



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

**MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA**

**ESTUDO IN VITRO DA CAPACIDADE ANTIMICROBIANA DE DOIS CIMENTOS  
ENDODÔNTICOS MODIFICADOS COM CLORHEXIDINA MEDIANTE TESTE DE  
CONTATO DIRETO**

Trabalho submetido por  
**Nuno Miguel Belo Gonçalves**  
para a obtenção do grau de Mestre em Medicina Dentária

**Outubro de 2015**



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

## **MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA**

### **ESTUDO IN VITRO DA CAPACIDADE ANTIMICROBIANA DE DOIS CIMENTOS ENDODÔNTICOS MODIFICADOS COM CLORHEXIDINA MEDIANTE TESTE DE CONTACTO DIRETO**

Trabalho submetido por  
**Nuno Miguel Belo Gonçalves**  
para a obtenção do grau de Mestre em Medicina Dentária

Trabalho orientado por  
**Prof. Doutor Diego António Velázquez González**  
e coorientado por  
**Prof. Doutora Maria Guilhermina Martins Moutinho**

**Outubro de 2015**



## **Agradecimentos**

Ao meu orientador, o Professor Doutor Diego Ant3nio Gonz3lez, pela orienta33o, ajuda e disponibilidade sempre quando necess3ria na elabora33o deste trabalho, pelo seu interesse e pela sua capacidade de me fazer gostar ainda mais deste mundo que 3 a Endodontia.

À minha coorientadora, a Professora Doutora Maria Guilhermina Moutinho, pela ajuda, apoio, e motiva33o sempre presentes. Agradeço a ajuda na elabora33o do protocolo para que a experi3ncia fosse poss3vel.

Ao Doutor Lu3s Proença, pelo aux3lio no tratamento estat3stico dos dados do estudo.

Ao Professor Doutor Jos3 Martins dos Santos e à Cooperativa de Ensino Egas Moniz, por todos os meios disponibilizados para a realiza33o este trabalho.

À Universidade Cat3lica do Porto, pelo acolhimento que me proporcionaram na minha desloca33o com o intuito de tirar d3vidas acerca do protocolo experimental.

Às funcion3rias do laborat3rio de microbiologia do Instituto Superior de Ci3ncias da Sa3de Egas Moniz, com quem passei tantas horas, que sempre me apoiaram e motivaram nos momentos mais cr3ticos da fase experimental do trabalho.

À minha fam3lia, o meu pai Gonçalo, a minha m3e Ana Paula, o meu irm3o Lu3s e a minha av3 Maria de Lurdes, e aos meus av3s que j3 n3o estando presentes, aqui deixo uma sauda33o muito especial.

À minha namorada, Maria In3s, pela compreens3o com que sempre me aconselhou e me apoiou em todas as decis3es que tomei.

A todos os meus amigos, colegas e professores que me acompanharam ao longo desta etapa crucial da vida, pelo conhecimento transmitido, pela força que me deram e pela amizade que nunca falhou, em qualquer momento.



## Resumo

**Objetivo:** avaliar *in vitro* a capacidade antimicrobiana de dois cimentos endodônticos com e sem a incorporação de digluconato de clorhexidina a 2% e 3% sobre dois microrganismos.

**Materiais e Métodos:** foi medida a absorvância, em nanómetros, mediante o teste de contacto direto, da capacidade antimicrobiana dos cimentos endodônticos AH Plus<sup>®</sup> e MTA Fillapex<sup>®</sup>, com e sem a incorporação de digluconato de clorhexidina a 2% e 3%, organizados em seis grupos, e com as variáveis de: envelhecimento em quatro períodos de tempo; e tempo de contacto em quatro períodos, frente aos microrganismos *Candida albicans* e *Enterococcus faecalis*. Os resultados foram analisados estatisticamente no programa IBM SPSS Statistics 23.0 (para Windows) com os testes ANOVA one-way com correção de Brown-Forsythe e testes post-Hoc Tamhane e Dunnett. O nível de significância foi  $p < 0,05$ .

**Resultados:** analisando: por grupos; por grupos e por microrganismo, o menor valor foi conseguido pelo grupo 6; por tempo de envelhecimento para cada microrganismo, o menor valor foi encontrado às 24 horas na *Candida albicans* e 72 horas no *Enterococcus faecalis*; por tempo de envelhecimento por grupo para cada microrganismo, o menor valor foi conseguido pelo grupo 6 às 72 horas, para os dois microrganismos; por tempo de contacto para cada microrganismo, o menor valor foi às 0 horas para ambos os microrganismos; por tempo de contacto por grupo para cada microrganismo, o menor valor foi do grupo 6 às 0 horas na *Candida albicans*, e o grupo 6, tal como o grupo 1 às 0 horas, no *Enterococcus faecalis*.

**Conclusões:** a incorporação de uma maior concentração de digluconato de clorhexidina aumenta a capacidade antimicrobiana. O cimento MTA Fillapex com a adição de digluconato de clorhexidina a 3%, foi o que apresentou maior efeito antimicrobiano frente aos dois microrganismos.

**Palavras-chave:** AH Plus, capacidade antimicrobiana, clorhexidina, MTA Fillapex.

## **Abstract**

**Aim:** evaluate the *in vitro* antimicrobial capacity of two sealers with and without the incorporation of chlorhexidine digluconate 2% and 3% over two microorganisms.

**Materials and Methods:** the absorbance, in nanometers, was measured through the direct contact test, of the antimicrobial capacity of the endodontic sealers AH Plus<sup>®</sup> and MTA Fillapex<sup>®</sup>, with and without the incorporation of chlorhexidine digluconate at 2% and 3%, organized into six groups, and with aging variables in four periods of time; and contact time for four periods against microorganisms *Candida albicans* and *Enterococcus faecalis*. The results were statistically analyzed with IBM SPSS Statistics 23.0 software (for Windows) with one-way ANOVA tests with Brown-Forsythe correction and the post-hoc Tamhane and Dunnett tests. The level of significance was  $p < 0,05$ .

**Results:** analyzing: by groups; by groups and by the microorganism, the lowest value was achieved by the group 6; by aging time for each microorganism, the lowest value was found at 24 hours in case of *Candida albicans* and at 72 hours in case of *Enterococcus faecalis*; by aging time per group for each microorganism, the lowest value was achieved by the group 6 at 72 hours, for the two microorganisms; by contact time for each microorganism, the lowest value was at 0 hours for both microorganisms; by time of contact per group for each microorganism, the lowest value was achieved by the group 6 at 0 hours in case of *Candida albicans*, and group 6, as the group 1 to 0 hours, in case of *Enterococcus faecalis*.

**Conclusions:** incorporating a higher concentration of chlorhexidine digluconate increases the antimicrobial capacity. The MTA Fillapex sealer with the addition of chlorhexidine digluconate 3% showed the greatest antimicrobial effect against the two microorganisms.

**Keywords:** AH Plus, antimicrobial capacity, chlorhexidine, MTA Fillapex

## Índice Geral

I – Introdução.....	15
1. A Endodontia – Enquadramento teórico.....	15
2. Infecção e microbiologia endodôntica.....	15
2.1. Métodos de recolha e identificação de espécies bacterianas em infecções endodônticas.....	15
2.2. Tipos de infecções endodônticas.....	16
2.2.1. Infecção intra-radicular primária.....	17
2.2.2. Infecção intra-radicular persistente ou secundária.....	18
2.2.3. Infecção extra-radicular.....	20
3. Organização bacteriana.....	20
4. Etapas do tratamento endodôntico.....	21
4.1. Diagnóstico.....	21
4.2. Preparação químico-mecânica do sistema de canais radiculares.....	22
4.2.1. A formação de smear layer.....	23
4.3. Irrigação e medicação intracanal.....	24
4.3.1 Hipoclorito de Sódio.....	25
4.3.2 Clorhexidina.....	27
4.3.3. Ácido etilenodiaminotetracético.....	29
4.3.4. Medicação intracanal.....	30
4.4. Obturação.....	31
4.4.1. Materiais centrais de obturação.....	32
4.4.1.1. Gutta-Percha.....	32
4.4.1.2. Pontas de prata.....	33
4.4.1.3. Materiais à base de resina.....	33
4.4.2. Cimentos endodônticos.....	34
4.4.2.1. Propriedades de um cimento obturador de canais ideal.....	35
4.4.2.2. Cimento endodôntico Ah Plus®.....	35
4.4.2.3. Cimento endodôntico MTA Fillapex®.....	35
4.4.3. Incorporação de antimicrobianos nos cimentos endodônticos.....	36
4.4.4 Técnicas de obturação.....	38

4.5. Restauração definitiva.....	38
5. Importância do estudo.....	39
6. Objetivos do trabalho.....	40
6.1. Objetivos gerais.....	40
6.2. Objetivos específicos.....	40
7. Hipóteses do trabalho.....	41
II – Materiais e Métodos.....	43
1. Fontes bibliográficas.....	43
2. Considerações éticas.....	43
3. Local do estudo.....	43
4. Lista de materiais utilizados, por ordem alfabética.....	44
5. Procedimento.....	45
5.1. Preparação dos microrganismos.....	45
5.2. Manipulação dos materiais utilizados no estudo.....	46
5.2.1. Cimentos endodônticos.....	46
5.2.2. Digluconato de Clorhexidina.....	48
5.3 Grupos de estudo.....	48
5.4 Distribuição das placas e variáveis de estudo.....	49
6. Teste de Contacto Direto.....	51
7. Critérios de avaliação.....	54
8. Base de dados para o registo.....	56
9. Análise estatística.....	56
III – Resultados.....	57
1. Análise por grupos.....	57
2. Análise por grupo por microrganismo.....	58
3. Análise por tempo de envelhecimento.....	61
3.1. Análise do tempo de envelhecimento para cada microrganismo.....	61
3.2. Análise do tempo de envelhecimento por grupo para cada microrganismo.....	62
4. Análise por tempo de contacto.....	66
4.1. Análise por tempo de contacto para cada microrganismo.....	66
4.2. Análise por tempo de contacto por grupo para cada microrganismo.....	68
IV – Discussão.....	73
V – Conclusões.....	89

VI – Bibliografía.....	93
VII – Anexos.....	99

## Índice de Figuras

Figura 1 – Placa de cultura contendo <i>Candida albicans</i> .....	45
Figura 2 – A) Placa de cultura contendo <i>Enterococcus faecalis</i> ; B) Aparelho Densimat™ apresentando o valor 0,5 da escala de McFarland.....	46
Figura 3 – Cimentos utilizados no estudo: A) Cimento AH Plus Jet® B) Cimento MTA Fillapex®, pasta catalisadora e pasta base.....	46
Figura 4 – Pesagem dos cimentos a testar, consoante a adição de clorhexidina.....	48
Figura 5 – A) Digluconato de clorhexidina a 20%. B) Pasta B do cimento AH Plus Jet, digluconato de clorhexidina, e pasta A do cimento AH Plus Jet, antes da mistura.....	48
Figura 6 – Organização esquemática da divisão de uma microplaca de 96 poços em 8 grupos.....	49
Figura 7 – A) Microplaca preenchida com os cimentos a testar, antes da incorporação dos microrganismos e do meio BHI. B) Pormenor de uma fila da microplaca, a demonstrar que não houve preenchimento do fundo do poço.....	52
Figura 8 – Pormenor do microrganismo em contacto com o cimento a testar.....	52
Figura 9 – A) Microplaca preenchida com os cimentos a testar, com os microrganismos e com o meio BHI nos respetivos poços. B) Ampliação de uma zona da microplaca.....	53
Figura 10 – Microplaca no agitador de placas.....	53
Figura 11 – A) Microplacas na estufa. B) Leitor de microplacas Platos R496 apresentando os resultados da medição.....	54
Figura 12 – Valores médios de absorvância (nm) o microrganismo <i>Candida albicans</i> , durante o tempo de estudo.....	55
Figura 13 – Valores médios de absorvância (nm) para o microrganismo <i>Enterococcus faecalis</i> , durante o tempo de estudo.....	55
Figura 14 – Distribuição dos valores médios de absorvância (nm) para os grupos de estudo e para os dois microrganismos.....	58

Figura 15 – Distribuição dos valores médios de absorvância (nm) por grupo para microrganismo <i>Candida albicans</i> .....	59
Figura 16 – Distribuição dos valores médios de absorvância (nm) por grupo para o microrganismo <i>Enterococcus faecalis</i> .....	60
Figura 17 – Distribuição dos valores médios de absorvância (nm) por tempo de envelhecimento, para o microrganismo <i>Candida albicans</i> .....	61
Figura 18 – Distribuição dos valores médios de absorvância (nm) por tempo de envelhecimento, para o microrganismo <i>Enterococcus faecalis</i> .....	62
Figura 19 – Distribuição dos valores médios de absorvância (nm) para os diferentes grupos nos quatro tempos de envelhecimento estudados, para o microrganismo <i>Candida albicans</i> .....	64
Figura 20 – Distribuição dos valores médios de absorvância (nm) para os diferentes grupos nos quatro tempos de envelhecimento estudados, para o microrganismo <i>Enterococcus faecalis</i> .....	66
Figura 21 – Distribuição dos valores médios de absorvância (nm) por tempo de contacto, para o microrganismo <i>Candida albicans</i> .....	67
Figura 22 – Distribuição dos valores médios de absorvância (nm) por tempo de contacto, para o microrganismo <i>Enterococcus faecalis</i> .....	68
Figura 23 – Distribuição dos valores médios de absorvância (nm) para todos os grupos, por tempo de contacto, para o microrganismo <i>Candida albicans</i> .....	70
Figura 24 – Distribuição dos valores médios de absorvância (nm) para todos os grupos, por tempo de contacto, para o microrganismo <i>Enterococcus faecalis</i> .....	72

## Índice de Tabelas

Tabela 1 – Características de um irrigante endodôntico ideal.....	25
Tabela 2 – Requisitos de um cimento endodôntico ideal.....	35
Tabela 3 – Composição, lote, validade e fabricante dos dois cimentos endodônticos utilizados no estudo.....	47
Tabela 4 – Valores médios de absorvância em nanómetros (nm) e intervalos de confiança para os grupos de estudo.....	58
Tabela 5 – Valores médios de absorvância (nm) e intervalos de confiança, entre os grupos de estudo, para o microrganismo <i>Candida albicans</i> .....	59
Tabela 6 – Valores médios de absorvância (nm) e intervalos de confiança entre os grupos de estudo, para o microrganismo <i>Enterococcus faecalis</i> .....	60
Tabela 7 – Valores médios de absorvância (nm) e intervalos de confiança por tempo de envelhecimento, para o microrganismo <i>Candida albicans</i> .....	61
Tabela 8 – Valores médios de absorvância (nm) e intervalos de confiança por tempo de envelhecimento, para o microrganismo <i>Enterococcus faecalis</i> .....	62
Tabela 9 – Valores médios de absorvância (nm) e intervalos de confiança para os diferentes grupos nos quatro tempos de envelhecimento estudados, para o microrganismo <i>Candida albicans</i> .....	63
Tabela 10 – Valores médios de absorvância (nm) e intervalos de confiança para todos os grupos nos quatro tempos de envelhecimento estudados, para o microrganismo <i>Enterococcus faecalis</i> .....	65
Tabela 11 – Valores médios de absorvância (nm) e intervalos de confiança por tempo de contacto, para o microrganismo <i>Candida albicans</i> .....	66
Tabela 12 – Valores médios de absorvância (nm) e intervalos de confiança por tempo de contacto, para o microrganismo <i>Enterococcus faecalis</i> .....	67

Tabela 13 – Valores médios de absorvância (nm) e intervalos de confiança para todos os grupos, por tempo de contacto, para o microrganismo *Candida albicans*.....69

Tabela 14 – Valores médios de absorvância (nm) e intervalos de confiança para todos os grupos, por tempo de contacto, para o microrganismo *Enterococcus faecalis*.....71

## **Lista de abreviaturas**

°C – Grau Celcius

ADN – Ácido Desoxirribonucleico

ADT – Teste de Difusão em Ágar

ATCC – American Type Culture Collection

BHI – Meio Brain Heart Infusion Broth

CHX – Clorhexidina

DCT – Teste de Contacto Direto

EDTA – Ácido etilenodiaminotetracético

µl – Microlitro

µm – Micrómetro

mg – Miligrama

ml – Mililitro

MTA – Agregado Trióxido Mineral

Ni-Ti – Níquel-Titânio

nm – Nanómetros

PBS – Solução tampão fosfato salino

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase

SAF – Self-Adjusting File

TSA – Meio Trypticase Soy Agar

UFC – Unidades Formadoras de Colónias

## **I – INTRODUÇÃO**

### **1. A Endodontia – Enquadramento teórico**

De acordo com a Associação Americana de Endodontistas: “A endodontia é a área da medicina dentária que estuda a morfologia, fisiologia e patologia da polpa dentária humana e tecidos periradiculares. O seu estudo e prática englobam as ciências básicas e clínicas, incluindo a biologia da polpa normal e a etiologia, diagnóstico, prevenção e o tratamento de doenças e lesões da polpa, bem como de condições periradiculares associadas.”(Eleazer, Glickman, McClanahan, Webb, & Justman, 2012).

A tríade constituída pela preparação químico-mecânica do canal, o controlo microbiano e a completa obturação tridimensional do canal radicular para evitar reinfecções, é a base do tratamento endodôntico (Krasner, Rankow, & Abrams, 2010).

O tratamento endodôntico bem-sucedido depende do desbridamento completo do tecido pulpar, de detritos de dentina, de microrganismos infecciosos e dos seus produtos metabólicos presentes no sistema de canais radiculares, a fim de esterilizar os canais. No entanto, a complexa anatomia canalar em alguns casos é um obstáculo para atingir este fim, mesmo com os instrumentos, substâncias e técnicas mais adequadas à disposição do médico dentista. Assim sendo, as populações de microrganismos devem ser reduzidas para um nível abaixo ao necessário para induzir ou manter a doença e, se possível, criar um ambiente no qual o organismo se consiga curar por si próprio (Shen *et al.*, 2012).

Em estudos e revisões recentes, após o tratamento endodôntico, foram relatados resultados favoráveis com valores de 85% a 95% (Shen & Cheung, 2013). De acordo com Tennert *et al.*, 2014, a principal causa de insucesso do tratamento endodôntico é a persistência de microrganismos no sistema de canais radiculares.

### **2. Infecção e microbiologia endodôntica**

#### **2.1. Métodos de recolha e identificação de espécies bacterianas em infeções endodônticas**

Pouco depois de ter inventado o seu microscópio em 1684, Anton van Leeuwenhoek começou a observar microrganismos relacionados com a cárie dentária. Em 1890, Miller foi o primeiro a observar microrganismos associados à polpa, que causavam infeções.

Em 1965, Kakeshi demonstrou, através de estudos com ratos, que a necrose pulpar e o desenvolvimento de lesões periapicais só aconteciam devido à exposição pulpar na cavidade oral com flora normal, não esterilizada. As investigações foram ocorrendo utilizando a microscopia, técnicas de cultura com isolamento, crescimento e identificação laboratorial de acordo com a morfologia dos microrganismos, e testes bioquímicos (Baumgartner, 2004). No entanto, com o avanço da tecnologia de diagnóstico molecular, a utilização da reação em cadeia da polimerase (PCR), a hibridação do ácido desoxirribonucleico (ADN), a hibridação *in situ* fluorescente ou a pirosequenciação do ADN, trouxeram como vantagens a rapidez e a precisão, sendo técnicas fidedignas para fornecer dados quantitativos de populações bacterianas (C. Zhang, Du, & Peng, 2015). O objetivo do tratamento endodôntico é reduzir as populações bacterianas a níveis não detetados em métodos de cultura ( $< 10^3 - 10^4$  células) (Siqueira Jr & Rôças, 2008).

Os métodos de diagnóstico molecular têm permitido a detecção de algumas espécies cultiváveis em dentes endodonciados com infecções após o tratamento, com valores de prevalência maiores do que através de métodos de cultura. Isto confirmou e reforçou a associação destas espécies bacterianas com a etiologia da periodontite apical persistente (Lins *et al.*, 2013). Pode-se concluir também que a sua prevalência varia consoante o tipo de doença pulpar e periapical.

## **2.2. Tipos de infecções endodônticas**

A cavidade oral humana é colonizada por microrganismos nos quais se incluem vírus, protozoários, *archaea*, fungos e bactérias, numa relação simbiótica, podendo denominar-se assim ecossistema. As comunidades bacterianas encontradas na boca são bastante complexas e podem chegar até 1000 espécies diferentes, sendo este o segundo local mais povoado de microrganismos, após o cólon (Baumgartner, 2004; Wade, 2013).

Mais de 400 espécies microbianas diferentes têm sido identificadas em amostras de dentes com diferentes tipos de periodontite apical. A grande variabilidade inter-individual faz com que, em amostras a partir da mesma doença clínica, se encontrem diferentes composições de comunidades bacterianas (Tennert *et al.*, 2014). Por causa destas características, as infecções endodônticas devem ser tratadas utilizando uma estratégia antibacteriana de largo-espectro (Siqueira Jr & Rôças, 2008).

As bactérias anaeróbias têm sido desde há muito reconhecidas como o principal agente etiológico no desenvolvimento de lesões pulpares e periapicais (Basrani & Haapasalo, 2012), sendo a periodontite apical uma doença inflamatória causada por uma infeção microbiana no sistema de canais radiculares. Esta pode classificar-se em intra-radicular primária ou intra-radicular persistente/ secundária, consoante se verifique em dentes sem tratamento endodôntico prévio, no caso da primária, ou não, no caso da persistente/ secundária, e quer numa quer noutra encontramos diferentes microrganismos (Siqueira Jr & Rôças, 2011, 2014).

Uma infeção localizada além dos limites do sistema de canais radiculares, quer sob a forma de um biofilme ligado à superfície externa da raiz, quer como colónias coesas presentes no interior da lesão inflamatória, pode ser responsável por uma periodontite apical pós-tratamento em alguns casos, denominando-se assim infeção extra-radicular (Ricucci, Siqueira Jr, Lopes, Vieira, & Rôças, 2015).

As vias possíveis de penetração de microrganismos nos canais são através de: dentina exposta devido a cáries ou cracks; gaps nas margens de restaurações defeituosas ou mal efetuadas; fraturas dentárias ou fraturas em restaurações; um tratamento endodôntico mal realizado; forâmen apical ou forâmens laterais que tenham sido expostos a organismos como resultado de trauma; bolsas periodontais profundas, resultantes de doenças periodontais avançadas. Das suprarreferidas, as vias mais comuns são as cáries, cracks e margens de restaurações (Abbott, 2011; Tennert *et al.*, 2014; C. Zhang *et al.*, 2015).

### **2.2.1. Infeção intra-radicular primária**

A progressiva infeção da dentina no caso de existir uma cárie leva eventualmente a que ocorram micro-abcessos na polpa, juntamente com a degradação de tecidos, mediada por enzimas proteolíticas. Parece haver um consenso já desde há algum tempo de que, à medida que a lesão de cárie progride pela dentina próxima da polpa, os microrganismos infiltram-se nela, podendo provocar uma infeção primária (Zehnder & Guggenheim, 2009).

Nas infeções primárias podem ser encontradas cerca de 10 a 30 espécies de microrganismos por canal, podendo até em alguns casos co-existirem mais espécies, e uma carga bacteriana de  $10^3$  a  $10^8$  células por canal infetado, variando consoante as infeções sejam sintomáticas ou não, sendo que quando assintomática, apresenta-se com

um valor maior. Entre as espécies mais prevalentes encontram-se as bactérias anaeróbias Gram-negativas e pigmentadas de preto (*Prevotellas* e *Porphyromonas*), *Fusobacterium nucleatum*, *Streptococcus*, espiroquetas (*Treponemas*), *Dialister*, *Pseudoramibacter alactolyticus*, *Propionibacterium*, *Parviromonas micra*, *Tannerella forsythia*, *Filifactor alocis*, *Eubacterium*, *Enterococcus faecalis* e *Olsenella* (Sassone *et al.*, 2008).

### **2.2.2. Infecção intra-radicular persistente ou secundária**

Ainda não está bem comprovado se as bactérias presentes em dentes endodonciados que apresentam infecções após o tratamento permanecem desde o tratamento anterior (infecção persistente) ou se são uma consequência da reinfeção (infecção secundária). Como a incidência de infecções após o tratamento é significativamente maior em casos que já apresentavam lesões de periodontite apical, pode-se inferir que as infecções persistentes são a maior causa da falha do tratamento endodôntico (Siqueira Jr & Rôças, 2008).

Na maioria dos canais de dentes endodonciados que apresentem lesões de periodontite apical é encontrada infecção intra-radicular. Está comprovado que há um risco acrescido de obter um pior resultado no tratamento quando existem microrganismos presentes no canal aquando a obturação. As bactérias Gram-positivas e os anaeróbios facultativos são as espécies mais frequentemente identificadas nos canais já submetidos a tratamento endodôntico, destacando-se o *Enterococcus faecalis*, com valores de prevalência que podem chegar aos 90% em alguns casos. Siqueira Jr e Rôças citam que nos canais de dentes com infecção pós-tratamento existe uma probabilidade 9 vezes superior de encontrar esta bactéria do que em canais com infecção primária (Siqueira Jr & Rôças, 2014).

O *Enterococcus faecalis* é uma bactéria do género *Enterococcus*, apresenta metabolismo fermentativo, é um anaeróbio facultativo, e um coccus Gram-positivo que não forma endósporos, também pode ser encontrada em infecções primárias de periodontite periapical crónica (C. Zhang *et al.*, 2015). Existe como comensal na cavidade oral e no trato gastro-intestinal e genito-urinário dos humanos apesar de, em certas situações, poder ser um agente patogénico oportunista, causando várias infecções, tais como a endocardite e bacterémia nosocomial (Lins *et al.*, 2013). Pensa-se que entra no nosso organismo por estar presente em vários alimentos (Zehnder & Guggenheim, 2009). Esta bactéria consegue sobreviver nos túbulos dentinários mesmo sob condições adversas tais como a irrigação e a medicação intracanal, e facilmente ganha resistência a antibióticos.

Possui ainda variados fatores de virulência, tais como as substâncias de agregação, adesinas, ácido lipoteicóico e hialuronidase para a colonização, aderência, invasão e inflamação. Pode ser encontrado em monoculturas ou em comunidades de biofilme, aumentando a sua resistência (Cord *et al.*, 2014; Park, Yang, Kim, Yun, & Han, 2015; Tennert *et al.*, 2014).

Zhang *et al.*, 2015 reportam que o *Enterococcus faecalis* está presente na saliva, com taxas de detecção entre 18,8% a 40,5%, e que pacientes que apresentem periodontite têm valores mais elevados desta bactéria do que pacientes com saúde periodontal, pelo que o tratamento periodontal para controlar a infecção, e sobretudo a utilização de isolamento absoluto com dique de borracha para impedir a contaminação de saliva para o interior dos canais, reduzem a taxa de insucesso do tratamento endodôntico. Outra possível origem deste microrganismo é em polpas necróticas que não foram corretamente eliminadas durante o tratamento endodôntico. O facto de este microrganismo apresentar resistência ao meio alcalino com um pH de 9,0-10,0 do hidróxido de cálcio, deve-se à sua bomba transportadora de prótons que os conduz para o interior do seu citoplasma e o acidifica, permitindo a sobrevivência ao suposto efeito antimicrobiano deste medicamento intracanal.

A variedade de espécies microbianas encontradas após um tratamento endodôntico falhado é menor quando comparada às encontradas em dentes não submetidos a tratamento endodôntico. Outras espécies encontradas em comunidades bacterianas associadas às infecções pós-tratamento são *Streptococcus*, *Pseudoramibacter alactolyticus*, *Propionibacterium*, *Parvimonas micra*, *Filifactor alocis* e *Dialister*, além de outras espécies ainda não identificadas, correspondendo a 55% da taxa detetada (Siqueira Jr & Rôças, 2014).

As espécies de *Candida* podem ser encontradas como parte da microbiota normal da pele, boca e trato gastro-intestinal, sendo as mais comuns quando existem infecções fúngicas nos humanos, e com taxas que variam entre os 30% e os 45% em indivíduos saudáveis e 95% em indivíduos imunocomprometidos. A *Candida albicans* é o fungo mais frequentemente encontrado na cavidade oral e em canais radiculares com infecção secundária. Este microrganismo pode ser encontrado em 3% a 18% dos casos (Rôças, Hülsmann, & Siqueira Jr, 2008). Tem a capacidade de sobreviver e adaptar-se em ambientes com poucos nutrientes, coagregar-se com bactérias, apresentar dimorfismo sob

a forma de blastosporo ou apresentar hifas (fator de virulência), produzir enzimas hidrolíticas, aderir-se à dentina, formar biofilmes e modular a resposta imune do hospedeiro de modo a proliferar e provocar infeções (Lima *et al.*, 2015; Siqueira Jr, Rôças, Lopes, Elias, & de Uzeda, 2002). Baumgartner refere ainda que este microrganismo consegue ser mais resistente ao hipoclorito de sódio do que o *Enterococcus faecalis* (Baumgartner, Watts, & Xia, 2000), uma vez instalada no interior de túbulos dentinários, o que as torna intervenientes nas infeções persistentes (Turk, Ates, & Sen, 2008).

### **2.2.3. Infeção extra-radicular**

As lesões de periodontite apical formam-se em resposta às infeções intra-radulares e atuam como um obstáculo contra a disseminação da infeção para o osso alveolar e outros locais do organismo mas, em certas situações, esta barreira pode ser quebrada e os tecidos periradulares inflamados serem invadidos por microrganismos, resultando numa infeção extra-radicular. A forma mais comum de infeção extra-radicular é o abscesso apical agudo (Siqueira Jr & Rôças, 2014).

Apesar de ainda não existir evidência clara de que a infeção extra-radicular possa ter origem independente da infeção intra-radicular (Siqueira Jr & Rôças, 2014), existem casos em que a mesma persiste após a infeção proveniente do interior dos canais radulares, mas também pode no entanto ter uma origem dependente, como por exemplo devido à sobre-instrumentação que projeta tecido e restos de dentina infetados para os tecidos periradulares (Ricucci *et al.*, 2015).

Siqueira e Rôças defendem que no caso das infeções extra-radulares de origem independente, as principais bactérias implicadas são *Actinomyces* e *Propionibacterium propionicum*, provocando a actinomicose apical. Estas bactérias apresentam a capacidade de formar colónias bastante coesas no interior de lesões, evitando assim serem fagocitadas pelas células do sistema imunitário do hospedeiro (Siqueira Jr & Rôças, 2014).

## **3. Organização bacteriana**

As bactérias que se encontram presentes no interior dos canais radulares têm tendência a organizar-se e a crescer como biofilme, principalmente em dentes com periodontite apical crónica e em dentes já sujeitos a tratamento endodôntico. As bactérias planctónicas

são mais facilmente eliminadas pela irrigação e são também mais sensíveis aos irrigantes antibacterianos, como por exemplo o hipoclorito de sódio, do que as bactérias presentes em biofilme que não são tão suscetíveis a tais medidas, pelo facto de estarem bem aderidas à parede do canal, e em zonas inacessíveis aos irrigantes, não são eliminadas pela irrigação (Metzger, Solomonov, & Kfir, 2013).

Além disso, as bactérias que crescem em biofilme apresentam uma menor taxa metabólica e são normalmente mais resistentes às defesas do hospedeiro, a agentes antibacterianos tais como os antibióticos (Subramanian & Mickel, 2009), o hidróxido de cálcio ou a clorhexidina (CHX). Esta resistência pode dever-se ao facto da proteção das camadas exteriores de outras bactérias e da própria matriz do biofilme, que possui polímeros carregados negativamente que podem neutralizar agentes oxidantes fortes, tornando difícil a sua penetração para matar os microrganismos presentes, além do próprio ambiente competitivo do biofilme, que pode induzir alterações no fenótipo de certas bactérias e potenciar a transferência e troca de informação genética, levando à criação de estirpes resistentes (Siqueira Jr & Rôças, 2014). Estas propriedades do biofilme ajudam a explicar a natureza crónica e a resistência de algumas infeções endodônticas. Como tal, a simples irrigação do canal com uma solução antibacteriana, tal como o hipoclorito de sódio, que possui uma tensão superficial relativamente elevada, pode não ser suficientemente eficaz como o esperado na remoção destas bactérias do interior do canal. Subramanian & Mickel, 2009 sugerem que as bactérias sob a forma de biofilme são importantes para a persistência de uma infeção, enquanto as células planctónicas nos tecidos desempenham um papel da exacerbação da infeção associada a esse mesmo biofilme.

#### **4. Etapas do tratamento endodôntico**

##### **4.1. Diagnóstico**

O diagnóstico, depois da história clínica e da observação intra e extraoral, é uma parte fulcral do tratamento endodôntico, uma vez que a partir deste passo é que se define o plano de tratamento para o paciente.

De acordo com a European Society of Endodontology, 2006, a causa da queixa que o paciente apresenta deverá ser identificada através dos seguintes testes de diagnóstico: palpação, mobilidade, percussão, examinação periodontal, análise oclusal, sensibilidade e

vitalidade pulpar, possibilidade de fraturas dentárias, transiluminação, anestesia local seletiva, radiografias periapicais (sempre que possível com a técnica do paralelismo), alterações de coloração e fistulografias. Poderá ser preciso tirar radiografias com diversas angulações, bem como *bitewings* e radiografias de plano oclusal. Alguns pacientes deverão ser acompanhados em intervalos de tempo específicos para comparar a evolução do diagnóstico ou do tratamento.

#### **4.2. Preparação químico-mecânica do sistema de canais radiculares**

Após uma adequada abertura da câmara pulpar e remoção do teto da mesma, deve-se proceder à identificação de todos os canais e instrumentação dos mesmos.

Esta fase inclui a remoção de tecido orgânico vital e/ou necrótico do sistema de canais radiculares, juntamente com a dentina radicular infetada e, no caso de retratamento, de obstáculos metálicos e não metálicos (Hülsmann, Peters, & Dummer, 2005).

Destina-se a preparar o espaço canal, assumindo uma forma afunilada, com paredes lisas para facilitar a desinfeção por parte de irrigantes e medicamentos para eliminar os microrganismos e os seus produtos, preservar a integridade e a localização da anatomia apical, evitar danos iatrogénicos para o sistema de canais e estrutura radicular, facilitar a obturação, evitar prolongar a infeção do espaço periapical e preservar a dentina sã para permitir a função do dente a longo prazo (Hülsmann *et al.*, 2005; Shen & Cheung, 2013).

A preparação dos canais radiculares é realizada através da utilização de instrumentos endodônticos manuais, mecânicos, sónicos, ultrassónicos ou a laser e soluções irrigantes em condições o mais assépticas possível (Haapasalo & Shen, 2013; Hülsmann *et al.*, 2005; Shen & Cheung, 2013).

Há quase três décadas foram introduzidos os sistemas de níquel-titânio (Ni-Ti), mais flexíveis e elásticos, eliminando algumas complicações iatrogénicas causadas pelos instrumentos de aço em algumas situações (Haapasalo & Shen, 2013; Hülsmann, 2013; Saunders, 2005; Zhou, Peng, & Zheng, 2013).

A redução da infeção microbiana é conseguida principalmente através da instrumentação mecânica e da irrigação química (Haapasalo & Shen, 2013). A instrumentação mecânica por si só não consegue garantir um sistema de canais radiculares livre de bactérias (Mohammadi & Abbott, 2009).

Tem sido verificado que a completa instrumentação do canal é impossível de conseguir utilizando a tecnologia atual, mas essa dificuldade foi reduzida desde que foi desenvolvida a *self-adjusting file* (SAF), que permite uma maior percentagem de contacto com as paredes do canal. Hülsmann cita estudos que afirmam que 20-40% das paredes do canal não são instrumentadas, e com esta nova lima, a SAF, essa percentagem de dentina não instrumentada baixa para 8.6% (Hülsmann, 2013). A lima incorpora ainda um sistema de irrigação dentro da mesma, o que facilita a limpeza e eliminação de detritos de dentina (Haapasalo, Qian, & Shen, 2013). Esta desvantagem de a instrumentação não abranger toda a superfície do canal radicular faz com que em alguns locais do canal, os microrganismos continuem a proliferar, mantendo por vezes a infeção intracanal. Citando Shen *et al.*, 2012: “As superfícies não instrumentadas devem ser classificadas como contaminadas.”.

A sequência da instrumentação de *crown down* superou largamente o antigo método de *step back*. Esta sequência de preparação manual desde a porção coronal, na qual se faz um pré-alargamento até ao ápex, possui como vantagens: um menor risco de inoculação de microrganismos nos tecidos periradiculares, um melhor acesso para o irrigante no sistema de canais, menor risco de extrusão da solução irrigante e detritos, menor risco de alteração do comprimento de trabalho durante a instrumentação, melhor percepção tátil da constrição apical, melhor desempenho dos localizadores eletrónicos apicais e menor flexão dos instrumentos a nível coronal (Saunders, 2005).

Assim, a preparação do canal é uma fase essencial para a eliminação da infeção, prevenir o avanço da patologia periapical e promover a cura em casos onde a patologia já exista. A prevenção da reinfeção deverá ser depois conseguida através de um selamento hermético, tridimensional e impermeável dos canais e uma restauração coronal (Hülsmann *et al.*, 2005).

#### **4.2.1. A formação de *smear layer***

A *smear layer* é uma camada fina e amorfa de detritos com uma espessura de 0,2-5 micrómetros ( $\mu\text{m}$ ) que é formada sempre que uma lima endodôntica é utilizada para instrumentar uma parede de dentina mineralizada, no interior de um canal. É constituída por uma mistura de dentina mineralizada, pré-dentina, restos de tecido pulpar, proteínas e, no caso de canais infetados, pode ser também constituída por bactérias, fungos e até mesmo biofilme (Shen *et al.*, 2012).

Por vezes, a *smear layer* tapa os canalículos de dentina e pode chegar a ser empurrada para dentro dos mesmos até 40 µm, pelos instrumentos endodônticos e deve ser removida pelo facto de poder conter células microbianas e antigénios, principalmente nos dentes que apresentam lesões apicais; pelo facto de diminuir a penetração e consequentemente o efeito dos agentes desinfetantes na dentina e, por poder afetar a qualidade da obturação e a adesão do cimento à parede do canal (Haapasalo *et al.*, 2013; Hülsmann, 2013). De acordo com Zehnder, 2006, a presença de *smear layer* interfere com a adaptação dos cimentos endodônticos às paredes de dentina dos canais radiculares, podendo consequentemente provocar infiltrações microbianas.

Turk *et al.*, 2008 referem que a presença desta camada aumenta a aderência da *Candida albicans* na dentina, uma vez que é composta por uma parte orgânica (como por exemplo o colagénio tipo I) e uma parte inorgânica (como por exemplo o cálcio). A presença dos iões cálcio facilita a sua morfogénese e o potencial de adesão a proteínas da matriz extracelular de biofilme.

A *smear layer* pode também prevenir a entrada de cimento endodôntico nos túbulos dentinários, e a atividade antibacteriana de vários medicamentos pode ser inibida pela dentina, pela matriz de dentina e pelo colagénio presentes (Hoelscher, Bahcall, & Maki, 2006).

Tal como visto anteriormente, atualmente, é impossível erradicar a infeção intra-radicular apenas com a instrumentação mecânica, pelo que os irrigantes são necessários para completar esta tarefa.

### **4.3. Irrigação e medicação intracanal**

Durante o tratamento endodôntico, as soluções irrigantes deverão estar em contacto direto com toda a superfície da parede do canal para uma ação eficaz, especialmente na porção apical de canais estreitos. Shen *et al.*, 2012 reportam que há grandes zonas no 1/3 apical dos canais que não chegam a ser instrumentadas, bem como em canais em fita ou canais ovais, pelo que os microrganismos presentes têm maior probabilidade de sobreviver, sendo assim imprescindível a irrigação.

Os objetivos da irrigação na endodontia são químico-mecânicos e biológicos. Os objetivos químico-mecânicos são a lavagem de detritos, lubrificação do canal, dissolução do tecido orgânico e inorgânico, e evitar a formação de *smear layer* durante a

instrumentação ou dissolvê-la, após a sua formação, tudo isto sem irritar os tecidos periapicais (European Society of Endodontology, 2006). A função biológica dos irrigantes está relacionada com o seu efeito antimicrobiano (Basrani & Haapasalo, 2012). As características de um irrigante ideal estão resumidas na tabela 1.

Tabela 1. Características de um irrigante endodôntico ideal. Adaptado de (Basrani & Haapasalo, 2012)
Deverá ter efeito bactericida e fungicida
Não deverá ser irritante para os tecidos periapicais
Deverá ser estável em solução
Deverá possuir um efeito antimicrobiano prolongado e um efeito antibacteriano sustentável após a utilização
Deverá permanecer ativo na presença de sangue, soro e proteínas derivadas dos tecidos apicais
Deverá ser capaz de remover totalmente a camada de <i>smear layer</i>
Deverá apresentar uma baixa tensão superficial
Deverá ser capaz de desinfetar a dentina e os túbulos dentinários
Não deverá interferir com a reparação dos tecidos periapicais
Não deverá manchar a estrutura dentária
Deverá ser inativado num meio de cultura
Não deverá induzir uma resposta imunitária mediada por células nem deverá ser antigénico, tóxico ou cancerígeno para as células do tecido periradicular
Não deverá ter efeitos adversos sobre as propriedades físicas de dentina exposta
Não deverá apresentar nenhum efeito adverso sobre a capacidade de selamento de materiais de obturação
Deverá ser fácil de utilizar/ aplicar
Deverá ser económico

O método mais comum de transporte do irrigante para os canais é através de uma seringa idealmente com sistema *leur-lock* e uma agulha de abertura lateral, e ser utilizada em movimentos contínuos sem prender a agulha no interior do conduto, com deposição lenta da solução irrigante. Na maior parte das vezes, a agulha segue o trajeto anteriormente criado pelos instrumentos endodônticos e como tal, os irrigantes vão ser libertados no mesmo local onde a *smear layer* se formou. A solução também pode ser transportada por sistemas sónicos ou ultrassónicos (European Society of Endodontology, 2006).

#### 4.3.1 Hipoclorito de Sódio

O hipoclorito de sódio, cuja fórmula é NaOCl, vulgarmente conhecido como lixívia, é utilizado como desinfetante ou agente de branqueamento. É o irrigante de escolha durante os tratamentos endodônticos, devido à sua eficácia como agente antimicrobiano, excelente na dissolução de materiais orgânicos, lubrificante, e com um tempo de ação relativamente rápido. Apresenta como limitações a sua toxicidade no caso de acidentes,

não apresentar substantividade, ser corrosivo, apresentar um odor desagradável, e apenas remover a porção orgânica do *smear layer* (Basrani & Haapasalo, 2012).

Quando o hipoclorito de sódio contacta com as proteínas dos tecidos, são formados em pouco tempo compostos como azoto, formaldeído e acetaldeído. As ligações peptídicas são cortadas para que as proteínas sejam dissolvidas. Durante este processo, o hidrogénio nos grupos imino (-NH-) é substituído por cloro (-N.Cl-), formando cloraminas que exercem um papel importante para a eficácia antimicrobiana (Basrani & Haapasalo, 2012).

A eficácia antimicrobiana do hipoclorito de sódio, devido ao seu elevado pH (por causa dos iões hidroxilo), é semelhante ao mecanismo de ação do hidróxido de cálcio. O elevado pH do hipoclorito de sódio interfere na integridade da membrana citoplasmática, causando inibições enzimáticas irreversíveis, provocando alterações no metabolismo celular e a degradação de fosfolípidos, observado na peroxidação lipídica (Basrani & Haapasalo, 2012).

Como irrigante endodôntico, o hipoclorito é utilizado em concentrações que variam entre 0,5% e 6%, existindo controvérsia quanto à concentração ideal. Alguns estudos *in vitro* têm demonstrado que o hipoclorito de sódio em concentrações mais elevadas é mais eficaz contra o *Enterococcus faecalis* e a *Candida albicans*. Em contraste, os estudos clínicos indicaram que tanto as altas como as baixas concentrações são igualmente eficazes na redução de bactérias dos canais radiculares. O hipoclorito de sódio, em concentrações mais elevadas, apresenta uma melhor capacidade de dissolução de tecidos, mas mesmo em concentrações mais baixas, quando utilizado em grandes volumes pode ser igualmente eficaz. Como as concentrações de hipoclorito de sódio mais elevadas são mais tóxicas do que as concentrações mais baixas, é recomendada a utilização de concentrações mais baixas, em maior volume e em intervalos mais curtos de tempo para compensar as limitações das baixas concentrações (Basrani & Haapasalo, 2012).

Para aumentar a eficácia deste irrigante na dissolução do tecido orgânico, Basrani & Haapasalo, 2012 sugerem que se deve aumentar o pH ou a temperatura da solução, utilizar a ativação com ultrassons ou prolongar o tempo de trabalho.

### 4.3.2 Clorhexidina (CHX)

A clorhexidina (CHX) foi desenvolvida há mais de 50 anos em Inglaterra como um creme antisséptico. Desde 1957 que tem sido utilizado como desinfetante de uso generalizado, bem como para infeções da pele, olhos e garganta, tanto em humanos como em animais. É uma poliguanida, formada por dois anéis simétricos de 4-clorofenil e dois grupos biguanida unidos por uma cadeia central de hexametileno (Mohammadi & Abbott, 2009).

É considerada um agente antimicrobiano de largo espetro, ativo contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, e leveduras. Além de ser uma molécula hidrofóbica e lipofílica, dada a sua natureza catiónica, a CHX é capaz de se ligar eletrostaticamente a superfícies aniónicas das bactérias, provocando danos e desorganização das camadas externas da parede celular, tornando-a permeável. De acordo com a sua concentração a CHX pode ter tanto efeitos bacteriostáticos como bactericidas (C. S. Wang, Arnold, Trope, & Teixeira, 2007).

Em altas concentrações, esta é bactericida pois atua como detergente e danifica a membrana celular, causando a precipitação do citoplasma. Em baixas concentrações, é bacteriostática, fazendo com que as substâncias de baixo peso molecular, como o potássio e o fósforo, saiam da célula, sem esta ser irreversivelmente danificada, ou também pode afetar o metabolismo bacteriano tal como parar a atividade do transporte de glúcidos e inibir a produção de ácido em algumas bactérias (C. S. Wang *et al.*, 2007).

A CHX tem a capacidade de se ligar reversivelmente a proteínas tais como a albumina, que está presente no soro, na saliva, e em películas sobre as superfícies dos dentes, também se consegue ligar a glicoproteínas salivares, a membranas mucosas e mesmo à hidroxiapatite dos dentes. Esta reação reversível de absorção e libertação de CHX leva a uma atividade antimicrobiana e é referida como "substantividade", mas é um efeito dependente da concentração. Em baixas concentrações (de 0,005% a 0,01%), forma-se na superfície do dente uma camada estável de CHX, o que pode alterar as propriedades físico-químicas da superfície, podendo prevenir ou reduzir a colonização bacteriana. Em concentrações mais elevadas (> 0,02%), são formadas várias camadas de CHX sobre a superfície, proporcionando uma espécie de reservatório de CHX, que vai libertando este composto quando a sua concentração no ambiente circundante diminui (Basrani & Haapasalo, 2012).

A substantividade antibacteriana de três soluções com concentrações diferentes de CHX (0,2%; 2%; e 4%), após 5 minutos de aplicação foi avaliada por Mohammadi e Abbott. Os resultados revelaram uma relação direta entre a concentração de CHX e a sua substantividade, e que a sua atividade antimicrobiana residual permanece no sistema de canais radiculares até 12 semanas (Basrani & Haapasalo, 2012).

Normalmente é utilizada em concentrações que variam entre os 0,12% e os 2%, apresentando com estas concentrações pouca toxicidade, quer local, quer sistémica. Tem sido aplicada na medicina dentária na prevenção de cáries, em ortodontia, na prevenção da formação de placa bacteriana e de gengivite, principalmente em idosos, em pacientes com dificuldades cognitivas ou motoras e em pacientes imunocomprometidos. Também está indicada como desinfetante de próteses em pacientes suscetíveis à candidíase oral, e pode ser aplicada na cirurgia para prevenir infeções alveolares, assim como na periodontologia (Basrani & Haapasalo, 2012).

Em endodontia, a CHX tem vindo a ser estudada como irrigante e como medicamento intracanal, tanto em testes *in vivo* como *in vitro*. De acordo com o estudo de Lindsdskog, Pierce e Blomlof, citados por Basrani & Haapasalo, 2012 uma concentração de 2% de CHX foi muito eficaz na eliminação de um biofilme de *Enterococcus faecalis*. Em canais radiculares infetados, reduz as bactérias de forma tão eficaz como o hidróxido de cálcio, quando aplicada durante 1 semana. Ao contrário do hidróxido de cálcio, a substantividade da CHX potencia a prevenção da colonização bacteriana nas paredes de dentina dos canais radiculares, por períodos prolongados de tempo. Este efeito depende da concentração de CHX, mas não do seu modo de aplicação, que pode ser em líquido sob a forma de digluconato de clorhexidina, gel ou em dispositivos de libertação controlada.

A CHX apresenta então como principais características:

- O facto de ter um largo espectro de atividade contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas e efeito antifúngico especialmente contra a *Candida albicans* (Mohammadi & Abbott, 2009);
- Possui um efeito contra os biofilmes microbianos ligeiramente inferior quando comparado com o hipoclorito de sódio (Gatewood, 2007);
- Apresenta uma substantividade até 12 semanas (Hülsmann, 2013);
- Apresenta uma biocompatibilidade aceitável (Mohammadi & Abbott, 2009);

- Pode ter o seu efeito reduzido ou inibido pela dentina e seus componentes, microrganismos e exsudado inflamatório do canal radicular (Haapasalo, Endal, Zandi, & Coil, 2005);
- Não possui a capacidade de dissolver a matéria orgânica, nem inorgânica, sendo esta uma das principais desvantagens (Hülsmann, 2013);
- A irrigação/ medicação com CHX pode atrasar a contaminação de dentes endodenciados através da restauração coronal e vai diminuir a contaminação através do forâmen apical (Basrani & Haapasalo, 2012);

Zehnder, 2006 sugere que antes da obturação, a dentina deve ser irrigada com hipoclorito de sódio para dissolver a matéria orgânica, ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) para eliminar a *smear layer*, e irrigação com CHX para potenciar o efeito antimicrobiano e conferir substantividade. Quando a CHX e o hipoclorito se misturam, dá-se uma reação ácido-base e forma-se um precipitado neutro e insolúvel, de cor alaranjada, constituído essencialmente por para-cloroanilina, que aumenta proporcionalmente com a concentração de hipoclorito de sódio utilizada. Este precipitado, além de poder interferir com o selamento da obturação, é tóxico para os humanos, mesmo em curtos períodos de exposição, causando cianose, que é uma manifestação da formação da metahemoglobina. Uma solução para evitar a formação deste precipitado é a secagem do canal com pontas de papel, antes da irrigação com CHX.

#### 4.3.3. Ácido etilenodiaminotetracético (EDTA)

O ácido etilenodiaminotetracético, mais conhecido como EDTA, faz parte dos agentes descalcificantes, uma vez que pode atuar como quelante de íons cálcio e ferro, e remover a parte inorgânica da *smear layer* após a irrigação com hipoclorito de sódio (que tem efeito proteolítico e remove a parte orgânica). Também serve de lubrificante à instrumentação e ajuda na eliminação de microrganismos dos canais radiculares quando combinado com outros irrigantes, aumentando o espectro de ação destes, uma vez que sozinho não possui atividade antibacteriana. É capaz de desmineralizar 20-50 µm dentina, e apresenta baixa toxicidade (Cord *et al.*, 2014; Haapasalo *et al.*, 2005).

Normalmente é utilizado em concentrações de 17% e, apesar de o ácido cítrico aparentemente ser mais potente que o EDTA em menores concentrações, ambos são eficazes na remoção da *smear layer* (Haapasalo *et al.*, 2005).

A solução irrigante mais utilizada é o hipoclorito de sódio, que apesar de ter bastantes características positivas, por si só não é suficiente para assegurar a completa limpeza de detritos orgânicos e inorgânicos, nem de biofilmes presentes nos canais. Para uma irrigação mais eficaz, deverá ser utilizada uma combinação de irrigantes, sendo o hipoclorito de sódio e o EDTA a combinação mais recomendada de acordo com (Haapasalo *et al.*, 2013).

O médico dentista deverá estar ciente das interações que podem existir entre vários compostos químicos presentes nos irrigantes e que podem alterar as suas capacidades de ação, ou até mesmo levar à formação de compostos nocivos ao paciente. Deste modo, a utilização de um protocolo de irrigação correto, de modo a que os irrigantes consigam libertar o seu potencial, é imperativo para o sucesso do tratamento endodôntico.

#### **4.3.4. Medicação intracanal**

Como as bactérias residuais podem afetar negativamente o resultado do tratamento endodôntico, recomenda-se a utilização de medicação intracanal entre sessões para complementar os efeitos antibacterianos dos procedimentos químico-mecânicos e eliminar as bactérias persistentes, embora alguns possam ser inativados pela dentina, fluídos e matéria orgânica que ainda esteja presente (Siqueira Jr & Rôças, 2008).

De acordo com Ferreira *et al.*, as medicações intracanales são eficazes a reduzir endotoxinas e apresentam propriedades anti-inflamatórias. Apesar de não garantir a completa erradicação dos microrganismos, estes compostos podem interferir com a patogenicidade de microrganismos e ajudar a reduzir a carga bacteriana a níveis que podem ser tolerados pelos tecidos periapicais, contribuindo assim para o sucesso do tratamento endodôntico (Ferreira *et al.*, 2015).

O hidróxido de cálcio é o medicamento intracanal mais utilizado devido à sua capacidade antimicrobiana, graças à dissociação em iões hidroxilo e cálcio, que provoca uma alcalinização do pH no meio em que se encontra, tendo a intenção de destruir as membranas citoplasmáticas bacterianas, e à sua eficácia para dissolver tecidos e induzir a mineralização (Ferreira *et al.*, 2015). No entanto, algumas espécies microbianas, como o *Enterococcus faecalis* e a *Candida albicans* podem apresentar resistência ao hidróxido de cálcio (Siqueira Jr & Rôças, 2008).

Devido à sua substantividade e capacidade antimicrobiana, Hiraishi, Yiu, King, & Tay, 2009 argumentam que a utilização de gel de CHX a uma concentração de 2% é mais eficaz do que o hidróxido de cálcio como medicamento intracanal, relativamente ao *Enterococcus faecalis*. No entanto, a atividade antimicrobiana de ambos os medicamentos diminuiu substancialmente após 72 horas. Num estudo semelhante, Neelakantan, Sanjeev, & Subbarao, 2007 também obtiveram exatamente as mesmas conclusões em relação ao resultado do gel de CHX com uma concentração a 2%, sendo mais eficaz do que o hidróxido de cálcio contra *Enterococcus faecalis*, *Candida albicans*, *Porphyromonas gingivalis*, e *Prevotella intermedia*, mesmo após 72 horas, contra as 48 horas do hidróxido de cálcio, que mesmo antes desse tempo não foi eficaz contra todas as espécies.

#### 4.4. Obturação

Idealmente após a irrigação, os canais devem estar livres de detritos, microrganismos e *smear layer*. Regra geral, 40% a 60% dos canais radiculares ainda apresentam bactérias cultiváveis após o procedimento químico-mecânico, utilizando o hipoclorito de sódio (C. S. Wang *et al.*, 2007). Além disto, Tennert *et al.*, 2014 chamam a atenção para o facto de que os microrganismos podem ainda entrar no sistema de canais durante o tratamento por contaminação de algum instrumento ou material utilizado após a irrigação final, ou durante o processo de obturação.

Vários estudos indicam que o prognóstico da periodontite apical após o tratamento endodôntico é muito pior se estiverem presentes microrganismos viáveis no interior dos canais radiculares, antes da obturação (Haapasalo *et al.*, 2005). Wang *et al.*, 2007 citando Sjögren *et al.*, afirma que em 94% de dentes com periodontite apical que apresentavam uma cultura negativa após a instrumentação, existiu cura dessa lesão periapical e, no caso de apresentarem uma cultura positiva, ou seja, com um número cultivável de microrganismos, em apenas 68% dos casos existiu cura da lesão periapical.

Mas não só com os canais nos devemos preocupar para garantir um canal esterilizado antes da obturação. Zhang *et al.*, 2015, citando Vidana *et al.*, referem que a desinfecção dos materiais de obturação pode ser um passo crítico no que toca a prevenir a contaminação dos canais por *Enterococcus faecalis*. Reportam que 19,4% dos cones de gutta-percha retirados de uma embalagem continham bactérias à superfície, pelo que recomendam uma desinfecção dos cones com hipoclorito de sódio a 5,25% ou CHX a 2%.

A prevenção de uma reinfecção deverá ser a meta dos materiais de obturação. Existem três propriedades principais nos materiais endodônticos: a capacidade de selamento contra o crescimento de bactérias provenientes da cavidade oral: o aprisionamento dos microrganismos restantes no canal, e a obturação completa ao nível microscópico para prevenir que os fluídos estagnados no interior dos canais se acumulem e sirvam de nutrientes a quaisquer bactérias (Ørstavik, 2005), além da atividade antimicrobiana e da biocompatibilidade (Lucas, 2015). Além disso, os materiais devem ter também propriedades de manuseamento que permitam uma correta aplicação no canal radicular, sem descuidar as três anteriores (Ørstavik, 2014).

Deve ser tido em consideração que mesmo com uma técnica de obturação bem executada, as bactérias que se mantêm na porção apical do canal radicular, nos deltas apicais e em canais laterais, podem ter acesso aos tecidos periradiculares e ter assim uma fonte de nutrientes que lhes permita manter a infecção (Siqueira Jr & Rôças, 2008).

A obturação endodôntica tradicional consiste na aplicação de um cimento endodôntico e um material central. Este núcleo central funciona como um pistão sobre o cimento, que deverá ter alguma fluidez, de modo a que este se espalhe ao longo do canal radicular e preencha os espaços vazios e se una às paredes dentinárias (Ørstavik, 2005).

Segundo Silveira, Soares, Nunes, & Mordente, 2007, os principais indicadores de uma obturação de excelência são:

- Uma conicidade progressiva e linear em direção apico-cervical ;
- Densidade homogénea na totalidade da sua extensão ;
- Nível apical ligeiramente antes do ápice radiográfico ;
- Interligação entre os materiais de obturação (forças coesivas), e à estrutura radicular (forças adesivas)

#### **4.4.1. Materiais centrais de obturação**

##### **4.4.1.1. Gutta-Percha**

A gutta-percha provém da árvore *Sapotaceae*, pode ter duas fases, a alfa ou a beta, com diferentes comportamentos físico-químicos. A fase alfa encontra-se presente na natureza, e é mais fluída que a beta; a beta é refinada, sendo a predominantemente utilizada em endodontia. Na forma final, os cones de gutta-percha consistem em 20% de gutta-percha, e até 75% de óxido de zinco, além de pigmentos para conferir radiopacidade, ceras e

resinas. A gutta-percha por si só não consegue aderir ao canal, nem selá-lo hermeticamente, sendo necessário o cimento endodôntico para fazer a ponte entre a gutta-percha e o dente. É o material de eleição, pois pode ser utilizada em várias técnicas de obturação, desde a condensação lateral à vertical (Gatewood, 2007).

Alguns fabricantes adicionam aos cones de gutta-percha hidróxido de cálcio, CHX e iodofórmio para lhe conferir algumas propriedades desinfetantes. Este tem sido o único material obturador que permanece dominante nas várias técnicas ao longo dos anos. Apenas mais recentemente é que as suas características têm vindo a ser desafiadas por novos materiais sintéticos aplicados na obturação dos canais radiculares (Ørstavik, 2005).

#### **4.4.1.2. Pontas de prata**

As pontas de prata, são flexíveis e rígidas, apresentando a vantagem de não deformar e ser aplicadas em canais estreitos. Não dispensam a utilização de cimento, e podem ser complementadas com mais pontas de prata ou mesmo cones de gutta-percha acessórios com a técnica de condensação lateral. Foram relatados casos com sinais e sintomas de periodontite apical associada aquando da obturação com este material. A corrosão das pontas de prata provoca a libertação de produtos tóxicos do metal, sendo a causa de muitas reações inflamatórias, e o facto de estarem muitas vezes associadas a dentes com infeção pós-tratamento, questiona a sua capacidade de selamento (Ørstavik, 2005). A Associação Americana de Endodontistas recomendou em 2011 a descontinuação deste material por causa da corrosão na presença de sangue e fluidos tecidulares; pigmentação do dente e estruturas adjacentes; incapacidade de realizar postes e núcleos após este tipo de obturação e; dificuldade de remoção em caso de cirurgia apical.

#### **4.4.1.3. Materiais à base de resina**

Só com a recente introdução da tecnologia que traz a adesão à dentina, através dos cones de Resilon™ é que se pode dizer que existe uma alternativa clinicamente viável à gutta-percha. O Resilon™ é um material termoplástico composto por polímeros de poliéster com vidro bioativo, e sais de bário na sua composição. É apresentado com um cone principal e vários secundários para a técnica de condensação lateral, e como pastilhas para a condensação vertical termoplástica. Com características físicas e de manuseamento similares à gutta-percha, a principal vantagem desta resina termoplástica como material central de obturação é que se vai fundir com o cimento específico, o Epiphany™, um cimento resinoso de dupla polimerização, criando um “monobloco” que se une às paredes

de dentina. Tal como outro sistema adesivo à dentina, deve-se fazer o ataque ácido e aplicação de primer, para conseguir uma adesão química (Gatewood, 2007).

#### **4.4.2. Cimentos endodônticos**

Os cimentos endodônticos são utilizados na obturação dos canais radiculares para conseguir uma vedação estanque e hermética ao longo do canal, incluindo o forâmen apical e todas as irregularidades e espaços vazios entre a parede dentinária e o material central de obturação, bem como canais laterais e anastomoses. Portanto, os cimentos ajudam a: prevenir fugas de fluídos, reduzir a possibilidade de as bactérias presentes no canal invadirem os tecidos periapicais e, resolver a lesão periapical (Shen, Peng, Yang, Ma, & Haapasalo, 2015).

De acordo com Tyagi, Mishra, & Tyagi, 2013; Z. Wang, Shen, & Haapasalo, 2014, os cimentos podem ser divididos de acordo com a sua composição, em:

- Cimentos de óxido de zinco eugenol
- Cimentos de hidróxido de cálcio
- Cimentos à base de resina epóxi-amina
- Cimentos à base de resina de metacrilato
- Cimentos à base de silicone
- Cimentos à base agregado trióxido mineral (MTA)
- Cimentos à base de ionómero de vidro
- Cimentos à base de cálcio-fosfato
- Cimentos biocerâmicos à base de silicato-cálcio-fosfato

Segundo Silveira *et al.*, 2007, os cimentos endodônticos que têm como base o óxido de zinco eugenol, o ionómero de vidro ou o hidróxido de cálcio demonstraram uma união reduzida com a dentina e com a gutta-percha. Por outro lado, os cimentos com bases resinosas demonstraram uma maior união com a gutta-percha e com a dentina radicular.

#### 4.4.2.1. Propriedades de um cimento obturador de canais ideal

Segundo Schilder, 2006, Grossman elaborou uma lista de 11 critérios (tabela 2) com as propriedades ideais dos cimentos endodônticos.

Tabela 2. Requisitos de um cimento endodôntico ideal. Adaptado de (Schilder, 2006)
O cimento deverá ser viscoso quando misturado, de modo a promover uma boa adesão, quando solidificar, entre si e a parede do canal radicular.
Deverá proporcionar um selamento hermético.
Deverá ser radiopaco, para ser observado radiograficamente.
As partículas do pó deverão ser finas para que se possam misturar facilmente com o líquido do cimento.
Não deverá contrair após solidificar.
Não deverá pigmentar a estrutura dentária.
Deverá ser bacteriostático ou pelo menos não permitir o crescimento bacteriano.
Deverá tomar presa lentamente.
Deverá ser insolúvel quando em contacto com fluídos tecidulares.
Deverá ser tolerado pelos tecidos, ou seja, não deverá irritar os tecidos periapicais.
Deverá ser solúvel com solventes comuns, para ser removido do canal radicular se necessário.

#### 4.4.2.2. Cimento endodôntico Ah Plus®

O cimento endodôntico AH Plus® (Dentsply DeTrey GmbH, Konstanz, Alemanha) é um cimento à base de resina epóxi-amina, que tem vindo a ser utilizado em vários estudos comparativos para avaliar as propriedades físico-químicas, biológicas e antimicrobianas (Resende *et al.*, 2009).

De acordo com o fabricante, é o sucessor do AH 26® (Dentsply DeTrey GmbH, Konstanz, Alemanha), com as características de baixa solubilidade, alta radiopacidade, baixa contração, alguma capacidade antimicrobiana, boa capacidade de selamento e adesão à dentina e boa biocompatibilidade. Apresenta as vantagens de não libertar formaldeído, um composto tóxico, e de não provocar a descoloração dentária.

É apresentado comercialmente sob a forma pasta-pasta com 2 bisnagas, ou em Jet, com a mesma composição, mas tendo uma seringa com uma ponta de auto-mistura.

#### 4.4.2.3. Cimento endodôntico MTA Fillapex®

O agregado trióxido mineral (MTA) é um biomaterial que tem sido investigado na área da endodontia desde 1990. Foi primeiro desenvolvido para tratar perfurações radiculares e para obturação de 1/3 apical. Actualmente é utilizado em tratamentos pulpares, reparações de reabsorção radicular e procedimentos de apexificação, sendo amplamente

aceite pela sua biocompatibilidade e capacidade de selamento. No entanto, algumas propriedades físicas impedem-no de ser utilizado como cimento endodôntico para obturação convencional. A necessidade de um material biocompatível e que induza a formação de tecido mineralizado, com uma boa taxa de fluidez e boa manipulação, deu origem ao desenvolvimento de cimentos endodônticos à base de MTA (Morgental *et al.*, 2011).

O cimento endodôntico MTA Fillapex<sup>®</sup> (Angelus, Londrina, Brasil), foi criado no ano de 2010 na tentativa de combinar as propriedades físico-químicas de um cimento à base de resina, com as propriedades biológicas do MTA, que apresenta uma matriz de silicato de cálcio. Apresenta alta solubilidade, pH e libertação de iões cálcio. Estas propriedades podem ser benéficas para a atividade antimicrobiana deste cimento (Z. Wang *et al.*, 2014).

De acordo com o fabricante, o MTA Fillapex apresenta as seguintes vantagens: formação de novo tecido, incluindo cimento, graças à incorporação de MTA; boa biocompatibilidade; alta radiopacidade; boa fluidez para obturar os canais laterais; um tempo de trabalho adequado; expansão de presa para impedir a penetração de fluidos tecidulares e/ou recontaminação bacteriana; libertação de iões de cálcio para regeneração de tecidos em zonas onde há lesão óssea e atividade microbiana; ação antimicrobiana devido à alcalinidade; e é fácil de utilizar e de remover caso necessário.

É apresentado comercialmente sob a forma pasta-pasta com 2 bisnagas, ou em seringa com uma ponta de auto-mistura, com a mesma composição.

#### **4.4.3. Incorporação de antimicrobianos nos cimentos endodônticos**

A utilização de cimentos endodônticos com atividade antibacteriana é considerada benéfica na batalha para reduzir o número de microrganismos persistentes no canal após a instrumentação e irrigação ou mesmo erradicar completamente a infeção. Os componentes antimicrobianos dos cimentos são libertados da sua matriz para os túbulos dentinários, mas no entanto, com o passar do tempo, os cimentos podem desintegrar-se e conseqüentemente comprometer a interface cimento-dentina e causar a infiltração de microrganismos (Barros, Silva, Rôças, *et al.*, 2014; Del Carpio-Perochena, Kishen, Shrestha, & Monteiro Bramante, 2015; Shen *et al.*, 2015).

Os cimentos endodônticos são então conhecidos por ter uma atividade antibacteriana inerente, dependendo da sua composição química, mas que é transitória e raramente se estende além de 7 dias. Tal período pode ser suficiente em certas circunstâncias, mas a evidência clínica é de que não é suficiente no caso de infecções persistentes quando se utilizam os cimentos endodônticos atualmente disponíveis. Até ao momento, já começam a ser feitos estudos no sentido de avaliar a atividade antimicrobiana de diferentes cimentos endodônticos (Gjorgievska, Apostolska, Dimkov, Nicholson, & Kaftandzieva, 2013).

Para aumentar a atividade antimicrobiana dos materiais de obturação, alguns agentes de largo espectro antimicrobiano, tais como o digluconato de clorhexidina a 2% e a cetrimida a 0,2%, que já são utilizados como irrigantes, têm vindo a ser incorporados nestes e demonstrado bons resultados, sem alterar significativamente as propriedades físicas dos mesmos (Ruiz-Linares, Bailón-Sanchez, Baca, Valderrama, & Ferrer-Luque, 2013).

Hoelscher *et al.*, 2006 incorporaram antibióticos (amoxicilina, penicilina, clindamicina, metronidazol e doxiciclina) a um cimento de óxido de zinco eugenol Pulp Canal Sealer EWT<sup>®</sup>, e testaram as zonas de inibição contra o *Enterococcus faecalis*. Todos os antibióticos melhoraram a performance antimicrobiana do cimento, à exceção do metronidazol, onde não houve diferenças estatisticamente significativas entre a incorporação ou não do metronidazol.

Outros estudos tentaram aprimorar as propriedades antibiofilmes do MTA, acrescentando CHX. Uma mistura de MTA e 0,12% CHX apresentou maior atividade antimicrobiana contra 7 microrganismos diferentes, num teste de difusão em ágar, quando comparada com a tradicional mistura de MTA e água (Stowe, Sedgley, Stowe, & Fenno, 2004), e (Holt, Watts, Beeson, Kirkpatrick, & Rutledge, 2007) com MTA branco e MTA cinzento juntando 2% de CHX, também verificou o aumento das propriedades antibacterianas frente ao *Enterococcus faecalis*, através do teste de difusão em ágar.

As propriedades antimicrobianas são desejáveis nos cimentos, uma vez que é muito provável que estes se encontrem em contacto direto com microrganismos que permaneçam nos túbulos dentinários ou em zonas não desbridadas do canal. A forma de controlar a infeção está subjacente não apenas pela remoção dos microrganismos do sistema de canais, mas também do impedimento da reinfecção, o que é conseguido através de uma boa obturação. Teoricamente, é possível melhorar as propriedades

antimicrobianas dos materiais, adicionando agentes antimicrobianos. No caso de infeções residuais persistentes e infiltrações coronárias, o uso de cimentos antimicrobianos seria desejável, de modo a aumentar a taxa de sucesso do tratamento endodôntico (Gjorgievska *et al.*, 2013).

#### **4.4.4 Técnicas de obturação**

As técnicas de obturação podem ser divididas em obturação a quente ou a frio. Embora, exista um grande número de materiais obturadores e técnicas de obturação, a combinação de gutta-percha e um cimento é o *gold standard* na prática clínica. No entanto, não existe nenhum método geralmente aceite para a colocação de gutta-percha no interior do canal. Para este efeito existem 4 técnicas básicas: (1) a compactação de gutta-percha a frio; (2) a compactação de gutta-percha aquecida no canal e, em seguida, condensada a frio; (3) a compactação de gutta-percha que foi termoplastificada fora do canal e injetada no sistema canal e, em seguida condensada a frio; e (4) a condensação de gutta-percha colocada no canal e aquecida por meios mecânicos. Existem muitas variações destas 4 técnicas, e a condensação lateral a frio é a técnica mais ensinada e a que mais vezes serve de comparação (Yücel & Çiftçi, 2006).

A técnica de condensação lateral a frio é a mais utilizada na Clínica Dentária Egas Moniz. De acordo com Schilder, 2006 esta técnica consiste na escolha de um cone principal de gutta-percha, que coincida o mais próximo possível com a conicidade e comprimento do canal radicular, confirmado radiograficamente. Este cone principal é então coberto com cimento e colocado em posição no canal radicular seco, sendo pressionado lateralmente contra uma parede do canal, com a ajuda de um condensador digital, e depois uma série de cones de gutta-percha com menor conicidade são acrescentados da mesma forma, até se obter o máximo de selamento possível.

#### **4.5. Restauração definitiva**

A restauração definitiva de um dente obturado surge como a etapa final do tratamento endodôntico e desempenha um papel fundamental no prognóstico do mesmo. Independentemente da técnica de obturação utilizada nos canais radiculares, a micro-infiltração pode ocorrer em pouco tempo em canais aparentemente bem obturados, e num curto espaço de tempo, podendo causar infeção periapical. O selamento coronário é um requisito fulcral para evitar a micro-infiltração microbiana. “O selamento coronário

exerce um papel importante na manutenção do selamento apical e possui um impacto significativo no sucesso a longo prazo.” (Johnson & Kulild, 2011).

Yücel & Çiftçi, 2006 citando Torabinejad, referem que quando ocorre a perda do selamento coronário, e o canal obturado fica exposto à flora oral, há uma via para a recontaminação bacteriana da zona periapical de dentes com tratamento endodôntico, levando ao fracasso do tratamento. O adiar de uma restauração permanente, uma fratura da restauração coronária e/ou do dente, uma espessura inadequada da restauração provisória, ou a colocação de um poste no canal radicular deixando pouco material de obturação, são potenciais riscos de recontaminação em dentes obturados. A microinfiltração coronária pode ser a principal causa de insucesso endodôntico não cirúrgico.

Estudos direcionados à microinfiltração indicam que o selamento coronário pode ser aprimorado através da aplicação de materiais restauradores diretamente sobre o orifício do canal, e pela execução de uma restauração definitiva o mais breve quanto possível. Um método eficiente para combater esta problemática consiste no revestimento do chão da câmara pulpar com material adesivo, após a remoção de gutta-percha e cimento próximos ao orifício de entrada do canal. Isto resulta na formação de uma camada híbrida com micropartículas de resina no interior dos túbulos dentinários presentes no fundo da câmara pulpar. Um ionómero de vidro modificado por resina é então aplicado numa fina camada com 1 milímetro de espessura e fotopolimerizado. Estudos concluem que este procedimento impedia a micro-infiltração coronal em todas as amostras por um período de 60 dias (Johnson & Kulild, 2011).

## **5. Importância do estudo**

Um dos principais objetivos do tratamento endodôntico é a eliminação de microrganismos do sistema de canais radiculares. Tal é conseguido através da preparação químico-mecânica do sistema de canais radiculares e da eventual utilização de medicação intracanal entre consultas. No entanto, o tratamento vai reduzir mas não eliminar completamente a infecção canal.

Assim, a obturação deve selar as bactérias remanescentes dentro dos túbulos dentinários e prevenir a reinfeção. Uma possibilidade terapêutica para melhorar o resultado do tratamento endodôntico é a utilização de cimentos endodônticos com propriedades antimicrobianas, e se possível aumentá-las com a incorporação de CHX.

Até à data, não foram publicados trabalhos nos quais se incorporou clorhexidina a uma concentração de 3% para aumentar a capacidade antimicrobiana de cimentos endodônticos. Baseado no exposto anteriormente estabelecemos os objetivos deste trabalho de investigação, que passamos a descrever de seguida.

## **6. Objetivos do trabalho**

### **6.1. Objetivos gerais**

Avaliar a capacidade antimicrobiana de dois cimentos endodônticos com e sem a incorporação de digluconato de clorhexidina, sobre dois microrganismos.

### **6.2. Objetivos específicos**

6.2.1 Medir a absorvância em nanómetros, mediante o teste de contacto direto, da capacidade antimicrobiana dos cimentos endodônticos AH Plus e MTA Fillapex, com e sem a incorporação de digluconato de clorhexidina a 2% e 3%, organizados pelos grupos que expomos a seguir:

Grupo 1: Cimento AH Plus

Grupo 2: Cimento AH Plus + digluconato de clorhexidina 2%

Grupo 3: Cimento AH Plus + digluconato de clorhexidina 3%

Grupo 4: Cimento MTA Fillapex

Grupo 5: Cimento MTA Fillapex + digluconato de clorhexidina 2%

Grupo 6: Cimento MTA Fillapex + digluconato de clorhexidina 3%

6.2.2. Medir a capacidade antimicrobiana de cada grupo frente aos microrganismos *Candida albicans* e *Enterococcus faecalis*.

6.2.3. Medir a capacidade antimicrobiana de cada grupo, com os cimentos envelhecidos nos quatro períodos de tempo seguintes:

Fresco

24 Horas

72 Horas

168 Horas

6.2.4 Medir a capacidade antimicrobiana de cada grupo nos seguintes tempos de contacto, de acordo com cada microrganismo:

6.2.4.1 *Candida albicans*

0 Horas

6 Horas

10 Horas

30 Horas

6.2.4.2 *Enterococcus faecalis*

0 Horas

2,5 Horas

5 Horas

10 Horas

6.2.5 Comparar os resultados obtidos

## **7. Hipóteses do trabalho**

Hipótese Nula (H0):

- Não há diferença da capacidade antimicrobiana nos materiais testados.

Hipótese Alternativa (H1):

- Há diferença da capacidade antimicrobiana nos materiais testados.



## **II – Materiais e Métodos**

### **1. Fontes bibliográficas**

A revisão da literatura científica utilizada nesta tese foi obtida através da consulta de fontes primárias e secundárias, pesquisadas nas bases de dados PUBMED, no Science Direct e no B-on para pesquisar publicações, usando uma combinação dos termos “AH Plus”; “antimicrobial capacity”; “chlorhexidine”; “MTA Fillapex”. A pesquisa realizou-se com um limite temporal de 10 anos com limite linguístico para a língua inglesa, portuguesa e espanhola. Os artigos foram selecionados de acordo com os critérios de relevância do tema. Rejeitaram-se os artigos não relacionados com o tema e aqueles sem resumo em inglês. Foi também utilizado o livro “Cohen Caminhos da Polpa”. A partir do material encontrado utilizaram-se outras fontes citadas como artigos relacionados.

### **2. Considerações éticas**

Este estudo foi submetido à Comissão de Ética da Cooperativa de Ensino Superior Egas Moniz, tendo sido aprovado. O documento encontra-se anexado.

### **3. Local do estudo**

Este trabalho de investigação realizou-se no departamento de Medicina Dentária Conservadora com a colaboração do laboratório de microbiologia do Instituto Superior de Ciências da Saúde Egas Moniz.

### **4. Lista de materiais utilizados, por ordem alfabética**

- Agitador de placas Certomat<sup>®</sup> MO II (B. Braun Biotech International, Goettingen, Alemanha)
- Ansas estéreis (Artiglass, Due Carrare, Itália)
- Balança Precisa 125A (Precisa Gravimetrics, Dietikon, Suíça)
- Câmara de fluxo laminar DanLaf VFRS106 (Claus Damm, Humlebaek, Dinamarca)
- Câmara fotográfica Carl Zeiss Nokia<sup>®</sup> Lumia 920 (Nokia, Espoo, Finlândia)
- Cimento endodôntico AH Plus Jet<sup>®</sup> (Dentsply DeTrey GmbH, Konstanz, Alemanha)
- Cimento endodôntico MTA Fillapex<sup>®</sup> (Angelus, Londrina, Brasil)
- Espátula de cimento (Asa Dental, Lucca, Itália)

- Espátula Heidemann de compósito (Asa Dental, Lucca, Itália)
- Densímetro Densimat™ (BioMérieux, Lyon, França)
- Digluconato de clorhexidina ( $C_{22}H_{30}Cl_2N_{10.2}O_7$ ) 20% (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha)
- Estufa BE500 (Mettler GmbH + CO, Schwabach W, Alemanha)
- Folhas de papel encerado para espátulação de cimentos (Dentsply DeTrey GmbH, Konstanz, Alemanha)
- Meio de cultura Brain Heart Infusion Broth (BHI) (VWR Chemicals, Leuven, Bélgica)
- Micropipetas Biopette™ p10, p100 e p1000 (Labnet, Edison, New Jersey, EUA)
- Microplacas de poliestireno com 96 poços, estéreis (Deltalab, Barcelona, Espanha)
- Microrganismo *Candida albicans* (ATCC® 10231™ American Type Culture Collection, Manassas, EUA)
- Microrganismo *Enterococcus faecalis* (ATCC® 29212™ American Type Culture Collection, Manassas, EUA)
- Microscópio Leica® ATC 2000 (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemanha)
- Óleo de imersão para microscópio (Panreac, Barcelona, Espanha)
- Placa de petri com meio Sabouraud Glucose Gentamicina Cloranfenicol (Oxoid, Perth, Inglaterra)
- Placa de petri com meio Trypticase Soy Agar (TSA) (VWR Chemicals, Leuven, Bélgica)
- Programa Microsoft Excell 2007 (Microsoft Corporation, Washington, EUA)
- Programa Statistical Package for the Social Sciences, SPSS® versão 23 para Windows (IBM Corporation, Nova Iorque, EUA)
- Solução tampão fosfato salino (PBS) (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha)
- Teste de coloração Azul de Lactofenol (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha)
  - Composição:
    - Glicerol:  $C_3H_8O_3$
    - Ácido Lático:  $C_3H_6O_3$
    - Fenol:  $C_6H_6O$
    - Azul de algodão:  $C_{37}H_{27}N_3O_9S_3Na_2$

- Teste de coloração Gram:
  - Acetona C<sub>3</sub>H<sub>6</sub>O (VWR BDH Prolab, Fontenay-sous-Bois, França)
  - Cristal violeta C<sub>24</sub>H<sub>28</sub>N<sub>3</sub>Cl (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha)
  - Etanol C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>O (Carlo Erba, Chauseée du Vexin, França)
  - Fucsina C<sub>20</sub>H<sub>20</sub>N<sub>3</sub>·HCl (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha)
  - Lugol I<sub>2</sub> (Scharlau S.L., Sentmenat, Espanha)

## 5. Procedimento

### 5.1. Preparação dos microrganismos

Foram utilizados os microrganismos *Candida albicans* e *Enterococcus faecalis*.

A levedura *Candida albicans* foi repicada a partir de uma amostra conservada a -80°C, para uma placa de petri contendo o meio Sabouraud Glucose Gentamicina Cloranfenicol e incubada a 37°C durante a noite (figura 1).

Posteriormente repicou-se uma colónia para 9 mililitros (ml) de meio de cultura BHI e incubou-se a 37°C, até atingir também o grau de turvação de 0,5 da escala de McFarland, que corresponde aproximadamente a 1,5 x 10<sup>8</sup> Unidades formadoras de colónias (UFC) por ml.

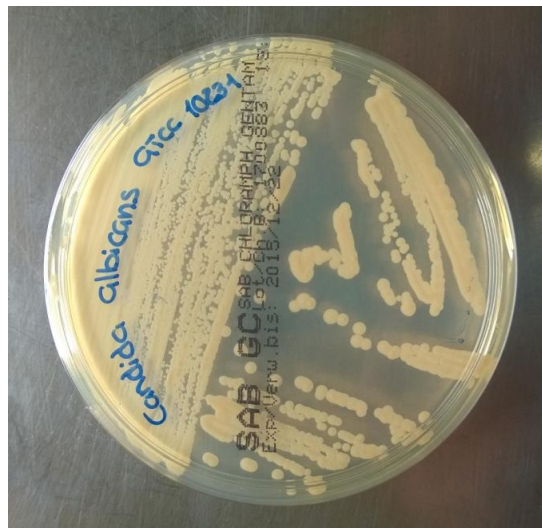


Figura 1. Placa de cultura contendo *Candida albicans*

A bactéria *Enterococcus faecalis* foi repicada a partir de uma amostra armazenada a -80°C, para uma placa de petri contendo o meio Trypticase Soy Agar (TSA) e incubada aerobicamente a 37°C durante a noite.

Seguidamente foi repicada uma colónia com uma ansa estéril e ressuspensa em 9 ml de meio de cultura Brain Heart Infusion Broth (BHI) estéril e foi incubada a 37°C até atingir o grau de turvação de 0,5 da escala de McFarland (aproximadamente a  $1,5 \times 10^8$  UFC/ml), (figura 2).

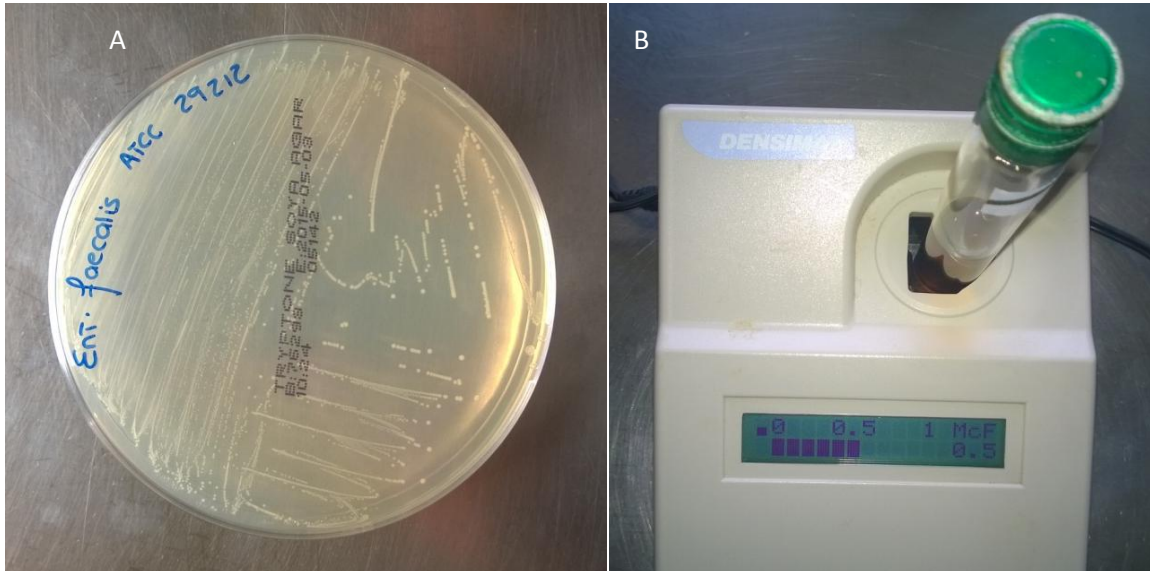


Figura 2. A) Placa de cultura contendo *Enterococcus faecalis* B) Aparelho Densimat™ apresentando o valor 0,5 da escala de McFarland

## 5.2. Manipulação dos materiais utilizados no estudo

### 5.2.1. Cimentos endodônticos

Foram utilizados dois tipos de cimentos endodônticos, cuja composição está descrita na tabela 3. Um cimento com base de resina epóxi-amina, AH Plus Jet® e um cimento com base MTA, MTA Fillapex® (figura 3). Os cimentos foram manipulados de acordo com as instruções do fabricante, utilizando uma espátula de cimento numa folha de papel encerado.

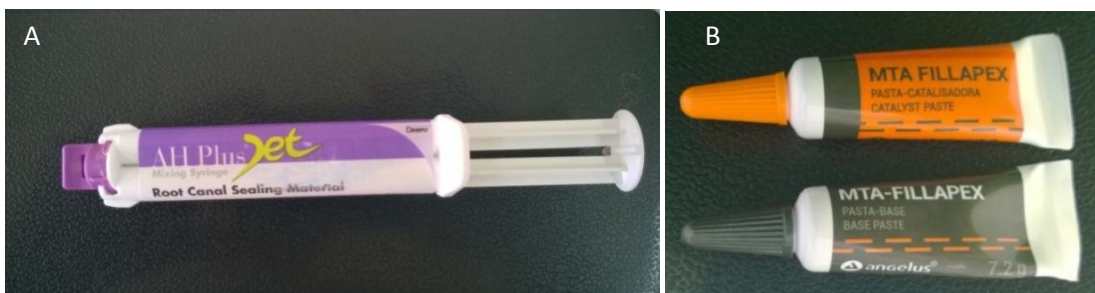


Figura 3. Cimentos utilizados no estudo: A) Cimento AH Plus Jet® B) Cimento MTA Fillapex®, pasta catalisadora e pasta base

Tabela 3 – Composição, lote, validade e fabricante dos dois cimentos endodônticos utilizados no estudo

Cimento	Composição	Lote	Validade	Fabricante
AH Plus	Pasta A: Resina epóxi bisfenol-A, resina epóxi bisfenol-F, tungstato de cálcio, óxido de zircônio, sílica, pigmentos de óxido de ferro	1502000450	2017-01	Dentsply DeTrey GmbH, Konstanz, Alemanha
	Pasta B: Dibenzildiamina, aminoadamantano, diamina-tricyclodecane, tungstato de cálcio, óxido de zircônio, sílica, óleo de silicone	1502000450	2017-01	Dentsply DeTrey GmbH, Konstanz, Alemanha
MTA Fillapex	Pasta Base: Resina salicilato, resina natural, tungstato de cálcio, sílica nanoparticulada, pigmentos	34972	2017-04	Angelus, Londrina, Brasil
	Pasta Catalizadora: Resina diluente, mineral trióxido agregado, sílica nanoparticulada, pigmentos.	34971	2017-04	Angelus, Londrina, Brasil

Foram feitos os cálculos necessários para determinar a quantidade de cimento para cada grupo. Os cimentos foram pesados na balança Precisa 125A (figura 4).

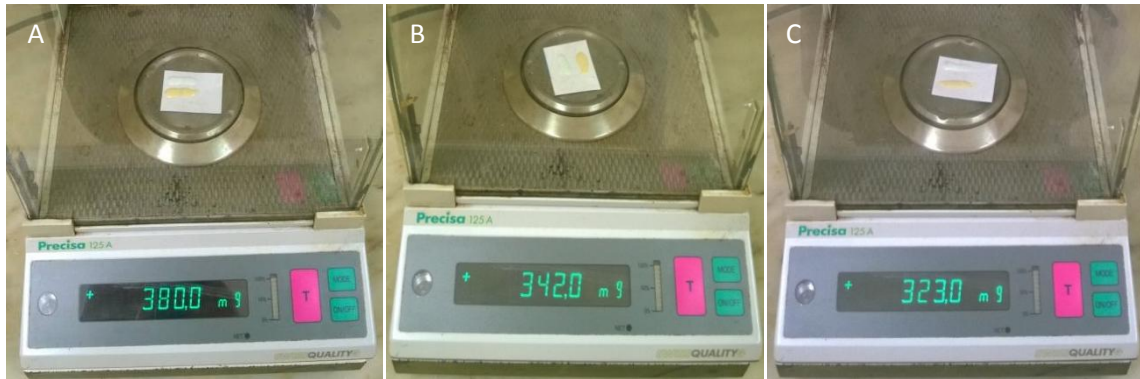


Figura 4. Pesagem dos cimentos a testar, consoante a adição de digluconato de clorhexidina: A) Grupo sem adição de digluconato de clorhexidina B) Grupo antes da adição de digluconato de clorhexidina a 2% C) Grupo antes da adição de digluconato de clorhexidina a 3%

### 5.2.2. Digluconato de Clorhexidina

A partir de digluconato de clorhexidina a 20%, foram feitos os cálculos necessários para determinar a quantidade a incorporar para obter as duas percentagens a estudo: 2% e 3%. O digluconato de clorhexidina foi incorporado nos cimentos, utilizando uma micropipeta p100 e misturada juntamente com os componentes do cimento, com auxílio de uma espátula de cimento numa folha de papel encerado (figura5).



Figura 5. A) Digluconato de clorhexidina a 20%. B) Pasta B do cimento AH Plus Jet, digluconato de clorhexidina, e pasta A do cimento AH Plus Jet, antes da mistura

### 5.3. Grupos de estudo

Consoante o cimento utilizado e a incorporação ou não do digluconato de clorhexidina, a diferentes concentrações, estabeleceram-se os seguintes grupos a estudo:

Grupo 1: Cimento AH Plus

Grupo 2: Cimento AH Plus + digluconato de clorhexidina 2%

Grupo 3: Cimento AH Plus + digluconato de clorhexidina 3%

Grupo 4: Cimento MTA Fillapex

Grupo 5: Cimento MTA Fillapex + digluconato de clorhexidina 2%

Grupo 6: Cimento MTA Fillapex + digluconato de clorhexidina 3%

Grupo 7: Controlo positivo (+)

Grupo 8: Controlo negativo (-)

#### 5.4. Distribuição das placas e variáveis de estudo

Foram utilizadas 8 microplacas de poliestireno com 96 poços de fundo plano. Cada microplaca foi organizada de modo a que os vários grupos pudessem ser testados na mesma placa, bem como o controlo positivo e o controlo negativo, sem, no entanto, haver contaminações cruzadas. A imagem esquemática das microplacas corresponde à figura 6.

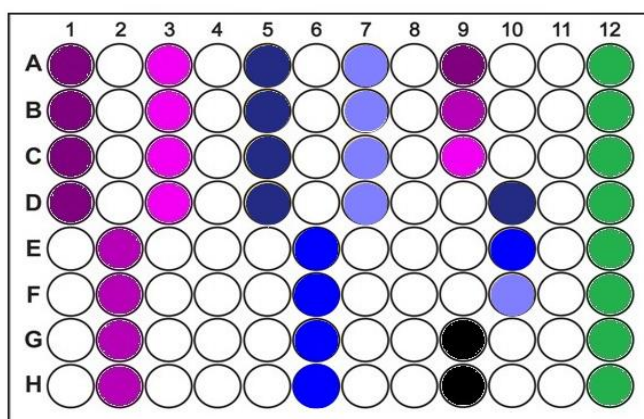


Figura 6. Organização esquemática da divisão de uma microplaca de 96 poços em 8 grupos

O Grupo 1, identificado pela cor roxa, correspondia a quatro poços com uma parede revestida com cimento AH Plus, sem a adição de digluconato de clorhexidina, e posterior adição de microrganismo e meio de crescimento;

O Grupo 2, identificado pela cor lilás, correspondia a quatro poços com uma parede revestida com cimento AH Plus, com a adição de digluconato de clorhexidina a 2%, e posterior adição de microrganismo e meio de crescimento;

O Grupo 3, identificado pela cor rosa, correspondia a quatro poços com uma parede revestida com cimento AH Plus, com a adição de digluconato de clorhexidina a 3%, e posterior adição de microrganismo e meio de crescimento;

O Grupo 4, identificado pela cor azul escuro, correspondia a quatro poços com uma parede revestida com cimento MTA Fillapex, sem a adição de digluconato de clorhexidina, e posterior adição de microrganismo e meio de crescimento;

O Grupo 5, identificado pela cor azul, correspondia a quatro poços com uma parede revestida com cimento MTA Fillapex, com a adição de digluconato de clorhexidina a 2%, e posterior adição de microrganismo e meio de crescimento;

O Grupo 6, identificado pela cor azul claro, correspondia a quatro poços com uma parede revestida com cimento MTA Fillapex, com a adição de digluconato de clorhexidina a 3%, e posterior adição de microrganismo e meio de crescimento;

O Grupo 7, denominado controlo negativo, correspondia a um poço igual a um de cada grupo anterior, mas sem a posterior adição de microrganismo; e dois poços, identificados pela cor preto, sem a adição de cimento nem microrganismo, apenas com meio de crescimento;

O Grupo 8, denominado controlo positivo, identificado pela cor verde, correspondia a oito poços sem revestimento de cimento nem digluconato de clorhexidina, apenas com o microrganismo e o meio de crescimento;

Para os grupos 1 e 4 foram utilizados 380 miligramas (mg) de cimento.

Para os grupos 2 e 5, foram utilizados 342 mg de cimento e 38 microlitros ( $\mu$ l) de digluconato de clorhexidina a 20%.

Para os grupos 3 e 6, foram utilizados 323 mg de cimento e 57  $\mu$ l de digluconato de clorhexidina 20%.

Das 8 microplacas, foram utilizadas 4 microplacas onde os cimentos estiveram em contacto direto com o *Enterococcus faecalis* e nas restantes 4 microplacas, os cimentos estiveram em contacto direto com a *Candida albicans*, correspondendo à variável microrganismo.

As 4 microplacas de cada microrganismo, atendendo à variável tempo, foram posteriormente divididas em 4 grupos:

Grupo A, que corresponde à utilização de uma microplaca para cada microrganismo com os cimentos a fresco;

Grupo B, que corresponde à utilização de uma microplaca para cada microrganismo com os cimentos envelhecidos 1 dia;

Grupo C, que corresponde à utilização de uma microplaca para cada microrganismo com os cimentos envelhecidos 3 dias;

Grupo D, que corresponde à utilização de uma microplaca para cada microrganismo com os cimentos envelhecidos 1 semana;

## **6. Teste de Contacto Direto**

Para avaliar a atividade antimicrobiana dos cimentos endodônticos foi selecionado o teste de contacto direto, desenvolvido por Weiss, Shalhav, & Fuss, 1996 que tem por base a análise da capacidade antimicrobiana dos materiais testados, frente a microrganismos.

A manipulação das microplacas para a realização de toda a experiência decorreu na câmara de fluxo laminar, de forma a evitar a ocorrência de contaminações.

Cada microplaca foi mantida na vertical e foi seguido o esquema anteriormente representado onde os cimentos, sem a adição de digluconato de clorhexidina ou com a adição das duas concentrações de digluconato de clorhexidina a testar, foram colocados. Para tal, foi utilizada uma espátula Heidemann de compósito, de modo a revestir uniformemente uma parede que corresponde aproximadamente à metade de cada poço, e sem que houvesse deposição de cimento no fundo do mesmo, o que poderia levar a interferências na passagem do feixe de luz no momento da leitura, pelo leitor de microplacas. Foram ainda preenchidos seis poços de acordo com o mesmo método anteriormente descrito, correspondentes ao controlo negativo. Antes de serem retiradas da câmara de fluxo laminar, as placas foram sempre tapadas com a respetiva tampa estéril (figura 7).

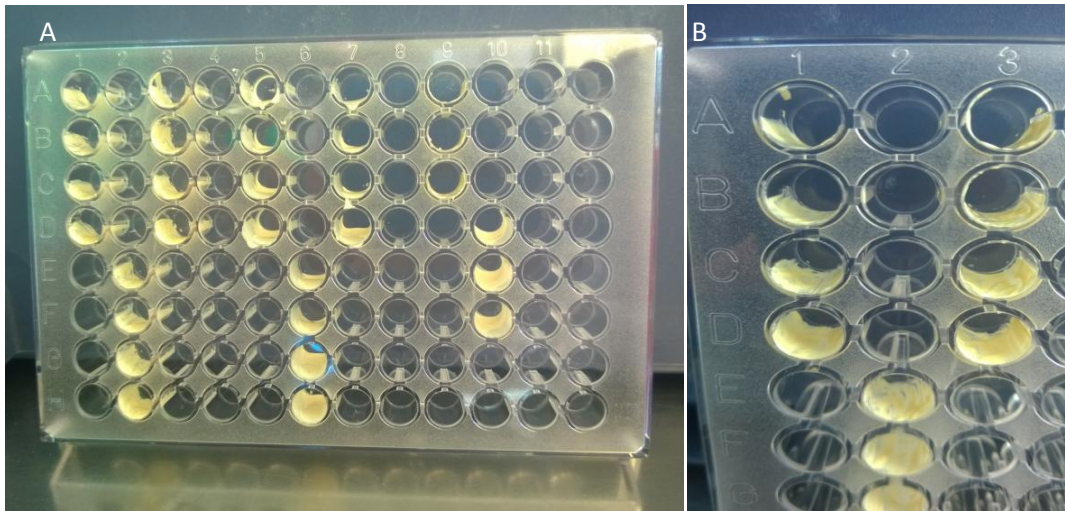


Figura 7. A) Microplaca preenchida com os cimentos a testar, antes da incorporação dos microrganismos e do meio BHI. B) Pormenor de uma fila da microplaca, a demonstrar que não houve preenchimento do fundo do poço

As duas placas do grupo A e as dos restantes grupos foram 1h à estufa a 37°C, para acelerar a toma de presa do cimento.

Após esse período, as placas do grupo B foram preenchidas com tampão fosfato salino (PBS) estéril durante 24h, e nas restantes placas dos grupos C e D o mesmo meio PBS estéril foi renovado a cada 48h para evitar que os cimentos secassem, e posteriormente guardadas na estufa a 37°C até serem utilizadas.

Seguidamente, as placas foram retiradas da estufa e foram colocados nos poços revestidos com cimento, assim como nos poços do grupo de controlo positivo, 10 µls de inóculo preparado anteriormente, com ajuda de uma micropipeta p10 (figura 8).



Figura 8. Pormenor do microrganismo em contacto com o cimento a testar

Após este passo, as placas foram novamente colocadas na estufa, mantidas na vertical, a incubar 1 hora a 37°C em humidade relativa, até à evaporação evidente da suspensão líquida, assegurando o contacto direto entre os microrganismos e as superfícies dos materiais testados.

Decorrido esse período, na câmara de fluxo laminar, a placa foi colocada na horizontal, e utilizando uma micropipeta p1000, foram adicionados 250 µl de meio de crescimento BHI estéril a cada poço revestido a cimento e microrganismo, 250 µl de meio de crescimento BHI estéril aos poços do controlo positivo e 260 µl de meio de crescimento BHI estéril aos poços de controlo negativo (figura 9).

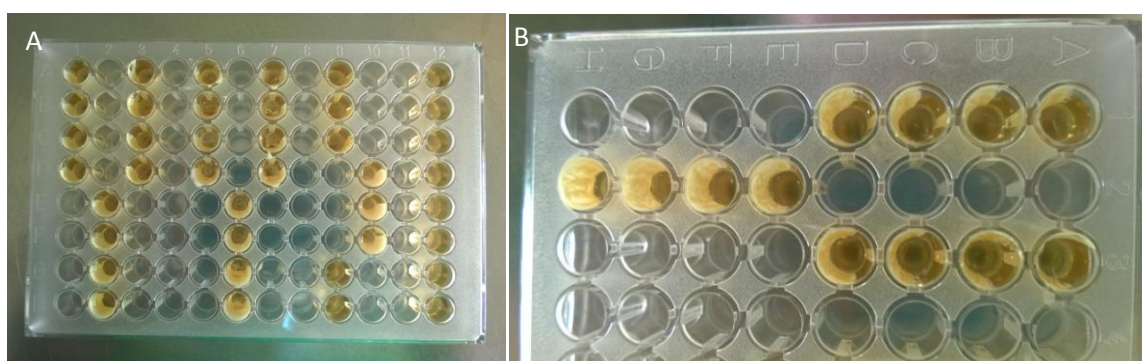


Figura 9. A) Microplaca preenchida com os cimentos a testar, com os microrganismos e com o meio BHI nos respetivos poços. B) Ampliação de uma zona da microplaca

As placas foram depois levadas ao agitador de placas Certomat MO II durante 2 minutos de modo a homogeneizar bem o conteúdo de cada poço (figura 10). Este procedimento foi realizado sempre antes de cada leitura no leitor de microplacas, para garantir uma suspensão o mais homogénea possível.



Figura 10. Microplaca no agitador de placas

Finalmente as placas foram colocadas no leitor de microplacas Platos R496, calibrado para medir a densidade ótica (turbidez) ao comprimento de onda de 630 nanómetros

(nm), e foram feitas medições nos tempos estabelecidos, sempre com as placas a voltarem à estufa a 37°C após cada leitura (figura 11).

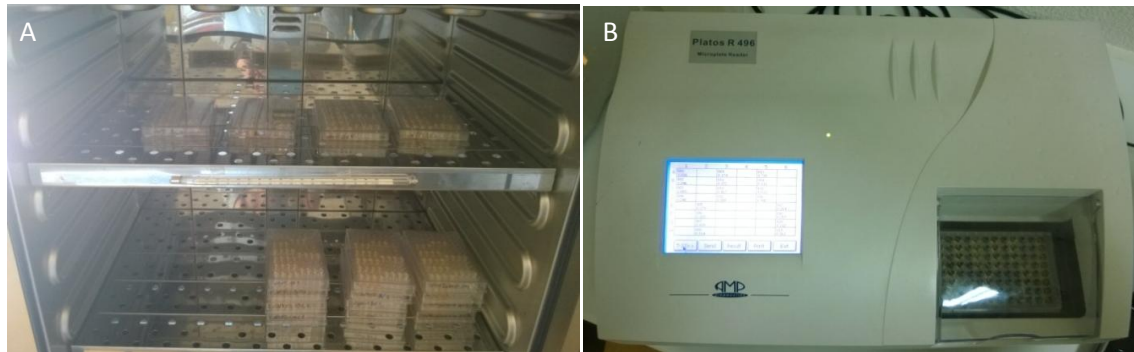


Figura 11. A) Microplacas na estufa. B) Leitor de microplacas Platos R496 apresentando os resultados da medição

Os tempos de medição ocorreram às: 0h; 0,5h; 1h; 1,5h; 2h; 2,5h; 3h; 3,5h; 4h; 5h; 6h; 7h; 8h; 9h; 10h; 11h; 12h; 24h; 26h; 28h; 30h; 32h e 34h para ambos os microrganismos.

Toda a experiência foi realizada em duplicado e os valores de todas as placas foram anotados, e foi feita a média aritmética dos valores entre cada grupo.

Previamente foram feitos testes-piloto para observar o crescimento microbiano sob condições experimentais de uma maneira quantitativa e reproduzível.

## **7. Critérios de avaliação**

A partir dos valores médios de absorvância dos poços do controlo positivo, foram subtraídos os valores médios de absorvância dos poços de controlo negativo sem material a ser testado, e foi traçada uma curva de crescimento para cada microrganismo.

Os valores médios de absorvância, em nanómetros (nm) dos grupos de controlo negativo foram anotados, e foi feita a subtração dos valores médios dos poços do controlo negativo sem material, para traçar a curva de crescimento para o microrganismo *Candida albicans* (figura 12).

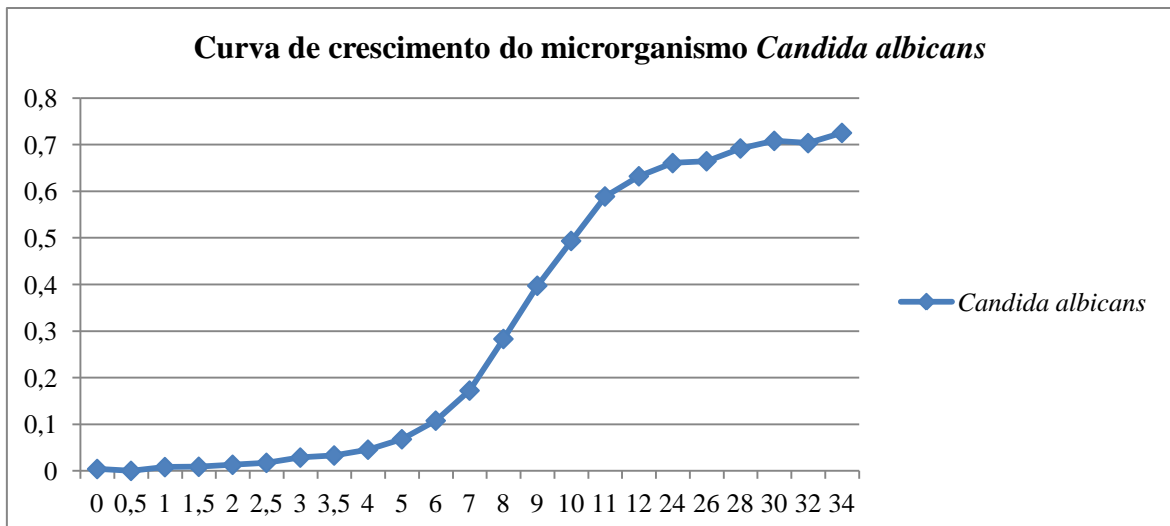


Figura 12. Valores médios de absorvância (nm) o microrganismo *Candida albicans*, durante o tempo de estudo

Os valores médios de absorvância, em nanómetros (nm) dos grupos de controlo negativo foram anotados, e foi feita a subtração dos valores médios dos poços do controlo negativo sem material, para traçar a curva de crescimento para o microrganismo *Enterococcus faecalis* (figura 13).

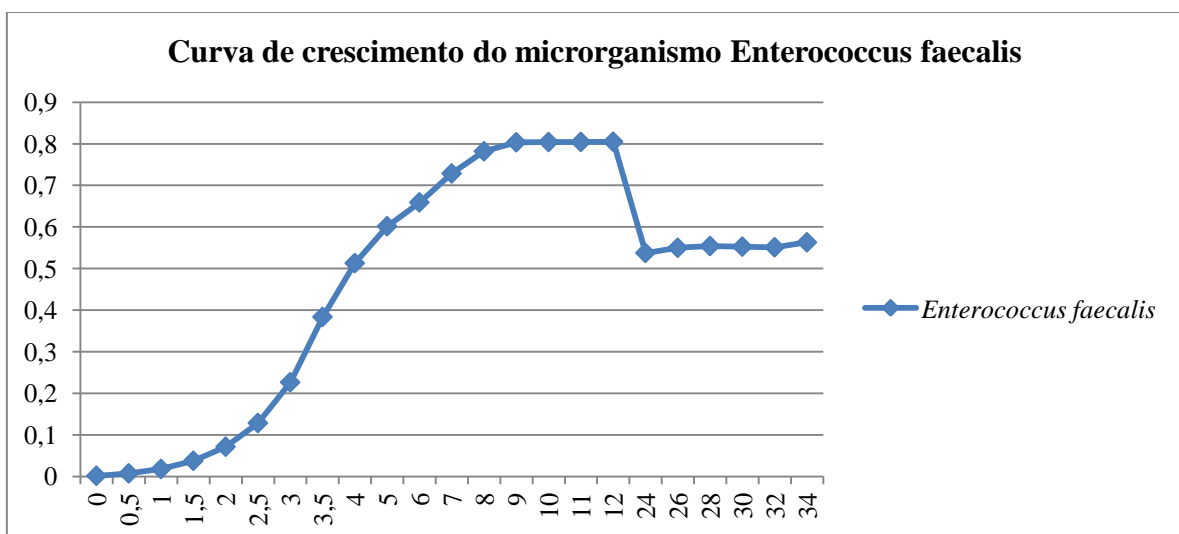


Figura 13. Valores médios de absorvância (nm) para o microrganismo *Enterococcus faecalis*, durante o tempo de estudo

De seguida, foram seleccionados os intervalos de tempo de 0; 6; 10 e 30 horas para serem estudados no caso do microrganismo *Candida albicans* e os intervalos de tempo de 0; 2,5; 5 e 10 horas para serem estudados no caso do microrganismo *Enterococcus faecalis*.

A estes valores médios de absorvância dos poços relativos a cada grupo, foram subtraídos os valores médios de absorvância dos poços negativos correspondentes, e feita a análise

estatística. Quanto maior o valor de absorvância, menor a capacidade antimicrobiana do material em estudo.

## **8. Base de dados para o registo**

Os dados laboratoriais foram introduzidos no Programa Microsoft Excel, para que fosse possível uma análise estatística.

## **9. Análise estatística**

Para a análise estatística dos resultados, foi obtida a ajuda do departamento de estatística do Instituto Superior de Ciências da Saúde Egas Moniz. Os resultados foram submetidos a uma análise estatística inferencial, com utilização do software SPSS<sup>®</sup> versão 23 para Windows, com os testes ANOVA one-way com correção de Brown-Forsythe e teste post-Hoc Tamhane, e ANOVA one-way com correção de Brown-Forsythe e teste post-Hoc Dunnett, tendo sido considerado um nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ).

### III – Resultados

#### 1. Análise por grupos

Após o registo da absorvância em nanómetros (nm), foi calculada a média nos 4 tempos de envelhecimento, nos 4 períodos de contacto analisados e dos dois microrganismos utilizados para cada grupo.

Observando a tabela 4, o grupo que apresentou o valor médio mais alto de absorvância foi o do cimento AH Plus sem a adição de digluconato de clorhexidina (0,267 nm), e o grupo que apresentou o valor médio mais baixo de absorvância foi o do cimento MTA Fillapex com a adição de digluconato de clorhexidina a 3% (0,010 nm). Houve diferenças estatisticamente significativas entre estes dois grupos, e nos seguintes: entre o AH Plus sem a adição de digluconato de clorhexidina e o AH Plus com a adição de digluconato de clorhexidina a 3%; entre o AH Plus sem a adição de digluconato de clorhexidina e o MTA Fillapex com a adição de digluconato de clorhexidina a 2%; entre o AH Plus com a adição de digluconato de clorhexidina a 2% e o AH Plus com a adição de digluconato de clorhexidina a 3%; entre o AH Plus com a adição de digluconato de clorhexidina a 2% e o MTA Fillapex com a adição de digluconato de clorhexidina a 2%; entre o AH Plus com a adição de digluconato de clorhexidina a 2% e o MTA Fillapex com a adição de digluconato de clorhexidina a 3%; entre o AH Plus com a adição de digluconato de clorhexidina a 3% e o MTA Fillapex sem a adição de digluconato de clorhexidina; entre o MTA Fillapex sem a adição de digluconato de clorhexidina e o MTA Fillapex com a adição de digluconato de clorhexidina a 2%; entre o MTA Fillapex sem a adição de digluconato de clorhexidina e o MTA Fillapex com a adição de digluconato de clorhexidina a 3%; entre o MTA Fillapex com a adição de digluconato de clorhexidina a 2% e o MTA Fillapex a com adição de digluconato de clorhexidina a 3%. Os resultados podem ser confirmados pela figura 14.

Tabela 4. Valores médios de absorvância em nanómetros (nm) e intervalos de confiança para os grupos de estudo

Grupos a estudo	Média de absorvância (nm) ± Desvio Padrão	Intervalo de confiança de 95% para média	
		Limite inferior	Limite superior
Grupo 1: Cimento AH Plus	0,267 ± 0,363	0,129	0,396
Grupo 2: Cimento AH Plus + digluconato de clorhexidina 2%	0,118 ± 0,101	0,079	0,156
Grupo 3: Cimento AH Plus + digluconato de clorhexidina 3%	0,025 ± 0,024	0,013	0,037
Grupo 4: Cimento MTA Fillapex	0,208 ± 0,117	0,159	0,257
Grupo 5: Cimento MTA Fillapex + digluconato de clorhexidina 2%	0,048 ± 0,025	0,038	0,058
Grupo 6: Cimento MTA Fillapex + digluconato de clorhexidina 3%	0,010 ± 0,008	0,006	0,014

\*Teste ANOVA com correção Brown-Forsythe ( $p < 0,001$ ) e teste post-Hoc Tamhane ( $p < 0,05$ )

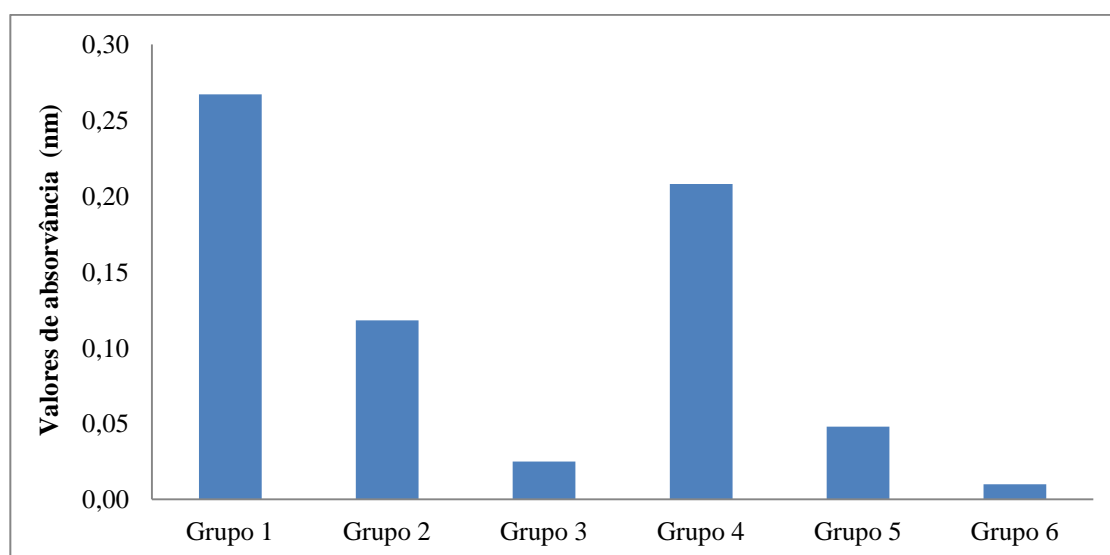


Figura 14. Distribuição dos valores médios de absorvância (nm) para os grupos de estudo e para os dois microrganismos

## 2. Análise por grupo por microrganismo

Após o registo da absorvância em nanómetros, foi calculada a média nos 4 tempos de envelhecimento e nos 4 períodos de contacto analisados para cada microrganismo.

Observando a tabela 5, o grupo que apresentou o valor médio mais alto de absorvância foi o do cimento MTA Fillapex sem a adição de digluconato de clorhexidina (0,237 nm), e o grupo que apresentou o valor médio mais baixo de absorvância foi o do cimento MTA Fillapex com a adição de digluconato de clorhexidina a 3% (0,007 nm), relativamente à *Candida albicans*, como pode ser observado na figura 15. Houve diferenças estatisticamente significativas entre estes dois grupos. Houve também diferenças estatisticamente significativas entre os grupos AH Plus sem a adição de digluconato de clorhexidina e MTA Fillapex sem a adição de digluconato de clorhexidina; AH Plus com

a adição de digluconato de clorhexidina a 2% e MTA Fillapex sem a adição de digluconato de clorhexidina; AH Plus com a adição de digluconato de clorhexidina a 2% e MTA Fillapex com a adição de digluconato de clorhexidina a 3%; MTA Fillapex sem a adição de digluconato de clorhexidina e MTA Fillapex com a adição de digluconato de clorhexidina a 2%; MTA Fillapex com a adição de digluconato de clorhexidina a 2% e MTA Fillapex com a adição de digluconato de clorhexidina a 3%.

Tabela 5. Valores médios de absorvância (nm) e intervalos de confiança, entre os grupos de estudo, para o microrganismo *Candida albicans*

Grupos a estudo	Média de absorvância (nm) ± Desvio Padrão	Intervalo de confiança de 95% para média	
		Limite inferior	Limite superior
Grupo 1: Cimento AH Plus	0,040 ± 0,033	0,015	0,066
Grupo 2: Cimento AH Plus + digluconato de clorhexidina 2%	0,108 ± 0,089	0,056	0,159
Grupo 3: Cimento AH Plus + digluconato de clorhexidina 3%	0,178 ± 0,216	0,059	0,298
Grupo 4: Cimento MTA Fillapex	0,237 ± 0,092	0,179	0,296
Grupo 5: Cimento MTA Fillapex + digluconato de clorhexidina 2%	0,067 ± 0,045	0,041	0,093
Grupo 6: Cimento MTA Fillapex + digluconato de clorhexidina 3%	0,007 ± 0,003	0,004	0,009

\*Teste ANOVA com correção Brown-Forsythe ( $p < 0,001$ ) e teste post-Hoc Tamhane ( $p < 0,05$ )

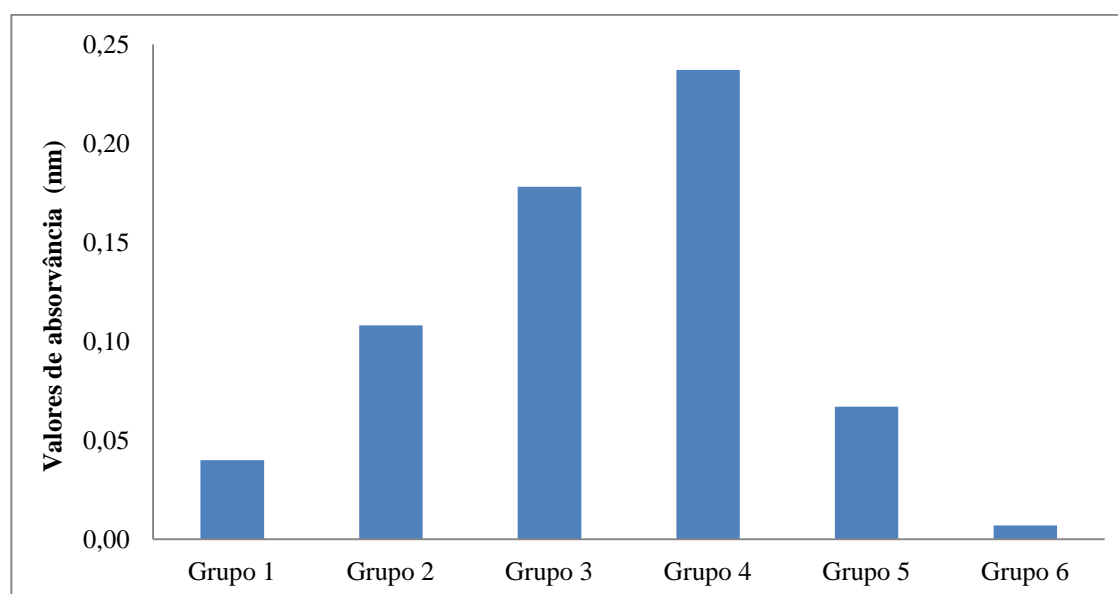


Figura 15. Distribuição dos valores médios de absorvância (nm) por grupo para microrganismo *Candida albicans*

Observando a tabela 6, o grupo que apresentou o valor médio mais alto de absorvância foi o do cimento MTA Fillapex sem a adição de digluconato de clorhexidina (0,339 nm), e o grupo que apresentou o valor médio mais baixo de absorvância foi o do cimento MTA Fillapex com a adição de digluconato de clorhexidina a 3% (0,017 nm), relativamente ao *Enterococcus faecalis*, observável na figura 16. Houve diferenças estatisticamente

significativas entre estes dois grupos. Foram também encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos AH Plus com a adição de digluconato de clorhexidina a 2% e AH Plus com a adição de digluconato de clorhexidina a 3%; AH Plus com a adição de digluconato de clorhexidina a 2% e MTA Fillapex com a adição de digluconato de clorhexidina a 3%; AH Plus com a adição de digluconato de clorhexidina a 3% e MTA Fillapex sem a adição de digluconato de clorhexidina; AH Plus com a adição de digluconato de clorhexidina a 3% e MTA Fillapex com a adição de digluconato de clorhexidina a 2%; MTA Fillapex sem a adição de digluconato de clorhexidina e MTA Fillapex com a adição de digluconato de clorhexidina a 2%; MTA Fillapex com a adição de digluconato de clorhexidina a 2% e MTA Fillapex com a adição de digluconato de clorhexidina a 3%.

Tabela 6. Valores médios de absorvância (nm) e intervalos de confiança entre os grupos de estudo, para o microrganismo *Enterococcus faecalis*

Grupos a estudo	Média de absorvância (nm) ± Desvio Padrão	Intervalo de confiança de 95% para média	
		Limite inferior	Limite superior
Grupo 1: Cimento AH Plus	0,259 ± 0,362	0,066	0,452
Grupo 2: Cimento AH Plus + digluconato de clorhexidina 2%	0,127 ± 0,113	0,064	0,189
Grupo 3: Cimento AH Plus + digluconato de clorhexidina 3%	0,020 ± 0,018	0,007	0,032
Grupo 4: Cimento MTA Fillapex	0,339 ± 0,313	0,173	0,506
Grupo 5: Cimento MTA Fillapex + digluconato de clorhexidina 2%	0,046 ± 0,017	0,037	0,056
Grupo 6: Cimento MTA Fillapex + digluconato de clorhexidina 3%	0,017 ± 0,014	0,007	0,026

\*Teste ANOVA com correção Brown-Forsythe ( $p < 0,001$ ) e teste post-Hoc Tamhane ( $p < 0,05$ )

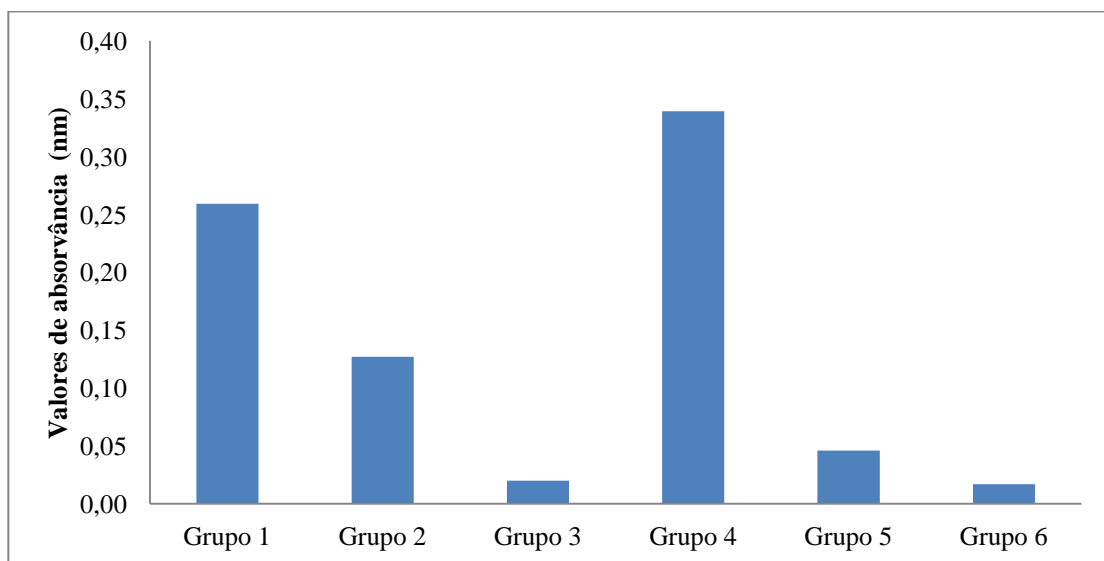


Figura 16. Distribuição dos valores médios de absorvância (nm) por grupo para o microrganismo *Enterococcus faecalis*

### 3. Análise por tempo de envelhecimento

#### 3.1. Análise do tempo de envelhecimento para cada microrganismo

Após o registo da absorvância em nanómetros, foi calculada a média nos 4 tempos de envelhecimento para cada um dos microrganismos utilizados.

Observando a tabela 7, o tempo de envelhecimento que apresentou o valor médio mais alto de absorvância foi o de cimento envelhecido 168 horas (0,487 nm), e o grupo que apresentou o valor médio mais baixo de absorvância foi o de cimento envelhecido 24 horas (0,021 nm), relativamente à *Candida albicans*, como indica a figura 17. Houve diferenças estatisticamente significativas entre estes dois grupos. Foram também observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos Fresco e envelhecido 24 horas; Fresco e envelhecido 168 horas; envelhecido 24 horas e envelhecido 72 horas; envelhecido 72 horas e envelhecido 168 horas.

Tabela 7. Valores médios de absorvância (nm) e intervalos de confiança por tempo de envelhecimento, para o microrganismo *Candida albicans*

Tempo de envelhecimento	Média de absorvância (nm) ± Desvio Padrão	Intervalo de confiança de 95% para média	
		Limite inferior	Limite superior
Fresco	0,175 ± 0,147	0,113	0,237
24 Horas	0,021 ± 0,013	0,014	0,027
72 Horas	0,092 ± 0,079	0,057	0,128
168 Horas	0,487 ± 0,486	0,281	0,692

\*Teste ANOVA com correção Brown-Forsythe ( $p < 0,001$ ) e teste post-Hoc Tamhane ( $p < 0,05$ )

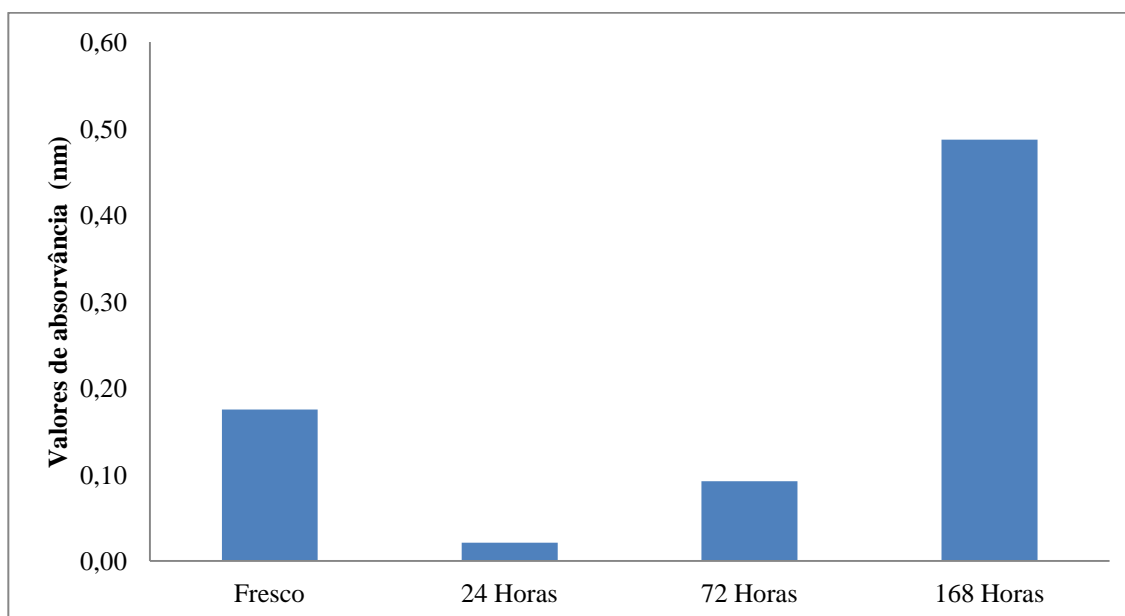


Figura 17. Distribuição dos valores médios de absorvância (nm) por tempo de envelhecimento, para o microrganismo *Candida albicans*

Observando a tabela 8, o tempo de envelhecimento que apresentou o valor médio mais alto de absorvância foi o de cimento envelhecido 168 horas (0,313 nm), e o grupo que apresentou o valor médio mais baixo de absorvância foi o de cimento envelhecido 72 horas (0,034 nm), relativamente ao *Enterococcus faecalis*, como demonstrado na figura 18. Houve diferenças estatisticamente significativas entre estes dois grupos. Houve também diferenças estatisticamente significativas entre os grupos Fresco e envelhecido 24 horas; Fresco e envelhecido 72 horas; envelhecido 24 horas e envelhecido 168 horas.

Tabela 8. Valores médios de absorvância (nm) e intervalos de confiança por tempo de envelhecimento, para o microrganismo *Enterococcus faecalis*

Tempo de envelhecimento	Média de absorvância (nm) ± Desvio Padrão	Intervalo de confiança de 95% para média	
		Limite inferior	Limite superior
Fresco	0,162 ± 0,169	0,091	0,234
24 Horas	0,036 ± 0,026	0,023	0,048
72 Horas	0,034 ± 0,026	0,021	0,047
168 Horas	0,313 ± 0,391	0,148	0,477

\*Teste ANOVA com correção Brown-Forsythe ( $p < 0,001$ ) e teste post-Hoc Tamhane ( $p < 0,05$ )

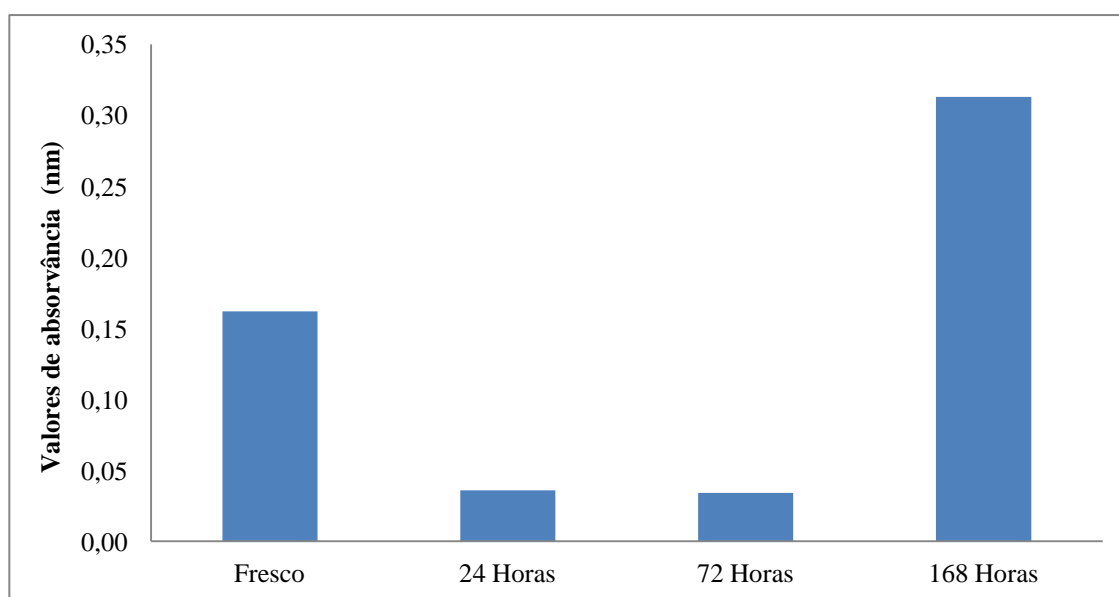


Figura 18. Distribuição dos valores médios de absorvância (nm) por tempo de envelhecimento, para o microrganismo *Enterococcus faecalis*

### 3.2. Análise do tempo de envelhecimento por grupo para cada microrganismo

Após o registo da absorvância em nanómetros, foi calculada a média nos 4 tempos de envelhecimento para cada grupo e para cada um dos microrganismos utilizados.

Observando a tabela 9, o grupo que apresentou o valor médio mais alto de absorvância foi o do cimento MTA Fillapex envelhecido 168 horas e sem adição de digluconato de clorhexidina (0,692 nm), e o grupo que apresentou o valor médio mais baixo de

absorvância foi o do cimento MTA Fillapex envelhecido 72 horas e com adição de digluconato de clorhexidina a 3% (0,005 nm), tal como mostra também a figura 19, relativamente à *Candida albicans*. Apesar de existirem diferenças entre os tempos de envelhecimento para cada grupo, estas não são estatisticamente significativas.

Tabela 9. Valores médios de absorvância (nm) e intervalos de confiança para os diferentes grupos nos quatro tempos de envelhecimento estudados, para o microrganismo *Candida albicans*

Grupos a estudo	Tempo envelhecimento	Média de absorvância (nm) ± Desvio Padrão	Intervalo de confiança de 95% para média	
			Limite inferior	Limite superior
Grupo 1: Cimento AH Plus	Fresco	0,048 ± 0,023	0,01	0,085
	24 Horas	0,174 ± 0,254	-0,23	0,577
	72 Horas	0,443 ± 0,476	-0,314	1,201
	168 Horas	0,651 ± 0,626	-0,345	1,647
Grupo 2: Cimento AH Plus + digluconato de clorhexidina 2%	Fresco	0,188 ± 0,090	0,044	0,331
	24 Horas	0,030 ± 0,015	0,006	0,054
	72 Horas	0,113 ± 0,065	0,009	0,217
	168 Horas	0,488 ± 0,516	-0,332	1,308
Grupo 3: Cimento AH Plus + digluconato de clorhexidina 3%	Fresco	0,350 ± 0,189	0,048	0,651
	24 Horas	0,018 ± 0,012	-0,001	0,037
	72 Horas	0,096 ± 0,112	-0,082	0,273
	168 Horas	0,521 ± 0,567	-0,382	1,424
Grupo 4: Cimento MTA Fillapex	Fresco	0,286 ± 0,117	0,1	0,472
	24 Horas	0,334 ± 0,203	0,011	0,658
	72 Horas	0,320 ± 0,299	-0,156	0,796
	168 Horas	0,692 ± 0,551	-0,185	1,569
Grupo 5: Cimento MTA Fillapex + digluconato de clorhexidina 2%	Fresco	0,092 ± 0,054	0,007	0,178
	24 Horas	0,031 ± 0,022	-0,004	0,065
	72 Horas	0,093 ± 0,031	0,044	0,142
	168 Horas	0,323 ± 0,441	-0,379	1,025
Grupo 6: Cimento MTA Fillapex + digluconato de clorhexidina 3%	Fresco	0,085 ± 0,075	-0,034	0,205
	24 Horas	0,014 ± 0,011	-0,004	0,032
	72 Horas	0,005 ± 0,003	0	0,01
	168 Horas	0,246 ± 0,359	-0,326	0,817

\*Teste ANOVA com correção Brown-Forsythe (p=0,055)

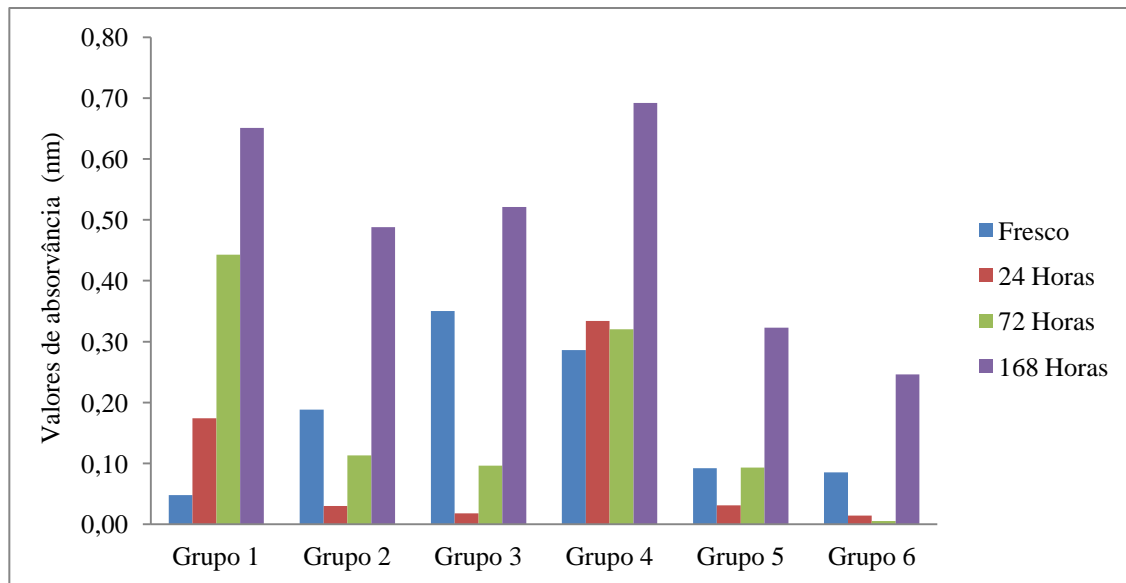


Figura 19. Distribuição dos valores médios de absorvância (nm) para os diferentes grupos nos quatro tempos de envelhecimento estudados, para o microrganismo *Candida albicans*

Observando a tabela 10, o grupo que apresentou o valor médio mais alto de absorvância foi o do cimento MTA Fillapex envelhecido 168 horas sem a adição de digluconato de clorhexidina (0,569 nm), e o grupo que apresentou o valor médio mais baixo de absorvância foi o do cimento MTA Fillapex envelhecido 72 horas com a adição de digluconato de clorhexidina a 3% (0,007 nm), tal como mostra a figura 20, relativamente ao *Enterococcus faecalis*. Apesar de existirem diferenças entre os tempos de envelhecimento para cada grupo, estas não são estatisticamente significativas.

Tabela 10. Valores médios de absorvância (nm) e intervalos de confiança para todos os grupos nos quatro tempos de envelhecimento estudados, para o microrganismo *Enterococcus faecalis*

Grupos a estudo	Tempo envelhecimento	Média de absorvância (nm) ± Desvio Padrão	Intervalo de confiança de 95% para média	
			Limite inferior	Limite superior
Grupo 1: Cimento AH Plus	Fresco	0,023 ± 0,009	0,008	0,037
	24 Horas	0,142 ± 0,218	-0,205	0,488
	72 Horas	0,426 ± 0,435	-0,266	1,117
	168 Horas	0,447 ± 0,493	-0,337	1,230
Grupo 2: Cimento AH Plus + digluconato de clorhexidina 2%	Fresco	0,269 ± 0,097	0,114	0,424
	24 Horas	0,057 ± 0,019	0,027	0,087
	72 Horas	0,097 ± 0,085	-0,038	0,232
	168 Horas	0,332 ± 0,531	-0,513	1,177
Grupo 3: Cimento AH Plus + digluconato de clorhexidina 3%	Fresco	0,409 ± 0,160	0,154	0,664
	24 Horas	0,014 ± 0,015	-0,010	0,037
	72 Horas	0,019 ± 0,020	-0,013	0,051
	168 Horas	0,296 ± 0,443	-0,410	1,001
Grupo 4: Cimento MTA Fillapex	Fresco	0,129 ± 0,180	-0,16	0,42
	24 Horas	0,350 ± 0,291	-0,11	0,81
	72 Horas	0,309 ± 0,344	-0,24	0,86
	168 Horas	0,569 ± 0,350	0,01	1,13
Grupo 5: Cimento MTA Fillapex + digluconato de clorhexidina 2%	Fresco	0,047 ± 0,024	0,008	0,086
	24 Horas	0,048 ± 0,012	0,029	0,067
	72 Horas	0,048 ± 0,014	0,026	0,070
	168 Horas	0,180 ± 0,307	-0,309	0,668
Grupo 6: Cimento MTA Fillapex + digluconato de clorhexidina 3%	Fresco	0,097 ± 0,063	-0,003	0,197
	24 Horas	0,025 ± 0,018	-0,004	0,053
	72 Horas	0,007 ± 0,006	-0,003	0,017
	168 Horas	0,052 ± 0,066	-0,054	0,157

\*Teste ANOVA com correção Brown-Forsythe (p=0,064)

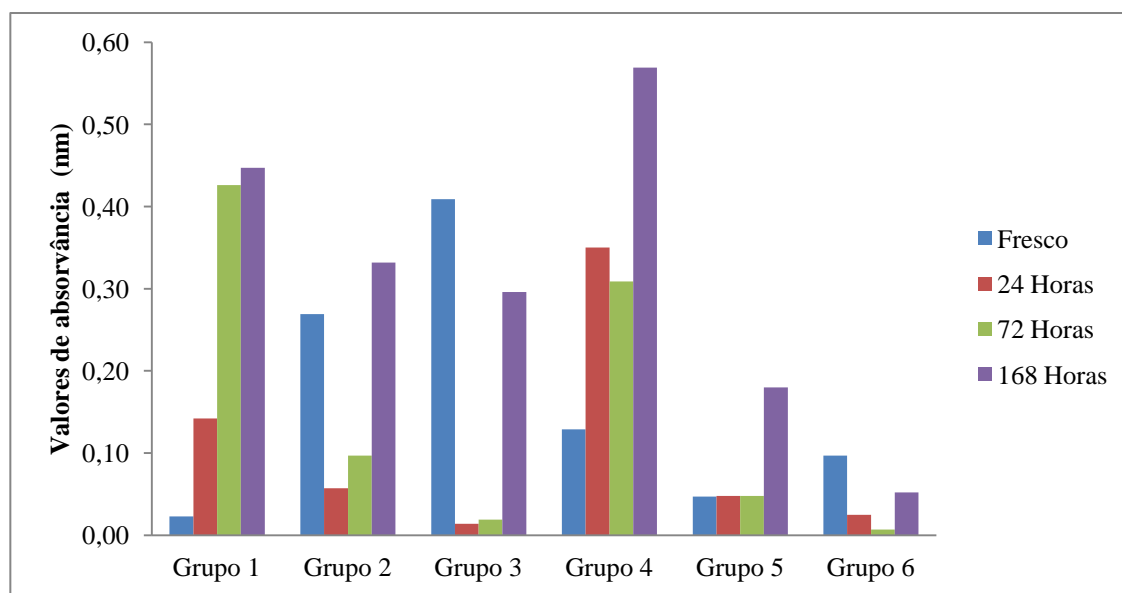


Figura 20. Distribuição dos valores médios de absorvância (nm) para os diferentes grupos nos quatro tempos de envelhecimento estudados, para o microrganismo *Enterococcus faecalis*

#### 4. Análise por tempo de contacto

##### 4.1. Análise por tempo de contacto para cada microrganismo

Após o registo da absorvância em nanómetros, foi calculada a média nos 4 tempos de contacto, para cada um dos microrganismos utilizados.

Observando a tabela 11, o tempo de contacto que apresentou o valor médio mais alto de absorvância foi o de 30 horas (0,051 nm), e o tempo de contacto que apresentou o valor médio mais baixo de absorvância foi o de 0 horas (0,023 nm), indicado também na figura 21, no que toca à *Candida albicans*. Os tempos de contacto de 0 horas e de 30 horas mostraram diferenças estatisticamente significativas com os restantes tempos de contacto.

Tabela 11. Valores médios de absorvância (nm) e intervalos de confiança por tempo de contacto, para o microrganismo *Candida albicans*

Tempo de contacto	Média de absorvância (nm) ± Desvio Padrão	Intervalo de confiança de 95% para média	
		Limite inferior	Limite superior
0 Horas	0,023 ± 0,025	0,011	0,035
6 Horas	0,120 ± 0,107	0,075	0,165
10 Horas	0,152 ± 0,138	0,088	0,217
30 Horas	0,510 ± 0,459	0,316	0,704

\*Teste ANOVA com correção Brown-Forsythe ( $p < 0,001$ ) e teste post-Hoc Tamhane ( $p < 0,05$ )

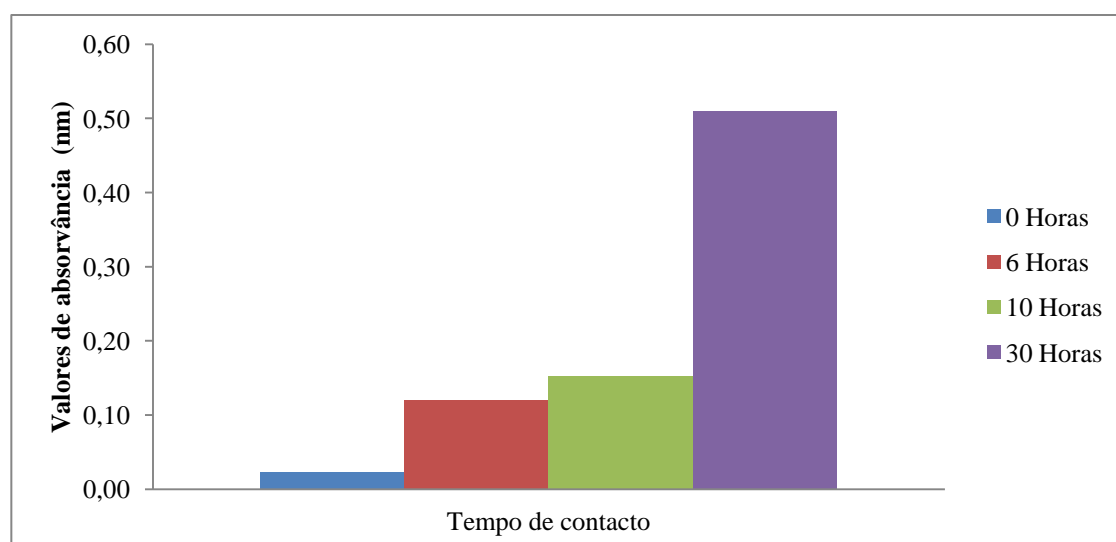


Figura 21. Distribuição dos valores médios de absorvância (nm) por tempo de contacto, para o microrganismo *Candida albicans*

Observando a tabela 12, o tempo de contacto que apresentou o valor médio mais alto de absorvância foi o de 10 horas (0,416 nm), e o tempo de contacto que apresentou o valor médio mais baixo de absorvância foi o de 0 horas (0,017 nm), demonstrado na figura 22, relativamente ao *Enterococcus faecalis*. Houve diferenças estatisticamente significativas entre o tempo de contacto de 10 horas e os restantes tempos. Houve também diferenças estatisticamente significativas entre os tempos de contacto às 0 horas e o tempo de contacto às 5 horas.

Tabela 12. Valores médios de absorvância (nm) e intervalos de confiança por tempo de contacto, para o microrganismo *Enterococcus faecalis*

Tempo de contacto	Média de absorvância (nm) ± Desvio Padrão	Intervalo de confiança de 95% para média	
		Limite inferior	Limite superior
0 Horas	0,017 ± 0,018	0,009	0,025
2,5 Horas	0,033 ± 0,023	0,021	0,045
5 Horas	0,067 ± 0,049	0,041	0,092
10 Horas	0,416 ± 0,395	0,249	0,583

\*Teste ANOVA com correção Brown-Forsythe ( $p < 0,001$ ) e teste post-Hoc Tamhane ( $p < 0,05$ )

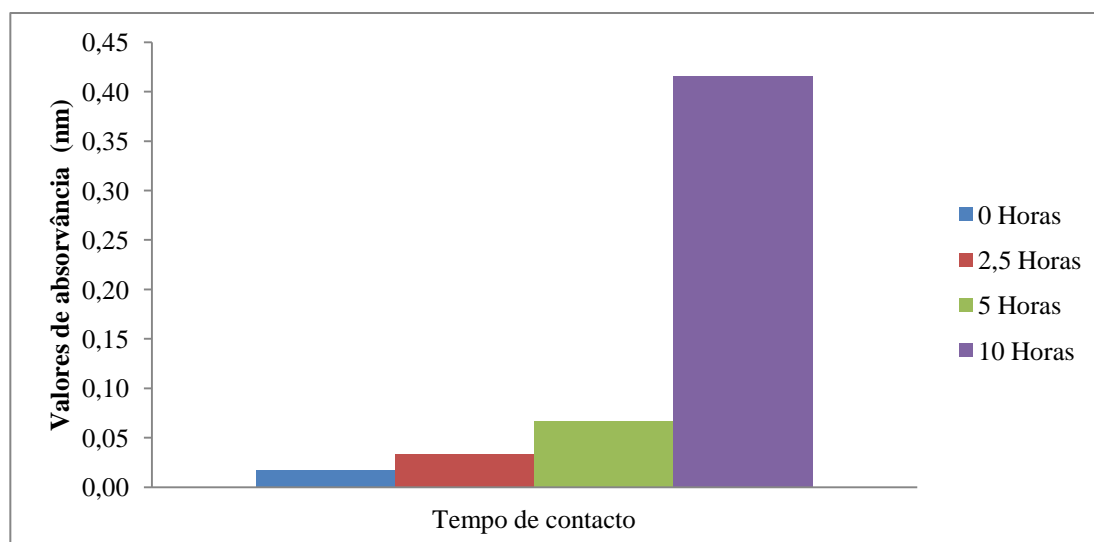


Figura 22. Distribuição dos valores médios de absorvância (nm) por tempo de contacto, para o microrganismo *Enterococcus faecalis*

#### 4.2. Análise por tempo de contacto por grupo para cada microrganismo

Após o registo da absorvância em nanómetros, foi calculada a média nos 4 tempos de contacto para cada um dos grupos e para cada um dos microrganismos utilizados.

Observando a tabela 13, no que toca à *Candida albicans*, no grupo do AH Plus sem a adição de digluconato de clorhexidina, o valor médio mais alto de absorvância foi às 30 horas de contacto (0,745 nm), e o valor médio mais baixo de absorvância foi às 0 horas de contacto (0,012 nm). Entre os vários tempos de contacto deste grupo não houve diferenças estatisticamente significativas; no grupo do AH Plus com a adição de digluconato de clorhexidina a 2% o valor médio mais alto de absorvância foi às 30 horas de contacto (0,423 nm), e o valor médio mais baixo de absorvância foi às 0 horas de contacto (0,043 nm). Entre os vários tempos de contacto deste grupo não houve diferenças estatisticamente significativas; no grupo do AH Plus com a adição de digluconato de clorhexidina a 3% o valor médio mais alto de absorvância foi às 30 horas de contacto (0,518 nm), e o valor médio mais baixo de absorvância foi às 0 horas de contacto (0,024 nm). Entre os vários tempos de contacto deste grupo não houve diferenças estatisticamente significativas; no grupo do MTA Fillapex sem a adição de digluconato de clorhexidina o valor médio mais alto de absorvância foi às 30 horas de contacto (0,791 nm), e o valor médio mais baixo de absorvância foi às 0 horas de contacto (0,152 nm). Entre os vários tempos de contacto deste grupo não houve diferenças estatisticamente significativas; no grupo do MTA Fillapex com a adição de digluconato de clorhexidina a 2% o valor médio mais alto de absorvância foi às 30 horas

de contacto (0,332 nm), e o valor médio mais baixo de absorvância foi às 0 horas de contacto (0,059 nm). Entre os vários tempos de contacto deste grupo não houve diferenças estatisticamente significativas; no grupo do MTA Fillapex com a adição de digluconato de clorhexidina a 3% o valor médio mais alto de absorvância foi às 30 horas de contacto (0,250 nm), e o valor médio mais baixo de absorvância foi às 0 horas de contacto (0,005 nm). Entre os vários tempos de contacto deste grupo não houve diferenças estatisticamente significativas. Estes resultados estão também indicados na figura 23.

Tabela 13. Valores médios de absorvância (nm) e intervalos de confiança para todos os grupos, por tempo de contacto, para o microrganismo *Candida albicans*

Grupos a estudo	Tempo de contacto	Média de absorvância (nm) ± Desvio Padrão	Intervalo de confiança de 95% para média	
			Limite inferior	Limite superior
Grupo 1: Cimento AH Plus	0 Horas	0,012 ± 0,008	-0,001	0,024
	6 Horas	0,121 ± 0,097	-0,034	0,276
	10 Horas	0,438 ± 0,482	-0,329	1,205
	30 Horas	0,745 ± 0,544	-0,121	1,611
Grupo 2: Cimento AH Plus + digluconato de clorhexidina 2%	0 Horas	0,043 ± 0,028	-0,003	0,088
	6 Horas	0,123 ± 0,091	-0,021	0,267
	10 Horas	0,230 ± 0,260	-0,183	0,644
	30 Horas	0,423 ± 0,503	-0,377	1,223
Grupo 3: Cimento AH Plus + digluconato de clorhexidina 3%	0 Horas	0,024 ± 0,038	-0,038	0,085
	6 Horas	0,150 ± 0,166	-0,115	0,415
	10 Horas	0,293 ± 0,298	-0,181	0,767
	30 Horas	0,518 ± 0,536	-0,335	1,371
Grupo 4: Cimento MTA Fillapex	0 Horas	0,152 ± 0,021	0,118	0,186
	6 Horas	0,240 ± 0,064	0,139	0,341
	10 Horas	0,450 ± 0,345	-0,099	0,998
	30 Horas	0,791 ± 0,383	0,181	1,401
Grupo 5: Cimento MTA Fillapex + digluconato de clorhexidina 2%	0 Horas	0,032 ± 0,022	-0,003	0,068
	6 Horas	0,059 ± 0,032	0,009	0,109
	10 Horas	0,117 ± 0,094	-0,033	0,266
	30 Horas	0,332 ± 0,426	-0,346	1,009
Grupo 6: Cimento MTA Fillapex + digluconato de clorhexidina 3%	0 Horas	0,005 ± 0,003	0	0,009
	6 Horas	0,029 ± 0,026	-0,012	0,070
	10 Horas	0,066 ± 0,073	-0,050	0,182
	30 Horas	0,250 ± 0,359	-0,322	0,821

\*Teste ANOVA com correção Brown-Forsythe ( $p=0,009$ ) e teste post-Hoc Dunnett ( $p<0,05$ )

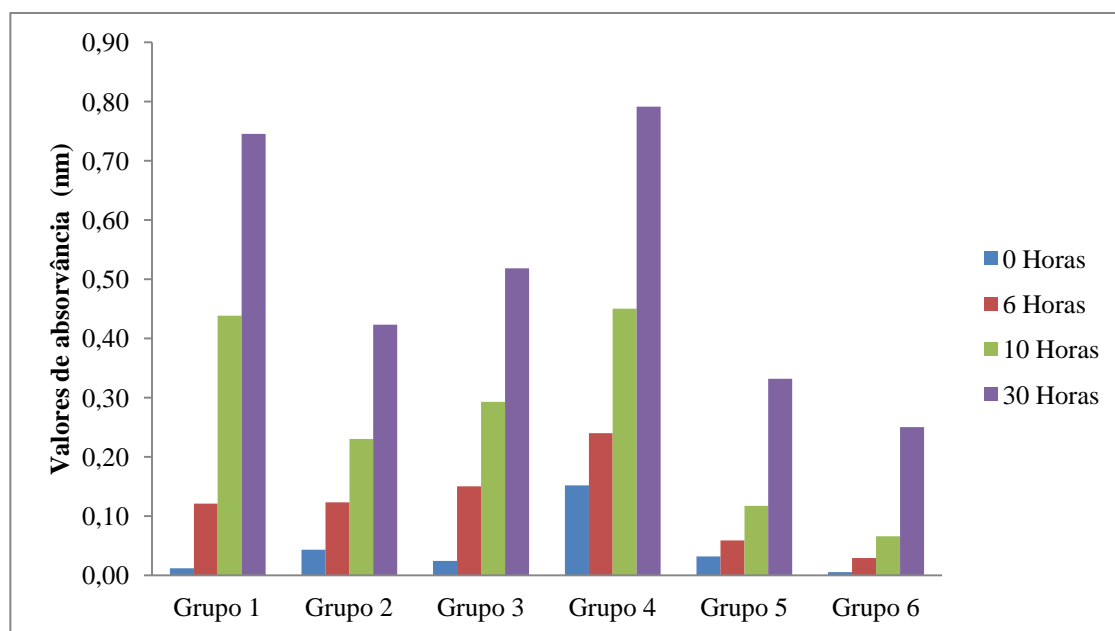


Figura 23. Distribuição dos valores médios de absorvância (nm) para todos os grupos, por tempo de contacto, para o microrganismo *Candida albicans*

Observando a tabela 14, tendo em conta o *Enterococcus faecalis*, no grupo do AH Plus sem a adição de digluconato de clorhexidina, o valor médio mais alto de absorvância foi às 10 horas de contacto (0,364 nm), e o valor médio mais baixo de absorvância foi às 0 horas de contacto (0,007 nm). Entre os vários tempos de contacto deste grupo não houve diferenças estatisticamente significativas; no grupo do AH Plus com a adição de digluconato de clorhexidina a 2% o valor médio mais alto de absorvância foi às 10 horas de contacto (0,435 nm), e o valor médio mais baixo de absorvância foi às 0 horas de contacto (0,057 nm). Entre os vários tempos de contacto deste grupo não houve diferenças estatisticamente significativas; no grupo do AH Plus com a adição de digluconato de clorhexidina a 3% o valor médio mais alto de absorvância foi às 10 horas de contacto (0,391 nm), e o valor médio mais baixo de absorvância foi às 0 horas de contacto (0,049 nm). Entre os vários tempos de contacto deste grupo não houve diferenças estatisticamente significativas; no grupo do MTA Fillapex sem a adição de digluconato de clorhexidina o valor médio mais alto de absorvância foi às 10 horas de contacto (0,736 nm), e o valor médio mais baixo de absorvância foi às 0 horas de contacto (0,107 nm). Entre os vários tempos de contacto deste grupo não houve diferenças estatisticamente significativas; no grupo do MTA Fillapex com a adição de digluconato de clorhexidina a 2% o valor médio mais alto de absorvância foi às 10 horas de contacto (0,211 nm), e o valor médio mais baixo de absorvância foi às 0 horas de contacto (0,026 nm). Entre os vários tempos de contacto deste grupo não houve

diferenças estatisticamente significativas; no grupo do MTA Fillapex com a adição de digluconato de clorhexidina a 3% o valor médio mais alto de absorvância foi às 10 horas de contacto (0,092 nm), e o valor médio mais baixo de absorvância foi às 0 horas de contacto (0,007 nm). Entre os vários tempos de contacto deste grupo não houve diferenças estatisticamente significativas. Estes resultados, são demonstrados na figura 24.

Tabela 14. Valores médios de absorvância (nm) e intervalos de confiança para todos os grupos, por tempo de contacto, para o microrganismo *Enterococcus faecalis*

Grupos a estudo	Tempo de contacto	Média de absorvância (nm) ± Desvio Padrão	Intervalo de confiança de 95% para média	
			Limite inferior	Limite superior
Grupo 1: Cimento AH Plus	0 Horas	0,007 ± 0,005	-0,001	0,015
	2,5 Horas	0,074 ± 0,065	-0,029	0,177
	5 Horas	0,322 ± 0,307	-0,167	0,811
	10 Horas	0,634 ± 0,484	-0,136	1,404
Grupo 2: Cimento AH Plus + digluconato de clorhexidina 2%	0 Horas	0,057 ± 0,052	-0,03	0,14
	2,5 Horas	0,104 ± 0,119	-0,09	0,29
	5 Horas	0,159 ± 0,116	-0,02	0,34
	10 Horas	0,435 ± 0,474	-0,32	1,19
Grupo 3: Cimento AH Plus + digluconato de clorhexidina 3%	0 Horas	0,049 ± 0,084	-0,085	0,183
	2,5 Horas	0,124 ± 0,211	-0,212	0,460
	5 Horas	0,173 ± 0,224	-0,183	0,529
	10 Horas	0,391 ± 0,441	-0,310	1,092
Grupo 4: Cimento MTA Fillapex	0 Horas	0,107 ± 0,100	-0,052	0,265
	2,5 Horas	0,154 ± 0,132	-0,056	0,363
	5 Horas	0,361 ± 0,269	-0,067	0,788
	10 Horas	0,736 ± 0,247	0,342	1,129
Grupo 5: Cimento MTA Fillapex + digluconato de clorhexidina 2%	0 Horas	0,026 ± 0,014	0,003	0,049
	2,5 Horas	0,035 ± 0,011	0,017	0,052
	5 Horas	0,052 ± 0,008	0,039	0,065
	10 Horas	0,211 ± 0,286	-0,244	0,665
Grupo 6: Cimento MTA Fillapex + digluconato de clorhexidina 3%	0 Horas	0,007 ± 0,006	-0,003	0,017
	2,5 Horas	0,029 ± 0,034	-0,026	0,083
	5 Horas	0,053 ± 0,058	-0,040	0,145
	10 Horas	0,092 ± 0,071	-0,021	0,204

\*Teste ANOVA com correção Brown-Forsythe ( $p=0,003$ ) e teste post-Hoc Dunnett ( $p<0,05$ )

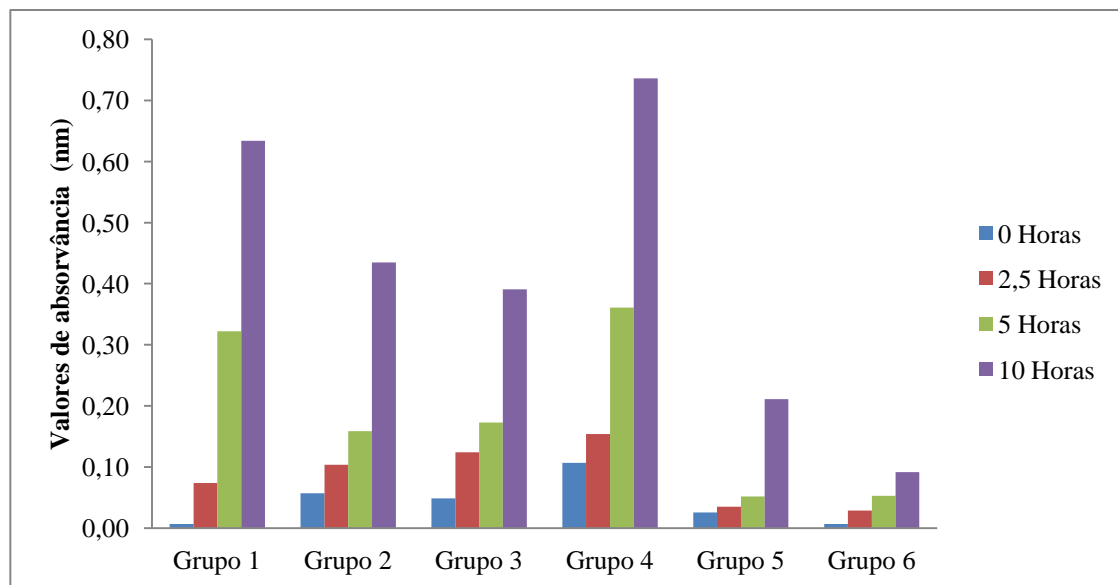


Figura 24. Distribuição dos valores médios de absorvância (nm) para todos os grupos, por tempo de contacto, para o microrganismo *Enterococcus faecalis*

#### IV – Discussão

Um objetivo importante do tratamento endodôntico, é eliminar ou prevenir a introdução de microrganismos no sistema de canais radiculares e prevenir a infecção, através de uma obturação que garanta um bom selamento tridimensional. É sabido, no entanto, que a preparação químico-mecânica não é capaz de abranger todo o sistema de canais radiculares, pelo que podem existir microrganismos residuais que resistem pelo facto de não terem sofrido a ação dos instrumentos, irrigantes ou medicamentos, pelo que torna este objetivo difícil de ser alcançado (Baer & Maki, 2010; Gjorgievska *et al.*, 2013; Morgental *et al.*, 2011; H. Zhang, Shen, Ruse, & Haapasalo, 2009).

Apesar de uma preparação químico-mecânica meticulosa, mesmo com a utilização de hidróxido de cálcio como medicação intracanal entre consultas, a infecção pode persistir em 20%-33% dos canais radiculares (Kesler Shvero *et al.*, 2013). A persistência de microrganismos nos canais radiculares, canais laterais ou ramificações apicais, pode comprometer o sucesso do tratamento endodôntico (Nair, 2006).

A utilização de materiais de obturação com propriedades antimicrobianas pode contribuir para a eliminação destes microrganismos que sobreviveram ao preparo químico-mecânico, ou prevenir a recontaminação pelos mesmos (Faria-Júnior, Tanomaru-Filho, Berbert, & Guerreiro-Tanomaru, 2013). É desejável que um cimento endodôntico apresente propriedades antibacterianas pelo facto de poder estar em contacto directo, no interior dos túbulos dentinários ou em porções não desbridadas do canal radicular, com microrganismos causadores do insucesso do tratamento endodôntico (Gjorgievska *et al.*, 2013).

Slutzky-Goldberg *et al.*, 2008, citando Grossman, afirmam que um cimento ideal deve ser bacteriostático, e de facto, tem vindo a ser demonstrado que alguns cimentos endodônticos possuem atividade antimicrobiana.

Barros, Silva, Rodrigues, *et al.*, 2014 afirmam que: “Geralmente, tanto uma atividade antimicrobiana eficaz como uma baixa toxicidade são propriedades necessárias para um cimento endodôntico ideal”.

A Sociedade Europeia de Endodontologia exige também que os cimentos endodônticos, além de obturarem completamente o canal radicular, preferencialmente apresentem um efeito inibidor do crescimento microbiano (European Society of Endodontology, 2006).

Vários estudos na literatura têm demonstrado *in vitro* a capacidade antimicrobiana de diferentes cimentos endodônticos sobre diversos microrganismos, mas um dos desafios da investigação em endodontia é a falta de padronização de protocolos para os testar, tanto *in vitro* como *in vivo* (H. Zhang *et al.*, 2009).

O objetivo desta investigação foi avaliar *in vitro* a capacidade antimicrobiana dos cimentos endodônticos AH Plus e MTA Fillapex, com ou sem a adição de duas concentrações de digluconato de clorhexidina mediante o teste de contacto direto, sobre dois microrganismos.

Neste estudo foi utilizado o teste de contacto direto (DCT), inicialmente desenvolvido por Weiss *et al.*, 1996 e que, segundo os autores, tem por base o contacto direto *in vitro* entre um microrganismo e um material, de modo a testar a cinética do crescimento e viabilidade de microrganismos.

É virtualmente independente da solubilidade e difusibilidade dos componentes antimicrobianos presentes no material testado e do meio em que se encontra, através da medição turbidimétrica, em microplacas de 96 poços, num espectrofotómetro, fornecendo dados quantitativos e reprodutíveis (Weiss *et al.*, 1996). Este teste simula clinicamente o contacto entre um microrganismo e o material a testar (Barros, Silva, Rodrigues, *et al.*, 2014).

No presente estudo, tal como no ensaio de Baer & Maki, 2010, a quantificação do efeito antimicrobiano de cada grupo foi obtida pelos valores registados do espectrofotómetro ao comprimento de onda de 630 nanómetros. Uma menor quantidade de luz transmitida, ou seja, valores mais altos de absorvância, correspondem a uma maior densidade de células bacterianas. “Indiretamente, o efeito antimicrobiano é baseado em dados turbidimétricos do crescimento bacteriano.” (Baer & Maki, 2010).

“No DCT, o método turbidimétrico permite detetar a inibição do crescimento bacteriano (efeito bacteriostático).” (H. Zhang *et al.*, 2009).

O teste de contacto direto veio substituir o popular teste de difusão em ágar (ADT), que consiste na medição de halos de inibição do material a ser testado, em placas de ágar, e a partir daí inferir a atividade antimicrobiana desses materiais contra os microrganismos testados. O ADT apresenta limitações devido à influência da solubilidade e da difusão dos materiais no meio de cultura, e do próprio meio de cultura, da viscosidade do ágar,

das condições de armazenamento das placas de ágar, o tamanho e número de amostras por placa, e o tempo e a temperatura de incubação (Çobankara, Altinoz, Erganis, Kav, & Belli, 2004; Faria-Júnior *et al.*, 2013; Slutzky-Goldberg *et al.*, 2008), além de não conseguir distinguir os efeitos microbiostáticos e microbicidas dos materiais (Eldeniz, Erdemir, Hadimli, Belli, & Erganis, 2006). Apesar de H. Zhang *et al.*, 2009 defenderem que o ADT já não é recomendado para inferir o potencial antimicrobiano de materiais endodônticos, Morgental *et al.*, 2011 e Damlar, Ozcan, Yula, Yalcin, & Celík, 2014 referem que o ADT é adequado para indicar a atividade de materiais antes que estes tomem presa.

Segundo Weiss *et al.*, 1996, os resultados demonstram o acrescido valor do DCT no estudo das propriedades antimicrobianas dos cimentos endodônticos em comparação com outros estudos, porque uma vantagem do DCT é permitir acompanhar a curva de crescimento microbiano, na presença ou na ausência do material testado, facto que se verificou neste estudo.

O mesmo autor destaca que o teste apresenta a desvantagem de haver exposição das microplacas a diferentes ambientes, o que pode resultar na contaminação da experiência. Este fator foi ultrapassado nesta experiência, utilizando microplacas estéreis e sempre dentro da câmara de fluxo laminar, além de que cada microrganismo utilizado no estudo foi cultivado em meio de crescimento seletivo para o mesmo.

Segundo Z. Wang *et al.*, 2014, tanto o ADT como o DCT têm limitações, uma vez que não consideram fatores como a microanatomia e propriedades químicas do dente, nem a formação de biofilme. A sobrevivência de bactérias pode ser em parte devido à invasão dos túbulos dentinários, onde os biofilmes se podem formar, e consequentemente servir de proteção aos efeitos antibacterianos dos cimentos endodônticos.

De acordo com a revisão bibliográfica de outros autores que também realizaram este tipo de testes, a variabilidade de fatores entre protocolos, tais como os tempos de presa, os tempos de contacto, os métodos de medição da atividade antimicrobiana, as estirpes microbianas utilizadas, as áreas de contacto, a quantidade de microrganismo e meio de cultura, os meios de crescimento dos microrganismos, o leitor de microplacas, os tempos de leitura, entre outros... podem influenciar os resultados obtidos. Apenas Faria-Júnior *et al.*, 2013 compararam o efeito antibacteriano dos dois cimentos utilizados no nosso estudo, através de uma modificação do teste de contacto direto, onde utilizaram discos de

cimento em contacto com blocos de dentina infetados com biofilmes de *Enterococcus faecalis*. Nenhum estudo testou a incorporação de digluconato de clorhexidina a 3% nestes dois cimentos endodônticos, nem testou a incorporação de digluconato de clorhexidina a 2% no cimento MTA Fillapex. Também nenhum estudo testou o efeito antimicrobiano destes cimentos contra a *Candida albicans*.

As infeções endodônticas são causadas por microrganismos presentes na microflora oral e que podem ser anaeróbios, anaeróbios facultativos, aeróbios ou fungos, sendo o *Enterococcus faecalis* a principal bactéria e a *Candida albicans* a principal levedura as causadoras destas infeções. Ambos os microrganismos podem ser isolados de dentes com lesões periapicais (Damlar *et al.*, 2014).

Este estudo foca as atenções no combate aos mesmos, através da análise da capacidade antimicrobiana de cimentos endodônticos, com a incorporação de um agente antimicrobiano como o digluconato de clorhexidina, a diferentes concentrações, para verificar se realmente existe ou não alguma capacidade de potenciar os efeitos antimicrobianos dos referidos cimentos, através da sua incorporação nos mesmos.

Normalmente, os materiais são testados contra microrganismos na forma planctónica (Faria-Júnior *et al.*, 2013).

A persistência e a elevada prevalência do *Enterococcus faecalis*, que pode ir dos 24% aos 77% (Stuart, Schwartz, Beeson, & Owatz, 2006) nos casos de infeção secundária persistente, e também poder ser detetado em infeções primárias, demonstrando a sua importância no tratamento endodôntico, sendo utilizado bastantes vezes em estudos para avaliar propriedades antimicrobianas de materiais endodônticos. Dois dos fatores responsáveis pela sua resistência ao tratamento endodôntico são: a sua habilidade de sobreviver aos efeitos dos irrigantes, em ambientes alcalinos, e em ambientes com poucos nutrientes; e os vários fatores de virulência que possui, pelo que pode competir com outros microrganismos e adaptar-se a condições adversas (Gong *et al.*, 2014; Heyder *et al.*, 2013; Lovato & Sedgley, 2011).

Com a utilização de estirpes clínicas de *Enterococcus faecalis*, é possível existirem diferenças na sensibilidade antimicrobiana face aos materiais testados, pelo que normalmente é utilizada uma estirpe de origem não endodôntica, para avaliar a eficácia antimicrobiana de materiais endodônticos (Lovato & Sedgley, 2011). No nosso estudo, e

de acordo com a American Type Culture Collection (ATCC), o *Enterococcus faecalis* utilizado foi isolado da urina. Este tipo de *Enterococcus faecalis*, ATCC 29212, é o mais utilizado em estudos da capacidade antimicrobiana de cimentos endodônticos.

Eldeniz *et al.*, 2006 defendem que, devido ao facto de diferentes bactérias poderem variar na sua sensibilidade ao mesmo material, é importante utilizar mais do que um tipo de bactéria na avaliação da capacidade antibacteriana dos cimentos endodônticos.

De acordo com Dohaihem, Al-Nasser, Al-Badah, Al-Nazhan, & Al-Maflehi, 2011, a *Candida albicans*, pelo facto de ser detetada em dentes com tratamento endodôntico, sugerem que este fungo possa colonizar as paredes do canal radicular e penetrar nos túbulos dentinários. Estes autores, citando Grossman, afirmam que a presença de *Candida* em canais radiculares infetados, causa diversos problemas no tratamento endodôntico, pelo que a sua eliminação levará a um melhor prognóstico. Este fungo mostrou-se muito resistente ao hidróxido de cálcio, e mais resistente que o *Enterococcus faecalis* ao hipoclorito de sódio, pelo que sobrevive até ao momento da obturação. Portanto, estes autores defendem que “o envolvimento de fungos em casos de infeções persistentes requer a utilização de cimentos com atividade antifúngica”.

Um requisito importante para um material dentário permanente é a sua resistência à solubilidade e degradação quando exposto por longos períodos de tempo. Qualquer material que vá libertando substâncias antimicrobianas ou outras substâncias terapêuticas tende a perder parte da sua massa e algumas propriedades físicas, tais como a estabilidade dimensional, porosidade, força compressiva e de cisalhamento e até mesmo a resistência ao desgaste (Weiss *et al.*, 1996).

Barros, Silva, Rodrigues, *et al.*, 2014 reiteram que a maior parte dos cimentos endodônticos apresenta uma atividade antibacteriana fraca e pouco prolongada, e que ainda diminui após a presa do material.

Slutzky-Goldberg *et al.*, 2008 também afirmam que os materiais que possuam algumas propriedades antimicrobianas podem perder gradualmente o seu volume, prejudicando assim a qualidade da obturação. Além disso, os dados apresentados nos testes de contacto direto referem-se a condições *in vitro*, e testar a atividade antibacteriana *in vivo* pode levar a resultados diferentes, pelo que extrapolar os resultados para a prática clínica pode ser um problema, tendo em conta que a quantidade de líquido no canal radicular é

limitada, e o efeito antibacteriano do cimento poderá depender da capacidade do material penetrar no interior dos túbulos dentinários após a remoção da *smear layer* infetada, e da capacidade de alcançar as bactérias causadoras da infeção.

Gong *et al.*, 2014 reportam que a libertação de compostos antimicrobianos pode comprometer a integração do cimento com o material central de obturação, ou com a dentina, o que aumenta o risco de recolonização microbiana.

Çobankara *et al.*, 2004 defendem que devido aos componentes permanentes ou transitórios dos cimentos, os materiais devem ser testados imediatamente após a mistura e também após o período de tempo quando é assumido que atingiu a sua estrutura química final. Após o período de presa, é ainda possível que os componentes tóxicos se libertem dos materiais. A diferença dos padrões antibacterianos de vários materiais também pode estar relacionada com o grau da presa.

O AH Plus é um cimento com base de resina epóxi-amina. O efeito antimicrobiano deste tipo de cimentos é controverso. A inibição do crescimento bacteriano dá-se possivelmente por causa do efeito bactericida do formaldeído que, apesar de em pequenas quantidades, ainda é libertado durante o processo de toma de presa (Heyder *et al.*, 2013; Z. Wang *et al.*, 2014).

Este cimento é utilizado em bastantes estudos comparativos de propriedades físico-químicas, biológicas e antimicrobianas de cimentos endodônticos. Os autores Çobankara *et al.*, 2004 consideram que o seu efeito antimicrobiano se deve ao éter bisfenol diglicídico.

Kesler Shvero *et al.*, 2013 observaram que o formaldeído e o eugenol são eficazes contra agentes patogénicos bacterianos, mas são também citotóxicos e mutagénicos, além de as suas propriedades antibacterianas desaparecerem rapidamente. Por exemplo o AH Plus não apresenta um efeito antibacteriano envelhecido (Slutzky-Goldberg *et al.*, 2008). Os cimentos que antes de tomar presa apresentem atividade antibacteriana, não a mantêm após tomar presa (Morgental *et al.*, 2011). O mesmo autor considera que deverá ser elaborado um cimento que apresente propriedades antibacterianas eficazes e a longo-prazo. Neste sentido, dada a substantividade da clorhexidina, colocamos a hipótese se a sua incorporação poderá aumentar a capacidade antimicrobiana.

Sagsen *et al.*, concluíram que os cimentos que contêm eugenol e os que contêm resina epóxi são os que apresentam maior efeito antibacteriano, e conseqüentemente deverão ser recomendados (Baer & Maki, 2010).

H. Zhang *et al.*, 2009, ao testarem, através de um DCT modificado, os cimentos AH Plus, Apexit® Plus, iRoot® SP, Tubli Seal™, Sealapex™, Epiphany® e EndoRez®, todos a fresco ou envelhecidos 1; 3 e 7 dias e em contacto direto 0; 2; 5; 20 e 60 minutos contra o *Enterococcus faecalis* na forma planctónica, mostrou que o efeito antibacteriano se manteve estável até aos 3 dias de envelhecimento, no entanto, aos 7 dias de envelhecimento a maioria dos cimentos já não apresentava atividade antibacteriana, exceto o Sealapex e o Endorez. O AH Plus a fresco reduziu significativamente o número de bactérias viáveis a partir dos 2 minutos e erradicou completamente as bactérias entre 5 a 20 minutos. Os restantes cimentos demoraram mais de 20 minutos para o mesmo efeito. No caso do AH Plus envelhecido 1 e 3 dias, o mesmo falhou em eliminar a bactéria nos primeiros 60 minutos, tendo perdido maior parte do seu efeito antibacteriano. Já em relação ao AH Plus envelhecido 7 dias, não foi registada nenhuma capacidade antibacteriana, em qualquer tempo.

Pizzo, Giammanco, Cumbo, Nicolosi, & Gallina, 2006 testaram os cimentos AH Plus, Endomethasone, Pulp Canal Sealer™ e VCanalare, a fresco e envelhecidos 1 e 7 dias, em contacto direto durante 24h com o *Enterococcus faecalis*. Obtiveram como resultado uma completa inibição do crescimento bacteriano provocado por todos os cimentos a fresco e envelhecidos 1 dia. O AH Plus envelhecido 7 dias apresentou valores semelhantes ao controlo, ou seja, não houve inibição do crescimento bacteriano.

Heyder *et al.*, 2013 estudaram os cimentos AH Plus, Hermetic, RoekoSeal, Sealapex, Apexit Plus, 2Seal®, EndoRez e o ProRoot® MTA contra *Enterococcus faecalis*, *Fusobacterium nucleatum*, e *Porphyromonas gingivalis*, através do ADT, com os cimentos a fresco e com 6 dias de envelhecimento, durante 24 horas; e do DCT com cimentos a fresco, também em contacto durante 24 horas. O AH Plus tanto a fresco como envelhecido 6 dias, não apresentou inibição contra o *Enterococcus faecalis* no teste do ADT. Já no teste do DCT, o AH Plus fresco apresentou inibição do *Enterococcus faecalis* e permitiu um crescimento de *P.gingivalis*.

Slutzky-Goldberg *et al.*, 2008 comparam o AH Plus, Apexit Plus, Epiphany SE e Roekoseal a fresco e envelhecidos 1; 2; 7 e 14 dias através do DCT em contacto direto

com uma estirpe clínica de *Enterococcus faecalis* durante 16 horas. Os resultados do AH Plus em todos os tempos são semelhantes aos do controlo positivo, pelo que este não teve efeitos antibacterianos.

Çobankara *et al.*, 2004 testaram a fresco o Ah Plus, RoekoSeal, Ketac<sup>TM</sup>Endo, Sealapex e Sultan contra o *Enterococcus faecalis* através do DCT. Para o DCT foram feitas 12 medições, uma cada 30 minutos, durante as 6 primeiras horas, e 12 medições nas 6 horas finais, tendo o teste durado 19 horas. O AH Plus fresco inibiu o crescimento da bactéria durante todo o estudo do DCT.

O MTA Fillapex, após a mistura das duas pastas, é composto basicamente por MTA, resina salicilato, resina natural, bismuto e sílica.

Del Carpio-Perochena *et al.*, 2015, citando Zhou *et al.*, afirmam que o MTA Fillapex consegue manter um pH alcalino até 5 semanas. Os altos valores de pH do MTA poderão ser, segundo estes autores, um dos fatores que contribuem para o seu efeito antibacteriano.

A incorporação de componentes antimicrobianos em cimentos endodônticos pode tornar-se um fator essencial no combate aos microrganismos que persistem no interior do sistema de canais radiculares (Weiss *et al.*, 1996).

Citando Gjorgievska *et al.*, 2013: “Em princípio, é possível melhorar as propriedades antimicrobianas dos materiais através da adição de agentes antimicrobianos.”.

Na experiência de Ruiz-Linares *et al.*, 2013, o digluconato de clorhexidina a 1% e 2% e a cetrimida a 0,1%; 0,2%; 0,3%; 0,4% e 0,5% e combinações entre ambos, foram incorporados no cimento AH Plus e não alteraram significativamente as propriedades físicas do mesmo.

Bailón-Sánchez, Baca, Ruiz-Linares, & Ferrer-Luque, 2014 continuaram a experiência de Ruiz-Linares *et al.*, 2013 e utilizaram o cimento AH Plus envelhecido 48 horas com a adição de digluconato de clorhexidina a 1% e 2%, e a cetrimida a 0,1%; 0,2%; 0,3%; 0,4% e 0,5%, e combinações entre ambos. Neste teste foram utilizadas formas planctónicas e em biofilme de *Enterococcus faecalis*. Em relação à forma planctónica, o AH Plus misturado com CHX mostrou um menor efeito antimicrobiano do que sem a adição de CHX, e as combinações de AH Plus com cetrimida mostraram uma atividade

antimicrobiana dependente da concentração, embora nenhuma das concentrações incorporadas no AH Plus tenha conseguido erradicar a bactéria. Já no que toca à forma de biofilme, o AH Plus com CHX demonstrou uma inibição em relação direta com a concentração usada de digluconato de clorhexidina, mas nenhuma das concentrações conseguiu a inibição completa da formação do biofilme, enquanto a concentração de 0,2% de cetrimida foi suficiente para impedir a formação de biofilme. Quando misturados os dois compostos no AH Plus, obteve-se um efeito sinérgico, pelo que foi necessário apenas 0,3% de cetrimida quando combinado com 2% de CHX para erradicar a bactéria, e apenas 0,1% de cetrimida e 1% CHX para alcançar a inibição da formação do biofilme.

Kesler Shvero *et al.*, 2013 resolveram incorporar nanopartículas antibacterianas insolúveis de amónio quaternário com concentrações de 0,5%, 1% e 2% em relação ao peso do cimento onde foram incorporadas. Foram utilizados os cimentos AH Plus e o Guttaflow<sup>®</sup> envelhecidos 4 semanas, realizou-se o ADT durante 48 horas e o DCT durante 14 horas, para testar o efeito antibacteriano contra o *Enterococcus faecalis*. Em relação ao DCT, houve inibição do crescimento da bactéria, directamente proporcional à concentração de nanopartículas, tendo a inibição completa sido conseguida com a concentração de 2%, e houve um efeito limitado no caso do AH Plus sem nanopartículas. No caso do ADT não foi verificado nenhum halo de inibição, com nenhuma das concentrações utilizadas. Barros, Silva, Rodrigues, *et al.*, 2014 justificam estes resultados diferentes devido ao método utilizado (método turbidimétrico), pelo facto de as nanopartículas poderem influenciar a densidade ótica da amostra, e por terem sido utilizados diferentes lotes dos cimentos.

Gong *et al.*, 2014 incorporaram nanopartículas de amónio quaternário com concentrações de 0%; 2%; 4% e 8% em relação ao peso do cimento onde foram incorporadas. Foi utilizado o cimento AH Plus envelhecido 4 semanas, e foi feito um DCT após 5 horas de contacto, para testar o efeito antibacteriano contra o *Enterococcus faecalis*. Sem a incorporação de nanopartículas, ou seja, só o cimento AH Plus, não houve inibição do crescimento bacteriano, comparando com o grupo de controlo. Com a incorporação das nanopartículas, o seu efeito foi directamente proporcional à concentração utilizada.

Já Del Carpio-Perochena *et al.*, 2015 citam estudos onde o efeito antimicrobiano de um cimento de óxido de zinco-eugenol foi potenciado pela adição de nanopartículas de quitosano, e mesmo estes autores realizaram um estudo onde adicionaram estas

nanopartículas, bem como carboximetil-quitosano a um cimento resinoso (ThermaSeal<sup>®</sup>) e ao MTA Fillapex, e os testaram contra o *Enterococcus faecalis* em discos de papel embebidos com a bactéria. Colocaram estes discos, em contacto com os cimentos durante 30 minutos a 37°C. Depois, colocaram-nos em meio BHI, a solução foi diluída e procederam à contagem das CFU. Fez-se o mesmo protocolo mas com uma membrana a separar o disco de papel dos cimentos. No caso do MTA Fillapex, obtiveram uma redução bacteriana independentemente da adição das nanopartículas. No outro cimento observaram melhores resultados nos grupos que tinham as nanopartículas, comparando com os que não tinham este composto. O teste que tinha uma membrana reduziu a ação antimicrobiana, mas não foi suficiente para impedir algum efeito antibacteriano.

Barros *et al.*, 2014 adicionaram nanopartículas de polietilenimina com 2% de amónio quaternário ao cimento AH Plus e Pulp Canal Sealer<sup>™</sup> EWT, um cimento de óxido de zinco-eugenol, e testaram-no em contacto direto e através de membranas contra biofilme de *Enterococcus faecalis*, obtendo uma redução bacteriana nos cimentos que continham as nanopartículas.

Em outro estudo, Barros, Silva, Rodrigues, *et al.*, 2014, adicionaram nanopartículas de polietilenimina com 1% e 2% de amónio quaternário ao cimento AH Plus e Pulp Canal Sealer EWT com os cimentos testados a fresco e envelhecidos 7 dias, e nos tempos de contacto de 10, 30 e 60 minutos, contra uma estirpe de coleção e duas estirpes clínicas de *Enterococcus faecalis*, utilizando o DCT. O cimento AH Plus a fresco e sem nanopartículas mostrou erradicação bacteriana apenas aos 60 minutos contra uma das estirpes. A incorporação de nanopartículas nos cimentos testados a fresco não melhorou significativamente o efeito antibacteriano. Após 7 dias de envelhecimento, o cimento não modificado perdeu o seu efeito antibacteriano e a adição de nanopartículas também não provocou efeitos no AH Plus. A incorporação de nanopartículas no AH Plus, independentemente da concentração das mesmas, não potenciou os efeitos antibacterianos do cimento, quer a fresco, quer envelhecido. Segundo os autores, a informação dos efeitos bactericidas é mais relevante clinicamente, uma vez que as bactérias residuais que são inibidas pelo agente antimicrobiano, podem começar a crescer novamente quando o efeito inibitório acaba. Além de avaliar os efeitos bacteriostáticos, o DCT baseado na medição da densidade ótica pode ser influenciado por partículas que se desprendam do cimento na parede.

Gjorgievska *et al.*, 2013 incorporaram cloreto de benzalcônio a 2% e cloreto de cetilpiridínio a 2% nos cimentos endodônticos AH Plus, RoekoSeal, Endomethasone N, N2<sup>®</sup> e Apexit Plus, e testaram o efeito antibacteriano após 2, 7 e 21 dias de incubação contra as espécies de *S. mutans*, *Lactobacillus casei* e *Actinomyces viscosus*, através do ADT. A incorporação das duas substâncias aumentou a capacidade antibacteriana dos cimentos em todos os casos, quando comparados sem a incorporação das substâncias. Mas ainda assim, ao longo do tempo, os efeitos antimicrobianos, quer com a incorporação dos agentes, quer sem a incorporação, foram reduzindo.

Baer & Maki, 2010, utilizaram o teste de contacto direto para avaliar o efeito antibacteriano do cimento Pulp Canal Sealer EWT, Real Seal SE e AH Plus, com e sem a adição de amoxicilina, contra *Enterococcus faecalis*, e com os cimentos frescos, envelhecidos 1, 3 e 7 dias. Os grupos onde foi incorporada amoxicilina obtiveram uma completa inibição do crescimento do *Enterococcus faecalis*, e não houve diferenças estatisticamente significativas entre os vários tempos de envelhecimento. Os grupos onde não foi incorporado o antibiótico, não inibiram o crescimento da bactéria. Também não houve diferenças estatisticamente significativas entre os tempos de envelhecimento. Concluindo, os cimentos com amoxicilina foram estatisticamente superiores relativamente à eliminação de *Enterococcus faecalis*, do que os cimentos sem amoxicilina, quer a fresco, quer após o tempo de presa.

Considerando os resultados obtidos no nosso estudo, na análise por grupos, pode-se constatar que o cimento MTA Fillapex com a adição de digluconato de clorhexidina a 3% foi o mais eficaz e o AH Plus sem a adição de digluconato de clorhexidina o de menor capacidade antimicrobiana. Estas diferenças são estatisticamente significativas. Os grupos onde o digluconato de clorhexidina foi incorporado apresentaram valores mais baixos de turvez em relação aos grupos onde o cimento não foi modificado, com significado estatístico exceto no grupo do cimento AH Plus com a adição de digluconato de clorhexidina a 2% em relação ao grupo do cimento AH Plus sem a adição de digluconato de clorhexidina. O digluconato de clorhexidina a 3% obteve valores de absorvâncias mais baixos que o digluconato de clorhexidina a 2%, e comparando as duas concentrações, houve significado estatístico. Entre o AH Plus sem a adição de digluconato de clorhexidina e o MTA Fillapex sem a adição de digluconato de clorhexidina, o MTA Fillapex apresentou uma média de absorvância menor, mas sem

diferenças significativamente estatísticas. Consultando a literatura, nenhum estudo comparou, até à data, estes dois cimentos com ou sem a adição de clorhexidina.

Observámos que os resultados na análise de grupos variam dependendo do microrganismo. Relativamente à comparação dos grupos em função do desempenho antimicrobiano face a *Candida albicans*, observou-se que o grupo que teve o valor mais baixo de absorvância foi o cimento MTA Fillapex com a adição de digluconato de clorhexidina a 3% e o que apresentou o valor mais elevado de absorvância foi o cimento MTA Fillapex sem a adição de digluconato de clorhexidina, tendo havido significado estatístico entre os dois. O cimento AH Plus sem adição de digluconato de clorhexidina apresentou um efeito antifúngico mais eficaz que o cimento MTA Fillapex sem a adição de digluconato de clorhexidina, com significado estatístico, mas no entanto, este efeito foi-se dissipando à medida que foi sendo adicionada uma maior concentração de digluconato de clorhexidina, mas sem diferenças estatisticamente significativas. Este efeito pode ter-se dado devido á interação do digluconato de clorhexidina com os componentes do AH Plus. Pelo contrário, no caso do MTA Fillapex, a adição de digluconato de clorhexidina foi melhorando a capacidade antifúngica do mesmo, existindo diferenças estatísticas só entre os grupos em que foi testado o MTA Fillapex.

Relativamente aos resultados do *Enterococcus faecalis*, constatou-se que o cimento que teve o menor resultado de absorvância foi o cimento MTA Fillapex com a adição de digluconato de clorhexidina a 3% e o que apresentou o maior resultado de absorvância foi o cimento MTA Fillapex sem a adição de digluconato de clorhexidina, tendo havido significado estatístico entre os dois, tal como se sucedeu para a *Candida albicans*. O cimento AH Plus sem adição de digluconato de clorhexidina apresentou um efeito antibacteriano mais eficaz que o cimento MTA Fillapex sem a adição de digluconato de clorhexidina, mas não foi encontrado significado estatístico. Este efeito, ao contrário do que se sucedeu para a *Candida albicans*, foi sendo mais eficaz para os dois cimentos, à medida que foi adicionada uma maior concentração de digluconato de clorhexidina. Verificaram-se diferenças estatisticamente significativas entre os 2% e os 3% de digluconato de clorhexidina no caso do cimento AH Plus, e entre todos os grupos do MTA Fillapex.

No estudo de Faria-Júnior *et al.*, 2013, onde foram utilizados os cimentos AH Plus, Sealer 26, Epiphany SE, Sealapex, Activ GP, MTA Fillapex e um cimento experimental

de MTA, envelhecidos 2 e 7 dias, o MTA Fillapex provocou uma subida do pH, mas não conseguiu eliminar completamente o *Enterococcus faecalis* sob a forma de biofilme, mas reduziu as CFU/ml entre a 5<sup>a</sup> e a 15<sup>a</sup> horas, enquanto o AH Plus não provocou nenhuma redução na quantidade de CFU/ml durante os períodos de contacto estudados, que foram às 5 h, 10 h e 15 h.

No que toca à variável tempo de envelhecimento, escolhemos o tempo a fresco, porque é o que acontece clinicamente, quando o cimento é introduzido no interior dos canais radiculares. O tempo de 24 horas foi escolhido porque, segundo as instruções dos fabricantes, já ocorreu a presa dos materiais. O tempo de 168 horas já foi utilizado em alguns estudos (Barros, Silva, Rôças, *et al.*, 2014; Pizzo *et al.*, 2006), e pelo motivo de ter um tempo intermédio entre este e as 24 horas, foi decidido estudar também às 72 horas o tempo de envelhecimento. Estes tempos foram utilizados para todos os grupos, de forma a padronizar os critérios.

Considerando então a variável tempo de envelhecimento, vimos que esta influencia a capacidade antimicrobiana para os dois microrganismos de forma semelhante. Em relação à *Candida albicans*, verificaram-se valores mais baixos de absorvância para os grupos com os cimentos envelhecidos 24 horas, e valores mais altos de absorvância para os grupos com os cimentos envelhecidos 168 horas, com diferenças estatisticamente significativas.

Já em relação ao *Enterococcus faecalis*, os resultados mais baixos de absorvância verificaram-se nos grupos com os cimentos envelhecidos 72 horas, e resultados mais elevados de absorvância nos grupos com os cimentos envelhecidos 168 horas, com diferenças estatisticamente significativas.

Analisando agora esta variável, mas por grupo e por microrganismo, no que toca à *Candida albicans*, o valor médio mais baixo de absorvância foi obtido pelo grupo do cimento MTA Fillapex envelhecido 72 horas e com adição de digluconato de clorhexidina a 3%, e o valor médio mais alto de absorvância foi o do grupo do cimento MTA Fillapex envelhecido 168 horas e sem adição de digluconato de clorhexidina. Não houve diferenças estatisticamente significativas.

No que toca ao *Enterococcus faecalis*, o valor médio mais baixo de absorvância foi o do cimento MTA Fillapex envelhecido 72 horas com a adição de digluconato de

clorhexidina a 3%, e o valor médio mais alto de absorvância foi o do cimento MTA Fillapex envelhecido 168 horas sem a adição de digluconato de clorhexidina. Apesar de não existirem diferenças estatisticamente significativas, os resultados do cimento AH Plus sem adição de digluconato de clorhexidina mostram que o cimento vai perdendo a eficácia ao longo do tempo. Esta observação vai de acordo aos estudos de Barros, Silva, Rodrigues, *et al.*, 2014; Heyder *et al.*, 2013; Pizzo *et al.*, 2006; H. Zhang *et al.*, 2009, mas contraria os resultados de Baer & Maki, 2010, onde os cimentos sem amoxicilina mantiveram atividade durante os 7 dias de envelhecimento, e os resultados de Slutzky-Goldberg *et al.*, 2008, onde o AH Plus não apresentou qualquer efeito antibacteriano, nem a fresco nem envelhecido 24 horas, 48 horas, 7 e 14 dias; e de Faria-Júnior *et al.*, 2013, onde o AH Plus foi ineficaz quer aos 2 dias de envelhecimento, quer aos 7 dias. As diferenças podem ser por causa da metodologia utilizada.

Em relação ao MTA Fillapex sem a adição de digluconato de clorhexidina, verifica-se a mesma situação, onde, apesar de não haver diferenças estatisticamente significativas, este cimento a fresco foi o que apresentou a média de absorvância menor, quando comparado com os restantes tempos. O MTA Fillapex foi eficaz contra o *Enterococcus faecalis* no estudo de Morgental *et al.*, 2011, pelo teste de difusão em ágar quando foi testado a fresco. No entanto, quando testado pelo método do contacto direto com 7 dias de envelhecimento não teve efeito antibacteriano. Mas de acordo com os resultados do teste de contacto direto realizados por Faria-Júnior *et al.*, 2013, o MTA Fillapex demonstrou ter atividade antibacteriana mesmo envelhecido 2 e 7 dias, após o contacto com o *Enterococcus faecalis* sob a forma de biofilme às 5 horas; 10 horas e 15 horas.

Foi realizada a análise tendo em conta a variável tempo de contacto por microrganismo. Foram seleccionados os intervalos de tempo de 0 horas; 6 horas; 10 horas e 30 horas para serem estudados no caso do microrganismo *Candida albicans* e os intervalos de tempo de 0 horas; 2,5 horas; 5 horas e 10 horas para serem estudados no caso do microrganismo *Enterococcus faecalis*. O facto de os microrganismos serem diferentes, e consequentemente, apresentarem diferentes curvas de crescimento, é o motivo pelo qual os tempos seleccionados não sejam exatamente iguais.

Estes tempos foram seleccionados, no caso das 0 horas que é quando começa a haver crescimento microbiano, os tempos de 6 horas para a *Candida albicans* e 2,5 horas para o *Enterococcus faecalis* são os valores em que começa a curva de crescimento exponencial,

os tempos de 10 horas para a *Candida albicans* e 5 horas para o *Enterococcus faecalis* são os tempos a meio da curva de crescimento, e finalmente os tempos de 30 horas para a *Candida albicans* e 10 horas para o *Enterococcus faecalis* é quando se atinge a fase estacionária ou “plateau”, do crescimento.

Os resultados contra a *Candida albicans*, mostram que os cimentos foram mais eficazes às 0 horas de contacto, e menos eficazes às 30 horas de contacto, com diferenças estatisticamente significativas, e à medida que o tempo de contacto ia aumentando, os cimentos revelaram-se menos eficazes.

Considerando agora o *Enterococcus faecalis*, os resultados do nosso estudo vão no mesmo sentido do que os da *Candida albicans*, sendo o maior efeito observado às 0 horas, e o menor às 10 horas, com diferenças estatisticamente significativas.

Analisando esta variável, mas por grupo e por microrganismo, no que toca à *Candida albicans*, os resultados seguem a mesma tendência da análise anterior, tendo em todos os grupos o tempo de contacto às 0 horas sido o que apresentou maior efeito antifúngico, e o de 30 horas o que apresentou menor efeito antifúngico. Dentro de cada grupo não houve diferenças estatisticamente significativas. De todos os grupos, o que apresentou valor médio de absorvância mais baixo foi o do cimento MTA Fillapex com a adição de digluconato de clorhexidina a 3% às 0 horas de contacto, e o que apresentou o valor médio de absorvância foi o do cimento MTA Fillapex sem a adição de digluconato de clorhexidina às 30 horas de contacto. Entre estes dois grupos não houve diferenças estatisticamente significativas.

Finalmente, a respeito do *Enterococcus faecalis*, verificou-se que a tendência continua a ser seguida, tendo em todos os grupos, o tempo de contacto às 0 horas, demonstrado maior efeito antibacteriano, e o de 10 horas o menor efeito antibacteriano. Dentro de cada grupo não houve diferenças estatisticamente significativas. Entre todos os grupos, o que apresentou valor médio de absorvância mais baixo foi o do cimento AH Plus sem adição de digluconato de clorhexidina às 0 horas de contacto, e com o mesmo valor o cimento MTA Fillapex com a adição de digluconato de clorhexidina a 3% às 0 horas de contacto, e o que apresentou o maior valor médio de absorvância foi o do cimento MTA Fillapex sem a adição de digluconato de clorhexidina às 10 horas de contacto. Entre estes grupos não houve diferenças estatisticamente significativas.

*Estudo in vitro da capacidade antimicrobiana de dois cimentos endodônticos modificados com clorhexidina mediante teste de contacto direto*

## V – Conclusões

A questão de um efeito antimicrobiano adjuvante dos cimentos tem-se tornado cada vez mais um fator importante, especialmente do ponto de vista clínico, porque não é incomum a persistência de microrganismos nos túbulos dentinários após o tratamento endodôntico, sendo um dos principais motivos para a falha do mesmo.

Assim, é de interesse, especialmente para o clínico, conhecer que efeito antimicrobiano pode ser esperado com a utilização de cimentos disponíveis comercialmente, e se a adição de digluconato de clorhexidina aos mesmos, potencia ou não este desejado efeito.

No entanto, face aos resultados obtidos neste estudo, pode-se concluir que, na observação geral sem ter em consideração as diferentes variáveis, o MTA Fillapex apresentou valores de absorvância mais baixos do que o AH Plus em todos os casos, o que significa que teve uma maior capacidade antimicrobiana. À medida que foi sendo incorporado o digluconato de clorhexidina, houve um aumento do efeito antimicrobiano. No caso do AH Plus, não houve significado estatístico entre o grupo sem a adição de digluconato de clorhexidina e o grupo com a adição de digluconato de clorhexidina a 2%, mas houve entre os restantes grupos, pelo que a concentração a 3% foi a que apresentou maior eficácia antimicrobiana, com diferenças estatisticamente significativas. No caso do cimento MTA Fillapex, com o aumento da concentração de digluconato de clorhexidina, verificou-se um aumento significativo da capacidade antimicrobiana.

Contra a *Candida albicans*, o AH Plus sem adição de digluconato de clorhexidina, apresentou maior capacidade antifúngica que o MTA Fillapex sem adição de digluconato de clorhexidina. Neste caso, a adição de clorhexidina revelou efeitos contrários consoante o cimento. No caso do AH Plus, a incorporação de digluconato de clorhexidina demonstrou uma perda da capacidade antifúngica à medida que a concentração de digluconato de clorhexidina foi aumentando, sem diferenças estatisticamente significativas. No sentido inverso, a incorporação de maiores concentrações de digluconato de clorhexidina no cimento MTA Fillapex, traduziu-se num maior efeito antifúngico, com diferenças estatisticamente significativas.

Contra o *Enterococcus faecalis*, o AH Plus sem adição de digluconato de clorhexidina teve um efeito antibacteriano maior do que o MTA Fillapex sem adição de clorhexidina. Ao contrário do verificado em relação à *Candida albicans*, a incorporação de digluconato

de clorhexidina potenciou o efeito antibacteriano do AH Plus, e à medida que se foi aumentando a concentração da mesma, maior o efeito antibacteriano observado. No caso do AH Plus, não houve significado estatístico entre o grupo sem a adição de digluconato de clorhexidina, e o grupo com adição de digluconato de clorhexidina a 2%, mas houve entre os restantes grupos, pelo que a concentração a 3% foi a que apresentou maior eficácia antimicrobiana, com diferenças estatisticamente significativas. No cimento MTA Fillapex, o aumento da concentração de digluconato de clorhexidina causou um aumento mais marcado da capacidade antibacteriana, com diferenças estatisticamente significativas.

Tendo em consideração apenas o tempo de envelhecimento, os resultados obtidos sugerem que este influencia a capacidade antimicrobiana, e desde o tempo a fresco até ao tempo em que os cimentos já tinham tomado presa, às 24 horas de envelhecimento, verificou-se um aumento da capacidade antimicrobiana que se manteve até às 72 horas no caso do *Enterococcus faecalis*. No caso da *Candida albicans*, às 72 horas começou a haver diminuição da capacidade antimicrobiana. A partir deste tempo, a capacidade antimicrobiana foi reduzindo, como observável às 168 horas. Tal observação é válida para os dois microrganismos.

Quando feita a análise do tempo de envelhecimento nos diferentes grupos para a *Candida albicans*, o cimento AH Plus sem a adição de digluconato de clorhexidina apresentou maior efeito antimicrobiano que o cimento MTA Fillapex sem a adição de digluconato de clorhexidina, até às 72 horas. A partir das 72 horas, o MTA Fillapex sem a adição de digluconato de clorhexidina aumentou ligeiramente a sua atividade antimicrobiana quando comparado com o AH Plus, mas voltou a ser menos eficaz que o anterior, sem a adição de digluconato de clorhexidina, às 168 horas. Não houve diferenças estatisticamente significativas. Foi observada a mesma situação quando em contacto com o *Enterococcus faecalis*. A incorporação de maiores concentrações de digluconato de clorhexidina aumentou no mesmo sentido a capacidade antimicrobiana do cimento AH Plus, em comparação com os dois grupos onde o digluconato de clorhexidina não foi incorporado, nos mesmos tempos de envelhecimento, embora não tenham sido encontradas diferenças estatisticamente significativas. O mesmo foi observável para o cimento MTA Fillapex nos dois microrganismos.

Observando o tempo de contacto, os resultados obtidos sugerem que este influencia a capacidade antimicrobiana, e desde o tempo de contacto às 0 horas, até às 30 horas, no caso da *Candida albicans*, e até às 10 horas, no caso do *Enterococcus faecalis*, houve uma diminuição da capacidade antimicrobiana, sendo este resultado estatisticamente significativo. No caso da *Candida albicans*, a perda da capacidade antimicrobiana dos cimentos foi mais acentuada do que no caso do *Enterococcus faecalis*.

Finalmente, considerando o tempo de contacto, por grupos e por microrganismo, o grupo do cimento AH Plus sem a adição de digluconato de clorhexidina, apresentou uma maior capacidade antimicrobiana quando comparado com o grupo do cimento MTA Fillapex sem a adição de digluconato de clorhexidina, sendo esta diferença mais evidente nos dois primeiros tempos de contacto, para ambos os microrganismos, embora não exista diferenças estatisticamente significativas. O facto de ser incorporado o digluconato de clorhexidina levou a uma diminuição da capacidade antimicrobiana no caso do cimento AH Plus, nos dois primeiros tempos de contacto com a *Candida albicans* e com o *Enterococcus faecalis*. Relativamente ao AH Plus, com a adição de digluconato a 3%, proporcionou um aumento da absorvância nos tempos de contacto de 10 horas e 30 horas, no caso da *Candida albicans* e nas 5 horas de contacto, no caso do *Enterococcus faecalis*, em relação à adição de 2%. Quando foi incorporado digluconato de clorhexidina no cimento MTA Fillapex, verificou-se um aumento da capacidade antimicrobiana proporcional à concentração, em todos os tempos de contacto, pelo que, tanto para a *Candida albicans*, como para o *Enterococcus faecalis*, o maior efeito antimicrobiano foi observado no grupo do cimento MTA Fillapex com a incorporação de digluconato de clorhexidina a 3%. Não houve diferenças estatisticamente significativas.

Perante os resultados obtidos, pode-se afirmar que os objetivos foram cumpridos, e a hipótese nula rejeitada, uma vez que foram verificadas diferenças na capacidade antimicrobiana dos materiais testados.

No entanto, são necessários mais estudos para avaliar possíveis efeitos citotóxicos e a capacidade de selamento dos materiais testados. O mesmo tipo de estudo, mas com outros cimentos disponíveis no mercado, também poderá ser um desafio interessante a considerar.



## VI – Bibliografia

- Abbott, P. V. (2011). Diagnosis and management planning for root-filled teeth with persisting or new apical pathosis. *Endodontic Topics*, (19), 1–21.
- Baer, J., & Maki, J. S. (2010). In Vitro Evaluation of the Antimicrobial Effect of Three Endodontic Sealers Mixed with Amoxicillin. *Journal of endodontics*, 36(7), 1170–3.
- Bailón-Sánchez, M. E., Baca, P., Ruiz-Linares, M., & Ferrer-Luque, C. M. (2014). Antibacterial and Anti-biofilm Activity of AH Plus with Chlorhexidine and Cetrimide. *Journal of Endodontics*, 40(7), 977–981.
- Barros, J., Silva, M. G., Rôças, I. N., Gonçalves, L. S., Alves, F. F., Lopes, M. A., Siqueira Jr, J. F. (2014). Antibiofilm effects of endodontic sealers containing quaternary ammonium polyethylenimine nanoparticles. *Journal of Endodontics*, 40(8), 1167–1171.
- Barros, J., Silva, M. G., Rodrigues, M. A., Alves, F. R. F., Lopes, M. A., Pina-Vaz, I., & Siqueira Jr, J. F. (2014). Antibacterial, physicochemical and mechanical properties of endodontic sealers containing quaternary ammonium polyethylenimine nanoparticles. *International Endodontic Journal*, 47(8), 725–734.
- Basrani, B., & Haapasalo, M. (2012). Update on endodontic irrigating solutions. *Endodontic Topics*, 27, 74–102.
- Baumgartner, J. C. (2004). Microbiological and molecular analysis of endodontic infections. *Endodontic Topics*, 7, 35–51.
- Baumgartner, J. C., Watts, C. M., & Xia, T. (2000). Occurrence of *Candida albicans* in infections of endodontic origin. *Journal of endodontics*, 26(12), 695–698.
- Çobankara, F., Altinoz, H. C., Erganis, O., Kav, K., & Belli, S. (2004). In Vitro Antibacterial Activities of Root-Canal. *Journal of Endodontics*, 30(1), 57–60.
- Cord, C. B., Velasco, R. V. C., Lima, L. F. R. M., Rocha, D. G. P., da Silveira Bueno, C. E., & Pinheiro, S. L. (2014). Effective Analysis of the Use of Peracetic Acid after Instrumentation of Root Canals Contaminated with *Enterococcus faecalis*. *Journal of endodontics*, 40(8), 1145–1148.
- Damlar, I., Ozcan, E., Yula, E., Yalcin, M., & Celik, S. (2014). Antimicrobial effects of several calcium silicate-based root-end filling materials. *Dental Materials Journal*, 33(4), 453–457.
- Del Carpio-Perochena, A., Kishen, A., Shrestha, A., & Monteiro Bramante, C. (2015). Antibacterial Properties Associated with Chitosan Nanoparticle Treatment on Root Dentin and 2 Types of Endodontic Sealers. *Journal of endodontics*, 41(8), 1353–1358.
- Dohaitem, A., Al-Nasser, A., Al-Badah, A., Al-Nazhan, S., & Al-Maflehi, N. (2011).

- An in vitro evaluation of antifungal activity of bioaggregate. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology*, 112(4), e27–30.
- Eldeniz, A. U., Erdemir, A., Hadimli, H. H., Belli, S., & Erganis, O. (2006). Assessment of antibacterial activity of EndoREZ. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics*, 102(1), 119–26.
- Eleazer, P. D., Glickman, G. N., McClanahan, S. B., Webb, T. D., & Justman, B. C. (2012). Glossary of Endodontic Terms. *Journal of the American Association of Endodontists*, 1, 1–51.
- European Society of Endodontology. (2006). Quality guidelines for endodontic treatment: consensus report of the European Society of Endodontology. *International Endodontic Journal*, 39(12), 921–930.
- Faria-Júnior, N. B., Tanomaru-Filho, M., Berbert, F. L. C. V., & Guerreiro-Tanomaru, J. M. (2013). Antibiofilm activity, pH and solubility of endodontic sealers. *International Endodontic Journal*, 46(8), 755–762.
- Ferreira, N. S., Martinho, F. C., Cardoso, F. G. R., Nascimento, G. G., Carvalho, C. A. T., & Valera, M. C. (2015). Microbiological Profile Resistant to Different Intracanal Medications in Primary Endodontic Infections. *Journal of endodontics*, 41(6), 824–830.
- Gatewood, R. S. (2007). Endodontic Materials. *Dental Clinics of North America*, 51(3), 695–712.
- Gjorgievska, E., Apostolska, S., Dimkov, A., Nicholson, J. W., & Kaftandzieva, A. (2013). Incorporation of antimicrobial agents can be used to enhance the antibacterial effect of endodontic sealers. *Dental Materials*, 29(3), e29–e34.
- Gong, S.-Q., Huang, Z.-B., Shi, W., Ma, B., Tay, F. R., & Zhou, B. (2014). In Vitro Evaluation of Antibacterial Effect of AH Plus Incorporated with Quaternary Ammonium Epoxy Silicate against *Enterococcus faecalis*. *Journal of endodontics*, 40(10), 1611–1615.
- Haapasalo, M., Endal, U., Zandi, H., & Coil, J. M. (2005). Eradication of endodontic infection by instrumentation and irrigation solutions. *Endodontic Topics*, 10, 77–102.
- Haapasalo, M., Qian, W., & Shen, Y. (2013). Irrigation : beyond the smear layer. *Endodontic Topics*, 27, 35–53.
- Haapasalo, M., & Shen, Y. (2013). Evolution of nickel - titanium instruments : from past to future. *Endodontic Topics*, 29, 3–17.
- Heyder, M., Kranz, S., Völpel, A., Pfister, W., Watts, D. C., Jandt, K. D., & Sigusch, B. W. (2013). Antibacterial effect of different root canal sealers on three bacterial species. *Dental Materials*, 29(5), 542–549.

- Hiraishi, N., Yiu, C. K. Y., King, N. M., & Tay, F. R. (2009). Antibacterial Effect of Experimental Chlorhexidine-releasing Polymethyl Methacrylate-based Root Canal Sealers. *Journal of Endodontics*, 35(9), 1255–1258.
- Hoelscher, A. A., Bahcall, J. K., & Maki, J. S. (2006). In Vitro Evaluation of the Antimicrobial Effects of a Root Canal Sealer-Antibiotic Combination Against *Enterococcus faecalis*. *Journal of Endodontics*, 32(2), 145–147.
- Holt, D. M., Watts, J. D., Beeson, T. J., Kirkpatrick, T. C., & Rutledge, R. E. (2007). The Anti-microbial Effect Against *Enterococcus faecalis* and the Compressive Strength of Two Types of Mineral Trioxide Aggregate Mixed With Sterile Water or 2% Chlorhexidine Liquid. *Journal of Endodontics*, 33(7), 844–847.
- Hülsmann, M. (2013). Effects of mechanical instrumentation and chemical irrigation on the root canal dentin and surrounding tissues. *Endodontic Topics*, 29, 55–86.
- Hülsmann, M., Peters, O. A., & Dummer, P. M. H. (2005). Mechanical preparation of root canals: shaping goals, techniques and means. *Endodontic Topics*, 10, 30–46.
- Johnson, W. T., & Kulild, J. C. (2011). Obturação do sistema de canais radiculares limpos e modelados. Em S. Cohen & K. M. Hargreaves (Eds.), *Cohen Caminhos da Polpa* (10.<sup>a</sup> ed., pp. 324–358). Rio de Janeiro: Elsevier.
- Kesler Shvero, D., Abramovitz, I., Zaltsman, N., Perez Davidi, M., Weiss, E. I., & Beyth, N. (2013). Towards antibacterial endodontic sealers using quaternary ammonium nanoparticles. *International Endodontic Journal*, 46(8), 747–754.
- Krasner, P., Rankow, H. J., & Abrams, E. S. (2010). Access opening and canal location. *American Association of Endodontists*, 1, 1–8.
- Lima, S. M. D. F., Sousa, M. G. D. C., Freire, M. D. S., Almeida, J. A. De, Cantuária, A. P. D. C., Machado e Silva, T. A., ... Rezende, T. M. B. (2015). Immune Response Profile against Persistent Endodontic Pathogens *Candida albicans* and *Enterococcus faecalis* In Vitro. *Journal of Endodontics*, 41(7), 1061–1065.
- Lins, R. X., de Oliveira Andrade, A., Hirata Junior, R., Wilson, M. J., Lewis, M. A. O., Williams, D. W., & Fidel, R. A. S. (2013). Antimicrobial resistance and virulence traits of *Enterococcus faecalis* from primary endodontic infections. *Journal of Dentistry*, 41(9), 779–786.
- Lovato, K. F., & Sedgley, C. M. (2011). Antibacterial Activity of EndoSequence Root Repair Material and ProRoot MTA against Clinical Isolates of *Enterococcus faecalis*. *Journal of Endodontics*, 37(11), 1542–1546.
- Lucas, B. M. B. N. (2015). *Estudo in vitro comparativo da citotoxicidade de dois cimentos endodônticos modificados com clorhexidina* (Tese de Mestrado). Instituto Superior de Ciências da Saúde Egas Moniz. Portugal.
- Metzger, Z., Solomonov, M., & Kfir, A. (2013). The role of mechanical instrumentation

- in the cleaning of root canals. *Endodontic Topics*, 29, 87–109.
- Mohammadi, Z., & Abbott, P. V. (2009). The properties and applications of chlorhexidine in endodontics. *International Endodontic Journal*, 42(4), 288–302.
- Morgental, R. D., Vier-Pelisser, F. V., Oliveira, S. D., Antunes, F. C., Cogo, D. M., & Kopper, P. M. P. (2011). Antibacterial activity of two MTA-based root canal sealers. *International Endodontic Journal*, 44(12), 1128–1133.
- Nair, P. N. R. (2006). On the causes of persistent apical periodontitis: A review. *International Endodontic Journal*, 39(4), 249–281.
- Neelakantan, P., Sanjeev, K., & Subbarao, C. V. (2007). Duration-dependent susceptibility of endodontic pathogens to calcium hydroxide and chlorhexidene gel used as intracanal medicament: an in vitro evaluation. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics*, 104(4), e138–41.
- Ørstavik, D. (2005). Materials used for root canal obturation : technical , biological and clinical testing. *Endodontic Topics*, 12, 25–38.
- Ørstavik, D. (2014). Endodontic filling materials. *Endodontic Topics*, 31, 53–67.
- Park, O.-J., Yang, J., Kim, J., Yun, C.-H., & Han, S. H. (2015). *Enterococcus faecalis* Attenuates the Differentiation of Macrophages into Osteoclasts. *Journal of endodontics*, 41(5), 658–62.
- Pizzo, G., Giammanco, G. M., Cumbo, E., Nicolosi, G., & Gallina, G. (2006). In vitro antibacterial activity of endodontic sealers. *Journal of dentistry*, 34, 35–40.
- Resende, L. M., Rached-Junior, F. J. A., Versiani, M. A., Souza-Gabriel, A. E., Miranda, C. E. S., Silva-Sousa, Y. T. C., & Sousa Neto, M. D. (2009). A comparative study of physicochemical properties of AH Plus, Epiphany and Epiphany SE root canal sealers. *International Endodontic Journal*, 42(9), 785–793.
- Ricucci, D., Siqueira Jr, J. F., Lopes, W. S. P., Vieira, A. R., & Rôças, I. N. (2015). Extraradicular Infection as the Cause of Persistent Symptoms: A Case Series. *Journal of Endodontics*, 41(2), 265–273.
- Rôças, I. N., Hülsmann, M., & Siqueira Jr, J. F. (2008). Microorganisms in Root Canal–treated Teeth from a German Population. *Journal of Endodontics*, 34(8), 926–931.
- Ruiz-Linares, M., Bailón-Sanchez, M. E., Baca, P., Valderrama, M., & Ferrer-Luque, C. M. (2013). Physical Properties of AH Plus with Chlorhexidine. *Journal of Endodontics*, 39(12), 1611–1614.
- Sassone, L. M., Fidel, R. A., Faveri, M., Guerra, R., Figueiredo, L., Fidel, S. R., & Feres, M. (2008). A Microbiological Profile of Symptomatic Teeth with Primary Endodontic Infections. *Journal of endodontics*, 34(5), 541–545.
- Saunders, E. M. (2005). Hand instrumentation in root canal preparation. *Endodontic*

- Topics*, 10(1), 163–167.
- Schilder, H. (2006). Filling Root Canals in Three Dimensions. *Journal of Endodontics*, 32(4), 281–290.
- Shen, Y., & Cheung, G. S. P. (2013). Methods and models to study nickel-titanium instruments. *Endodontic Topics*, 29, 18–41.
- Shen, Y., Gao, Y., Lin, J., Ma, J., Wang, Z., & Haapasalo, M. (2012). Methods and models to study irrigation. *Endodontic Topics*, 27, 3–34.
- Shen, Y., Peng, B., Yang, Y., Ma, J., & Haapasalo, M. (2015). What do different tests tell about the mechanical and biological properties of bioceramic materials? *Endodontic Topics*, 32, 47–85.
- Silveira, F. F., Soares, J. A., Nunes, E., & Mordente, V. L. M. (2007). Negative influence of continuous wave technique on apical sealing of the root canal system with Resilon. *Journal of Oral Science*, 49(2), 121–128.
- Siqueira Jr, J. F., & Rôças, I. N. (2008). Clinical Implications and Microbiology of Bacterial Persistence after Treatment Procedures. *Journal of endodontics*, 34(11), 1291–1301.e3.
- Siqueira Jr, J. F., & Rôças, I. N. (2011). Microbiologia e Tratamento de Infecções Endodônticas. Em S. Cohen & K. M. Hargreaves (Eds.), *Cohen Caminhos da Polpa* (10<sup>a</sup> ed., pp. 512–548). Rio de Janeiro: Elsevier.
- Siqueira Jr, J. F., & Rôças, I. N. (2014). Present status and future directions in endodontic microbiology. *Endodontic Topics*, 30, 3–22. doi:10.1111/etp.12060
- Siqueira Jr, J. F., Rôças, I. N., Lopes, H. P., Elias, C. N., & de Uzeda, M. (2002). Fungal Infection of the Radicular Dentin. *Journal of endodontics*, 28(11), 770–773.
- Slutzky-Goldberg, I., Slutzky, H., Solomonov, M., Moshonov, J., Weiss, E. I., & Matalon, S. (2008). Antibacterial Properties of Four Endodontic Sealers. *Journal of endodontics*, 34(6), 735–738.
- Stowe, T. J., Sedgley, C. M., Stowe, B., & Fenno, C. J. (2004). The Effects of Chlorhexidine Gluconate ( 0.12 %) on the Antimicrobial Properties of Tooth-Colored ProRoot Mineral Trioxide Aggregate. *Journal of Endodontics*, 30(6), 429–431.
- Stuart, C. H., Schwartz, S. A., Beeson, T. J., & Owatz, C. B. (2006). Enterococcus faecalis: Its Role in Root Canal Treatment Failure and Current Concepts in Retreatment. *Journal of Endodontics*, 32(2), 93–98.
- Subramanian, K., & Mickel, A. K. (2009). Molecular Analysis of Persistent Periradicular Lesions and Root Ends Reveals a Diverse Microbial Profile. *Journal of Endodontics*, 35(7), 950–957.

- Tennert, C., Fuhrmann, M., Wittmer, A., Karygianni, L., Altenburger, M. J., Pelz, K., ... Al-Ahmad, A. (2014). New Bacterial Composition in Primary and Persistent/Secondary Endodontic Infections with Respect to Clinical and Radiographic Findings. *Journal of Endodontics*, 40(5), 670–677.
- Turk, B. T., Ates, M., & Sen, B. H. (2008). The effect of treatment of radicular dentin on colonization patterns of *C. albicans*. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology*, 106(3), 457–462.
- Tyagi, S., Mishra, P., & Tyagi, P. (2013). Evolution of root canal sealers: An insight story. *European Journal of General Dentistry*, 2(3), 199–218.
- Wade, W. G. (2013). The oral microbiome in health and disease. *Pharmacological Research*, 69(1), 137–143.
- Wang, C. S., Arnold, R. R., Trope, M., & Teixeira, F. B. (2007). Clinical Efficiency of 2% Chlorhexidine Gel in Reducing Intracanal Bacteria. *Journal of Endodontics*, 33(11), 1283–1289.
- Wang, Z., Shen, Y., & Haapasalo, M. (2014). Dental materials with antibiofilm properties. *Dental Materials*, 30(2), e1–e16.
- Weiss, E. I., Shalhav, M., & Fuss, Z. (1996). Assessment of antibacterial activity of endodontic sealers by a direct contact test. *Endodontics & dental traumatology*, 12, 179–184.
- Yücel, A. Ç., & Çiftçi, A. (2006). Effects of different root canal obturation techniques on bacterial penetration. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology*, 102(4), e88–e92.
- Zehnder, M. (2006). Root Canal Irrigants. *Journal of Endodontics*, 32(5), 389–398.
- Zehnder, M., & Guggenheim, B. (2009). The mysterious appearance of enterococci in filled root canals. *International Endodontic Journal*, 42(4), 277–287.
- 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.
- Zhang, H., Shen, Y., Ruse, N. D., & Haapasalo, M. (2009). Antibacterial Activity of Endodontic Sealers by Modified Direct Contact Test Against *Enterococcus faecalis*. *Journal of Endodontics*, 35(7), 1051–1055.
- Zhou, H., Peng, B., & Zheng, Y.-F. (2013). An overview of the mechanical properties of nickel-titanium endodontic instruments. *Endodontic Topics*, 29, 42–54.

## VII – Anexos



5

Ex.mo Senhor  
**Nuno Miguel Belo Gonçalves**

Monte de Caparica, 24 de março de 2015

Ex.mo Senhor,

Venho comunicar-lhe que o Pedido de Parecer que submeteu à apreciação da Comissão de Ética da Egas Moniz, com o tema denominado "*Estudo in vitro da capacidade antimicrobiana de quatro cimentos endodônticos modificados com clorhexidina mediante teste de contacto directo*", foi aprovado por unanimidade.

Com os melhores cumprimentos,

A Presidente da Comissão de Ética da Egas Moniz

  
Prof.<sup>a</sup>. Doutora Maria Fernanda de Mesquita

c.c. – Prof. Doutor Diogo Gonzalez

---

EGAS MONIZ – COOPERATIVA DE ENSINO SUPERIOR, CRL  
Campus Universitário – Quinta da Granja – Monte de Caparica  
2829-511 Caparica