EGAS MONIZ SCHOOL of HEALTH & SCIENCE | INSTITUTO UNIVERSITÁRIO EGAS MONIZ

INSTITUTO UNIVERSITÁRIO EGAS MONIZ

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA

Comparação das técnicas de ativação sónica e laser na irrigação endodôntica para a erradicação de *Enterococcus faecalis:* Um estudo *in vitro*

Trabalho submetido por
Margarida Santa Comba Macedo
para a obtenção do grau de **Mestre** em Medicina Dentária

outubro de 2024

EGAS MONIZ SCHOOL of HEALTH & SCIENCE | INSTITUTO UNIVERSITÁRIO EGAS MONIZ

INSTITUTO UNIVERSITÁRIO EGAS MONIZ

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA

Comparação das técnicas de ativação sónica e laser na irrigação endodôntica para a erradicação de *Enterococcus faecalis:* Um estudo *in vitro*

Trabalho submetido por
Margarida Santa Comba Macedo
para a obtenção do grau de **Mestre** em Medicina Dentária

Trabalho orientado por
Prof. Doutora Lucinda Bessa
E coorientado por
Prof. Doutor João Neves

outubro de 2024

Agradecimentos

À Prof. Doutora Lucinda Bessa, minha orientadora, pela confiança depositada, pela constante disponibilidade e apoio, pelo perfeccionismo e empenho ao longo da realização deste trabalho.

Ao Prof. Doutor João Neves, com quem partilho o gosto pela Endodontia, pela amizade construída, por acreditar nas minhas ideias e confiar em mim, pela sua constante disponibilidade e positividade, por simplificar todas as situações e por me desafiar a sair da minha zona de conforto.

Ao Prof. Doutor Luis Proença, pelos conselhos dados que foram uma grande ajuda na análise estatística dos resultados.

Ao Dr. Alejandro Perez, dono da marca 3DsurpreenDente tooth pela sua contribuição e pelo feedback dado.

Ao Nuno Tomé, representante da Biolase em Portugal, pela disponibilidade e cedência de material.

Aos meus pais, por estarem presentes todos os dias, por apoiarem todas as minhas decisões e pela educação que me trouxe até aqui. Agradeço por me ensinarem a nunca desistir e por me desafiarem a lutar pelos meus sonhos e objetivos.

Aos meus avós e família que celebram comigo todas as minhas conquistas e as tornam possíveis.

Ao meu avô Lindolfo, que no momento de escolher o curso, sugeriu que seguisse Medicina Dentária.

Aos meus amigos de infância, que ajudaram a moldar quem sou e que estiveram sempre presentes, tornando o meu caminho mais animado e alegre.

Às minhas amigas de curso, com quem tive o prazer enorme de partilhar estes 5 anos de curso. Marcados por momentos de aprendizagem e de muitas semanas académicas.

Por fim, às minhas amigas Verónica Quina Barros e Ana Corchero, as primeiras que fiz ao entrar na faculdade, e que estiveram presentes todos os dias ao longo destes cinco anos, com quem cresci e partilhei todas as experiências ao longo deste percurso.

Resumo

Introdução: O avanço científico tem revelado o papel dos biofilmes bacterianos na capacidade de adesão às paredes do canal radicular, dificultando o tratamento das infeções endodônticas. Os principais desafios no tratamento endodôntico compreendem a anatomia radicular e a infeção microbiana. Após a conformação dos canais, a irrigação torna-se essencial, exercendo uma ação tanto mecânica quanto química. Atualmente, vários sistemas e protocolos de irrigação complementam a instrumentação, removendo tecido pulpar necrótico, a *smear layer* e as bactérias, assegurando o sucesso do tratamento endodôntico.

Objetivos: O objetivo foi implementar um estudo *in vitro* usando modelos 3D de dentes molares para determinar se as técnicas de irrigação com ativação sónica e ativação laser, são mais eficazes do que a irrigação passiva na desinfeção e limpeza dos canais radiculares.

Materiais e Métodos: O estudo foi dividido em duas fases, uma primeira fase de otimização de protocolos para quantificação e análise da formação de biofilme. E uma segunda fase para comparar os diferentes protocolos de irrigação na erradicação de biofilme de *E. faecalis*. No total foram utilizados 51 modelos 3D de molares inferiores (3DsurpreenDente tooth, Portugal) com 2 raízes e 3 canais (2 canais mesiais e 1 canal distal). Os canais foram preparados mecanicamente, esterilizados, e seguidamente inoculados para formação do biofilme de *E. faecalis* durante 21 dias. Os protocolos de irrigação foram aplicados e o biofilme remanescente foi recolhido dos canais radiculares e analisado através da contagem de UFCs/mL, qPCR, e microscopia de fluorescência.

Resultados: As 3 análises mostraram-se consistentes entre si. A ativação com laser revelou ser o método com maior redução da carga bacteriana, seguido da ativação sónica. Ambos os métodos de ativação demonstraram ser mais eficazes do que a irrigação manual convencional na remoção de *E. faecalis.*

Conclusão: Espera-se que os resultados obtidos ajudem a melhorar os procedimentos clínicos e, consequentemente, aumentar o sucesso dos tratamentos endodônticos.

Palavras-Chave: *Enterococcus faecalis;* Irrigação Endodôntica; Ativação sónica; Ativação Laser

Abstract

Introduction: Scientific advances have uncovered the role of bacterial biofilms in their ability to adhere to the walls of the root canal, making the treatment of endodontic infections more demanding. The main challenges in endodontic treatment include root anatomy and microbial infection. After shaping the canals, irrigation becomes essential, providing both mechanical and chemical action. Currently, various irrigation systems and protocols complement instrumentation, removing necrotic pulp tissue, the smear layer, and bacteria, ensuring the success of endodontic treatment.

Objectives: The aim was to conduct an *in vitro* study using 3D molar tooth models to determine whether irrigation techniques with sonic activation and laser activation are more effective than passive irrigation in disinfecting and cleaning root canals.

Materials and Methods: The study was divided into two phases. The first phase focused on optimizing protocols for the quantification and analysis of biofilm formation. The second phase compared different irrigation protocols in the eradication of *E. faecalis* biofilm. In total, 51 3D models of lower molars (3DsurpreenDente tooth, Portugal) with 2 roots and 3 canals (2 mesial canals and 1 distal canal) were used. The canals were mechanically prepared, sterilized, and then inoculated for the formation of *E. faecalis* biofilm over 21 days. The irrigation protocols were applied, and the remaining biofilm was collected from the root canals and analyzed through CFU/mL counting, qPCR, and fluorescence microscopy.

Results: The three analyses were consistent with each other. Laser activation proved to be the method with the greatest reduction in bacterial load, followed by sonic activation. Both activation methods were more effective than conventional manual irrigation in the removal of *E. faecalis*.

Conclusion: The results obtained here are expected to help improve clinical procedures and, consequently, increase the success of endodontic treatments.

Key-words: *Enterococcus faecalis;* Endodontic Irrigation; Sonic Activation; Laser Activation

Índice Geral

I. Introdução 13

1. Etiologia das infeções endodônticas 13

1.1. O papel do biofilme nas infeções endodônticas 13

1.2. Prevalência de *Enterococcus faecalis* 15

2. A finalidade do tratamento endodôntico 16

3. Desafio da complexidade anatómica radicular 16

4. Desafio microbiológico e o papel das soluções irrigantes 19

4.1. Hipoclorito de sódio 20

4.2. Ácido etilenodiamino tetraacético 22

5. Técnicas de irrigação no tratamento endodôntico 24

5.1. O efeito *vapor lock* 24

5.2. Técnica de irrigação manual com seringa e agulha 26

5.3. Técnica de irrigação dinâmica manual 27

5.4. Irrigação com ativação sónica 27

5.5. Irrigação com ativação Laser 29

II. Objetivos do Trabalho 33

III. Materiais e Métodos 35

1. Estudo piloto: formação e análise do biofilme de *E. faecalis* em modelos 3D de dentes naturais 35

1.1. Metodologias preliminares para otimização de protocolos 35

2. Estudo *in vitro* comparativo das técnicas de ativação sónica e laser na irrigação endodôntica na erradicação de *E. faecalis* 42

2.1. Metodologias 42

2.2. Análise estatística 48

IV. Resultados 49

1. Resultados do estudo Piloto 49

2. **Resultados do Estudo *in vitro* comparativo das técnicas de ativação sónica e laser na irrigação endodôntica na erradicação de *E. faecalis*** 50

2.1. Contagens de unidade formadoras de colónias (UFCs/mL) 50

2.2. Quantificação de *E. faecalis* após análise de qPCR (reação em cadeia da polimerase em tempo real) 56

2.3. Visualização do biofilme na zona do istmo por microscopia de fluorescência 59

V. Discussão 63

VI. Conclusão 75

VII. Referências Bibliográficas 77

VIII. Anexos 95

Índice de Figuras

Figura 1: Esquema ilustrativo das fases iniciais de formação de biofilme e das primeiras interações bacterianas com a superfície..... 14

Figura 2: Modelo 3D de molar inferior com 2 canais mesiais e 1 canal distal (3DsurpreenDente tooth, Vila Nova de Gaia, Porto, Portugal), vista a) vestibular, b) mesial e c) distal. 35

Figura 3: a) Modelo 3D de molar inferior após corte da coroa ao nível da JAC, **b)** Programa utilizado para instrumentação com as limas BlueShaper (Zarc, Espanha) 4.0 torque e 500rpms, **c)** Material utilizado para a preparação mecânica dos canais..... 36

Figura 4: Ilustração do 2º método: submersão das amostras em etanol 70%..... 37

Figura 5: Ilustração do 3º método **a)** preenchimento dos canais com etanol 70%; **b)** Molares invertidos submetidos a luz UV **c)** Meio BHI sem turvação..... 37

Figura 6: Ilustração esquemática da preparação do inóculo de *E. faecalis*. 38

Figura 7: Esquema ilustrativo da recolha de *E. faecalis*..... 39

Figura 8: Esquema ilustrativo de diluições seriadas para contagem de UFCs do biofilme de *E. faecalis***.** 39

Figura 9: Istmo dentro de tubo de microcentrífuga. 41

Figura 10: Ilustração esquemática do delineamento do estudo experimental 42

Figura 11: Esquema ilustrativo do protocolo de irrigação manual passiva seguido no ensaio 45

Figura 12: Esquema ilustrativo do protocolo de irrigação com ativação sónica seguido no ensaio..... 45

Figura 13: Esquema ilustrativo do protocolo de irrigação com ativação laser seguido no ensaio. 46

Figura 14: Imagens representativas de microscopia de fluorescência, após coloração Live/Dead, da zona do istmo. É possível observar a presença de cocos, *E. faecalis*, corados de verde (vivos) e de vermelho (mortos). Ampliação 1000×. Barra de escala 10µm. 49

Figura 15: Análise gráfica boxplot: comparação dos valores de contagens de *E. faecalis* (Log_{10} UFC) dos três grupos experimentais: Controlo, IMP e IS. 53

Figura 16: Análise gráfica boxplot: comparação dos valores de contagens de *E. faecalis* (Log_{10} UFC) entre dois grupos experimentais: Controlo, IMP. 55

Figura 17: Gráfico das curvas de amplificação da análise de qPCR das amostras do 1º ensaio. As cores representam cada amostra representada na Tabela 7. 58

Figura 18 : Gráfico das curvas de amplificação da análise de qPCR das amostras do 2º ensaio. As cores representam cada amostra representada na Tabela 7. 58

Figura 19: Curvas que mostram a análise de melting das diferentes amostras dos grupos experimentais. a) 1º e 2º ensaio; b)1º ensaio; c) 2º ensaio. 59

Figura 20: Imagens representativas de microscopia de fluorescência, após coloração Live/Dead, da zona do istmo; a) controlo; b) IMP; c) IS; d) Grupo IL. É possível observar a presença de cocos, *E. faecalis*, corados de verde (vivos) e de vermelho (mortos). Ampliação 1000×. Barra de escala 10µm. 60

Índice de Tabelas

Tabela 1: Designação e identificação dos molares modelo utilizados nos ensaios. 43

Tabela 2: Valores de UFC/mL (e log_{10} UFC/mL) obtidos do biofilme de *E. faecalis* recolhido dos canais de cada um dos quatro modelos 3D de molares inferiores. 49

Tabela 3: Contagens de UFCs/mL de *E. faecalis* de cada molar, dos 4 grupos experimentais do 1º Ensaio. 50

Tabela 4: Contagens de UFCs/mL de *E. faecalis* de cada molar, dos 4 grupos experimentais do 2º Ensaio. 51

Tabela 5: Análise estatística dos valores médios de contagens de *E. faecalis* (Log_{10} UFC/mL) em diferentes grupos experimentais no 1º ensaio. A tabela apresenta as médias (M) e desvios padrão (DP) das contagens bacterianas, os intervalos de confiança de 95% (IC 95%) e os valores de significância estatística (p). 52

Tabela 6: Análise comparativa dos valores médios de contagens de *E. faecalis* (Log_{10} UFC/mL) dos diferentes grupos experimentais em relação ao grupo IL, no 1º ensaio. A tabela apresenta as médias (M) e desvios padrão (DP) das contagens bacterianas, os intervalos de confiança de 95% (IC 95%) e os valores de significância estatística (p). O valor logarítmico de referência médio de contagens de *E. faecalis* do grupo IL foi considerado como sendo 1. 53

Tabela 7: Análise estatística dos valores médios de contagens de *E. faecalis* (Log_{10} UFC/mL) em diferentes grupos experimentais no 2º ensaio. A tabela apresenta as médias (M) e desvios padrão (DP) das contagens bacterianas, os intervalos de confiança de 95% (IC 95%) e os valores de significância estatística (p). 54

Tabela 8: Análise comparativa dos valores médios de contagens de *E. faecalis* (Log_{10} UFC/mL) dos grupos controlo e IMPmem relação ao grupo IL e IS, no 2º ensaio. A tabela apresenta as médias (M) e desvios padrão (DP) das contagens bacterianas, os intervalos de confiança de 95% (IC 95%) e os valores de significância estatística (p). O valor de referência médjo de contagens de E. faecalis do grupo IL foi considerado como sendo 1. 55

Tabela 9: Comparação dos valores médios de de contagens de *E. faecalis* (M) e desvio padrão (DP) em Log_{10} UFC/mL nos Grupos Controlo e IMP entre o 1º e o 2º ensaio. 56

Tabela 10: Valores de Ct obtidos através da análise qPCR em tempo real para duas amostras de cada um dos 4 grupos experimentais do 1º e 2 ensaios. Todas as amostras foram analisadas simultaneamente, havendo por isso um único valor de controlo negativo..... 57

Lista de siglas e abreviaturas

BHI: *Brain Heart Infusion*

CBCT: Tomografia computorizada de feixe cónico

Ct: *Cycle-threshold*

CT: Comprimento de trabalho

E. faecalis: Enterococcus faecalis

EDTA: Ácido etilenodiamino tetraacético

Er, Cr:YSGG: *Erbium Chromium Yttrium Scandium Gallium Garnet*

Er:YAG: *Erbium:Yttrium Aluminum Garnet*

JAC: Junção amelocementária

Micro-CT: Tomografia computadorizada microscópica

NaOCl: Hipoclorito de sódio

PIPS™: *Photon-Induced Photoacoustic Streaming*

PPI: Irrigação por pressão positiva

PUI: Irrigação passiva ultrassónica

qPCR – Reação em cadeia da polimerase em tempo real

SEM: Microscopia eletrónica de varrimento

SWEEPS™: *Shock Wave-Enhanced Emission Photoacoustic Streaming*

TSA: *Trypticase soy agar*

UFCs: Unidades formadoras de colónias

UV: Ultravioleta

I. Introdução

1. Etiologia das infeções endodônticas

A periodontite apical apresenta uma etiologia microbiana e é uma das doenças inflamatórias orais mais prevalentes. Fungos, arqueas e vírus têm sido associados à periodontite apical, mas as bactérias e os seus produtos metabólicos são os principais responsáveis pelo desenvolvimento de patologias pulpares e periapicais (Siqueira & Rôças, 2022). O princípio para alcançar resultados favoráveis no tratamento de infeções endodônticas exige o reconhecimento do problema e a eliminação dos fatores etiológicos (Chávez de Paz, 2015).

Os avanços na microbiologia têm elucidado a natureza complexa da microbiota associada às infeções endodônticas (Chávez de Paz, 2015). Estudos indicam que essa microbiota, e principalmente as bactérias, estão organizadas estruturalmente em biofilmes, que se aderem às paredes do canal radicular (Olsen, 2015; Siqueira & Rôças, 2022).

1.1. O papel do biofilme nas infeções endodônticas

Os biofilmes são uma forma de crescimento microbiano onde os microrganismos interagem de forma dinâmica, aderindo a uma superfície e estando envolvidos numa matriz extracelular por eles produzida (Bamford et al., 2023). Os biofilmes são comunidades estruturadas e complexas que apresentam características específicas, tais como, autopoiese, homeostase e sinergismo (Jhajharia et al., 2015). Estas comunidades têm relevância clínica significativa, pois as características fenotípicas dos biofilmes conferem às células bacterianas que os compõem proteção contra 1) stresses externos, 2) resposta imunológica do hospedeiro, 3) agentes antimicrobianos (incluindo antibióticos, antifúngicos e antissépticos) e 4) forças mecânicas (Stewart, 2014; Chávez de Paz, 2015; Bamford et al., 2023). O processo de formação de um biofilme bacteriano é bem conhecido e ocorre em várias etapas. Inicialmente, uma célula bacteriana adere a uma superfície, o que desencadeia um processo de desenvolvimento e maturação do biofilme, e por fim, há dispersão de células para iniciar novos biofilmes (Figura 1). Este processo é regulado em resposta às condições externas e envolve interações contínuas com a superfície e com o crescimento do biofilme (Chávez de Paz, 2015).

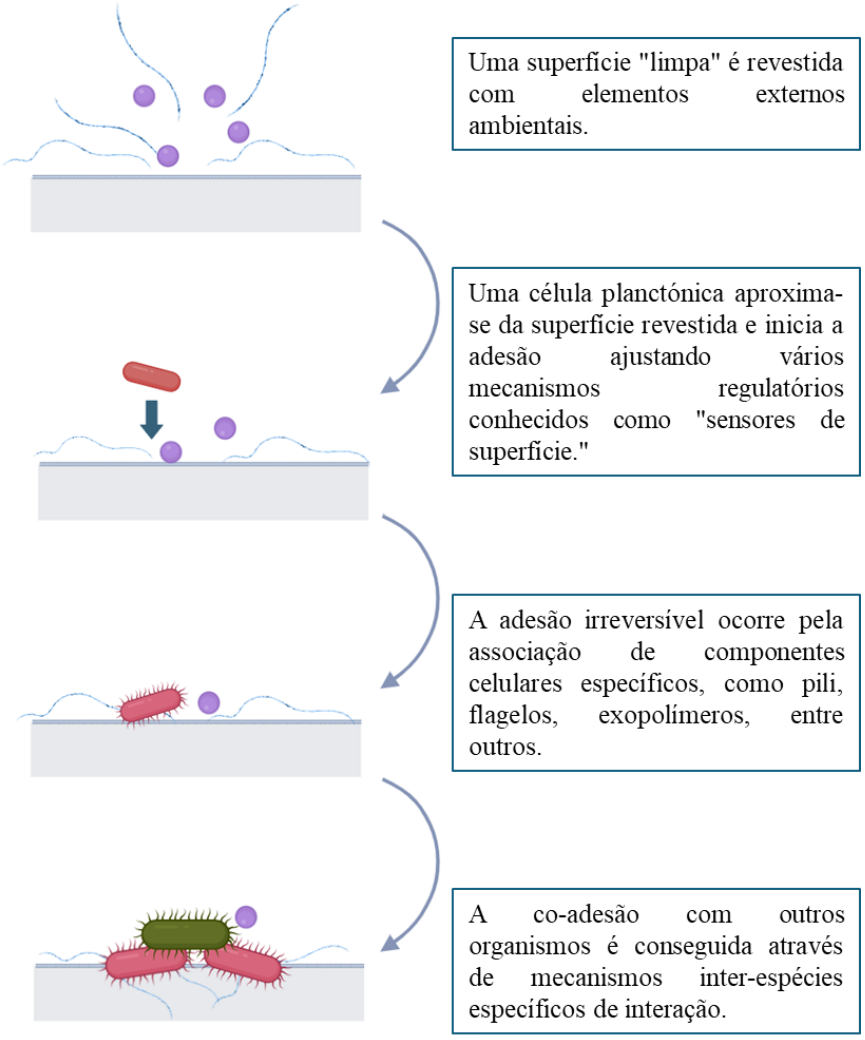


Figura 1: *Esquema ilustrativo das fases iniciais de formação de biofilme e das primeiras interações bacterianas com a superfície.*

A presença de biofilmes nos canais radiculares é um fator crítico na patogénese da pulpite e da periodontite apical. Quando estas comunidades de microrganismos aderem às paredes do canal radicular, especialmente em regiões de difícil acesso, como o terço apical, canais acessórios e istmos, as proteínas derivadas do hospedeiro provenientes dos tecidos necróticos remanescentes e as substâncias adesivas produzidas pelas próprias bactérias proporcionam os pré-requisitos adequados para a sobrevivência dos microrganismos (Jhajharia et al., 2015). Esta situação contribui para a formação de um efeito barreira que impede a desinfeção e limpeza eficazes, e que combinado com a resistência das células bacterianas à fagocitose, esta barreira leva à persistência da

infeção, dificultando a eficácia do tratamento (Stewart, 2014; Chávez de Paz, 2015; Prada et al., 2019).

A espessura e a composição da matriz do biofilme variam conforme a idade do biofilme e o tipo de espécies que constituem, influenciando a resistência e o comportamento patogénico do mesmo (Abdallah et al., 2014; Siqueira & Rôças, 2022).

1.2. Prevalência de *Enterococcus faecalis*

Embora as infeções endodônticas sejam frequentemente de natureza polimicrobiana, as condições ambientais do canal radicular tendem a favorecer o crescimento de certas espécies, nomeadamente de *Enterococcus faecalis (E. faecalis)*. No entanto, é importante notar que *E. faecalis* representa apenas uma pequena fração da microbiota da cavidade oral (Khalifa et al., 2016; Henriques et al., 2016; Mohmmed et al., 2018; Prada et al., 2019; Zhang et al., 2019).

E. faecalis é uma bactéria anaeróbia facultativa, coco Gram-positivo. Esta bactéria habita a cavidade oral, o trato gastrointestinal e o trato genital (de Almeida et al., 2018), mas pode tornar-se patogénica, sendo frequentemente encontrada em infeções do canal radicular, com uma prevalência que varia entre 30% e 90% dos casos (Gomes et al., 2021). Infeções endodônticas secundárias ou persistentes têm uma probabilidade significativamente maior de conter *E. faecalis* em comparação com infeções endodônticas primárias (Gomes et al., 2021). Além disso, *E. faecalis* tem a capacidade de resistir às condições adversas encontradas no canal radicular, tais como ambientes alcalinos e falta de nutrientes por períodos prolongados. Esta resistência pode ser atribuída à sua capacidade de formar biofilmes (Khalifa et al., 2016).

Uma vez estabelecida a infeção no canal radicular, esta progride gradualmente em direção ao ápex, até que as bactérias e/ou os seus fatores de virulência atinjam os tecidos periapicais através dos forames apicais e laterais, causando inflamação. A periodontite apical é, então, estabelecida nesse momento, podendo manifestar-se de forma sintomática (aguda) ou assintomática (crónica), dependendo de diversos fatores bacterianos e relacionados ao hospedeiro. Danos significativos dos tecidos periapicais podem ocorrer, resultando na formação de abscesso, fístula ou reabsorção óssea (Ørstavik, 2020). Neste sentido, a Endodontia surge como a área da Medicina Dentária especializada na morfologia, fisiologia e patologia da polpa dentária e dos tecidos periapicais. A sua prática

clínica compreende a etiologia, diagnóstico, prevenção e o tratamento de doenças e lesões da polpa, bem como das condições periapicais associadas (AAE, 2016; Pérez et al., 2020).

2. A finalidade do tratamento endodôntico

O sucesso do tratamento endodôntico é avaliado segundo critérios clínicos e radiográficos (Zandi et al., 2019). Os objetivos principais do tratamento endodôntico são a prevenção e o tratamento da periodontite apical, para preservar a longo prazo o dente assintomático e funcional rodeado de tecidos periapicais saudáveis (Gluskin et al., 2014). Estes objetivos são alcançados pelo desbridamento mecânico combinado com a desinfeção química através de soluções irrigantes. Estes passos são fundamentais para eliminar ou reduzir a carga microbiana e os seus produtos metabólicos, presentes no canal radicular, assim como os detritos inorgânicos *(smear layer)* que podem conter bactérias e ser um foco de reinfeção (Versiani et al., 2016).

A *smear layer* é uma camada amorfa e irregular composta por detritos inorgânicos, juntamente com materiais orgânicos como restos de tecido pulpar, resíduos de odontoblastos, microrganismos, produtos metabólicos e tecido necrótico (Violich et al., 2010). Alguns componentes orgânicos da *smear layer* podem, potencialmente, servir como substrato para bactérias e protegem os biofilmes. A sua espessura pode variar entre 1 a 5 μm, sendo suficiente para dificultar a penetração de irrigantes e selantes nos túbulos dentinários até 40 μm, o que compromete a desinfeção adequada. Assim, a irrigação química torna-se um complemento essencial para garantir uma desinfeção eficaz (Mello et al., 2009; Morago et al., 2016).

No entanto, há muitos outros fatores que influenciam o sucesso do tratamento endodôntico, como a qualidade da restauração e a integridade estrutural do dente após a preparação do canal radicular (Ray & Trope, 1995).

No tratamento endodôntico, é fundamental reconhecer dois principais desafios: o desafio anatómico e o desafio microbiológico.

3. Desafio da complexidade anatómica radicular

O sistema de canais radiculares possui uma configuração irregular e anatomias complexas, como canais curvos, istmos, canais laterais e canais ovais, que representam

um desafio na prática clínica, e afetam o sucesso do tratamento endodôntico (Mazzi-Chaves et al., 2020). A dentina radicular tem uma natureza porosa com túbulos dentinários que permitem a invasão e adesão bacteriana, tornando a desinfeção do canal uma etapa desafiadora (Chávez de Paz, 2015).

A instrumentação mecânica dos canais radiculares é realizada com sistemas de limas endodônticas, que permitem conformar os canais radiculares removendo dentina radicular vital e/ou necrótica e o biofilme microbiano. Esta preparação mecânica cria um espaço adequado e limpo, o que facilita a penetração e o fluxo eficaz das soluções irrigantes por todo o sistema radicular (Neelakantan et al., 2016;Lee et al., 2019). A eficácia destes instrumentos e das soluções irrigantes pode ser comprometida na presença das anatomias complexas, onde algumas áreas do canal radicular não são tocadas e limpas pelas técnicas convencionais (Siqueira et al., 2013; Mazzi-Chaves et al., 2020;). Essas áreas de difícil acesso também podem ser preenchidas com detritos dentinários criados e empurrados pelos instrumentos endodônticos, que vão interferir na desinfeção, tanto ao impedir o fluxo do irrigante nessas regiões quanto ao neutralizar a sua eficácia (Paqué et al., 2012).

As áreas de istmo (conexões entre dois canais radiculares na mesma raiz) em dentes posteriores são particularmente difíceis de irrigar, o que pode resultar na sobrevivência de microrganismos nessa zona e na remoção apenas parcial de detritos dentinários e restos de tecido pulpar. A incidência de istmos nos canais varia de acordo com o tipo de dente, o nível da raiz, idade e etnia (Von Arx, 2005; Gu et al., 2009; Mazzi-Chaves et al., 2020). Um estudo relatou uma prevalência de istmos entre 17% e 50% nos 5 mm apicais da raiz mesial dos primeiros molares inferiores, sendo mais frequente na região a 3 mm do apéx (Mannocci et al., 2005.). Outro estudo mostrou que a maior prevalência de istmos em primeiros molares mandibulares ocorre entre 4 e 6 mm do ápex (Gu et al., 2009).

Chuppani Dastgerdi e colaboradores analisaram, por meio de tomografia computorizada de feixe cónico (CBCT), 312 dentes de 156 pacientes com idades entre 20 e 60 anos, com o objetivo de investigar as características dos primeiros molares mandibulares em pacientes sem patologia ou histórico de tratamento endodôntico (Chuppani Dastgerdi et al., 2020). Os resultados em relação à presença de istmos indicaram que, quanto mais distante do ápice, maior a probabilidade de encontrar istmos. Estes foram mais frequentes em indivíduos entre 20 e 40 anos, com uma diferença estatisticamente significativa em comparação aos indivíduos entre 40 e 60 anos. Na secção de 0 a 2 mm das raízes mesiais, 36,4% das mulheres e 24,1% dos homens

apresentaram istmos, com diferença significativa. Entre 2 e 4 mm, 56,5% das mulheres e 45,6% dos homens tinham istmos, embora sem significância estatística, e em secções mais distantes (4-6 mm), a diferença foi ainda menos expressiva.

Estudos que utilizaram uma abordagem inovadora para correlacionar imagens de tomografia computadorizada microscópica (micro-CT) com microscopia ótica ou eletrónica de varrimento (SEM) mostraram que existem áreas do canal radicular que, após a preparação mecânica e a desinfeção, apresentam remanescentes de tecido pulpar necrótico e/ou biofilmes bacterianos que não são significativamente afetados pelos instrumentos e pelas soluções irrigantes (Paqué et al. 2009; De-Deus et al. 2015; Versiani et al. 2016; Lacerda et al., 2017). No entanto, uma das limitações da micro-CT é que só pode ser utilizada em dentes extraídos e deteta apenas matéria inorgânica, não conseguindo medir os efeitos químicos do hipoclorito de sódio (NaOCl) em tecidos moles (Paqué et al., 2009).

O estudo de Siqueira Junior e colaboradores, em 2013, mostrou que aproximadamente 20% a 35% das paredes do canal radicular em molares superiores e inferiores permanecem intocadas pelos instrumentos, sem considerar a área de istmos (Siqueira Junior et al., 2013).

Num outro estudo, Pérez e colaboradores compararam instrumentos com modificações na liga e com diferentes designs propostos para a preparação do canal radicular, e verificaram que quando utilizados durante a instrumentação com irrigação de NaOCl, tanto os instrumentos Reciproc Blue quanto os XP-endo Shaper promoveram uma confirmação satisfatória, mas mais de metade dos canais radiculares ainda apresentaram bactérias residuais e/ou restos de tecido pulpar (Pérez et al., 2020).

Desta forma, a combinação da irrigação com a instrumentação mecânica parece ser essencial para uma desinfeção mais eficaz, especialmente considerando que o uso exclusivo da instrumentação não é suficiente para eliminar o biofilme radicular e a irrigação é a única forma de alcançar as áreas da parede do canal radicular que não são tocadas pela instrumentação mecânica (Haapasalo et al., 2014a; Siqueira Junior et al., 2018; Lee et al., 2019).

4. Desafio microbiológico e o papel das soluções irrigantes

Com base nas suposições mencionadas, após o desbridamento e conformação dos canais, a irrigação torna-se essencial para a desinfeção e limpeza do sistema de canais radiculares. As soluções irrigantes atuam de forma mecânica e química em todo o espaço do canal previamente preparado (Siqueira et al., 2013; Pereira et al., 2022). Estas técnicas complementam a instrumentação e são parte fundamental do protocolo de desinfeção final, com o objetivo de eliminar o tecido pulpar necrótico, a *smear layer*, as comunidades bacterianas e os seus subprodutos, assegurando uma limpeza e desinfeção eficazes (Mohmmed et al., 2018).

As soluções irrigantes em endodontia podem ser classificadas em soluções antimicrobianas, soluções quelantes (fortes ou fracas), combinadas (soluções antibacterianas e quelantes combinadas) e soluções com detergentes (Bettina & Gevik, 2015).

Na ausência de evidência científica consistente sobre os regimes e protocolos de irrigação endodôntica, a utilização de soluções para este fim varia amplamente entre dentistas e especialistas (Willershausen et al., 2015).

Em teoria, uma solução irrigante ideal deve possuir características como biocompatibilidade, baixa tensão de superfície, ação de lavagem eficaz, ação lubrificante, ajuda no corte da dentina pelos instrumentos, dissolução de matéria orgânica e inorgânica, boa penetração nos canais radiculares e propriedades antimicrobianas. Além disso, não deve apresentar efeitos negativos como citotoxicidade para os tecidos periapicais, reagir de forma adversa com outros materiais dentários ou ser alergénica (Haapasalo et al., 2014a).

Atualmente, não existe uma solução que reúne todas estas caraterísticas. Na prática clínica, para garantir a segurança e eficácia do processo é necessário utilizar uma combinação de soluções em sequência específica para contribuir ao máximo para o sucesso do tratamento do canal radicular (Haapasalo et al., 2014a; De Gregorio et al., 2015).

4.1. Hipoclorito de sódio

O NaOCl é o principal irrigante utilizado em endodontia devido às suas propriedades antimicrobianas e proteolíticas. Atualmente, é a solução mais eficaz na erradicação de biofilmes e na dissolução de tecidos orgânicos (Haapasalo et al., 2014a).

4.1.1. Mecanismo de ação

O NaOCl atua como agente oxidante e agente hidrolisante. As soluções comerciais são fortemente alcalinas e hipertónicas, com concentrações de cloro disponível geralmente entre 10% e 14% (Bettina & Gevik, 2015).

O NaOCl dissocia-se em água, formando iões sódio (Na^+) e hipoclorito (OCl^-), este último estabelecendo um equilíbrio com o ácido hipocloroso (HOCl) em solução. O pH e a concentração de iões hidróxido (OH^-) nas soluções de NaOCl variam significativamente entre as diferentes marcas, podendo oscilar entre 10,9 e 12,0 de pH e entre 0,03% e 1,1% de concentração de OH^- (Clarkson et al., 2006). Alguns produtos têm uma maior concentração de OH^- e, portanto, um pH mais elevado. A partir de um pH acima de 9, o ião OCl^- é predominante, enquanto s pH neutro predomina HOCl. Em pH inferior a 4, começa a formar-se gás cloro. O HOCl tem um efeito antibacteriano mais forte, enquanto o ião OCl^- é menos eficaz. O HOCl afeta diretamente as funções vitais da célula microbiana, resultando rapidamente em morte celular (Fukuzaki, 2006).

A eficácia do NaOCl depende do pH da solução, mas também, da sua concentração (que varia entre 0,5% e 6%), da temperatura, das condições de armazenamento, e do tempo de contacto com os tecidos (Christensen et al., 2008). Soluções aquecidas (45-60 °C) e concentrações mais elevadas (5-6%) têm uma maior capacidade de decompor a matéria orgânica (Stojicic et al., 2010; Haapasalo et al., 2014b).

Alguns estudos demonstram que uma solução de NaOCl a 0,5% pode eliminar bactérias em 30 minutos, enquanto concentrações mais altas conseguem o mesmo resultado em apenas 30 segundos. No entanto, é necessário interpretar esses resultados com cautela, pois o tempo de ação pode variar conforme os métodos utilizados nos testes. É importante lembrar que a presença de matéria orgânica, exsudatos inflamatórios, restos teciduais e biomassa microbiana consome o NaOCl, reduzindo a sua eficácia (Glassman & Charara, 2015).

O pré-aquecimento de soluções de baixa concentração melhora a capacidade de decomposição da matéria orgânica, sem afetar a estabilidade a curto prazo, além de apresentar menor toxicidade sistémica em comparação com soluções de maior concentração a temperatura mais baixa, mantendo a eficácia (Sirtes et al., 2005). A agitação mecânica das soluções de NaOCl também é considerada importante para a dissolução de tecidos, havendo quem destaque o impacto significativo do fluxo turbulento e das forças de cisalhamento geradas pela agitação nesse processo (Haapasalo et al., 2014b).

4.1.2. Limitações e recomendações clínicas

Apesar das suas propriedades ideais, o NaOCl apresenta algumas limitações e requer cuidados na sua aplicação na prática clínica. Esta solução é citotóxica e, se aplicada sob pressão e extravasar pelo forame apical, pode causar irritação dos tecidos periapicais, danos celulares e provocar dores moderadas a severas no paciente. Para mitigar estes riscos, é recomendada a utilização de agulhas endodônticas com saída lateral e a aplicação de técnicas de injeção com pressão adequada, assegurando uma irrigação segura (Haapasalo et al., 2014a; Plotino et al., 2016).

O pH das soluções de NaOCl pode diminuir ao reagir com outros irrigantes ou ao entrar em contato com a dentina radicular, o que compromete sua eficácia (Tartari et al., 2017). Para otimizar a irrigação com NaOCl, é fundamental renovar a solução regularmente e mantê-la em movimento, seja por agitação ou irrigação contínua. A agitação eficaz e a troca constante da solução aceleram a dissolução dos tecidos (Darcey et al., 2016).

Outro ponto crítico, é o facto do NaOCl não ser capaz de remover a porção inorgânica da *smear layer* (Morago et al., 2016). Ruiz-Linares e colaboradores, testaram a eficácia de 2,5% de NaOcl em biofilmes maduros de isolados clínicos de infeções endodônticas, o NaOCl demostrou uma atividade antimicrobiana superior em comparação com vários outros irrigantes. No entanto, não elimina completamente o volume do biofilme nem consegue uma erradicação total das bactérias (Ruiz-Linares et al., 2017). Estratégias para aumentar a eficácia do NaOCl na desinfeção incluem a combinação com outros agentes antimicrobianos ou quelantes (Krishnan et al., 2017).

Consequentemente, foram propostos protocolos de irrigação que utilizam NaOCl de forma alternada com uma solução aquosa contendo um agente descalcificante, como ácido etilenodiamino tetraacético (EDTA) ou ácido cítrico.

Concluindo, para garantir uma utilização segura na prática clínica, o NaOCl em concentrações entre 2,5% e 6% deve ser aplicado ao longo de todo o processo de limpeza e conformação. A câmara pulpar deve funcionar como um reservatório de irrigante fresco. Após a conclusão da preparação mecânica e a determinação do diâmetro apical final, o protocolo de irrigação deve começar com a ativação de NaOCl fresco em cada canal (Gulabivala et al., 2010).

4.2. Ácido etilenodiamino tetraacético

Na literatura, há vários estudos bem documentados que destacam as vantagens do uso de EDTA para a remoção da *smear layer* formada durante o desbridamento do canal (Arslan et al., 2013; Ahmetoglu et al., 2014).

O EDTA é um ácido aminopolicarboxílico, que se apresenta como um sólido incolor solúvel em água. É frequentemente recomendado como irrigante devido à sua capacidade de quelar e remover os componentes mineralizados da *smear layer* (Bettina & Gevik, 2015). A solução de EDTA é neutra ou ligeiramente alcalina; em pH ácido, o EDTA precipita.

O estudo de Golob e colaboradores demonstra que a aplicação de EDTA promove a limpeza da superfície dentinária e a abertura dos túbulos dentinários, e dessa forma, a penetração do NaOCl nos túbulos dentinários e a eliminação de *E. faecalis* torna-se mais eficaz e facilitada (Golob et al., 2017).

4.2.1. Mecanismo de ação

A fórmula química do EDTA é $[CH_2N(CH_2CO_2H)_2]_2$. O EDTA é particularmente eficaz como agente quelante, uma vez que tem capacidade de sequestrar iões metálicos divalentes e trivalentes, como Ca^{2+} (Bettina & Gevik, 2015).

Pesquisas anteriores demonstram que soluções de EDTA entre 15% a 17% e pH entre 7 e 8,5 são eficazes na remoção da componente inorgânica da camada de detritos e

apresentam capacidade biocida limitada, tem uma ação quelante e propriedades lubrificantes (Biel et al., 2017).

O EDTA apresenta uma atividade biocida indireta, que está relacionada com a sua capacidade de interagir com proteínas da membrana celular bacteriana, perturbando as suas funções estruturais e catalíticas, e também à capacidade de complexar iões metálicos, como cálcio e magnésio, que são essenciais para a integridade da membrana externa dessas bactérias (Hu et al., 2003).

4.2.2. Limitações e recomendações clínicas

O EDTA por si só geralmente não consegue remover eficazmente a *smaer layer*,sendo necessário adicionar um componente proteolítico, como o NaOCl, para eliminar os componentes orgânicos dessa camada (Bettina & Gevik, 2015).

É importante que os dois irrigantes, NaOCl + EDTA, não sejam utilizados simultaneamente no canal, pois o EDTA pode reduzir a eficácia antibacteriana e solvente do NaOCl (Clarkson et al., 2011; Basrani & Haapasalo, 2013). A combinação alternada das soluções de EDTA e de NaOCl provoca uma maior dissolução da matéria orgânica e inorgânica e consequentemente a redução do conteúdo bacteriano no interior dos canais radiculares (Golob et al., 2017; Chubb, 2019). Num recente trabalho de Cardoso e colaboradores, avaliaram a influência dos protocolos de irrigação na componente inorgânica da dentina; um grupo de dentes foi irrigado apenas com EDTA (17%), outro apenas com NaOCl (5.25%) e um grupo com ambas as soluções (Cardoso et al, 2019). Os resultados mostraram que, no terço médio, todos os grupos com EDTA mostraram melhor capacidade de eliminação da *smear layer,* mas no terço apical, isso aconteceu só no grupo de EDTA + NaOCl. Esta combinação foi, assim, eficaz para desinfetar completamente o terço apical.

Desta forma, na prática clínica, após a utilização de NaOCl durante todo o procedimento de instrumentação e limpeza, a irrigação com EDTA por 1 minuto deve ser realizada para remover a camada de detritos. O EDTA pode ser ativado por alguns segundos para melhorar a penetração. Como o NaOCl e o EDTA podem interagir negativamente, é importante remover o NaOCl usando uma maior quantidade de EDTA.

5. Técnicas de irrigação no tratamento endodôntico

A irrigação pode ser realizada através de sistemas manuais ou assistidos por aparelhos. As técnicas manuais de irrigação incluem a irrigação por pressão positiva (PPI), geralmente realizada com uma seringa e uma agulha endodôntica. As técnicas de irrigação assistidas por aparelhos incluem métodos sónicos e ultrassónicos, bem como sistemas mais recentes, como a irrigação por pressão negativa apical, e sistemas laser (Afkhami et al., 2021; Liu et al., 2022).

Apesar de existirem diversos protocolos de irrigação, ainda não há um procedimento padronizado. No entanto, há etapas essenciais comuns a todos os protocolos. A irrigação com NaOCl (1 a 5,25%) é fundamental, devendo o irrigante ser renovado a cada 2 minutos, por um mínimo de 20 minutos. O aquecimento do NaOCl pode ser utilizado para aumentar a sua eficácia (Morago et al., 2019). A irrigação com EDTA, alternada com NaOCl, por 1 a 5 minutos, é crucial para remover a *smear layer* e lubrificar o canal. Após a remoção da *smear layer*, uma irrigação final com NaOCl, como agente antimicrobiano, é importante (Basrani & Haapasalo, 2013).

A irrigação pode ser estática (passiva) e dinâmica (ativa). A irrigação estática depende da profundidade de penetração da agulha. A capacidade de limpar o canal é limitada, uma vez que o irrigante permanece estático, restringindo a penetração e a circulação. A irrigação dinâmica utiliza a hidrodinâmica dos fluidos, em que a troca e a profundidade de penetração dependem do tipo de instrumento e do movimento aplicado (Machtou, 2015).

Ao longo da última década, técnicas de erradicação de biofilmes, como a sonicação de soluções irrigantes, e o uso de dispositivos ultrassónicos e lasers, têm sido investigadas em ambientes laboratoriais (Josic et al., 2022).

O objetivo das diferentes técnicas de irrigação é garantir uma distribuição ideal dos irrigantes por todo o sistema de canais radiculares, permitindo uma limpeza mais previsível nas áreas de difícil acesso (Haapasalo et al., 2014b).

5.1. O efeito *vapor lock*

Como as raízes estão rodeadas pelo periodonto, a menos que o forame do canal radicular esteja aberto, o canal comporta-se como um canal fechado. Neste contexto, cria-

se um efeito designado de *vapor lock,* que se trata de um bloqueio apical de vapor que resiste à deslocação durante a instrumentação e à irrigação final, impedindo o fluxo da solução irrigante para o terço apical e comprometendo a desinfeção adequada do sistema de canais radiculares (de Gregorio et al., 2009). O bloqueio de vapor apical também provoca o aprisionamento de gás no terço apical. Durante a irrigação, o NaOCl reage com o tecido orgânico radicular, e a hidrólise liberta grandes quantidades de amónia e dióxido de carbono (Parente et al., 2010). O fenómeno conhecido como *vapor lock* descreve a dificuldade de dispersão e mistura da solução irrigante numa geometria fechada (Gulabivala et al., 2010).

Este fenómeno foi pela primeira vez mencionado por Luks em 1974 (Luks & Bolatin, 1974). Machtou mais tarde sugeriu o uso de cera moldável para selar a ponta da raiz nos estudos in vitro, a fim de manter a viabilidade dos estudos (Machtou, 1980).

O fenómeno de *vapor lock* foi confirmado em estudos posteriores nas décadas seguintes. Num estudo em 2010, as raízes foram embebidas em material de impressão de polivinil siloxano para restringir o fluxo de fluido através do forame apical, simulando um canal fechado (Tay et al., 2010). Os resultados desse estudo revelaram um desbridamento incompleto das paredes apicais do canal ao utilizar uma técnica de irrigação com pressão positiva por seringa. Exames por micro-CT e testes histológicos também confirmaram a presença do bloqueio de vapor apical (Tay et al., 2010). De facto, estudos realizados sem garantir a simulação de um canal fechado não podem ser considerados conclusivos quanto à eficácia dos irrigantes e do sistema de irrigação (Torabinejad et al., 2003; Van Der Sluis et al., 2006;).

No entanto, outro estudo, de 2014, mostrou que o *vapor lock* nem sempre ocorre e que a inserção de uma agulha fina perto do comprimento de trabalho (CT) pode prevenir ou eliminá-lo (Boutsioukis et al., 2014a). Este resultado já era antecipado, como evidenciado por um estudo anterior que utilizou subtração digital para avaliar a penetração e renovação do irrigante durante o protocolo final de irrigação (Bronnec et al., 2010). Neste estudo, a profundidade de inserção da ponta da agulha foi o principal fator que influenciou a penetração do irrigante, seguida pela conicidade apical, o design da agulha e o volume do irrigante utilizado. A irrigação do canal radicular com agulha e seringa poderá apresentar resultados clinicamente satisfatórios se obedecer a determinadas características e protocolos (Bronnec et al., 2010).

A eliminação do bloqueio de vapor apical no terço apical, aliado às preocupações com a segurança do paciente representa um desafio significativo durante o tratamento endodôntico. Técnicas adicionais, como a ativação das soluções irrigantes ou o uso de pressão negativa apical, têm-se mostrado úteis, pois melhoram a hidrodinâmica dos fluidos no interior do canal radicular. Por isso, é essencial identificar um sistema de irrigação que permita uma irrigação eficiente dessa região, bem como dos istmos e canais laterais, garantindo que o processo seja seguro e evitando a extrusão do irrigante (Glassman & Charara, 2015).

5.2. Técnica de irrigação manual com seringa e agulha

Este sistema de irrigação é amplamente utilizado pelos médicos dentistas, pois alia a facilidade de manuseamento a uma base científica bem estabelecida e protocolada (Boutsioukis & Arias-Moliz, 2022). A técnica consiste em inserir a solução irrigante no canal radicular com o auxílio de uma seringa e agulha, possibilitando o controlo da profundidade que se deseja alcançar (Psimma et al., 2013).

A ação de limpeza, depende de fatores como, o diâmetro da agulha, o volume de irrigante, a profundidade de inserção e a anatomia do canal radicular. A solução de irrigação deve ser introduzida passivamente, por isso é necessário controlar a pressão, sem nunca bloquear a agulha dentro do canal, efetuando movimentos de vaivém (Machtou, 2015).

A escolha da agulha e da seringa é muito importante e deve ter em consideração alguns critérios. O comprimento da agulha deve ser o suficiente para fazer chegar o irrigante o mais próximo possível do CT (o ideal será entre 1 a 3 mm). O diâmetro deve ser de 28 ou 30/100 mm e o calibre 27G ou 30G. A agulha deve ser rígida para não se dobrar no canal ou fraturar (Silva et al., 2016).

As seringas utilizadas devem ser de plástico descartáveis e apresentar um sistema de bloqueio da agulha (Luer Lock) para segurança do paciente e do próprio Médico Dentista. A capacidade de volume deve ser de 2 ou 5 mililitros (Silva et al., 2016).

A principal desvantagem desta técnica é a desinfeção incompleta do terço apical, devido à complexidade do sistema de canais radiculares, tornando difícil o contacto da solução irrigante com todas as áreas do canal radicular (Haupt et al., 2020). Existe também um risco de extrusão da solução além do apéx se o CT não for respeitado e se a pressão não for adequada (Gulabivala et al., 2014; Boutsioukis, et al., 2014b). Os recentes

estudos mostram que o efeito de *flushing* (capacidade de lavagem e remoção de detritos do canal radicular) é maior se ativamos as soluções irrigantes ou aumentarmos a temperatura das mesmas (Chubb, 2019).

5.3. Técnica de irrigação dinâmica manual

A irrigação dinâmica manual difere da irrigação passiva manual pela ativação manual do irrigante de forma manual, que acontece provocando o movimento e agitação do irrigante com recurso a instrumentos manuais. É um método rápido, económico e seguro para realizar a agitação do irrigante no final da preparação do canal radicular, facilitando a substituição de solução nova com a solução estagnada nos milímetros apicais (Machtou, 2018).

A técnica de agitação com guta-percha rompe as bolhas de ar localizadas entre 0 e 2 mm do ápex (Chubb, 2019). Esta agitação também promove um maior contacto de superfície da solução pelo sistema radicular aumentando a eficiência antibacteriana comparativamente a uma técnica sem ativação. Existem ainda outras técnicas de ativação manual, como por exemplo, técnicas com recurso a limas endodônticas, mas de acordo com a evidencia científica, a ativação com guta-percha mostrou-se mais eficaz (Machtou, 2018; Chubb, 2019).

O risco de extrusão apical durante a ativação do irrigante é significativamente reduzido quando o cone de guta-percha é agitado um milímetro aquém do CT (Boutsioukis et al., 2013a). No entanto, o mesmo estudo de Boutsioukis e colaboradores, demostrou que a técnica de agitação manual resultou numa maior extrusão de irrigante em comparação com as técnicas sónicas e ultrassónicas.

5.4. Irrigação com ativação sónica

Num questionário online realizado em 2015 com dentistas do Conselho Espanhol de Medicina Dentária, foram analisados os protocolos de irrigação e outros fatores relacionados à desinfeção do canal radicular, diferenciando entre endodontistas e dentistas generalistas. Os inquiridos que usaram técnicas de ativação de soluções

irrigantes relataram que a maioria utilizava ativação ultrassónica, enquanto uma percentagem menor utilizava ativação sónica (De Gregorio et al., 2015).

A eficácia dos ultrassons na irrigação endodôntica deve-se principalmente ao efeito do fluxo acústico e da cavitação. Estes efeitos geram bolhas de gás no líquido, que se expandem e colapsam violentamente, produzindo ondas de choque. Estas ondas aumentam o stress de cisalhamento nas paredes do canal, facilitando a rutura do biofilme intrarradicular, melhorando a hidrodinâmica dos fluidos e promovendo a limpeza e desinfeção dos canais radiculares (Nusstein, 2015).

No entanto, foram identificadas várias limitações que criam problemas procedimentais ao usar a ativação ultrassónica. O contato com a parede do canal reduz a energia e limita o movimento do instrumento. Assim, em canais radiculares curvos, os instrumentos ultrassónicos têm menos probabilidade de oscilar livremente. Mesmo em canais retos, um instrumento ultrassónico entra em contato com a parede pelo menos 20% do tempo de trabalho. Além disso, embora os instrumentos de irrigação ultrassónica tenham um design não cortante, são feitos de uma liga metálica mais dura do que a dentina radicular, o que pode alterar a morfologia do canal radicular (Boutsioukis et al., 2013b; Neuhaus et al., 2016).

Para evitar os efeitos prejudiciais causados pela ativação ultrassónica, foi sugerida a ativação da solução irrigante com pontas plásticas não cortantes movidas por tecnologia sónica (Nusstein, 2015).

O princípio da ativação sónica passa por ativar a solução irrigante através de uma ponta de poliamida não cortante acopolada a um aparelho de ultrassons que funciona a uma frequência sónica entre (1000-6000 Hz) e de alta amplitude (Borges et al, 2017).

Existem vários sistemas de ativação sónica como por exemplo o sistema EndoActivator (Dentsply Sirona) e o sistema EDDY (VDW) (Neuhaus et al., 2016; Urban et al., 2017).

No sistema EDDY, existe um dispositivo sónico acionado por um punho sónico a cerca de 5000 a 6000 Hz. O dispositivo apresenta uma ponta plástica não cortante e flexível possibilita uma ativação segura de vários reagentes, uma vez que produz uma agitação forte do fluido evitando o corte ativo da dentina do canal radicular ou a abertura da constrição apical (Neuhaus et al., 2016; Urban et al., 2017). A vibração da ponta do dispositivo, associado à movimentação do mesmo, provoca um fenómeno hidrodinâmico

de fluxos acústicos e cavitação, do ponto de vista sinergético, melhorando a limpeza do canal radicular e a eficácia antibacteriana (Ramamoorthi, et al., 2015; Hoedke et al., 2021).

A ativação sónica oferece vantagens significativas, como a remoção eficaz da smear layer e debris gerados pela instrumentação, além de reduzir o risco de extrusão de irrigantes pelo ápex (Boutsioukis et al., 2013a). Este sistema também se destaca pela maior eficácia na irrigação de canais laterais (Borges et al., 2017; Hoedke et al., 2021).

As pontas flexíveis podem apresentar uma vantagem em comparação com as pontas metálicas rígidas comummente usadas na ativação passiva ultrassónica (PUI), pois conseguem alcançar com mais facilidade a porção apical crucial do canal, mesmo em canais radiculares com curvaturas acentuadas, e podem oscilar apesar do contato com as paredes do canal (Haupt et al., 2020). No entanto, são necessários mais estudos para avaliar a eficiência de limpeza do sistema de ativação sónica em configurações de canal mais desafiadoras, como canais com curvaturas severas. (Neuhaus et al., 2016; Urban et al., 2017; Haupt et al., 2020)

Urban e colaboradores (2017) demonstraram que, quer o método EDDY quer o PUI, resultaram em paredes do canal quase sem detritos e foram significativamente mais eficazes na remoção da camada de smear layer em comparação com a irrigação passiva manual (Urban et al., 2017).

5.5. Irrigação com ativação Laser

Os métodos de irrigação ativada por laser têm sido cada vez mais utilizados e aprimorados para melhorar a remoção de *smear layer* e de bactérias dos canais radiculares (Sahar-Helft et al., 2013; Jaramillo, 2015).

Os estudos experimentais concentram-se na desinfeção, na remoção de *smear layer* e na conformação do canal radicular, tal como os ultrassons e outras técnicas de ativação (Nusstein, 2015).

Atualmente, existem muitos tipos diferentes de lasers, com diferentes comprimentos de onda, e protocolos que são utilizados na Medicina Dentária para realizar procedimentos endodônticos. Todos funcionam principalmente pela radiação direta de

energia luminosa para as superfícies dentárias por meio de uma reação térmica (Jaramillo, 2015).

A terapia com laser de baixo nível é uma técnica não invasiva e simples, usada principalmente para diferentes procedimentos de medicina regenerativa (Jaramillo, 2015). Em endodontia, lasers de infravermelho médio, como *o Erbium Chromium Yttrium Scandium Gallium Garnet* (Er, Cr:YSGG) e *Erbium:Yttrium Aluminum Garnet* (Er:YAG) são frequentemente utilizados na desinfeção dos canais radiculares (Jurič et al., 2014; Aydin et al., 2020).

Estudos anteriores sobre os efeitos térmicos dos lasers indicaram que, durante o tratamento de canais radiculares, é importante utilizar parâmetros adequados do laser para evitar o principal problema de danos térmicos nas células do osso periodontal e alveolar (George & Walsh, 2010; Koch et al., 2016; Akcay et al., 2017). Nesse sentido, Machida e colaboradores afirmam que o limite de temperatura para a realização segura de tratamentos de canais radiculares com laser, sem causar danos aos tecidos periodontais, é 7°C acima da temperatura corporal (Machida et al., 1995).

Um estudo de George e colaboradores que avaliou dois tipos de sistemas laser (ER:YAG e ER,Cr:YSGG) e dois designs de ponta de fibra (ponta cónica de emissão lateral e de uma ponta de fibra ótica convencional) com o objetivo de observar as variações de temperatura no terço apical da superfície radicular durante a irrigação, concluíram que todas as combinações de sistemas laser e designs de fibra resultaram em aumentos de temperatura inferiores a 2,5°C durante a aplicação do laser (George & Walsh, 2010). Diversos fatores, incluindo o comprimento de onda, energia, tempo de exposição e espessura da dentina radicular, influenciam a condução da temperatura do canal radicular através da dentina até ao periodonto. O uso de agentes de arrefecimento, como ar e água, durante a aplicação do laser, também pode influenciar a quantidade de calor conduzida ao periodonto. A irrigação com água eliminou completamente os efeitos térmicos dos ciclos de laser.

A penetração do laser na dentina radicular é influenciada por vários fatores. No comprimento de onda do laser Er,Cr:YSGG (2780nm), ocorre absorção pela solução irrigante e pela dentina devido à presença de hidróxido e água intersticial (na matriz dentinária e intratubular). Cada pulso do laser é composto por aproximadamente 150 micropulsos, e cada micropulso é responsável por penetrar a energia cerca de 3 μm na água, dependendo da fluência (Gordon et al., 2007). Dessa forma, é possível alcançar a

expansão da água intratubular e o colapso do vapor de água a profundidades de 1.000 µm ou mais. Este efeito é capaz de gerar ondas acústicas fortes o suficiente para destruir células bacterianas. A penetração na dentina pode proporcionar ao laser vantagens em relação aos métodos convencionais de desinfeção, como a irrigação com NaOCl, especialmente em casos de complexidade bacteriana (Jurič et al., 2014; Meire et al., 2014; Aydin, et al., 2020).

Blanken e colaboradores relataram os efeitos do uso do laser Er,Cr:YSGG na irrigação endodôntica. Observaram um movimento imediato do fluido após cada pulso do laser e visualizaram os efeitos da cavitação (expansão e implosão das bolhas de gás) (Blaken et al., 2007).

Matsumoto e colaboradores demonstraram os efeitos da cavitação, observando que o fluido presente no canal (água, no caso do estudo) vaporizou instantaneamente (1 µs) próximo à ponta do laser (Matsumoto et al., 2011). Essa vaporização levou à expansão da água, formando uma bolha de gás à medida que a irradiação continuava a aquecer a água na superfície interna da bolha. Relataram ainda que essa expansão durou 700 µs. Quando o pulso do laser cessou, a bolha começou a encolher, mas a pressão do fluido circundante provocou um colapso violento, gerando ondas acústicas que se propagaram pelo fluido, um fenómeno conhecido como streaming acústico.

A irrigação assistida por laser requer o posicionamento da ponta da fibra entre 1 a 5 mm do CT, com movimentos circulares ao retirar a ponta a uma velocidade de 2mm/seg, sempre rodeada por soluções desinfetantes (Deleu et al., 2015; Verstraeten et al., 2017; Akcay et al., 2017; Mancini et al., 2018). Ao ser inserida no canal, a ponta deve ser centrada, evitando o contacto com as superfícies do canal (Deleu et al., 2015; Mancini et al., 2018).

O uso de pontas de disparo radial (RFT) tem sido utilizado na irradiação com o laser Er,Cr:YSGG, revelando resultados promissores quando comparado aos sistemas de desinfeção tradicionais (Martins et al., 2013). Assim, a irradiação laser homogénea ocorre ao utilizar as pontas de disparo radial, resultando na remoção eficaz da smear layer e na erradicação de bactérias no canal radicular (Martins et al., 2016).

Por outro lado, estudos confirmaram que não é necessário posicionar a ponta do laser no ápice, pois as bolhas de cavitação também promovem a limpeza na região apical (Ayranci et al., 2016).

A técnica PIPS™ (Photon-Induced Photoacoustic Streaming) é uma técnica de irrigação ativada por laser que atua de forma indireta, sem gerar efeitos térmicos, e ativa os irrigantes. O seu mecanismo de ação baseia-se na criação de uma forte onda de choque fotoacústica, que distribui os irrigantes tridimensionalmente por todo o sistema de canais radiculares. Os impulsos interagem com as moléculas de água, atingindo picos de potência de 400 W, o que provoca uma poderosa expansão e fluxo do fluido, sem aumentar a temperatura (Koch et al., 2016).

Ao contrário das aplicações convencionais de laser, a ponta cónica e despojada do PIPS™ não necessita de ser inserida no sistema de canais, devendo apenas ser posicionada na câmara pulpar (Verstraeten et al., 2017).

Uma tecnologia recente, denominada SWEEPS™ (Shock Wave-Enhanced Emission Photoacoustic Streaming), foi desenvolvida para aumentar a eficiência de desinfeção do método PIPS™. Esta técnica consiste em posicionar a ponta da fibra laser na cavidade de acesso preenchida com o líquido irrigante e, em seguida, emitir um laser pulsado (Lei et al., 2022). Embora o SWEEPS™ atue de forma semelhante ao PIPS™, apresenta um mecanismo físico distinto, pois envia pares de pulsos para o líquido (Koch et al., 2016; Olivi & Divito, 2012).

Quando respeitados os valores de potência do equipamento, o tempo utilizado e a correta distribuição da luz, o laser apresenta melhores resultados em comparação com as técnicas convencionais, técnicas sónicas, ultrassónicas, pressão positiva e pressão negativa (Blakimé et al., 2023). O laser apresenta como resultados após a sua utilização, paredes limpas e com túbulos dentinários expostos e ausência de danos às estruturas dentinárias (Ordinola-Zapata, 2014; Helft-Sahar, 2015).

II. Objetivos do Trabalho

Este trabalho experimental foi dividido em duas fases. A primeira fase consistiu num estudo piloto para otimização de protocolos de formação e quantificação do biofilme de *E. faecalis* em modelos 3D de dentes naturais. A segunda fase visou investigar e comparar a eficácia das técnicas de ativação, nomeadamente a ativação sónica e a laser, na irrigação endodôntica e na eliminação do biofilme de *E. faecalis* dos canais radiculares dos modelos 3D.

O objetivo principal deste estudo foi determinar se as técnicas de irrigação com ativação sónica e com ativação laser, são mais eficazes do que a irrigação passiva na desinfeção e limpeza dos canais radiculares, nomeadamente em zonas de difícil acesso aos instrumentos mecânicos, como por exemplo em zonas de istmos. Os resultados obtidos ajudarão a melhorar os procedimentos clínicos e, consequentemente, aumentar o sucesso dos tratamentos endodônticos.

III. Materiais e Métodos

1. Estudo piloto: formação e análise do biofilme de *E. faecalis* em modelos 3D de dentes naturais

Com este estudo piloto pretendeu-se implementar e otimizar protocolos para testar a formação de biofilme de *E. faecalis* em canais de modelos 3D em resina de molares inferiores naturais (3DsurpreenDente tooth, Vila Nova de Gaia, Porto, Portugal) e quantificar e avaliar o biofilme formado. Posteriormente, os protocolos otimizados foram usados para o estudo comparativo das diferentes técnicas irrigantes para eliminação do biofilme formado.

1.1. Metodologias preliminares para otimização de protocolos

1.1.1. Preparação dos modelos 3D de molares inferiores

Nesta primeira fase utilizaram-se no total 11 modelos 3D em resina de molares inferiores naturais, cada um com 2 raízes (2 canais mesiais e 1 canal distal). A raiz mesial apresenta uma curvatura moderada (< 20º), e um istmo entre ambos os canais na região apical (Vertucci tipo II). A raiz distal apresenta uma anatomia oval (Enrique Perez et al., 2024). A Figura 2 mostra um exemplar de um dos modelos 3D de molar inferior.

Figura 2: *Modelo 3D de molar inferior com 2 canais mesiais e 1 canal distal (3DsurpreenDente tooth, Vila Nova de Gaia, Porto, Portugal), vista a) vestibular, b) mesial e c) distal.*

Para padronização, as coroas de todos os molares foram cortadas até ao nível da junção amelocementária (JAC), tal como demonstra a Figura 3a. Os canais foram instrumentados com o sistema de limas BlueShaper (Zarc, Espanha) até Z4 a CT, definido como 1 mm a menos do comprimento total dos canais. Entre limas, os canais foram irrigados com NaOCl a 1% para remover a *smear layer*, e, por fim, lavados com água destilada, para

neutralizar o efeito do NaOCl (Figura 3). Para selar o ápex, aplicaram-se duas camadas de verniz na zona apical da superfície externa dos molares.

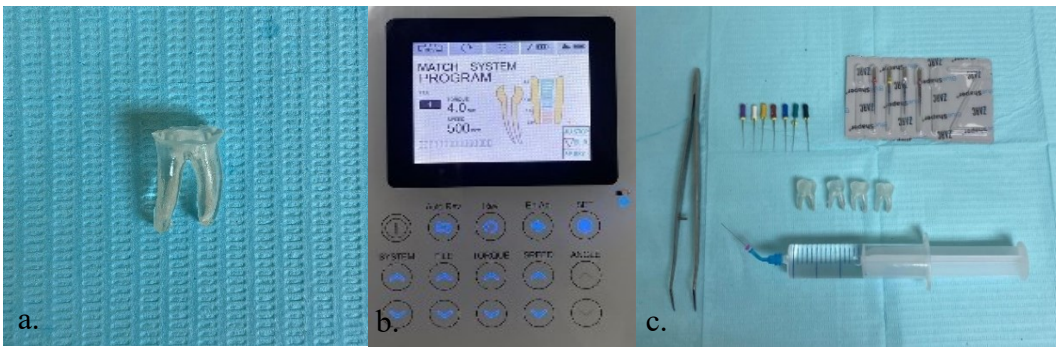


Figura 3: a) *Modelo 3D de molar inferior após corte da coroa ao nível da JAC,* ***b)*** *Programa utilizado para instrumentação com as limas BlueShaper (Zarc, Espanha) 4.0 torque e 500rpms,* ***c)*** *Material utilizado para a preparação mecânica dos canais.*

1.1.2. Otimização do protocolo de esterilização dos modelos 3D de molares inferiores

Para efeitos de esterilização dos modelos 3D de molares inferiores, três métodos foram testados.

1º Método: Esterilização por autoclavagem

Para testar este método de esterilização, quatro molares modelo foram autoclavados (120℃, 15 minutos) e, de seguida, para verificação da eficácia da esterilização, foram incubados em meio de cultura, *Brain Heart Infusion* (BHI, - Biokar Diagnostics, France), durante 24 horas, a 37℃. Embora não tenha sido observado crescimento de microrganismos por turvação do meio, foram detetadas pequenas fissuras ao longo da superfície externa do material. Pelo que não se optou por este protocolo, uma vez que o material dos modelos foi afetado pela autoclavagem.

2º Método: Esterilização em etanol 70%

Testou-se de seguida um outro método de esterilização, em que se usaram apenas dois dentes modelo. Colocou-se cada um dos dentes modelo em etanol 70% durante 24 horas, à temperatura ambiente. Contudo, verificou-se que este processo foi bastante agressivo para o material, pois os modelos ficaram frágeis e quebradiços (Figura 4) Consequentemente, este procedimento de esterilização teve também de ser descartado.

Figura 4: *Ilustração do 2º método: submersão das amostras em etanol 70%.*

3º Método: Preenchimento dos canais com etanol 70% durante 20 min, seguido de exposição a luz ultravioleta.

Para testar este último protocolo de esterilização, foram utilizados cinco molares modelo.

Os canais de cada dente modelo foram preenchidos com etanol 70% que ficou a atuar durante 20 minutos. De seguida, os molares foram transferidos para uma placa de Petri estéril, invertidos (abertura dos canais para baixo) e submetidos a luz ultravioleta (UV) durante 1 hora (Figura 5). Os dentes foram novamente invertidos (abertura dos canais para cima), colocados numa placa de poços, e assim expostos novamente à luz UV durante mais 1 hora.

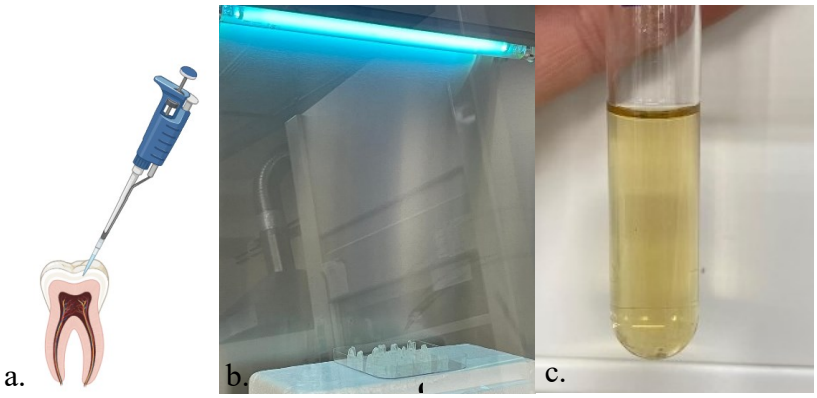


Figura 5: *Ilustração do 3º método* ***a)*** *preenchimento dos canais com etanol 70%;* ***b)*** *Molares invertidos submetidos a luz UV* ***c)*** *Meio BHI sem turvação.*

Posteriormente, os dentes foram incubados a 37ºC no meio de cultura, BHI, durante 24 horas. Em quatro dentes não foi observada qualquer turvação do meio, o que foi

indicativo de que estes dentes estavam corretamente esterilizados. Num dos dentes foi detetada contaminação, acreditando-se que tenha ocorrido devido a um erro durante a manipulação. Não se verificou alteração do material, pelo que se optou por seguir este protocolo de esterilização.

1.1.3. Preparação do inóculo de *E. faecalis* e formação do biofilme nos canais dos modelos 3D de molares inferiores

O inóculo *E. faecalis* ATCC 29212 foi preparado em meio de BHI a partir de colónias com menos de 24 horas, previamente cultivadas em meio de cultura, *Trypticase soy agar* (TSA, - HiMedia Laboratories, India), e padronizado com base na leitura da densidade ótica a 600 nm (OD_{600}) (Figura 6). O inóculo com OD_{600} ajustada a 0,1 foi usado para inocular os canais dos quatro dentes modelos, previamente esterilizados. Com uma micropipeta adicionou-se o inóculo até preencher todo o canal radicular, sem transbordar (aproximadamente 20 µL no canal distal e 10 µL em cada canal mesial).

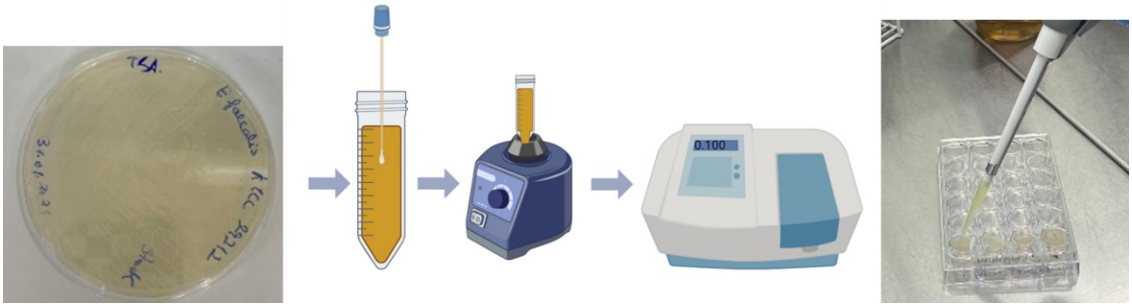


Figura 6: *Ilustração esquemática da preparação do inóculo de E. faecalis.*

As amostras foram incubadas a 37ºC em aerobiose e humidade 100% durante 3 semanas (21 dias). De 48 horas em 48 horas foi adicionado novo meio BHI, até preencher os canais radiculares sem transbordar.

1.1.4. Recolha do biofilme formado nos canais

Para recolha do biofilme formado nos canais seguiu-se o protocolo descrito por Maden et al. (2017) e a seguir detalhado.

Para recolha do biofilme de *E. faecalis,* em cada canal foi utilizado um cone de papel estéril ISO #25 colocado ao nível do CT e retirado ao fim de 60 segundos. Em cada canal

radicular foi novamente inserida uma lima Hedstroem estéril ISO #25 para fazer raspagem das paredes durante 30 segundos. Um segundo cone de papel com as mesmas medidas foi novamente inserido em cada canal durante 60 segundos. Os cones de papel e a lima de cada molar foram transferidos para o mesmo tubo respetivo contendo 1 mL de solução salina tamponada com fosfato (PBS) 1× e vortexou-se durante 60 segundos (Figura 7). Após este procedimento foram realizadas diluições seriadas decimais em PBS 1×, (diluições de 10^{-1} até 10^{-5}), e de seguida, 100 µL de cada diluição foram transferidos para meio de Mueller-Hinton agar, onde foi utilizada a técnica de plaqueamento por espalhamento. Após incubação durante 24 horas a 37ºC, as colónias de *E. faecalis* foram contadas e, de seguida, foram calculados os valores de unidades formadoras de colónias (UFC)/mL (Figura 8).

Figura 7: *Esquema ilustrativo da recolha de E. faecalis.*

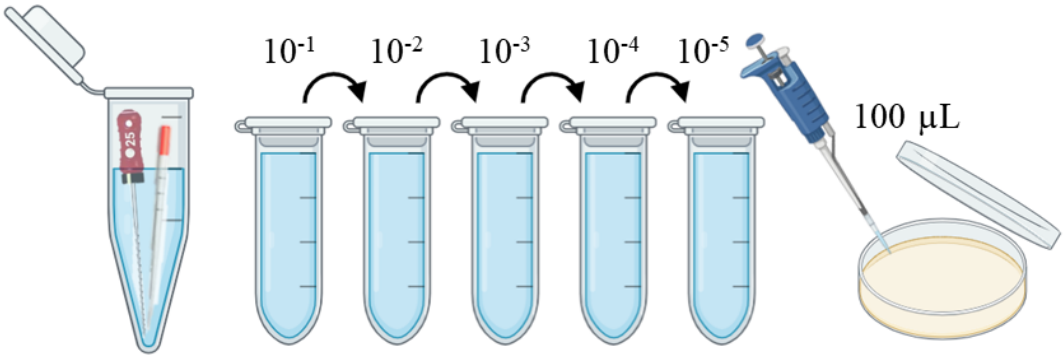


Figura 8*: Esquema ilustrativo de diluições seriadas para contagem de UFCs do biofilme de E. faecalis.*

1.1.5. Otimização do protocolo para observação de *E. faecalis* por microscopia de fluorescência após coloração Live/Dead

Devido à anatomia da zona do istmo dos canais mesiais que dificulta a remoção do biofilme nesta zona, pretendeu-se observar por microscopia de fluorescência a eventual presença de células de *E. faecalis* nessa zona após ter sido levada a cabo a recolha do biofilme acima descrita. Para isso, os quatro modelos de molares foram usados para testar dois métodos. Em ambos os métodos, cortaram-se os canais mesiais na zona do istmo com o auxílio de uma broca tronco-cónica 012 diamantada.

1º método:

Posteriormente, cada istmo foi transferido para um poço de placa de 96 poços contendo 200 µL de solução Live/Dead (LIVE/DEAD™ *Bac*Light™ Bacterial Viability Kit, Invitrogen™), e incubou-se durante 30 minutos no escuro. Lavou-se de seguida, transferindo-se para um poço com 200 µL de PBS 1×.

Retirou-se o istmo para lâmina com fita-cola de dupla face e colocou-se na posição direita, cobriu-se com lamela para se visualizar diretamente ao microscópio de fluorescência.

2º método:

Cada istmo foi transferido para um tubo de de microcentrífuga que continha 500 µL de PBS 1× (Figura 9), vortexou-se e colocou-se no banho de ultrassons durante 10 minutos para desagregar o biofilme eventualmente ainda remanescente na zona do istmo.

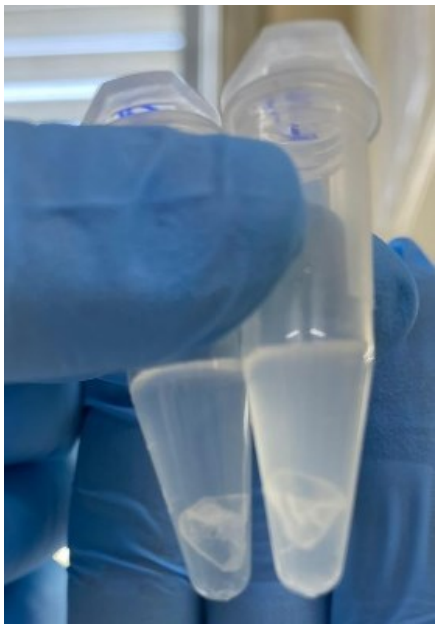


Figura 9 :*Istmo dentro de tubo de microcentrífuga.*

De seguida, centrifugou-se a 15000 ×*g* por 6 minutos, rejeitou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se em 100 µL de solução Live/Dead e deixou-se durante 30 minutos no escuro.

Centrifugou-se novamente nas mesmas condições e rejeitou-se o sobrenadante. Sem pertubar o *pellet*, rejeitou-se o istmo, e ressuspendeu-se depois o *pellet* em 15 µL de PBS 1×. De seguida, para uma lâmina, transferiram-se 10 µL dessa suspensão, cobriu-se com lamela e observou-se ao microscópio de fluorescência na objetiva de 100×.

2. Estudo *in vitro* comparativo das técnicas de ativação sónica e laser na irrigação endodôntica na erradicação de *E. faecalis*

2.1. Metodologias

O delineamento do estudo está ilustrado na Figura 10.

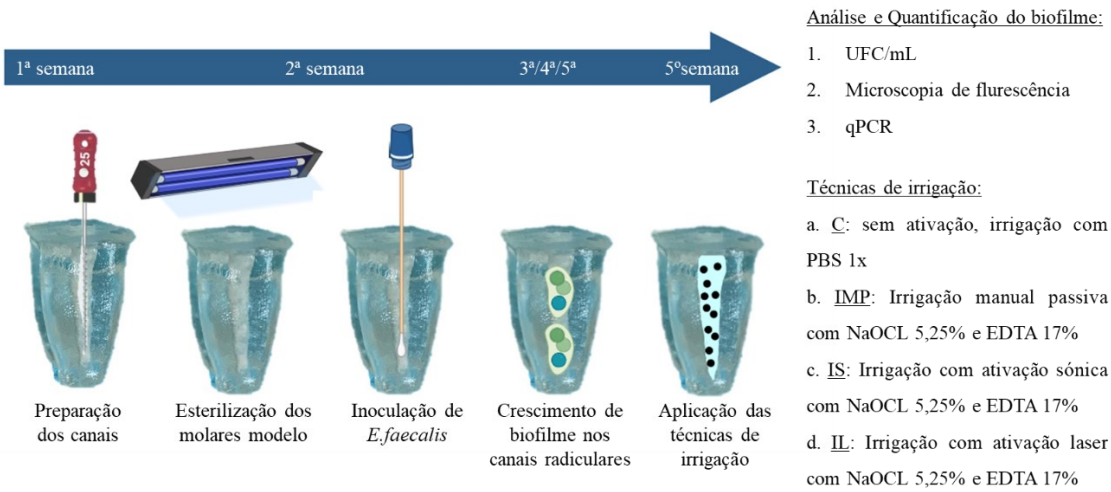


Figura 10: *Ilustração esquemática do delineamento do estudo experimental*

2.1.1. Preparação dos modelos 3D de molares inferiores

Um total de 40 modelos 3D de molares inferiores com 2 raízes e 3 canais (2 canais mesiais e 1 canal distal), foram utilizados neste estudo, em dois ensaios independentes (n=20 por ensaio). Foi atribuído um número a cada molar modelo (Tabela 1).

.

Tabela 1: *Designação e identificação dos molares modelo utilizados nos ensaios*

1º Ensaio					
Grupo Controlo	43	44	45	46	47
Grupo de irrigação manual passiva	48	49	50	51	52
Grupo de irrigação com ativação sónica	53	54	55	56	57
Grupo de irrigação com ativação laser	58	59	60	61	62
2º Ensaio					
Grupo Controlo	65	66	67	68	69
Grupo de irrigação manual passiva	70	71	72	73	74
Grupo de irrigação com ativação sónica	75	76	77	78	79
Grupo de irrigação com ativação laser	80	81	82	83	84

Quarenta modelos de molares foram preparados de acordo com o protocolo descrito no estudo piloto (secção III; 1.1.1.), e esterilizados conforme descrito na secção III; 1.1.2. 3º método.

2.1.2. Preparação do inóculo de *E. faecalis* e formação do biofilme nos canais dos modelos 3D de molares inferiores

A preparação do inóculo de *E. faecalis* ATCC 29212 e a inoculação dos canais para formação do biofilme durante 3 semanas foram feitas como anteriormente descrito (secção III; 1.1.3.).

2.1.3. Grupos experimentais

A amostra total de 40 molares modelo foi divida em dois ensaios experimentais independentes. Em cada experiência, os 20 molares modelo foram distribuídos aleatoriamente em quatro grupos experimentais (cada um com n=5):

1. Grupo Controlo: sem ativação, irrigação com solução tampão PBS 1×.

2. Grupo de irrigação manual passiva (IMP) (Figura 11): Irrigação durante 1 minuto com NaOCl 5,25%, seguida de 1 minuto com EDTA 17% e 1 minuto com NaOCl 5,25% sem ativação, com recurso a seringa e agulha com saída lateral. Lavagem final com PBS 1× (Machtou, 2015).

3. Grupo de irrigação com ativação sónica (IS) (Figura 12): Irrigação com NaOCl 5,25% seguido de um ciclo de 20 segundos de ativação sónica com pontas EDDY em frequência de 5000 até 6000 Hz, 30 segundos de irrigação com EDTA 17%, irrigação com NaOCl seguido de um 2º e 3º ciclo de 20 segundos de ativação sónica. Lavagem final com PBS 1× (Nusstein et al., 2015; Neuhaus et al., 2016; Haupt et al., 2020).

4. Grupo de irrigação com ativação laser (IL) (Figura 13): Protocolo de irrigação, de acordo com as normas do fabricante (Biolase, Portugal), ou seja, irrigação com NaOCl 5,25% seguido de 2 ciclos intercalados de ativação laser 2mm/seg, irrigação com EDTA 17% sem ativação, irrigação com NaOCl seguido de 2 ciclos intercalados de ativação laser, retirando a ponta com movimentos circulares e a uma velocidade de 2mm/seg. Laser Er CR: YSGG modelo waterlase iplus (BIOLASE, Portugal), com comprimento de onda 2780nm, e configurações a 1,25W, 25mJ, com pulsos de 50Hz, sem água ou ar. As pontas utilizadas foram as de emissão radial RFT2 (BIOLASE; Portugal).

Durante a irrigação, as pontas de todos os dispositivos de ativação, bem como a agulha de irrigação, foram inseridas o mais profundamente possível no terço apical, sem prender, mas não ultrapassando 1 mm do CT.

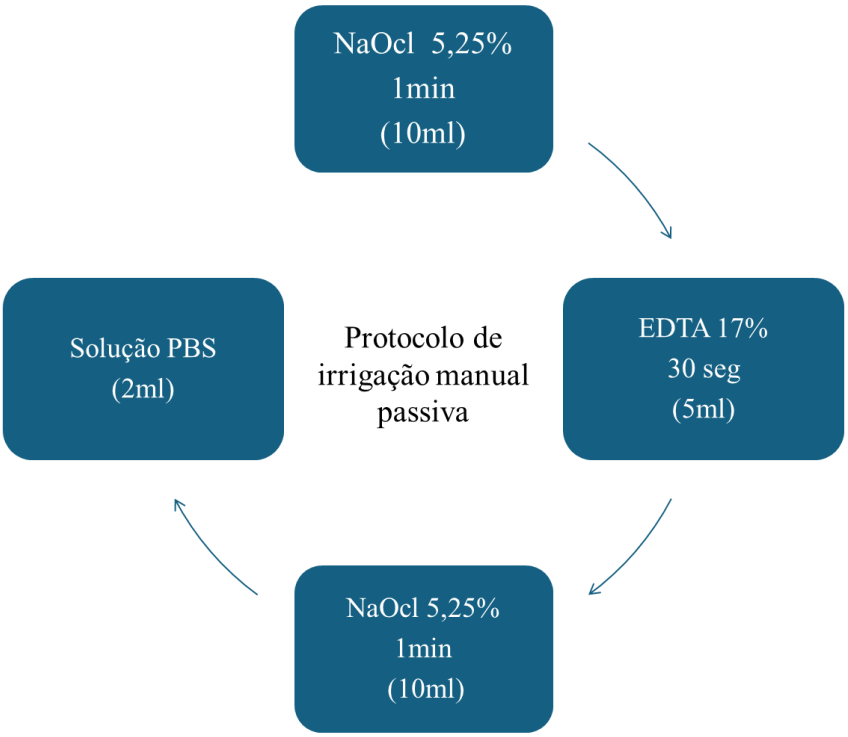


Figura 11: *Esquema ilustrativo do protocolo de irrigação manual passiva seguido no ensaio*

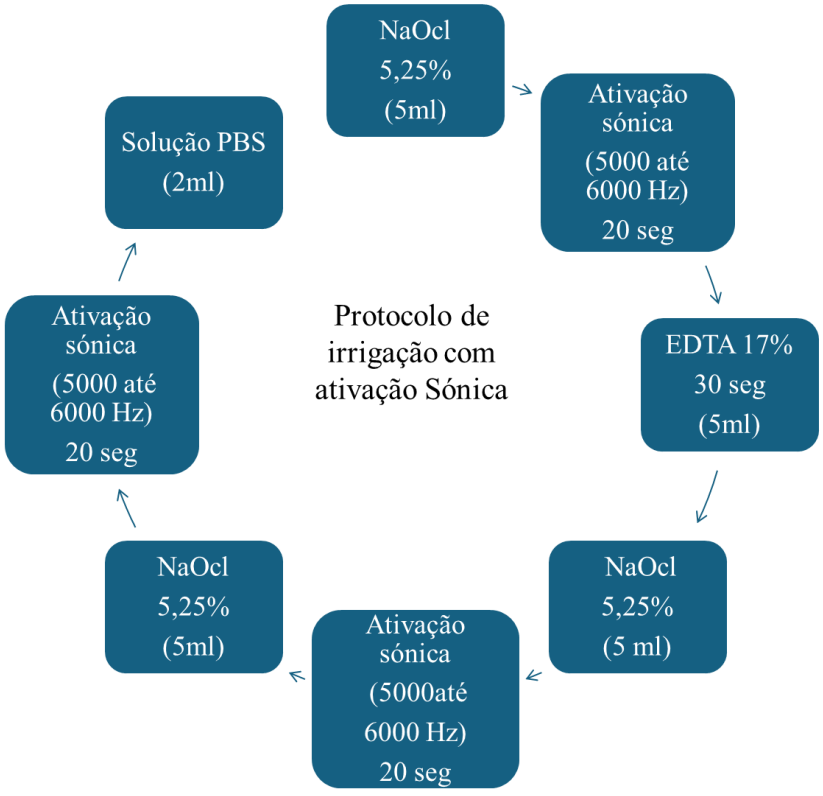


Figura 12: *Esquema ilustrativo do protocolo de irrigação com ativação sónica seguido no ensaio*

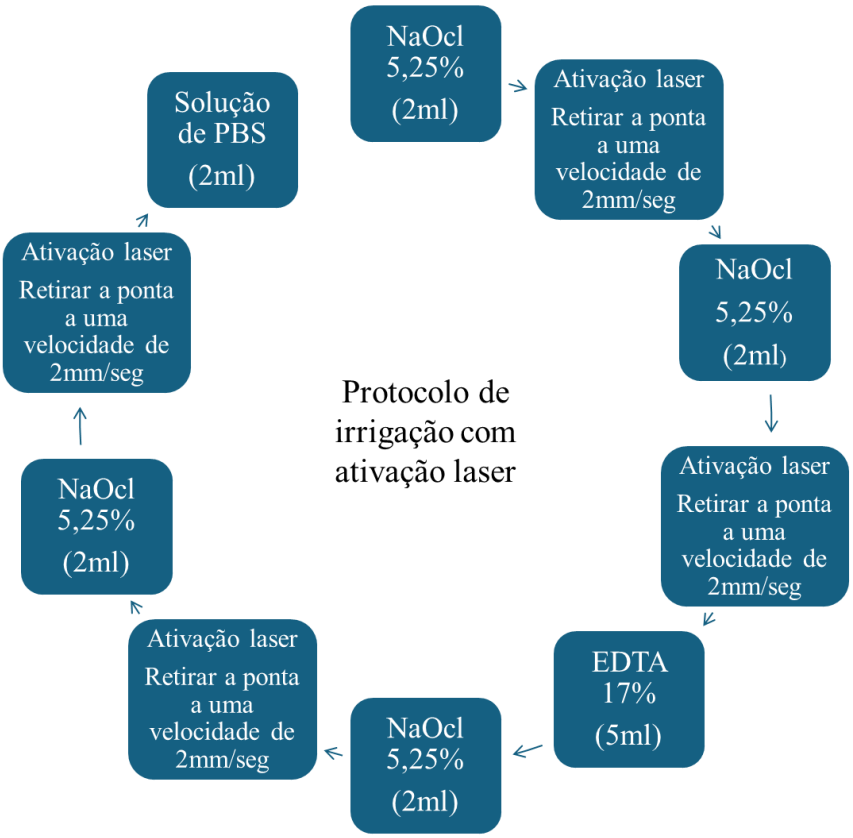


Figura 13: *Esquema ilustrativo do protocolo de irrigação com ativação laser seguido no ensaio.*

2.1.4. Recolha e análise do biofilme de *E. faecalis* formado

Após a aplicação das diferentes técnicas irrigantes em cada grupo experimental, o biofilme de *E. faecalis* foi recolhido dos canais de acordo com o protocolo seguido no estudo piloto (secção III; 1.1.4.). e descrito por Maden et al. (2017).

Depois do plaqueamento para contagem de UFCs, a amostra restante (contendo os cones de papel e aproximadamente 900 µL) foi centrifugada a 15000 ×*g* durante 6 minutos e ressuspendida em 750 µL de tampão Tris-EDTA com 20% de glicerol, sendo depois armazenada a -80ºC para posterior extração de DNA e análise por PCR em tempo real, conforme descrito mais à frente.

2.1.5. Microscopia de fluorescência após coloração Live/Dead

Para a análise do biofilme formado especificamente na zona do istmo dos canais mesiais, foram selecionados aleatoriamente dois molares modelo de cada grupo experimental. A zona do istmo foi então seccionada utilizando uma broca tronco-cónica

012 diamantada. As amostras foram preparadas de acordo com o método 2 definido no estudo piloto para análise por microscopia de fluorescência após coloração Live/Dead.

2.1.6. Extração de DNA de amostras dos quatro grupos experimentais

O DNA do biofilme de *E. faecalis* foi extraído de quatro amostras de cada grupo (duas amostras da 1ª experiência e duas da 2ª), utilizando um kit comercial, NZYMicrobial gDNA Isolation Kit (NZYtech, Portugal). Foi seguido o protocolo de extração indicado pelo fabricante, embora com algumas modificações.

As amostras conservadas a -80ºC em 750 µL de Tris-EDTA (TE) com glicerol foram descongeladas e centrifugadas a 15000 ×*g* por 6 minutos, descartando-se o sobrenadante. O *pellet* foi então ressuspendido em 100 µL de TE + lisozima (20 mg/mL) e incubado a 37ºC por 30 minutos.

A suspensão resultante foi transferida para um tubo NZYSpin Microbial Bead, ao qual se adicionaram 40 µL de Buffer NML e 10 µL de Proteinase K (líquido). A mistura foi vortexada e incubada a 56ºC por 30 minutos. Após esse período, a amostra foi colocada num vortex horizontal durante 15 minutos e, em seguida, centrifugada por 30 segundos a 11000 ×*g*.

Adicionaram-se 600 µL de Buffer NML à suspensão, vortexou-se por 3 segundos e centrifugou-se por 30 segundos a 11000 ×*g*. O sobrenadante foi transferido para uma coluna NZYSpin Microbial e centrifugado novamente a 11000 ×*g*, descartando-se o tubo de recolha com o filtrado. A coluna foi colocada num novo tubo de recolha.

Adicionaram-se 500 µL de Buffer NMW1 à coluna e centrifugou-se por 30 segundos a 11000 ×*g*. Após descartar o filtrado, a coluna foi novamente colocada no tubo de recolha, onde foram adicionados 500 µL de Buffer NMW2 (com etanol previamente adicionado). A centrifugação foi repetida por 30 segundos a 11.000 ×*g*, descartando-se o filtrado.

Por fim, a coluna NZYSpin Tissue foi centrifugada por 2 minutos a 11 000 ×*g*, transferida para um novo tubo de microcentrífuga, e 50 µL de Buffer NME (previamente aquecido a 70ºC) foram adicionados diretamente à membrana da coluna. A mistura foi incubada por 5 minutos à temperatura ambiente e centrifugada por 2 minutos a > 11000 ×*g* para eluir o DNA.

O DNA genómico obtido foi armazenado a -20ºC.

2.1.7. PCR (qPCR) em tempo real para quantificação de *E. faecalis*

A identificação e quantificação de *E. faecalis* nas amostras de DNA extraído foi feita por qPCR, usando os primers e as condições descritas por Takahashi e colaboradores, e que são de seguida apresentadas (Takahashi et al., 2011).

A reação de PCR (volume total de 20 μL) continha 5 μL do DNA genómico microbiano, 1×NZYSpeedy qPCR Green Master Mix (NZYtech, Portugal), e 0,5 μL de cada primer (forward: 5'-CCAATCAAATGGCGGCTTCTACG-3'; reverse: 5'-GCGATCAGGGAAATGATCGATTCC-3').

A amplificação foi realizada utilizando o (Rotor-Gene Q, Qiagen) a 95°C durante 10 minutos, seguida de 45 ciclos a 95°C durante 10 segundos, 53°C durante 10 segundos, e 72°C durante 12 segundos. Para confirmar a formação de um único produto, foi realizada uma análise da curva de fusão a 95°C e a 55ºC durante 1 minuto cada, com um aumento subsequente da temperatura de 55ºC até 95°C a 0,5°C por cada 10 segundos.

2.2. Análise estatística

Os resultados das contagens de UFCs/mL, expressos em $\log_{10}$ UFC/mL, foram analisados estatisticamente com recurso ao software IBM SPSS statistics versão29. Foram utilizadas metodologias estatísticas de analise descritiva e inferencial (comparativa). Neste último caso foi estabelecido um nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

IV. Resultados

1. Resultados do estudo Piloto

Na Tabela 2 estão apresentados os resultados obtidos, em valores de UFC/mL, do biofilme de *E. faecalis* recolhido dos canais de cada um dos quatro dentes modelo testados.

Tabela 2: *Valores de UFC/mL (e log_{10} UFC/mL) obtidos do biofilme de E. faecalis recolhido dos canais de cada um dos quatro modelos 3D de molares inferiores.*

Modelo de dente molar	1	2	3	4	Média	Desvio Padrão
UFC/mL	$1{,}00 \times 10^6$	$1{,}61 \times 10^6$	$6{,}30 \times 10^5$	$2{,}00 \times 10^6$	$1{,}31 \times 10^6$	$6{,}12 \times 10^5$
Log_{10} UFC/mL	6,00	6,21	5,80	6,30	**6,08**	**0,22**

Para os quatro dentes, a média ± desvio padrão de log_{10} UFC/mL obtida foi de 6.08 ± 0.22, o que demostra que houve formação de biofilme nos canais dos quatro dentes modelo testados. E além disso, o baixo valor de desvio padrão, mostra houve similaridade na formação e quantificação do biofilme nos quatro molares modelo testados.

Contudo, nem todo o biofilme foi completamente recolhido, uma vez que, após visualização microscópica (usando o 2º médodo descrito na seção 1.5.) se verificou a presença de bactérias na zona do istmo, com aproximadamente 50% de viabilidade (Figura 14).

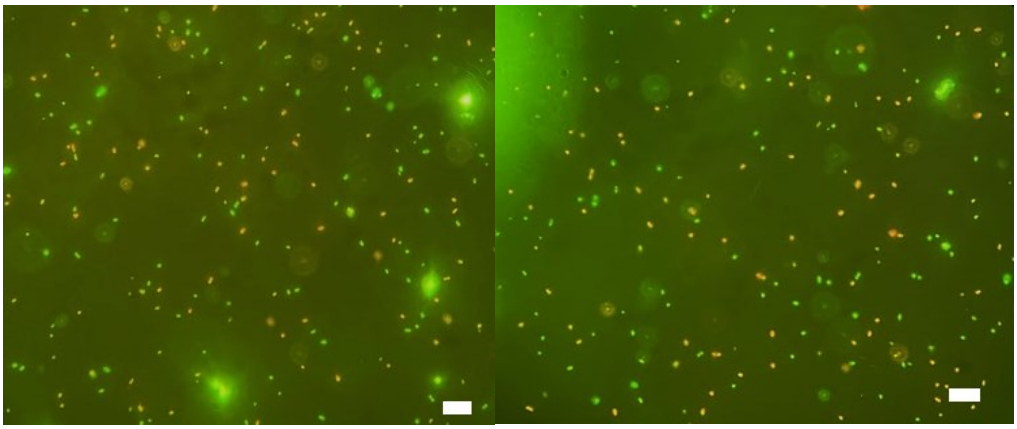


Figura 14: *Imagens representativas de microscopia de fluorescência, após coloração Live/Dead, da zona do istmo. É possível observar a presença de cocos, E. faecalis, corados de verde (vivos) e de vermelho (mortos). Ampliação 1000×. Barra de escala 10µm.*

2. Resultados do Estudo in vitro comparativo das técnicas de ativação sónica e laser na irrigação endodôntica na erradicação de *E. faecalis*

2.1. Contagens de unidade formadoras de colónias (UFCs/mL)

A Tabela 3 apresenta os resultados da contagem de UFCs/mL e os seus valores logarítmicos (Log_{10} UFC/mL) para diferentes grupos experimentais em molares modelo do primeiro ensaio.

Tabela 3: *Contagens de UFCs/mL de E. faecalis de cada molar, dos 4 grupos experimentais do 1º Ensaio.*

Grupo controlo	Molares modelo	UFCs/mL	Log10 UFC/mL	Grupo de irrigação com ativação sónica	Molares modelo	UFCs/mL	Log10 UFC/mL
	43	$8{,}80\times10^{5}$	5,94		53	$1{,}30\times10^{3}$	3,11
	44	$2{,}51\times10^{7}$	7,40		54	$1{,}90\times10^{3}$	3,28
	45	$2{,}64\times10^{6}$	6,42		55	$3{,}81\times10^{3}$	3,58
	46	$1{,}09\times10^{6}$	6,04		56	$1{,}60\times10^{2}$	2,20
	47	$1{,}99\times10^{6}$	6,30		57	$3{,}04\times10^{4}$	4,48
Grupo de irrigação manual passiva	48	$3{,}40\times10^{4}$	4,53	Grupo de irrigação com ativação laser	58	< 100	< 2
	49	$4{,}70\times10^{5}$	5,67		59	< 100	< 2
	50	$2{,}24\times10^{4}$	4,35		60	< 100	< 2
	51	$3{,}22\times10^{5}$	5,51		61	< 100	< 2
	52	$1{,}57\times10^{5}$	5,20		62	< 100	< 2

No grupo Controlo (43 a 47), observou-se uma elevada contagem de Log_{10} UFCs/mL variando entre 7,40 e 5,94. Este grupo reflete a presença significativa de bactérias, uma vez que não houve qualquer intervenção das técnicas de irrigação.

No grupo IMP (48 a 52), observam-se valores relativamente mais baixos de Log_{10} UFCs/mL em comparação com o grupo Controlo. Os valores variam entre 4,53 e 5,67.

No grupo IS (53 a 57) observa-se uma redução mais drástica nos valores de Log_{10} UFCs/mL, a variar entre 2,20 e 4,48.

O grupo IL (58 a 62) apresenta uma contagem extremamente baixa de UFCs/mL, com valores de Log_{10} UFCs/mL menores que 2 em todos os casos.

A Tabela 4 apresenta os resultados da contagem de UFCs/mL e os seus valores logarítmicos (Log_{10} UFC/mL) para diferentes grupos experimentais em molares modelo do 2º ensaio.

Tabela 4: *Contagens de UFCs/mL de E. faecalis de cada molar, dos 4 grupos experimentais do 2º Ensaio.*

Grupo controlo	Molares modelo	UFCs/mL	Log10 UFC/mL	Grupo de irrigação com ativação sónica	Molares modelo	UFCs/mL	Log10 UFC/mL
	65	$1{,}03\times10^{6}$	6,01		75	< 10	< 1
	66	$2{,}99\times10^{6}$	6,48		76	< 10	< 1
	67	$1{,}81\times10^{6}$	6,26		77	< 10	< 1
	68	$2{,}19\times10^{6}$	6,34		78	< 10	< 1
	69	$5{,}10\times10^{6}$	6,71		79	< 10	< 1
Grupo de irrigação manual passiva	70	$2{,}00\times10^{2}$	2,30	Grupo de irrigação com ativação laser	80	< 10	< 1
	71	< 100	< 2		81	< 10	< 1
	72	$3{,}00\times10^{2}$	2,48		82	< 10	< 1
	73	$2{,}20\times10^{3}$	3,34		83	< 10	< 1
	74	$1{,}10\times10^{3}$	3,04		84	< 10	< 1

No grupo Controlo (65 a 69), observou-se uma elevada contagem de Log_{10} UFCs/mL variando entre 6,01 e 6,71, confirmando uma alta carga bacteriana sem qualquer intervenção de irrigação adicional.

No grupo IMP (70 a 74), verificou-se uma redução significativa da contagem de UFCs/mL em comparação com o grupo controlo. Os valores de Log_{10} UFCs/mL variam de < 2 até 3,34.

O grupo IS (75 a 79) e o grupo IL (80 a 84) apresentaram uma redução nas contagens muito marcada em relação ao controlo, com valores de Log_{10} UFCs/mL consistentemente < 1 em todos os casos.

As Tabelas 5, 6, 7, 8 e 9, e as Figuras 15 e 16 apresentam os resultados de uma análise estatística dos valores médios de contagens de *E. faecalis* (expressos em Log_{10} UFC/mL) nos três grupos experimentais: grupo Controlo, IMP e IS. A análise inclui a média (M), o desvio padrão (DP), o intervalo de confiança de 95% (IC 95%) e os valores de significância estatística ($p < 0,05$).

Tabela 5: *Análise estatística dos valores médios de contagens de E. faecalis (Log_{10} UFC/mL) em diferentes grupos experimentais no 1º ensaio. A tabela apresenta as médias (M) e desvios padrão (DP) das contagens bacterianas, os intervalos de confiança de 95% (IC 95%) e os valores de significância estatística (p).*

1º Ensaio	M (DP)	IC 95%	p*
Grupo Controlo	6,4 (0,6)	5,7-7,1	< 0,001
Grupo IMP	5,1 (0,6)	4,3-5,8	
Grupo IS	3,3 (0,8)	2,3-4,4	

*ANOVA ($p < 0,05$)

O teste ANOVA foi utilizado para comparar os grupos experimentais do 1º ensaio (Controlo; IMP, IS). Os resultados indicaram uma diferença estatisticamente significativa entre os grupos, com um valor de $p < 0,001$.

A Tabela 6 apresenta os resultados da análise estatística, ainda relativos ao 1º ensaio, onde foi utilizado o teste T-student para comparar os grupos experimentais (Controlo, IMP e IS) com o grupo IL. Como as contagens para o grupo IL eram qualitativas (Log_{10} UFCs/mL <1), por isso na análise utilizou-se o valor máximo de 1 como referência para permitir a comparação. Os resultados mostram que o Grupo IL apresentou diferenças estatisticamente significativas em relação aos grupos Controlo, IMP e IS.

Tabela 6: *Análise comparativa dos valores médios de contagens de E. faecalis (Log$_{10}$ UFC/mL) dos diferentes grupos experimentais em relação ao grupo IL, no 1º ensaio. A tabela apresenta as médias (M) e desvios padrão (DP) das contagens bacterianas, os intervalos de confiança de 95% (IC 95%) e os valores de significância estatística (p). O valor logarítmico de referência médjo de contagens de E. faecalis do grupo IL foi considerado como sendo 1.*

1º Ensaio	M (DP)	p*
Grupo Controlo	6,4 (0,6)	< 0,001
Grupo IMP	5,1 (0,6)	< 0,001
Grupo IS	3,3 (0,8)	0,003

*T-student 1 amostra ($p < 0,05$)

Na Figura 15 é apresentada a análise em gráfico *boxplot,* que compara os valores de contagens de *E. faecalis* (Log$_{10}$ UFC) nos três grupos experimentais: Controlo, IMP e IS.

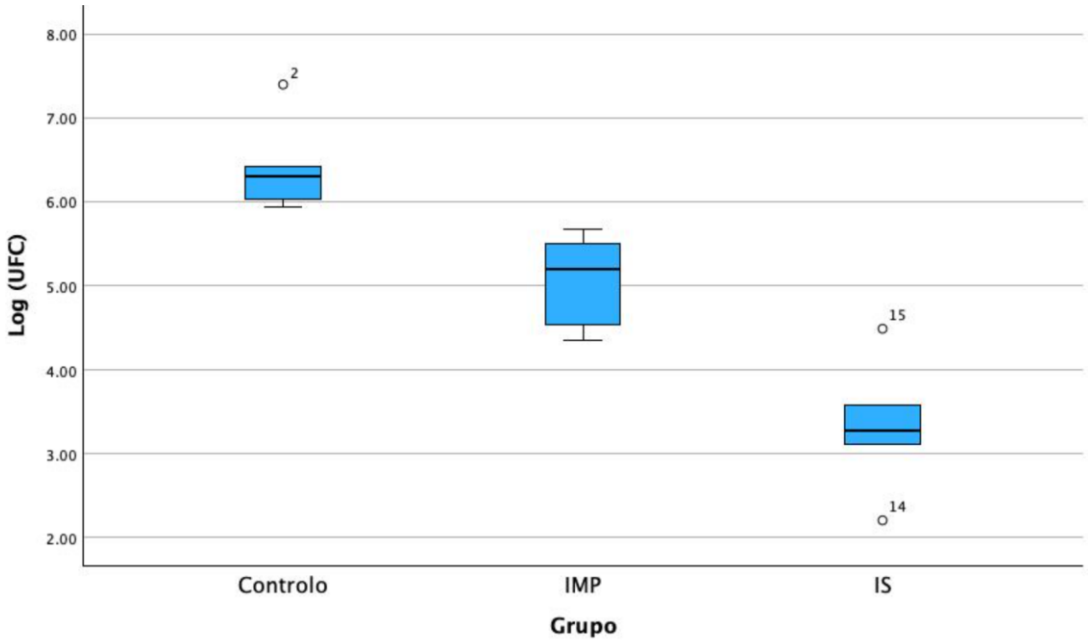


Figura 15*: Análise gráfica boxplot: comparação dos valores de contagens de E. faecalis (Log$_{10}$ UFC) dos três grupos experimentais: Controlo, IMP e IS.*

O grupo IS apresentou a menor mediana e menor variabilidade, enquanto o grupo IMP teve uma redução significativa em comparação com o Controlo, mas com maior variabilidade.

A Tabela 7 apresenta os resultados do 2º ensaio, onde o teste T-student foi usado para comparar os valores médios de contagens de *E. faecalis* entre o grupo Controlo e o grupo IMP. A análise revelou uma diferença estatisticamente significativa entre os grupos, com um valor de ($p < 0,001$).

Tabela 7: *Análise estatística dos valores médios de contagens de E. faecalis (Log_{10} UFC/mL) em diferentes grupos experimentais no 2º ensaio. A tabela apresenta as médias (M) e desvios padrão (DP) das contagens bacterianas, os intervalos de confiança de 95% (IC 95%) e os valores de significância estatística (p).*

2º Ensaio	M (DP)	IC 95%	p*
Grupo Controlo	6,4 (0,3)	6,0-6.8	< 0,001
Grupo IMP	2,4 (0,9)	1,3-3,6	

*T-student ($p < 0,05$)

Para comparar os grupos Controlo e IMP com os grupos IS e IL no 2º ensaio (Tabela 4), foi novamente utilizado o teste T-student. E igualmente, como os valores médios de Log_{10} UFC/mL para os grupos IS e IL eram qualitativos (<1), o valor máximo de 1 foi utilizado como referência. Os resultados mostraram que tanto o grupo Controlo quanto o grupo IMP apresentaram diferenças significativas relativamente aos grupos IS e IL (Tabela 8).

Tabela 8: *Análise comparativa dos valores médios de contagens de E. faecalis (Log$_{10}$ UFC/mL) dos grupos controlo e IMPmem relação ao grupo IL e IS, no 2º ensaio. A tabela apresenta as médias (M) e desvios padrão (DP) das contagens bacterianas, os intervalos de confiança de 95% (IC 95%) e os valores de significância estatística (p). O valor de referência médjo de contagens de E. faecalis do grupo IL foi considerado como sendo 1.*

2º Ensaio	M (DP)	p*
Grupo Controlo	6,4 (0,3)	< 0,001
Grupo IMP	2,4 (0,9)	< 0,024

*T-student 1 amostra ($p < 0,05$)

A Figura 16 apresenta a análise em gráfico *boxplot,* que compara os valores de contagens de *E. faecalis* (Log$_{10}$ UFC) entre dois grupos experimentais: grupo Controlo e grupo IMP. O grupo IMP apresenta uma redução significativa e maior dispersão nas contagens de *E. faecalis* em comparação com o grupo Controlo.

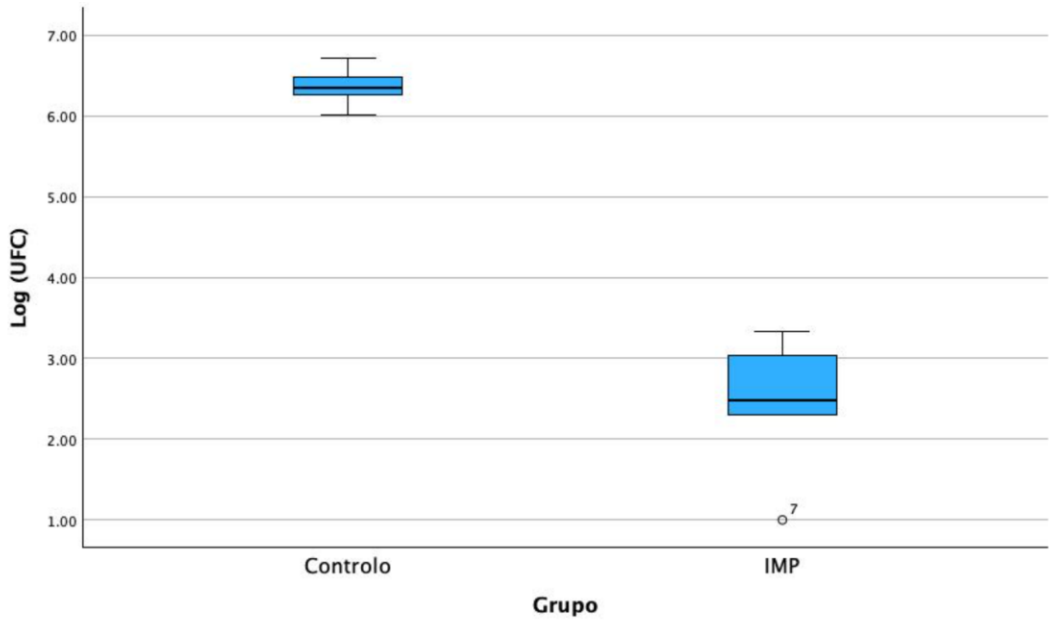


Figura 16: *Análise gráfica boxplot: comparação dos valores de contagens de E. faecalis (Log$_{10}$ UFC) entre dois grupos experimentais: Controlo, IMP.*

Por fim, foi realizado um teste T-student para comparar os resultados entre o 1º e o 2º ensaio para os grupos Controlo e IMP (Tabela 9).

Tabela 9: *Comparação dos valores médios de de contagens de E. faecalis (M) e desvio padrão (DP) em Log_{10} UFC/mL nos Grupos Controlo e IMP entre o 1º e o 2º ensaio.*

1º Ensaio	M (DP)	2º Ensaio	M (DP)	p*
Grupo Controlo	6,4 (0,6)	Grupo Controlo	6,4 (0,3)	0,809
Grupo IMP	5,1 (0,6)	Grupo IMP	2,4 (0,9)	0,007

*T-student ($p < 0,05$)

No grupo Controlo, a média de contagens de *E. faecalis* permaneceu praticamente a mesma entre os dois ensaios (6,4), não havendo, portanto, diferença estatisticamente significativa entre os resultados do 1º e 2º ensaios para este grupo ($p = 0,809$). O desvio padrão no 2º ensaio (0,3) foi menor do que no 1º ensaio (0,6), indicando uma menor dispersão dos resultados em torno da média no caso do 2º ensaio. Para o grupo IMP, houve uma redução significativa ($p < 0.05$) na média de contagens de *E. faecalis* entre o 1º ensaio (5,1) e o 2º ensaio (2,4).

2.2. Quantificação de *E. faecalis* após análise de qPCR (reação em cadeia da polimerase em tempo real)

Os resultados de qPCR são expressos em valores de "*cycle-threshold*" (Ct). Ct é o número de ciclos necessários para que a fluorescência de um amplicão ultrapasse um determinado nível de deteção (*threshold*). Esse *threshold* é definido acima do nível de *background* (ruído de fundo), ou seja, o Ct reflete o ponto em que o sinal da fluorescência se torna detetável e indica que houve amplificação suficiente do DNA alvo (Bonacorsi et al., 2021). Na Tabela 10 estão apresentados os valores Ct obtidos para duas amostras de cada um dos quatro grupos (Controlo, IMP, IS e IL). Os valores de Ct indicam a quantidade relativa de material genético de *E. faecalis* nas amostras. O valor de Ct é inversamente proporcional à quantidade de material genético bacteriano, ou seja, quanto menor o valor de Ct, maior a quantidade de DNA bacteriano presente na amostra. É de

notar que por este método, sendo o alvo o DNA, esse DNA pode ser proveniente quer de bactérias vivas ou mortas presentes na amostra.

Tabela 10: *Valores de Ct obtidos através da análise qPCR em tempo real para duas amostras de cada um dos 4 grupos experimentais do 1º e 2 ensaios. Todas as amostras foram analisadas simultaneamente, havendo por isso um único valor de controlo negativo.*

	Amostra (1º Ensaio)	Ct	Amostras (2º ensaio)	Ct
Grupo Controlo	45	15,70	66	16,57
	47	16,90	68	16,26
Grupo IMP	48	18,77	70	16,01
	50	17,10	72	18,42
Grupo IS	54	19,65	75	24,28
	55	19,78	76	23,21
Grupo IL	58	26,00	80	28,69
	59	29,78	81	33,36
Negativo		26,09		

As Figuras 17 e 18 ilustram o ciclo no qual as curvas de amplificação cruzam o limiar (*threshold*) para cada amostra analisada do primeiro e do segundo ensaio, respetivamente. Esses ciclos correspondem aos Ct apresentados na Tabela 10. As curvas mais à esquerda (Ct mais baixos) correspondem às amostras com maior quantidade de DNA *de E. faecalis*, enquanto as curvas mais à direita, cruzando o limiar em ciclos mais altos, indicando amostras com menor quantidade de DNA de *E. faecalis*.

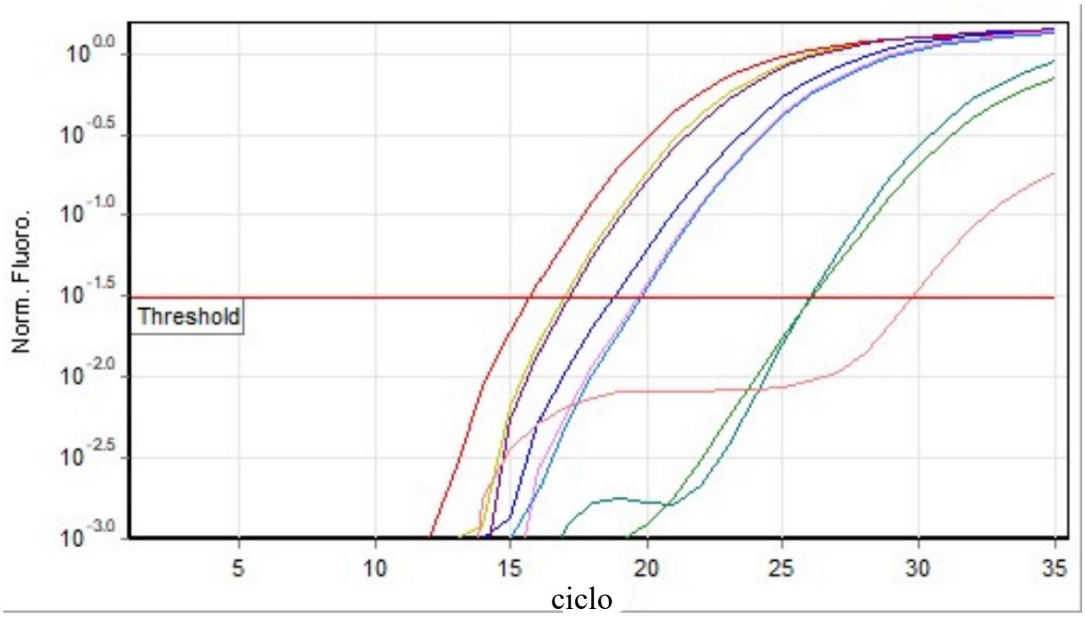


Figura 17: *Gráfico das curvas de amplificação da análise de qPCR das amostras do 1º ensaio. As cores representam cada amostra representada na Tabela 7.*

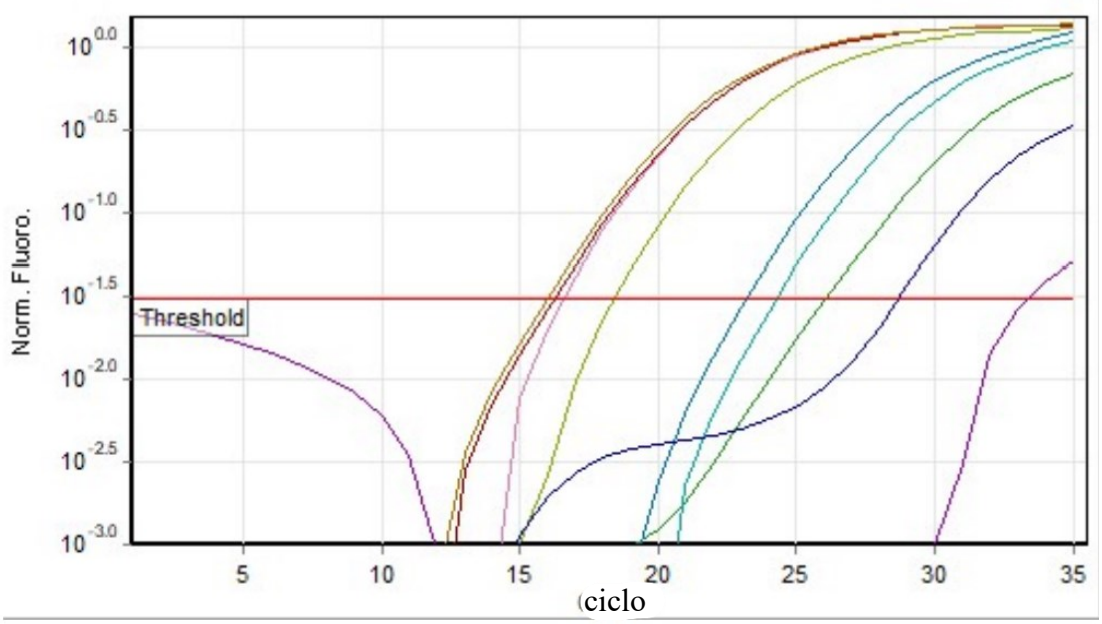


Figura 18: *Gráfico das curvas de amplificação da análise de qPCR das amostras do 2º ensaio. As cores representam cada amostra representada na Tabela 7.*

O controlo negativo é usado na reação de qPCR para garantir que não há contaminação no processo de preparação ou na própria reação de qPCR. Apesar de ter sido detetado um valor de Ct de 26,09 para o controlo negativo, na análise da curva de *melting* (Figura 19)

não se verifica um pico evidente para este, servindo assim este como valor de referência acima do qual há ausência de DNA alvo.

A Figura 19 mostra o gráfico da análise de curvas de *melting*. O pico demonstra a especificidade dos primers, e valida o protocolo.

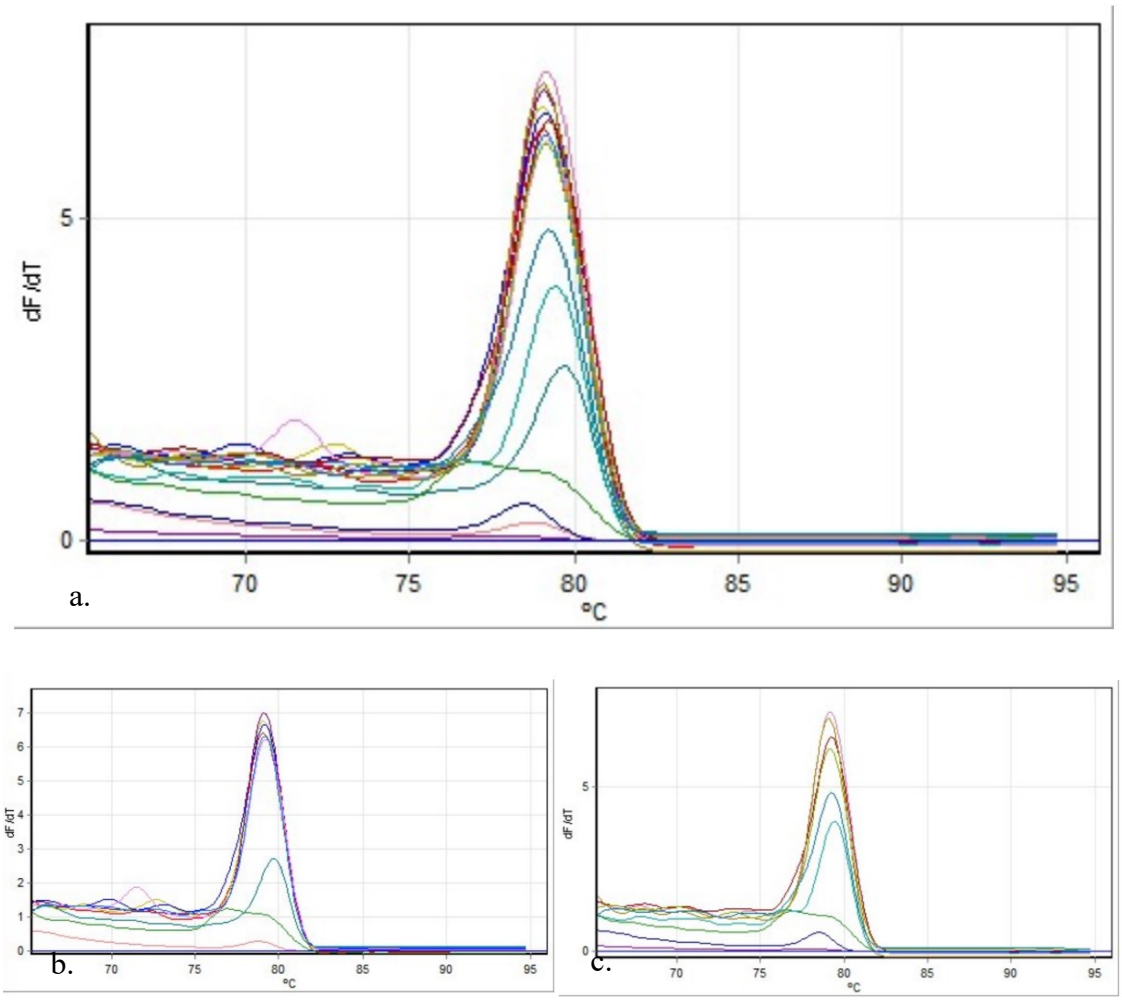


Figura 19: *Curvas que mostram a análise de melting das diferentes amostras dos grupos experimentais. a) 1º e 2º ensaio; b)1º ensaio; c) 2º ensaio.*

2.3. Visualização do biofilme na zona do istmo por microscopia de fluorescência

As imagens de microscopia de fluorescência permitem uma avaliação qualitativa acerca da presença/ausência e da viabilidade de *E. faecalis* nos diferentes grupos analisados: controlo, IMP, IS e IL. A coloração Live/Dead distingue de forma clara as células vivas das mortas, fornecendo uma visualização direta dos efeitos dos tratamentos aplicados. A análise foi focada exclusivamente na região do istmo dos canais mesiais,

uma área particularmente desafiadora em termos de limpeza e de penetração eficaz das soluções irrigantes devido à sua complexidade anatómica.

Os resultados obtidos por microscopia de fluorescência para cada grupo estão ilustrados na Figura 20.

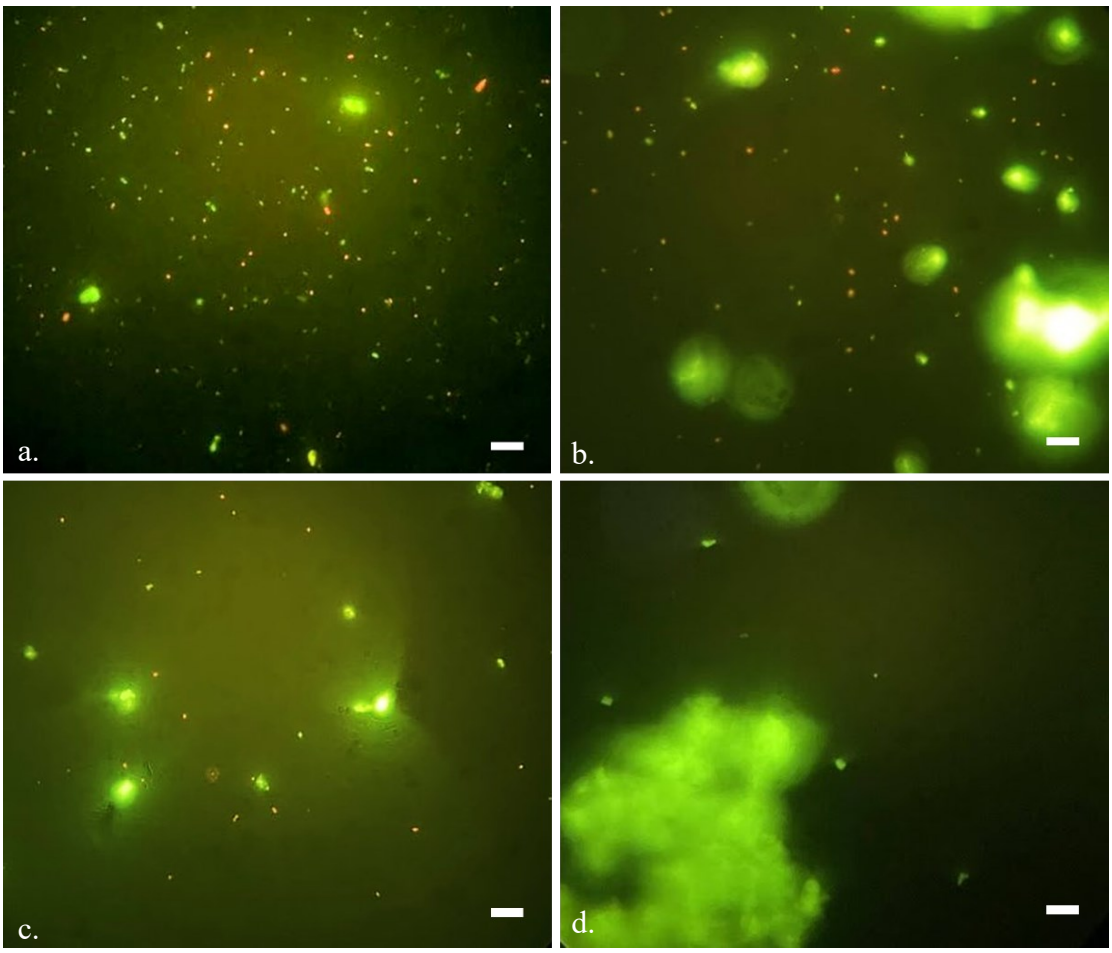


Figura 20: *Imagens representativas de microscopia de fluorescência, após coloração Live/Dead, da zona do istmo; a) controlo; b) IMP; c) IS; d) Grupo IL. É possível observar a presença de cocos, E. faecalis, corados de verde (vivos) e de vermelho (mortos). Ampliação 1000×. Barra de escala 10µm.*

As células coradas de verde representam células vivas de *E. faecalis*, ou seja, células com membranas intactas, onde o corante fluorescente verde (SYTO 9) permeabilizou as células, indicando que a membrana celular permanece intacta e impermeável ao corante vermelho (iodeto de propídio). Já as células coradas de vermelho indicam células mortas de *E. faecalis*, com uma membrana celular comprometida, que permitiu a penetração do corante vermelho, o que reflete a eficácia do tratamento em termos de ação bactericida.

As manchas coradas a verde que apresentam uma forma amorfa e uma tamanho maior correspondem ao *smear layer* constituído pelos detritos do tipo de material dos molares

modelo que também foram marcados pelo corante verde. É possível distinguir estas manchas das bactérias viáveis pelo seu tamanho e forma inespecífica.

V. Discussão

Considerando a importância de uma limpeza eficaz e da eliminação de microrganismos do sistema de canais radiculares, o presente estudo teve como objetivo avaliar a eficácia de três técnicas irrigantes na erradicação do biofilme de *E. faecalis*, que poderão ser utilizadas como coadjuvantes após o desbridamento mecânico dos canais.

Todos os modelos 3D de molares inferiores utilizados no estudo foram fabricados com materiais sintéticos transparentes, cuja superfície e composição difere da dentina dos canais radiculares. Ao contrário dos dentes modelo 3D, os dentes naturais apresentam uma natureza e comportamento distinto (Mohmmed et al., 2018). Um estudo laboratorial que utilize dentes *ex-vivo* extraídos para testar a ação microbiana das diferente técnicas irrigantes poderá ser mais relevante em termos clínicos. Porém, a principal vantagem do modelo 3D *in vitro* desenvolvido é o elevado grau de padronização das condições experimentais, pois elimina variáveis como a anatomia do canal radicular, a preparação do canal e a composição da dentina, e outros fatores que estão presentes quando se trabalha com dentes extraídos, para além das questões éticas e das dificuldades em obter dentes naturais *ex-vivo* com as características necessárias para o estudo experimental.

Neste sentido, no estudo optou-se por utilizar modelos 3D em resina de molares inferiores naturais, impressos em série com características anatómicas idênticas, aumentando a fiabilidade do estudo. Uma crítica importante a este modelo é que a formação e adesão do biofilme à dentina poderá diferir da adesão no material sintético. No entanto, o ensaio preliminar realizado para testar a formação do biofilme *in vitro* nos dentes modelo 3D demonstrou que o modelo permitiu o crescimento e formação de biofilme de *E. faecalis* na sua superfície. Além disso, o baixo desvio padrão observado (0,22) indica uma similaridade na formação e quantificação do biofilme nos quatro molares modelo testados. Outras investigações que analisaram a formação do biofilme de *E. faecalis* em dentes naturais apresentaram valores muito semelhantes aos obtidos no estudo piloto com os modelos 3D (Bago Jurič et al., 2016; Pladisai et al., 2016; Betancourt et al., 2020). Pelo que torna os dentes modelo adequados para uma investigação com relevância clínica com tamanhos de amostra adequados e sem variabilidade anatómica.

Os canais radiculares dos modelos foram preparados mecanicamente até um diâmetro apical de 0,25mm e conicidade de 6%, utilizando o sistema de limas BlueShaper (Zarc, Espanha). Embora estudos tenham indicado uma maior eficiência de limpeza com o

aumento do tamanho da preparação apical (Rodrigues et al., 2017), a preparação com uma conicidade adequada, sem remoção excessiva de dentina na região apical, também pode ser suficiente para permitir uma desinfeção eficaz (Haupt et al., 2020). Além disso, uma preparação apical maior pode aumentar o risco de erros iatrogénicos, como transporte do canal radicular, perfuração ou fratura radicular (Aazzouzi-Raiss et al., 2023). Com o advento de estratégias de irrigação com ativação da solução irrigante, permanece desconhecido se tamanhos menores de preparação apical resultarão em canais tão limpos quanto canais preparados com tamanhos maiores, quando a conicidade é padronizada. Esta tendência crescente de tratamentos endodônticos minimamente invasivos, onde as cavidades de acesso e a preparação mecânica do canal são menores, tem como objetivo conservar a estrutura do dente e, em última instância, prevenir fraturas (Plotino et al., 2017, Rover et al., 2017).

A filosofia endodôntica minimamente invasiva, para ser mecanicamente válida, deverá combinar cavidades de acesso conservadoras estrategicamente ampliadas com uma perda mínima de dentina radicular durante a conformação, sem comprometer a limpeza do sistema de canais radiculares. Apesar do vasto número de estudos que avaliaram a eficácia de diferentes sistemas e técnicas de instrumentação na limpeza dos canais radiculares, há uma clara falta de estudos que mostrem a eficácia da irrigação com sistemas de ativação em dentes com canais radiculares com preparações reduzidas (Lee et al., 2019). Desta forma, no presente estudo, foi realizada uma preparação até o tamanho 25, com uma conicidade de 6% para alcançar um equilíbrio aceitável entre o diâmetro apical e um fluxo adequado de irrigante para uma desinfeção intracanalar eficaz.

Neste estudo incluiu-se a complexidade da anatomia radicular, utilizando modelos de molares inferiores com canais mesiais que apresentam um istmo na região apical. Este tipo de anatomia complexa pode estar presente numa elevada percentagem de molares inferiores e, na maioria das vezes, não é preparada pela instrumentação mecânica, fazendo com que a desinfeção e limpeza dependam exclusivamente da irrigação do canal radicular (Pereira et al., 2022). Diversos estudos experimentais já compararam diferentes técnicas de irrigação e ativação de soluções irrigantes em canais retos e em anatomias menos complexas (Urban et al., 2017), mas poucos analisaram e compararam estas técnicas em anatomias mais desafiantes (Yeung et al., 2014; Haupt et al., 2020).

As coroas dos dentes foram removidas para padronizar as condições *in vitro* e para que os modelos se ajustassem adequadamente às placas de poços. No entanto, essa

modificação pode ser vista como uma limitação técnica do estudo, pois facilita o acesso aos canais radiculares e elimina o depósito coronário da solução irrigante.

A porção apical dos molares modelo foi selada com verniz para criar um sistema fechado e simular o efeito de *vapor lock*, reproduzindo condições clínicas e garantindo a viabilidade do estudo (Parente et al., 2010).

A bactéria *E. faecalis* foi utilizada neste estudo devido ao seu papel significativo no insucesso do tratamento endodôntico e à sua prevalência em infeções endodônticas secundárias. É consensual que as infeções endodônticas são, na realidade, causadas por bactérias sésseis, que formam biofilme. *E. faecalis* é particularmente relevante porque é capaz de formar biofilme, o que lhe confere uma maior resistência e melhora as suas condições de sobrevivência (Zhang et al., 2015;Prada et al., 2019)

As bactérias cultivadas em biofilme são mais resistentes a agentes antimicrobianos e tratamentos do que as bactérias planctónicas (Bago Jurič et al., 2016). Atualmente, não existe consenso sobre as configurações adequadas e os tempos de incubação necessários para desenvolver um modelo representativo de biofilme, o que destaca a importância de criar modelos padronizados de biofilme para ensaios endodônticos (Stojicic et al., 2013). Vários estudos experimentais recentes utilizaram biofilmes de várias idades, variando entre biofilmes de 24 horas até biofilmes de várias semanas de incubação (Neuhaus et al., 2016; Bago Jurič et al., 2016; Jurič et al., 2014; Pladisai et al., 2016; Golob et al., 2017; Betancourt et al., 2020). A presente pesquisa utilizou biofilmes com 21 dias de incubação.

O trabalho experimental foi dividido em dois ensaios independentes devido ao tamanho da amostra. Cada ensaio utilizou 20 molares modelo, distribuídos em quatro grupos de tratamento, cada um com 5 molares modelo. No total, a amostra consistiu em 40 molares modelo, com 10 molares modelo por grupo de tratamento.

Os irrigantes selecionados para o estudo foram o NaOCl a 5,25% como agente antimicrobiano e o EDTA a 17% como agente quelante. O NaOCl é um agente oxidante altamente reativo e o irrigante endodôntico mais utilizado (Wright et al., 2017). A sua capacidade única de dissolver tecido orgânico e desinfetar faz dele a escolha principal na endodontia contemporânea (Haapasalo et al., 2014). Contudo, o NaOCl não remove a *smear layer*, sendo necessário combiná-lo com um agente quelante para eliminar os componentes inorgânicos. O EDTA é o mais utilizado para este propósito (Arias-Moliz et al., 2016).

A recolha de biofilme de *E. faecalis* foi realizada através de limas *Hedstroem* e cones de papel que mantêm a integridade da superfície da dentina intacta e têm sido utilizados para a recolha de amostras para avaliação bacteriológica (Maden et al., 2017). Uma limitação deste método é a dificuldade em recolher todo o biofilme dos canais radiculares devido à complexidade anatómica. Isto poderá afetar a avaliação precisa da quantidade de biofilme presente após os procedimentos de irrigação.

Umas das técnicas mais utilizadas para avaliar a remoção do biofilme presente nos canais radiculares é a contagem de UFCs (Neuhaus et al., 2016; Cheng et al., 2017; Mohmmed et al., 2017; Mohmmed et al., 2018), independentemente da técnica para recolha de amostra utilizada, este método fornece informações sobre o número de bactérias viáveis encontradas, quer na superfície do canal radicular, quer a várias profundidades da dentina (Josic et al., 2022).

Apenas dois autores utilizaram a técnica de análise qPCR com o objetivo de confirmar a identificação de DNA de *E. faecalis* e determinar a presença de bactérias, mesmo em baixas quantidades ou na fase estacionária, evitando assim resultados falso-negativos (Alves et al., 2011; Balić et al., 2016). Este método de análise não tão frequentemente utilizado foi relatado como um método válido para a avaliação da erradicação bacteriana (Zhang et al., 2019). No entanto, é importante ter presente que, tanto o DNA de células viáveis como o DNA de células mortas, pode ser amplificado e detetado, podendo eventualmente induzir interpretações incorretas. Estes resultados poderão não refletir necessariamente a eficácia antimicrobiana de cada protocolo de irrigação utilizado, mas sim a respetiva capacidade de *flushing* e a hidrodinâmica de fluidos, com o objetivo de promover a lavagem do material genético bacteriano para fora dos canais radiculares. Esta hipótese é colocada quando se compara a análise dos valores de Ct das amostras de cada grupo experimental e se compara essas amostras entre ensaios, e não se observam grandes variações nos resultados. Estes resultados sugerem que a concentração da solução irrigante pode não ser o fator principal para aumentar a capacidade de lavagem das técnicas de irrigação. Em vez disso, a agitação e ativação do irrigante, que permitem uma penetração da solução e o movimento desta por todo o canal radicular, parecem ser a chave principal para a redução do material genético bacteriano nos diferentes grupos experimentais (Zhang et al., 2019).

Neste estudo, optou-se por uma análise quantitativa recolhendo o biofilme dos canais dos molares modelo e avaliando as bactérias viáveis em cada amostra através da contagem

de UFCs/mL, após o tratamento com as técnicas de irrigação protocoladas. A restante amostra foi usada para extração de DNA para posterior análise por qPCR, que confirmou e complementou os resultados das UFCs/mL. Para uma avaliação mais detalhada, e considerando que uma das limitações da análise por UFCs/mL e qPCR é a dificuldade prévia em recolher todo o biofilme dos canais radiculares devido à complexidade anatómica, utilizou-se microscopia de fluorescência para analisar a região do istmo. Esta análise permitiu avaliar a eficácia das técnicas de irrigação e a capacidade de desinfeção e limpeza na presença desta complexidade anatómica.

Os resultados das três análises (UFCs/mL, qPCR e microscopia de fluorescência) mostraram-se consistentes entre si. Sugerindo que o grupo IL, irrigação com ativação laser, se destaca como o método mais promissor para a redução da carga bacteriana, enquanto que a ativação sónica (IS) também apresenta resultados favoráveis. Ambos os métodos de ativação mecânica parecem ser mais eficazes do que a irrigação manual passiva na remoção do biofilme bacteriano dos canais radiculares. Os resultados entre grupos dos diferentes ensaios também realçam a importância da escolha de um bom irrigante. O artigo publicado, em 2022, por Josic e colaboradores está de acordo com os resultados do presente estudo, onde mostra que a agitação assistida por laser, bem como a ativação sónica de irrigantes, proporcionam uma remoção de biofilme mais eficaz em comparação com métodos tradicionais, como a irrigação passiva com seringa e agulha. (Josic et al., 2022). Além disso, a escolha do irrigante é crucial.

As amostras do grupo controlo, que não foram submetidos a nenhum tratamento adicional, não apresentaram diferenças significativas nos valores da contagem de UFCs/mL entre ensaios e na análise qPCR apresentaram os valores de Ct mais baixos (variando entre 15,70 e 16,90), em comparação com as amostras dos outros grupos experimentais, sugerindo uma maior quantidade de *E. faecalis* presente nessas amostras do grupo controlo. Estes resultados são esperados, uma vez que o grupo controlo serve como referência para a presença de bactérias no sistema radicular sem qualquer intervenção para reduzir a carga bacteriana.

Para as amostras do grupo IMP do 1º ensaio, os valores de Ct foram ligeiramente superiores (18,77 e 17,10), enquanto, que nas amostras do 2º ensaio desse grupo, os valores Ct variaram um pouco mais (16,01 e 18, 42). De forma geral, embora o método tenha mostrado alguma eficácia, a variação entre as amostras indica que o resultado pode não ser consistentemente eficaz na redução da carga bacteriana.

Adicionalmente, a análise microscópica revelou que *E. faecalis* estava presente em maior quantidade na zona do istmo das amostras do grupo IMP do que nas amostras dos outros dois grupos (IS, IL) (Figura 20) Isto sugere que o protocolo de irrigação manual passiva com agulha e seringa não é tão eficaz, em comparação com os grupos que utilizaram ativação, para promover uma dinâmica de fluídos suficiente para que a solução irrigante alcance todas as áreas do canal radicular, como a região do istmo.

Para uma desinfeção eficaz a solução irrigante precisa de estar em contato direto com a parede do canal radicular, o que nem sempre ocorre. Isto pode ser causado pelo principal desafio relacionado ao movimento do fluido numa geometria confinada (Glassman & Cha, 2015). Esta natureza fechada do sistema do canal radicular promove o efeito de *vapor lock*, que interfere com a ação de lavagem, e limita a ação da solução de NaOCl.

O presente estudo utilizou uma agulha lateral com calibre 30G. Esta agulha possui uma abertura na superfície lateral localizada a 2 mm da ponta fechada e gera uma pressão apical menor do que uma agulha com extremidade aberta (Boutsioukis et al. 2007). As agulhas com saída lateral permitem que a solução irrigante alcance cerca de 1 mm além da extremidade da ponta. Shen e colaboradores calcularam a pressão do fluido do irrigante, que pode ser útil para limpar as paredes do canal ao deslocar detritos como biofilmes (Shen et al., 2010). Os três parâmetros dinâmicos (padrão de fluxo, velocidade e pressão nas paredes) são todos influenciados pela taxa de fluxo do fluido introduzido na agulha (Shen et al., 2010). No entanto, outras pesquisas mostram consistentemente que a irrigação tradicional com agulhas não consegue limpar eficazmente os istmos, canais laterais e áreas de difícil acesso (Mohmmed et al., 2018; Mohmmed et al., 2017; Neuhaus et al., 2016; Urban et al., 2017; Haupt et al., 2020; Betancourt et al., 2019). Para contornar este problema, um estudo de dinâmica de fluidos computacional que avaliou o efeito da profundidade de inserção da agulha no fluxo do irrigante recomendou que as agulhas com saídas laterais devem ser posicionadas até 1 mm do CT sempre que possível, pois a substituição do irrigante atingiu o CT apenas quando a agulha com saída lateral estava colocada nesta posição (Boutsioukis et al., 2010).

Um estudo realizado por Perez e colaboradores avaliou o impacto da profundidade de inserção da agulha (calibre 30G) na remoção de detritos de tecido duro utilizando imagens de micro-CT (Perez et al., 2017). Os resultados do estudo demostraram que nenhuma das profundidades de inserção resultou em canais completamente livres de detritos. No entanto, a profundidade de inserção teve um efeito significativo na remoção dos detritos.

A agulha posicionada 1 mm abaixo do CT foi três vezes mais eficaz na remoção de detritos comparada àquela posicionada 5 mm aquém do CT ($P < 0,05$) (Perez et al., 2017).

Por outro lado, ao analisar estatisticamente os valores médios da contagem de UFCs/mL, o Grupo IMP e o Grupo IS do 2º ensaio apresentam uma redução significativa dos valores de biofilme de *E. faecalis* em comparação com os grupos respetivos do 1º ensaio. Esta discrepância pode estar relacionada com o facto de, no 1º ensaio, a solução de NaOCl utilizada, ter sido já preparada há 20 dias, embora estivesse num frasco escurecido e afastado da exposição solar, isso poderá ter reduzido a sua eficácia. No 2º ensaio, foi utilizada uma solução de NaOCl preparada no dia anterior. Interessantemente, estes resultados vêm reforçar e confirmar a premissa de que estas técnicas são dependentes da escolha de uma solução irrigante que apresente características antimicrobianas, tal como do tempo de contacto desta com a parede do canal radicular (Virdee et al., 2020). Além disso, é de notar que a vida útil do NaOCl é limitada, e parece existir uma discrepância entre a concentração esperada de cloro livre disponível e a concentração real de cloro livre disponível em soluções de NaOCl destinadas à irrigação endodôntica. O armazenamento e a exposição à luz, ar, metais e matéria orgânica podem reduzir a concentração de cloro livre disponível, resultando numa perda das propriedades antimicrobianas e de dissolução de tecidos (Van Der Waal et al., 2014). Um estudo de Van Der Waal e colaboradores, publicado em 2014, investigou a concentração de cloro livre disponível em soluções de NaOCl de uso doméstico e profissional, avaliando também os efeitos da diluição e armazenamento na concentração e concluiu que existe uma grande diferença nas concentrações de NaOCl, sendo o NaOCl doméstico o mais impreciso. A concentração de cloro livre disponível no NaOCl doméstico é instável e, portanto, parece ser a menos adequada para uso clínico (Van Der Waal et al., 2014).

Os valores da contagem de UFCs/mL do Grupo IS do 2º ensaio são muito reduzidos (Log_{10} UFCs/mL < 1), o que sugere que seguindo as normas do protocolo de ativação de uma solução de NaOCl com concentrações de 5,25% e ciclos de ativação de 20s, é uma técnica de ativação bastante eficaz na remoção de biofilme.

Um estudo realizado por Mohmmed e colaboradores investigou a erradicação do biofilme de *E. faecalis* num canal lateral de um modelo de canal radicular, comparando protocolos de irrigação com agitação sónica e ultrassónica utilizando NaOCl a 2,5%. Os resultados mostram que os canais estavam significativamente mais limpos, e a agitação proporcionou uma melhor penetração da solução irrigante (Mohmmed et al., 2018). Nesse

estudo, o biofilme de *E. faecalis* tinha 10 dias de formação. Segundo Stojicic e colaboradores, nas primeiras duas semanas, as bactérias em biofilme são sensíveis ao NaOCl 1%, à clorexidina 2% e ao iodo 0,2/0,4%; mas após 3 semanas, tornam-se muito resistentes aos mesmos agentes (Stojicic et al., 2013). Assim, no estudo de Mohmmed e colaboradores, a erradicação do biofilme pode estar relacionada com a sua sensibilidade à concentração de 2,5% de NaOCl. Esta concentração de NaOCl, combinada com as técnicas de agitação, terá sido reportada como suficiente para obter canais limpos.

No presente estudo, o biofilme utilizado tem 3 semanas, o que lhe confere uma maior resistência ao efeito antimicrobiano do NaOCl em concentrações mais baixas, pelo que se optou por utilizar uma concentração de 5,25% de NaOCl. Um estudo de Bago Jurič e colaboradores, mostrou que o NaOCl a 5,25%, utilizado durante 1 minuto, foi o protocolo antimicrobiano mais eficiente contra o biofilme de *E. faecalis* de três semanas, proporcionando até a erradicação completa em algumas amostras (Bago Jurič et al., 2016).

Após a análise qPCR, as amostras do grupo IS detetaram menos DNA de *E. faecalis* comparativamente às amostras do grupo Controlo e grupo IMP, nos dois ensaios. Portanto, ambos os resultados são concordantes e apoiam a eficaz capacidade de *flushing* provocada pelas ondas de cavitação. O estudo de Urban e colaboradores, demonstrou que o sistema de ativação sónica EDDY tem uma maior capacidade de remoção de detritos do canal radicular em comparação com a irrigação manual, resultados corroborados por Haupt e colaboradores., que também estão em concordância com os resultados do presente estudo (Urban et al., 2017;Haupt et al., 2020).

Por outro lado, o grupo IL apresenta resultados consistentes em ambos os ensaios com valores de Log_{10} UFCs/mL < 2 no 1º ensaio e < 1 no 2º ensaio. Foi o grupo experimental com menores contagens de *E. faecalis*, o que sugere que o próprio sistema laser já apresenta por si só um efeito antibacteriano, embora sejam necessários mais estudos para perceber a capacidade antimicrobiana do sistema laser quando usado em protocolo sem a utilização da solução de NaOCl ou em concentrações muito baixas. Na análise de qPCr, observando os valores de Ct (Tabela 10) e o gráfico das curvas de *melting*, é notório que não houve deteção de DNA de *E. faecalis* nas amostras do grupo IL, uma vez que os Ct são muito altos e superiores ao Ct obtido para o controlo negativo.

Esta técnica parece promover uma melhor penetração da solução irrigante por todo o canal e uma hidrodinâmica e capacidade de *flushing* superior às outras técnicas,

promovendo uma maior remoção do biofilme. Estes resultados são apoiados por alguns estudos que comparam as técnicas sónicas e ultrassónicas passivas com a técnica de ativação laser (Neelakantan et al., 2015; Betancourt et al., 2019; Aydin et al., 2020; Jurič et al., 2014).

Um estudo de De Meyer e colaboradores, publicado em 2017, avaliou o efeito da irrigação ativada por laser em biofilmes em canais radiculares simulados (De Meyer et al., 2017). Os biofilmes foram submetidos a diferentes protocolos de irrigação durante 20 segundos: irrigação com seringa, irrigação ativada ultrassonicamente, e irrigação ativada a laser com um laser Er:YAG, os resultados do estudo indicam a irrigação ativada a laser removeu mais biofilme do que a irrigação ativada ultrassonicamente quando se usou solução salina, indicando uma remoção física maior do biofilme (De Meyer et al., 2017). O uso de NaOCl resultou numa maior redução do biofilme, sem diferenças significativas entre os grupos de tratamento.

Outro estudo de Betancourt e colaboradores, publicado em 2019, demontrou que a irrigação ativada por laser Er,CR:YSGG aumentou a eficiência bactericida do NaOCl a 0,5%, permitindo que atingisse o mesmo nível de eficácia que o NaOCl a 5% (Betancourt et al., 2019).

No entanto, um estudo de Christo e colaboradores, publicado em 2016, teve resultados contraditórios onde demonstra que a irrigação com ativação laser Er,Cr:YSSG de baixa potência (0,5 W) não melhorou o efeito antibacteriano NaOCl a baixas concentrações (Christo et al., 2016).

Os estudos laboratoriais podem mostrar resultados contraditórios sobre a eficácia de diferentes protocolos de ativação com várias concentrações de NaOCl na erradicação de biofilmes. Isto ocorre devido à heterogeneidade nas metodologias utilizadas, o que dificulta a comparação entre técnicas endodônticas adjuvantes e a formulação de recomendações sobre o método mais eficiente. Além disso, as variações na apresentação dos resultados e a dificuldade em interpretar dados que não seguem uma distribuição normal também contribuem para essas discrepâncias.

É também importante notar que ainda não se sabe se uma diferença na potência média ou na potência de pico influenciará o efeito de cavitação, especialmente considerando que existem muitos outros parâmetros a serem levados em conta, como a localização da ponta

dentro do canal/câmara, o tamanho do canal e se o canal está permeável ou obstruído (Christo et al., 2016).

Quando se avaliou a quantidade de material genético de *E. faecalis*, o grupo IS apresentou valores de Ct inferiores aos do grupo IL, para o qual aliás se verificou não ser detetável DNA de *E. faecalis.* Estes resultados sugerem que a capacidade de lavagem dos canais radiculares e a agitação da solução irrigante com a técnica sónica é inferior à agitação proporcionada pela irrigação com ativação a laser. E, portanto, o laser terá uma capacidade de criar cavitação superior ao sistema sónico (Peeters & Gutknecht, 2014).

Os resultados de microscopia de fluorescência para os grupos IL e IS (Figura 20) apoiam os resultados da análise estatística da contagem de UFCs/mL e de qPCR. Nas amostras do grupo IL, não foi possível observar a presença de *E. faecalis.* Contudo, devido à presença de detritos do próprio material, não foi possível avaliar com certeza a total ausência de células de *E. faecalis*. O que sugere uma grande eficácia de desinfeção e capacidade de *flushing* por parte da irrigação com ativação laser.

As amostras do grupo IS apresentaram também uma quantidade visivelmente mais reduzida de *E. faecalis* vivos e mortos, em comparação às amostras do grupo Controlo, mas com uma maior quantidade de células coradas em comparação com as amostras do grupo IL.

As imagens de microscopia de fluorescência fornecem uma confirmação visual do impacto dos tratamentos, reforçando a relevância da ativação como um fator determinante na desinfeção e limpeza em dentes com anatomias mais complexas, como zonas de istmo.

Os lasers Érbium tal como os sistemas de ativação sónica são mais adequados a canais curvos, ao contrário do sistema convencional de seringa e agulha. Estes sistemas apresentam a vantagem de a posição da ponta ser menos afetada pela complexidade dos canais radiculares (Yeung et al., 2014).

No caso do sistema de ativação sónica as pontas flexíveis EDDY podem apresentar uma vantagem em comparação com a agulha de calibre 30G comumente utilizada, uma vez que podem alcançar mais facilmente a porção apical do canal, mesmo em canais radiculares com curvaturas acentuadas, e podem oscilar apesar do contacto com as paredes do canal, devido à sua ponta não cortante. No entanto, são necessários mais estudos para avaliar a eficácia de limpeza do EDDY em configurações de canal mais desafiantes, como canais com curvaturas acentuadas (Urban et al., 2017).

No caso da ativação laser, estudos recentes têm testado sistemas e protocolos com diferentes potências e energia de radiação onde a ponta é colocada até 5 mm do apéx ou até na câmara pulpar, tendo os mesmos efeitos bactericidas, o que facilita a irrigação em anatomias curvas e complexas (Koch et al., 2016; Golob et al., 2017).

Embora alguns estudos tenham já avaliado e comparado os diferentes sistemas e protocolos de irrigação com ativação sónica e laser, ainda há falta de consenso quanto a metodologias e protocolos consistentes. Futuras pesquisas devem concentrar-se na padronização das condições experimentais, incluindo o tempo de incubação do biofilme e os protocolos de irrigação, de forma a facilitar a comparação direta entre os estudos.

A ativação a laser mostrou-se promissora na remoção do biofilme, mas é necessária uma investigação mais aprofundada sobre sua capacidade antimicrobiana quando utilizada sem soluções irrigantes, bem como a influência de parâmetros como a potência do laser, a duração do pulso e a profundidade de inserção da ponta. Além disso, é importante estudar os efeitos pós-operatórios, incluindo o tempo de cicatrização de lesões periapicais e dor pós-operatória, para oferecer alternativas mais seguras e menos tóxicas para o tratamento endodôntico. É essencial continuar a explorar a eficácia das técnicas de irrigação e ativação, especialmente em canais com anatomias mais desafiantes, onde estas técnicas têm se mostrados mais eficazes do que as técnicas convencionais.

Uma das limitações identificadas é a dificuldade em recolher todo o biofilme dos canais radiculares devido à sua complexidade anatómica. Portanto, há uma necessidade de desenvolver métodos de avaliação mais eficientes, como a combinação de técnicas (por exemplo, microscopia de fluorescência e qPCR) para uma análise mais precisa da eficácia da desinfeção.

Para futuras investigações, o método de análise por qPCR pode ser melhorado para distinguir entre bactérias vivas e mortas, otimizando o protocolo com o uso de PMA (propídio de monoazida) (Salam et al., 2014). Dessa forma, será possível obter resultados mais precisos e representativos da eficácia dos diferentes protocolos de irrigação e ativação.

VI. Conclusão

Para uma melhor limpeza, desinfeção e eliminação do biofilme, existem várias técnicas e dispositivos de ativação disponíveis, que diferem em termos de protocolos e matérias.

A irrigação com ativação laser destacou-se como o método mais promissor para a redução da carga bacteriana, enquanto a irrigação com ativação sónica também apresentou resultados favoráveis. Ambos os métodos de ativação mecânica parecem ser mais eficazes do que a irrigação manual passiva na remoção de *E. faecalis* dos canais radiculares.

Embora estas técnicas e dispositivos tenham sido amplamente testados e comparados, é difícil interpretar os resultados e tirar conclusões definitivas a partir da literatura, devido aos modelos distintos e diferentes protocolos de avaliação utilizados, bem como diferenças nas concentrações das soluções irrigantes, volumes e tempos de aplicação.

O presente estudo mostra que independentemente da técnica de ativação, é importante lembrar que a agitação é um fator crítico para ajudar a distribuir e a trocar a solução dentro do canal, aumentando a eficácia da solução antisséptica utilizada. Assim, existe um consenso sobre o benefício da ativação do irrigante no final da preparação do canal radicular, o que parece melhorar a limpeza e desinfeção em comparação com a irrigação com seringa e agulha.

VII. Referências Bibliográficas

AAE. (2016). Guide to Clinical Endodontics. https://www.aae.org/specialty/clinical-resources/glossary-endodontic-terms/

Aazzouzi-Raiss, K., Ramírez-Muñoz, A., Mendez S, P. M., Vieira, G. C. S., Aranguren, J., & Pérez, A. R. (2023). Effects of Conservative Access and Apical Enlargement on Shaping and Dentin Preservation with Traditional and Modern Instruments: A Micro-computed Tomographic Study. Journal of Endodontics, 49(4), 430–437. https://doi.org/10.1016/j.joen.2023.01.004

Abdallah, M., Benoliel, C., Drider, D., Dhulster, P., & Chihib, N. E. (2014). Biofilm formation and persistence on abiotic surfaces in the context of food and medical environments. Archives of microbiology, 196(7), 453–472. https://doi.org/10.1007/s00203-014-0983-1

Afkhami, F., Akbari, S., & Chiniforush, N. (2017). Entrococcus faecalis Elimination in Root Canals Using Silver Nanoparticles, Photodynamic Therapy, Diode Laser, or Laser-activated Nanoparticles: An In Vitro Study. Journal of Endodontics, 43(2), 279–282. https://doi.org/10.1016/j.joen.2016.08.029

Ahmetoglu, F., Keles, A., Yalcin, M., & Simsek, N. (2014). Effectiveness of different irrigation systems on smear layer removal: A scanning electron microscopic study. European Journal of Dentistry, 8(1), 53–57. https://doi.org/10.4103/1305-7456.126241

Akcay, M., Arslan, H., Mese, M., Durmus, N., & Capar, I. D. (2017). Effect of photon-initiated photoacoustic streaming, passive ultrasonic, and sonic irrigation techniques on dentinal tubule penetration of irrigation solution: a confocal microscopic study. Clinical Oral Investigations, 21(7), 2205–2212. https://doi.org/10.1007/s00784-016-2013-y

Alves, F. R. F., Almeida, B. M., Neves, M. A. S., Moreno, J. O., Rôças, I. N., & Siqueira, J. F. (2011). Disinfecting oval-shaped root canals: Effectiveness of different supplementary approaches. Journal of Endodontics, 37(4), 496–501. https://doi.org/10.1016/j.joen.2010.12.008

Arias-Moliz, M. T., Morago, A., Ordinola-Zapata, R., Ferrer-Luque, C. M., Ruiz-Linares, M., & Baca, P. (2016). Effects of Dentin Debris on the Antimicrobial Properties of Sodium Hypochlorite and Etidronic Acid. Journal of Endodontics, 42(5), 771–775. https://doi.org/10.1016/j.joen.2016.01.021

Arslan, H., Ayranci, L. B., Karatas, E., Topçuoğlu, H. S., Yavuz, M. S., & Kesim, B. (2013). Effect of agitation of EDTA with 808-nanometer diode laser on removal of smear layer. Journal of Endodontics, 39(12), 1589–1592. https://doi.org/10.1016/j.joen.2013.07.016

Ayranci, L. B., Arslan, H., Akcay, M., Capar, I. D., Gok, T., & Saygili, G. (2016). Effectiveness of laser-assisted irrigation and passive ultrasonic irrigation techniques on smear layer removal in middle and apical thirds. Scanning, 38(2), 121–127. https://doi.org/10.1002/sca.21247

Aydin, S. A., Taşdemir, T., Buruk, C. K., & Çelik, D. (2020). Efficacy of Erbium, Chromium-doped Yttrium, Scandium, Gallium and Garnet Laser-activated Irrigation Compared with Passive Ultrasonic Irrigation, Conventional Irrigation, and Photodynamic Therapy against *Enterococcus faecalis*. Journal of Contemporary Dental Practice, 21(1), 11–16.

Bago Jurič, I., Plečko, V., Anić, I., Pleško, S., Jakovljević, S., Rocca, J. P., & Medioni, E. (2016). Antimicrobial efficacy of photodynamic therapy, Nd: YAG laser and QMiX solution against Enterococcus faecalis biofilm. Photodiagnosis and Photodynamic Therapy, 13, 238–243. https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2015.07.176

Balić, M., Lucić, R., Mehadžić, K., Bago, I., Anić, I., Jakovljević, S., & Plečko, V. (2016). The efficacy of photon-initiated photoacoustic streaming and sonic-activated irrigation combined with QMiX solution or sodium hypochlorite against intracanal E. faecalis biofilm. Lasers in Medical Science, 31(2), 335–342. https://doi.org/10.1007/s10103-015-1864-9

Bamford, N. C., Macphee, C. E., & Stanley-Wall, N. R. (2023). Microbial Primer: An introduction to biofilms – what they are, why they form and their impact on built and natural environments. Microbiology (United Kingdom), 169(8). https://doi.org/10.1099/mic.0.001338

Betancourt, P., Merlos, A., Sierra, J. M., Arnabat-Dominguez, J., & Viñas, M. (2020). Er,Cr:YSGG Laser-Activated Irrigation and Passive Ultrasonic Irrigation: Comparison of Two Strategies for Root Canal Disinfection. Photobiomodulation, Photomedicine, and Laser Surgery, 38(2), 91–97. https://doi.org/10.1089/photob.2019.4645

Batista Borges, M. M., Alves Duque, J., Fernandes Zancan, R., Monteiro Bramante, C., Hungaro Duarte, M. A., & Ricci Vivan, R. (2017). Uso Do Endoactivator No Tratamento Endodôntico. SALUSVITA, 36(1), 123-140.

Betancourt, P., Merlos, A., Sierra, J. M., Camps-Font, O., Arnabat-Dominguez, J., & Viñas, M. (2019). Effectiveness of low concentration of sodium hypochlorite activated by Er,Cr:YSGG laser against Enterococcus faecalis biofilm. Lasers in Medical Science, 34(2), 247–254. https://doi.org/10.1007/s10103-018-2578-6

Basrani, B., Malkhassian, G. (2015). Update of Endodontic Irrigating Solutions. In: Basrani, B. (eds) Endodontic Irrigation. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-16456-4_5

Blakimé, A., Henriques, B., Silva, F. S.,2, Teughels, W., Özcan, M., Souza, J. C. M. (2023). Smear layer removal and bacteria eradication from tooth root canals by Erbium lasers irradiation. Lasers in Dental Science, 7, 16 7–193. https://doi.org/10.1007/s41547-023-00194-1

Blanken, J.W. and Verdaasdonk, R.M. (2007) Cavitation as a working mechanism of the Er, Cr:YSGG laser in endodontics: A visualization study. Journal of Oral Laser Applications, 7, 97-106.

Bonacorsi, S., Visseaux, B., Bouzid, D., Pareja, J., Rao, S. N., Manissero, D., Hansen, G., & Vila, J. (2021). Systematic Review on the Correlation of Quantitative PCR Cycle Threshold Values of Gastrointestinal Pathogens With Patient Clinical Presentation and Outcomes. Frontiers in Medicine, 8, 711809. https://doi.org/10.3389/fmed.2021.711809

Boutsioukis, C., & Arias-Moliz, M. T. (2022). Present status and future directions – irrigants and irrigation methods. International Endodontic Journal, 55(3), 588–612. https://doi.org/10.1111/iej.13739

Boutsioukis, C., Kastrinakis, E., Lambrianidis, T., Verhaagen, B., Versluis, M., & van der Sluis, L. W. M. (2014a). Formation and removal of apical vapor lock during syringe irrigation: A combined experimental and Computational Fluid Dynamics approach. International Endodontic Journal, 47(2), 191–201. https://doi.org/10.1111/iej.12133

Boutsioukis, C., Lambrianidis, T., Kastrinakis, E., & Bekiaroglou, P. (2007). Measurement of pressure and flow rates during irrigation of a root canal ex vivo with

three endodontic needles. International Endodontic Journal, 40(7), 504–513. https://doi.org/10.1111/j.1365-2591.2007.01244.x

Boutsioukis, C., Lambrianidis, T., Verhaagen, B., Versluis, M., Kastrinakis, E., Wesselink, P. R., & Van Der Sluis, L. W. M. (2010). The effect of needle-insertion depth on the irrigant flow in the root canal: Evaluation using an unsteady computational fluid dynamics model. Journal of Endodontics, 36(10), 1664–1668. https://doi.org/10.1016/j.joen.2010.06.023

Boutsioukis, C., Psimma, Z., & Kastrinakis, E. (2014b). The effect of flow rate and agitation technique on irrigant extrusion ex vivo. International Endodontic Journal, 47(5), 487–496. https://doi.org/10.1111/iej.12176

Boutsioukis, C., Psimma, Z., & Van der Sluis, L. W. M. (2013a). Factors affecting irrigant extrusion during root canal irrigation: A systematic review. International Endodontic Journal, 46(7), 599–618. https://doi.org/10.1111/iej.12038

Boutsioukis, C., Verhaagen, B., Walmsley, A. D., Versluis, M., & Van Der Sluis, L. W. M. (2013b). Measurement and visualization of file-to-wall contact during ultrasonically activated irrigation in simulated canals. International Endodontic Journal, 46(11), 1046–1055. https://doi.org/10.1111/iej.12097

Bronnec, F., Bouillaguet, S., & Machtou, P. (2010). Ex vivo assessment of irrigant penetration and renewal during the final irrigation regimen. International Endodontic Journal, 43(8), 663–672. https://doi.org/10.1111/j.1365-2591.2010.01723.x

Cardoso, L. R., Baldasso, F. E. R., Delai, D., Montagner, F., & Kopper, P. M. P. (2019). Effect of EDTA, sodium, and calcium hypochlorite on the inorganic component of root canal dentin: A SEM analysis. Microscopy Research and Technique, 82(2), 128–133. https://doi.org/10.1002/jemt.23151

Chávez de Paz, L.E. (2015). Microbial Biofilms in Endodontics. In B. Basrani (Ed), Endodontic Irrigation: Chemical Disinfection of the Root Canal System, (vol.1, pp.1-11). Publisher: Springer. DOI 10.1007/978-3-319-16456-4_1

Cheng, X., Xiang, D., He, W., Qiu, J., Han, B., Yu, Q., & Tian, Y. (2017). Bactericidal Effect of Er:YAG Laser-Activated Sodium Hypochlorite Irrigation Against Biofilms of Enterococcus faecalis Isolate from Canal of Root-Filled Teeth with Periapical Lesions.

Photomedicine and Laser Surgery, 35(7), 386–392. https://doi.org/10.1089/pho.2017.4293

Christensen, C. E., McNeal, S. F., & Eleazer, P. (2008). Effect of Lowering the pH of Sodium Hypochlorite on Dissolving Tissue in Vitro. Journal of Endodontics, 34(4), 449–452. https://doi.org/10.1016/j.joen.2008.01.001

Christo, J. E., Zilm, P. S., Sullivan, T., & Cathro, P. R. (2016). Efficacy of low concentrations of sodium hypochlorite and low-powered Er,Cr: YSGG laser activated irrigation against an Enterococcus faecalis biofilm. International Endodontic Journal, 49(3), 279–286. https://doi.org/10.1111/iej.12447

Chubb D. W. R. (2019). A review of the prognostic value of irrigation on root canal treatment success. Australian endodontic journal: the journal of the Australian Society of Endodontology Inc, 45(1), 5–11. https://doi.org/10.1111/aej.12348

Darcey, J., Jawad, S., Taylor, C., Roudsari, R. V., & Hunter, M. (2016). Modern Endodontic Principles Part 4: Irrigation. Dental update, 43(1). https://doi.org/10.12968/denu.2016.43.1.20

de Almeida, C. V., Taddei, A., & Amedei, A. (2018). The controversial role of *Enterococcus faecalis* in colorectal cancer. Therapeutic Advances in Gastroenterology, 11. https://doi.org/10.1177/1756284818783606

De Gregorio, C., Arias, A., Navarrete, N., Cisneros, R., & Cohenca, N. (2015). Differences in disinfection protocols for root canal treatments between general dentists and endodontists: A Web-based survey. Journal of the American Dental Association, 146(7), 536–543. https://doi.org/10.1016/j.adaj.2015.01.027

De Gregorio, C., Estevez, R., Cisneros, R., Heilborn, C., & Cohenca, N. (2009). Effect of EDTA, Sonic, and Ultrasonic Activation on the Penetration of Sodium Hypochlorite into Simulated Lateral Canals: An In Vitro Study. Journal of Endodontics, 35(6), 891–895. https://doi.org/10.1016/j.joen.2009.03.015

De Meyer, S., Meire, M. A., Coenye, T., & De Moor, R. J. (2017). Effect of laser-activated irrigation on biofilms in artificial root canals. International endodontic jornal, 50(5), 472–479. https://doi.org/10.1111/iej.12643

Deleu, E., Meire, M. A., & De Moor, R. J. G. (2015). Efficacy of laser-based irrigant activation methods in removing debris from simulated root canal irregularities. Lasers in Medical Science, 30(2), 831–835. https://doi.org/10.1007/s10103-013-1442-y

Enrique Perez, A., Juan, R., Author, F., Tiscareño, A., Ortolani-Seltenerich, D. P., Ramírez-Muñoz, A., Pérez-Ron, O., Mendez S Carmen Leal-Moya, P. M., & Gaya Vieira, D. C. (2024). Efficacy of Advanced Cleaning Approches in Minimally Shaped 3D Mandibular Molar Models. Submitted to Journal of Endodontics.

Fukuzaki S. (2006). Mechanisms of actions of sodium hypochlorite in cleaning and disinfection processes. Biocontrol Science, 11(4), 147–157. https://doi.org/10.4265/bio.11.147

George, R., & Walsh, L. J. (2010). Thermal effects from modified endodontic laser tips used in the apical third of root canals with erbium-doped yttrium aluminium garnet and erbium, chromium-doped yttrium scandium gallium garnet lasers. Photomedicine and laser surgery, 28(2), 161–165. https://doi.org/10.1089/pho.2008.2423

Glassman, G., Charara, K. (2015). Apical Negative Pressure: Safety, Efficacy and Efficiency. In: Basrani, B. (eds) Endodontic Irrigation. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-16456-4_9Gluskin, A. H., Peters, C. I., & Peters, O. A. (2014). Minimally invasive endodontics: Challenging prevailing paradigms. British Dental Journal, 216(6), 347–353. https://doi.org/10.1038/sj.bdj.2014.201

Golob, B. S., Olivi, G., Vrabec, M., El Feghali, R., Parker, S., & Benedicenti, S. (2017). Efficacy of Photon-induced Photoacoustic Streaming in the Reduction of Enterococcus faecalis within the Root Canal: Different Settings and Different Sodium Hypochlorite Concentrations. Journal of Endodontics, 43(10), 1730–1735. https://doi.org/10.1016/j.joen.2017.05.019

Gomes, B. P. F. A., Francisco, P. A., Godoi, E. P., Endo, M. S., Barbosa-Ribeiro, M., Delboni, M. G., & Pecorari, V. G. A. (2021). Identification of Culturable and Nonculturable Microorganisms, Lipopolysaccharides, and Lipoteichoic Acids From Root Canals of Teeth With Endodontic Failure. Journal of Endodontics, 47(7), 1075–1086. https://doi.org/10.1016/j.joen.2021.04.011

Gordon, W., Atabakhsh, V. A., Meza, F., Doms, A., Nissan, R., Rizoiu, I., & Stevens, R. H. (2007). The antimicrobial efficacy of the erbium, chromium:yttrium-scandium-gallium-garnet laser with radial emitting tips on root canal dentin walls infected with

Enterococcus faecalis. Journal of the American Dental Association, 138(7), 992–1002. https://doi.org/10.14219/jada.archive.2007.0297

Gu, L., Wei, X., Ling, J., & Huang, X. (2009). A Microcomputed Tomographic Study of Canal Isthmuses in the Mesial Root of Mandibular First Molars in a Chinese Population. Journal of Endodontics, 35(3), 353–356. https://doi.org/10.1016/j.joen.2008.11.029

Gulabivala, K., Ng, Y. L., Gilbertson, M., & Eames, I. (2010). The fluid mechanics of root canal irrigation. Physiological measurement, 31(12), 49–84. https://doi.org/10.1088/0967-3334/31/12/R01

Gulabivala, K., & Ng, Y. L. (2014). Non-surgical root-canal treatment. In Endodontics: Fourth Edition (pp. 174–236). Elsevier Ltd. https://doi.org/10.1016/B978-0-7020-3155-7.00008-4

Haapasalo, M., Shen, Y., Wang, Z., & Gao, Y. (2014a). Irrigation in endodontics. British Dental Journal, 216(6), 299–303. https://doi.org/10.1038/sj.bdj.2014.204

Haapasalo, M., Wang, Z., Shen, Y., Curtis, A., Patel, P., & Khakpour, M. (2014b). Tissue dissolution by a novel Multisonic Ultracleaning system and sodium hypochlorite. Journal of Endodontics, 40(8), 1178–1181. https://doi.org/10.1016/j.joen.2013.12.029

Haupt, F., Meinel, M., Gunawardana, A., & Hülsmann, M. (2020). Effectiveness of different activated irrigation techniques on debris and smear layer removal from curved root canals: a SEM evaluation. Australian Endodontic Journal, 46(1), 40–46. https://doi.org/10.1111/aej.12342

Henriques, L. C. F., de Brito, L. C. N., Tavares, W. L. F., Teles, R. P., Vieira, L. Q., Teles, F. R., & Sobrinho, A. P. R. (2016). Microbial Ecosystem Analysis in Root Canal Infections Refractory to Endodontic Treatment. Journal of Endodontics, 42(8), 1239–1245. https://doi.org/10.1016/j.joen.2016.05.014

Hoedke, D., Kaulika, N., Dommisch, H., Schlafer, S., Shemesh, H., & Bitter, K. (2021). Reduction of dual-species biofilm after sonic- or ultrasonic-activated irrigation protocols: A laboratory study. International Endodontic Journal, 54(12), 2219–2228. https://doi.org/10.1111/iej.13618

Hülsmann, M., Heckendorff, M., & Lennon, A. (2003). Chelating agents in root canal treatment: mode of action and indications for their use. International endodontic journal, 36(12), 810–830. https://doi.org/10.1111/j.1365-2591.2003.00754.x

Jaramillo, D.E. (2015). Irrigation of the Root Canal System by Laser Activation (LAI): PIPS Photon-Induced Photoacoustic Streaming. In: Basrani, B. (eds) Endodontic Irrigation. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-16456-4_13Jhajharia, K., Parolia, A., Shetty, Kv., & Mehta, L. (2015). Biofilm in endodontics: A review. Journal of International Society of Preventive and Community Dentistry, 5(1), 1. https://doi.org/10.4103/2231-0762.151956

Josic, U., Mazzitelli, C., Maravic, T., Fidler, A., Breschi, L., & Mazzoni, A. (2022). Biofilm in Endodontics: In Vitro Cultivation Possibilities, Sonic-, Ultrasonic- and Laser-Assisted Removal Techniques and Evaluation of the Cleaning Efficacy. Polymers, 14(7), 1334. https://doi.org/10.3390/polym14071334

Jurič, I. B., Plečko, V., & Anić, I. (2014). Antimicrobial efficacy of Er,Cr:YSGG laser-activated irrigation compared with passive ultrasonic irrigation and RinsEndo® against intracanal enterococcus faecalis. Photomedicine and Laser Surgery, 32(11), 600–605. https://doi.org/10.1089/pho.2014.3767

Khalifa, L., Shlezinger, M., Beyth, S., Houri-Haddad, Y., Coppenhagen-Glazer, S., Beyth, N., & Hazan, R. (2016). Phage therapy against Enterococcus faecalis in dental root canals. Journal of Oral Microbiology, 8, 32157. https://doi.org/10.3402/jom.v8.32157

Klyn, S. L., Kirkpatrick, T. C., & Rutledge, R. E. (2010). In vitro comparisons of debris removal of the EndoActivatorTM System, the F FileTM, ultrasonic irrigation, and NaOCl irrigation alone after hand-rotary instrumentation in human Mandibular molars. Journal of Endodontics, 36(8), 1367–1371. https://doi.org/10.1016/j.joen.2010.03.022

Koch, J. D., Jaramillo, D. E., DiVito, E., & Peters, O. A. (2016). Irrigant flow during photon-induced photoacoustic streaming (PIPS) using Particle Image Velocimetry (PIV). Clinical Oral Investigations, 20(2), 381–386. https://doi.org/10.1007/s00784-015-1562-9

Krishnan, U., Saji, S., Clarkson, R., Lalloo, R., & Moule, A. J. (2017). Free Active Chlorine in Sodium Hypochlorite Solutions Admixed with Octenidine, SmearOFF, Chlorhexidine, and EDTA. Journal of Endodontics, 43(8), 1354–1359. https://doi.org/10.1016/j.joen.2017.03.034

Lacerda, M. F. L. S., Marceliano-Alves, M. F., Pérez, A. R., Provenzano, J. C., Neves, M. A. S., Pires, F. R., Gonçalves, L. S., Rôças, I. N., & Siqueira, J. F. (2017). Cleaning and Shaping Oval Canals with 3 Instrumentation Systems: A Correlative Micro–computed Tomographic and Histologic Study. Journal of Endodontics, 43(11), 1878–1884. https://doi.org/10.1016/j.joen.2017.06.032

Lee, O. Y. S., Khan, K., Li, K. Y., Shetty, H., Abiad, R. S., Cheung, G. S. P., & Neelakantan, P. (2019). Influence of apical preparation size and irrigation technique on root canal debridement: a histological analysis of round and oval root canals. International Endodontic Journal, 52(9), 1366–1376. https://doi.org/10.1111/iej.13127

Lei, L., Wang, F., Wang, Y., Li, Y., & Huang, X. (2022). Laser activated irrigation with SWEEPS modality reduces concentration of sodium hypochlorite in root canal irrigation. Photodiagnosis and photodynamic therapy, 39, 102873. https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2022.102873

Liu, C., Li, Q., Yue, L., & Zou, X. (2022). Evaluation of sonic, ultrasonic, and laser irrigation activation systems to eliminate bacteria from the dentinal tubules of the root canal system. Journal of Applied Oral Science, 30. https://doi.org/10.1590/1678-7757-2022-0199

Luks, S., & Bolatin, L. (1974). Endodontic myths. The New York state dental journal, 40(7), 417–419.

Machida, T., Wilder-Smith, P., Arrastia, A. M., Liaw, L. H., & Berns, M. W. (1995). Root canal preparation using the second harmonic KTP:YAG laser: a thermographic and scanning electron microscopic study. Journal of endodontics, 21(2), 88–91. https://doi.org/10.1016/S0099-2399(06)81102-7

Machtou P. (1980). L'irrigation en endodontie [Irrigation in endodontics]. Actualites odonto-stomatologiques, 34(131), 387–394.

Machtou, P. (2015). Manual Dynamic Activation (MDA) Technique. In: Basrani, B. (eds) Endodontic Irrigation. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-16456-4_8Mancini, M., Cerroni, L., Iorio, L., Dall'Asta, L., & Cianconi, L. (2018). FESEM evaluation of smear layer removal using different irrigant activation methods (EndoActivator, EndoVac, PUI and LAI). An in vitro study. Clinical Oral Investigations, 22(2), 993–999. https://doi.org/10.1007/s00784-017-2179-y

Mannocci, F., Peru, M., Sherriff, M., Cook, R., & Pitt Ford, T. R. (2005). The isthmuses of the mesial root of mandibular molars: a micro-computed tomographic study. International endodontic journal, 38(8), 558–563. https://doi.org/10.1111/j.1365-2591.2005.00994.x

Martins, M. R., Carvalho, M. F., Vaz, I. P., Capelas, J. A., Martins, M. A., & Gutknecht, N. (2013). Efficacy of Er,Cr:YSGG laser with endodontical radial firing tips on the outcome of endodontic treatment: Blind randomized controlled clinical trial with six-month evaluation. Lasers in Medical Science, 28(4), 1049–1055. https://doi.org/10.1007/s10103-012-1172-6

Martins, M. R., Lima, R. C., Pina-Vaz, I., Carvalho, M. F., & Gutknecht, N. (2016). Endodontic Treatment of an Autogenous Transplanted Tooth Using an Er,Cr:YSGG Laser and Radial Firing Tips: Case Report. Photomedicine and Laser Surgery, 34(10), 487–493. https://doi.org/10.1089/pho.2015.4061

Matsumoto, H., Yoshimine, Y., & Akamine, A. (2011). Visualization of irrigant flow and cavitation induced by Er:YAG laser within a root canal model. Journal of Endodontics, 37(6), 839–843. https://doi.org/10.1016/j.joen.2011.02.035

Meire, M. A., Poelman, D., & De Moor, R. J. (2014). Optical properties of root canal irrigants in the 300-3,000-nm wavelength region. Lasers in Medical Science, 29(5), 1557–1562. https://doi.org/10.1007/s10103-013-1307-4

Mello, I., Coil, J., & Antoniazzi, J. H. (2009). Does a final rinse to remove smear layer interfere on dentin permeability of root canals? Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology, 107(4). https://doi.org/10.1016/j.tripleo.2008.12.007

Mohmmed, S. A., Vianna, M. E., Penny, M. R., Hilton, S. T., Mordan, N. J., & Knowles, J. C. (2018). Investigations into in situ Enterococcus faecalis biofilm removal by passive and active sodium hypochlorite irrigation delivered into the lateral canal of a simulated root canal model. International Endodontic Journal, 51(6), 649–662. https://doi.org/10.1111/iej.12880

Morago, A., Ordinola-Zapata, R., Ferrer-Luque, C. M., Baca, P., Ruiz-Linares, M., & Arias-Moliz, M. T. (2016). Influence of Smear Layer on the Antimicrobial Activity of a Sodium Hypochlorite/Etidronic Acid Irrigating Solution in Infected Dentin. Journal of Endodontics, 42(11), 1647–1650. https://doi.org/10.1016/j.joen.2016.07.023

Morago, A., Ruiz-Linares, M., Ferrer-Luque, C. M., Baca, P., Rodríguez Archilla, A., & Arias-Moliz, M. T. (2019). Dentine tubule disinfection by different irrigation protocols. Microscopy Research and Technique, 82(5), 558–563. https://doi.org/10.1002/jemt.23200

Neelakantan, P., Cheng, C. Q., Mohanraj, R., Sriraman, P., Subbarao, C., & Sharma, S. (2015). Antibiofilm activity of three irrigation protocols activated by ultrasonic, diode laser or Er: YAG laser in vitro. International Endodontic Journal, 48(6), 602–610. https://doi.org/10.1111/iej.12354

Neelakantan, P., Devaraj, S., & Jagannathan, N. (2016). Histologic Assessment of Debridement of the Root Canal Isthmus of Mandibular Molars by Irrigant Activation Techniques Ex Vivo. Journal of Endodontics, 42(8), 1268–1272. https://doi.org/10.1016/j.joen.2016.05.005

Neuhaus, K. W., Liebi, M., Stauffacher, S., Eick, S., & Lussi, A. (2016). Antibacterial Efficacy of a New Sonic Irrigation Device for Root Canal Disinfection. Journal of Endodontics, 42(12), 1799–1803. https://doi.org/10.1016/j.joen.2016.08.024

Nusstein, J.M. (2015). Sonic and Ultrasonic Irrigation. In: Basrani, B. (eds) Endodontic Irrigation. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-16456-4_10Olivi, G., & Divito, E. (2012). REVIEW Photoacoustic Endodontics using PIPSTM: experimental background and clinical protocol. Journal of the Laser and Health Academy, 2012(1), 22–25. www.laserandhealth.com

Ørstavik, D. (Ed.). (2020). Essential endodontology: Prevention and treatment of apical periodontitis (3rd ed). Wiley-Blackwell.

Ordinola-Zapata, R., Bramante, C. M., Aprecio, R. M., Handysides, R., & Jaramillo, D. E. (2014). Biofilm removal by 6% sodium hypochlorite activated by different irrigation techniques. International endodontic journal, 47(7), 659–666. https://doi.org/10.1111/iej.12202

Paqué, F., Al-Jadaa, A., & Kfir, A. (2012). Hard-tissue debris accumulation created by conventional rotary versus self-adjusting file instrumentation in mesial root canal systems of mandibular molars. International Endodontic Journal, 45(5), 413–418. https://doi.org/10.1111/j.1365-2591.2011.01991.x

Paqué, F., Laib, A., Gautschi, H., & Zehnder, M. (2009). Hard-Tissue Debris Accumulation Analysis by High-Resolution Computed Tomography Scans. Journal of Endodontics, 35(7), 1044–1047. https://doi.org/10.1016/j.joen.2009.04.026

Parente, J. M., Loushine, R. J., Susin, L., Gu, L., Looney, S. W., Weller, R. N., Pashley, D. H., & Tay, F. R. (2010). Root canal debridement using manual dynamic agitation or the EndoVac for final irrigation in a closed system and an open system. International Endodontic Journal, 43(11), 1001–1012. https://doi.org/10.1111/j.1365-2591.2010.01755.x

Peeters, H. H., & Gutknecht, N. (2014). Efficacy of laser-driven irrigation versus ultrasonic in removing an airlock from the apical third of a narrow root canal. Australian Endodontic Journal, 40(2), 47–53. https://doi.org/10.1111/aej.12016

Pereira, M. R., Pascoal-Faria, P., Vasconcelos, I., Alves, N., & Ginjeira, A. (2022). Endodontics Irrigation: A Computational Fluid Dynamics Approach. AIP Conference Proceedings, 2425. https://doi.org/10.1063/5.0085908

Pérez, A. R., Ricucci, D., Vieira, G. C. S., Provenzano, J. C., Alves, F. R. F., Marceliano-Alves, M. F., Rôças, I. N., & Siqueira, J. F. (2020). Cleaning, Shaping, and Disinfecting Abilities of 2 Instrument Systems as Evaluated by a Correlative Micro–computed Tomographic and Histobacteriologic Approach. Journal of Endodontics, 46(6), 846–857. https://doi.org/10.1016/j.joen.2020.03.017

Perez, R., Neves, A. A., Belladonna, F. G., Silva, E. J. N. L., Souza, E. M., Fidel, S., Versiani, M. A., Lima, I., Carvalho, C., & De-Deus, G. (2017). Impact of needle insertion depth on the removal of hard-tissue debris. International Endodontic Journal, 50(6), 560–568. https://doi.org/10.1111/iej.12648

Pladisai, P., Ampornaramveth, R. S., & Chivatxaranukul, P. (2016). Effectiveness of different disinfection protocols on the reduction of bacteria in Enterococcus faecalis biofilm in teeth with large root canals. Journal of Endodontics, 42(3), 460–464. https://doi.org/10.1016/j.joen.2015.12.016

Plotino, G., Cortese, T., Grande, N. M., Leonardi, D. P., Di Giorgio, G., Testarelli, L., & Gambarini, G. (2016). New technologies to improve root canal disinfection. In Brazilian Dental Journal, 27(1), 3–8. https://doi.org/10.1590/0103-6440201600726

Plotino, G., Grande, N. M., Isufi, A., Ioppolo, P., Pedullà, E., Bedini, R., Gambarini, G., & Testarelli, L. (2017). Fracture Strength of Endodontically Treated Teeth with Different Access Cavity Designs. Journal of Endodontics, 43(6), 995–1000. https://doi.org/10.1016/j.joen.2017.01.022

Prada, I., Micó-Muñoz, P., Giner-Lluesma, T., Micó-Martínez, P., Collado-Castellano, N., & Manzano-Saiz, A. (2019). Influence of microbiology on endodontic failure. Literature review. Medicina Oral Patologia Oral y Cirugia Bucal, 24(3), 364–372. https://doi.org/10.4317/medoral.22907

Prado, M. do, Assis, D. F. de, & Simão, R. A. (2014). Efeito de diferentes soluções utilizadas como irrigante final na superfície dentinária: análise de rugosidade. Revista de Odontologia Da UNESP, 43(1), 36–40. https://doi.org/10.1590/s1807-25772014000100006

Ramamoorthi, S., Nivedhitha, M. S., & Divyanand, M. J. (2015). Comparative evaluation of postoperative pain after using endodontic needle and EndoActivator during root canal irrigation: A randomised controlled trial. Australian Endodontic Journal, 41(2), 78–87. https://doi.org/10.1111/aej.12076

Rodrigues, R. C. V., Zandi, H., Kristoffersen, A. K., Enersen, M., Mdala, I., Ørstavik, D., Rôças, I. N., & Siqueira, J. F. (2017). Influence of the Apical Preparation Size and the Irrigant Type on Bacterial Reduction in Root Canal–treated Teeth with Apical Periodontitis. Journal of Endodontics, 43(7), 1058–1063. https://doi.org/10.1016/j.joen.2017.02.004

Rover, G., Belladonna, F. G., Bortoluzzi, E. A., De-Deus, G., Silva, E. J. N. L., & Teixeira, C. S. (2017). Influence of Access Cavity Design on Root Canal Detection, Instrumentation Efficacy, and Fracture Resistance Assessed in Maxillary Molars. Journal of endodontics, 43(10), 1657–1662. https://doi.org/10.1016/j.joen.2017.05.006

Ruiz-Linares, M., Aguado-Pérez, B., Baca, P., Arias-Moliz, M. T., & Ferrer-Luque, C. M. (2017). Efficacy of antimicrobial solutions against polymicrobial root canal biofilm. International Endodontic Journal, 50(1), 77–83. https://doi.org/10.1111/iej.12598

Sahar-Helft, S., Sarp, A. S. K., Stabholtz, A., Gutkin, V., Redenski, I., & Steinberg, D. (2015). Comparison of Positive-Pressure, Passive Ultrasonic, and Laser-Activated Irrigations on Smear-Layer Removal from the Root Canal Surface. Photomedicine and Laser Surgery, 33(3), 129–135. https://doi.org/10.1089/pho.2014.3788

Sahar-Helft, S., Stabholtz, A., Moshonov, J., Gutkin, V., Redenski, I., & Steinberg, D. (2013). Effect of Er:YAG laser-Activated irrigation solution on enterococcus faecalis biofilm in an ex-vivo root canal model. Photomedicine and Laser Surgery, 31(7), 334–341. https://doi.org/10.1089/pho.2012.3445

Salam, K. W., El-Fadel, M., Barbour, E. K., & Saikaly, P. E. (2014). A propidium monoazide–quantitative PCR method for the detection and quantification of viable Enterococcus faecalis in large-volume samples of marine waters. Applied Microbiology and Biotechnology, 98(20), 8707–8718. https://doi.org/10.1007/s00253-014-6023-x

Shen, Y., Gao, Y., Qian, W., Ruse, N. D., Zhou, X., Wu, H., & Haapasalo, M. (2010). Three-dimensional Numeric Simulation of Root Canal Irrigant Flow with Different Irrigation Needles. Journal of Endodontics, 36(5), 884–889. https://doi.org/10.1016/j.joen.2009.12.010

Silva, P. B., Krolow, A. M., Pilownic, K. J., Casarin, R. P., Lima, R. K. P., Leonardo, R. de T., & Pappen, F. G. (2016). Apical extrusion of debris and irrigants using different irrigation needles. Brazilian Dental Journal, 27(2), 192–195. https://doi.org/10.1590/0103-6440201600382

Siqueira, J. F., Alves, F. R. F., Versiani, M. A., Rôças, I. N., Almeida, B. M., Neves, M. A. S., & Sousa-Neto, M. D. (2013). Correlative bacteriologic and micro-computed tomographic analysis of mandibular molar mesial canals prepared by self-adjusting file, reciproc, and twisted file systems. Journal of Endodontics, 39(8), 1044–1050. https://doi.org/10.1016/j.joen.2013.04.034

Siqueira, J. F., Jr, & Rôças, I. N. (2022). Present status and future directions: Microbiology of endodontic infections. International endodontic journal, 55(3), 512–530. https://doi.org/10.1111/iej.13677

Sirtes, G., Waltimo, T., Schaetzle, M., & Zehnder, M. (2005). The effects of temperature on sodium hypochlorite short-term stability, pulp dissolution capacity, and antimicrobial efficacy. Journal of endodontics, 31(9), 669–671. https://doi.org/10.1097/01.don.0000153846.62144.d2

Stewart, P. S. (2014). Biophysics of biofilm infection. Pathogens and Disease, 70(3), 212–218). https://doi.org/10.1111/2049-632X.12118

Stojicic, S., Shen, Y., & Haapasalo, M. (2013). Effect of the source of biofilm bacteria, level of biofilm maturation, and type of disinfecting agent on the susceptibility of biofilm bacteria to antibacterial agents. Journal of Endodontics, 39(4), 473–477. https://doi.org/10.1016/j.joen.2012.11.024

Takahashi, Y., Yoshida, A., Nagayoshi, M., Kitamura, C., Nishihara, T., Awano, S., & Ansai, T. (2011). Enumeration of viable Enterococcus faecalis, a predominant apical periodontitis pathogen, using propidium monoazide and quantitative real-time polymerase chain reaction. Microbiology and Immunology, 55(12), 889–892. https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.2011.00390.x

Tartari, T., Oda, D. F., Zancan, R. F., da Silva, T. L., de Moraes, I. G., Duarte, M. A. H., & Bramante, C. M. (2017). Mixture of alkaline tetrasodium EDTA with sodium hypochlorite promotes in vitro smear layer removal and organic matter dissolution during biomechanical preparation. International Endodontic Journal, 50(1), 106–114. https://doi.org/10.1111/iej.12595

Tay, F. R., Gu, L. sha, Schoeffel, G. J., Wimmer, C., Susin, L., Zhang, K., Arun, S. N., Kim, J., Looney, S. W., & Pashley, D. H. (2010). Effect of Vapor Lock on Root Canal Debridement by Using a Side-vented Needle for Positive-pressure Irrigant Delivery. Journal of Endodontics, 36(4), 745–750. https://doi.org/10.1016/j.joen.2009.11.022

Torabinejad, M., Cho, Y., Khademi, A. A., Bakland, L. K., & Shabahang, S. (2003). The Effect of Various Concentrations of Sodium Hypochlorite on the Ability of MTAD to Remove the Smear Layer. Journal of endodontics, 29(4), 233–239. https://doi.org/10.1097/00004770-200304000-00001

Urban, K., Donnermeyer, D., Schäfer, E., & Bürklein, S. (2017). Canal cleanliness using different irrigation activation systems: a SEM evaluation. Clinical Oral Investigations, 21(9), 2681–2687. https://doi.org/10.1007/s00784-017-2070-x

Van Der Sluis, L. W. M., Gambarini, G., Wu, M. K., & Wesselink, P. R. (2006). The influence of volume, type of irrigant and flushing method on removing artificially placed dentine debris from the apical root canal during passive ultrasonic irrigation. International Endodontic Journal, 39(6), 472–476. https://doi.org/10.1111/j.1365-2591.2006.01108.x

Van Der Waal, S. V., Van Dusseldorp, N. E., & De Soet, J. J. (2014). An evaluation of the accuracy of labeling of percent sodium hypochlorite on various commercial and professional sources: Is sodium hypochlorite from these sources equally suitable for

endodontic irrigation? Journal of Endodontics, 40(12), 2049–2052. https://doi.org/10.1016/j.joen.2014.08.021

Verstraeten, J., Jacquet, W., De Moor, R. J. G., & Meire, M. A. (2017). Hard tissue debris removal from the mesial root canal system of mandibular molars with ultrasonically and laser-activated irrigation: a micro-computed tomography study. Lasers in Medical Science, 32(9), 1965–1970. https://doi.org/10.1007/s10103-017-2297-4

Violich, D. R., & Chandler, N. P. (2010). The smear layer in endodontics - A review. International Endodontic Journal, 43(1), 2–15. https://doi.org/10.1111/j.1365-2591.2009.01627.x

Virdee, S. S., Farnell, D. J. J., Silva, M. A., Camilleri, J., Cooper, P. R., & Tomson, P. L. (2020). The influence of irrigant activation, concentration and contact time on sodium hypochlorite penetration into root dentine: an ex vivo experiment. International Endodontic Journal, 53(7), 986–997. https://doi.org/10.1111/iej.13290

von Arx T. (2005). Frequency and type of canal isthmuses in first molars detected by endoscopic inspection during periradicular surgery. International endodontic journal, *38*(3), 160–168. https://doi.org/10.1111/j.1365-2591.2004.00915.x

Willershausen, I., Wolf, T. G., Schmidtmann, I., Berger, C., Ehlers, V., Willershausen, B., & Briseño, B. (2015). Survey of root canal irrigating solutions used in dental practices within Germany. International Endodontic Journal, 48(7), 654–660. https://doi.org/10.1111/iej.12360

Wright, P. P., Kahler, B., & Walsh, L. J. (2017). Alkaline sodium hypochlorite irrigant and its chemical interactions. Materials, 10(10), 1147. https://doi.org/10.3390/ma10101147

Yeung, W., Raldi, D. P., Cunha, R. S., & Mello, I. (2014). Assessment of smear layer removal protocols in curved root canals. Australian Endodontic Journal, 40(2), 66–71. https://doi.org/10.1111/aej.12038

Zandi, H., Petronijevic, N., Mdala, I., Kristoffersen, A. K., Enersen, M., Rôças, I. N., Siqueira, J. F., & Ørstavik, D. (2019). Outcome of Endodontic Retreatment Using 2 Root Canal Irrigants and Influence of Infection on Healing as Determined by a Molecular Method: A Randomized Clinical Trial. Journal of Endodontics, 45(9), 1089-1098. https://doi.org/10.1016/j.joen.2019.05.021

Zhang, C., Du, J., & Peng, Z. (2015). Correlation between Enterococcus faecalis and Persistent Intraradicular Infection Compared with Primary Intraradicular Infection: A Systematic Review. Journal of Endodontics, 41(8), 1207–1213. https://doi.org/10.1016/j.joen.2015.04.008

Zhang, D., Shen, Y., de la Fuente-Núñez, C., & Haapasalo, M. (2019). In vitro evaluation by quantitative real-time PCR and culturing of the effectiveness of disinfection of multispecies biofilms in root canals by two irrigation systems. Clinical Oral Investigations, 23(2), 913–920. https://doi.org/10.1007/s00784-018-2515-x

VIII. Anexos

Anexo I. Resumo do Poster submetido e aceite pela comissão científica do IV Congresso da Sociedade Portuguesa de Endodontologia.

Formação e análise do biofilme de *Enterococcus faecalis* em modelos 3D de dentes naturais

Margarida Macedo[1], Alejandro Perez[2], João Neves[1], Lucinda J. Bessa[1,3]

[1] Instituto Universitário Egas Moniz, Egas Moniz School of Health & Science, Almada, Portugal

[2] Departamento de Endodoncia, Rey Juan Carlos Universidad, Madrid, Espanha

[3] Egas Moniz Research for Interdisciplinary Research (CiiEM), Egas Moniz School of Health & Science, Almada, Portugal

Objetivos: Pretendeu-se implementar e otimizar protocolos para 1) testar a formação de biofilme de *Enterococcus faecalis* em canais de molares modelo (3DsurpreenDente tooth, Portugal), e 2) quantificar e avaliar o biofilme formado. Posteriormente, os mesmos métodos serão usados para investigar diferentes técnicas irrigantes para eliminação do biofilme formado.

Metodologia: Utilizaram-se 4 molares modelos inferiores com 2 raízes e 3 canais (2 canais mesiais e 1 canal distal). Os canais foram instrumentados com o sistema de limas BlueShaper (Zarc, Espanha), irrigados com hipoclorito de sódio a 1% para remover *smear layer*, e, por fim, lavados com água destilada. A zona apical foi selada com verniz. Os dentes foram esterilizados com etanol 70% e irradiação UV. Os canais foram inoculados com *E. faecalis* ATCC 29212 em meio *Brain Heart Infusion* (BHI), preenchendo-se todo o canal radicular, seguindo-se incubação a 37℃, em aerobiose e 100% de humidade durante 21 dias. A cada 48 h foi adicionado BHI para preencher os canais.

Após 3 semanas, o biofilme formado foi recolhido de cada um dos canais, de acordo com protocolo previamente descrito [1], e quantificado através da contagem de unidades formadoras de colónias (UFC)/mL. Posteriormente, a dois dentes cortaram-se os canais mesiais na zona do istmo com recurso a uma broca troncocónica 012 diamantada, e foi avaliada a presença e viabilidade de bactérias nessa zona por microscopia de fluorescência após coloração Live/Dead.

Resultados: Para os 4 dentes, a média ± desvio padrão de $\log_{10}$ UFC/mL obtida foi de 6.08 ± 0.22, o que demostra que houve formação de biofilme. Contudo, nem todo o biofilme foi completamente recolhido, uma vez que, após visualização microscópica se verificou a presença de bactérias na zona do istmo, com aproximadamente 50% de viabilidade.

Discussão e Conclusões: Embora a contagem de UFC seja um método tradicional, apresenta limitações significativas. Uma delas prende-se com a dificuldade em recolher todo o biofilme, como evidenciado nos nossos resultados. Portanto, é essencial complementar a análise e quantificação do biofilme com outros métodos, como por exemplo a microscopia de fluorescência.

Referência Bibliográfica: [1] Maden M, et al. (2017). https://doi.org/10.1371/journal.pone.0183895

Anexo II. Poster a apresentar no IV Congresso da Sociedade Portuguesa de Endodontologia (dia 27 e 28 de Setembro de 2024, em Guimarães).

EGAS MONIZ SCHOOL of HEALTH & SCIENCE

IV° CONGRESSO SOCIEDADE PORTUGUESA DE ENDODONTOLOGIA

Formação e análise do biofilme de *Enterococcus faecalis* em modelos 3D de dentes naturais

Margarida Macedo [1], Alejandro Perez [2], João Neves [1,3], Lucinda J. Bessa[1,3]

[1] Instituto Universitário Egas Moniz, Egas Moniz School of Health & Science, Almada, Portugal; [2] Departamento de Endodoncia, Rey Juan Carlos Universidad, Madrid, Espanha; [3] Egas Moniz Research for Interdisciplinary Research (CiiEM), Egas Moniz School of Health & Science, Almada, Portugal

E-mail: margaridacomba@hotmail.com

Introdução: Os avanços na microbiologia têm elucidado a natureza complexa da microbiota associada às infeções endodônticas (Chávez de Paz, 2015). Estudos indicam que essa microbiota, e principalmente as bactérias, está organizada estruturalmente em biofilmes, que aderem às paredes do canal radicular (Olsen, 2015; Siqueira & Rôças, 2022).

Objetivo: Com este estudo pretendeu-se implementar e otimizar protocolos para testar a formação de biofilme de *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*) em canais de molares inferiores modelo (3DsurpreenDente tooth, Portugal) e quantificar e avaliar o biofilme formado. Posteriormente, os mesmos métodos serão usados para investigar e comparar diferentes técnicas irrigantes para eliminação do biofilme formado.

MATERIAIS E MÉTODOS:

Preparação dos modelos 3D:

No estudo utilizaram-se 4 modelos 3D de molares inferiores (3DsurpreenDente tooth, Portugal) com 2 raízes e 3 canais (2 canais mesiais e 1 canal distal) (Figura 1).

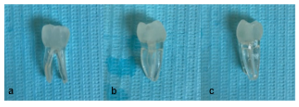


Figura 1: *Modelo 3D de molar inferior com 2 canais mesiais e 1 canal distal (3DsurpreenDente tooth, Portugal), vista a) vestibular, b) mesial e c) distal.*

Para padronização, as coroas foram cortadas até ao nível da junção amelocementária (JAC).

Os canais foram instrumentados com o sistema de limas BlueShaper (Zarc, Espanha) até Z4 a comprimento de trabalho (CT), definido como 1 mm a menos do comprimento total dos canais. Entre limas, os canais foram irrigados com NaOCl a 1% e lavados com água destilada. Para selar o ápice, aplicaram-se duas camadas de verniz na zona apical da superfície externa dos molares (Figura2).

Figura 2*: a), b) Material endodôntico utilizado para a instrumentação dos canais dos molares modelo c) Modelo 3D de molar inferior com a coroa cortada ao nível da JAC.*

Esterilização dos modelos 3D:

Preencheu-se cada canal com etanol 70% (tempo de atuação 20min) → Numa placa de Petri, os dentes foram invertidos com a abertura dos canais para baixo → Exposição à luz ultravioleta (UV) durante 1 h (Figura 3). → Numa placa de 96 poços, colocaram-se os dentes com abertura dos canais para cima → Verificação da esterilidade: incubou-se a 37°C no meio de cultura, BHI, durante 24 h

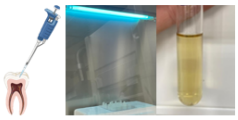


Figura 3: a. *Ilustração do preenchimento dos canais com etanol 70%;* ***b.*** *Molares invertidos submetidos a luz UV,* ***c.*** *Meio BHI sem turvação*

Inoculação dos modelos 3D com *E. faecalis* e formação de biofilme:

O inóculo de *E. faecalis* ATCC 29212 foi preparado em meio de BHI a partir de colónias com menos de 24 h, previamente cultivadas em meio TSA (HiMedia laboratories, India), e padronizado com base na leitura da densidade ótica a 600 nm (OD_{600}) ajustada a 0,1 (Figura 4). Com uma micropipeta adicionou-se o inóculo até preencher todo o canal radicular, sem transbordar (aproximadamente 20 µL no canal distal e 10 µL em cada canal mesial) (Figura 5).

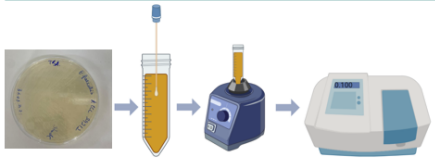
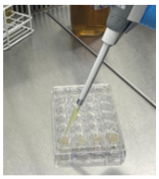


Figura 4: *Ilustração esquemática da preparação do inóculo de E. faecalis*



Os dentes modelo foram incubados a 37°C em aerobiose e humidade 100% durante 22 dias. De 48 h em 48 h foi adicionado novo meio BHI, até preencher os canais radiculares sem transbordar.

Figura 5: *Preenchimento dos canais com o inóculo de E. faecalis*

Recolha e quantificação do biofilme:

Para recolha do biofilme formado nos canais seguiu-se o protocolo descrito por Maden et al. (2017) e a seguir detalhado na Figura 6.

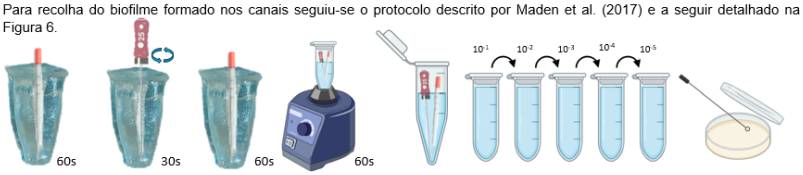


Figura 6: *Recolha do biofilme de E. faecalis:* foram utilizados 2 cones de papel estéril ISO #25 e uma lima Hedstroem estéril ISO #25 em cada canal. Os cones de papel e a lima de cada molar foram transferidos para o mesmo tubo respetivo contendo 1 mL de solução salina tamponada com fosfato (PBS) 1×. Foram realizadas diluições seriadas decimais em PBS 1×, (diluições de 10^{-1} até 10^{-5}). 100 µL de cada diluição foram transferidos para meio de Mueller-HInton agar. Utilizou-se a técnica de plaqueamento por espalhamento. Após incubação durante 24 h a 37°C, as colónias de *E. faecalis* foram contadas e, de seguida, foram calculados os valores de unidades formadoras de colónias (UFC)/mL.

RESULTADOS:

Para os quatro dentes, a média ± desvio padrão de $\log_{10}$ UFC/mL obtida foi de 6.08 ± 0.22, o que demostra que houve formação de biofilme nos canais dos quatro dentes modelo testados (Tabela 1). E além disso, o baixo valor de desvio padrão, mostra similaridade na formação e quantificação do biofilme nos quatro molares modelo testados.

Tabela 1: *Valores de UFC/mL (e log10 UFC/mL) obtidos do biofilme de E. faecalis recolhido dos canais de cada um dos quatro modelos 3D de molares inferiores.*

Modelo 3D de molar inferior	1	2	3	4	Média	Desvio padrão
UFC/mL	$1{,}00 \times 10^6$	$1{,}61 \times 10^6$	$6{,}30 \times 10^5$	$2{,}00 \times 10^6$	$1{,}31 \times 10^6$	$6{,}12 \times 10^5$
$\log_{10}$ UFC/mL	6,00	6,21	5,80	6,30	6,08	0,22

Conclusão: Os resultados da contagem de UFC/ml confirmam que houve formação de biofilme nos canais. No entanto, este método, apesar de tradicional, tem limitações relevantes. Uma dessas limitações é a dificuldade em recolher todo o biofilme, nomeadamente da zona do istmo. Por isso, é crucial complementar a análise e quantificação do biofilme com outros métodos, como por exemplo por microscopia de fluorescência.

Referências Bibliográficas:

Chávez de Paz, L.E. (2015). "Microbial Biofilms in Endodontics", In Endodontic Irrigation: Chemical Disinfection of the Root Canal System, Ed: Betina Basrani vol.1, pp.1-11 Publisher: Springer.

Maden M, Ertuğrul IF, Orhan EO, Erik CE, Yetiş CÇ, et al. (2017) Correction: Enhancing antibacterial effect of sodium hypochlorite by low electric current-assisted sonic agitation. PLOS ONE 12(11): e0188672. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0188672

Olsen I. (2015). Biofilm-specific antibiotic tolerance and resistance. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases : official publication of the European Society of Clinical Microbiology*, *34*(5), 877–886. https://doi.org/10.1007/s10096-015-2323-z

Siqueira, J. F., Jr. & Rôças, I. N. (2022). Present status and future directions: Microbiology of endodontic infections. *International endodontic journal*, *55 Suppl 3*, 512–530. https://doi.org/10.1111/iej.13677

Financiamento: Os autores agradecem à FCT/MCTES pelo apoio financeiro ao CiiEM (10.54499/UIDB/04585/2020) através de fundos nacionais.