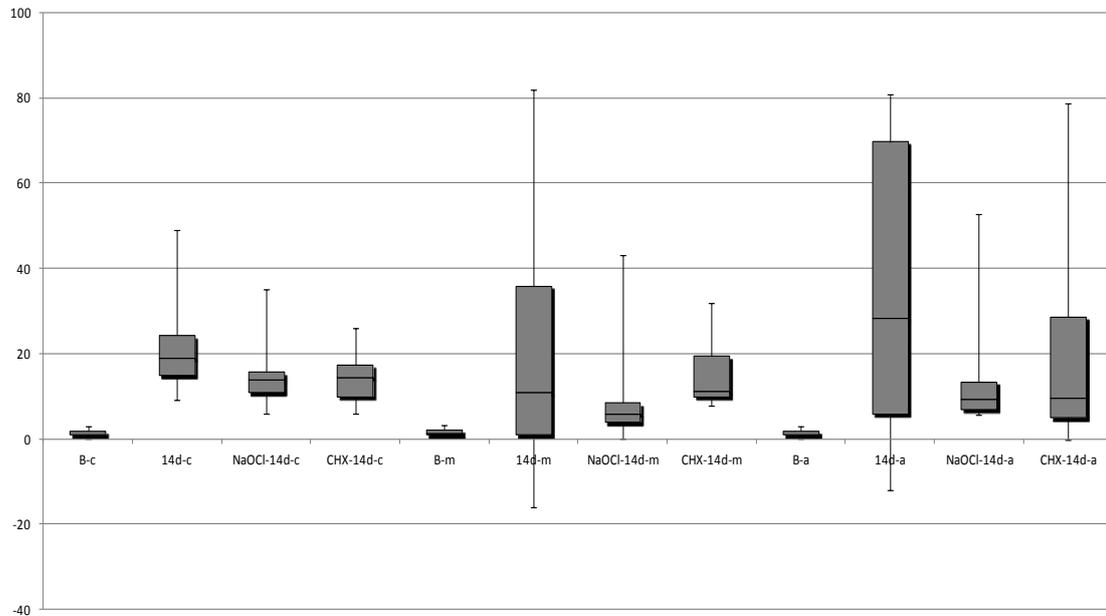
Figura 7 – Gráfico demonstrativo das medianas dos valores de fluorescência da dentina bovina nos momentos inicial (B), após 7 dias de contaminação (7d) e após o protocolo de descontaminação com solução de hipoclorito de sódio (NaOCl) ou clorexidina líquida (CHX), considerando-se os terços radiculares cervical (c), médio (m) e apical (a).



Fonte: do autor, 2012.

* B-c = dentina não-infectada, leitura do terço cervical; 7d-c = biofilme induzido em 7 dias, leitura do terço cervical; NaOCl-7d-c = biofilme de 7 dias após desinfecção com NaOCl, leitura do terço cervical; CHX-7d-c= biofilme de 7 dias após a desinfecção com Clorexidina, leitura do terço cervical; B-m = dentina não-infectada, leitura do terço médio; 7d-m = biofilme induzido em 7 dias, leitura do terço médio; NaOCl-7d-m = biofilme de 7 dias após desinfecção com NaOCl, leitura do terço médio; CHX-7d-m= biofilme de 7 dias após a desinfecção com Clorexidina, leitura do terço médio; B-a = dentina não-infectada, leitura do terço apical; 7d-a = biofilme induzido em 7 dias, leitura do terço apical; NaOCl-7d-a = biofilme de 7 dias após desinfecção com NaOCl, leitura do terço apical; CHX-7d-a= biofilme de 7 dias após a desinfecção com Clorexidina, leitura do terço apical.

Figura 8 – Gráfico demonstrativo das medianas dos valores de fluorescência da dentina bovina nos momentos inicial (B), após 14 dias de contaminação (14d) e após o protocolo de descontaminação com solução de hipoclorito de sódio (NaOCl) ou clorexidina líquida (CHX), considerando-se os terços radiculares cervical (c), médio (m) e apical (a).



Fonte: do autor, 2012.

* B-c = dentina não-infectada, leitura do terço cervical; 14d-c = biofilme induzido em 14 dias, leitura do terço cervical; NaOCl-14d-c = biofilme de 14 dias após desinfecção com NaOCl, leitura do terço cervical; CHX-14d-c= biofilme de 14 dias após a desinfecção com Clorexidina, leitura do terço cervical; B-m = dentina não-infectada, leitura do terço médio; 14d-m = biofilme induzido em 14 dias, leitura do terço médio; NaOCl-14d-m = bifilme de 14 dias após desinfecção com NaOCl, leitura do terço médio; CHX-14d-m= biofilme de 14 dias após a desinfecção com Clorexidina, leitura do terço médio; B-a = dentina não-infectada, leitura do terço apical; 14d-a = biofilme induzido em 14 dias, leitura do terço apical; NaOCl-14d-a = bifilme de 7 dias após desinfecção com NaOCl, leitura do terço apical; CHX-14d-a= biofilme de 14 dias após a desinfecção com Clorexidina, leitura do terço apical.

4.2 CONTAGEM DO NÚMERO DE UNIDADES FORMADORAS DE COLÔNIA (UFCS)

Após o período de incubação, todas as colônias cultivadas a partir das amostras apresentaram a mesma morfologia, sugerindo que não havia presença de contaminantes externos.

O número de UFCs obtido em biofilmes de 7 dias foi superior àquele observado para biofilmes de 14 dias (Teste T de Student, $P < 0,05$).

Nos dentes que continham biofilmes formados em 7 dias, a solução de hipoclorito de sódio 5,25% e a clorexidina líquida 2% foram capazes de produzir redução microbiana de 99,23% e 100%, respectivamente. Não foi observada diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($P > 0,05$) (Tabela 2).

Em biofilmes de 14 dias, observou-se uma redução no número de UFCs de 99,67% e de 99,86% para a solução de hipoclorito de sódio 5,25% e para a clorexidina líquida 2%, respectivamente ($P > 0,05$) (Tabela 3).

Tabela 2– Contagem do número de unidades formadoras de colônia (UFCs) e percentual de redução microbiana em cada amostra antes e após os protocolos de desinfecção com NaOCl 5,25% ou CHX 2%, considerando-se 7 dias de contaminação bacteriana.

Solução de NaOCl 5.25%				Solução de CHX 2%			
AMOSTRA	x10 ⁺⁴ UFCs/mL		REDUÇÃO %	AMOSTRA	x10 ⁺⁴ UFCs/mL		REDUÇÃO %
	ANTES	APÓS			ANTES	APÓS	
1	204,60	3,12	98,48	1	13060,00	0,22	100,00
2	3120,00	2,68	99,91	2	2908,80	21,36	99,27
3	3600,00	4,17	99,88	3	53,80	0,00	100,00
4	320,00	12,79	96,00	4	2794,67	0,00	100,00
5	800,00	0,82	99,90	5	8640,00	0,00	100,00
6	1080,00	2,42	99,78	6	6860,00	0,00	100,00
7	1920,00	12,87	99,33	7	2340,00	0,04	100,00
8	68,00	15,78	76,79	8	35880,00	0,02	100,00
9	1600,00	13,88	99,13	9	133840,0	0,15	100,00
10	1200,00	140,40	88,30	10	31300,00	0,00	100,00
Mediana	1140,00	8,48	99,23	Mediana	7750,00	0,01	100,00
Mínimo	68,00	0,82	76,79	Mínimo	53,80	0,00	99,27
Máximo	3600,00	140,40	99,91	Máximo	133840,0	21,36	100,00

Tabela 3– Contagem do número de unidades formadoras de colônia (UFCs) e percentual de redução microbiana em cada amostra antes e após os protocolos de desinfecção com NaOCl 5,25% ou CHX 2%, considerando-se 14 dias de contaminação bacteriana.

Solução de NaOCl 5.25%				Solução de CHX 2%			
AMOSTRA	x10 ⁺⁴ UFCs/mL		REDUÇÃO %	AMOSTRA	x10 ⁺⁴ UFCs/mL		REDUÇÃO %
	ANTES	DEPOIS			ANTES	DEPOIS	
1	10,62	0,520	95,10	1	7,44	0,320	95,70
2	24,00	0,600	97,50	2	270,93	0,001	100,00
3	226,00	0,240	99,89	3	3,24	0,002	99,93
4	268,00	0,030	99,99	4	3,78	0,005	99,86
5	36,00	0,035	99,90	5	3,66	0,004	99,90
6	3,24	0,480	85,19	6	16,08	0,022	99,86
7	96,00	0,320	99,67	7	72,00	0,005	99,99
8	ND	0,480	ND	8	52,00	0,321	99,38
9	128,00	0,038	99,97	9	0,88	0,001	99,86
10	6,02	0,080	98,67	10	48,00	0,178	99,63
Mediana	36,00	0,28	99,67	Mediana	11,76	0,01	99,86
Mínimo	3,24	0,03	85,19	Mínimo	0,88	0,00	95,70
Máximo	268,00	0,60	99,99	Máximo	270,93	0,32	100,00

5 DISCUSSÃO

Os dentes bovinos foram empregados no estudo por serem de fácil obtenção e apresentam um padrão mais coerente de configuração da microanatomia, favorecendo a padronização do substrato base para a pesquisa (CAMARGO et al., 2007). Schmaltz et al. (2001) relatam que a variabilidade no padrão de configuração da dentina bovina é mais homogêneo quando comparada à dentina humana.

Para a avaliação da alteração na fluorescência de dentina contaminada, é necessário avaliar a fluorescência da dentina sem a presença de contaminantes. De acordo com os resultados do presente estudo, a dentina de canais radiculares de dentes bovinos demonstrou um valor médio de fluorescência igual a 2. Sainsbury *et al.* (2009) demonstraram valores de fluorescência próximos a 5 quando a fluorescência da dentina radicular humana foi mensurada. Entretanto, os autores não consideraram as diferentes profundidades do canal radicular ao realizarem a avaliação. No presente estudo, não se observou variação de fluorescência quando os terços cervical, médio e apical foram acessados com a ponta de leitura. Observa-se assim uma uniformidade na fluorescência da dentina radicular bovina, ao longo de toda a extensão do canal radicular. Pode-se sugerir que há uma similaridade nos valores de fluorescência da dentina radicular de dentes bovinos e humanos. Embora ocorram variações no diâmetro e na densidade de túbulos dentinários nas diferentes regiões do canal radicular (CARRIGAN et al., 1984), parece que a fluorescência da dentina está associada às características de constituição do tecido dentinário e não a sua configuração anatômica. Estudos de Shilke et al. (2007) e Camargo et al. (2007) não observaram diferença estatisticamente significativa entre o número de túbulos dentinários/unidade de área quando as dentinas coronária e radicular humana e bovina foram comparadas.

De acordo com Costerton (2001), biofilmes são populações de células aderidas de forma irreversível a superfícies inanimadas ou vivas, enclausuradas em matrizes de substâncias extracelulares, proteínas, polissacarídeos e ácidos nucléicos. As bactérias organizadas em biofilmes demonstram comportamentos diferenciados daquele observados em células microbianas isoladas (COSTERTON, 2001). As cepas de *Enterococcus faecalis* têm a capacidade de se organizar em

biofilmes, desenvolvendo estruturas complexas que recobrem as paredes do canal radicular (DUGAN; SEDGLEY, 2007).

Fatores nutricionais, disponibilidade de ferro e gás carbônico, osmolaridade, pH e temperatura são fatores que influenciam as características dos biofilmes formados por cepas de *Enterococcus* spp. (MOHAMED; HUANG, 2007). O fator tempo parece ser importante na formação dos biofilmes de *E. faecalis* (WANG et al., 2012). O número de UFCs obtidos no presente estudo após a coleta inicial em biofilmes induzidos em 14 dias foi menor do que aquele observado para biofilmes formados em 7 dias. A maior complexidade das estruturas extracelulares que envolveriam tais microrganismos poderia reduzir o número de células passíveis de serem removidas durante o procedimento de coleta utilizando pontas de papel absorvente. Da mesma forma, biofilmes mais velhos podem apresentar um número de células não-viáveis maiores que as presentes em biofilmes mais jovens. No estudo também observou-se que biofilmes formados em 7 dias apresentaram valores de fluorescência similares à dentina bovina e inferiores àqueles formados após 14 dias de incubação. Bactérias Gram-positivas demonstram baixas taxas de emissão de fluorescência (SAINSBURY et al., 2009). Assim, a escolha de microrganismos que apresentem baixa fluorescência permitiu a observação de alterações na fluorescência à medida que ocorreu acréscimo no tempo de infecção. Tal resultado pode estar associado ainda à baixa concentração de fluoróforos produzidas pelas células microbianas, abaixo dos limites de detecção do método. Estes dados não são concordantes com os resultados descritos por Sainsbury et al (2009), onde valores de fluorescência próximos a 20 foram obtidos para biofilmes de *E. faecalis* induzidos após 7 dias de inoculação.

Embora o fator tempo possa influenciar nas características dos biofilmes de *E. faecalis*, a localização no interior do canal radicular não parece influenciar o número de UFCs e a fluorescência associada aos biofilmes. No presente estudo, os biofilmes formados nos terços cervical, médio e apical demonstram ser uniformes, pois os valores de fluorescência não se alteraram ao longo de todo o canal radicular.

O preparo mecânico isolado dos canais radiculares não consegue atingir todas as áreas do sistema de canais radiculares, permanecendo uma quantidade significativa de locais não instrumentados, onde permanecem bactérias e restos teciduais (PETERS et al., 2001). Torna-se necessário associar uma substância

química auxiliar que favoreça a sanificação do sistema de canais radiculares, favorecendo a remoção de tecido pulpar e de microrganismos.

O objetivo do presente estudo foi acessar as propriedades antimicrobianas da solução de hipoclorito de sódio 5,25% e da solução de clorexidina 2% frente a biofilmes de *E. faecalis*, sem a utilização do preparo mecânico com instrumentos endodônticos. Senna *et al* (2006) demonstraram ação antimicrobiana similar entre a solução de NaOCl 5,25% e a solução de CHX 2% frente a biofilmes de *E. faecalis*, mesmo em períodos de 30 segundos. Embora apresentem efeito antimicrobiano similar, o mecanismo de ação do NaOCl e da CHX são diferentes. Enquanto que as soluções de NaOCl apresentam elevado pH e são capazes de desnaturar proteínas das membranas celulares, as soluções de CHX atuam por alteração na osmolaridade da célula bacteriana (ESTRELA *et al.*, 2009; FERRAZ *et al.*, 2001; GOMES *et al.*, 2003). Os níveis de fluorescência dos biofilmes e o número de UFCs de *E. faecalis* recuperadas dos canais radiculares foram reduzidos após a exposição às substâncias químicas auxiliares. Em amostras onde o biofilme foi induzido em 7 dias, a redução da fluorescência promovida pela solução de CHX 2% foi superior àquela promovida pela solução de NaOCl 5,25%, especialmente nos terços cervical e médio. Efeitos similares de redução de fluorescência e UFCs foram obtidos com o uso das soluções de NaOCl e CHX para biofilmes induzidos em 14 dias. Embora apresentem mecanismos de ação diferenciados, tanto o NaOCl quanto a CHX foram efetivos na redução microbiana em canais radiculares infectados com *E. faecalis*, concordando com os resultados de Gomes *et al.* (2001) e Berber *et al.* (2006).

As substâncias químicas auxiliares foram capazes de reduzir significativamente os níveis de contaminação no interior de canais radiculares bovinos infectados com biofilmes de *E. faecalis* induzidos em 7 e 14 dias. Wang *et al.* (2012) observaram diferença do efeito das substâncias químicas auxiliares entre biofilmes produzidos após 1 dia e em biofilmes produzidos após 30 dias de contaminação. A divergência de resultados pode estar associada à diferença entre os períodos de contaminação avaliados. No presente estudo, a redução microbiana avaliada corresponde aos microrganismos presentes apenas na luz do canal radicular. Wang *et al.* (2012) avaliaram através de microscopia confocal a laser a

viabilidade dos microrganismos que estavam presentes também no interior de túbulos dentinários.

Cabe destacar novamente que, quando se utiliza o método do DIAGNOdent para a avaliação de biofilmes induzidos em curtos períodos de tempo, não é possível determinar se a fluorescência observada é apenas emitida pela dentina ou pelos microrganismos constituintes do biofilme. Os resultados sugerem ainda que biofilmes induzidos em 7 dias podem não ter uma carga microbiana suficiente para produzir moléculas de fluorescência em uma concentração capaz de ser detectada pela sonda do DIAGNOdent. São necessários estudos adicionais para determinar se a fluorescência captada pode ser emitida apenas pela dentina e microrganismos presentes na superfície de dentina ou mesmo no interior dos túbulos dentinários.

A capacidade de detecção da redução dos níveis de fluorescência após a utilização de substâncias químicas auxiliares demonstra que o DIAGNOdent parece ser uma ferramenta interessante como auxiliar no controle do padrão de infecção do sistema de canais radiculares. Torna-se necessário desenvolver sondas que apresentem maior flexibilidade e menores diâmetros para que possam ser utilizadas no interior dos canais radiculares previamente a sua ampliação.

6 CONCLUSÃO

A partir dos resultados do presente estudo pode-se concluir que:

- a) o DIAGNOdent pen apresentou potencial para detectar e quantificar níveis de fluorescência diferentes quando a dentina radicular bovina apresentava-se contaminada ou não.
- b) Biofilmes de *E. faecalis* apresentaram valores de fluorescência superiores aos da dentina radicular, especialmente após 14 dias de formação.
- c) A solução de hipoclorito de sódio 5,25% e a solução de clorexidina gel 2% foram efetivas na redução do número de bactérias da população microbiana em biofilmes de *E. faecalis* induzidos em curtos períodos de tempo.

REFERÊNCIAS

- AKPATA, E.S.; BLEACHMAN, H. Bacterial invasion of pulpal dentin wall in vitro. **Journal of Dental Research**, Chicago, v. 61, no. 2, p. 435-438, Feb.1982.
- ARIAS-MOLIZ, M.T. et al. Enterococcus faecalis biofilms eradication by root canal irrigants. **Journal of Endodontics**, New York, v. 35, no. 5, p. 711-714, 2009.
- BADER, J.D.; SHUGARS, D.A. A systematic review of the performance of a laser fluorescence device for detecting caries. **Journal of the American Dental Association**, Chicago, v. 135, no. 10, p. 1413–1426, Oct. 2004.
- BYSTRÖM, A.; CLAESON, R.; SUNDQVIST, G. The antibacterial effect of camphorated paramonochlorophenol, camphoratedphenol and calcium hydroxide in the treatment of infected root canals phenol. **Endodontics and Dental Traumatology**, Copenhagen, v. 1, no. 5, p. 170–175, Oct. 1985.
- BYSTRÖM, A.; SUNDQVIST, G. Bacteriologic evaluation of the effect of 0.5 per cent sodium hypochlorite in endodontic therapy. **Oral Surgery, Oral Medicine and Oral Pathology**, St. Louis, v. 55, no. 3, p. 307-312, Mar. 1983.
- BYSTRÖM, A.; SUNDQVIST, G. Bacteriologic evaluation of the efficacy of mechanical root canal instrumentation in endodontic therapy. **Scandinavian Journal of Dental Research**, Copenhagen, v. 89, no. 4, p. 321-328, Aug. 1981.
- BYSTRÖM, A.; SUNDQVIST, G. The antibacterial action of sodium hypochlorite and EDTA in 60 cases of endodontic therapy. **Internacional Endodontic Journal**, Oxford, v. 18, no. 1, p. 35-40, Jan. 1985.
- CALAS, P. et al. In vitro adhesion of two strains of *Prevotella nigrescens* to the dentin of the root canal: the part played by different irrigation solutions. **Journal of Endodontics**, Chicago, v. 24, no. 2, p. 112-115, Feb.1998.
- CAMARGO, C.H.R. et al. Topographical, diametral and quantitative analysis of dentin tubules in the root canals of human and bovine teeth. **Journal of Endodontics**, New York, v. 33, no. 4, p. 422-426, Apr. 2007.
- CARRIGAN, P.J. et al. A scanning electron microscopic evaluation of human dentinal tubules according to age and location. **Journal of Endodontics**, New York, v. 10, no. 8, p. 359-363, Aug. 1984.

CHEUNG, G.S.; STOCK, C.J. In vitro cleaning ability of root canal irrigants with and without endodontics. **International Endodontics Journal**, Oxford, v. 26, no. 6, p. 334-343, Nov. 1993.

DAHLÈN, G. et al. Identification and antimicrobial susceptibility of enterococci isolated from the root canal. **Oral Microbiology and Immunology**, Copenhagen, v. 15, no. 5, p. 309-312, Oct. 2000.

DONLAN, R.M.; COSTERTON, J.W. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 15, no. 2, p. 167-193, Apr. 2002.

DUGGAN, J.M.; SEDGLEY, C.M. Biofilm formation of oral and endodontic *Enterococcus faecalis*. **Journal of Endodontics**, New York, v. 33, no. 7, p. 815-818, July 2007.

DYCHDALA, G.R. Chlorine and chlorine compounds. In: BLOCK, S.S. (Ed.). **Desinfection, sterilization, and preservation**. 4th ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1991. p. 133-135.

ELIOPOULOS, G.M. Enterococcal endocarditis. In: KAYNE, D. (Ed.). **Infective endocarditis**. New York, NY: Raven Press, 1992. p. 209-23.

ESTRELA, C. et al. A model system to study antimicrobial strategies in endodontic biofilms. **Journal of Applied Oral Science**, Bauru, v. 17, no. 2, p. 87-91, Mar./Apr. 2009.

EVANS, M. et al. Mechanisms involved in the resistance of *Enterococcus faecalis* to calcium hydroxide. **International Endodontic Journal**, Oxford, v. 35, no. 3, p. 221-228, Mar. 2002.

FARDAL, O.; TURNBULL, R.S. A review of the literature on use of chlorhexidine in dentistry. **Journal of the American Dental Association**, Chicago, v. 112, no. 6, p. 863-869, June 1986.

FELMINGHAM, D. et al. *Enterococcus* species in urinary tract infection. **Clinical Infectious Disease**, Chicago, v.15, no. 2, p. 295-301, Aug. 1992.

FERRAZ, C.C.R. et al. In vitro assessment of chlorhexidine gel as an endodontic irrigant. **Journal of Endodontics**, New York, v. 7, no. 7, p. 452-455, July 2001.

FIGDOR, D.; DAVIES, J.K.; SUNDQVIST, G. Starvation survival, growth, and recovery of *Enterococcus faecalis* in human serum. **Oral Microbiology and Immunology**, Copenhagen, v. 18, no. 4, p. 234-239, Aug. 2003.

GOMES, B.P. et al. In vitro antimicrobial activity of several concentrations of sodium hypochlorite and chlorhexidine gluconate in the elimination of *Enterococcus faecalis*. **International Endodontics Journal**, Oxford, v.34, no. 6, p. 424-428, Sept. 2001.

GOMES, B.P.; MONTAGNER, F. O papel do diagnóstico molecular no estudo das infecções de origem endodôntica: conceitos, técnicas e aplicações. In: FERRARI, P.H.P.; BOMBANA, A.C. **A Infecção endodôntica e sua resolução**. São Paulo: Liv. Santos, 2010. p. 23-45.

GOMES, B.P.F.A. et al. Effectiveness of 2% chlorhexidine gel and calcium hydroxide against *Enterococcus faecalis* in bovine root dentine in vitro. **International Endodontic Journal**, Oxford, v. 36, no. 4, p. 267-275, Apr. 2003.

GRANINGER, W.; RAGETTE, R. Nasocomial bacteremia due to *Enterococcus faecalis* without endocarditis. **Clinical Infectious Disease**, Chicago, v. 15, no. 1, p. 49-57, July 1992.

HAAPASALO, M.; ORSTAVIK, D. In vitro infection and disinfection of dentinal tubules. **Journal of Dental Research**, Chicago, v. 66, no. 8, p. 1375-1379, Aug. 1987.

HEINRICH-WELTZIEN, R. et al. Comparison of different DIAGNOdent cut-off limits for in vivo detection of occlusal caries. **Operative Dentistry**, Seattle, v. 28, no. 6, p. 672-680, Nov. 2003.

IWAMI, Y. et al. Relationship between bacterial infection and evaluation using a laser fluorescence device, DIAGNOdent. **European Journal Oral Sciences**, Copenhagen, v. 112, no. 5, p. 419-423, Oct. 2004.

JEASONNE, M.J.; WHITE, R.R. A comparison of 2.0% chlorhexidine gluconate and 5,25% sodium hypochlorite as antimicrobial endodontics irrigants. **Journal of Endodontics**, New York, v. 20, no. 6, p. 276-278, June 1994.

JONES, W.G. et al. Enterococcal burn sepsis: a highly lethal complication in severely burned patients. **Archives of Surgery**, Chicago, v. 121, no. 6, p. 649-652, June 1986.

KAKEHASHI, S.; STANLEY, H.R.; FITZGERALD, R.J. The effects of surgical exposures of dental pulps in germ-free and conventional laboratory rats. **Oral Surgery, Oral Medicine and Oral Pathology**, St. Louis, v. 20, no. 4, p. 340–349, Sept. 1965.

KAUFMAN, A.Y.; KEILA, S. Hypersensitivity to sodium hypochlorite. **Journal of Endodontics**, New York, v. 15, no. 5, p. 224-226, May 1989.

KHARDORI, N.; et al. Infections associated with biliary drainage procedures in patients with cancer. **Reviews of Infectious Diseases**, Chicago, v. 13, no. 4, p. 587-591, July/ Aug. 1991.

KISHEN, A.; GEORGE, S.; KUMAR, R. Enterococcus faecalis- mediated biomineralized biofilm formation on root canal dentine in vitro. **Journal of biomedical materials research, Part A**, Hoboken, v. 77, no. 2, p. 406- 415, May 2006.

LEE, L.W.; LAN, W.H.; WANG, G.Y. An evaluation of chlorhexidine as an endodontic irrigant. **Journal of the Formosan Medical Association**, Taipei, v. 89, no. 6, p. 491-497, June 1990.

LEONARDO, M.R. Preparo biomecânico dos canais radiculares definição e conceituação, finalidades, importância. Recursos convencionais para sua aplicação: meios químicos (soluções irrigadoras) e meios físicos (irrigação, aspiração e inundação). In: _____. **Endodontia: tratamento de canais radiculares – princípios técnicos e biológicos**. São Paulo: Artes Médicas, 2008. Cap. 13, p. 487-540.

LOPES, H.P.; SIQUEIRA JÚNIOR, J.F.; ELIAS, C.N. Substâncias químicas empregadas no preparo dos canais radiculares. In: LOPES, H.P.; SIQUEIRA JR., J.F. **Endodontia: biologia e técnica**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010. p. 531-571.

LOVE, R.M. Enterococcus faecalis- a mechanism for its role in endodontic failure. **Internacional Endodontic Journal**, Oxford, v. 34, no. 5, p. 399-405, July 2001.

LUSSI, A. et al. Detection of approximal caries with a new laser fluorescence device. **Caries Research**, New York, v. 40, no. 2, p. 97-103, 2006.

LUSSI, A. et al. Performance and reproducibility of a laser fluorescence system for detection of occlusal caries in vitro. **Caries Research**, New York, v. 33, no. 4, p. 261-266, July/Aug. 1999.

MOHAMED, J.A.; HUANG, D.B. Biofilm formation by enterococci. **Journal of Medical Microbiology**, Edinburgh, v. 56, Pt. 12, p. 1581-1588, Dec. 2007.

NAIR, P.N. On the causes of persistent apical periodontitis: a review. **International Endodontic Journal**, Oxford, v. 39, no. 4, p. 249-281, Apr. 2006.

NAIR, P.N. Pathogenesis of apical periodontitis and the causes of endodontic failures. **Critical Reviews in Oral Biology and Medicine**, Alexandria, v. 15, no. 6, p. 348–381, Nov. 2004.

NAIR, P.N. et al. Microbial status of apical root canal system of human mandibular first molars with primary apical periodontitis after 'one-visit' endodontic treatment. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontics**, St Louis, v. 99, no. 2, p. 231–252, Feb. 2005.

NEAL, R.G.; POWERS, J.M. Effect of sterilization and irrigants on the cutting abilities of stainless steel files. **Journal of Endodontics**, New York, v. 9, no. 3, p. 93-96, Mar. 1983.

ORSTAVIK, D.; HAAPASALO, M. Desinfection by endodontic irrigants and dressings of experimentally infected dentinal tubules. **Endodontics and Dental Traumatology**, Copenhagen, v. 6, no. 4, p. 142-149, Aug. 1990.

PASHLEY, E.L. et al. Cytotoxic effects of sodium hypochlorite on vital tissue. **Journal of Endodontics**, New York, v. 11, no. 12, p. 525-528, Dec. 1985.

PETERS, O.A. et al. Changes in root canal geometry after preparation assessed by high-resolution computed tomography. **Journal of Endodontics**, New York, v. 27, no. 1, p. 1-6, Jan. 2001.

PINHEIRO, E.T. et al. Microorganisms from canals of root-filled teeth with periapical lesions. **International Endodontic Journal**, Oxford, v. 36, no. 1, p. 1-11, Jan. 2003.

RAMACHANDRAN NAIR, P.N. Light and electron microscopic studies of root canal flora and periapical lesions. **Journal of Endodontics**, New York, v. 13, no. 1, p. 29–39, Jan. 1987.

RINGEL, A.M. et al. In vivo evaluation of chlorhexidine gluconate solution and sodium hypochlorite solution as root irrigants. **Journal of Endodontics**, New York, v. 8, no. 5, p. 200-204, May 1982.

RUOFF, K.L. et al. Species identities of enterococci isolated from clinical specimens. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 28, no. 3, p. 435-437, Mar. 1990.

SABER, S.E.D.M.; EL-HADY, S.A. Development of an intracanal mature *Enterococcus faecalis* biofilm and its susceptibility to some antimicrobial intracanal medications; an in vitro study. **European Journal of Dentistry**, Ankara, v. 6, no. 1, p. 43-50, Jan. 2012.

SAINSBURY, A.L.; BIRD, P.S.; WALSH, L.J. Diagnodent laser fluorescence assessment of endodontic infection. **Journal of Endodontics**, New York, v. 35, no. 10, p. 1404-1407, Oct. 2009.

SANDOE, J.A. et al. Measurement of ampicillin, vancomycin, linezolid and gentamicin activity against enterococcal biofilms. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, London, v. 57, no. 4, p. 767-770, Apr. 2006.

SCHILKE, R. et al. Comparison of the number and diameter of dentin tubules in human and bovine dentine by scanning electron microscopic investigation. **Archives Oral Biology**, Oxford, v. 45, no. 5, p. 355–361, May 2000.

SCHMALZ, G. et al. Permeability characteristics of bovine and human dentin under different pretreatment conditions. **Journal of Endodontics**, New York, v. 27, no. 1, p. 23-30, Jan. 2001.

SENA, N.T. et al. In vitro antimicrobial activity of sodium hypochlorite and chlorhexidine against selected single-species biofilms. **Internacional Endodontic Journal**, Oxford, v. 39, no. 11, p. 878-885, Nov. 2006.

SJÖGREN, U. Influence of infection at the time of root filling on the outcome of endodontic treatment of teeth with apical periodontitis. **International Endodontics Journal**, Oxford, v. 30, no. 5, p. 297–306, Sept. 1997.

SPÄNGBERG, L.; ENGSTRÖM, B.; LANGELAND, K. Biologic effects of dental materials. 3. Toxicity and antimicrobial effect of endodontic antiseptics in vitro. **Oral Surgery, Oral Medicine, and Oral Pathology**, St. Louis, v. 36, no. 6, p. 856-870, Dec. 1973.

SPÄNGBERG, L. et al. Antimicrobial and toxic effect in vitro of a bisdequalinium acetate solution for endodontic use. **Journal of Endodontics**, New York, v. 14, no. 4, p. 175-178, Apr. 1988.

STUART, C.H. et al. *Enterococcus faecalis*: its role in root canal treatment failure and current concepts in retreatment. **Journal of Endodontics**, New York, v. 32, no. 2, p. 93-98, Feb. 2006.

SUNDQVIST G. Associations between microbial species in dental root canal infections. **Oral Microbiology and Immunology**, Copenhagen, v. 7, no. 5, p. 257-262, Oct. 1992.

SUNDQVIST, G. et al. Microbiologic analysis of teeth with failed endodontic treatment and the outcome of conservative re-treatment. **Oral Surgery, Oral Medicine and Oral Pathology**, St. Louis, v. 85, no. 1, p. 86–93, Jan. 1998.

TRONSTAD, L.; BARNETT, F.; RISO, K.; SLOTS, J. Extraradicular endodontic infections. **Endodontics and Dental Traumatology**, Copenhagen, v. 3, no. 2, p.86–90, Apr. 1987.

VLACIC, J.; MEYERS, I.A.; WALSH, L.J. Combined CPP-ACP and photoactivated disinfection (PAD) therapy in arresting root surface caries: a case report. **British Dental Journal**, London, v. 203, no. 8, p. 457–459, Oct. 2007.

WALSH, L.J.; CLIFFORD, H. Changes in Diagnodent scores in smooth surface enamel carious lesions in primary teeth: a longitudinal clinical study. **The Journal Oral of Laser Applications**, Berlin, v. 8, no. 3, p. 157–164, 2008.

WANG, Z.; SHEN, Y.; HAAPASALO, M. Effectiveness of endodontic disinfecting solutions against young and old *Enterococcus faecalis* biofilms in dentin canals. **Journal of Endodontics**, New York, v. 38, no. 10, p. 1376-1379, Oct. 2012.

WHITE, R.R.; HAYS, G.L.; JANER, L.R. Residual antimicrobial activity after canal irrigation with chlorhexidine. **Journal of Endodontics**, New York, v. 23, no. 4, p. 229-231, Apr. 1997.

YANG, J.; DUTRA, V. Utility of radiology, laser fluorescence, and transillumination. **Dental Clinics of North America**, Philadelphia, v. 49, no. 4, p. 739–752, Oct. 2005.

ANEXO– DOCUMENTO DE APROVAÇÃO DO PROJETO DE PESQUISA NA COMISSÃO DE PESQUISA EM ODONTOLOGIA, DA FACULDADE DE ODONTOLOGIA, DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL.

Título: AVALIACAO IN VITRO DO DESEMPENHO DO DIAGNODENT PEN NA DETECCAO DE ENTEROCOCCUS FAECALIS EM CANAIS RADICULARES DE DENTES BOVINOS INFECTADOS

COMISSAO DE PESQUISA DE ODONTOLOGIA: Parecer

O objetivo deste estudo é avaliar o desempenho do DIAGNodent pen na identificação de microrganismos em canais radiculares de dentes bovinos infectados artificialmente, bem como em identificar a descontaminação desses canais radiculares utilizando solução de hipoclorito de sódio 5,25% e solução de clorexidina 2%. A origem dos dentes bovinos é partir de abates. Estes dentes serão contaminados com cepas dos microrganismos e a contagem em UFC ser; a considerado o método padrão ouro. Análises de acurácia com curva ROC e testes de diagnóstico serão aplicados. A metodologia está adequada para os objetivos propostos.