**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU**

ALDO ENRIQUE DEL CARPIO PEROCHENA

**Efeito das nanopartículas de quitosana e da variação da concentração,
temperatura e pH do hipoclorito de sódio sobre biofilmes orais
formados “*in situ*”.**

**BAURU
2014**

ALDO ENRIQUE DEL CARPIO PEROCHENA

**Efeito das nanopartículas de quitosana e da variação da concentração,
temperatura e pH do hipoclorito de sódio sobre biofilmes orais
formados “*in situ*”.**

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia
de Bauru da Universidade de São Paulo, como
parte dos requisitos para a obtenção do título
de Doutor em Ciências Odontológicas
Aplicadas.

Área de Concentração: Endodontia.

Orientador: Prof. Dr. Clovis Monteiro Bramante

Versão corrigida

BAURU
2014

del Carpio-Perochena, Aldo Enrique

P424e Efeito das nanopartículas de quitosana e da variação da concentração, temperatura e pH do hipoclorito de sódio sobre biofilmes orais formados “*in situ*” / Aldo Enrique del Carpio Perochena. – Bauru, 2015.

131 p. : il. ; 30cm.

Tese. (Doutorado) -- Faculdade de Odontologia de Bauru. Universidade de São Paulo.

Orientador: Prof. Dr. Clovis Monteiro Bramante

Nota: A versão original desta tese encontra-se disponível no Serviço de Biblioteca e Documentação da Faculdade de Odontologia de Bauru – FOB/USP

Autorizo, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese, por processos fotocopiadores e outros meios eletrônicos.

Assinatura:

Data:

Comitê de Ética da FOB-USP
Protocolo nº: 166/2011
Data: 01/12/2011

Aldo Enrique del Carpio Perochena

Dados curriculares

Nascimento	01 de Junho de 1982 Arequipa – Peru.
Filiação	José Enrique del Carpio Vargas. Ana Maria Perochena de del Carpio.
2000 – 2005	Graduação em Odontologia pela Universidade Católica de Santa Maria. Arequipa – Peru.
2007 – 2008	Especialização em Endodontia pela Faculdade de Odontologia de Bauru – Universidade de São Paulo.
2009 – 2011	Mestrado em Ciências Odontológicas Aplicadas. Área de concentração em Endodontia na Faculdade de Odontologia de Bauru – Universidade de São Paulo.
2014 – 2014	Doutorado sanduíche. Laboratory of Phototherapeutics & Nanomaterials, Faculty of Dentistry, University of Toronto, Canada
2011 – 2015	Doutorado em Ciências Odontológicas Aplicadas. Área de concentração em Endodontia na Faculdade de Odontologia de Bauru – Universidade de São Paulo.

Nada sobre esta terra pode deter o homem que possui a correta atitude mental para atingir sua meta. Nada sobre esta terra pode ajudar o homem com uma incorreta atitude mental."

(Thomas Jefferson)

DEDICATÓRIA

À Deus pela vida e fortaleza e motivações de cada dia.

Aos meus pais, José Enrique del Carpio Vargas (in memoriam) e Ana María Perochena de del Carpio.

Paí, día a día me ensinaste o verdadeiro conceito de família, respeito e humanidade. Embora o tempo passe você sempre será minha melhor lembrança e maior adoração. Obrigado por cada lição de sabedoria que me dedicaste. Você estará eternamente vivo em cada um dos meus passos. Te amo y extraño papá lindo.

Mãe, você é minha rainha, meu imutável conceito de luta e incansável amor. Te dizer obrigado jamais será suficiente para te retribuir, porque você é minha inextinguível fonte geradora de amor. Por favor não me falte nunca, te amo mamita.

Aos Meus irmãos Eduardo e Alejandra por sempre se preocuparem por mim, pelos seus constantes apoios em cada uma das etapas importantes da minha vida. Los amo mucho.

A minha esposa Carolina e meu filho Adrian. Meu amor, inimaginavelmente superamos a distância e todas as dificuldades que vem com ela. Finalmente a nossa perseverança e amor venceram e se afiançaram com a maior alegria que a vida nos deu, nosso filho.

Adriancito, você me fez conhecer o mais puro amor, agora você é meu motor. Obrigado por existir filinho...te amo

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Professor Dr. Clovis Monteiro Bramante pelo apoio e disposição. Professor, você me ensinou que a estima e respeito se ganham com trabalho. Obrigado por ter me outorgado o privilégio de compartilhar sua experiência e conhecimentos comigo nos últimos 8 anos. Valorizo cada vez que estimulou minhas conquistas e valorizo ainda mais quando nos momentos difíceis você passou de professor a amigo.

Ao Professor Dr. Marco Antonio Húngaro Duarte. Imensa gratidão é muito pouco para resumir minha estima e carinho pelo senhor. Me atrevo a utilizar suas palavras para lhe dizer: “você é diferenciado”. Obrigado pelos conselhos, pelo apoio e pela sua inestimável amizade dentro e fora da Faculdade.

À Professora Dra. Flaviana Bombarda de Andrade, pela simpatia e por estar sempre disposta a me ajudar.

Ao Professor Dr. Rodrigo Vivan, por dar-me a confiança de trata-lo como um amigo e me oferecer sua ajuda.

Aos Professores. Ivaldo Gomes de Moraes, Roberto Brandão Garcia e Norberti Bernardineli, por compartilhar momentos alegres, pela educação, bom trato e ter sempre disponibilidade para esclarecer minhas dúvidas.

Aos funcionários da disciplina de Endodontia, Neide Leandro, Edímauro de Andrade, Andressa Tossi e Suely Regina Bettio por sempre estarem pendentes de mim. Sua ajuda e carinho fizeram deste tempo uma experiência inesquecível. Vou sentir muitas saudades de todos vocês.

À Marcia Graeff, por ser a excelente pessoa que você é. Voce contagia alegria Marcia. Muito obrigado pela amizade e constante ajuda.

A Marcelo Milanda, pela amabilidade e ajuda durante a realização deste trabalho.

Aos funcionários da Pós-graduação, do Comitê de Ética em Pesquisa e da Biblioteca de FOB-USP. Giane Tenório Quintela, Margareth Mokarzel, Fatima Carvalho, Ana Letícia Momesso, Rita Paglione, Maristela Ferrari e Maria Helena Ronchesel pelo apoio na realização deste trabalho.

Aos Professores Haír Salas Beltrán e Marco Zevallos, da Faculdade de Odontologia da Universidade Católica Santa María de Arequipa-Perú, pela amizade e constante incentivo na minha superação profissional.

Aos Professor (s) Doctor (s) Fauze Aouada e Marcia de Moura do Departamento de Física e Química da Universidade Estadual Paulista (UNESP), Ilha Solteira, pela ajuda e boa disposição durante a realização da terceira parte deste trabalho.

Ao Professor Anil Kishen da Faculdade de Odontologia da Universidade de Toronto-Canada pela amizade e confiança. Graças ao senhor eu pude adquirir conhecimentos e viver uma das etapas mais agradáveis da minha vida acadêmica.

As minhas amigas Annie Shrestha, Martha Cordova, Suja Shrestha e Arezou Ossareh pela simpatia, amizade e momentos felizes compartilhados durante minha estadia no Canada.

Ao Professor Ashraf Abd-Elmeguid da Faculdade de Odontologia da Universidade de Alberta-Canada pela constante ajuda e preocupação.

Aos meus grandes amigos Bruno Cavenago e Pablo Amoroso (mí causa). Sempre serei grato pela amizade sincera, eu considero vocês como irmãos.

Ao Diego Bravo Calderón, Carlos Villavicencio e Juan Fernando Ordoñez Aguilera por serem além de meus amigos meus irmãos em todo momento. Obrigado pela agradável convivência.

Aos meus amigos Murilo Priori Alcalde, Samuel Lucas Fernandes e Bruno Martiní Gumarães pelas alegrias. Murilão, você é um grande amigo, obrigado por tudo. Tupi, esse seu coração é o melhor presente que Deus te deu. Loba loca, obrigado por ter me dado tanta risada e bons momentos.

A meu amigo e conterrâneo, Ronald Ordínola Zapata. Meu amigo, eu devo muito da minha formação de pós-graduando a você. Muito obrigado por tudo.

Aos meus amigos, Marcelo Haas Villas Boas, Clarissa Teles Rodrigues, Marina Marciano da Silva, Paloma Gagliardi Minotti, Raquel Zanin Mídena e Thaís Vieira Rizzo. Somente posso lhes agradecer por serem pessoas tão maravilhosas. Sabem que podem contar comigo quando precisar.

A todos meus amigos pós-graduandos da disciplina de Endodontia da FOB-USP, de Maneira especial a Marcela Milanezi, Amanda Maliza, Layla Vasconcelos, Paulo Weckwerth e Jussaro Duque pela prazerosa convivência.

A meus amigos ex pós-graduandos da disciplina de Endodontia da FOB-USP. Ricardo Bernardes, Jarcio Baldi, Christian Giampietro Brandão e Fernando Orosco pela ajuda e convivência.

Ao Professor Rodrigo Sanches Cunha da Faculdade de Odontologia da Universidade Manitoba-Canada, agradeço imensamente pela sua grande amabilidade, ajuda e confiança.

A Thelma Lopes Silva pelas orientações durante a realização da primeira parte deste estudo.

A todos meus familiares, em especial a Beatriz Perochena, Elsa Llerena, Eduardo Perochena Ll, Renzo Perochena S, Angel del Carpio e Carlos del Carpio V e suas respectivas famílias pelo carinho e constante apoio.

A Claudio Bustamante, Carlos Paredes, Luis Salinas, Carlos Montesinos, Mauricio Villena, Jose Antonio Manrique, Zaith Corrales, Renato Carpio, Pierre Segura e Eder Sucila. Nos crescemos juntos e forjamos uma amizade invejável por muitos. Obrigado meus irmãos pelo seu apoio a pesar dos anos e da distância.

A meus irmãos da Loja Maçônica Roosevelt, Bauru, São Paulo. Pela convivência e grande amabilidade, de maneira especial ao Luciano Olavo pela sua disposição e ajuda.

AGRADECIMENTOS INSTITUCIONAIS

À Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, na pessoa do seu Diretor, Profa. Dra Maria Aparecida de Andrade Moreira Machado.

À Comissão da Pós-graduação, na pessoa do Professor Dr. Guilherme dos Reis Pereira Janson

Ao coordenador do programa de Pós-graduação na área de concentração em Endodontia, Professor Dr. Marco Antonio Húngaro Duarte.

Ao Centro Integrado de Pesquisas da Faculdade de Odontologia de Bauru-USP, na pessoa do Professor Dr. Rodrigo Cardoso de Oliveira.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP, pelo apoio financeiro para a realização deste trabalho e durante toda minha formação como pós-graduando.

Ao programa Pró-aluno-CAPES, pela ajuda na disponibilização das impressões dos pôster para as apresentações deste trabalho.

Resumo

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar se a variação da temperatura e pH do hipoclorito de sódio (NaOCl), incrementa sua capacidade antibacteriana e de dissolução. Foi avaliado também, se as nanopartículas de Quitosana (CNPs) inibem o crescimento bacteriano e removem a lama dentinária. Foram utilizados 260 blocos de dentina bovina infetados intra-oralmente. As soluções experimentais foram NaOCl a 1% e 2.5%, a temperatura ambiente e 37°C e acidificado a pH 5 e 7. Os tempos de exposição foram 5 e 20 min. Os espécimes foram analisados pré (controle) e pós-irrigação. Após esta análise, as amostras foram incubadas em BHI por 24 horas e analisadas novamente quanto a reativação bacteriana. Estes procedimentos foram realizados em duplicado para poder determinar a porcentagem de limpeza dentinária. Para analisar o efeito quelante das CNPs sobre a dentina infetada *in situ*, as amostras receberam uma irrigação final com CNPs em solução e analisadas imediatamente ou infetadas intra-oralmente para avaliar o efeito antibacteriano. O NaOCl apresentou poder antibacteriano e foi capaz de dissolver significativamente o biofilme sem importar sua temperatura. O NaOCl em pHs ácidos apresentaram alto poder antibacteriano, contudo seu poder de dissolução decresceu. As CNPs foram capazes de significativamente remover a lama dentinária e interferir com o crescimento bacteriano sobre dentina. Portanto, a temperatura do NaOCl não é relevante quando é testada sobre biofilmes multi-espécies. O poder antibacteriano do NaOCl foi inversamente proporcional a seu pH, enquanto que a sua capacidade de dissolução foi diretamente proporcional. As CNPs podem ser uma alternativa para o uso de EDTA devido a suas propriedades quelantes e de interferir com a adesão inicial das bactérias sobre dentina.

Palavras chave: Hipoclorito de sódio. Dentina. Biofilme. Quitosana. Nanopartículas.

Abstract

ABSTRACT

Effect of chitosan nanoparticles and the temperature and pH variations of sodium hypochlorite on biofilms formed “*in situ*”.

The aim of this study was to evaluate if the variation of the sodium hypochlorite (NaOCl) temperature and pH increase its antibacterial and dissolution abilities. It was also evaluated if the chitosan nanoparticles (CNPs) inhibit the bacterial growth and remove smear layer. Two hundred-sixty bovine dentin blocks were infected intraorally. The experimental solutions were 1% and 2.5% NaOCl at room temperature and 37°C. the solution was acidified at pH 5 and 7. The exposure times were 5 and 20 min. The specimens were analyzed pre- (control) and post-irrigation. After that, the samples were incubated in BHI and analyzed again to evaluate the bacterial recolonization. These procedures were performed in duplicate to access the percentage of dentinal cleaning. The samples were rinsed with a final irrigation of CNPs and analyzed immediately to determine the chelating effect, or infected intraorally to evaluate its antibacterial ability. NaOCl showed antibacterial power and was able to significantly dissolve the biofilm regardless its temperature. NaOCl at acid pHs showed great antibacterial properties, however its dissolution ability decreased. The CNPs were able to remove significantly the smear layer and interfere with the bacterial growth on dentin. Therefore, the NaOCl temperature is not relevant when the solution was tested on multi-specie biofilms. The antibacterial power of NaOCl was inversely proportional to its pH, while its dissolution capacity was directly proportional. CNPs could be an alternative instead of EDTA due to its chelating properties and ability to interfere with the earlier bacterial adhesion on dentin.

Key words: Sodium hypochlorite. Dentin. Biofilm. Chitosan. Nanoparticles.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES.

Figuras -

- Figura 1.** Imagens do estudo piloto onde se pode observar a dentina após tratamento com hipoclorito de sódio e EDTA verificando a efetividade do método de limpeza analisada com o MEV (esquerda) e CLSM (direita)..... 58
- Figura 2.** Modelo em gesso pedra do arco superior (A), aparelho intrabucal palatino (B), aparelho com os blocos de dentina (C)..... 59

Gráficos-

- Gráfico 1.** Porcentagem de células viáveis após tratamento com NaOCl a 22°C. A avaliação foi realizada imediatamente e após a reativação bacteriana em BHI por 24 horas (R). As colunas representam os intervalos de valores e medianas dos grupos experimentais..... 75
- Gráfico 2.** Biovolume bacteriano expressado em $\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$ após tratamento. A avaliação foi realizada depois que os biofilmes foram tratados com NaOCl à 1% e 2.5% em diferentes pH e reativados em BHI por 24 horas (R) 79
- Gráfico 3..** Porcentagem de dissolução por escore após tratamento com NaOCl em diferentes concentrações, tempos de contato e temperaturas..... 82
-
-

Gráfico 4.	Porcentagem de dissolução por escore após tratamento com NaOCl em diferentes concentrações e pH durante 5 minutos	83
Gráfico 5.	Porcentagem de dissolução por escore após tratamento com NaOCl em diferentes concentrações e pH durante 20 minutos	84
Gráfico 6.	Porcentagem de dissolução por escore após reativação bacteriana dos biofilmes tratados com NaOCl em diferentes concentrações e pH durante 20 minutos	85
Gráfico 7..	Percentagem de áreas com túbulos dentinários visíveis por escore após irrigação com CNPs.....	86

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Grupos experimentais.	69
Tabela 2.	Mediana e 25–75% percentiles do biovolume total e da percentagem de células viáveis apos tratamento com NaOCl a 22°C e 37°C.....	74
Tabela 3.	Mediana e 25–75% percentiles do biovolume total e da percentagem de células viáveis apos tratamento com NaOCl em diferentes concentrações e pH durante 5 MINUTOS.).....	77
Tabela 4.	Mediana e 25–75% percentiles do biovolume total e da percentagem de células viáveis apos tratamento com NaOCl em diferentes concentrações e pH durante 20 MINUTOS.....	78
Tabela 5.	Mediana e 25–75% percentiles do biovolume total e da percentagem de células viáveis apos diferentes tratamentos experimentais usando CNPs.....	87

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

%.....	Porcentagem.
seg	Segundo.
min	Minutos.
mm.....	Milímetros.
µm.....	Micrometros.
nm.....	Nanômetro.
µg.....	Microgramas.
mL.....	Mililitros.
ppm.....	Partes por milhão.
x	Aumentos.
SAD	Sistema Arginina Deiminasa
PIPS.....	Photon-Induced Photoacoustic Streaming
N	Numero.
G	Grupo.
p	Significância estatística.
°C	Graus Celsius.
G+	Gram Positivo.
G-.....	Gram negativo.
NaOCl.....	Hipoclorito de sódio.
Ca(OH) ₂	Hidróxido de cálcio.
CLSM.....	Confocal Laser Scanning Microscopy.
MEV	Microscópio Eletrônico de Varredura.
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético.
BHI.....	Infusão coração-cérebro.
PMCC	Paramonoclorofenol canforado.
UFC	Unidades formadoras de colônias.
FISH.....	Hibridação fluorescente in situ.
PSEM.....	Microscópio Eletrônico de Varredura de bancada.
CNPs	Nanopartículas de quitosana.
TPP	Tripolifosfato

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	19
2	REVISÃO DA LITERATURA.....	25
2.1	Biofilmes orais e no canal radicular	27
2.2	Hipoclorito de sódio sobre biofilmes bacterianos.....	35
2.3	Efeito antibacteriano e de dissolução do hipoclorito de sódio em diferentes temperaturas e pHs.....	43
2.4	Efeito da quitosana sobre biofilmes e dentina	46
3	PROPOSIÇÃO.....	51
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	55
I PARTE:		
4.1	Obtenção e tratamento dos blocos de dentina	57
4.2	Formação do Biofilme Oral in situ.....	58
4.3	Análises do biofilme oral pré e pós irrigação com hipoclorito de sódio a temperatura ambiente e aquecido a 37°C.....	59
4.4	Análise da reativação bacteriana.....	60
4.5	Análise das amostras no Microscópio confocal de varredura laser	62
4.6	Determinação da viabilidade bacteriana e biovolume do biofilme.....	62
4.7	Análise estatística	63
4.8	Irrigação do biofilme oral com hipoclorito de sódio acidificado a pH 5 e 7	63
II PARTE:		
4.9	Preparo previo das amostras antes de serem analisadas no PSEM.....	66

4.10	Análise das amostras no PSEM	66
4.11	Análise estatística	67
III PARTE:		
4.12	Sínteses das nanopartículas de quitosana	68
4.13	Tratamento das amostras	68
4.14	Efeito quelante das CNPs	69
4.15	Capacidade antibacteriana das CNPs	70
4.16	Análise estatística	70
5	RESULTADOS	71
5.1	Resultados da primeira parte do projeto	73
	- Variação da temperatura do NaOCl	73
	- Variação do pH do NaOCl	76
5.2	Resultados da segunda parte do projeto	80
	- Variação da temperatura do NaOCl	80
	- Variação do pH do NaOCl	80
5.3	Resultados da terceira parte do projeto	85
6	DISCUSSÃO	89
6.1	Da metodologia	91
6.2	Dos resultados	92
	- Da variação da temperatura do NaOCl	92
	- Da variação do pH do NaOCl	94
	- Do efeito quelante e antibacteriano das CNPs	96
7	CONCLUSÕES	99
	REFERÊNCIAS	103
	ANEXOS	117

1 Introdução

1 INTRODUÇÃO

O principal objetivo da terapia endodôntica é remover restos pulpares e microorganismos do sistema de canais radiculares. Todavia, devido à complexa anatomia do canal radicular mais do 50% de suas paredes permanecem sem instrumentar (PETERS et al., 2001). Em consequência, a persistência de polpa, dentina infetada e biofilmes bacterianos podem determinar o fracasso do tratamento endodôntico.

Os restos de tecido orgânico e os biofilmes bacterianos com seus produtos são os principais fatores etiológicos na iniciação, propagação e persistência da periodontite apical crônica (KAKEHASHI; STANLEY; FITZGERALD, 1965; MOLLER et al., 1981). Ultra-estruturalmente os biofilmes formam microcolônias com canais dispersos os quais estão separados do meio ambiente externo por um fluido. As células dentro do biofilme produzem matriz extracelular e geralmente as células da sua profundidade estão expostas a condições ambientais que diferem das condições existentes na superfície, como por exemplo, a diminuição da tensão de oxigênio (FIGDOR; SUNDQVIST, 2007). Além disso, a baixa taxa metabólica dos microorganismos dentro do biofilme assim como a matriz extracelular dificultam a ação e efetividade de muitos antimicrobianos (DUNAVANT et al., 2006). Portanto, todos os estudos sobre a efetividade antimicrobiana das soluções irrigadoras devem ser conduzidos com bactérias na forma de biofilme (CHAVEZ DE PAZ, 2007).

Convencionalmente, a desinfecção dos canais radiculares é realizada mediante procedimentos de preparo químico-mecânico que inclui a limpeza e modelagem dos canais radiculares e a aplicação de soluções químicas desinfetantes (SIQUEIRA; PAIVA; ROCAS, 2007). Embora esta técnica seja o procedimento padrão para a desinfecção dos canais radiculares com polpas necróticas, em muitas oportunidades, esta técnica pode falhar na eliminação completa dos biofilmes bacterianos e restos de tecido orgânico, principalmente devido a diversos fatores microbiológicos e anatômicos (KVIST et al., 2004; NAIR et al., 2005), como já foi demonstrado por diversos estudos que avaliaram o preparo químico-mecânico, revelando crescimento bacteriano de amostras tiradas antes da obturação do canal radicular (SJOGREN et al., 1997). É importante mencionar que a persistência das

infecções é atribuída à resistência dos microrganismos aos antimicrobianos. Desta forma as bactérias de um biofilme podem permanecer inativas ou se desenvolver muito lentamente quando as condições não são favoráveis para seu crescimento (XU, K.D.; MCFETERS; STEWART, 2000). As bactérias existentes em canais com polpas necróticas têm que sobreviver em condições de ausência de nutrientes. Estas bactérias em condições de stress e ausência de nutrientes desenvolvem reações regulatórias adaptativas para mudar seu balanço metabólico a biossíntese de energia necessária para suas funções biológicas fundamentais (WATSON; CLEMENTS; FOSTER, 1998). Em consequência, as bactérias em estado de “stand by” podem se manter viáveis mas não cultiváveis por sua quantidade reduzida. No entanto, quando as condições do seu ambiente se tornam favoráveis novamente, elas podem se reproduzir e desenvolver rapidamente (SHEN; STOJICIC; HAAPASALO, 2010).

A irrigação é um dos aspectos mais importantes no preparo biomecânico do canal radicular, já que mediante este procedimento a solução irrigadora pode atingir lugares onde os instrumentos podem não chegar devido à complexa anatomia do sistema de canais radiculares (QING et al., 2006). Embora o hipoclorito de sódio seja o irrigante mais efetivo quando é avaliado em estudos de laboratório, sua capacidade antimicrobiana in vivo pode depender de outros fatores como sua concentração, temperatura, tempo de contato, pH e concentração do ácido hipocloroso (HClO) (ESTRELA et al., 2002). O fator mais importante que afeta o HClO presente no Hipoclorito de sódio, é o pH, sendo que a diminuição do pH aumenta a dissociação do HClO e em consequência sua efetividade antimicrobiana (KUROIWA et al., 2003).

Em um estudo prévio encontrou-se que o hipoclorito de sódio à 5.25% foi mais efetivo na dissolução de biofilme oral (DEL CARPIO-PEROCHENA et al., 2011). Entretanto, uma limitação do uso do hipoclorito de sódio em altas concentrações é que causa danos estruturais na dentina e é altamente tóxico para os tecidos periapicais (PASCON et al., 2009) (BARNHART et al., 2005). O pré-aquecimento de soluções de hipoclorito de sódio a baixas concentrações, melhora sua capacidade antibacteriana e de dissolução de tecidos, com nenhum efeito sobre sua estabilidade a curto prazo. Assim mesmo, sua toxicidade é menor em comparação com as soluções hipoclorito de sódio com uma maior concentração (a uma temperatura inferior) com a mesma eficácia (SIRTES et al., 2005). Embora já

seja quase um consenso que o aumento da temperatura do hipoclorito de sódio melhora sua efetividade, existem poucas publicações sobre o tema (ROSSI-FEDELE; DE FIGUEIREDO, 2008; SIRTES et al., 2005).

A quitosana é um biopolímero catiônico não tóxico, geralmente obtido pela desacetilação alcalina da quitina, a qual é o principal componente do exoesqueleto dos crustáceos (SINHA et al., 2004). Além disso, a quitosana possui atividade antibacteriana sobre uma ampla variedade de fungos e bactérias (CALAMARI et al., 2011; IKINCI et al., 2002; NO et al., 2002). Adicionalmente, a presença de nanopartículas de quitosana (CNPs) na interface dentinária, pode induzir biomineralização das matrizes de colágeno formando uma barreira contra a recolonização bacteriana (XU, Z. et al., 2011). Na literatura há limitada informação sobre a utilização nas CNPs aplicadas na endodontia e em nenhum desses artigos elas foram usadas como irrigante final. No entanto, quando CNPs são incorporadas ao cimento de óxido de zinco-eugenol, o efeito bactericida do selador é potencializado, inibindo o crescimento bacteriano na interface cimento dentina (DASILVA et al., 2013; KISHEN et al., 2008). Além disso, a adição de CNPs no primer de cimentos à base de metacrilato, mostraram uma potente ação antibacteriana, sem interferir com a força de adesão do selador (ELSAKA; ELNAGHY, 2012).

O objetivo deste estudo foi avaliar a efetividade antimicrobiana das CNPs e da variação da concentração, temperatura, tempo de contato e pH do NaOCl sobre biofilmes polimicrobianos. Além disso, foi avaliado se o remanescente bacteriano é capaz de se reproduzir novamente em um meio rico em nutrientes. Foi avaliada também a capacidade de dissolução do NaOCl em função dos parâmetros acima mencionados e se o efeito residual do NaOCl interfere com a ação das CNPs.

A hipótese deste trabalho foi: A acidificação e aquecimento do hipoclorito de sódio a baixas concentrações potencializam seu efeito antimicrobiano e sua capacidade de dissolução; a irrigação final do canal radicular com CNPs inibe o crescimento bacteriano?.

2 *Revisão da Literatura*

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Biofilmes orais e no canal radicular.

AUSCHILL et al., em 2005, descreveram a ação de dois enxaguatórios bucais a base de fluoreto estanhoso (250ppm) e clorexidina (0.2%), encontrando que ambos os enxaguatórios tinham propriedades antibacterianas e redução de placa com respeito ao biofilme formado “in situ”. O estudo permitiu o exame de biofilme oral e a influência dos componentes antibacterianos aplicados sobre condições clínicas.

GEORGE, KISHEN, SONG, em 2005, estudaram a influencia das mudanças ambientais na formação de biofilmes de *E. faecalis* e sua penetração intratubular em canais de dentes humanos. Os espécimes (N=55) foram divididos em 4 grupos segundo as condições de crescimento e o meio de inoculação: G1 meio rico em nutrientes e incubados a 37°C em condições aeróbias; G2 meio rico em nutrientes e incubados a 37°C em condições anaeróbias; G3 meio sem nutrientes e incubados a 37°C em condições aeróbias; G4 meio sem nutrientes e incubados a 37°C em condições anaeróbias. A análise das amostras foi feita por meio do microscópio eletrônico de varredura (MEV), microscópio confocal de varredura laser (CLSM), microscópio de luz e energia dispersiva de raios X (EDX). As imagens microscópicas mostraram uma marcada variação na ultraestrutura dos biofilmes formados em diferentes condições experimentais. A EDX mostrou um aumento significativo dos níveis de cálcio nas estruturas biofilmicas formadas em condições anaeróbias privadas de nutrientes. A profundidade de penetração das bactérias foi significativamente maior em condições ricas em nutrientes. O estudo mostrou distintas propriedades ultraestruturais e físico-químicas nos biofilmes formados e a penetração intratubular do *E. faecalis* em diferentes condições de crescimento.

KISHEN, GEORGE, KUMAR, em 2006, investigaram a interação entre o *E. faecalis* e o substrato dentinário do canal radicular. Os dentes foram preparados e separados em 2 grupos. No grupo 1, os dentes foram incubados com *E. faecalis* por períodos de 2, 4 e 6 semanas, a composição química do biofilme foi determinada usando difração de raios X e transformação infravermelha de Fourier. No grupo 2 os

dentes foram incubados por um período de 6 semanas; a topografia e ultraestrutura do biofilme foi examinada pelo SEM, microscópio de luz e CLSM. A pesquisa mostrou diferentes etapas na interação de *E. faecalis* com a dentina radicular. Por outro lado, uma precipitação de apatita induzida pela bactéria também foi observada no biofilme maduro. Concluíram que a habilidade do *E. faecalis* para formar biofilme calcificado nas paredes do canal radicular pode ser um fator que contribui a sua persistência após o tratamento endodôntico.

YOSHIDA et al., em 2006, analisaram o comportamento dos polissacarídeos receptores de *streptococcus* (RPS) do grupo viridans no reconhecimento de moléculas para a formação de biofilmes, tendo em consideração que os *streptococcus* do grupo *viridans* iniciam a colonização da superfície de dentes humanos coagregados entre si ou com *Actinomyces naeslundii*. Os pesquisadores acharam que os RPS dependentes da interação de *S. oralis* com *A. naeslundii* promoveram o crescimento bacteriano e a formação de biofilme na presença de fluido salivar. Um tipo de diferença específica na produção de RPS foi notado na flora estreptocócica residente de diferentes indivíduos, aumentando a possibilidade de diferenças na composição de comunidades de biofilme oral.

DUGGAN, SEDGLEY, em 2007, avaliaram se a habilidade do *Enterococcus faecalis* para formar biofilmes esta relacionada com a fonte de obtenção das cepas, as quais foram obtidas dos canais radiculares (n=33), cavidade oral (n=21) e fontes não orais/não endodônticas (n=16). Os biofilmes foram crescendo em caldo tripticase soja por 24 horas a 37°C e concluíram que não houve diferença estatística significativa entre os grupos.

CHAVEZ DE PAZ et al., em 2007 determinaram se as bactérias isoladas de canais radiculares infectados sobrevivem melhor as trocas alcalinas no biofilme ou como células planctônicas. *E. faecalis*, *L. paracasei*, *Olsenella uli*, *S. anginosus*, *S. gordonii*, *S. oralis* e *F. nucleatum* na forma de biofilmes e células planctônicas foram expostos a pH 10.5 por 4 horas e a viabilidade bacteriana foi determinada pela coloração LIVE/DEAD. Os resultados mostraram um alto numero de sobrevivência do *E. faecalis*, *L. paracasei*, *O. uli* e *S. gordonii* nas formas de biofilme e células planctônicas após a exposição a um meio alcalino, enquanto que *S. anginosus*, *S. oralis* e *F. nucleatum* mostraram uma viabilidade aumentada no biofilme comparado com as células planctônicas. Concluíram que, as bactérias resistem melhor ao estresse alcalino na forma de biofilme em comparação com as células planctônicas,

no entanto, as células planctônicas parecem usar agregação e transporte extracelular de proteínas específicas como mecanismo de defesa.

CHAI et al., em 2007, investigaram a eficácia antibacteriana de 6 grupos de antibióticos e hidróxido de cálcio contra biofilmes de *E. faecalis* desenvolvidos em membranas de nitrocelulose. Os biofilmes de 2 dias de maturação foram expostos por 1 hora a Ampicilina, Co-trimoxazol, Eritromicina, Oxitetraciclina, Vancomicina, Vancomicina seguida de Gentamicina e Ca(OH)_2 . Os resultados mostraram que só a Eritromicina, Oxitetraciclina e Ca(OH)_2 eliminaram 100% o biofilme. Houve diferenças estatísticas significantes entre todos os grupos, exceto entre Ampicilina e Co-trimoxazol. Concluíram que somente a Eritromicina, Oxitetraciclina e Ca(OH)_2 possuem capacidade antibacteriana para eliminar por completo o biofilme de *E. faecalis*.

MANZUR et al., em 2007, estudaram a eficácia antibacteriana de medicações intracanal com hidróxido de cálcio [Ca(OH)_2], Clorexidina gel à 2% (CHX) e a combinação de ambas [Ca(OH)_2 /CHX] em dentes com periodontite apical crônica. Trinta e três dentes foram instrumentados, divididos em 3 grupos e medicados com Ca(OH)_2 , CHX e Ca(OH)_2 /CHX. As amostras bacteriológicas foram obtidas dos campos operatórios antes (S1) e após a instrumentação (S2) na primeira sessão de tratamento e após a medicação (S3) na segunda sessão de tratamento (1 semana depois). O crescimento bacteriano e as UFC decresceram significativamente de S1 para S2; entre S2 e S3 não houve diferenças estatísticas significativas em nenhum dos 3 grupos. Concluíram que a eficácia antibacteriana de Ca(OH)_2 , CHX e Ca(OH)_2 /CHX foi comparável.

ZAPATA et al., em 2008, avaliaram o potencial da microscopia confocal de varredura laser para a identificação, in situ, de biofilmes de *Enterococcus faecalis* viáveis e não viáveis em dentina infectada. Oito blocos de dentina bovina foram contaminados com *E. faecalis* em BHI por 21 dias. Após o período experimental, os espécimes foram corados com Diacetato de Fluoresceína (FDA), Propidium iodeto (PI) e Laranja de Acridina (0.01%) e analisados com CLSM. Dois espécimes não infectados foram usados como controles negativos. As amostras coradas com FDA/PI e analisadas com o CLSM mostraram uma discriminação entre as bactérias (vermelhas) viáveis e (verde) não viáveis nos túbulos dentinários contaminados. A laranja de acridina mostrou a atividade metabólica das células de *E. faecalis* dentro dos túbulos dentinários, identificados por sua fluorescência vermelha.

BRANDLE et al., em 2008, estudaram o impacto das condições de crescimento de 5 espécies microbianas sobre sua susceptibilidade ao estresse alcalino. *E. faecalis*, *S. sobrinus*, *C. albicans*, *A. naeslundii* e *F. nucleatum* cresceram como células planctônicas permitindo sua aderência na dentina por 24 horas. O crescimento de biofilmes uni-espécie e multi-espécies na dentina foi feito em condições anaeróbias com suplemento de nutrientes a 37°C durante 5 dias. As amostras infectadas foram expostas ao hidróxido de cálcio (pH 12.5) por 10 e 100 min. Os resultados mostraram que as células planctônicas foram mais susceptíveis; só *E. faecalis* e *C. albicans* sobreviveram ao Ca(OH)_2 por 10 min; a *C. albicans* sobreviveu por 100 minutos. A adesão dentinária foi o principal fator no melhoramento da resistência de *E. faecalis* e *A. naeslundii* ao Ca(OH)_2 , enquanto que, nos biofilmes multi-espécies promoveram a resistência de *S. sobrinus*. Em contraste, a resistência de *C. albicans* ao Ca(OH)_2 não foi influenciada pelas condições de crescimento. Concluíram que a aderência na dentina e as interações multi-espécies em um biofilme parecem afetar diferencialmente a sensibilidade das espécies microbianas ao Ca(OH)_2 .

ROCHA et al., em 2008, avaliaram por meio do MEV a presença de biofilmes na superfície externa do terço apical de dentes decíduos com polpas vitais e necróticas (com e sem evidencia radiográfica de patologia periradicular). Em 100% dos dentes com polpas necróticas e evidencia radiográfica de periodontite apical se observou áreas de reabsorção com presença de cocos, bacilos, filamentos e espiroquetas. Nos dentes com vitalidade e com necrose sem lesão apical evidente na radiografia não se observou bactérias.

CHAVEZ DE PAZ, HAMILTON, SVENSATER, em 2008, examinaram a velocidade de reativação de duas bactérias orais na forma de células planctônicas e biofilme quando reativado o fornecimento de nutrientes. Quando o *Streptococcus anginosus* e *Lactobacillus salivarius* foram levados a um meio rico em nutrientes por 24 horas não se observou reativação, no entanto, as membranas celulares da maioria das bactérias se mantiveram intactas. A reativação metabólica das células do biofilme privado de nutrientes se observou só 48 horas após do fornecimento de nutrientes; as mesmas células em culturas planctônicas tiveram uma rápida reativação em menos de 2 horas após o fornecimento de nutrientes. O estudo sugeriu que a lenta reativação das células de um biofilme quando reiniciado o

suprimento de nutrientes pode ser uma estratégia de sobrevivência empregada pelos microrganismos na cavidade oral.

TANOMARU et al., em 2008, avaliaram a distribuição microbiológica no sistema de canais radiculares após a indução de lesão periapical em dentes de cão usando diferentes métodos. Cinquenta e dois canais foram divididos em 4 grupos (N=13). Grupos I e II: canais radiculares foram expostos à cavidade oral por 180 dias; Grupos III e IV: canais radiculares foram expostos por 7 dias e depois a cavidade foi selada por 53 dias. Os ápices dos grupos I e III foram perfurados, enquanto que, os dos grupos II e IV permaneceram intatos. Após os períodos experimentais, os animais foram sacrificados e as peças dentárias contendo os canais foram processadas e coradas com o método de Brown & Brenn para analisar a presença e distribuição dos microrganismos. Os resultados mostraram que todos os grupos apresentaram microrganismos no sistema de canais radiculares. Um amplo numero de bactérias foi observado nas paredes do canal, delta apical e túbulos dentinários, seguidos pelo cimento e áreas de reabsorção no mesmo. Apesar dos diferentes períodos de exposição à cavidade oral, os métodos usados para a indução de periodontite apical mostraram uma distribuição similar de microrganismos no sistema de canais radiculares.

SCHAUDINN et al., em 2009, estudaram biofilmes endodônticos por meio do MEV e a combinação de hibridação fluorescente in situ (FISH) com o CLSM. Foram extraídos 5 dentes com fracasso do tratamento endodôntico, fixados por 4 horas em paraformaldeído à 4%, lavados com PBS, armazenados em etanol à 50% a 4°C e cortados longitudinalmente. O MEV mostrou diferentes canais cobertos por uma matriz amorfa e umas poucas estruturas sugerindo a presença de bactérias aderidas, embora, foi muito duvidoso se a matriz amorfa representava um extenso biofilme com grandes quantidades de bactérias o foi um produto delas. O CLSM/FISH mostrou fortes sinais fluorescentes em distintas regiões do canal. Quando as imagens do CLSM/FISH foram sobrepostas com as do MEV, elas coincidiram nas áreas onde o MEV mostrou matriz amorfa. Concluíram que as áreas onde o CLSM mostrou densas regiões de colônias bacterina coincidiam com as áreas onde o MEV mostrou uma matriz amorfa.

RICUCCI et al., em 2009, avaliaram histologicamente dentes obturados endodônticamente com presença de periodontite apical e correlacionaram os resultados com observações clinicas de acordo com a presença ou ausência de

sintomas. As amostras foram obtidas de dentes de 24 pacientes (12 assintomáticos e 12 sintomáticos). Todos os espécimes mostraram inflamação periradicular. Em todos os casos houve presença de bactérias, exceto em um espécime do grupo assintomático na qual uma estranha reação do organismo ao extravasamento do material obturador foi a possível causa da lesão. Independentemente da presença de sintomas, sempre foram encontradas bactérias no interior do sistema de canais radiculares, embora elas também fossem observadas nos tecidos periradiculares em 1 dente assintomático e 4 com sintomatologia. Em geral, a colonização bacteriana intracanal foi maior nos dentes com sintomatologia. O estudo reforçou a hipótese das infecções intraradiculares, usualmente na forma de biofilme, como a principal causa do fracasso do tratamento endodôntico.

AL-AHMAD et al., em 2009, examinaram se o *E. faecalis* (isolado de saliva e do canal radicular) pode prevalecer frente as bactérias salivares quando cultivado em um cocultivo reator de biofilme. Saliva livre de *E. faecalis* foi usada como inóculo. A identificação de *E. faecalis* foi realizada mediante técnicas de cultura celular e hibridação fluorescente in situ (FISH). Nas bactérias de *E. faecalis* isoladas do canal radicular, encontrou-se um 37.4% no biofilme e 31.9% nas células planctônicas quando examinados por técnicas de cultura celular, enquanto que, a proporção examinada por FISH mostrou 15.3% no biofilme e 11.7% nas células planctônicas. Nas bactérias de *E. faecalis* isoladas da saliva, encontrou-se um 32.4% no biofilme e 27.1% nas células planctônicas quando examinados por técnicas de cultura celular, comparando-o com FISH onde encontrou-se um 14.1% no biofilme e 9.5% nas células planctônicas. Pelo estudo pode-se concluir que o *E. faecalis* pode persistir no biofilme da cavidade oral.

CARR et al., em 2009, analisaram biofilmes endodônticos de um dente com insucesso de retratamento endodôntico e lesão periapical persistente. Foi examinado o ápice de um molar inferior que inicialmente tinha sido tratado 10 anos antes de seu retratamento e retratado 2 anos antes de sua extração. O ápice foi cortado transversalmente e examinado por meio do microscópio óptico e de transmissão. As áreas analisadas corresponderam ao istmo entre os canais mesiovestibular e mesiolingual. Os resultados mostraram um complexo e variável biofilme multi-espécie presente em toda a extensão da amostra.

BRUNDIN et al., em 2009, analisaram o comportamento de espécies bacterianas representativas de canais radiculares infectados (*Fusobacterium*

nucleatum, *Peptostreptococcus anaerobius*, *Prevotella intermedia* e *Pseudoramibacter alactolyticus*) em ausência de nutrientes por 60 dias. Nenhuma bactéria sobreviveu 1 dia em água. Em soro à 1%, as 4 espécies não conseguiram sobreviver mais de 2-3 semanas. As espécies bacterianas testadas precisaram de uma alta densidade de células iniciais e soro $\geq 10\%$ para sobreviver 60 dias. Concluíram que estas 4 espécies possuem uma baixa capacidade de sobrevivência comparadas com espécies que prevalecem em infecções pós-tratamento endodôntico.

SHEN, STOJICIC, HAAPASALO, em 2010, estudaram a sobrevivência das bactérias de um biofilme na ausência de nutrientes. Biofilmes multi-espécie foram desenvolvidos em discos de hidroxiapatita com um fornecimento rico em nutrientes durante 3 semanas (I etapa), seguido da suspensão do fornecimento de nutrientes durante 9 semanas (II etapa) e a reativação do fornecimento de nutrientes durante 4 semanas (III etapa). Foi encontrado que as UFC decresceram 50% na II etapa, mas alcançaram um 75% de UFC na III etapa. Por outro lado no cultivo celular não houve crescimento bacteriano positivo, razão pela qual concluíram que, a maioria das bactérias de um biofilme se mantem viáveis ainda quando o fornecimento de nutrientes é suspenso, só que a quantidade de células viáveis não encontra-se em um número suficiente para ser detectada em estudos de laboratório.

ZIJNGE et al., em 2010, estudaram por meio da hibridação fluorescente in situ, as espécies bacterianas mais abundantes associadas com a periodontite. Os dados mostraram convincentemente o predomínio de *Actinomyces sp*, *Forsythia Tannerella*, *Fusobacterium nucleatum*, espiroquetas e *Synergistetes* na placa subgingival; este último resultou ser novo com um possível papel importante na interação hospede-patógeno devido a sua localização nas proximidades das células imunes. *Lactobacillus sp.* são as células centrais dos agregados bacterianos na placa subgingival. *Streptococcus sp.* e *Candida albicans* formam estruturas ramificadas na placa supragingival. Por último, patógenos periodontais colonizaram biofilmes já formados e criam microcolônias nos mesmos.

STANDAR et al., em 2010, estudaram o comportamento de biofilmes multi-espécie desenvolvidos em cultura celular com patógenos dentais e periodontais. Os pesquisadores encontraram que *S. mitis*, *F. nucleatum*, *P. gingivalis* e *P. micra* não prosperaram na tentativa de formar estruturas biofilmicas. *S. mutans*, *S. sanguinis* e *S. intermedius* formaram massas abundantes de biofilme. *A.*

actinomycescomitans formaram monocamadas irregulares. Para uma análise mais detalhada foram escolhidos *S. mitis*, *S. mutans* e *A. actinomycescomitans* pelo fato de serem os microrganismos representativos da fisiologia cariogênica e da periodontite associada à flora bacteriana respectivamente e por suas diferenças na habilidade de formar biofilmes. O estudo revelou que a associação de *S. mitis* com *S. mutans* ou com *A. actinomycescomitans* gerou interações bacterianas influenciando na massa, estrutura e viabilidade celular do biofilme.

PEREIRA et al., em 2011, avaliaram a susceptibilidade de biofilmes uni, bi e tri-espécies à inativação fotodinâmica usando azul de metileno. Biofilmes de *C. albicans*, *S. aureus*, and *S. Mutans* cresceram sobre discos de acrílico imersos em BHI durante 5 dias para sua posterior exposição à terapia fotodinâmica. Os resultados mostraram que a redução de UFC foi significativamente maior nos biofilmes uni-espécie quando comparados com os biofilmes formados pela associação das espécies bacterianas mencionadas acima. Foi encontrado também que o efeito do tratamento fotodinâmico sobre as bactérias foi letal predominantemente nas camadas externas dos biofilmes.

BAFFONE et al., em 2011 avaliaram a efetividade da clorexidina e quatro exagatários bucais contra biofilmes uni e multi-espécies. Biofilmes de *S. mutans*, *S. aureus* e *P. Aeruginosa* que cresceram sobre discos de titânio durante 16.6, 40.5 e 64.5 horas foram analisados antes e depois de serem expostos às soluções experimentais. Embora houvesse diferenças entre as soluções testadas, os pesquisadores concluíram, de forma geral, que a efetividade destas foi diminuída quando testada sobre biofilmes polimicrobianos.

WANG et al., em 2012 investigaram a atividade antimicrobiana do chrydohsin-1 sobre vários patógenos orais. Os pesquisadores analisaram também a citotoxicidade deste peptídeo catiônico sobre fibroblastos gengivais humanos. Os resultados deste estudo mostraram que chrydohsin-1 reduziu significativamente a viabilidade celular dos biofilmes e que este teve um significativo efeito letal sobre biofilmes de *S. mutans*. Com relação à toxicidade, foi encontrado que chrydohsin-1 em concentrações de 8 µg/mL e 32 µg/mL teve um reduzido efeito na viabilidade fibroblástica após 5 minutos. Concluíram que chrydohsin-1 pode ter uma potencial aplicação na prevenção de caries dentária e patologia pulpar.

MEIRE et al., em 2012 compararam a eficácia de dois laser de alta potencia (Nd:YAG e Er:YAG), duas terapias fotodinâmicas comerciais e do NaOCl contra

biofilmes de *E. faecalis* aderidos sobre discos de dentina. Os pesquisadores descobriram que NaOCl foi o mais efetivo na eliminação do *E. faecalis*, no entanto, Er:YAG também foi capaz de diminuir significativamente as UFC. As duas terapias fotodinâmica mostraram uma insignificante redução nos níveis de células bacterianas viáveis. A irradiação com Nd:YAG foi a menos efetiva.

NASCIMENTO et al., em 2014 testou a hipóteses que incrementar os níveis de arginina na cavidade oral por meio de um recurso exógeno melhoraria a atividade do sistema arginina deiminasa (SAD) na saliva e na placa dental. Saliva e placa dental procedentes de indivíduos com dentes sadios e cariados foram coletadas antes e depois do uso de um creme dental contendo arginina a 1.5% por 4 semanas. Altos níveis de SAD foram observados nas amostras livres de caries comparadas com as amostras com atividade cariada. Considerando que a produção alcalina pelas bactérias via arginina deiminasa incrementa o pH dos biofilmes orais reduzindo o risco de caries, os autores concluíram que formulações de arginina no combate a caries dental oferecem benefícios promissórios.

AL-AHMAD et al., em 2014 avaliaram a resistência antibiótica e a formação biofílmica de 47 diferentes bactérias aeróbias e anaeróbias isoladas do canal radicular. A sensibilidade antibiótica a 11 medicamentos, tais como, Penicilina G, Amoxicilina, Clindamicina, Gentamicina, Ciprofloxacino, etc. foram testadas. Cinco espécies aeróbias e 2 anaeróbias incluindo *S. mutans*, *L. fermentum*, *A. naeslundii*, *A. viscosus*, *P. Bucalis* e *P. acidifaciens* foram identificados como altos produtores de biofilmes. Enquanto que outros 8 aeróbios 3 anaeróbios mostraram uma produção moderada. Os pesquisadores concluíram que devido aos diferentes comportamentos das espécies em relação aos antibióticos, o tratamento endodôntico deveria considerar a adesão e formação de biofilme de uma variedade de espécies bacterianas.

2.2 Hipoclorito de sódio sobre biofilmes bacterianos.

DUNAVANT et al., em 2006, compararam a eficácia de diferentes irrigantes endodônticos contra biofilmes de *E. faecalis*. As amostras foram submersas nas soluções irrigadoras experimentais durante 1 e 5 min. A análise estatística revelou uma significativa relação entre os agentes testados e a porcentagem de eliminação das bactérias do biofilme que foi: NaOCl à 6% (>99.99%), NaOCl à 1% (99.78%)

Smear Clear (78.06%), clorexidina à 2% (60.49%), REDTA (26.9%) e MTAD Biopuro (16.08%). Não houve diferença estatística significativa entre tempo de exposição e a porcentagem de eliminação bacteriana. Dentro dos parâmetros deste estudo, o NaOCl à 1% e 6% foi mais eficiente na eliminação de biofilmes de *E. faecalis* em comparação com as outras soluções testadas.

CLEGG et al., em 2006, estudaram a eficácia do hipoclorito de sódio em diferentes concentrações (1%, 3% e 6%), Clorexidina 2% e hipoclorito de sódio 1% seguido do MTAD Biopure sobre biofilme formado em dentina apical “in vitro”. As imagens obtidas por meio do MEV mostraram que NaOCl à 3% e 6% foram capazes de remover completamente o biofilme. O NaOCl à 1% seguido de MTAD Biopure removeu parcialmente o biofilme, enquanto a clorexidina 2% deixou o biofilme intato. A clorexidina a 2% não foi capaz de interromper o crescimento bacteriano. Viabilidade bacteriana não foi encontrada em espécimes expostos ao NaOCl 6%, Clorexidina 2% e NaOCl 1% seguido de MTAD Biopure. Bactérias não viáveis e eliminação de biofilme somente foi encontrada nas amostras expostas a NaOCl 6%.

SENA et al., em 2006, investigaram a atividade antimicrobiana do Hipoclorito de Sódio à 2.5% e 5.25% e Clorexidina gel e líquida à 2% como irrigantes endodônticos sobre biofilmes uni-espécie (*E. faecalis*, *S. aureus*, *C. albicans*, *Prevotella intermedia*, *P. gingivalis*, *P. endodontalis* e *F. nucleatum*) desenvolvidos em membranas de nitrocelulose, as quais foram imersas durante 30 seg, 5, 10, 15, 30 e 60 min, com e sem agitação mecânica. A agitação mecânica melhorou a efetividade dos agentes antimicrobianos, precisando de menos tempo para eliminar o mesmo microrganismo, exceto o NaOCl 2.5% sobre *S. aureus*. Os agentes antimicrobianos líquidos, especialmente NaOCl 5.25% e Clorexidina 2% eliminaram mais rapidamente os microrganismos.

ESTRELA et al., em 2007, determinaram a eficácia antimicrobiana da água ozonizada, ozônio gasoso, hipoclorito de sódio à 2.5% e clorexidina à 2% em canais radiculares infetados com *E. faecalis*. Trinta dentes anteriores humanos foram preparados e inoculados com *E. faecalis* por 60 dias. Tubos Eppendorf foram conectados à porção coronal do dente e mangueiras de uretano anexadas aos tubos. A saída do dispositivo correspondeu à porção apical do canal. As soluções testadas circularam em um fluido constante durante 20 min. O crescimento bacteriano foi analisado pela turbidez do meio e subcultura em agar. Os resultados mostraram que nenhuma solução testada mostrou efeito antibacteriano sobre *E.*

faecalis. Concluíram que nenhuma das soluções experimentais em contato durante 20 min com as amostras foi capaz de inativar as bactérias de *E. faecalis*.

VIRTEJ et al., em 2007, determinaram a eficácia de 4 diferentes métodos na desinfecção de canais radiculares infectados in situ. Foram colocados cilindros de dentina com um de seus extremos fechado em um aparelho intraoral durante 7 dias para facilitar a formação do biofilme. Transcorrido esse tempo as amostras foram desinfetadas com o sistema Endox, irrigação com MTAD, irrigação com NaOCl 3% e a aplicação de ozônio por meio do aparelho HealOzone. Após a desinfecção, se fecharam ambos extremos dos cilindros, os quais foram levados a uma incubadora a 37°C durante 1 e 2 semanas. MTAD, NaOCl e HealOzone foram efetivos na desinfecção dos canais radiculares, não encontrando diferenças estatísticas significativas entre eles. O sistema Endox mostrou o menor efeito antibacteriano.

GARCEZ et al., em 2007, estudaram a capacidade antibacteriana da terapia fotodinâmica (PDT) combinada ou não com o tratamento endodôntico convencional. Os dentes foram inoculados com bactérias Gram- (*Proteus mirabilis* e *Pseudomonas aeruginosa*) durante 3 dias. A terapia fotodinâmica empregou uma combinação entre polyethylenimina e clorina como fotosintetizador e um diodo de luz laser de 660nm levados dentro do canal por meio de fibra de 200 µm. Para a irrigação endodôntica convencional utilizaram 10 mL de NaOCl à 2.5% seguido de 10 ml de peróxido de hidrogênio à 3% a cada troca de lima. A terapia endodôntica convencional reduziu a quantidade de bactérias em 90%, PDT 95% e a combinação de ambas em 98%. A recolonização bacteriana após 24 horas foi muito menor quando foram combinadas as duas terapias.

GIARDINO et al., em 2007, compararam a eficácia antimicrobiana do NaOCl (5.25%), MTAD BioPure e Tetraclean contra o biofilme gerado por *Enterococcus faecalis* sobre membranas de nitrocelulose. Após a incubação, as membranas foram transferidas aos tubos que continham 5 mL de solução salina (controle positivo) e incubadas por 5, 30, e 60 minutos a 20°C. Após cada período de tempo, os agentes testados foram homogeneizados por 60 segundos para suspender os microrganismos. Cada diluição foi colocada em placas de infuso cérebro-coração (BHI). As placas foram incubadas por 48 horas em uma atmosfera aeróbia de 37°C. A análise estatística mostrou que o NaOCl 5.25% foi o único que conseguiu remover todo o biofilme, entretanto, o tratamento com Tetraclean causou um alto nível de

desorganização do biofilme em todos os tempos testados quando comparado com MTAD.

JOHAL; BAUMGARTNER; MARSHALL, em 2007, compararam a eficácia antimicrobiana do hipoclorito de sódio à 1.3% seguido de MTAD biopuro e hipoclorito de sódio à 5.25% seguido de Ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) à 15% como irrigantes endodônticos em dentes humanos extraídos e infectados com *E. faecalis*. Foram tomadas amostras bacterianas dos canais após de sua instrumentação e irrigação. Houve diferenças estatísticas significantes entre os grupos experimentais. Os resultados mostraram crescimento bacteriano negativo nas 20 amostras irrigadas com NaOCl à 5.25% / EDTA à 15% e em 8 de 20 amostras irrigadas com NaOCl à 1.3% / MTAD biopuro. A pesquisa mostrou uma boa desinfecção dos canais radiculares quando foi usado NaOCl à 5.25% / EDTA à 15%. A combinação de NaOCl à 1.3% / MTAD biopuro desinfetou menos de 50% dos canais infectados com *E. faecalis*.

OZOK et al., em 2007, compararam in vitro, o crescimento e a susceptibilidade dos biofilmes de *Fusobactérium nucleatum* e *Peptostreptococcus micros* em contato com diferentes concentrações de hipoclorito de sódio (NaOCl) durante 24 horas e 96 horas. O teste de U- Mann-Whitney revelou que, embora às 24 horas, os biofilmes multi-espécies tivessem contagens de células viáveis similares à aqueles dos biofilmes de uni-espécie, eles eram mais resistentes ao NaOCl. Em 96 horas ambos microrganismos tiveram mais contagens de células viáveis e foram mais resistentes a NaOCl nos biofilmes multi-espécies comparados com os biofilmes uni-espécie.

SIQUEIRA, MAGALHAES, ROCAS, em 2007, investigaram a redução bacteriana após instrumentação utilizando hipoclorito de sódio a 2.5% e medicação intracanal com hidróxido de cálcio associado ao paramonoclorofenol canforado (PMCC). Onze dentes com periodontite apical crônica foram selecionados. Amostras bacteriológicas foram tiradas antes do tratamento (S1), após a preparação biomecânica com limas manuais NiTi e NaOCl à 2.5% (S2) e após 7 dias de medicação com Ca(OH)₂/PMCC (S3). Foram encontradas bactérias viáveis em todos os casos de S1, 6 de 11 (54.5%) dos casos de S2 e somente em 1 (9.1%) dos casos de S3. Houve uma diferença estatística significativa na redução bacteriana entre S1-S2 e S1-S3. Concluíram que a preparação químico-mecânica com NaOCl à 2.5% como irrigante reduziu significativamente o numero de bactérias no canal

radicular, mas fracassou na completa desinfecção do canal em mais do 50% dos casos. A medicação intracanal com Ca(OH)_2 /PMCC por 7 dias aumentou significativamente o numero de células não viáveis.

HUTH et al., em 2009, analisaram a eficácia antibacteriana do ozônio líquido e gasoso como uma alternativa antisséptica contra patógenos endodônticos em suspensão e na forma de biofilme uni-espécie. *E. faecalis*, *C. albicans*, *P. micros* e *P. aeruginosa* foram desenvolvidos em meio de cultivo durante 3 semanas. As culturas foram expostas ao ozônio, hipoclorito de sódio à 2.5% e 5.25%, digluconato de clorexidina à 2% e peróxido de hidrogênio à 3% por 1 min. O remanescente das UFC foi contado. Os resultados mostraram que as concentrações de ozônio gasoso e líquido quase eliminaram os microrganismos em suspensão assim como NaOCl e clorexidina. Peróxido de hidrogênio e ozônio aquoso em baixas concentrações foram menos efetivos. A eliminação bacteriana total foi obtida com o ozônio gasoso em altas concentrações e pelo NaOCl após 1 min de exposição. O ozônio gasoso em baixas concentrações eliminou as bactérias após 2.5 min. O ozônio aquoso em altas concentrações e clorexidina quase eliminaram completamente o biofilme, enquanto que, o peróxido de hidrogênio foi o menos efetivo. Concluíram que altas concentrações de ozônio gasoso e aquoso são dose-cepa-tempo dependentes contra os microrganismos testados em suspensão e na forma de biofilme. O NaOCl é reforçado mais uma vez como um irrigante efetivo na eliminação bacteriana.

BRYCE et al., em 2009, investigaram a capacidade de remoção e efeito bactericida de vários irrigantes sobre biofilmes uni e polimicrobianos (*S. sanguinis* e *F. nucleatum*). Biofilmes de *S. sanguinis*, *E. faecalis*, *F. nucleatum* e *P. gingivalis* que cresceram em membranas de nitrocelulose durante 72 horas e imersas em NaOCl, EDTA, Clorexidina e iodo por 1, 5 e 10 minutos; após esses tempos determinou-se a remoção do biofilme e a quantidade de células viáveis e não viáveis contidas nas amostras, encontrando-se que as espécies anaeróbias estritas G- foram removidas mais facilmente que as anaeróbias facultativas G+. Após o 1º minuto de exposição, a maioria das células tornou-se não viáveis. O NaOCl foi a solução mais efetiva na remoção do biofilme, o iodo teve efeito bactericida mas não de remoção, enquanto o *E. faecalis* não foi viável após contato com a Clorexidina no entanto ela não foi efetiva na remoção do biofilme de *S. sanguinis*. Os biofilmes multi-espécie apresentaram uma resistência maior aos irrigantes quando comparados com os biofilmes uni-espécie.

CAMARA et al., em 2009, estudaram a capacidade antimicrobiana da irrigação do hipoclorito de sódio a 0.5%, 1% e 2.5% associada com instrumentação rotatória com o sistema ProTaper em pré-molares inferiores com canal único infectados com *C.albicans*, *P. aeruginosa*, *E. faecalis* e *S. aureus*. Os microrganismos foram eliminados após a instrumentação com o instrumento S1 e irrigados com todas as soluções testadas, exceto por uma amostra irrigada com NaOCl à 0.5%, a qual mostrou crescimento bacteriano positivo. Não houve diferença estatística significativa entre as soluções em teste. Concluíram que todas as concentrações de NaOCl foram efetivas na eliminação dos biofilmes bacterianos quando combinadas com instrumentação rotatória com sistema o ProTaper.

PRABHAKAR et al., em 2010, estudaram a eficácia antibacteriana de ervas alternativas (polifenoles de Triphala e chá verde), MTAD, e Hipoclorito de Sódio 5% sobre *E. faecalis*. Blocos de dentes humanos, cortados verticalmente, foram inoculados durante 3 e 6 semanas. Após esses períodos de tempo, as amostras foram expostas às soluções experimentais durante 10 min. Todas as soluções, exceto o polifenol de chá verde (GTP), mostraram inibição completa do biofilme de *E. faecalis* formado em 3 semanas; a análise quantitativa mostrou para GTP 1516 ± 17.2 UFC/mL. No biofilme desenvolvido durante 6 semanas, as amostras apresentaram crescimento bacteriano após irrigação com Triphala, GTP e MTAD enquanto o NaOCl mostrou inibição completa. Concluíram que o NaOCl 5% é altamente bactericida contra *E. faecalis*.

OZDEMIR et al., em 2010, avaliaram o efeito do EDTA e do hipoclorito de sódio sobre biofilmes de *E. faecalis* desenvolvidos em canais radiculares de humanos jovens (<30) e idosos (>60). As porções coronal e apical dos dentes foram seccionadas e os cilindros de dentina foram tratados com broca Gates Glidden #2 e irrigados com EDTA à 17% + NaOCl à 2.5%, EDTA à 17% só e NaOCl à 2.5% só. Após irrigação, uma broca Gates Glidden #3 foi utilizada e as raspas de dentina foram coletadas para obter as bactérias, as quais foram cultivadas em Agar e as UFC foram contadas. O SEM e CLSM foram utilizados para examinar a formação do biofilme sobre a dentina. Os resultados mostraram que a combinação de EDTA e NaOCl reduziu significativamente a quantidade de bactérias em ambos grupos etários. No entanto, a quantidade de bactérias de *E. faecalis* nos dentes do grupo >60 anos foi muito maior. O estudo sugeriu que canais de populações jovens são menos susceptíveis a infecção intracanal.

CHAVEZ DE PAZ, BERGENHOLTZ, SVENSATER, em 2010, avaliaram o efeito de deferentes antimicrobianos (Alkali pH = 12, Digluconato de Clorexidina 2.5%, EDTA e Hipoclorito de Sódio 1%) sobre biofilmes bacterianos (*Enterococcus faecalis*, *Lactobacillus paracasei*, *Streptococcus anginosus*, e *Streptococcus gordonii*). Após 5 min de contato da solução irrigadora com o biofilme, as amostras foram coradas com LIVE/DEAD para determinar a integridade de membrana celular. O hipoclorito de sódio a 1% afetou a integridade da membrana de todos os organismos e removeu mais biofilme; o EDTA afetou a integridade da membrana de todos os organismos mas falhou na remoção de biofilmes de *E. faecalis*, *L. paracasei* e *S. anginosus*; a Clorexidina a 2.5% afetou ligeiramente a integridade da membrana de *E. faecalis* e removeu só 50% das células desse biofilme.

HOPE et al., em 2010, compararam a o efeito da irrigação endodôntica sobre biofilmes de *E. faecalis* formados em dentes extraídos e membranas de nitrocelulose. Dentes humanos extraídos infectados com *E. faecalis* foram irrigados com hipoclorito de sódio à 1%, enquanto que, os biofilmes formados nas membranas de nitrocelulose foram imersos na solução. Após 60 seg. de exposição ao NaOCl à 1% o biofilme formado nas membranas de nitrocelulose foi completamente inativado, enquanto que, se encontraram bactérias viáveis no modelo de dentes extraídos.

SOARES et al., em 2010, analisaram a efetividade antimicrobiana de um régimen alternativo de irrigação durante a preparação químico-mecânica de canais radiculares. Dentes humanos extraídos foram infectados com *E. faecalis* e incubados durante 21 dias; transcorrido esse tempo, os dentes foram irrigados com NaOCl à 5.25% com uma irrigação final de EDTA à 17% (grupo de irrigação convencional) e com o uso alternado de NaOCl e EDTA (grupo de irrigação alternada). As amostras bacteriológicas foram tiradas antes do tratamento endodôntico, após a preparação químico-mecânica e durante os seguintes 14 dias. O grupo da irrigação alternada não apresentou crescimento bacteriano após o preparo químico-mecânico. Estes resultados foram confirmados pelo MEV que mostrou imagens das amostras livres de bactérias. Concluíram que o uso da irrigação alternada de NaOCl e EDTA pode ser uma ferramenta importante na eliminação de biofilmes de *E. faecalis* hospedados no canal radicular.

DEL CARPIO-PEROCHENA et al., em 2011 avaliaram a capacidade de limpeza e dissolução de diferentes irrigantes sobre dentina infectada intra-oralmente. Os biofilmes foram expostos independentemente ao NaOCl à 1%, 2.5% e 5.25% e

clorexidina à 2% durante 5, 15 e 30 minutos. Foi encontrado que o NaOCl foi capaz de dissolver grandes quantidades de biofilme após 30 minutos de exposição sem importar sua concentração. O NaOCl à 5.25% em 5 e 15 minutos também foi efetivo na remoção de biofilme sem diferença estatística com os demais concentrações de NaOCl em 30 minutos. Enquanto que a Clorexidina 2% foi ineficiente na remoção de matéria orgânica.

JIANG et al., em 2011, avaliaram a aplicação de resazurina para investigar a desinfecção do canal radicular. *E. faecalis* junto ou não com *S.mutans* foram cultivados e incubados durante 24 horas para facilitar a formação de biofilmes, os quais foram tratados com varias concentrações de hipoclorito de sódio por 1 min. Os resultados mostraram que durante o tratamento com o NaOCl, a resazurina mostrou uma clara relação dose-resposta, não só em biofilmes uni-espécie, mas também em biofilmes bi-espécies, os quais mostraram uma resistência 30 vezes maior ao NaOCl que os biofilmes uni-especie de *E. faecalis*. A contagem de células viáveis confirmou o resultado e mostrou um aumento na resistência do *E. faecalis* nos biofilmes bi-espécies.

ORDINOLA-ZAPATA et al., em 2012 avaliaram o volume residual de células viáveis, a espessura do biofilme e área coberta do substrato de biofilmes multi-espécie depois de ser tratados com diferentes irrigantes endodônticos. Biofilmes formados *in situ* foram irrigados com Clorexidina à 2%, NaOCl à 1%, acido cítrico à 10%, EDTA à 17% e agua destilada. Todas as soluções foram usadas durante 5 minutos. Os resultados mostraram valores similares para o biovolume total, biovolume de células viáveis e área de substrato coberto depois do tratamento com Clorexidina à 2%, acido cítrico à 10%, EDTA à 17% e agua destilada. O NaOCl à 1% mostrou os menores níveis nos parâmetros estudados, com exceção da altura do biofilme, onde não houve diferença com o resto das soluções. Os autores concluíram que somente o NaOCl à 1% teve um efeito significativo sobre a viabilidade e arquitetura do biofilme.

ORDINOLA-ZAPATA et al., em 2014 comparou a capacidade de remoção de biofilmes do NaOCl à 6% usando 4 diferentes técnicas de irrigação. No estudo foi utilizada a técnica convencional, Endoactivator, irrigação ultrassônica passiva e irrigação ativada por laser (PIPS Photon-induced photoacoustic streaming). A irrigação “PIPS” exibiu os resultados mais favoráveis na remoção do biofilme. A irrigação ultrassônica passiva foi significativamente melhor que a irrigação

convencional e o Endoactivator. Concluíram que a irrigação ativada por laser usando PIPS com NaOCl a 6% melhorou significativamente a limpeza da dentina infectada por biofilmes.

YAP et al., em 2014 estudaram se o *E. faecalis* apresentava maior resistência ao NaOCl a 0.9% em biofilmes uni- ou multi-espécies. *E. faecalis* como espécie única ou em combinação com *F. nucleatum* e *S. sanguinis* cresceram sobre discos de dentina. NaOCl a 0.9% mostrou alta efetividade contra os biofilmes puros de *E. faecalis* e naqueles em que a bactéria cresceu com outras espécies bacterianas. Concluíram que NaOCl é efetivo na eliminação *E. faecalis* na forma de biofilme uni o multi-espécie sem diferença estatísticas entre eles.

2.3 Efeito antibacteriano e de dissolução do hipoclorito de sódio em diferentes temperaturas e pHs.

CUNNINGHAM; JOSEPH e CUNNINGHAM; BALEKJIAN em 1980 avaliaram o efeito da temperatura sobre a capacidade antibacteriana e de dissolução do NaOCl. Os autores concluíram que o efeito antibacteriano do NaOCl a 2.6% a temperatura ambiente (21°C) foi potencializado quando a solução foi aquecida a 37°C. Respeito ao efeito de dissolução, o NaOCl foi utilizado a 2.6% e 5.2%. Foi encontrado que o NaOCl a 2.6% aquecido a 37°C teve a mesma efetividade de dissolução que o NaOCl a 5.2% a 21°C ou 37°C.

ABOU-RASS; OGLESBY em 1981 analisaram o efeito da temperatura e concentração do NaOCl sobre sua atividade solvente. Soluções de NaOCl a 2.6% e 5.25% foram aquecidas a 73.2°F (22.8°C) e 140°F (60°C). Os pesquisadores relacionaram a velocidade de dissolução com a concentração e a temperatura da solução pelo tempo que demorou cada solução em dissolver tecido. Os resultados mostraram que o NaOCl a 140°F foi mais efetivo na dissolução de matéria orgânica comparado com a mesma solução em 73.2°F sem importar a concentração. No entanto, concentrações de 5,25% foram mais efetivas que as de 2.6% em qualquer temperatura.

ZEHNDER et al., em 2002 compararam o potencial de dissolução da solução de Dakin com soluções de NaOCl tamponadas e sem tamponar sobre tecido fresco e cariado. NaOCl a 0.5% e 2.5% sem tamponar e NaOCl a 0.5% tamponado a pH 9

e 12 foram testadas sobre palatos porcinos. Os resultados mostraram que NaOCl a 2.5% foi significativamente mais efetivo na dissolução de tecido que as 3 soluções de NaOCl a 0.5%. O tamponamento das soluções teve um efeito muito leve na capacidade de dissolução. A solução de Dakin foi igualmente efetiva sobre tecidos frescos e cariados. O efeito antibacteriano desta solução não mostrou diferenças significativas quando comparadas com as soluções de NaOCl equivalentes sem tamponar. Concluíram que o tamponamento das soluções não proporcionou nenhum benefício em comparação com as soluções sem tamponar.

SIRTES et al., em 2005 testaram o efeito de pré-aquecimento do NaOCl usando um aquecedor de seringas. A estabilidade das soluções de NaOCl a 1%, 2.62% e 5.25% a 20°C, 45°C e 60°C foram controladas durante 1 hora e testadas sobre *E. faecalis*. Os resultados mostraram que as soluções mantiveram estabilidade durante o período de prova. Também foi mostrado que o NaOCl a 1% a 45°C dissolveu tecidos pulpare humanos tão eficientemente como o NaOCl a 5.25% a 20°C. No entanto o poder de dissolução do NaOCl a 1% a 60°C foi significativamente maior. Respeito a capacidade antibacteriana, foi observado que o NaOCl aquecido a 60°C foi capaz de eliminar 100% de bactérias. Houve um aumento de 100 vezes na redução de numero de bactérias quando a solução foi aquecida a 45°C em comparação com 20°C. Os autores concluíram que o aquecimento de NaOCl melhora sua capacidade de dissolução e poder antibacteriano contra *E. faecalis*.

CHRISTENSEN; MCNEAL; ELEAZER em 2008 examinaram a capacidade do NaOCl em diferentes pHs, tempos de exposição e concentrações para dissolver musculo porcino. Os períodos de tempo testados foram 5, 15 e 30 minutos. Foram conformados 7 grupos de acordo a concentração e pH do NaOCl. (1) controle (solução salina), (3) NaOCl a 2.6% pH 12, (4) NaOCl a 5.25% pH 9, (5) NaOCl a 2.6% pH 9, (6) NaOCl a 5.25% pH 6, (7) NaOCl a 2.6% pH 6. Quando os grupos foram examinados somente no referente ao pH, não foram encontradas diferenças significativas entre os pH 12 e 9, mas estes dois grupos foram diferentes ao de pH 6. Concluíram que altas concentrações do NaOCl e longos tempos de exposição resultam em grandes quantidades de dissolução de tecido.

ROSSI-FEDELE; DE FIGUEIREDO em 2008, avaliaram a capacidade de dissolução do NaOCl a 4% a temperatura ambiente e aquecido a 45°C, 60°C e 75°C. Polpas bovinas foram levadas a tubos contendo a solução e aquecidos ate

atingir a temperatura desejada usando um aquecedor de mamadeiras. Houve diferenças estatísticas significativas no aumento de velocidade de dissolução entre os grupos de NaOCl a 45°C (mais rápido) e o controle (20.5°C). O mesmo incremento foi observado entre os grupos de NaOCl a 60°C e 75°C em comparação com NaOCl a 45°C. As temperaturas de 60°C e 75°C foram estatisticamente iguais.

CAMPS et al., em 2009 avaliaram a vida útil e as propriedades de dissolução e antibacterianas do NaOCl a 2.5% tamponado. Os resultados mostraram que as soluções tamponadas de NaOCl a 2.5% deveriam ser usadas dentro das duas primeiras horas depois de ser misturadas por serem inapropriadas para seu uso no canal radicular em pH muito ácidos (<6), pelo risco de evaporação do cloro. Também foi descoberto que o NaOCl a 2.5% tamponado ou sem tamponar possui a mesma capacidade de dissolução dentro dos primeiros 5 minutos. A solução tamponada de NaOCl apresentou maior efetividade antibacteriana que a solução inalterada.

MERCADE et al., em 2009 determinaram a eficácia antibacteriana do NaOCl a 4.2% ajustado a pH 12, 7.5 e 6.5 canais radiculares infectados com *E. faecalis*. Foi encontrado que nenhuma das soluções experimentais usadas nesse estudo demonstraram 100% de efetividade contra *E. faecalis*. A habilidade antibacterina do NaOCl a 4.2% pH 6.5 foi significativamente maior comparada com o NaOCl a 4.2% pH 12. Concluíram que a atividade bactericida da solução foi melhorada pela acidificação do NaOCl.

STOJICIC et al., em 2010 avaliaram e compararam o efeito da concentração, temperatura e agitação do NaOCl sobre a dissolução de tecido. Soluções de NaOCl a 1%, 2%, 4% e 5.8% foram testadas a temperatura ambiente, 37°C e 45°C com ou sem o uso de agitação sônica e ultrassônica. Pedacos de musculo bovino foram colocados dentro de 10mL de solução por 5 minutos. A agitação foi realizada entre 1 a 5 vezes por 15 segundos. A capacidade de dissolução aumentou proporcionalmente à concentração da solução. Altas temperaturas e agitação aumentaram consideravelmente a eficácia de NaOCl. O efeito da agitação do NaOCl foi consideravelmente mais influente que a temperatura para diluir a matéria orgânica. Concluíram que otimizar a concentração, temperatura e fluxo da solução podem melhorar a sua capacidade de dissolução até em 50 vezes.

GUERREIRO-TANOMARU et al., em 2011 avaliaram o pH, o teor de cloro ativo e atividade antibacteriana do NaOCl a 2.5% puro e em combinação com acido cítrico a 10% e vinagre de maça. O efeito antibacteriano das soluções foi medido por

contato direto contra *E. faecalis*. Foi descoberto que as combinações do NaOCl com vinagre de maçã e ácido cítrico diminuíram o pH e o teor de cloro. O NaOCl puro ou em combinação foi capaz de eliminar *E. faecalis* em 30 segundos, enquanto o ácido cítrico somente foi capaz de eliminar as bactérias após 10 minutos. O vinagre de maçã diminuiu a quantidade de bactérias (32.2%) depois de 10 minutos. Concluíram que as combinações de NaOCl com ácidos decresceram o pH e o teor de cloro sem alterar o efeito antibacteriano da solução.

ROSSI-FEDELE et al., em 2011 fizeram uma revisão dos artigos publicados até 2010 com a finalidade de determinar a influência do pH sobre a eficácia do teor de cloro ativo nos irrigantes endodônticos. Baseados nesta revisão os autores concluíram que a efetividade antibacteriana do NaOCl é melhorada quando a solução é acidificada entre pHs de 6 e 7.5.

GULSAHI et al., em 2014 estudaram a efetividade do NaOCl a 2.5% em diferentes temperaturas e intervalos (30 segundos, 1 minuto e 5 minutos) sobre condutos radiculares de dentes humanos infectados com *E. faecalis* e *C. Albicans*. O NaOCl foi usado em duas temperaturas 25°C e 37°C. NaOCl a 25°C por 5 minutos foi o regime de irrigação mais efetivo para eliminar *E. faecalis*, enquanto que a solução aquecida a 37°C teve um efeito antifúngico superior depois de 5 minutos. Nos mesmos tempos de contato, a temperatura do NaOCl não interferiu com o crescimento de nenhum dos microrganismos testados. Os autores concluíram que o tempo de exposição foi mais relevante que a temperatura para eliminar *E. faecalis*.

2.4 Efeito da quitosana sobre biofilmes e dentina.

BUDIRAHARJO et al., em 2010 avaliaram a atividade de carboximetil quitosana incorporada ou não ao MTA sobre dentina. Depois dos procedimentos experimentais, a deposição mineral foi analisada usando microscópio eletrônico de varredura, dispersão de energia (EDX) e espectroscopia. Os resultados mostraram que a carboximetil quitosana aplicada isoladamente ou associado ao MTA causaram deposição de hidroxiapatita depois de 1 semana. No entanto, esta deposição foi significativamente maior nos grupos carboximetil quitosana / MTA. Concluíram que a bioatividade do MTA foi melhorada com a incorporação da quitosana.

SANO et al., em 2001 examinaram o efeito de 4 tipos de quitosana sobre a aderência inicial de bactérias orais em superfícies de dentes humanos. As soluções de quitosana a 0.5% com baixo peso molecular suprimiu a adesão bacteriana da mesma forma que foi feita pela clorexidina durante 3 horas. A quitosana fosforilada à 0.1% também mostrou efeito supressor mas somente durante 1 hora. A quitosana amorfa teve um efeito inibitório moderado, enquanto que a carboximetil quitosana a 0.1% não apresentou um considerável efeito na adesão bacteriana. Os autores concluíram que a quitosana fosforilada e de baixo peso molecular possuem potencial para inibir a aderência bacteriana inicial de bactérias orais sobre dentina.

IKINCI et al., em 2002 determinaram a atividade antimicrobiana da quitosana em diferentes formulações contra patógenos periodontais. A quitosana foi adicionada a clorexidina à 0.1% e 0.2% em forma de gel bioadesivos. Foi encontrado que a quitosana apresentou grande atividade antimicrobiana contra *P. gingivalis*, esta propriedade foi melhorada notavelmente quando a quitosana foi usada em altos pesos moleculares. A atividade antimicrobiana da associação da quitosana / clorexidina foi significativamente melhor que o efeito apresentado pela clorexidina. Conclui-se que filmes (gel) de quitosana poderiam ser promissórios no tratamento da doença periodontal devido a suas capacidades bioadesivas e antibacterianas.

KISHEN et al., em 2008 investigaram a eficácia antibacteriana de nanopartículas catiônicas usadas na desinfecção do canal radicular. O experimento foi dividido em duas etapas com a finalidade de avaliar as propriedades físicas de três tipos de nanopartículas (quitosana, óxido de zinco e a combinação de ambas) e seu efeito antibacteriano quando associadas a cimentos a base de óxido de zinco e eugenol. Na segunda etapa foi analisada a capacidade dessas nanopartículas para prevenir a aderência bacteriana na dentina. Os resultados mostraram que a incorporação de nanopartículas não alterou o fluido dos cimentos, mas estas melhoraram a capacidade antibacteriana e a liberação dos componentes antibacterianos. A aderência de *E. faecalis* sobre dentina foi significativamente diminuída quando os cimentos foram associados as nanopartículas.

CALAMARI et al., em 2011 avaliaram as propriedades antifúngicas da clorexidina, fluconazol e quitosana sobre cepas de *C. albicans* comerciais e obtidas de 10 pacientes com candidíase oral. Os microrganismos foram expostos aos agentes antifúngicos em diferentes concentrações e combinados entre eles. Os

fatores de virulência dos microrganismos obtidos de pacientes e comercialmente mostraram significativa diminuição aos diferentes tratamentos, exceto pela atividade de fosfolipase. Concluíram que a *C. albicans* exposta por períodos curtos aos antifúngicos testados isoladamente ou em associação podem modular os fatores de virulência diminuindo a patogenicidade do microrganismo.

XU et al., em 2011 estudaram a capacidade remineralizadora da quitosana fosforilada sobre dentina. Superfícies de dentina parcialmente desmineralizadas, principalmente compostas de colágeno tipo I foram modificadas pela imobilização covalente da quitosana sobre as superfícies de colágeno, depois as amostras foram colocadas em uma solução remineralizadora para estudar seu efeito. Foi encontrado que a quitosana fosforilada facilitou a remineralização de dentina, portanto, ela poderia ser usada no tratamento de caries e hipersensibilidade dentinária.

SHRESTHA; FRIEDMAN; KISHEN em 2011 investigaram o efeito da combinação fotodinâmica / química com a incorporação da carboximetil quitosana sobre o entrecruzamento do colágeno dentinário, a resistência à degradação enzimática e as propriedades químicas da dentina. Foi observado que o entrecruzamento da carboximetil quitosana com a matriz de colágeno melhorou significativamente a resistência à degradação enzimática, a ultraestrutura e a força de tração da dentina. Concluíram que a resistência e micro-dureza do colágeno dentinário foram melhoradas pela ativação fotodinâmica / química das matrizes de colágeno com a incorporação da quitosana.

ELSAKA; ELNAGHY em 2012 avaliaram a atividade antibacteriana de um “primer” (RealSeal) de auto-polimerização modificado pela incorporação de soluções de quitosana à 0.03%, 0.06%, 0.12% e 0.25%. O efeito antibacteriano foi analisado por contato direto com *E. faecalis*. Os resultados mostraram que o primer modificado exibiu um potente efeito antibacteriano comparado com o primer na sua formulação original. A força de adesão do primer associado ou não a quitosana não mostrou diferenças significantes. Foi concluído que a incorporação de quitosana ao primer de auto-polimerização do sistema RealSeal oferece vantagens pelas suas propriedades antibiofílmicas e por não interferir negativamente com a sua força de adesão na dentina radicular.

SHRESTHA; HAMBLIN; KISHEN em 2012 avaliaram o efeito da quitosana associada a um fotosintetizador contra biofilmes orais, também foi avaliado a capacidade para reforçar a matriz de dentina a fim de melhorar sua estabilidade

física e química. Rosa de Bengala associada à quitosana foi submetida à terapia fotodinâmica para determinar suas propriedades remineralizantes e antibacterianas. A associação mencionada acima inativou significativamente o crescimento bacteriano do *E. faecalis* e induziu o entrecruzamento das fibras colágenas, mostrando alta resistência à degradação do colágeno e melhorando as propriedades físicas da dentina. Os autores concluíram que a ativação fotodinâmica da quitosana / rosa de bengala pode ser de muita utilidade no tratamento de tecidos duros infectados devido a seus benéficos antibiofílmicos e remineralizantes.

DA SILVA et al., em 2013 analisaram a formação de biofilmes na interface cimento–dentina de segmentos de raízes bovinas obturadas com guta-percha e cimentos associados ou não a nanopartículas de quitosana. Foram avaliados também o efeito de diferentes formulações de quitosana sobre a superfície dentinária. Após 7 dias (tempo de presa), as amostras foram armazenadas em soluções envelhecedoras durante 1 e 4 semanas para sua posterior infecção com *E. faecalis*. Somente foi observado uma significativa diminuição do crescimento bacteriano nas interfaces cimento-dentina nas amostras tratadas e obturadas com quitosana, quitosana fosforilada e quitosana fosforilada associada a rosa de bengala sem apresentar diferenças entre os três grupos. Os autores concluíram que a incorporação de CNPs aos cimentos a base de óxido de zinco e eugenol inibiram a formação de biofilme. Este efeito foi mantido quando a dentina foi tratada com quitosana fosforilada.

SILVA et al., em 2013 avaliaram a eficácia da quitosana e outras soluções quelantes para remover lama dentinária. Vinte e cinco canais radiculares de dentes caninos foram instrumentados e irrigados com NaOCl à 1% e divididos em grupos de acordo a irrigação final recebida. Os resultados mostraram que o EDTA à 15%, quitosana à 0.2% e ácido cítrico à 10% removeram de forma similar a lama dentinária e foram significativamente melhores que o ácido acético à 1% e o grupo controle (sem irrigação final). Concluíram que o EDTA a 15%, quitosana a 0.2% e ácido cítrico a 10% removeram eficientemente a lama dentinária do terço médio e apical dos canais radiculares. No entanto, EDTA a 15% e quitosana a 0.2% foram associados com altos níveis de desmineralização da dentina radicular.

3 *Proposição*

3 PROPOSIÇÃO

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito das nanopartículas de Quitosana (CNPs) e da variação da temperatura, tempo de exposição e pH do NaOCl sobre biofilmes bacterianos, de acordo com os seguintes parâmetros:

- 3.1 Viabilidade e biovolume bacteriano após irrigação com as soluções experimentais. (Parte I)
- 3.2 Áreas de dentina limpa após ser irrigada com as soluções experimentais. (Parte II)
- 3.3 Inibição do crescimento bacteriano e limpeza da superfície dentinária após irrigação final com CNPs. (Parte III)

4 Materiais e Métodos

4 MATERIAIS E MÉTODOS

I. PRIMEIRA PARTE: *Efeito antibacteriano e de dissolução do NaOCl em diferentes temperaturas e pHs.*

Como requisito prévio ao início do estudo, o projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em seres humanos da Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo (Processo nº 166/2011). Anexo 1.

4.1 Obtenção e tratamento dos blocos de dentina

Para os procedimentos experimentais foram utilizados blocos de dentina bovina. Dentes de bovinos foram seccionados utilizando uma máquina metalográfica de corte ISOMET Low Speed Saw (Buehler Ltd, Lake Bluff IL, USA) até obter blocos medindo 5x5x3mm aproximadamente . Anexo 8.

Os blocos foram tratados com hipoclorito de sódio a 1% por 15 minutos e EDTA a 17% por 3 minutos para eliminação de resíduos orgânicos e possível presença de “smear layer”. Para verificar o método de limpeza, dois blocos foram examinados no Microscópio Eletrônico de Varredura de bancada, modelo PSEM-Express (PSEM) (Aspex Corporation; Delmont, PA, USA) e Microscópio Confocal de Varredura Laser (CLSM) (TCS-SPE, Leica Microsystem GmbH, Mannheim, Germany) (fig. 1). No caso do CLSM, o bloco foi corado com Laranja de acridina a 0.1% durante 5 min.

Os blocos foram esterilizados com o auxílio de autoclave (Sercon-Modelo HS-Mogi das Cruzes, SP) a 121°C; uma vez estéreis, eles foram fixados em aparelho ortodôntico removível com cera utilidade (Kota Ind. e Com. Ltda.; São Paulo, SP, Brasil).

Figura 1. Imagens do bloco de dentina no MEV (esquerda) e CLSM (direita) para verificação da efetividade do método de limpeza.

4.2 Formação do Biofilme oral in situ.

Para a formação do biofilme oral, in situ, foram feitas moldagens do arco superior de um voluntário onde, posteriormente confeccionou-se os modelos de gesso pedra e o aparelho intrabucal palatino utilizando resina acrílica, no qual foram realizados 12 nichos dispostos em 3 fileiras (4 nichos por fileira), que alojaram os blocos de dentina. (fig. 2). O aparelho foi utilizado pelo voluntário durante 48 horas para possibilitar a formação de biofilme sobre a superfície dos blocos de dentina. Os procedimentos de higiene do voluntário não foram interrompidos. Transcorrido esse período os blocos de dentina foram cuidadosamente separados e irrigados com 500 μ l de água destilada estéril para eliminar células não aderidas e incubados a 37°C em tubos de ensaio contendo 5 mL de BHI durante 24 horas para standardizar a colonização bacteriana sobre a superfície dentinária.

Figura 2. Modelo em gesso pedra do arco superior (A), aparelho intrabucal palatino (B), aparelho com os blocos de dentina (C).

4.3 Análises do biofilme oral pré e pós irrigação com hipoclorito de sódio a temperatura ambiente e aquecido a 37°C.

Transcorrido o período para a formação do biofilme, os blocos de dentina infectados foram irrigados com água destilada estéril e colocados em placas de cultura celular de 24 poços contendo Live/dead® BacLight™ Kit (Molecular Probes, Burlington, ON, Canada) durante 10 minutos, para sua posterior análise pré-operatória no CLSM em 400X. Todas as amostras pré-irrigação foram utilizadas como grupo controle

Uma vez comprovada a colonização bacteriana da superfície dentinária, foram conformados 4 grupos experimentais, cada um deles com 2 subgrupos contendo 5 blocos de dentina infectada in situ, totalizando 40 blocos. Foram tomadas 4 fotomicrografias por amostra.

Grupo 1: Dez amostras foram irrigadas com 500 µl de hipoclorito de sódio a 1% a temperatura ambiente durante 5 minutos (N=5) e 20 minutos (N=5).

Grupo 2: Dez amostras foram irrigadas com 500 µl de hipoclorito de sódio a 2.5% a temperatura ambiente durante 5 minutos (N=5) e 20 minutos (N=5).

Para regular a temperatura do hipoclorito de sódio, seringas de 1 mL contendo a solução irrigadora, foram colocadas 30 minutos antes de sua utilização em uma incubadora (Fanem Ltda. - Modelo 002 CB - São Paulo, SP, Brasil) a 37° C. Foram

utilizadas diferentes seringas a cada 5 min para manter a temperatura do irrigante. A temperatura da solução foi controlada com um pHmetro com sensor de temperatura (AlfaKit Ltda, Florianópolis, SC, Brasil). A temperatura do laboratório foi controlada utilizando um barômetro de mercúrio.

Grupo 3: Dez amostras foram irrigadas com 500 µl de hipoclorito de sódio a 1% a 37 °C durante 5 minutos (N=5) e 20 minutos (N=5).

Grupo 4: Dez amostras foram irrigadas com 500 µl de hipoclorito de sódio a 2.5% a 37 °C durante 5 minutos (N=5) e 20 minutos (N=5).

Para os subgrupos com períodos de tempo de 20 minutos, a solução foi trocada a cada 5 minutos.

Transcorridos os períodos de tempo experimentais, os blocos foram irrigados com 500 µl de água destilada estéril e colocados por 10 min em uma placa de cultura celular contendo Tiosulfato de sódio à 5% com a finalidade de inativar o efeito residual do hipoclorito de sódio. Após estes procedimentos, as amostras foram irrigadas de novo com 500 µl de água destilada estéril e coradas com LIVE/DEAD durante 10 minutos para sua análise pós-operatória no CLSM em 400X. Imediatamente depois de finalizados os procedimentos de irrigação as amostras foram novamente colocadas em Tiosulfato de sódio á 5%, classificadas de acordo aos grupos de estudo e colocadas em tubos de ensaio contendo 5 ml de BHI para sua incubação durante 24 horas. Transcorrido este período as amostras foram analisadas novamente no CLSM para determinar se houve ou não a reativação bacteriana.

4.4 Análise da reativação bacteriana.

Após o período de incubação, as amostras foram lavadas com 500 µl de água destilada estéril e coradas com LIVE/DEAD durante 10 minutos para sua posterior análise no CLSM a 400X.

A viabilidade bacteriana (cor verde) determina se as bactérias do biofilme podem sobreviver e se reproduzir em um meio rico em nutriente após serem

expostas às soluções experimentais em diferentes concentrações, tempos e temperaturas. Foram utilizadas as mesmas amostras, já que um estudo piloto prévio determinou que o Live/Dead não interferia com a vitalidade celular. Embora, fossem utilizadas as mesmas amostras, conformou-se 4 novos grupos para facilitar a interpretação dos resultados.

Grupo 1: Foram analisadas 10 amostras após irrigação com NaOCl a 1% a temperatura ambiente durante 5 (N=5) e 20 (N=5) minutos e incubados em BHI durante 24 horas.

Grupo 2: Foram analisadas 10 amostras após irrigação com NaOCl a 2.5% a temperatura ambiente durante 5 (N=5) e 20 (N=5) minutos e incubados em BHI durante 24 horas.

Grupo 3: Foram analisadas 10 amostras após irrigação com NaOCl a 1% a 37 °C durante 5 (N=5) e 20 (N=5) minutos e incubados em BHI durante 24 horas.

Grupo 4: Foram analisadas 10 amostras após irrigação com NaOCl a 2.5% a 37 °C durante 5 (N=5) e 20 (N=5) minutos e incubados em BHI durante 24 horas.

No referente à variação de temperatura do NaOCL, todos os procedimentos pós operatórios e pós reativação foram feitos em duplicado com a finalidade de determinar a porcentagem de limpeza da superfície dentinária, utilizando o PSEM. (parte II do estudo)

Imagens representativas do biofilme pre e pós contato com NaOCl a temperatura ambiente (22°C) e aquecido a 37° C e apos ser revitalizado em BHI podem ser observadas no anexo 2.

4.5 Análise das amostras no Microscópio confocal de varredura laser

Após os procedimentos de coloração, as amostras foram avaliadas imediatamente no Microscópio Confocal de Varredura a Laser do Centro Integrado de Pesquisas da Faculdade de Odontologia de Bauru. Foram obtidas 4 fotomicrografias a 400X de cada bloco: 4 fotomicrografias pré irrigação com a finalidade de comprovar a colonização bacteriana e a standardização da espessura do biofilme, 4 fotomicrografias pós irrigação e 4 fotomicrografias pós reativação (40 pré, 40 pós irrigação e 40 pós reativação para cada grupo). As imagens foram feitas a intervalos de 1.5 μ m desde a parte mais superior do biofilme até a superfície dentinária mediante o uso da ferramenta Z-stack do programa Leica LAS-AF (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) no formato de 512 x 512 pixels.

4.6 Determinação da viabilidade bacteriana e biovolume do biofilme

As imagens obtidas pelo microscópio confocal foram armazenadas em formato ".lif" e exportadas intervalo por intervalo em formato ".tif" utilizando o software Leica LAS/AF lite. Posteriormente, estas imagens foram avaliadas com o software BioImage_L 2.0 (BioImage_L 2.0, Malmö, Sweden) http://www.bioimageL.com/get_bioimage_L

Os parâmetros analisados foram:

1. Biovolume total bacteriano
2. Porcentagem de células viáveis

Os dados obtidos foram classificados de acordo aos parâmetros de estudo no programa Excel (Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA) e transferidos no programa GraphPad Prism 4 (GraphPad Software Inc, La Jolla, CA, USA) para realizar a análise estatística.

4.7 Análise estatística.

Para a análise estatística foi utilizado o programa GraphPad Prism 4 (GraphPad Software Inc, La Jolla, CA, USA). Os métodos estatísticos empregados foram não paramétricos porque os dados não mostraram uma distribuição normal. O nível de significância foi fixado em $P < 0.05$. Para as comparações múltiplas entre os grupos foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis Dunn's.

4.8 Irrigação do biofilme oral com hipoclorito de sódio acidificado a pH 5 e 7.

A acidificação das soluções experimentais foi realizada de acordo com o protocolo descrito por Maliza, A (2013). Para o preparo das soluções irrigadoras, utilizou-se a solução de hipoclorito de sódio 10-15% (Sigma-Aldrich Co., St Louis, MO, USA), a qual foi ajustada à concentração desejada (1% e 2.5%). Para o ajuste do pH, foi utilizado o ácido acético e as respectivas substâncias tampão para cada valor de pH, como se segue: acetato de sódio (Synth®, Diadema, SP, Brasil) para o pH 5 e cacodilato de sódio (Eletron Microscopy Sciences, Ft. Washington, PA, USA) para o pH 7. As concentrações e os valores de pHs foram ajustados de acordo com as fórmulas químicas, respectivamente:

$$C_1 \cdot V_1 = C_2 \cdot V_2$$

Onde,

C_1 = concentração do NaOCl (13%);

V_1 = volume necessário do NaOCl (13%);

C_2 = concentração do NaOCl que se deseja obter;

V_2 = volume total de solução (40mL)

$$C = \frac{m \text{ (g)}}{PM \cdot V \text{ (l)}}$$

Onde,

C = massa molar (0,1);

m = massa da substância (em gramas);

PM = peso molecular da substância;

V = volume da solução (em litros).

A massa molar (C) e o volume (V) para as soluções foram padronizadas para o cálculo nas fórmulas, sendo 0,1 e 40mL, respectivamente. Devido à oscilação que o hipoclorito de sódio sofre, conforme especificado pelo próprio fabricante (10-15%), optou-se em utilizar a média dessa concentração (13%) para evitar resultados “falsos-negativos”. Após o cálculo do volume do hipoclorito de sódio e da massa da substância tampão, para cada concentração e pH, a substância tampão foi pesada em balança de precisão analítica (Mettler Toledo International Inc., Modelo PB303-S, Greifensee, Suíça) e colocada em um Becker de 40mL cada (Uniglas e Carvalhaes Produtos para Laboratório Ltda., Alvorada, RS, Brasil) contendo 15mL de água destilada e uma barra magnética (Synth®, Diadema, SP, Brasil). Na sequência, a fim de promover a dissolução da substância, o becker foi colocado em um agitador magnético (Quimis Aparelhos Científicos Ltda., Diadema, SP, Brasil) durante 2 minutos. Em seguida, ainda com o agitador ligado, com uma pipeta (Eppendorf®, Hamburgo, Alemanha) acrescentou-se o volume de hipoclorito de sódio a 13% necessário para se obter a concentração desejada, realizando a homogeneização por mais 2 minutos.

O valor do pH foi aferido com um pHmetro modelo Thermo Scientific Orion 3 Star (Thermo Fisher Scientific Inc., Ayer Rajah Crescent, Singapura). Para o ajuste do pH desejado, ainda com o agitador ligado, foi adicionado ácido acético (Merck S.A Indústria Químicas, Rio de Janeiro, RJ, Brasil), quando necessário. Quanto menor o valor do pH desejado, maior a quantidade de ácido acético acrescentada. À medida que o ácido ia sendo adicionado, o pHmetro ia aferindo o novo valor. Após se obter o pH desejado e uma solução homogênea, esta foi transferida para uma proveta (Pyrex®, Union City, CA, USA) para ser avaliada e, quando necessário acrescentar, o volume de água destilada suficiente para completar os 40mL. Após estes procedimentos, as soluções foram colocadas em frascos escuros e armazenadas em uma geladeira a 2°C.

Foram conformados 6 grupos experimentais, cada um deles com 2 subgrupos contendo 5 blocos de dentina infectada in situ, totalizando 60 blocos de dentina bovina. Para os subgrupos com períodos de tempo de 20 minutos, a solução foi trocada a cada 5 minutos. Nos grupos 1 e 2, o NaOCl não foi alterado (pH 12).

Grupo 1: Dez blocos de dentina foram irrigados NaOCl a 1% com pH 12 durante 5 minutos (N=5) e 20 minutos (N=5).

Grupo 2: Dez blocos de dentina foram irrigados NaOCl a 2.5% com pH 12 durante 5 minutos (N=5) e 20 minutos (N=5).

Grupo 3: Dez blocos de dentina foram irrigados com NaOCl a 1% com pH 5 durante 5 (N=5) e 20 (N=5) minutos

Grupo 4: Dez blocos de dentina foram irrigados com NaOCl a 2.5% com pH 5 durante 5 (N=5) e 20 (N=5) minutos

Grupo 5: Dez blocos de dentina foram irrigados com NaOCl a 1% com pH 7 durante 5 (N=5) e 20 (N=5) minutos

Grupo 6: Dez blocos de dentina foram irrigados com NaOCl a 2.5% com pH 7 durante 5 (N=5) e 20 (N=5) minutos

Os procedimentos de formação, tratamento e revitalização do biofilme bacteriano, assim como a análise das amostras no CLSM e a análise estatística dos dados obtidos foram os mesmos descritos nos itens 4.2, 4.3, 4.4, 4.5, 4.6 e 4.7 respectivamente.

Imagens representativas do biofilme pré e pós contato com NaOCl acidificado a pH 5 e 7 podem ser observadas nos anexos 3 e 4, respectivamente. A porcentagem de cloro ativo nas soluções experimentais imediatamente após suas preparações e depois de 7 e 14 dias, pode ser visto no anexo 9

No referente à variação de pH do NaOCL, todos os procedimentos pós operatórios e pós reativação foram feitos em duplicado com a finalidade de determinar a porcentagem de limpeza da superfície dentinária, utilizando o PSEM. (parte II do estudo)

II.- SEGUNDA PARTE: *Avaliação da limpeza dentinária após irrigação com NaOCl em diferentes temperaturas e pHs.*

4.9 Preparação previa das amostras antes de serem analisadas no PSEM

Nesta etapa, foram conformados os grupos experimentais de acordo aos parâmetros estudados na primeira parte (temperatura, acidificação e suas respectivas reativações). Concluídos os procedimentos experimentais, as amostras foram separadas de acordo a cada grupo e lavadas com 500 µl de agua destilada estéril durante 5 minutos, para sua posterior armazenagem em solução fixadora de Karnovsky (1% paraformaldeído + 3% glutaraldeído em tampão cacodilato 0.07 M ph 7,2) durante 7 dias. Transcorrido esse período experimental, as amostras foram lavadas novamente com agua destilada estéril durante 10 minutos e colocadas em um recipiente fechado com tetróxido de ósmio a 1% durante 24 horas para a fixação dos microrganismos. Os procedimentos envolvendo o uso do tetróxido de ósmio foram realizados em capela de fluxo laminar. Passado o período de fixação, as amostras foram lavadas mais uma vez com agua destilada estéril durante 5 minutos. Posteriormente, as amostras foram secas a temperatura ambiente durante 12 horas.

Embora não seja necessária a metalização das amostras para sua analise no PSEM, este procedimento foi realizado, em vista que um estudo piloto mostrou que a qualidade das imagens obtidas foi otimizada quando as amostras foram metalizadas.

Para realizar o processo de metalização, as amostras foram fixadas em “stubs” e metalizadas com uma camada de ouro de aproximadamente 20 nanômetros. O mencionado processo foi feito utilizando o aparelho Desk II Denton Vacuun (Denton Vacuum, Co., Moorestown, NJ, USA).

4.10 Analise das amostras no PSEM.

Com a finalidade de determinar a limpeza da superfície dentinária foram feitas 4 fotomicrografias das partes mais representativas de cada amostra em 500X com auxilio do programa Aspex Perception. Para quantificar a capacidade de limpeza das

soluções irrigadoras sobre o biofilme oral, foi sobreposta a cada fotomicrografia uma grade quadriculada contendo 100 áreas de dimensões iguais. Nos anexos 5 e 6, pode-se observar imagens representativas da limpeza da superfície dentinária após irrigação com NaOCl em diferentes temperaturas e pH e após serem incubadas em BHI durante 24 horas.

Cada fotomicrografia foi avaliada por 3 examinadores de acordo com os seguintes escores:

- 1.- Menos de 10% de quadrados com túbulos dentinários visíveis.
- 2.- De 10 a 50 % de quadrados com túbulos dentinários visíveis.
- 3.- De 50 a 70 % de quadrados com túbulos dentinários visíveis
- 4.- Mais do 70% de quadrados com túbulos dentinários visíveis.

Desta forma foi possível estabelecer a porcentagem de limpeza da superfície dentinária e conseqüentemente a capacidade de dissolução de matéria orgânica das soluções irrigadoras em diferentes concentrações, tempos, temperaturas, pH e suas respectivas revitalizações.

Os dados obtidos foram inseridos de modo temporal em um gráfico e levados ao programa GraphPad Prism 4 (GraphPad Software Inc, La Jolla, CA, USA) para realizar a análise estatística.

4.11 Análise estatística.

Com a finalidade de observar a concordância inter e intra examinadores foi utilizado o teste estatístico de Kappa.

Para as comparações múltiplas entre os grupos e tempos foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis Dunn. O nível de significância foi fixado em $P < 0.05$.

III.- TERCEIRA PARTE: Avaliação de efeito antibacteriano e quelante das nanopartículas de quitosana

Para a terceira parte deste projeto foram utilizados 80 blocos de dentina bovina. Os blocos foram cortados horizontal e longitudinalmente com o objetivo de criar debris dentinário em todas as superfícies dos espécimes. As amostras foram autoclavadas mas não tratadas com nenhuma substância química para manter a lama dentinária gerada durante o seccionamento.

4.12 Sínteses das nanopartículas de quitosana

As nanopartículas foram sintetizadas pelo método de gelação descrito por De Moura *et al.* (2009). A quitosana (Polymar Ciência e Nutrição S/A. Fortaleza, Brasil) foi diluída em ácido acético à 1% sob constante agitação magnética a temperatura ambiente. 1 mg/mL de tripolifosfato (TPP, Sigma–Aldrich Chemical Co. St. Louis, MO, USA) foi adicionado à solução de quitosana. A preparação foi misturada usando um homogeneizador (Polytron PT 3000 – Brinkmann) a 5000 rpm. adicionando gota a gota a solução de TPP, até obter uma concentração final de CNPs de 1.29 mg/mL. Uma zona opalescente com formação de nanopartículas foi visível na suspensão. As CNPs foram examinadas pelo método de caracterização de nanopartículas. A concentração do TPP na solução final foi 0.3-0.6 (mg mL⁻¹). O tamanho das nanopartículas foi 85-221 nm.

4.13 Tratamento das amostras

As soluções irrigadoras usadas foram NaOCl a 2.5% (Farmácia Específica, Bauru, SP, Brasil) por 20 minutos, EDTA a 17% (Bioquímica, Ibiporã, PR, Brasil) por 3 minutos e 1.29 mg/mL de CNPs por 3 minutos. O NaOCl foi renovado a cada 5 minutos para simular condições clínicas. As amostras foram divididas em quatro grupos ($n=20$ /grupo) e tratadas da seguinte maneira: (1) água destilada (controle), (2) NaOCl-EDTA, (3) NaOCl-EDTA-CNPs, (4) NaOCl-CNPs. O volume utilizado foi padronizado a 3 mL para todas as soluções. Os experimentos foram realizados pela

imersão dos blocos de dentina em placas de cultura celular de 24 poços contendo as soluções irrigadoras. Após os procedimentos de irrigação, a metade das amostras ($n=40$) foi usada para analisar o efeito quelante das CNPs utilizando o PSEM, enquanto que a outra metade ($n=40$) foi infectada intraoralmente para analisar a capacidade das bactérias para formar biofilmes sobre dentina tratada com as soluções experimentais. O CLSM foi utilizado para analisar esses biofilmes. Os grupos experimentais podem ser vistos na tabela 1.

Tabela 1. Distribuição dos grupos experimentais.

Grupo	Tratamento	Efeito quelante (n)	Efeito antibacteriano (n)
1	Água destilada	10	10
2	NaOCl-EDTA	10	10
3	NaOCl-EDTA-CNPs	10	10
4	NaOCl-CNPs	10	10

4.14 Efeito quelante das CNPs

Após os procedimentos de irrigação, as amostras foram fixadas em temperatura ambiente e fixadas em “stubs”. Três micrográficos por bloco de dentina foram analisados usando o PSEM em 500X (120 imagens no total). A área de cada imagem foi 1024x1024 mm. As imagens foram divididas em 100 partes iguais usando uma grade digital e examinadas por três endodontistas para determinar a quantidade de áreas cobertas por lama dentinária. Cada examinador avaliou as imagens 2 vezes com um intervalo de 1 semana entre cada observação. Os mesmos escores utilizados na segunda parte do projeto (item 4.10) foram usados para analisar as imagens. Os valores que mostraram concordância e menor discrepância entre as observações foram escolhidos para realizar a análise estatística (item 4.11).

4.15 Capacidade antibacteriana das CNPs

Depois que as amostras foram tratadas com as soluções experimentais, cada bloco de dentina foi infectado *in situ*, corados com Live/Dead e analisados com o CLSM como explicado na primeira parte do projeto (itens 4.2, 4.3, 4.5 e 4.6). É importante mencionar que um estudo piloto prévio não mostrou diferenças entre os grupos onde o efeito residual do NaOCl foi ou não inativado. Imagens representativas obtidas com o PSEM (pós-irrigação) e com o CLSM (pós-infecção) são mostradas no anexo 7.

4.16 Análise estatística

Os dados obtidos foram analisados utilizando o teste de Kruskal-Wallis Dunn (item 4.7). O nível de significância foi fixado em $P < 0.05$.

5 *Resultados*

5 RESULTADOS

5.1 Resultados da primeira parte do projeto

Variação da temperatura do NaOCl

Quarenta amostras foram avaliadas, totalizando 480 imagens (campos operatórios), isto quer dizer que foram examinados 20 campos para cada grupo concentração/tempo/temperatura e suas respectivas reativações.

Todas as soluções experimentais foram capazes de reduzir a biomassa bacteriana ($P<.05$) sem apresentar diferenças estatísticas significantes entre os grupos. Não foram encontradas diferenças estatísticas entre as porcentagens de células viáveis do grupo controle e o grupo do NaOCl a 1% - 5 min a 22 °C e aquecido a 37 °C ($P>.05$). As medianas e o 25-75% percentiles do biovolume total e a percentagem de células viáveis dos dados referentes ao tratamento das amostras com NaOCl a diferentes temperaturas podem ser vistas na tabela 2.

O biovolume total e a percentagem de células viáveis dos biofilmes revitalizados após serem tratados com o NaOCl a 1% a 22°C não mostraram diferenças estatísticas significativas em comparação com o controle ($P>.05$). Embora o NaOCl a 1% a 22°C fosse capaz de dissolver significativamente a matéria orgânica ($P<.05$), o remanescente bacteriano mostrou uma alta percentagem de viabilidade celular ($P>.05$). Ver o gráfico 1.

Todas as soluções de NaOCl a 37°C foram capazes de reduzir o biovolume total ($P<.05$). A percentagem de células viáveis atingiu valores similares aos do grupo controle, quando o biofilme foi exposto a NaOCl a 1% - 5 min a 37°C e quando este foi reativado ($P>.05$).

Tabela 2. Mediana e 25–75% percentiles do biovolume total e da percentagem de células viáveis após tratamento com NaOCl a 22°C e 37°C.

	Biovolume $\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$	%
	Total	Células viáveis
Controle	1.19 (0.50-3.06) ^a	94.10 (84.42-96.49) ^a
1%-5min-22°C °	0.05 (0.02-0.25) ^b	69.26 (37.62-87.38) ^{ab}
1%-20min-22°C	0.04 (0.00-0.14) ^b	45.13 (13.71-84.03) ^{bc}
2.5%-5min-22°C	0.03 (0.00-0.16) ^b	49.73 (9.63-85.07) ^{bc}
2.5%-20min-22°C	0.01 (0.00-0.04) ^b	19.58 (3.02-62.94) ^c
1%-5min-37°C	0.04 (0.01-0.20) ^b	73.82 (5.27-93.17) ^{ac}
1%-20min-37°C°	0.03 (0.00-0.19) ^b	20.13 (1.70-63.16) ^c
2.5%-5min-37°C°	0.05 (0.04-0.15) ^b	54.96 (46.64-74.96) ^{bc}
2.5%-20min-37°C°	0.05 (0.02-0.07) ^b	30.13 (16.31-52.09) ^{bc}

* Diferentes letras em cada coluna, representam diferença estatística significativa

Gráfico 1. Porcentagem de células viáveis após tratamento com NaOCl a 22°C. A avaliação foi realizada imediatamente e após a reativação bacteriana em BHI por 24 horas (R). As colunas representam os intervalos de valores e medianas dos grupos experimentais.

* Diferentes letras em cada coluna, representam diferença estatística significante.

Variação do pH do NaOCl

Sessenta amostras foram avaliadas, totalizando 720 imagens (campos operatórios), isto quer dizer que foram examinados 20 campos para cada grupo concentração/tempo/temperatura e suas respectivas reativações.

TEMPOS DE EXPOSIÇÃO DE 5 MINUTOS: O biovolume bacteriano não decresceu significativamente quando foi irrigado com NaOCl acidificado a pH 5 sem importar a sua concentração ($P>.05$). O NaOCl a 2.5% com pH 12 (inalterado) apresentou os maiores níveis de redução da biomassa ($P<.05$). Não houve diferença estatística entre as porcentagem de células viáveis do grupo controle e os irrigados com NaOCl a 1% em qualquer pH ($P>.05$). Quando as soluções de NaOCl a 2.5% foram acidificadas a pH 5 e 7, a viabilidade bacteriana diminuiu significativamente ($P<.05$). As medianas e o 25-75% percentiles do biovolume total e a porcentagem de células viáveis dos dados referentes ao tratamento das amostras com NaOCl a diferentes pH durante 5 min pode ser visto na tabela 3.

O biovolume total e a porcentagem de células viáveis dos biofilmes revitalizados após serem tratados com NaOCl a 1% e 2.5% nos diferentes pH estudados, guardaram relação direta com o volume e viabilidade bacteriana remanescente ($P>.05$), isto quer dizer que nenhum dos grupos que apresentou valores estatisticamente diferentes ao controle, conseguiu atingir ditos valores após serem reativados e vice-versa.

TEMPOS DE EXPOSIÇÃO DE 20 MINUTOS: Não houve diferença estatística significante entre o biovolume do grupo controle e o irrigado com NaOCl a 1% em pH 5 ($P>.05$), no entanto, este grupo apresentou uma significativa diminuição da viabilidade bacteriana ($P<.05$). Foi encontrada uma relação inversa à mencionada acima, quando as amostras foram irrigadas com NaOCl a 1% em pH 12 (houve redução da biomassa mas a viabilidade celular permaneceu alta). Os grupos acidificados a pH 5 e 7 e o NaOCl a 2.5% em pH 12 mostraram uma alta capacidade antibacteriana ($P<.05$). As medianas e o 25-75% percentiles do biovolume total e a porcentagem de células viáveis dos dados referentes ao tratamento das amostras com NaOCl a diferentes pH durante 20 min podem ser vistas na tabela 4.

No referente à viabilidade bacteriana e biovolume dos grupos revitalizados, foi repetida a mesma relação que se encontrou nos grupos que foram revitalizados após de 5 minutos de exposição às soluções experimentais (nenhum dos grupos que apresentou valores estatisticamente diferentes ao controle, conseguiu atingir ditos valores após serem reativados e vice-versa). O biovolume bacteriano após reativação mostrou níveis significativamente baixos nos grupos tratados com NaOCl a 1% e 2.5% em pH 7 e 12 ($p < .05$), no entanto nos pH mais ácidos a biomassa foi evidente ($p < .05$) (gráfico 2).

Tabela 3. Mediana e 25–75% percentiles do biovolume total e da percentagem de células viáveis após tratamento com NaOCl em diferentes concentrações e pH durante 5 MINUTOS.

	Biovolume $\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$	%
	Total	Células viáveis
Controle	1.25 (0.50-3.06) ^a	82.81 (60.10-91.03) ^a
1%-pH5	0.64 (0.35-1.1) ^{ab}	52.11 (18.35-71.53) ^{ab}
1%-pH7	0.14 (0.05-1.5) ^{bc}	51.04 (39.68-71.89) ^{ab}
1%-pH12	0.05 (0.02-0.12) ^{cd}	76.89 (37.62-89.89) ^a
2.5%-pH5	0.48 (0.17-1.0) ^{ab}	11.79 (6.99-48.58) ^b
2.5%-pH7	0.29 (0.13-0.89) ^{bc}	10.07 (4.40-43.32) ^b
2.5%-pH12	0.03 (0.00-0.11) ^d	49.73 (9.63-84.27) ^{ab}

* Diferentes letras em cada coluna, representam diferença estatística significante

Tabela 4. Mediana e 25–75% percentiles do biovolume total e da percentagem de células viáveis após tratamento com NaOCl em diferentes concentrações e pH durante 20 MINUTOS.

	Biovolume $\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$	%
	Total	Células viáveis
Controle	1.25 (0.50-3.06) ^a	82.81 (60.10-91.03) ^a
1%-pH5	0.58 (0.23-0.80) ^{ab}	28.22 (17.97-68.50) ^b
1%-pH7	0.09 (0.01-0.64) ^{bc}	30.52 (3.38-63.73) ^b
1%-pH12	0.04 (0.00-0.17) ^c	43.72 (13.71-76.39) ^{ab}
2.5%-pH5	0.07 (0.03-0.15) ^{bc}	7.79 (1.15-43.85) ^b
2.5%-pH7	0.02 (0.00-1.00) ^{bc}	10.80 (6.22-28.07) ^b
2.5%-pH12	0.01 (0.00-0.05) ^c	19.58 (3.02-62.94) ^b

* Diferentes letras em cada coluna, representam diferença estatística significante

Gráfico 2. Biovolume bacteriano expressado em $\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$ após tratamento. A avaliação foi realizada depois que os biofilmes foram tratados com NaOCl a 1% e 2.5% em diferentes pH e reativados em BHI por 24 horas (R).

* Diferentes letras em cada coluna, representam diferença estatística significativa.

5.2 Resultados da segunda parte do projeto

Uma media de 86.5% foi encontrada no nível de concordância entre examinadores ($Kappa \geq 0.75$).

Varição da temperatura do NaOCl

Não foi encontrada diferenças significativas entre os grupos tratados durante 5 minutos ($p > .05$), os quais mostraram uma grande área de túbulos dentinários cobertos por matéria orgânica. O NaOCl a 2.5% durante 20 minutos, sem importar a temperatura da solução mostrou os valores mais altos de dissolução ($p < .05$). No gráfico 3 podem ser vistas as porcentagens de dissolução por scores e as diferenças estatísticas entre os grupos tratados com NaOCl em diferentes temperaturas.

O biofilme revitalizado durante 24 horas não evidenciou um crescimento bacteriano significativo ($P > .05$), desta forma, os resultados encontrados na primeira parte do projeto foram confirmados.

O biovolume total e a percentagem de células viáveis dos biofilmes revitalizados apos serem tratados com NaOCl a 1% e 2.5% nas diferentes temperaturas estudadas, guardaram relação direta com o volume e viabilidade bacteriana remanescente ($P > .05$), isto quer dizer que nenhum dos grupos que apresentou valores estatisticamente diferentes ao controle, conseguiu atingir ditos valores apos serem reativados e vice-versa.

Varição do pH do NaOCl

TEMPOS DE EXPOSIÇÃO DE 5 MINUTOS: Embora não fossem encontradas diferenças estatísticas significativas entre todos os grupos tratados com NaOCl ($P > .05$), estes foram diferentes quando comparados ao grupo controle ($P < .05$). Neste tempo de exposição foi observada uma desorganização da massa bacteriana, no entanto, foi evidenciado que em geral a combinação dos escores 1 e 2 atingiu aproximadamente 70% e somente 30% para os escores 3 e 4. As diferenças estatísticas do biofilme tratado com

NaOCl em diferentes concentrações e pH durante 20 minutos podem ser vistas no gráfico 4.

No referente à revitalização bacteriana, nenhum grupo atingiu valores similares ao controle após ser reativado ($P<.05$). Mas a diferença dos grupos tratados e não reativados, neste caso foi possível observar diferenças estatísticas entre os grupos experimentais após reativação bacteriana ($P<.05$), onde foi vista uma relação direta entre a alcalinidade da solução e a percentagem de limpeza da superfície dentinária. No entanto a percentagem de limpeza no escore 4 não foi maior que 30% em nenhum grupo.

TEMPOS DE EXPOSIÇÃO DE 20 MINUTOS: Igual ao tempo de exposição de 5 min, foram encontradas diferenças significantes entre os grupos tratados com NaOCl e o controle ($P<.05$), no entanto neste tempo de exposição (20 min), também foram apreciadas diferenças entre os grupos irrigados com NaOCl ($P<.05$). Os níveis mais altos de limpeza dentinária foram vistos em pH alcalino e concentrações altas. Nas concentrações de 2.5% foi observada uma relação direta entre o pH e a dissolução ($P<.05$). Entre as concentrações de 1% não foi encontrada diferença estatística significativa ($P<.05$). As diferenças estatísticas do biofilme tratado com NaOCl em diferentes concentrações e pH durante 20 minutos podem ser vistas no gráfico 5. Imagens representativas do biofilme pré e pós tratamento durante 20 minutos, pode ser vistas no anexo 5.

No referente à revitalização bacteriana, todos os grupos experimentais foram diferentes ao controle ($P<.05$). Os valores mais altos de dentina limpa foram mostradas por 2.5% NaOCl-pH12. Não houve diferença estatística entre os grupos tratados com NaOCl em pH 7 e 5 ($P<.05$). As diferenças estatísticas do biofilme reativado após ser tratado com NaOCl em diferentes concentrações e pH durante 20 minutos podem ser vistas no gráfico 6.

Gráfico 3. Porcentagem de escores de dissolução após tratamento com NaOCl em diferentes concentrações, tempos de contato e temperaturas.

* Diferentes letras em cada coluna, representam diferença estatística significativa.

Gráfico 4. Porcentagem de escores de dissolução após tratamento com NaOCl em diferentes concentrações e pH durante 5 minutos.

* Diferentes letras em cada coluna, representam diferença estatística significante.

Gráfico 5. Porcentagem de escores de dissolução após tratamento com NaOCl em diferentes concentrações e pH durante 20 minutos.

* Diferentes letras em cada coluna, representam diferença estatística significante.

Gráfico 6. Porcentagem de escore de dissolução após reativação bacteriana dos biofilmes tratados com NaOCl em diferentes concentrações e pH durante 20 minutos.

* Diferentes letras, representam diferença estatística significante.

5.3 Resultados da terceira parte do projeto

O teste de Kappa mostrou concordância entre os examinadores com valores de 0.8 ou mais nas diferentes categorias.

NaOCl-EDTA, NaOCl-EDTA-CNPs e NaOCl-CNPs foram capazes de remover significativamente a lama dentinária em comparação com o grupo controle ($P < .05$). A porcentagem de áreas com ou sem túbulos dentinários por escores e as diferenças estatísticas entre os grupos são mostradas no gráfico 7.

O biovolume e viabilidade bacteriana nas amostras que receberam uma irrigação final com CNPs foi significativamente menor que as apresentadas pelo grupo controle ($P < .05$). Não houve diferenças estatísticas entre NaOCl-EDTA e NaOCl-EDTA-CNPs ($P > .05$). A colonização bacteriana e a viabilidade celular foi maior nos grupo irrigado com NaOCl-EDTA ($P > .05$) quando comparados com os demais grupos experimentais. As comparações entre as medias, 25%-75% percentil e a percentagem de células viáveis são mostradas na tabela 5.

Gráfico 7. Percentagem de escores de áreas com túbulos dentinários visíveis após irrigação com CNPs.

* Diferentes letras em cada coluna, representam diferença estatística significante.

Tabela 5. Mediana e 25–75% percentiles do biovolume total e da percentagem de células viáveis após diferentes tratamentos experimentais usando CNPs.

	Biovolume $\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$	%
	Total	Células viáveis
Controle	5.0 (4.0-5.4) ^a	92 (90-96) ^a
NaOCl-EDTA	3.6 (2.8-5.1) ^{ab}	91 (87-94) ^a
NaOCl-EDTA-CNPs	2.6 (0.85-4.4) ^c	73 (51-86) ^b
NaOCl-CNPs	2.7 (1.8-4.2) ^{bc}	77 (60-83) ^b

* Diferentes letras em cada coluna, representam diferença estatística significativa.

6 *Discussão*

6 DISCUSSÃO

6.1 DA METODOLOGIA

No presente estudo, foi escolhida a indução bacteriana *in situ*, porque embora haja uma vasta informação na literatura mostrando o efeito dos irrigantes endodônticos sobre biofilmes uni ou bi espécies (BRYCE et al., 2009; DUNAVANT et al., 2006; GOMES et al., 2001), o crescimento bacteriano de um gênero no seu ambiente natural, difere profundamente das células da mesma cepa, quando este é induzido em condições de laboratório (COSTERTON et al., 1987). Essas diferenças são determinadas pelas variações de fatores ambientais, tais como: nutrientes, pH, temperatura, superfície e fluxo de saliva, os quais não são encontrados em biofilmes desenvolvidos em condições *in vitro* (LORIAN et al., 1985; MARSH; BRADSHAW, 1997).

Além disso, mono infecções raramente acontecem na natureza. A cavidade oral não é uma exceção, porque nela se apresentam associações dinâmicas de mais de 500 espécies bacterinas, estas associações são difíceis de simular em condições *in vitro* (MOORE; MOORE, 1994). Da mesma forma, o biofilme do canal radicular esta conformado por uma ampla variedade de espécies bacterianas (CHAVEZ DE PAZ, 2007). Assim, a patogenicidade das co-agregações biofílmicas multi espécie é muito maior em comparação à encontrada nos biofilmes uni espécie (OCHIAI et al., 1993). Em consequência, a eficácia dos antimicrobianos, poderia ser determinada pelas espécies que habitam em um determinado biofilme (ELIAS; BANIN, 2012).

Por outro lado, neste estudo foi avaliada a concentração, tempo de contato, temperatura e pH do NaOCl, porque a capacidade antibacteriana e de dissolução desta solução é dependente destes fatores (CLEGG et al., 2006; DEL CARPIO-PEROCHENA et al., 2011; MERCADE et al., 2009; MOORER; WESSELINK, 1982; SIRTES et al., 2005; STOJICIC et al., 2010).

Embora a quitosana seja usada em áreas como a biotecnologia, indústria de alimentos e farmacêutica, entre outras (SINGLA; CHAWLA, 2001), sua aplicação na Odontologia ainda é limitada, no entanto os estudos sobre o tema parecem ser promissores (DASILVA et al., 2013; KISHEN et al., 2008; SILVA, S.S. et al., 2013).

Além disso, neste estudo foram escolhidas as CNPs porque são sintetizadas a partir de uma fonte renovável e abundante na natureza, o qual representa uma grande vantagem sobre as outras nanopartículas, devido a que estas vantagens fazem deste polímero, uma alternativa econômica e aplicável para o bem-estar de grande quantidades de pessoas (CRINI; BADOT, 2008; FELT; BURI; GURNY, 1998).

6.2 DOS RESULTADOS

Da variação de temperatura do NaOCl

No presente estudo, todas as soluções em 22°C ou 37°C foram efetivas na dissolução de biofilme sem diferenças estatísticas entre elas. Estes resultados são similares aos encontrados em um estudo previamente publicado pelo autor (DEL CARPIO-PEROCHENA et al., 2011), onde foi observado que a capacidade de dissolução do NaOCl a 1% e 2.5% a temperatura ambiente (22°C) sobre biofilmes multi-espécie não mostrou diferenças estatísticas quando o tempo de exposição foi de 5 e 15 minutos. Estes resultados podem ser explicados pelas interações presentes nos biofilmes polimicrobianos, entre as quais, o sinergismo bacteriano exerce um papel importante, já que ele desenvolve fenótipos favoráveis como a formação biofílmica por co-agregação, cooperação metabólica entre espécies e incremento da resistência aos agentes antimicrobianos. Estas interações não são desenvolvidas em biofilmes mono-espécie (ELIAS; BANIN, 2012).

Embora, no presente estudo não foram encontradas diferenças estatísticas entre os grupos, vale ressaltar que o NaOCl a 2.5% durante 20 minutos, mostrou os valores mais altos de redução de biomassa e efeito antibacteriano. Esse resultado reforça a relação diretamente proporcional entre o tempo de exposição do NaOCl e a dissolução de matéria orgânica (CLEGG et al., 2006; DEL CARPIO-PEROCHENA et al., 2011; STOJICIC et al., 2010). De qualquer forma, períodos de exposição de 15, 20 e 30 minutos parecem ser insuficientes para eliminar ou dissolver completamente as bactérias e o biofilme respectivamente (DEL CARPIO-PEROCHENA et al., 2011; RETAMOZO et al., 2010)

Em adição, foi observado que a capacidade de dissolução do NaOCl a 1% em 37°C por 5 e 20 minutos não foi significativamente diferente que ao exercido pelo

NaOCl a 2.5% em 22°C nos mesmos tempos de exposição. Estes achados sugerem que o aquecimento da solução a 37°C não melhora a sua capacidade para dissolver matéria orgânica

Previas publicações, analisaram o efeito antibacteriano do NaOCl em diferentes temperaturas sobre biofilmes uni-espécie (CUNNINGHAM; JOSEPH, 1980; SIRTES et al., 2005). Esses estudos mostraram que o aumento da temperatura do NaOCl melhorou seu efeito bactericida. Em contraste com este estudo, onde foi observado que o efeito antibacteriano do NaOCl foi mais dependente da sua concentração e tempo de contato do que da temperatura da solução. Estes achados podem ser explicados pelo sinergismo bacteriano encontrado unicamente nos biofilmes multi- espécies (ELIAS; BANIN, 2012). (ver paragrafo 1 da discussão dos resultados). É importante notar que, os grupos de NaOCl a 1% durante 5 minutos, sem importar sua temperatura, mostraram percentagens de viabilidade celular similares aos do grupo controle.

No referente à reativação bacteriana, no presente estudo, não foram encontradas diferenças estatísticas entre os grupos de NaOCl a 22°C e suas respectivas revitalizações. A mesma situação se repetiu nos grupos de NaOCl a 37°C. Isto pareceria ser contraditório, dado que em todos os grupos foram encontrados valores variáveis de viabilidade bacteriana, mas a taxa de crescimento lento das bactérias dentro de um biofilme, não é necessariamente devido à limitação de nutrientes. De fato, essa desaceleração da reprodução bacteriana, também pode ser uma resposta às condições de estresse. Esta condição causa mudanças fisiológicas que protegem a bactéria do efeito das mudanças da temperatura e pH proporcionando uma maior resistência aos agentes antimicrobianos (BROWN; BARKER, 1999; MAH; O'TOOLE, 2001). Adicionalmente, Chavez de Paz *et al.* (CHAVEZ DE PAZ; HAMILTON; SVENSATER, 2008), mostraram que biofilmes de *S. anginosus*, foram capazes de recuperar 78% da atividade desidrogenase e 61% da sua atividade esterase, além de aumentar 35% da sua biomassa apos 72 horas de reativação. Todavia, Shen *et al.* (2010), usando a técnica de coloração Live/Dead, encontraram que o biofilme tomou 4 semanas para atingir 75% de crescimento bacteriano, percentagem similar ao crescimento bacteriano sobre condições ricas em nutrientes durante 3 semanas. Considerando estes resultados, é possível que 24 horas de reativação, seja um tempo insuficiente para que o biofilme mude seu “metabolismo de estresse” para um metabolismo de “abundancia

nutricional". Em consequência, as bactérias dentro do biofilme permanecem em fase estacionária.

Da variação do pH do NaOCl

Prévios estudos *in vitro* têm demonstrado uma significativa capacidade antibacteriana e solvente do NaOCl (ANDERSEN et al., 1992; OLIVEIRA et al., 2007; SIQUEIRA et al., 1997; TURKUN; CENGIZ, 1997). No entanto, testar a eficácia da solução sobre biofilmes formados *in situ* poderia evidenciar uma forte correlação com as condições *in vivo* já que a lista de bactérias que sobrevivem ao tratamento do canal radicular ou estresse alcalino inclui diversas espécies de estreptococos e bacilos gram positivos (CHAVEZ DE PAZ, 2007). Além disso, a patogenicidade dos biofilmes multi-espécie é maior que os de espécie única, assim a eficácia dos antimicrobianos é afetada pelas espécies bacterianas que habitam no biofilme (ELIAS; BANIN, 2012).

Zehnder *et al.*, (2005) demonstraram que a combinação do NaOCl com ácido acético resulta na ausência de cloro disponível após o primeiro minuto de preparação. Isso é devido à evaporação do cloro na forma de gás durante a interação das substâncias (BAUMGARTNER; IBAY, 1987; MERCADE et al., 2009). Portanto, se estima que o nível de cloro pode diminuir ou se tornar ausente após o primeiro minuto de preparação, causando interferências nos resultados dos estudos. Continuando com este enunciado, é entendível que as soluções deveriam ser levadas diretamente para dentro do canal radicular (cl clinicamente impraticável), ao invés de serem preparadas antes, para evitar uma potencial perda de cloro durante o primeiro minuto. Mas, somente um minuto de interação entre as soluções acidificadas e a flora bacteriana do sistema de canais radiculares não é tempo suficiente para eliminar as bactérias ou dissolver matéria orgânica (DEL CARPIO-PEROCHENA et al., 2011; MERCADE et al., 2009). Assim, para evitar mudanças no pH das soluções testadas e consequentemente preservar o conteúdo de cloro, foram usadas substâncias tampão para manter o pH estabilizado por longo tempo.

É bastante conhecido que a capacidade antibacteriana e de dissolução do NaOCl é diretamente proporcional à sua concentração, tempo de exposição, temperatura e renovação da solução (ABOU-RASS; OGLESBY, 1981; CUNNINGHAM; BALEKJIAN, 1980; CUNNINGHAM; JOSEPH, 1980; DEL CARPIO-

PEROCHENA et al., 2011; HAND; SMITH; HARRISON, 1978; MOORER; WESSELINK, 1982; SIRTES et al., 2005). No entanto, a efetividade da acidificação do NaOCl para eliminar bactérias ou remover matéria orgânica foi raramente investigado (CHRISTENSEN; MCNEAL; ELEAZER, 2008; MERCADE et al., 2009). A limitada informação a respeito do tema, sugere que a diminuição do pH do NaOCl intensifica sua atividade antimicrobiana (SIQUEIRA et al., 1997) mas sua ação dissolvente é mais dependente de outros fatores tais como elevadas concentrações e tempos de contato que do pH ácido da solução (CHRISTENSEN; MCNEAL; ELEAZER, 2008).

No presente estudo foi observado que altas concentrações de NaOCl alcalino foram capazes de dissolver grande quantidade de matéria orgânica. Nossos resultados estão em concordância com os achados descritos em prévias publicações (BLOOMFIELD; MILES, 1979; CLEGG et al., 2006; DEL CARPIO-PEROCHENA et al., 2011; HARRISON; HAND, 1981; SPANO et al., 2001), onde o poder de dissolução do NaOCl foi proporcional à concentração da solução inalterada. Além disso, os resultados deste estudo mostraram que, embora a maioria dos grupos experimentais fossem capazes de dissolver matéria orgânica sem diferenças estatísticas entre eles (exceto NaOCl a 1%-pH5), a capacidade de dissolução foi proporcional à concentração e pH do NaOCl (CHRISTENSEN; MCNEAL; ELEAZER, 2008). Isto quer dizer que o NaOCl a 2.5%-pH12 foi o mais efetivo na remoção do biofilme, enquanto que o NaOCl a 1%-pH5 foi o pior (sem mostrar diferenças com o grupo controle). Os achados mencionados acima podem ser explicados devido às reações de saponificação e neutralização, as quais são consequência da interação entre o hidróxido de sódio e a matéria orgânica, resultando numa diminuição do pH da solução (ESTRELA et al., 2002). Elevadas concentrações do NaOCl contêm altos níveis do íon hidroxila, causando uma baixa acidificação da solução (SPANO et al., 2001). Todavia, quando o pH do NaOCl atinge valores próximos ou abaixo do neutro, a formação de HOCl é incrementada e consequentemente a velocidade de dissolução é reduzida (ROSSI-FEDELE et al., 2011; SPANO et al., 2001).

A respeito do efeito antibacteriano, os resultados deste estudo sugerem que a acidificação do NaOCl foi diretamente proporcional a sua capacidade antibacteriana e inversamente proporcional para dissolver matéria orgânica. No entanto, a concentração da solução é também um fator determinante na eliminação bacteriana (DEL CARPIO-PEROCHENA et al., 2011; ZEHNDER et al., 2002), esta afirmação

guarda concordância com nossos resultados, onde foi observado que NaOCl a 1%-pH12 não foi capaz de reduzir significativamente a percentagem de células viáveis, mas quando a concentração da solução foi incrementada a 2.5%-pH12, a viabilidade bacteriana foi marcadamente afetada. No presente estudo, os valores mais baixos de viabilidade celular foram encontrados nos grupos de NaOCl a 2.5% em pH ácido. Estes resultados estão de acordo com Mercade *et al.*, (2009) que mostraram que a atividade bactericida do NaOCl a 4.2%-pH12 contra *E. faecalis* foi melhorada quando a solução foi acidificada a pH 7.5 e 6.5. Camps *et al.*, (2009) descreveram resultados similares usando NaOCl a 2.5% ajustado a pH 7. Os achados dos estudos mencionados acima são devido à diminuição do pH do NaOCl, o qual incrementa a concentração do HOCl dissociado, e consequentemente, sua efetividade antimicrobiana (KUROIWA *et al.*, 2003). O HOCl é capaz de penetrar a membrana celular bacteriana devido a sua estrutura molecular (similar à água) e a perda de sua carga elétrica (GUERREIRO-TANOMARU *et al.*, 2011).

Em contraste, Zehnder *et al.*, (2002) encontraram que a diminuição do pH do NaOCl a 0.5% e pH 9 não melhorou sua capacidade antibacteriana, mas é importante mencionar que a concentração do HOCl no NaOCl em pH 7.5 é duas vezes mais alta que em pH 9 (CAMPS *et al.*, 2009), portanto o efeito antibacteriano do NaOCl deveria ser melhorado pelo fato que ele mostra melhor atividade antibacteriana em pH próximo a 5 (HUGO WB; RUSSELL A, 1983).

Do efeito quelante e antibacteriano das CNPs

A capacidade quelante da quitosana no canal radicular tem sido acessada por poucos estudos, os quais mostraram que a irrigação dos canais radiculares durante 3 minutos com soluções a base deste biopolímero removeram eficientemente a lama dentinária (SILVA *et al.*, 2013; SILVA *et al.*, 2012). Esses resultados tem concordância com os obtidos no presente estudo, onde a irrigação final com CNPs removeu com eficácia a parte inorgânica da dentina. Embora, todos os grupos experimentais fossem efetivos na remoção da lama dentinária, o uso de CNPs após irrigação com NaOCl é aconselhável, devido a habilidade das CNPs para interferir com a adesão bacteriana e formação inicial de biofilme sobre dentina (KISHEN *et al.*, 2008). Isto representa uma importante vantagem sobre a aplicação de EDTA, o qual possui efeito quelante similar.

O efeito quelante das CNPs e o EDTA podem causar desmineralização da dentina (SILVA et al 2013). No entanto, um estudo prévio tem mostrado que quando a quitosana cobre a superfície dentinária, tem potencial de remineralizar a dentina desmineralizada (XU et al., 2011). Os resultados do presente estudo sugerem que o efeito quelante da irrigação com CNPs seguido de EDTA a 17% é similar ao efeito causado pelas nanopartículas utilizadas independentemente. Isto é porque a capacidade quelante das matrizes poliméricas da quitosana é mantida quando estas são modificadas com a imobilização química de EDTA (INOUE; YOSHIZUKA; OHTO, 1999). É importante mencionar que os tempos de exposição das soluções quelantes sobre dentina nos grupos NaOCl-EDTA-CNPs foram 6 minutos (3 minutos por agente), o qual poderia incrementar a possibilidade de erosão peritubular.

O mecanismo de quelação da quitosana sobre dentina não esta totalmente entendido. No entanto, este biopolímero bioativo é amplamente usado na indústria como um agente quelante para absorver metais pesados da águas servidas (BASSI; PRASHER; SIMPSON, 1999). Duas teorias têm sido usadas para explicar o mecanismo de quelação da quitosana. 1) O modelo da ponte o qual estabelece que dois ou mais grupos amino da quitosana se ligam ao mesmo íon metálico (BLAIR; HO, 1981). 2) O modelo do pendente o qual sugere que somente um grupo amino é utilizado na ligação, e o íon metálico é ligado ao grupo amino como um pendente (VOLD et al., 2003). Qualquer dos dois mecanismos pode ser responsável pela quelação do íon cálcio na dentina, resultando na redução da matéria orgânica da lama dentinária (PIMENTA et al., 2012).

Neste estudo, o volume bacteriano e a viabilidade celular foram maiores quando as amostras foram irrigadas com NaOCl-EDTA. O EDTA tem sido reportado como um agente antibacteriano fraco que geralmente possui um efeito quase nulo contra bactérias gram-positivas (GRAY; WILKINSO SG, 1965). Mas este ácido apresenta seletividade por bactérias gram-negativas, desestabilizando a sua membrana celular e causando liberação de polissacarídeo. Em contraste, os biofilmes formados após tratamento com NaOCl-EDTA-CNPs e NaOCl-CNPs foram significativamente menores que nos grupos controle e NaOCl-EDTA. Esses resultados corroboram a habilidade da quitosana para interferir com a adesão bacteriana (KISHEN et al., 2008) e consequentemente impedir a formação de micro-colônias. O mecanismo antibacteriano da quitosana tem sido atribuído a sua natureza policatiónica que interatua com a superfície da bactéria carregada

negativamente, alterando sua permeabilidade celular e causando vazamento dos componentes intracelulares (RABEA et al., 2003; YOUNG; KOHLE; KAUSS, 1982).

A utilização de tiosulfato de sódio para inativar o efeito residual do NaOCl não interferiu com a ação das soluções experimentais sobre a superfície dentinária e biofilmes bacterianos. Grande *et al.*, (2006) mostraram que a reação entre o NaOCl e o EDTA conduz a uma lenta, mas progressiva degradação do ácido. No entanto, em períodos de tempo clinicamente realísticos, as propriedades do EDTA não são afetadas. No referente à quitosana, sabe-se que sua estrutura e peso molecular são afetados pela oxidação causada pelo NaOCl (YOO et al., 2005). De qualquer forma, é de suma importância evidências mais detalhadas sobre a interação do NaOCl e a quitosana aplicadas na desinfecção do sistema de canais radiculares.

7 *Conclusões*

7 CONCLUSÕES

1. O aquecimento do NaOCl a 37°C não melhora sua capacidade de dissolução; o seu efeito antibacteriano é mais dependente da sua concentração e tempo de contato do que da sua temperatura.
 2. A acidificação do NaOCl favorece a sua capacidade antibacteriana, no entanto, o uso da solução em pH alcalino é necessário para melhorar seu efeito de dissolução sobre matéria orgânica.
 3. Embora exista uma relação inversa entre a dissolução e o efeito antibacteriano do NaOCl acidificado, esses fatores não são determinantes quando a solução é usada em altas concentrações e tempos de contato.
 4. O NaOCl alcalino deveria de ser usado inicialmente com a finalidade de dissolver matéria orgânica, no entanto a solução em pH ácido poderia ser útil para tratar o biofilme remanescente por apresentar efeito antibacteriano potencializado.
 5. O biofilme tratado com a NaOCl não é capaz de atingir níveis significantes de biomassa e viabilidade celular após 24 horas de revitalização, exceto quando a solução é usada em baixas concentrações e tempos de contato.
 6. As CNPs apresentam um grande potencial para serem usadas como um irrigante final na terapia endodôntica e poderiam ser uma alternativa útil para substituir ao EDTA devido a suas propriedades quelantes e antibacterianas.
-

Referências

REFERÊNCIAS

Abou-Rass M, Oglesby SW. The effects of temperature, concentration, and tissue type on the solvent ability of sodium hypochlorite. *J Endod.* 1981;7(8):376-7.

Al-Ahmad A, Ameen H, Pelz K, Karygianni L, Wittmer A, Anderson AC, et al. Antibiotic resistance and capacity for biofilm formation of different bacteria isolated from endodontic infections associated with root-filled teeth. *J Endod.* 2014;40(2):223-30.

Al-Ahmad A, Muller N, Wiedmann-Al-Ahmad M, Sava I, Hubner J, Follo M, et al. Endodontic and salivary isolates of *Enterococcus faecalis* integrate into biofilm from human salivary bacteria cultivated in vitro. *J Endod.* 2009;35(7):986-91.

Andersen M, Lund A, Andreasen JO, Andreasen FM. In vitro solubility of human pulp tissue in calcium hydroxide and sodium hypochlorite. *Endod Dent Traumatol.* 1992;8(3):104-8.

Auschill TM, Hein N, Hellwig E, Follo M, Sculean A, Arweiler NB. Effect of two antimicrobial agents on early in situ biofilm formation. *J Clin Periodontol.* 2005;32(2):147-52.

Baffone W, Sorgente G, Campana R, Patrone V, Sisti D, Falcioni T. Comparative effect of chlorhexidine and some mouthrinses on bacterial biofilm formation on titanium surface. *Curr Microbiol.* 2011;62(2):445-51.

Barnhart BD, Chuang A, Lucca JJ, Roberts S, Liewehr F, Joyce AP. An in vitro evaluation of the cytotoxicity of various endodontic irrigants on human gingival fibroblasts. *J Endod.* 2005;31(8):613-5.

Bassi R, Prasher SO, Simpson BK. Effects of organic acids on the adsorption of heavy metal ions by chitosan flakes. *J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng.* 1999;34(2):289-94.

Baumgartner JC, Ibay AC. The chemical reactions of irrigants used for root canal debridement. *J Endod.* 1987;13(2):47-51.

Blair HS, Ho TC. Studies in the Adsorption and Diffusion of Ions in Chitosan. *J Chem Technol Biotechnol.* 1981;31(1):6-10.

Bloomfield SF, Miles GA. The antibacterial properties of sodium dichloroisocyanurate and sodium hypochlorite formulations. *J Appl Bacteriol.* 1979;46(1):65-73.

Brandle N, Zehnder M, Weiger R, Waltimo T. Impact of growth conditions on susceptibility of five microbial species to alkaline stress. *J Endod.* 2008;34(5):579-82.

Brown MR, Barker J. Unexplored reservoirs of pathogenic bacteria: protozoa and biofilms. *Trends Microbiol.* 1999;7(1):46-50.

Brundin M, Figdor D, Sundqvist G, Sjogren U. Starvation response and growth in serum of *Fusobacterium nucleatum*, *Peptostreptococcus anaerobius*, *Prevotella intermedia*, and *Pseudoramibacter alactolyticus*. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2009;108(1):129-34.

Bryce G, O'Donnell D, Ready D, Ng YL, Pratten J, Gulabivala K. Contemporary root canal irrigants are able to disrupt and eradicate single- and dual-species biofilms. *J Endod.* 2009;35(9):1243-8.

Budiraharjo R, Neoh KG, Kang ET, Kishen A. Bioactivity of novel carboxymethyl chitosan scaffold incorporating MTA in a tooth model. *Int Endod J.* 2010;43(10):930-9.

Calamari SE, Bojanich MA, Barembaum SR, Berdicevski N, Azcurra AI. Antifungal and post-antifungal effects of chlorhexidine, fluconazole, chitosan and its combinations on *Candida albicans*. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2011;16(1):e23-8.

Camara AC, de Albuquerque MM, Aguiar CM, de Barros Correia AC. In vitro antimicrobial activity of 0.5%, 1%, and 2.5% sodium hypochlorite in root canals instrumented with the ProTaper Universal system. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2009;108(2):e55-61.

Camps J, Pommel L, Aubut V, Verhille B, Satoshi F, Lascola B, et al. Shelf life, dissolving action, and antibacterial activity of a neutralized 2.5% sodium hypochlorite solution. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2009;108(2):e66-73.

Carr GB, Schwartz RS, Schaudinn C, Gorur A, Costerton JW. Ultrastructural examination of failed molar retreatment with secondary apical periodontitis: an examination of endodontic biofilms in an endodontic retreatment failure. *J Endod.* 2009;35(9):1303-9.

Chai WL, Hamimah H, Cheng SC, Sallam AA, Abdullah M. Susceptibility of *Enterococcus faecalis* biofilm to antibiotics and calcium hydroxide. *J Oral Sci.* 2007;49(2):161-6.

Chavez de Paz LE, Bergenholtz G, Dahlen G, Svensater G. Response to alkaline stress by root canal bacteria in biofilms. *Int Endod J*. 2007;40(5):344-55.

Chavez de Paz LE, Bergenholtz G, Svensater G. The effects of antimicrobials on endodontic biofilm bacteria. *J Endod*. 2010;36(1):70-7.

Chavez de Paz LE, Hamilton IR, Svensater G. Oral bacteria in biofilms exhibit slow reactivation from nutrient deprivation. *Microbiology*. 2008;154(Pt 7):1927-38.

Chavez de Paz LE. Redefining the persistent infection in root canals: possible role of biofilm communities. *J Endod*. 2007;33(6):652-62.

Christensen CE, McNeal SF, Eleazer P. Effect of lowering the pH of sodium hypochlorite on dissolving tissue in vitro. *J Endod*. 2008;34(4):449-52.

Clegg MS, Vertucci FJ, Walker C, Belanger M, Britto LR. The effect of exposure to irrigant solutions on apical dentin biofilms in vitro. *J Endod*. 2006;32(5):434-7.

Costerton JW, Cheng KJ, Geesey GG, Ladd TI, Nickel JC, Dasgupta M, et al. Bacterial biofilms in nature and disease. *Annu Rev Microbiol*. 1987;41:435-64.

Crini G, Badot PM. Application of chitosan, a natural aminopolysaccharide, for dye removal from aqueous solutions by adsorption processes using batch studies: A review of recent literature. *Prog Polym Sci*. 2008;33(4):399-447.

Cunningham WT, Balekjian AY. Effect of temperature on collagen-dissolving ability of sodium hypochlorite endodontic irrigant. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1980;49(2):175-7.

Cunningham WT, Joseph SW. Effect of temperature on the bactericidal action of sodium hypochlorite endodontic irrigant. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1980;50(6):569-71.

Da Silva L, Finer Y, Friedman S, Basrani B, Kishen A. Biofilm formation within the interface of bovine root dentin treated with conjugated chitosan and sealer containing chitosan nanoparticles. *J Endod*. 2013;39(2):249-53.

De Moura MR, Aouada F, Avena-Bustillos RJ, McHugh TH, Krochta JM, Mattoso LHC. Improved barrier and mechanical properties of novel Hydroxypropyl methylcellulose edible films with chitosan/tripolyphosphate nanoparticles. *Food Eng*. 2009;92(4):448-53.

Del Carpio-Perochena AE, Bramante CM, Duarte MA, Cavenago BC, Villas-Boas MH, Graeff MS, et al. Biofilm dissolution and cleaning ability of different irrigant solutions on intraorally infected dentin. *J Endod*. 2011;37(8):1134-8.

Duggan JM, Sedgley CM. Biofilm formation of oral and endodontic *Enterococcus faecalis*. *J Endod*. 2007;33(7):815-8.

Dunavant TR, Regan JD, Glickman GN, Solomon ES, Honeyman AL. Comparative evaluation of endodontic irrigants against *Enterococcus faecalis* biofilms. *J Endod*. 2006;32(6):527-31.

Elias S, Banin E. Multi-species biofilms: living with friendly neighbors. *FEMS Microbiol Rev*. 2012;36(5):990-1004.

Elsaka S, Elnaghy A. Effect of addition of chitosan to self-etching primer: antibacterial activity and push-out bond strength to radicular dentin. *J Biomed Res*. 2012;26(4):288-94.

Estrela C, Estrela CR, Barbin EL, Spano JC, Marchesan MA, Pecora JD. Mechanism of action of sodium hypochlorite. *Braz Dent J*. 2002;13(2):113-7.

Estrela C, Estrela CR, Decurcio DA, Hollanda AC, Silva JA. Antimicrobial efficacy of ozonated water, gaseous ozone, sodium hypochlorite and chlorhexidine in infected human root canals. *Int Endod J*. 2007;40(2):85-93.

Felt O, Buri P, Gurny R. Chitosan: a unique polysaccharide for drug delivery. *Drug Dev Ind Pharm*. 1998;24(11):979-93.

Figdor D, Sundqvist G. A big role for the very small--understanding the endodontic microbial flora. *Aust Dent J*. 2007;52(1 Suppl):S38-51.

Garcez AS, Ribeiro MS, Tegos GP, Nunez SC, Jorge AO, Hamblin MR. Antimicrobial photodynamic therapy combined with conventional endodontic treatment to eliminate root canal biofilm infection. *Lasers Surg Med*. 2007;39(1):59-66.

George S, Kishen A, Song KP. The role of environmental changes on monospecies biofilm formation on root canal wall by *Enterococcus faecalis*. *J Endod*. 2005;31(12):867-72.

Giardino L, Ambu E, Savoldi E, Rimondini R, Cassanelli C, Debbia EA. Comparative evaluation of antimicrobial efficacy of sodium hypochlorite, MTAD, and Tetraclean against *Enterococcus faecalis* biofilm. *J Endod*. 2007;33(7):852-5.

Gomes BP, Ferraz CC, Vianna ME, Berber VB, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. In vitro antimicrobial activity of several concentrations of sodium hypochlorite and chlorhexidine gluconate in the elimination of *Enterococcus faecalis*. *Int Endod J*. 2001;34(6):424-8.

Grande NM, Plotino G, Falanga A, Pomponi M, Somma F. Interaction between EDTA and sodium hypochlorite: A nuclear magnetic resonance analysis. *J Endod*. 2006;32(5):460-4.

Gray GW, Wilkinso SG. Effect of Ethylenediaminetetra-Acetic Acid on Cell Walls of Some Gram-Negative Bacteria. *J Gen Microbiol*. 1965;39(3):385-99.

Guerreiro-Tanomaru JM, Morgental RD, Flumignan DL, Gasparini F, Oliveira JE, Tanomaru-Filho M. Evaluation of pH, available chlorine content, and antibacterial activity of endodontic irrigants and their combinations against *Enterococcus faecalis*. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2011;112(1):132-5.

Gulsahi K, Tirali RE, Cehreli SB, Karahan ZC, Uzunoglu E, Sabuncuoglu B. The effect of temperature and contact time of sodium hypochlorite on human roots infected with *Enterococcus faecalis* and *Candida albicans*. *Odontology*. 2014;102(1):36-41.

Hand RE, Smith ML, Harrison JW. Analysis of the effect of dilution on the necrotic tissue dissolution property of sodium hypochlorite. *J Endod*. 1978;4(2):60-4.

Harrison JW, Hand RE. The effect of dilution and organic matter on the anti-bacterial property of 5.25% sodium hypochlorite. *J Endod*. 1981;7(3):128-32.

Hope CK, Garton SG, Wang Q, Burnside G, Farrelly PJ. A direct comparison between extracted tooth and filter-membrane biofilm models of endodontic irrigation using *Enterococcus faecalis*. *Arch Microbiol*. 2010;192(9):775-81.

Hugo WB, Russell A. *Pharmaceutical microbiology*. Oxford:Blackwell Science;1983.

Huth KC, Quirling M, Maier S, Kamereck K, Alkhayer M, Paschos E, et al. Effectiveness of ozone against endodontopathogenic microorganisms in a root canal biofilm model. *Int Endod J*. 2009;42(1):3-13.

Ikinci G, Senel S, Akincibay H, Kas S, Ercis S, Wilson CG, et al. Effect of chitosan on a periodontal pathogen *Porphyromonas gingivalis*. *Int J Pharm*. 2002;235(1-2):121-7.

Inoue K, Yoshizuka K, Ohto K. Adsorptive separation of some metal ions by complexing agent types of chemically modified chitosan. *Anal Chim Acta*. 1999;388(1-2):209-18.

Jiang LM, Hoogenkamp MA, van der Sluis LW, Wesselink PR, Crielaard W, Deng DM. Resazurin metabolism assay for root canal disinfectant evaluation on dual-species biofilms. *J Endod*. 2011;37(1):31-5.

Johal S, Baumgartner JC, Marshall JG. Comparison of the antimicrobial efficacy of 1.3% NaOCl/BioPure MTAD to 5.25% NaOCl/15% EDTA for root canal irrigation. *J Endod*. 2007;33(1):48-51.

Takehashi S, Stanley HR, Fitzgerald RJ. The Effects of Surgical Exposures of Dental Pulp in Germ-Free and Conventional Laboratory Rats. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1965;20(3):340-9.

Kishen A, George S, Kumar R. Enterococcus faecalis-mediated biomineralized biofilm formation on root canal dentine in vitro. *J Biomed Mater Res A*. 2006;77(2):406-15.

Kishen A, Shi Z, Shrestha A, Neoh KG. An investigation on the antibacterial and antibiofilm efficacy of cationic nanoparticulates for root canal disinfection. *J Endod*. 2008;34(12):1515-20.

Kuroiwa K, Nakayama H, Kuwahara T, Tamagawa K, Hattori K, Murakami K, et al. Augmenting effect of acetic acid for acidification on bactericidal activity of hypochlorite solution. *Lett Appl Microbiol*. 2003;36(1):46-9.

Kvist T, Molander A, Dahlen G, Reit C. Microbiological evaluation of one- and two-visit endodontic treatment of teeth with apical periodontitis: a randomized, clinical trial. *J Endod*. 2004;30(8):572-6.

Lorian V, Zak O, Suter J, Bruecher C. Staphylococci, in vitro and in vivo. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 1985;3(5):433-44.

Mah TF, O'Toole GA. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends Microbiol*. 2001;9(1):34-9.

Maliza A. Desinfecção intratubular de dentes bovinos por soluções de hipoclorito de sódio acidificadas. 2013. 119 p. Dissertação (Mestrado em ciências odontológicas aplicadas Área de concentração: Endodontia) - - Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, Bauru, 2013.

Manzur A, Gonzalez AM, Pozos A, Silva-Herzog D, Friedman S. Bacterial quantification in teeth with apical periodontitis related to instrumentation and different intracanal medications: a randomized clinical trial. *J Endod*. 2007;33(2):114-8.

Marsh PD, Bradshaw DJ. Physiological approaches to the control of oral biofilms. *Adv Dent Res*. 1997;11(1):176-85.

Meire MA, Coenye T, Nelis HJ, De Moor RJ. Evaluation of Nd:YAG and Er:YAG irradiation, antibacterial photodynamic therapy and sodium hypochlorite treatment on *Enterococcus faecalis* biofilms. *Int Endod J*. 2012;45(5):482-91.

Mercade M, Duran-Sindreu F, Kuttler S, Roig M, Durany N. Antimicrobial efficacy of 4.2% sodium hypochlorite adjusted to pH 12, 7.5, and 6.5 in infected human root canals. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2009;107(2):295-8.

Moller AJ, Fabricius L, Dahlen G, Ohman AE, Heyden G. Influence on periapical tissues of indigenous oral bacteria and necrotic pulp tissue in monkeys. *Scand J Dent Res*. 1981;89(6):475-84.

Moore WE, Moore LV. The bacteria of periodontal diseases. *Periodontol* 2000. 1994;5:66-77.

Moorer WR, Wesselink PR. Factors promoting the tissue dissolving capability of sodium hypochlorite. *Int Endod J*. 1982;15(4):187-96.

Nair PN, Henry S, Cano V, Vera J. Microbial status of apical root canal system of human mandibular first molars with primary apical periodontitis after "one-visit" endodontic treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2005;99(2):231-52.

Nascimento MM, Browngardt C, Xiaohui X, Klepac-Ceraj V, Paster BJ, Burne RA. The effect of arginine on oral biofilm communities. *Mol Oral Microbiol*. 2014;29(1):45-54.

No HK, Park NY, Lee SH, Meyers SP. Antibacterial activity of chitosans and chitosan oligomers with different molecular weights. *Int J Food Microbiol*. 2002;74(1-2):65-72.

Ochiai K, Kurita-Ochiai T, Kamino Y, Ikeda T. Effect of co-aggregation on the pathogenicity of oral bacteria. *J Med Microbiol*. 1993;39(3):183-90.

Oliveira DP, Barbizam JV, Trope M, Teixeira FB. In vitro antibacterial efficacy of endodontic irrigants against *Enterococcus faecalis*. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2007;103(5):702-6.

Ordinola-Zapata R, Bramante CM, Aprecio RM, Handysides R, Jaramillo DE. Biofilm removal by 6% sodium hypochlorite activated by different irrigation techniques. *Int Endod J*. 2014;47(7):659-66.

Ordinola-Zapata R, Bramante CM, Cavenago B, Graeff MS, Gomes de Moraes I, Marciano M, et al. Antimicrobial effect of endodontic solutions used as final irrigants on a dentine biofilm model. *Int Endod J*. 2012;45(2):162-8.

Ozdemir HO, Buzoglu HD, Calt S, Stabholz A, Steinberg D. Effect of ethylenediaminetetraacetic acid and sodium hypochlorite irrigation on *Enterococcus faecalis* biofilm colonization in young and old human root canal dentin: in vitro study. *J Endod*. 2010;36(5):842-6.

Ozok AR, Wu MK, Luppens SB, Wesselink PR. Comparison of growth and susceptibility to sodium hypochlorite of mono- and dual-species biofilms of *Fusobacterium nucleatum* and *Peptostreptococcus (micromonas) micros*. *J Endod*. 2007;33(7):819-22.

Pascon FM, Kantovitz KR, Sacramento PA, Nobre-dos-Santos M, Puppim-Rontani RM. Effect of sodium hypochlorite on dentine mechanical properties. A review. *J Dent*. 2009;37(12):903-8.

Pereira CA, Romeiro RL, Costa AC, Machado AK, Junqueira JC, Jorge AO. Susceptibility of *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*, and *Streptococcus mutans* biofilms to photodynamic inactivation: an in vitro study. *Lasers Med Sci*. 2011;26(3):341-8.

Peters OA, Laib A, Gohring TN, Barbakow F. Changes in root canal geometry after preparation assessed by high-resolution computed tomography. *J Endod*. 2001;27(1):1-6.

Pimenta JA, Zaparolli D, Pecora JD, Cruz-Filho AM. Chitosan: effect of a new chelating agent on the microhardness of root dentin. *Braz Dent J*. 2012;23(3):212-7.

Prabhakar J, Senthilkumar M, Priya MS, Mahalakshmi K, Sehgal PK, Sukumaran VG. Evaluation of antimicrobial efficacy of herbal alternatives (Triphala and green tea polyphenols), MTAD, and 5% sodium hypochlorite against *Enterococcus faecalis* biofilm formed on tooth substrate: an in vitro study. *J Endod*. 2010;36(1):83-6.

Qing Y, Akita Y, Kawano S, Kawazu S, Yoshida T, Sekine I. Cleaning efficacy and dentin micro-hardness after root canal irrigation with a strong acid electrolytic water. *J Endod.* 2006;32(11):1102-6.

Rabea EI, Badawy ME, Stevens CV, Smagghe G, Steurbaut W. Chitosan as antimicrobial agent: applications and mode of action. *Biomacromolecules.* 2003;4(6):1457-65.

Retamozo B, Shabahang S, Johnson N, Aprecio RM, Torabinejad M. Minimum contact time and concentration of sodium hypochlorite required to eliminate *Enterococcus faecalis*. *J Endod.* 2010;36(3):520-3.

Ricucci D, Siqueira JF, Jr., Bate AL, Pitt Ford TR. Histologic investigation of root canal-treated teeth with apical periodontitis: a retrospective study from twenty-four patients. *J Endod.* 2009;35(4):493-502.

Rocha CT, Rossi MA, Leonardo MR, Rocha LB, Nelson-Filho P, Silva LA. Biofilm on the apical region of roots in primary teeth with vital and necrotic pulps with or without radiographically evident apical pathosis. *Int Endod J.* 2008;41(8):664-9.

Rossi-Fedele G, De Figueiredo JA. Use of a bottle warmer to increase 4% sodium hypochlorite tissue dissolution ability on bovine pulp. *Aust Endod J.* 2008;34(1):39-42.

Rossi-Fedele G, Guastalli AR, Dogramaci EJ, Steier L, De Figueiredo JA. Influence of pH changes on chlorine-containing endodontic irrigating solutions. *Int Endod J.* 2011;44(9):792-9.

Sano H, Shibasaki K, Matsukubo T, Takaesu Y. Comparison of the activity of four chitosan derivatives in reducing initial adherence of oral bacteria onto tooth surfaces. *Bull Tokyo Dent Coll.* 2001;42(4):243-9.

Schaudinn C, Carr G, Gorur A, Jaramillo D, Costerton JW, Webster P. Imaging of endodontic biofilms by combined microscopy (FISH/cLSM - SEM). *J Microsc.* 2009;235(2):124-7.

Sena NT, Gomes BP, Vianna ME, Berber VB, Zaia AA, Ferraz CC, et al. In vitro antimicrobial activity of sodium hypochlorite and chlorhexidine against selected single-species biofilms. *Int Endod J.* 2006;39(11):878-85.

Shen Y, Stojicic S, Haapasalo M. Bacterial viability in starved and revitalized biofilms: comparison of viability staining and direct culture. *J Endod.* 2010;36(11):1820-3.

Shrestha A, Friedman S, Kishen A. Photodynamically crosslinked and chitosan-incorporated dentin collagen. *J Dent Res*. 2011;90(11):1346-51.

Shrestha A, Hamblin MR, Kishen A. Characterization of a conjugate between Rose Bengal and chitosan for targeted antibiofilm and tissue stabilization effects as a potential treatment of infected dentin. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012;56(9):4876-84.

Silva PV, Guedes DF, Nakadi FV, Pecora JD, Cruz-Filho AM. Chitosan: a new solution for removal of smear layer after root canal instrumentation. *Int Endod J*. 2013;46(4):332-8.

Silva PV, Guedes DF, Pecora JD, da Cruz-Filho AM. Time-dependent effects of chitosan on dentin structures. *Braz Dent J*. 2012;23(4):357-61.

Silva SS, Caridade SG, Mano JF, Reis RL. Effect of crosslinking in chitosan/aloe vera-based membranes for biomedical applications. *Carbohydr Polym*. 2013;98(1):581-8.

Singla AK, Chawla M. Chitosan: some pharmaceutical and biological aspects--an update. *J Pharm Pharmacol*. 2001;53(8):1047-67.

Sinha VR, Singla AK, Wadhawan S, Kaushik R, Kumria R, Bansal K, et al. Chitosan microspheres as a potential carrier for drugs. *Int J Pharm*. 2004;274(1-2):1-33.

Siqueira JF, Jr., Machado AG, Silveira RM, Lopes HP, de Uzeda M. Evaluation of the effectiveness of sodium hypochlorite used with three irrigation methods in the elimination of *Enterococcus faecalis* from the root canal, in vitro. *Int Endod J*. 1997;30(4):279-82.

Siqueira JF, Jr., Magalhaes KM, Rocas IN. Bacterial reduction in infected root canals treated with 2.5% NaOCl as an irrigant and calcium hydroxide/camphorated paramonochlorophenol paste as an intracanal dressing. *J Endod*. 2007;33(6):667-72.

Siqueira JF, Jr., Paiva SS, Rocas IN. Reduction in the cultivable bacterial populations in infected root canals by a chlorhexidine-based antimicrobial protocol. *J Endod*. 2007;33(5):541-7.

Sirtes G, Waltimo T, Schaetzle M, Zehnder M. The effects of temperature on sodium hypochlorite short-term stability, pulp dissolution capacity, and antimicrobial efficacy. *J Endod*. 2005;31(9):669-71.

Sjogren U, Figdor D, Persson S, Sundqvist G. Influence of infection at the time of root filling on the outcome of endodontic treatment of teeth with apical periodontitis. *Int Endod J.* 1997;30(5):297-306.

Soares JA, Roque de Carvalho MA, Cunha Santos SM, Mendonca RM, Ribeiro-Sobrinho AP, Brito-Junior M, et al. Effectiveness of chemomechanical preparation with alternating use of sodium hypochlorite and EDTA in eliminating intracanal *Enterococcus faecalis* biofilm. *J Endod.* 2010;36(5):894-8.

Spano JC, Barbin EL, Santos TC, Guimaraes LF, Pecora JD. Solvent action of sodium hypochlorite on bovine pulp and physico-chemical properties of resulting liquid. *Braz Dent J.* 2001;12(3):154-7.

Standar K, Kreikemeyer B, Redanz S, Munter WL, Laue M, Podbielski A. Setup of an in vitro test system for basic studies on biofilm behavior of mixed-species cultures with dental and periodontal pathogens. *PLoS One.* 2010;5(10):e13135.

Stojicic S, Zivkovic S, Qian W, Zhang H, Haapasalo M. Tissue dissolution by sodium hypochlorite: effect of concentration, temperature, agitation, and surfactant. *J Endod.* 2010;36(9):1558-62.

Tanomaru JM, Leonardo MR, Tanomaru-Filho M, da Silva LA, Ito IY. Microbial distribution in the root canal system after periapical lesion induction using different methods. *Braz Dent J.* 2008;19(2):124-9.

Turkun M, Cengiz T. The effects of sodium hypochlorite and calcium hydroxide on tissue dissolution and root canal cleanliness. *Int Endod J.* 1997;30(5):335-42.

Virtej A, MacKenzie CR, Raab WH, Pfeffer K, Barthel CR. Determination of the performance of various root canal disinfection methods after in situ carriage. *J Endod.* 2007;33(8):926-9.

Vold IMN, Varum KM, Guibal E, Smidsrod O. Binding of ions to chitosan - selectivity studies. *Carbohydr Polym.* 2003;54(4):471-7.

Wang W, Tao R, Tong Z, Ding Y, Kuang R, Zhai S, et al. Effect of a novel antimicrobial peptide chrysophsin-1 on oral pathogens and *Streptococcus mutans* biofilms. *Peptides.* 2012;33(2):212-9.

Watson SP, Clements MO, Foster SJ. Characterization of the starvation-survival response of *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol.* 1998;180(7):1750-8.

Xu KD, McFeters GA, Stewart PS. Biofilm resistance to antimicrobial agents. *Microbiology*. 2000;146 (Pt 3):547-9.

Xu Z, Neoh KG, Lin CC, Kishen A. Biomimetic deposition of calcium phosphate minerals on the surface of partially demineralized dentine modified with phosphorylated chitosan. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2011;98(1):150-9.

Yap B, Zilm PS, Briggs N, Rogers AH, Cathro PC. The effect of sodium hypochlorite on *Enterococcus faecalis* when grown on dentine as a single- and multi-species biofilm. *Aust Endod J*. In press 2014.

Yoo SH, Lee JS, Park SY, Kim YS, Chang PS, Lee HG. Effects of selective oxidation of chitosan on physical and biological properties. *Int J Biol Macromol*. 2005;35(1-2):27-31.

Yoshida Y, Palmer RJ, Yang J, Kolenbrander PE, Cisar JO. Streptococcal receptor polysaccharides: recognition molecules for oral biofilm formation. *BMC Oral Health*. 2006;6 Suppl 1:S12.

Young DH, Kohle H, Kauss H. Effect of Chitosan on Membrane-Permeability of Suspension-Cultured Glycine-Max and Phaseolus-Vulgaris Cells. *Plant Physiol*. 1982;70(5):1449-54.

Zapata RO, Bramante CM, de Moraes IG, Bernardineli N, Gasparoto TH, Graeff MS, et al. Confocal laser scanning microscopy is appropriate to detect viability of *Enterococcus faecalis* in infected dentin. *J Endod*. 2008;34(10):1198-201.

Zehnder M, Kosicki D, Luder H, Sener B, Waltimo T. Tissue-dissolving capacity and antibacterial effect of buffered and unbuffered hypochlorite solutions. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2002;94(6):756-62.

Zehnder M, Schmidlin P, Sener B, Waltimo T. Chelation in root canal therapy reconsidered. *J Endod*. 2005;31(11):817-20.

Zijngel V, van Leeuwen MB, Degener JE, Abbas F, Thurnheer T, Gmur R, et al. Oral biofilm architecture on natural teeth. *PLoS One*. 2010;5(2):e9321.

Anexos

Anexo 1. Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da FOB-USP. **Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia de Bauru****Comitê de Ética em Pesquisa**

Processo nº 166/2011

Bauru, 1 de dezembro de 2011.

Senhor Professor,

O projeto de pesquisa encaminhado a este Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos, denominado "Efeito antibacteriano e de dissolução do hipoclorito de sódio em diferentes temperaturas e PH sobre biofilme oral formado in situ. Análise em três tipos de microscopia", de autoria de Aldo Enrique del Carpio Perochena, que será desenvolvido sob sua orientação, foi enviado ao relator para avaliação e apreciado em reunião realizada no dia 30 de novembro de 2011.

O CEP-FOB/USP considerou o projeto APROVADO lembrando que a condição de aprovação da pesquisa propriamente dita exige o que segue:

- que sejam encaminhados ao CEP-FOB/USP relatórios anuais sobre o andamento da pesquisa (parciais e finais), conforme o cronograma apresentado;
- que sejam notificados ao CEP-FOB/USP, com a devida justificativa, qualquer modificação na metodologia e/ou título e a inclusão ou exclusão de autores;
- na apresentação do relatório final, incluir todos os TCLEs e/ou termos de doação de dentes devidamente assinados e rubricados.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Flávio Augusto Cardoso de Faria
Coordenador

Prof. Dr. Clovis Monteirol Bramante
Docente do Departamento de Dentística, Endodontia e Materiais Odontológicos

Al. Dr. Octávio Pinheiro Brisolla, 9-75 – Bauru-SP – CEP 17012-101, – C.P. 73
e-mail: cep@fob.usp.br – Fone/FAX (0xx14) 3235-8356
<http://www.fob.usp.br>

Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia de Bauru

Comitê de Ética em Pesquisa

Proc. CEP nº 166/2011

Bauru, 5 de novembro de 2014.

Senhor Professor,

Em atenção à solicitação para alterações na pesquisa anteriormente denominada "*Efeito antibacteriano e de dissolução do hipoclorito de sódio em diferentes temperaturas e PH sobre biofilme oral formado in situ. Análise em três tipos de microscopia*", de autoria de Aldo Enrique Del Carpio Perochena, o relator emitiu parecer favorável, por não haver impedimentos éticos, quais sejam:

- ✓ Alteração do título para *EFEITO DAS NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANA E DA VARIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO, TEMPERATURA E pH DO HIPOCLORITO DE SÓDIO SOBRE BIOFILMES ORAIS FORMADOS IN SITU*,
- ✓ Uso das nanopartículas de quitosano para inibir o crescimento bacteriano.

Lembramos que ao final da pesquisa, os autores deverão enviar um relatório com os resultados obtidos, conforme orientações deste CEP, para análise e parecer.

Atenciosamente,

Profª Drª Izabel Regina Fischer Rubira de Bullen
Coordenadora

Prof. Dr. Clovis Monteiro Bramante

Docente do Departamento de Dentística, Endodontia e Materiais Odontológicos

Al. Dr. Octávio Pinheiro Brisolla, 9-75 – Bauru-SP – CEP 17012-901 – C.P. 73
e-mail: cep@fob.usp.br – Fone/FAX (0xx14) 3235-8356
<http://www.fob.usp.br>

Anexo 2. CLSM. Imagens representativas (40X) antes e apos tratamento das amostras com NaOCl em diferentes temperaturas. Imagens pré operatórias são mostradas em (A) e (G). O biofilme tratado com NaOCl à 1% por 5 minutos a 22°C e 37°C, pode ser visto em (B) e (H), respectivamente, onde uma considerável quantidade de biomassa e de células viáveis (verde) são evidenciadas. Áreas de dissolução são visíveis a 63X (C). A dissolução e a capacidade antibacteriana foi melhorada apos 20 minutos de exposição a NaOCl a 1% a 22°C (D) e 37°C (I). Imagens do biofilme irrigado com NaOCl a 2.5% durante 5 minutos 22°C e 37°C podem ser vistos em (E) e (J) respectivamente. O melhor efeito antibacteriano foi encontrado apos a irrigação com NaOCl a 2.5% por 20 minutos (F e K), sem importar a sua temperatura. O biofilme revitalizado apos ser tratado com NaOCl a 2.5% - 20 minutos - 37°C é observado em (L). Todas as barras representam 20 µm.

Anexo 3. CLSM. Imagens representativas (40X) antes e após tratamento das amostras com NaOCl em diferentes pH durante 5 MINUTOS. O biofilme pré operatório é mostrado em (A). O biofilme tratado com NaOCl a 1% em pH 5, pode ser visto em (B), onde se observa que tanto o biovolume como a viabilidade celular são altos. O biofilme exposto a NaOCl a 1% em pH 7 e 12 é mostrado em (C e D), respectivamente, onde uma considerável diminuição do volume bacteriano é visto, no entanto a viabilidade bacteriana é evidente. Em (E) é possível observar o biofilme tratado com NaOCl a 2.5% em pH 5, embora a dissolução de matéria orgânica é inexistente, a viabilidade celular é negativa. O NaOCl a 2.5% em pH 12 (F) foi capaz de reduzir o biovolume além de eliminar as bactérias. Todas as barras representam 20 μm.

Anexo 4. CLSM. Imagens representativas (40X) antes e após tratamento das amostras com NaOCl em diferentes pH durante 20 MINUTOS. O biofilme pré operatório é mostrado em (A). O biofilme tratado com NaOCl a 1% em pH 5, pode ser visto em (B), onde se observa uma considerável quantidade de biomassa, mas a viabilidade bacteriana foi negativa. O biofilme exposto a NaOCl a 1% em pH 7 é mostrado em (C), onde uma considerável diminuição do volume bacteriano é visto, além disso, a viabilidade bacteriana é quase inexistente. A mesma situação é encontrada quando o biofilme foi tratado com NaOCl a 2.5% em pH 7 e 12 (E e F). Embora o volume bacteriano fosse reduzido após contato do NaOCl a 1% em pH 12 (D), sua viabilidade celular foi alta. Todas as barras representam 20 μm.

Anexo 5. PSEM. Imagens representativas das amostras tratadas com NaOCl em diferentes temperaturas. No biofilme pré operatório em 500x (A) e 2500x (B) é possível observar conglomerados bacterianos cobrindo a superfície dentinária. Após contato com NaOCl a 1%-5min-22°C há desorganização do biofilme mas a massa bacteriana persiste (C). Após contato com NaOCl a 2.5%-20min-37°C pode-se observar uma evidente dissolução da matéria orgânica (D) que se mantém após a revitalização das bactérias (E). Em maior aumento (2500x) se aprecia fileiras bacterianas ao redor dos túbulos dentinários (F).

Anexo 6. PSEM. Imagens representativas das amostras tratadas com NaOCl a 2.5% em diferentes pH durante 20 min. No biofilme pré operatório não é possível observar áreas de dentina limpa (A). A capacidade de dissolução foi diretamente proporcional à alcalinidade da solução, sendo que em pH 12 foram evidenciadas grandes áreas com túbulos dentinários livres (B), seguido do pH 7 onde, embora foi possível observar túbulos dentinários, grandes áreas de dentina permaneceram cobertas por matéria orgânica (C). Essas áreas foram analisadas em 1000x (D) e 1500x (E) encontrando-se evidentes estruturas bacterianas (fileiras). O NaOCl acidificado a pH 5 foi ineficiente na remoção da biomassa (F).

Anexo 7. PSEM em 500X e CLSM em 40X. As amostras irrigadas, mas não infectadas podem ser vistas em (A-B-C). As amostras infectadas depois de receber os diferentes protocolos em (D-E-F). Uma considerável quantidade de lama dentinária foi observada quando os espécimes foram irrigado com água destilada (A). Pode-se observar túbulos dentinários nas amostras irrigadas com NaOCl-EDTA-CNPs (B) e NaOCl-CNPs (C). Evidente viabilidade celular e biomassa foi observada no grupo controle (D). Os grupos mencionados acima (NaOCl-EDTA-CNPs e NaOCl-CNPs) também foram capazes de diminuir a biomassa e interferir com o crescimento bacteriano (E e F respectivamente). Todas as barras representam 20 µm.

Anexo 8. Seccionamento dos blocos de dentina. Vistas corono-apical (A1-A3). Os lados curvos das raízes foram cortadas (A1), resultando em raízes retangulares (A2), as quais foram seccionadas novamente para obter barras de dentina (A3). Uma vista buco-lingual pode ser vista em (A4). As barras de dentina foram cortadas cada 5 mm (B1) para obter blocos de aproximadamente 5x5x3 mm (B2).

Groups	Time (days)		
	0	7	14
1% NaOCl-pH5	1%	0.93%	0.93%
1% NaOCl-pH7	1%	0.85%	0.85%
1% NaOCl-pH12	1%	1%	1%
2.5% NaOCl-pH5	2.3%	2.3%	2.1%
2.5% NaOCl-pH7	2.1%	1.96%	1.96%
2.5% NaOCl-pH12	2.5%	2.5%	2.5%

Anexo 9. Porcentagem de cloro ativo nas soluções experimentais em diferentes pHs imediatamente após sua preparação (0 dias) e depois de 7 e 14 dias.