



**INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
EGAS MONIZ**

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA

**ESTUDO DA CONTAMINAÇÃO MICROBIANA EM CONES DE
GUTTA-PERCHA EM UTILIZAÇÃO NA CLÍNICA DENTÁRIA
UNIVERSITÁRIA EGAS MONIZ**

Trabalho submetido por
Elisa Mestre Baio
para a obtenção do grau de Mestre em Medicina Dentária

Trabalho orientado por
Doutora Helena Barroso

novembro de 2016



**INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
EGAS MONIZ**

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA

**ESTUDO DA CONTAMINAÇÃO MICROBIANA EM CONES DE
GUTTA-PERCHA EM UTILIZAÇÃO NA CLÍNICA DENTÁRIA
UNIVERSITÁRIA EGAS MONIZ**

Trabalho submetido por
Elisa Mestre Baio
para a obtenção do grau de Mestre em Medicina Dentária

Trabalho orientado por
Doutora Helena Barroso

e coorientado por
Doutora Ana Cristina Mano Azul

novembro de 2016

Dedicatória

A um anjo que me fez crescer,
Que me mostrou o real sentido da vida,
Que me permitiu descobrir a felicidade,
Que me ensinou o significado de um sorriso,
Que me ensinou a amar.

Agradecimentos

Em primeiro lugar, agradeço à Doutora Helena Barroso que se mostrou disponível desde o primeiro segundo e sempre me deu todo o apoio necessário.

À Doutora Ana Cristina Mano Azul por me incentivar a desenvolver este projeto e ter aceite coorientá-lo.

Ao Doutor Luís Proença pela colaboração na análise estatística.

Ao Instituto Superior de Ciências da Saúde Egas Moniz, pois além de ter sido a minha casa nos últimos anos, financiou a investigação laboratorial.

À Clínica Dentária Universitária Egas Moniz, pela disponibilidade em permitir que utilizasse o espaço para parte da investigação.

À Kerr, pela oferta do material dentário necessário.

À Catarina Santos, que me ajudou a organizar as ideias para o projeto.

Aos meus pais e irmão que fizeram de mim a pessoa que sou hoje, nunca desistiram de mim e sempre acreditaram que era possível.

Ao Nuno e ao Zeus por todo o companheirismo, carinho, amor e compreensão quando não conseguia estar presente a 100%.

À Sónia e à Bianca, pois sempre estiveram do meu lado e fizeram-me acreditar em mim.

À Andreia Rosa, por estes 6 meses de parceria em que não existiram objetivos inalcançáveis.

Resumo

Objectivos: Existem diversas soluções irrigantes utilizadas durante o tratamento cujo objetivo é a desinfeção dos canais radiculares. Neste estudo, foi testado o NaOCl 1% com o objetivo de desinfetar os cones de *gutta-percha* antes da sua utilização de modo a diminuir os casos de insucesso do tratamento endodôntico por contaminação. Foram também analisados cones de *gutta-percha* #20 e #25 em utilização na Clínica Dentária Universitária Egas Moniz de modo a perceber se com a sua utilização contínua, estes ficavam contaminados.

Materiais e Métodos: Foram colocadas 40 caixas novas de cones de *gutta-percha* em circulação na Clínica Dentária Universitária Egas Moniz durante 6 semanas. Foi efetuada análise microbiológica a cones selecionados aleatoriamente de cada caixa em 3 tempos diferentes (tempo zero, 3 semanas e 6 semanas de circulação/utilização) com o objetivo de verificar se com a utilização contínua estes ficavam contaminados. Posteriormente elaborou-se um protocolo de desinfeção dos cones utilizando NaOCl a 1%.

Resultados: No estudo da contaminação dos cones, verificou-se que no tempo zero houve crescimento de germes totais aeróbios em 12,5% dos mesmos e de germes totais anaeróbios em 5%. Às 3 semanas, 10% dos cones apresentaram crescimento de germes totais aeróbios, 2,5% de *Enterococcus faecalis* e *Streptococcus spp.* Ao final de 6 semanas, 6,7% dos cones apresentaram contaminação de germes totais aeróbios, 6,6% de *Streptococcus spp.* e 3,3% de *Staphylococcus spp.* No estudo da descontaminação dos cones, verificou-se não existir crescimento microbiano após a lavagem com NaOCl a 1%.

Conclusões: Após a análise dos resultados, foi possível verificar que a contaminação dos cones de *gutta-percha* ao longo do tempo de utilização das caixas é praticamente nulo. No entanto, o protocolo de desinfeção com NaOCl a 1% foi testado e a sua eficácia foi próxima de 100%.

Palavras – chave: Cone de *gutta-percha*; Endodontia; Hipoclorito de Sódio; Microrganismos;

Abstract

Objectives: There are several irrigating solutions used during treatment aimed to disinfect root canals. In this study, the 1% NaOCl was tested with the purpose of disinfecting the *gutta-percha* points prior to use in order to decrease the cases of unsuccessful endodontic treatment by contamination. The *gutta-percha* points #20 and #25 were also analysed while being used in the Clínica Dentária Universitária Egas Moniz to understand their contamination, through continuous utilization.

Materials and Methods: 40 new boxes of *gutta-percha* points were used at the Clínica Dentária Universitária Egas Moniz for 6 weeks. A microbiological analysis was conducted of randomly selected points of each box in 3 different times (time zero, 3 weeks, 6 weeks of circulation/use) in order to verify if with continued use they became contaminated. Later, a disinfection protocol for the *gutta-percha* cones was elaborated using 1% NaOCl.

Results: In the study of contamination of *gutta-percha* points, it was found that at time zero was growth of total germs in 12,5% of points, and growth of anaerobic total germs in 5%. At 3 weeks, 10% of the points showed growth of total germs, 2,5% of *Enterococcus faecalis* and *Streptococcus spp.*. At the end of 6 weeks, 6,7% of the points were contaminated with total germs, 6,6% with *Streptococcus spp* and 3,3% with *Staphylococcus spp.*. In the study of decontamination of *gutta-percha* points, there was no growth after washing them with 1% NaOCl.

Conclusions: After analyzing the results, we found that contamination of *gutta-percha* points over time, using the boxes is practically nul, however, the disinfection protocol with 1% NaOCl has been tested and the efficiency is close to 100%.

Key words: *Gutta-percha* points; Endodontics; Microorganisms; Sodium hypochlorite

Índice

Índice de figuras	7
Índice de tabelas	9
Lista de Abreviaturas	11
Introdução	13
Tratamento endodôntico	14
<i>Gutta-percha</i>	15
Microrganismos	16
Hipoclorito de Sódio	19
Objetivos	21
Materiais e Métodos	23
Protocolo de desinfecção	26
Resultados e Discussão	29
Discussão	44
Conclusões	47
Bibliografia	49

Índice de figuras

Figura 1 - Caixa de cones de gutta-percha #20	23
Figura 2 - Caixa de cones de gutta-percha #25	23
Figura 3 - Meios de cultura sólidos	24
Figura 4 - Jarra de anaerobiose.....	24
Figura 5 - Colónia de germes totais (tempo zero; caixa #25.07).....	29
Figura 6 – Colónia de germes totais anaeróbios (tempo zero; caixa #25.16).....	29
Figura 7 - Colónias de <i>Enterococcus faecalis</i> (3 semanas; caixa #25.12).....	30
Figura 8 - Colónias de <i>Streptococcus</i> spp. (3 semanas; caixa #20.18).....	30

Índice de tabelas

Tabela 1 - Germes totais	31
Tabela 2. Enterococcus faecalis.....	33
Tabela 3. Streptococcus spp.	35
Tabela 4. Staplylococcus spp.	37
Tabela 5. Candida spp.	39
Tabela 6. Germes Totais Anaeróbios	41
Tabela 7. Protocolo de desinfecção	43

Lista de Abreviaturas

Am- Amostra

Br - Branco

CDUEM - Clínica Dentária Universitária Egas Moniz

CHX – Clorohexidina

DC – D- Coccoxel

E. coli - *Escherichia coli*

ETDA – Ácido etilenodiamino tetra-acético

GS – Gelose de Sangue

MAS – Manitol Sal Agar

ml - mililitro

MSA - Mitis Salivarius Agar

MTAD – Mistura de desinfetante de tetraciclina

NaOCl – Hipoclorito de Sódio

S. aureus – *Staphylococcus aureus*

SCG - Sabouraud com cloranfenicol e gentamicina

seg - segundo

TENC – Terapia Endodôntica não cirúrgica

TSA - Trypticase Soja Agar

Ufc- Unidade formadora de colónias

Introdução

Durante a consulta de medicina dentária, a contaminação microbiana é real, desde os materiais de impressão para a confecção das próteses, que não são estéreis, passando pelo fio de retração gengival, até chegar ao momento da própria entrega da prótese (Rice CD, 1991). Um dos exemplos de contaminação no consultório são as condutas de água, que ao não serem corretamente desinfetadas, podem provocar infecções cruzadas (Petti S, 2006). O facto do médico dentista usar anéis também é um fator de risco para contaminação por *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* (*E. coli*) e *Candida albicans* (Naeem A, 2015)

O ideal é eliminar a possibilidade de contaminação durante as consultas de medicina dentária de modo também a aumentar o grau de sucesso dos tratamentos. No caso da endodontia, o risco de contaminação é muito grande, não só por se tratar em muitas situações de um dente com infeção no sistema de canais radiculares, mas também devido à diversidade de materiais que são utilizados, agulhas para anestesia, brocas, limas, cones de papel, cones de *gutta-percha*, entre outros (Pessoa de Andrade L, 2014; Kayaoglu G, 2009; K. Vinay Kumar, 2015). Assim, devem ser criados protocolos de desinfeção para todos os materiais que chegam às mãos do profissional e à boca do doente.

Tratamento endodôntico

O tratamento endodôntico tem como objetivo eliminar ou reduzir a infecção microbiana do sistema de canais radiculares do dente afetado (S. Kwang, 2014; Happonen, 1986; FG. Signoretti, 2013). Para que o sucesso seja máximo, é essencial trabalhar em total assepsia, utilizando isolamento absoluto do dente, efectuando uma correta preparação químico-mecânica dos canais através de irrigantes antimicrobianos, obturando os canais radiculares com o material e técnica adequados ao caso e criando um bom selamento coronário através da restauração (Marcos S. Endo, 2013). Este tratamento permite que os tecidos periapicais fiquem totalmente curados, previne nova infecção e restaura a função (S. Kwang, 2014).

Uma das causas que leva à necessidade de tratamento endodôntico é a necrose pulpar. Esta, pode ser provocada por trauma dentário mecânico e/ou térmico, lesão de cárie, microinfiltração de restaurações, fratura dentária, entre outros (Walsh, 1997). Após a necrose da polpa, desenvolve-se o abscesso periapical, (P. Nair, 1987; HO Trowbridge, 1992; MO. Wasfy, 1992), que tem na sua formação bactérias anaeróbias (I. Brook, 1991). Estão presentes em maior quantidade *Streptococcus spp.*, *Prevotella spp.*, *Bacterioides spp.*, *Porphyromonas gingivalis* e *Porphyromonas endodontalis*. Segundo estudos de Katsutaka Kuremoto e colaboradores, as espécies bacterianas que mais se encontram na polpa infetada são *Enterococcus spp.*, *E. coli*, *Klebsiela pneumoniae*, *Streptococcus spp.*, *Proteus mirabilis* e *Morganella morganii* (Katsutaka Kuremoto, 2014). Por outro lado, os microrganismos mais presentes em casos de insucesso do tratamento endodôntico são *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans* (Oliveira B., 2015).

O objetivo da obturação é selar o sistema de canais radiculares, de modo a prevenir infiltração bacteriana. Um dos materiais mais utilizados é o cone de *gutta-percha*, que é fabricado em condições de assepsia, mas que pode ficar contaminado durante o manuseamento e embalamento (Skidmore LJ, 2006).

Gutta-percha

A *gutta-percha* é um material de consistência plástica e resistente, extraído de árvores da malásia, semelhantes às da borracha, mas que têm mais resina. Os cones de *gutta-percha* têm na sua constituição 20% de *gutta-percha* que forma a matriz, 66% de óxido de zinco que é o material de preenchimento, 11% de metais pesados para dar radiopacidade e 3% de ceras ou resinas que são plastificantes (Yildirim A, 2016). Uma das suas características é a termoplasticidade, logo, não pode ser esterilizado em autoclave nem através de outro método que faça aumentar a temperatura do cone (Skidmore LJ, 2006; Siqueira JF Jr, 2001; Stratton RK, 2006; Da Motta PG, 2000).

Do ponto de vista químico, a *gutta-percha* é um poli-isopreno e divide-se em duas fases cristalinas α e β . A fase α é a forma em bruto como se encontra originalmente, mas quando é aquecida a 65°C e arrefecida rapidamente, a sua estrutura altera para a fase cristalina β . Este processo é reversível por aquecimento. Cada uma das fases tem propriedades diferentes e, ambas são utilizadas em endodontia. A fase α é pegajosa e fluida, logo, não é aconselhada para a técnica convencional de obturação a frio porque pode não ser suficientemente compactada, mas sim para técnicas termoplásticas. Para a técnica de obturação a frio, utiliza-se a forma cristalina β pois tem uma dureza maior (Ayhan Yildirim, 2016).

A *gutta-percha* apresenta uma excelente biocompatibilidade, capacidade de vedação à humidade e não é reabsorvível. Estas vantagens justificam a sua grande aplicação na medicina dentária. No entanto, o tempo de armazenamento deve ser controlado; quando é prolongado, a *gutta-percha* torna-se frágil, pois altera a sua estrutura cristalina e não é possível a sua correta compactação. A *gutta-percha* armazenada em meio húmido é mais mole, mais maleável e é possível uma melhor compactação quando comparada à armazenada no frigorífico em meio seco (Ayhan Yildirim, 2016).

Microorganismos

As bactérias anaeróbias facultativas Gram-positivo, como *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus sanguinis* e *Streptococcus intermedius* podem colonizar os cones de gutta-percha, pois a sua superfície serve de estrutura para a formação de biofilme (N. Takemura, 2004). Estas bactérias encontram-se dentro do sistema de canais radiculares; deste modo, a correta preparação dos canais, através de meios mecânicos, manuais e químicos, é fundamental para a resolução da infeção em cerca de 90% dos casos (Happonen, 1986).

A espécie *Enterococcus faecalis*, no ser humano, está presente no tracto gastrointestinal, na cavidade oral e na vagina. No entanto, quando fora destas localizações, pode causar infeções (BD. Jett, 1994). Esta bactéria encontra-se em infeções endodônticas, especialmente em polpas necróticas de dentes não tratados (Sundqvist, 1992) e em canais obturados com periodontite apical crónica (HH. Hancock, 2001; V. Peciulienė, 2000). Os microrganismos do género *Enterococcus* são Gram-positivo, crescem entre os 10°C e os 45°C com um pH óptimo de 9,6 e têm a capacidade de adaptação a condições adversas, deste modo, podem sobreviver nos canais radiculares, em locais onde os nutrientes são escassos e a medicação intracanal pode não chegar (Güven Kayaoglu, 2004). Devido a esta grande capacidade de adaptação, nos últimos anos, tem-se verificado um aumento das resistências a antibióticos. No caso desta espécie, a maior resistência é à tetraciclina e a menor à vancomicina (Mirnejad R, 2016).

O facto de permanecerem bactérias nos canais radiculares após o tratamento endodôntico, leva a um fracasso do mesmo, com conseqüente necessidade de retratamento do dente (Nair, 2006). Nestes casos, as espécies *Enterococcus faecalis* e *Streptococcus spp.* são as que se encontram mais frequentemente (IN. Rôças, 2008; IN. Rôças, 2010; M. Sakamoto, 2007; GO. Zoletti, 2006). *Streptococcus spp.* são Gram-positivos e anaeróbios facultativos na sua maioria, sendo que algumas espécies são anaeróbias estritas. Para a sua classificação é importante determinar a capacidade de lise dos eritrócitos (beta, alfa, gama-hemolítico – da maior capacidade à menor). Encontram-se na pele, na boca e intestino de forma fisiológica, no entanto, podem provocar doenças graves como meningite, faringite, escarlatina, pneumonia, abscesso dentário, endocardite, cárie dentária, entre outras. O intervalo de temperatura em que

ocorre crescimento é amplo, varia entre -10°C e 45°C (Nomura R, 2016; J., 2016; Klein MI, 2015).

Podemos também encontrar *Staphylococcus spp.* nos canais radiculares, assim como *Candida spp.* e *E. coli*. Relativamente ao microrganismo *Staphylococcus spp.*, trata-se de uma bactéria Gram-positivo, anaeróbia facultativa; no entanto, o seu crescimento é mais rápido em meio aeróbio, o seu intervalo térmico de crescimento é de 30°C a 37°C e no ser humano, pode-se encontrar na pele e fossas nasais. Estas bactérias são destruídas em altas temperaturas; no entanto, têm a capacidade de resistir a grandes períodos de desidratação. Em situações em que o sistema imunitário humano está comprometido, este microrganismo pode sobrepor-se à restante flora e assim, provocar doenças oportunistas tais como foliculite, infeção das vias urinárias, endocardite, infeções cutâneas, entre outras (Carmona-Torre F, 2016; Paulsen J, 2016).

Escherichia coli, ou *E. coli*, termo pelo qual é conhecida, é um bacilo Gram-negativo e encontra-se presente no sistema gastrointestinal inferior, pode sobreviver um longo período de tempo fora de um hospedeiro e, tem como característica o curto tempo de replicação de 20 minutos. Infeções provocadas por *E. coli* podem provocar septicémia, apendicite ou peritonite e a sua transmissão é por via oro-fecal devido por exemplo ao consumo de água não tratada ou carne mal cozida. O tratamento é através de antibioterapia; no entanto, estas bactérias desenvolveram resistência a antibióticos, sendo os mais eficazes a amicacina e a gentamicina (Ricciardi W, 2016; Cag Y, 2016).

Ao contrário dos anteriores, *Candida spp.* não é uma bactéria, mas sim um fungo, responsável pela candidíase. No ser humano, encontra-se em condições de saúde na cavidade oral, mucosa vaginal, pele e intestino. Candidíase é uma infeção fúngica e pode-se manifestar na pele, cavidade oral, esófago, vagina e sistema vascular (Richard A Calderone, 2001). O tratamento mais eficaz é a Anfotericina B; no entanto, a sua alta toxicidade limita a utilização deste antifúngico. Hoje em dia, existem antifúngicos azólicos, como o fluconazol e o itraconazol, que têm um grande grau de eficácia, biodisponibilidade e poucos efeitos adversos (Vanessa Zardo, 2004). A candidíase oral pode-se apresentar sob a forma aguda ou crónica, com ou sem lesões associadas. Existem vários tipos de lesões, glossite romboide mediana, estomatite protética e queilite angular.

A estomatite protética é o processo de inflamação da mucosa devido à utilização de próteses dentárias, no entanto, desinfetando as próteses com hipoclorito de sódio (NaOCl) a 1%, 2% e 5%, o fungo é eliminado, diminuindo assim, o risco de inflamação devido a este microrganismo (Ricardo Jorge Simões, 2013; Karakis D, 2016). Como prevenção da estomatite protética, além da higiene da prótese, esta, deve também estar bem adaptada, com rebasamentos sempre que necessário e o acrílico muito bem polimerizado. A queilite angular é tratada através da aplicação tópica de antimicóticos em associação com antibióticos específicos para *Staphylococcus aureus* (Ricardo Jorge Simões, 2013).

Hipoclorito de Sódio

Durante a preparação química dos canais radiculares com irrigantes é utilizado o hipoclorito de sódio (NaOCl) a 1%, a clorhexidina (CHX), o ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) 17%, o ácido cítrico, mistura de desinfetante de tetraciclina (MTAD) e o ácido fosfórico a 37% (Prado M, 2013; Rocha AW, 2012).

Antes de mais, devem-se esclarecer os termos desinfeção, esterilização e descontaminação. A desinfeção é um processo que elimina vários tipos de organismos patogénicos sendo usualmente realizada com químicos líquidos. Um desinfetante é definido como um agente físico ou químico que remove, inativa ou destrói agentes patogénicos de superfícies tornando-as seguras e incapazes de transmissão. Muitos líquidos desinfetantes e esterilizantes são usados sozinhos ou em combinação com outros produtos, nomeadamente álcool, formaldeído, peróxido de hidrogénio, entre outros (Condrin, 2008). A esterilização destrói todo o tipo de microorganismos, incluindo os esporos. Pode ser realizada pelo calor (húmido ou seco), por imersão em desinfetantes líquidos, utilizando gases esterilizantes, por radiação e por filtração (William A. Rutala, 2013). A descontaminação reduz a presença de microorganismos tornando o material seguro para manipulação sem equipamento de proteção (Stjärne Aspelund A, 2016).

No início do século XVIII, as soluções de hipoclorito eram utilizadas como agentes branqueadores, e foram também recomendadas por Labarraque como prevenção da febre puerperal e de outras doenças contagiosas. Apenas no final do século XIX, foi aceite como desinfetante, após estudos de Koch e Pasteur. Na Primeira Grande Guerra Mundial, Henry Dakin utilizou NaOCl a 0,5%, hoje em dia conhecido como soluto de Dakin, para desinfetar feridas necróticas (Zehnder, 2006; HD., 1915).

Nos dias de hoje, o hipoclorito de sódio está presente no nosso dia-a-dia (a conhecida lixívia) como tira nódoas, branqueador e desinfetante de superfícies. É também utilizado nas estações de tratamento de águas, que depois vão para a rede de canalização e em piscinas. Em ambiente hospitalar, devido à sua eficácia contra bactérias e alguns vírus, é útil para desinfeção de superfícies, mas devido ao seu efeito corrosivo, posteriormente, deve-se passar a superfície por etanol (Weid, 2015).

Aparentemente, o NaOCl é o melhor irrigante endodôntico (Agrawal Vineet S, 2014). Tem uma elevada capacidade bactericida contra batérias Gram-positivo e Gram-

negativo; anaeróbias estritas e facultativas; alguns vírus, esporos e fungos, como por exemplo *Candida albicans* (Gomes BP, 2001; Vianna ME, 2004; Gomes BP, 2005). É utilizado na terapia endodôntica não cirúrgica (TENC) durante o desbridamento, para desinfecção intracanal, lubrificação e dissolução dos tecidos (Spangberg L, 1973).

Ao utilizar o NaOCl como desinfetante dos cones de *gutta-percha*, não existe aumento do custo para o médico dentista, pois é um irrigante utilizado durante o tratamento endodôntico. Segundo Prado et al. (2011), a solução de NaOCl a 5,25% aumenta a energia livre de superfície do cone, interferindo positivamente com o mecanismo de adesão. Uma das possíveis desvantagens da utilização do NaOCl na desinfecção dos cones é a formação de cristais de cloreto de sódio na superfície destes, mas que podem ser removidos através da lavagem com álcool a 70% ou água destilada (Prado M, 2011; Prado M, 2012). No entanto, segundo a evidência, não existe motivo para se utilizar soluções de NaOCl acima de 1% em que o seu pH ideal é 11 (Agrawal Vineet S, 2014).

Estudou-se também a capacidade do MTAD desinfetar os cones de *gutta-percha* e de facto, elimina microrganismos, porém, altera a estrutura da superfície do cone, o que interfere no contacto com o cimento utilizado em conjunto com este, na obturação (Prado M, 2011).

As caixas de cones de *gutta-percha* na Clínica Dentária Universitária Egas Moniz (CDUEM) têm uma utilização recorrente, ou seja, são abertas, são retirados os cones necessários e as caixas voltam a ser guardadas. Quando os compartimentos apresentam poucos cones, são repostos, retirando de caixas novas e colocando nas de circulação. Tal procedimento poderá levar a uma contaminação destes.

Na literatura atual não existem estudos que avaliem a contaminação dos cones de *gutta-percha* em uso continuado ou que proponham um protocolo de descontaminação eficaz e de aplicação simples na atividade clínica diária.

Objetivos

Pretende-se com este estudo verificar se ao longo da utilização das caixas de cones de *gutta-percha* na Clínica Dentária Universitária Egas Moniz, o conteúdo microbiano dos cones aumenta e se espécies potencialmente patogénicas estarão presentes nos mesmos.

Será também elaborado um protocolo de desinfeção dos cones de *gutta-percha* que anteceda a sua utilização para que deste modo se possa diminuir a contaminação durante o tratamento e evitar novas necessidades de retratamento endodôntico. Este protocolo terá em conta todas as características descritas dos cones e da utilização do NaOCl nestes.

Materiais e Métodos

O trabalho experimental decorreu no Laboratório de Microbiologia Aplicada do Instituto Superior de Ciências da Saúde Egas Moniz, em conjunto com a Clínica Dentária Universitária Egas Moniz.

Quarenta (40) caixas de cones de *gutta-percha* (tamanhos 20 e 25; 20 caixas de cada tamanho) (figuras 1 e 2) foram identificadas e abertas em laboratório. Foi retirado um cone de cada caixa e colocado num tubo com 3ml de soro fisiológico estéril (amostra ao tempo zero). Todos os tubos foram agitados durante 20 minutos a 120rpm.

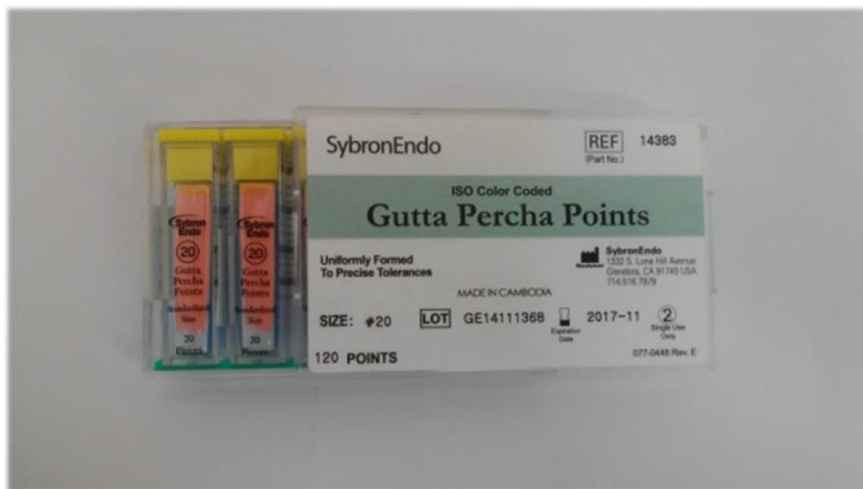


Figura 1 - Caixa de cones de *gutta-percha* #20

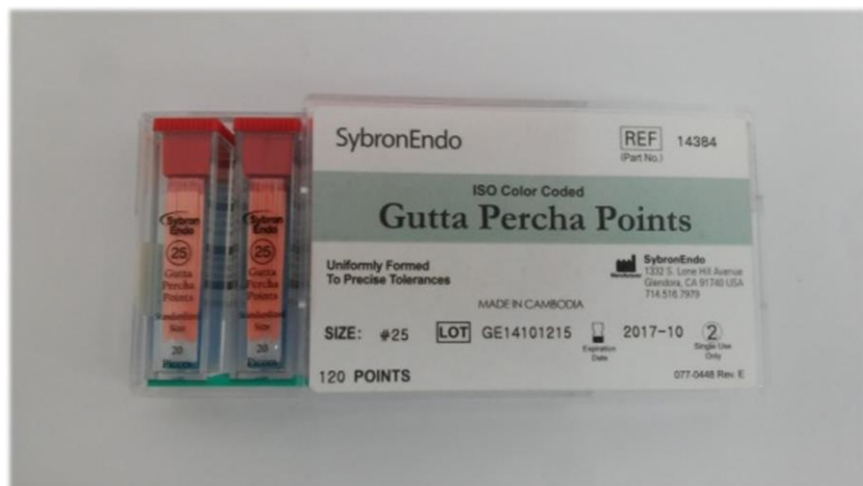


Figura 2 - Caixa de cones de *gutta-percha* #25

Esta solução de lavagem foi utilizada para inocular 6 meios de cultura diferentes (figura 3): Trypticase Soja Agar (TSA), Gelose de Sangue (GS); Mitis Salivarius Agar (MSA), D-Coccosel (DC), Sabouraud com cloranfenicol e gentamicina (SCG), e Chapman / Manitol Sal Agar (MAS), 200µl em cada meio. Os meios de GS e MSA foram colocados na estufa a 37° C em atmosfera de anaerobiose (com gerador de CO₂) (figura 4).

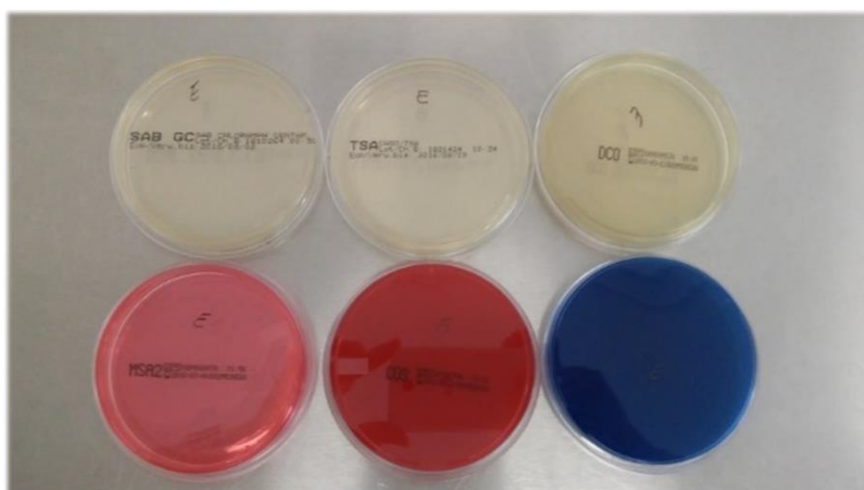


Figura 3 - Meios de cultura sólidos



Figura 4 - Jarra de anaerobiose

Após 48h de incubação, retiraram-se as placas da estufa e registaram-se os resultados do tempo zero. Cada placa contém um meio de cultura específico para determinado microrganismo. Utilizaram-se TSA em aerobiose e GS em anaerobiose, para isolar germes totais aeróbios e anaeróbios (respetivamente), MSA para isolamento de *Streptococcus spp.*, SCG para isolamento de *Candida spp.*, DC para isolamento de *Enterococcus faecalis* e o meio de cultura MAS para isolamento de *Staphylococcus spp.*

As caixas de cones em estudo foram colocadas em circulação na Clínica Dentária Universitária Egas Moniz durante 6 semanas. Foram efetuadas mais duas amostragens (colheita e análise de cones como explicado para o tempo zero): ao final de 3 semanas e de 6 semanas. Os utilizadores dos cones tinham a indicação de que o último cone de cada caixa nunca poderia ser utilizado, sob pena de invalidar o estudo. Foram efetuados exames a fresco com observação ao microscópico, testes da catalase e coloração de Gram, para auxílio na identificação dos microrganismos isolados.

Tendo por base a ideia de que os cones seriam contaminados durante a circulação das caixas na clínica, reforçada pelos resultados do tempo zero, foi desenhado e avaliado um protocolo de desinfeção, com o objetivo de minimizar a contaminação dos cones.

Protocolo de desinfeção

Foi escolhido para avaliação um protocolo de desinfeção com hidróxido de sódio (NaOCl) a 1% e álcool a 70%. Foi escolhido o NaOCl a 1%, pois soluções pouco concentradas deste composto são por vezes utilizadas para irrigação dos canais.

Contaminaram-se cones de *gutta-percha* com diferentes microrganismos: *Candida albicans*, *E. coli*, *Streptococcus mutans*, *Enterococcus faecalis*. Uma levedura, um bacilo e dois cocos, todos microrganismos que se podem isolar na boca. Verificou-se se o protocolo desenhado era eficaz a eliminar estes microrganismos dos cones.

Prepararam-se de cada bactéria suspensões com um conteúdo microbiano aproximado de 10^8 ufc/ml (unidades formadoras de colónias/mililitro - suspensões com uma turvação na escala de MacFarland de 0,5 para os bacilos e 1 para os cocos), Para a levedura *Candida* foi preparada uma suspensão com uma turvação de 0,5 equivalente a uma concentração aproximada de 10^6 ufc/ml.

Utilizaram-se para cada microrganismo dois cones de *gutta-percha* (um que não será sujeito ao protocolo – Branco (Br) e outro que será sujeito ao protocolo – Amostra (Am)). Inoculou-se em cada 20 µl da respetiva suspensão preparada, e deixou-se secar em câmara de fluxo laminar.

Após os cones secos, um cone inoculado com cada microrganismo foi colocado num tubo com 1ml de soro fisiológico estéril - Br. Agitaram-se os tubos 10 minutos a 120 rpm, e efetuaram-se diluições decimais até 1:1000. Desta diluição inocularam-se 100µl em meio de cultura: TSA para *E.coli* e *Enterococcus faecalis*, SCG para *Candida albicans* e GS para *Streptococcus mutans*. Após incubação (24h ou 48h a 37°C) efetuou-se a contagem das colónias e determinou-se o valor inicial utilizado para a contaminação, ou seja a concentração microbiana inicial.

O segundo cone de cada microrganismo, foi submerso em 3ml de NaOCl a 1% durante 30seg, borrifado de seguida com álcool a 70% e deixado a secar numa compressa esterilizada durante aproximadamente 30 seg - Am. Após seco foi colocado num tubo com 1ml de soro fisiológico estéril. Agitaram-se os tubos 10 minutos a 120 rpm. Desta solução inocularam-se 100µl em meio de cultura: TSA para *E.coli* e *Streptococcus faecalis*, SCG para *Candida albicans* e GS para *Streptococcus mutans*. Após incubação (24h ou 48h a 37°C) efetuou-se a contagem das colónias.

Avaliaram-se os resultados por forma a validar o protocolo de desinfeção.

Resultados e Discussão

Ao retirar as placas de crescimento (das inoculações das soluções de lavagem dos cones em circulação) da estufa, foi realizada a contagem das colônias presentes (figuras 5, 6, 7, 8) e de seguida, os cálculos devido às diluições efetuadas. Todos os resultados foram registados nas tabelas 1-7.

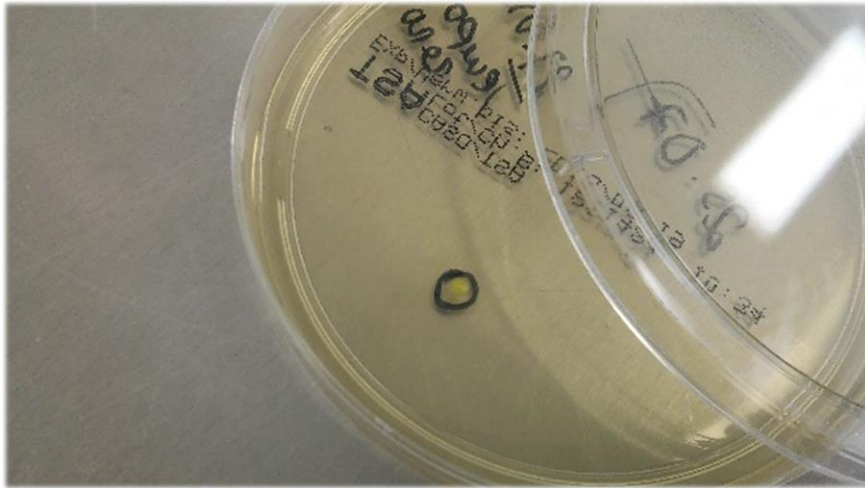


Figura 5 - Colónia de germes totais (tempo zero; caixa #25.07)

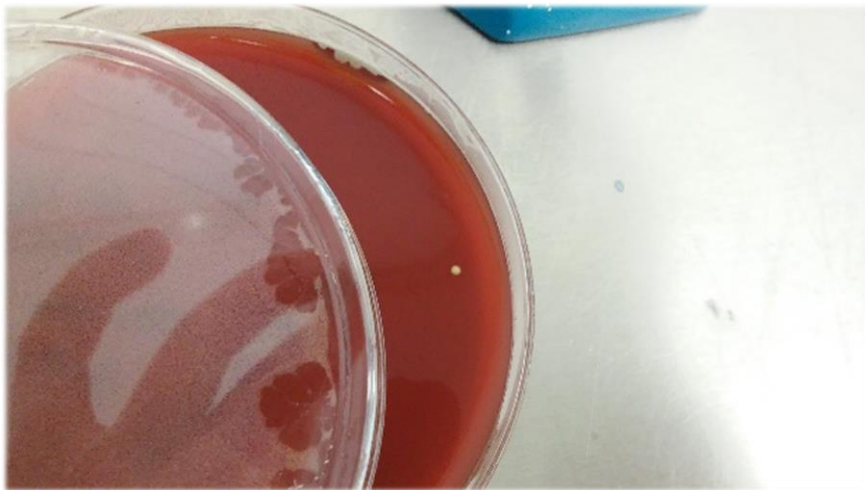


Figura 6 – Colónia de germes totais anaeróbios (tempo zero; caixa #25.16)

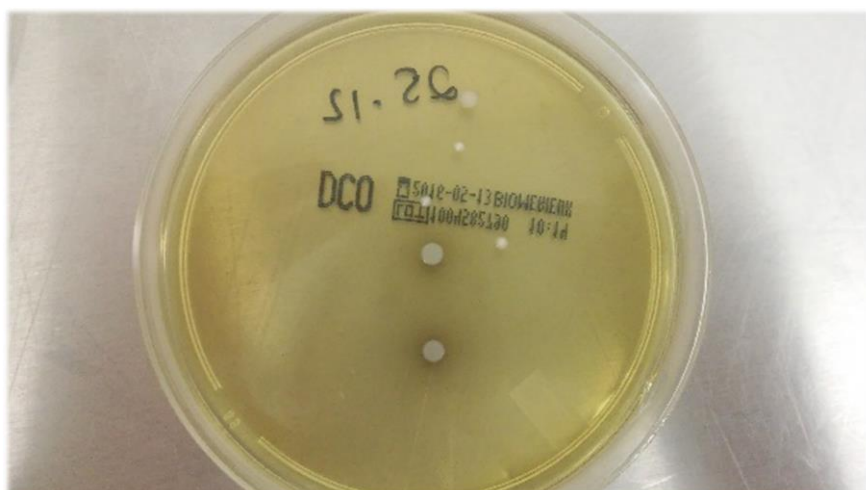


Figura 7 - Colónias de *Enterococcus faecalis* (3 semanas; caixa #25.12)



Figura 8 - Colónias de *Streptococcus spp.* (3 semanas; caixa #20.18)

Tabela 1 - Germes totais

Nº caixa	Tempo zero (ufc/cone)	3 semanas (ufc/cone)	6 semanas (ufc/cone)
20.01	<15	<15	<15
20.02	<15	<15	<15
20.03	<15	<15	n.d.
20.04	<15	<15	n.d.
20.05	<15	<15	<15
20.06	<15	930	n.d.
20.07	<15	15	n.d.
20.08	<15	<15	<15
20.09	<15	<15	<15
20.10	<15	<15	<15
20.11	<15	<15	<15
20.12	<15	<15	<15
20.13	<15	<15	n.d.
20.14	<15	<15	<15
20.15	<15	<15	<15
20.16	<15	<15	60
20.17	<15	<15	n.d.
20.18	<15	<15	<15
20.19	<15	<15	<15
20.20	<15	<15	n.d.
25.01	<15	<15	<15
25.02	<15	15	<15
25.03	<15	<15	<15
25.04	<15	<15	<15
25.05	15	<15	<15
25.06	<15	<15	15
25.07	15	<15	n.d.
25.08	<15	<15	<15
25.09	<15	<15	<15
25.10	45	<15	<15

25.11	<15	<15	<15
25.12	<15	15	<15
25.13	<15	<15	<15
25.14	<15	<15	<15
25.15	<15	<15	<15
25.16	15	<15	n.d.
25.17	<15	<15	<15
25.18	<15	<15	<15
25.19	<15	<15	<15
25.20	15	<15	n.d.

Tabela 2. *Enterococcus faecalis*

Nº caixa	Tempo zero (ufc/cone)	3 semanas (ufc/cone)	6 semanas (ufc/cone)
20.01	<15	<15	<15
20.02	<15	<15	<15
20.03	<15	<15	n.d.
20.04	<15	<15	n.d.
20.05	<15	<15	<15
20.06	<15	<15	n.d.
20.07	<15	<15	n.d.
20.08	<15	<15	<15
20.09	<15	<15	<15
20.10	<15	<15	<15
20.11	<15	<15	<15
20.12	<15	<15	<15
20.13	<15	<15	n.d.
20.14	<15	<15	<15
20.15	<15	<15	<15
20.16	<15	<15	<15
20.17	<15	<15	n.d.
20.18	<15	<15	<15
20.19	<15	<15	<15
20.20	<15	<15	n.d.
25.01	<15	<15	<15
25.02	<15	<15	<15
25.03	<15	<15	<15
25.04	<15	<15	<15
25.05	<15	<15	<15
25.06	<15	<15	<15
25.07	<15	<15	n.d.
25.08	<15	<15	<15
25.09	<15	<15	<15

25.10	<15	<15	<15
25.11	<15	<15	<15
25.12	<15	90	<15
25.13	<15	<15	<15
25.14	<15	<15	<15
25.15	<15	<15	<15
25.16	<15	<15	n.d.
25.17	<15	<15	<15
25.18	<15	<15	<15
25.19	<15	<15	<15
25.20	<15	<15	n.d.

Tabela 3. *Streptococcus spp.*

Nº caixa	Tempo zero (ufc/cone)	3 semanas (ufc/cone)	6 semanas (ufc/cone)
20.01	<15	<15	<15
20.02	<15	<15	<15
20.03	<15	<15	n.d.
20.04	<15	<15	n.d.
20.05	<15	<15	<15
20.06	<15	<15	n.d.
20.07	<15	<15	n.d.
20.08	<15	<15	<15
20.09	<15	<15	<15
20.10	<15	<15	<15
20.11	<15	<15	<15
20.12	<15	<15	<15
20.13	<15	<15	n.d.
20.14	<15	<15	<15
20.15	<15	<15	<15
20.16	<15	<15	4395
20.17	<15	<15	n.d.
20.18	<15	975	<15
20.19	<15	<15	<15
20.20	<15	<15	n.d.
25.01	<15	<15	<15
25.02	<15	<15	15
25.03	<15	<15	<15
25.04	<15	<15	<15
25.05	<15	<15	<15
25.06	<15	<15	<15
25.07	<15	<15	n.d.
25.08	<15	<15	<15
25.09	<15	<15	<15

25.10	<15	<15	<15
25.11	<15	<15	<15
25.12	<15	<15	<15
25.13	<15	<15	<15
25.14	<15	<15	<15
25.15	<15	<15	<15
25.16	<15	<15	n.d.
25.17	<15	<15	<15
25.18	<15	<15	<15
25.19	<15	<15	<15
25.20	<15	<15	n.d.

Tabela 4. *Staplylococcus spp.*

Nº caixa	Tempo zero (ufc/cone)	3 semanas (ufc/cone)	6 semanas (ufc/cone)
20.01	<15	<15	<15
20.02	<15	<15	<15
20.03	<15	<15	n.d.
20.04	<15	<15	n.d.
20.05	<15	<15	<15
20.06	<15	<15	n.d.
20.07	<15	<15	n.d.
20.08	<15	<15	<15
20.09	<15	<15	15
20.10	<15	<15	<15
20.11	<15	<15	<15
20.12	<15	<15	<15
20.13	<15	<15	n.d.
20.14	<15	<15	<15
20.15	<15	<15	<15
20.16	<15	<15	<15
20.17	<15	<15	n.d.
20.18	<15	<15	<15
20.19	<15	<15	<15
20.20	<15	<15	n.d.
25.01	<15	<15	<15
25.02	<15	<15	<15
25.03	<15	<15	<15
25.04	<15	<15	<15
25.05	<15	<15	<15
25.06	<15	<15	<15
25.07	<15	<15	n.d.
25.08	<15	<15	<15
25.09	<15	<15	<15

25.10	<15	<15	<15
25.11	<15	<15	<15
25.12	<15	<15	<15
25.13	<15	<15	<15
25.14	<15	<15	<15
25.15	<15	<15	<15
25.16	<15	<15	n.d.
25.17	<15	<15	<15
25.18	<15	<15	<15
25.19	<15	<15	<15
25.20	<15	<15	n.d.

Tabela 5. *Candida spp.*

Nº caixa	Tempo zero (ufc/cone)	3 semanas (ufc/cone)	6 semanas (ufc/cone)
20.01	<15	<15	<15
20.02	<15	<15	<15
20.03	<15	<15	n.d.
20.04	<15	<15	n.d.
20.05	<15	<15	<15
20.06	<15	<15	n.d.
20.07	<15	<15	n.d.
20.08	<15	<15	<15
20.09	<15	<15	<15
20.10	<15	<15	<15
20.11	<15	<15	<15
20.12	<15	<15	<15
20.13	<15	<15	n.d.
20.14	<15	<15	<15
20.15	<15	<15	<15
20.16	<15	<15	<15
20.17	<15	<15	n.d.
20.18	<15	<15	<15
20.19	<15	<15	<15
20.20	<15	<15	n.d.
25.01	<15	<15	<15
25.02	<15	<15	<15
25.03	<15	<15	<15
25.04	<15	<15	<15
25.05	<15	<15	<15
25.06	<15	<15	<15
25.07	<15	<15	n.d.
25.08	<15	<15	<15
25.09	<15	<15	<15

25.10	<15	<15	<15
25.11	<15	<15	<15
25.12	<15	<15	<15
25.13	<15	<15	<15
25.14	<15	<15	<15
25.15	<15	<15	<15
25.16	<15	<15	n.d.
25.17	<15	<15	<15
25.18	<15	<15	<15
25.19	<15	<15	<15
25.20	<15	<15	n.d.

Tabela 6. Germes Totais Anaeróbios

Nº caixa	Tempo zero (ufc/cone)	3 semanas (ufc/cone)	6 semanas (ufc/cone)
20.01	<15	<15	<15
20.02	<15	<15	<15
20.03	<15	<15	n.d.
20.04	<15	<15	n.d.
20.05	<15	<15	<15
20.06	<15	<15	n.d.
20.07	<15	<15	n.d.
20.08	<15	<15	<15
20.09	<15	<15	<15
20.10	<15	<15	<15
20.11	<15	<15	<15
20.12	<15	<15	<15
20.13	<15	<15	n.d.
20.14	<15	<15	<15
20.15	<15	<15	<15
20.16	<15	<15	<15
20.17	<15	<15	n.d.
20.18	<15	<15	<15
20.19	<15	<15	<15
20.20	<15	<15	n.d.
25.01	<15	<15	<15
25.02	<15	<15	<15
25.03	<15	<15	<15
25.04	<15	<15	<15
25.05	<15	<15	<15
25.06	<15	<15	<15
25.07	<15	<15	n.d.
25.08	<15	<15	<15
25.09	<15	<15	<15

25.10	<15	<15	<15
25.11	<15	<15	<15
25.12	<15	<15	<15
25.13	<15	<15	<15
25.14	<15	<15	<15
25.15	<15	<15	<15
25.16	15	<15	n.d.
25.17	<15	<15	<15
25.18	<15	<15	<15
25.19	15	<15	<15
25.20	<15	<15	n.d.

A análise descritiva dos resultados foi realizada com o auxílio do software IBM SPSS Statitics 24. Foi possível verificar que ao longo do tempo, o grau de contaminação dos cones é muito baixo, sendo quase nulo.

Das 40 caixas de cones de *gutta-percha*, 10 terminaram ao fim de 3 semanas, tendo sido efetuado o estudo do último cone nesse tempo. Assim, a amostra em estudo às 6 semanas foi de 30 cones.

No tempo zero, em 12,5% das caixas foi retirado um cone contaminado com germes totais aeróbios e 5% com germes totais anaeróbios no intervalo de 15-100 ufc/cone. Todos os restantes cones tiveram um crescimento inferior a 15 ufc/cone dos microrganismos em estudo.

Às 3 semanas, 2,5% dos cones em estudo apresentaram uma contaminação com germes totais aeróbios no intervalo de 100-1000 ufc/cone, 7,5% no intervalo 15-100 ufc/cone; 2,5% estavam contaminados com *Enterococcus faecalis*, exatamente o mesmo valor para *Streptococcus* spp. no intervalo de 15-100. Tal como referido no tempo zero, os restantes cones tiveram um valor de crescimento inferior a 15 ufc/cone.

Ao final de 6 semanas, com menos 25% dos cones, 6,7% das caixas tinham um cone contaminado com germes totais aeróbios dentro do intervalo 15 – 100 ufc/cone e em 93,3% o crescimento não chegou a 15 ufc/cone.

Na totalidade (100%) dos cones obtiveram-se valores inferiores a 15 ufc/cone de *Enterococcus faecalis*, *Candida* spp. e germes totais anaeróbios; em 3,3% obtiveram-se valores acima de 1000 ufc/cone de *Streptococcus* spp., em 3,3% obtiveram-se valores compreendidos entre 15-100 ufc/cone de *Streptococcus* spp e nos restantes 93,4% obtiveram-se valores inferiores a 15 ufc/cone de *Streptococcus* spp;

Relativamente a *Staphylococcus* spp., 3,3% dos cones tiveram um crescimento entre 15 e 100 ufc/cone, enquanto em 96,7% o crescimento foi inferior a 15 ufc/cone.

A utilização continuada das caixas de cones de *gutta-percha*, não está relacionada com a contaminação destes. No entanto, o risco existe.

Os resultados obtidos após o protocolo de desinfeção encontram-se na tabela 7.

Tabela 7. Protocolo de desinfeção

Microorganismo	Inóculo (ufc/ml)	Após 30 seg com hipoclorito (ufc/ml)
<i>Streptococcus mutans</i>	$3,015 \times 10^9$	<50
<i>Enterococcus faecalis</i>	$2,95 \times 10^8$	<50
<i>E. coli</i>	$4,0 \times 10^7$	<50
<i>Candida albicans</i>	$3,5 \times 10^7$	<50

Verificou-se que a eficácia do NaOCl 1% como desinfetante dos cones de *gutta-percha* no protocolo de desinfeção, ronda os 99,9999%.

Mergulhar um cone de *gutta-percha* numa solução de NaOCl 1% durante 30 segundos, seguido de um borrifo com álcool 70% elimina *Candida albicans*, *E. coli*, *Streptococcus mutans* e *Enterococcus faecalis* dos cones de *gutta-percha*.

Discussão

Neste estudo, comprovou-se que tal como referido na introdução, os cones de *gutta-percha* quando chegam à clínica dentária para ser utilizados, não estão completamente estéreis, muito possivelmente relacionado com as condições de embalagem (Skidmore LJ, 2006).

As 40 caixas de cones de *gutta-percha* foram colocadas em circulação na CDUEM para todos os alunos do 5º ano as utilizarem durante 6 semanas, sendo que ao final de 3 semanas foi retirado um cone de cada caixa para análise. Verificou-se que ao final de 3 semanas, 10 caixas apenas tinham um cone, pois foi pedido aos utilizadores das mesmas para não utilizarem o último de cada caixa de modo a não inviabilizar o estudo, (de todas as caixas foi retirado um cone no tempo zero, e em todas elas teria de existir pelo menos mais um cone para a comparação entre pelo menos dois tempos). Deste modo, a amostra para a análise das 6 semanas diminuiu para 30 caixas de cones de *gutta-percha* (13 caixas #20 e 17 caixas #25).

Na primeira fase do trabalho, foram analisados 110 cones de *gutta-percha* e efetuadas 660 inoculações em meios de cultura sólidos (40 cones no tempo zero, 40 às 3 semanas e 30 às 6 semanas; 6 meios de cultura por cone).

Em todos os tempos observou-se crescimento microbiano referente a algum cone, o que levou a uma necessidade de desenvolvimento do protocolo de desinfeção destes.

Güven Kayaoglu (2009) estudou o grau de contaminação de 12 caixas de cones de *gutta-percha* #15-40 no tempo zero, ao final de 1 dia e ao final de 3 dias. Tal como neste estudo, foram retirados ao acaso cones de cada tamanho (dois em vez de um) para incubação em meios de cultura sólidos, mas em vez de terem sido colocados em circulação na clínica dentária, foi atribuída uma caixa a um aluno finalista de medicina dentária para ser utilizada durante 3 dias. No tempo zero, tal como ao final de 1 dia, 42% das caixas apresentavam contaminação microbiana e no terceiro dia, observou-se crescimento microbiano em 25% das caixas. Foi referida a possibilidade de descontaminação dos cones com NaOCl, no entanto, não foi referida percentagem a utilizar, nem foi testada a eficácia dessa descontaminação (Güven Kayaoglu, 2009).

Na segunda fase do estudo, foi elaborado um protocolo de desinfeção dos cones de *gutta-percha* para quatro microrganismos (*Candida albicans*, *E. coli*, *Streptococcus*

mutans e *Enterococcus faecalis*). Para cada microrganismo foram utilizados dois cones de *gutta-percha*, sendo que um foi o controlo e o outro o cone submetido ao banho de NaOCl a 1%.

Dos irrigantes endodônticos existentes, foi utilizado o NaOCl a 1% devido aos estudos existentes que demonstram a sua elevada capacidade de eliminação de bactérias, vírus, esporos e fungos (Gomes BP F. C., 2001; Vianna ME, 2004; Gomes BP V. M., 2005) tendo esta sido comprovada com a diversidade de microrganismos estudados.

Prado M. (2011) estudou a capacidade do MTAD desinfetar os cones de *gutta-percha*, provando a sua eficácia; porém, altera a estrutura da superfície do cone, o que interfere no contacto com o cimento utilizado em conjunto com este, na obturação (Prado M, 2011).

Gomes et al. (2005) concluíram que o NaOCl a 5,25% elimina esporos dos cones de *gutta-percha* em 1 minuto, e *Candida albicans* e *Enterococcus faecalis* em 45 segundos (Gomes BP V. M., 2005). No entanto, foi possível verificar neste estudo que o NaOCl a 1% durante 30 segundos elimina *Candida albicans*, *E. coli*, *Streptococcus mutans* e *Enterococcus faecalis*.

Conclusões

A utilização continuada das caixas de cones de *gutta-percha*, não está relacionada com a contaminação destes. No entanto, o risco existe.

Na sequência dos valores obtidos, apesar do grau de contaminação ao longo de 6 semanas ser quase nulo, pode-se concluir que é benéfica a implementação de um protocolo de desinfecção dos cones de *gutta-percha* de modo a diminuir o risco de necessidade de retratamento endodôntico não cirúrgico.

Quanto à eficácia do NaOCl 1% como desinfetante dos cones de *gutta-percha* no protocolo de desinfecção, ronda os 99,9999%.

Relativamente à eficácia do protocolo de desinfecção, será benéfico testar em mais microrganismos e reduzir o tempo de exposição ao NaOCl 1% de modo a simplificar o processo durante a consulta.

Bibliografia

- A. Byström, R. H. (1987). Healing of periapical lesions of pulpless teeth after endodontic treatment with controlled asepsis. *Endod Dent Traumatol*, 3, pp. 58-63.
- Agrawal Vineet S, M. R. (2014). A contemporary overview of endodontic irrigants – A review. *J Dent App*, 1(6), pp. 105-115.
- Ayhan Yildirim, H.-T. L. (2016). Obturation du canal radiculaire à la gutta-percha – exigences, composition et propriétés. *Swiss Dental Journal SSO*, 126, 150-151.
- BD. Jett, M. H. (1994). Virulence of enterococci. *Clin Microbiol Rev*, 7, pp. 462-478.
- Cag Y, C. H. (September de 2016). Resistance mechanisms. *Ann Transl Med.*, 4(17), 326.
- Carmona-Torre F, R. M. (29 de September de 2016). Directed therapeutic approach to *Staphylococcus aureus* infections. Clinical aspects of prescription. *Rev Esp Quimioter*, 1, 15-20.
- Condrin, A. K. (2008). Disinfection and sterilization in dentistry. *TDA Perks Program*, 1-5.
- Da Motta PG, d. F. (2000). Efficacy of chemical sterilization and storage conditions of gutta-percha cones. *Int Endod J*, 34, pp. 435-439.
- FG. Signoretti, B. G. (October de 2013). Investigation of cultivable bacteria isolated from longstanding retreatment-resistant lesions of teeth with apical periodontitis. *J Endod*, 39(10), pp. 1240-1244.
- GO. Zoletti, J. S. (2006). Identification of *Enterococcus faecalis* in root-filled teeth with or without periradicular lesions by culture-dependent and -independent approaches. *J. Endod.*, 32, pp. 722-726.
- Gomes BP, F. C. (2001). In vitro antimicrobial activity of several concentrations of sodium hypochlorite and chlorhexidine gluconate in the elimination of *Enterococcus faecalis*. *Int Endod J*, 34, pp. 424-428.

- Gomes BP, V. M. (2005). Disinfection of gutta-percha cones with chlorhexidine and sodium hypochlorite. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 100, pp. 512-517.
- Güven Kayaoglu, D. Ø. (2004). Virulence factors of enterococcus faecalis: Relationship to endodontic disease. *Crit Rev Oral Boil Med*, 15(5), pp. 308-320.
- Güven Kayaoglu, M. G. (June de 2009). Examination of gutta-percha cones for microbial contamination during chemical use. *17(3)*, 244-247.
- Happonen, R. (1986). Periapical actinomycosis: a follow-up astudy of 16 surgically treated cases. *Endod Dent Traumatol*, 2, pp. 205-206.
- HD., D. (1915). On the use of certain antiseptic substances in treatment of infected wounds. *Br Med J*, 2, pp. 318-320.
- HH. Hancock, A. S. (2001). Bacteria isolated after unsuccessful endodontic treatment in a North American population. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*, 91, pp. 579-586.
- HO Trowbridge, B. S. (1992). Microbiologic and pathologic aspects of pulpal and periapical disease. *Curr Opin Dent*, 2, pp. 85-92.
- I. Brook, E. F. (1991). Aerobic and anaerobic microbiology of periapical abscesses. *Oral Microbiol Immunol*, 6, pp. 123-125.
- IN. Rôças, J. S. (2010). Identification of bacteria enduring endodontic treatment procedures by a combined reverse transcriptasepolymerase chain reaction and reverse-capture checkerboard approach. *J. Endod*, 36, pp. 45-52.
- IN. Rôças, M. H. (2008). Microorganisms in root canal-treated teeth from a German population. *J. Endod*, 34, pp. 926-931.
- J., M. (25 de July de 2016). The Streptococcus pyogenes Carrier State. *Oklahoma Health Sciences Center*.
- K. Vinay Kumar, K. K. (May de 2015). Pathological evaluation for sterilization of routinely used prosthodontic and endodontic instruments. *J Int Soc Prev Community Dent*, 5(3), 232-236.

- Karakis D, A. C. (2016). Effectiveness of disinfectants on the adherence of *Candida albicans* to denture base resins with different surface textures. *J Oral Sci.* , 58(3), 431-437.
- Katsutaka Kuremoto, Y. N. (July de 2014). Promotion of endodontic lesions in rats by a novel extraradicular biofilm model using obturation materials. *Applied and Environmental Microbiology*, 80, pp. 3804-3810.
- Kayaoglu G, G. M. (May de 2009). Examination of gutta-percha cones for microbial contamination during chemical use. *J Appl Oral Sci.* , 17(3), 244-247.
- Klein MI, H. G. (13 de February de 2015). *Streptococcus mutans*-derived extracellular matrix in cariogenic oral biofilms. *Front Cell Infect Microbiol*, 5-10.
- M. Sakamoto, J. S. (2007). Bacterial reduction and persistence after endodontic treatment procedures. *Oral Microbiol.Immunol.*, 22, pp. 19-23.
- Marcos S. Endo, C. C. (July - September de 2013). Quantitative and qualitative analysis of microorganisms in root-filled teeth with persistent infection: Monitoring of the endodontic retreatment. *European Journal of Dentistry*, 7(3), pp. 302-309.
- Mirnejad R, S. N. (1 de September de 2016). Identification of aminoglycoside resistance genes by Triplex PCR in *Enterococcus* spp. isolated from ICUs. *Infez Med.*, 24(3), 222-229.
- MO. Wasfy, K. M. (1992). Microbiological evaluation of periapical infections in Egypt. *Oral Microbiol Immunol*, 7, pp. 100-105.
- N. Takemura, Y. M. (2004). Single species biofilm-forming ability of root canal isolates on gutta-percha points. *Eur. J. Oral Science*, 112, pp. 523-529.
- Naeem A, S. S. (August de 2015). Contamination of Dentist's Hands with and without Finger Rings. *J Int Oral Health.* , 7(8), 114-117.
- Nair PN, U. S. (1987). Intraradicular bacteria and fungi in root-filled, asymptomatic human teeth with therapy-resistant periapical lesions: A long term light and electron microscopic follow-up study. *J Endod*, 16, pp. 580-595.
- Nair, P. (April de 2006). On the causes of persistent apical periodontitis: a review. *Int Endod J.*, 39(4), pp. 249-281.

- Nomura R, O. Y. (21 de July de 2016). Contribution of the Collagen-Binding Proteins of *Streptococcus mutans* to Bacterial Colonization of Inflamed Dental Pulp. *PLoS One*, 11(7).
- Oliveira B., A. C. (2015). Evaluation of Microbial Reduction in Root Canals Instrumented with Reciprocating and Rotary Systems. *Acta stomatol Croat.*, 49(4), 294-303.
- Paulsen J, S. E. (1 de March de 2016). The Impact of Infectious Disease Specialist Consultation for *Staphylococcus aureus* Bloodstream Infections: A Systematic Review. *Open Forum Infect Dis* , 3(2).
- Pessoa de Andrade L, C. d. (2014). Contamination of absorbent paper points in clinical practice: a critical approach. *Gen Dent.* , 62(4), 38-40.
- Petti S, T. G. (May de 2006). Detection and quantification of dental unit water line contamination by oral streptococci. *Infect Control Hosp Epidemiol.*, 27(5), 504-509.
- Prado M, d. A. (2011). Effect of disinfectant solutions on the surface free energy and wettability of filling material. *J Endod*, 37, pp. 980-982.
- Prado M, G. H. (2012). Effect of disinfectant solutions on gutta-percha and resilon cones. *Microsc Res Tech*, 75, pp. 791-795.
- Prado M, S. R. (2013). Impact of different irrigation protocols on resin sealer bond strength to dentin. *J Endod*.
- Ricardo Jorge Simões, P. F. (January de 2013). Oral infections by *Candida* spp. *Revista CRO* , 19-22.
- Ricciardi W, G. G. (1 de July de 2016). Surveillance and Control of Antibiotic Resistance in the Mediterranean Region. *Mediterr J Hematol Infect Dis.*, 8(1).
- Rice CD, D. M. (April de 1991). Bacterial contamination in irreversible hydrocolloid impression material and gingival retraction cord. *J Prosthet Dent.* , 65(4), 496-499.
- Richard A Calderone, W. A. (1 de July de 2001). Virulence factors of *Candida albicans*. *Trends in microbiology*, 9(7), 327–335.

- Rocha AW, d. A. (2012). Influence of endodontic irrigants on resin sealer bond strength to radicular dentin. *Bull Tokyo Dent Coll*, 53, pp. 1-7.
- S. Kwang, A. A. (2014). The critical time-lapse between various restoration replacements and subsequent endodontic intervention. *J Endod*, 40, pp. 1922-1926.
- Siqueira JF Jr, R. I. (2001). Apical sealing ability of five endodontic sealers. *Aust Endod J*, 27, pp. 33-35.
- Skidmore LJ, B. D. (2006). An in vitro comparison of the intraradicular dentin bond strength of Resilon and gutta-percha. *J Endod*, 32, pp. 963-966.
- Spangberg L, E. B. (1973). Biologic effects of dental materials. 3. Toxicity and antimicrobial effect of endodontic antiseptics in vitro. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*, 36, pp. 856-871.
- Stjärne Aspelund A, S. K. (September de 2016). Acetic acid as a decontamination method for sink drains in a nosocomial outbreak of metallo- β -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa*. *J Hosp Infect*, 94(1), 13-20.
- Stratton RK, A. M. (2006). A fluid filtration comparison of gutta-percha versus Resilon, a new soft resin endodontic obturation system. *J Endod*, 32, pp. 642-645.
- Sundqvist, G. (1992). Associations between microbial species in dental root canal infections. *Oral Microbiol Immunol*, 7, pp. 257-262.
- V. Peciuliene, I. B. (2000). Isolation of *Enterococcus faecalis* in previously root-filled canals in a Lithuanian population. *J Endod*, 26, pp. 593-595.
- Vanessa Zardo, A. M. (2004). Os antifúngicos nas infecções por *Candida* sp. *News Lab*, 136-146.
- Vianna ME, G. B. (2004). In vitro evaluation of the antimicrobial activity of chlorhexidine and sodium hypochlorite. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 97, pp. 79-84.
- Walsh, L. J. (1997). Serious complications of endodontic infections: Some cautionary tales. *Australian Dental Journal*, 42(3), pp. 156-159.

Weid, D. v. (June de 2015). Infection prevention and patient safety improvement in developing countries thanks to sodium hypochlorite production devices. *Antimicrobial Resistance and Infection Control* , 4(1).

William A. Rutala, D. J. (2013). Disinfection and sterilization: An overview. *American Journal of Infection Control*, S2-S5.

Yildirim A, L. H. (2016). Endodontic filling points with gutta percha - requirements, composition and properties. *swiss dent j*, 126(1), 40-41.

Zehnder, M. (2006). Root canal irrigants. *J Endod*, 32, pp. 389-398.