UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU

ALDO ENRIQUE DEL CARPIO PEROCHENA

**Capacidade de dissolução do Hipoclorito de Sódio e da
Clorexidina sobre Biofilme oral formado “in situ”**

BAURU
2011

ALDO ENRIQUE DEL CARPIO PEROCHENA

**Capacidade de dissolução do Hipoclorito de Sódio e da
Clorexidina sobre Biofilme oral formado “in situ”**

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

Área de Concentração: Endodontia.

Orientador: Prof. Dr. Clovis Monteiro Bramante

BAURU
2011

D37c del Carpio-Perochena, Aldo Enrique
Capacidade de dissolução do Hipoclorito de Sódio e da Clorexidina sobre Biofilme oral formado “in situ”/ Aldo Enrique del Carpio Perochena. – Bauru, 2011.
115 p. : il. ; 28cm.

Dissertação. (Mestrado) -- Faculdade de Odontologia de Bauru. Universidade de São Paulo.

Orientador: Prof. Dr. Clovis Monteiro Bramante

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

Assinatura:

Data:

Comitê de Ética da FOB-USP
Protocolo nº: 064/2009
Data: 25/06/2009

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.
Associações	COP – Colégio Odontológico do Peru SBPqO – Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica IADR – International Association for Dental Research

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 por me dar a fortuna de compartilhar o dia a dia com as pessoas que mais quero.

Aos meus pais, José Enrique del Carpio Vargas (in memoriam) e Ana María Perochena de del Carpio, porque sem o apoio de vocês eu não conseguiria chegar até aqui. Saibam que cada uma das minhas vitórias sempre serão dedicadas a vocês. Os amo infinitamente.

Paí, sinto que me faltou tempo para retribuir todo o amor que me dedicaste. Você sempre foi um exemplo de vida, humildade e sobretudo humanidade. Obrigado por tudo meu grande amigo, confidente e exemplo a seguir. Sempre me sentirei uma criança à te lembrar (tu ley). Não te digo adeus porque embora todos me digam que ganhei um anjo, sinto que nunca deixei de tê-lo. Te amo.

Mãe, definitivamente a vida não me bastará para agradecer por tua incansável luta, permanente preocupação e incondicional amor. De tua fortaleza aprendi a sorrir à vida, embora algumas vezes a melancolia nos tente ao abandono e conformismo. Te amo.

Aos Meus irmãos Eduardo e Alejandra pelos seus constantes apoios e carinhos em cada uma das etapas importantes da minha vida.

AGRADECIMENTOS

Há quatro anos o destino me trouxe ao Brasil cheio de uma combinação de expectativas e ilusões próprias de toda primeira vez, mas também de imensa saudade e dor por todos os que ficavam na minha Arequipa querida. Com o transcorrer do tempo conheci pessoas realmente boas e comecei a construir amizades e criar laços afetivos que pensei que somente poderia tê-los no Peru. Por isso meu sincero agradecimento a cada um desses brasileiros e estrangeiros que passaram a ocupar para sempre um lugar no meu coração. Muito obrigado Brasil!

Ao meu orientador, Professor Dr. Clovis Monteiro Bramante pelo seu tempo, paciência, preocupação e grande amabilidade durante o desenvolvimento deste trabalho. Guardo imenso respeito, admiração e carinho pelo senhor por cada um desses momentos que além de ser meu professor foi meu amigo.

Ao Professor Dr. Marco Antonio Húngaro Duarte, pela confiança, incentivo e permanente ajuda. Professor você é uma pessoa digna de admiração, sério nos momentos que correspondem e um verdadeiro amigo fora da faculdade. Minha infinita gratidão pelo privilégio de permitir ser seu amigo.

À Professora Dra. Flaviana Bombarda de Andrade, pela ajuda, disposição, grande amabilidade e vontade de trabalhar.

Aos Professor(s) Dr(s). Ivaldo Gomes de Moraes, Roberto Brandão Garcia e Norberti Bernardineli, da disciplina de Endodontia da FOB-USP, pela educação, bom trato e ter sempre disponibilidade para esclarecer minhas dúvidas.

Ao Professor Dr. Mário Roberto Leonardo, por sua amizade e humildade embora seja um “grande” da Endodontia mundial.

Aos funcionários da disciplina de Endodontia, Dona Neide, Edimauro e Suely pelo seu carinho e convivência agradável durante este tempo.

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

A Marcia Graeff, pela ajuda com a utilização do Microscópio Confocal, por sempre estar com um sorriso no rosto. Você é uma pessoa cheia de virtudes, obrigado pela amizade.

A meus amigos e companheiros de festa, Bruno Cavalini Cavenago e Diego Bravo Calderón, por toda sua hospitalidade e verdadeira amizade, por estar sempre presente nos momentos bons e ruins. Não é preciso levar o mesmo sangue para senti-los como irmãos.

A minha amiga Thaís Vieira Rizzo Nunes da Cunha, por sua alegria contagiante, por me ter sempre presente, por me escutar quando precisava de conforto. Obrigado pela amizade, eu quero você como minha irmã.

A meu amigo e conterrâneo, Ronald Ordínola Zapata, por seu espírito de serviço, sempre disposto a me ajudar e esclarecer minhas dúvidas. Com seus conselhos você contribuiu muito na minha formação de pós-graduando.

Aos meus amigos da turma de mestrado 2009-2011, Marcelo Haas Villas Bôas, Clarissa Teles Rodrigues, Marina Marciano da Silva, Paloma Gagliardi Minotti, Raquel Zanin Mídena e Elaine Cristina Consolmagno, por compartilhar estes dois anos comigo, pela convivência prazerosa e por me fazer sentir como em casa.

Aos meus amigos estrangeiros Carlos Franco, Ana Miriam Garrido e Santiago Bravo, pelo companheirismo.

A Carolina Figueroa Marroquín pela espera, paciência e carinho.

A todos meus amigos e familiares no Peru que de alguma maneira contribuíram para poder atingir meus objetivos.

AGRADECIMENTOS INSTITUCIONAIS

À Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, na pessoa do seu Diretor, Prof. Dr. José Carlos Pereira.

A Comissão da Pós-graduação, na pessoa do Professor Dr. Paulo César Rodrigues Conti.

Ao coordenador do programa de Pós-graduação na área de concentração em Endodontia, Professor Dr. Roberto Brandão Garcia.

Ao Centro Integrado de Pesquisas da Faculdade de Odontologia de Bauru-USP, na pessoa do Professor Dr. Vinícius Carvalho Porto.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP, pelo apoio financeiro para a realização deste trabalho.

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 o efeito do Hipoclorito de Sódio e a Clorexidina sobre biofilme dental formado “*in situ*” com relação a: Concentração do Hipoclorito de Sódio (1%, 2.5% e 5%) e Clorexidina 2%, tempo de exposição à solução irrigadora (5, 15 e 30 minutos.), volumes das soluções (500 µl e 1 mL), espessura do biofilme e área de limpeza segundo análise morfométrica. Foram utilizados 120 blocos de dentina bovina esterilizada, colocados em um aparelho intraoral e utilizados por um voluntário durante 3 dias. Transcorrido o período experimental as amostras foram retiradas e coradas com 50 µl de Laranja de acridina para determinar a espessura do biofilme pre irrigação por meio do Microscopio confocal de varredura laser (CLSM). Foram conformados 12 grupos experimentais com 10 blocos cada um e irrigados com NaOCl e Clorexina. Dez amostras foram irrigadas com 500 µl (N=5) e 1mL (N=5) de NaOCl 1% por: 5 min (G1), 15 min (G2) e 30 min (G3). Dez amostras foram irrigadas com 500 µl (N=5) e 1mL (N=5) de NaOCl 2.5% por: 5 min (G4), 15 min (G5) e 30 min (G6). Dez amostras foram irrigadas com 500 µl (N=5) e 1mL (N=5) de NaOCl 5% por: 5 min (G7), 15 min (G8) e 30 min (G9). Dez amostras foram irrigadas com 500 µl (N=5) e 1mL (N=5) de Clorexidina 2% por: 5 min (G10), 15 min (G11) e 30 min (G12). Para cada sub grupo experimental (N=5) se deixou um sexto bloco o qual foi irrigado com água destilada estéril para procedimentos de controle. Nos grupos de 15 e 30 minutos a solução de NaOCl e Clorexidina foi renovada a cada 5 minutos. Os segmentos de dentina foram lavados com 200 µl de água destilada estéril para eliminar resíduos não aderidos e corados com 50 µl de Laranja de acridina para determinar a espessura do biofilme após irrigação por meio do CLSM. Foram encontrados altos valores de dissolução do biofilme e dentina limpa após contato com NaOCl a 5% durante 5 e 15 min. e com todos os grupos de NaOCl durante 30 min. O uso de Clorexidina a 2% não dissolveu o biofilme e nem aumentou a limpeza dentinária quando comparado com o NaOCl ($P < 0.05$).

Palavras chave: Biofilme, dentina, irrigantes endodônticos.

Abstract

ABSTRACT

Biofilm dissolution and cleaning ability of different irrigant solutions on intraorally infected dentin

Introduction: The aim of this study is to evaluate the biofilm dissolution and cleaning ability of different irrigant solutions on intraorally infected dentin.

Methods: 120 bovine dentin specimens were infected intraorally using a removable orthodontic device. 30 samples were used for each irrigant solution; 2% Chlorhexidine, 1%, 2.5% and 5.25% of sodium hypochlorite (NaOCl). The solutions were used for 5, 15 and 30 minutes and 2 experimental volume 500µl and 1mL. The samples were stained using the acridine orange dye before and after the experiments and evaluated using a confocal microscope. The percentage of biofilm, isolated cells and no colonized dentin was measured using a grid system. Differences in the reduction or increase of the studied parameters was assessed using non-parametric methods ($P < 0.05$).

Results: The higher values of biofilm dissolution and clean dentin were found in the 30 minutes NaOCl groups and in the 5 and 15 minutes of 5.25% NaOCL. The use of 2% chlorhexidine solution does not improve the biofilm dissolution neither increases the cleaning of the dentin in comparison to the NaOCl solutions ($P < 0.05$).

Conclusions: 2% chlorhexidine does not dissolve the biofilms. 30 minutes of sodium hypochlorite are necessary to have the higher values of biofilm dissolution and to increase the cleaning of the dentin independently of the concentration in comparison to the 5 min and 15 min contact time.

Key words: Biofilm, dentin, endodontic irrigants.

LISTA DE FIGURAS.

- Figura 1.** Dentina após tratamento com Hipoclorito de sódio e EDTA verificando a efetividade do método de limpeza observado com o MEV (esquerda) e CLSM (direita).....50
- Figura 2.** Raiz de dente bovino fixada em uma lâmina acrílica com godiva aquecida e máquina de corte Isomet utilizada para a confecção dos corpos de prova (A). Blocos colocados em tubos de ensaio com 5 mL de água destilada (B). Autoclave utilizada para esterilização dos blocos (C).....50
- Figura 3.** Modelo em gesso pedra do arco superior (A), aparelho intrabucal palatino (B), aparelho com os blocos de dentina (C).51
- Figura 4.** Bloco de dentina após 72 horas de uso por um voluntário demonstrando a capacidade da laranja de acridina para corar as células bacterianas e a capacidade de formação do biofilme oral sobre a dentina *in situ*.52
- Figura 5.** Soluções experimentais: Hipoclorito de Sódio à 1%, 2.5% e 5% (A-B-C) e Clorexidina 2% (D)53
- Figura 6.** Blocos de dentina irrigados com água destilada estéril (A-B); blocos sendo corados com Laranja de acridina 0.01% durante 5 min (C); Microscópio Confocal de Varredura Laser (D); Ferramenta Z-Stack do software Leica LAS-AF (E).....55
- Figura 7.** Imagem representativa da dentina infectada intraoralmente mostrando a divisão da imagem em 100 quadrados iguais. Áreas de intensa colonização bacteriana são observadas na forma de biofilme. Presença de células isoladas (seta). A barra representa 20 µm.....57
-
-

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Distribuição dos espécimes em função das soluções irrigadoras testadas, concentração, tempo de exposição e volumes das soluções.54
- Tabela 2.** Mediana e 25 - 75% percentil da porcentagem da espessura do biofilme em μm antes e após o contato com Clorexidina a 2% (A), Hipoclorito de sódio a 1% (B), 2.5% (C) e 5% (D). Letras diferentes em cada coluna representam diferenças estadísticas significantes. Kruskal Wallis-Dunn ($P < 0.05$). (N=10).65
- Tabela 3.** Mediana e 25 - 75% percentil da porcentagem do Biofilme, células isoladas e dentina limpa antes e após o contato com Clorexidina a 2% (A), Hipoclorito de sódio a 1% (B), 2.5% (C) e 5% (D). Letras diferentes em cada coluna representam diferenças estadísticas significantes. Kruskal Wallis-Dunn ($P < 0.05$). (N=10).66
-
-

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

%	Porcentagem.
seg	Segundo.
min	Minutos.
h	Hora.
mm	Milímetros.
µm	Micrometros.
nm	Nanômetro.
µg	Microgramas.
mL	Mililitros.
ppm	Partes por milhão.
x	Aumentos.
N	Numero.
G	Grupo.
p	Significância estatística.
±	Desvio padrão.
°C	Graus Celsius.
G+	Gram Positivo.
G-	Gram negativo.
NaOCl	Hipoclorito de sódio.
CLX	Clorexidina.
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
DNA	Ácido desoxirribonucleico.
RNA	Ácido ribonucleico.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 REVISÃO DA LITERATURA	21
2.1 Biofilmes orais	23
2.2 Biofilmes nos condutos radiculares	28
2.3 Efeito dos irrigantes endodônticos sobre biofilmes orais.....	34
3 PROPOSIÇÃO	43
4 MATERIAIS E MÉTODOS	47
4.1 Delineamento experimental.....	49
4.2 Formação do Biofilme Oral.....	51
4.3 Análise microscópica dos espécimes pré irrigação.	51
4.4 Tratamento dos blocos de dentina com as soluções irrigadoras.....	53
4.5 Análise estatística	59
5 RESULTADOS.....	61
6 DISCUSSÃO	67
6.1 Da metodologia.	70
6.2 Dos resultados.	75
7 CONCLUSÕES	81
REFERÊNCIAS.....	83
ANEXOS	101

1 Introdução

1 INTRODUÇÃO

A periodontite apical é a principal patologia associada com o fracasso do tratamento endodôntico, se encontrando nela uma vasta variedade de espécies bacterianas (SKUCAITE et al., 2010; ZIJNGE et al., 2010). No entanto, a maioria dos trabalhos analisa o poder antimicrobiano dos irrigantes endodônticos contra espécies bacterianas isoladas (JACINTO et al., 2003; EICK, SELTMANN, PFISTER, 2004; DUNAVANT et al., 2006; CLEGG et al., 2006; DUGGAN, SEDGLEY, 2007; GIARDINO et al., 2007; OZOK et al., 2007; SEDLACEK, WALKER, 2007; CAMARA et al., 2009; ARIAS-MOLIZ et al., 2010; CHAVEZ DE PAZ, BERGENHOLTZ, SVENSATER, 2010), não permitindo as interações bacterianas características dos biofilmes multi-espécie que os fazem mais resistentes (COOK, COSTERTON, LAMONT, 1998; STANDAR et al., 2010; ZIJNGE et al., 2010).

Os biofilmes bacterianos dentro do canal radicular e sua relação com a etiologia da periodontite apical crônica e o insucesso do tratamento endodôntico tem sido motivo de diversos estudos nos últimos anos (FIGDOR, SUNDQVIST, 2007; LEONARDO et al., 2002). Convencionalmente, a desinfecção dos canais radiculares é realizada mediante procedimentos de preparo químico-mecânico que incluem 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 polpa necrótica, em muitas oportunidades, esta técnica pode falhar na eliminação completa dos biofilmes bacterianos, principalmente devido a diversos fatores microbiológicos e anatômicos (KVIST et al., 2004; NAIR et al., 2005).

A variação fenotípica e genotípica dos biofilmes bacterianos quando são comparados às bactérias planctônicas, além da complexa estrutura e composição da matriz extracelular, contribui com a sua alta resistência contra diversos agentes antimicrobianos (CHAVEZ DE PAZ, 2007a). Ultra-estruturalmente os biofilmes formam microcolônias com canais dispersos os quais estão separados do meio ambiente externo por um fluido que proporciona proteção às bactérias hospedadas em seu interior.

As células dentro do biofilme produzem matriz extracelular que as protege das agressões externas e geralmente estas células da profundidade do biofilme

estão expostas às condições ambientais que diferem das condições existentes na superfície do biofilme, como por exemplo, a diminuição da tensão de oxigênio (SKUCAITE et al., 2010). Além disso, a baixa taxa metabólica dos microrganismos dentro do biofilme assim como a matriz extracelular, dificultam a ação e efetividade de muitos antimicrobianos (DUNAVANT et al., 2006). Por tanto, todos os estudos sobre a efetividade antimicrobiana das soluções irrigadoras devem ser conduzidos com bactérias na forma de biofilme. (CHAVEZ DE PAZ, 2007)

Ate o presente, poucos estudos avaliando a capacidade antibacteriana das soluções irrigadoras contra biofilmes formados na cavidade oral, tem sido publicados (VIRTEJ et al., 2007). Além disso, não e muito claro se os biofilmes bacterianos são intrinsecamente resistentes aos compostos utilizados durante o preparo químico-mecânico como o hipoclorito de sódio ou se a atividade antimicrobiana é afetada por fatores anatômicos ou outras variáveis como tempo, concentração ou volume do antimicrobiano os quais possam interferir numa apropriada ação das soluções irrigadoras.

O objetivo deste estudo foi avaliar a efetividade antimicrobiana e de dissolução do Hipoclorito de Sódio e Clorexidina contra biofilme dental polímicrobiano formado em dentina “in situ” utilizando como modelo experimental uma modificação de um protocolo previamente publicado.

A hipótese deste trabalho é: Biofilme oral polímicrobiano formado em dentina, “in situ”, não é resistente ao Hipoclorito de sódio, mas sim à Clorexidina. A dissolução do Biofilme esta afetada por outras variáveis como tempo de exposição, volume da solução irrigadora, concentração da solução irrigadora e espessura do biofilme.

2 *Revisão da Literatura*

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Biofilmes orais

COOK, COSTERTON, LAMONT, em 1998, com o uso da microscopia confocal visualizaram a formação do biofilme pelas bactérias orais *Streptococcus gordonii* e *Porphyromonas gingivalis*. Foi utilizada uma lamínula de vidro recoberta com saliva para investigar a fixação à película de saliva e também o efeito da interação célula-célula durante a extensa colonização e desenvolvimento do biofilme. *S. gordonii* se ligou na película salivar, mas não competiu com *P. gingivalis* por lugares de fixação. Ambas bactérias falharam na formação considerável de biofilme independentemente, no entanto, a formação de biofilme ocorreu subsequente à aderência inicial de *P. gingivalis* a *S. gordonii*. Os pesquisadores concluíram que *S. gordonii* pode providenciar a *P. gingivalis* um substrato de ligação para a colonização e adição ao biofilme.

LEONARDO et al., em 2002, avaliaram a presença de biofilmes nas superfícies externas de ápices de dentes humanos com necrose. Foram extraídos 8 dentes com polpa necrosada e lesão periapical visível na radiografia, 8 dentes com necrose sem lesão periapical visível e 5 dentes com polpa vital. Os dentes foram cortados a 3mm do ápice e preparados para sua análise no MEV. As amostras foram avaliadas quanto a presença de microrganismos, reabsorção radicular e presença de biofilme. Não encontraram bactérias nas amostras correspondentes a dentes com polpas vitais e com necrose sem lesão periapical visível na radiografia; houve presença de bactérias nos dentes com polpas necróticas com lesão periapical visível. Isto incluiu cocos, bacilos, filamentos e a presença de biofilme apical.

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.

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 tripticosa soja por 24 horas a 37°C e conclui-se que não houve nenhuma diferença estatística significativa entre os grupos.

CHAVEZ DE PAZ et al., em 2007, determinaram se as bactérias isoladas de canais radiculares infectados sobrevivem melhor a 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 número 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 incrementada 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 cotrimoxazol. Concluíram que somente a eritromicina, oxitetraciclina e Ca(OH)_2 possuem capacidade antibacteriana para eliminar por completo o biofilme de *E. faecalis*.

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). No 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.

RICUCCI et al., em 2009, avaliaram histologicamente dentes obturados endodônticamente com presença de periodontite apical e correlacionaram os resultados com observações clínicas 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 foram 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 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 se obtiveram cortes delgados que foram examinadas 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 longitude 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 numero 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. actinomycetemcomitans* formaram monocamadas irregulares. Para uma análise mais detalhada foram escolhidos *S. mitis*, *S. mutans* e *A. actinomycetemcomitans* 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.

2.2 Biofilmes nos condutos radiculares.

BARTHEL et al., em 2002, estudaram a capacidade antibacteriana da clorexidina gel 5%, a pasta de hidróxido de cálcio e os cones de guta-percha contendo clorexidina e hidróxido de cálcio contra biofilmes orais formados in situ. Foram colocados cilindros de dentina com um dos seus extremos fechado em um aparelho intraoral durante 7 dias para facilitar a formação do biofilme; transcorrido esse período a medicação intracanal e os cones de guta-percha foram colocados dentro do canal radicular e se fecharam ambos extremos dos cilindros, os quais foram levados a uma incubadora a 37°C durante 1 e 2 semanas. Só a pasta de hidróxido de cálcio e a clorexidina 5% inibiram o crescimento bacteriano após 7 e 14 dias.

DISTEL, HATTON, GILLESPIE, em 2002, avaliaram se o *E. faecalis* tem capacidade de colonizar canais medicados com hidróxido de cálcio. Quarenta e seis dentes com medicação intracanal foram extraídos e observados com o microscópio eletrônico de varredura (MEV) e o microscópio confocal de varredura laser (CLSM). Por meio de MEV observou-se colonização bacteriana em canais medicados com pontas de Ca(OH)_2 após 2 dias. Em um período de 77 dias observou-se biofilmes em canais medicados com pasta de Ca(OH)_2 . Na análise com CLSM observou-se colônias bacterianas viáveis em 2 canais medicados com pasta de Ca(OH)_2 por 86 dias, enquanto que, em 160 dias a típica forma de cogumelo do biofilme foi observada. Concluíram que o *E. faecalis* possui potencial para formar biofilmes em canais medicados.

GEORGE, KISHEN, SONG, em 2005, estudaram a influência 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 MEV, 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 maturo. 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.

FOSCHI et al., em 2007, investigaram os efeitos da terapia fotodinâmica (PDT) com azul de metileno (MB) em canais radiculares infectados com *E. faecalis*. Sessenta e quatro canais foram instrumentados e inoculados com *E. faecalis* durante 3 dias. Transcorrido esse período, foi colocado azul de metileno nos canais por 5 min e expostos a luz laser a 665 nm via fibra óptica. Após a PDT, as células viáveis foram calculadas por contagem de UFC. Os resultados mostraram que a PDT alcançou 77.5% de redução da viabilidade bacteriana. O azul de metileno e a luz laser por separado reduziram a viabilidade bacteriana em 19.5% e 40.5% respectivamente. Os pesquisadores concluíram que é preciso determinar uma correta concentração do MB em combinação com PDT para a eliminação total de bactérias do canal radicular.

GEORGE, KISHEN, em 2007, estudaram a características fotoquímicas e fotobiológicas de diferentes formulações de azul de metileno na desinfecção de canais radiculares mediante a terapia de ativação de luz (LAT). O azul de metileno

foi dissolvido em água, glicerol à 70%, polietilenoglicol à 70% e glicerol+etanol+água (30:20:50) (MIX). A formulação de azul de metileno associada a MIX foi capaz de penetrar nos túbulos dentinários. O azul de metileno mostrou uma alta afinidade por *E. faecalis* (Gram +) e *A. actinomycetemcomitans* (Gram -) em sua formulação com água, seguido por MIX, esta última aumentou significativamente a oxidação do substrato e a geração de uma camada de oxigênio comparado com as demais formulações do azul de metileno. Finalmente a eficácia da LAT foi avaliada sobre biofilmes produzidos por ambos microrganismos em condições *in vitro* e *ex vivo*, onde se encontrou que a formulação MIX foi a mais efetiva na desinfecção do canal radicular. Concluíram que este método tem uma aplicação potencial para a desinfecção do sistema de canais radiculares.

PAQUETTE et al., em 2007, estudaram a capacidade antibacteriana da clorexidina à 2% como medicação intracanal em dentes com periodontite apical. Vinte e dois canais foram instrumentados e medicados com clorexidina a 2% por 7 e 15 dias. As amostras bacteriológicas foram aspiradas depois da primeira e segunda sessão, antes e após instrumentação. A quantidade de bactérias viáveis foi obtida por cultura (UFC) y microscopia utilizando corantes de viabilidade celular. Concluíram que a medicação intracanal com clorexidina não reduz a concentração bacteriológica.

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 1ª 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.

NOIRI et al., em 2008, avaliaram o poder do laser Er:YAG para remover o biofilme residual dos canais radiculares contaminados *in vitro*. No estudo examinaram-se os biofilmes infectados com *Actinomyces naeslundii*, *Enterococcus faecalis*, *Lactobacillus casei*, *Propionibacterium acnes*, *Fusobacterium nucleatum*,

Porphyromonas gingivalis e *Prevotella nigrescens*. Após da irradiação com Er:YAG as amostras de biofilme foram quantitativa e morfológicamente avaliadas. O Er:YAG foi eficaz contra 6 dos biofilmes estudados com exceção daqueles formados pela *L. casei*. Após a irradiação, os números de células viáveis dos biofilmes foram diminuídos significativamente.

ZAPATA et al., em 2008, avaliaram o potencial da microscopia confocal de varredura laser (CLSM) 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 .

FIMPLE et al., em 2008, investigaram os efeitos da terapia fotodinâmica utilizando azul de metileno sobre biofilmes multi-espécies do canal radicular de dentes humanos infectados in vitro. Os microrganismos estudados (*Actynomices Israelii*, *Fusobacterium nucleatum*, *Porphyromonas gingivalis* e *Prévotella intermédia*) foram detectados no canal radicular com o uso de testes de DNA; a microscopia eletrônica confirmou a presença dos biofilmes nos canais radiculares, antes do tratamento endodôntico. O canais radiculares foram corados com azul de metileno (25 µg/mL) por 10 minutos seguido pela exposição à luz vermelha em 665 nm com uma fluidez de energia de 30 J/cm². A luz foi liberada por um laser de diodo através de fibra óptica de metacrilato de polimetil de 250-µm de diâmetro, que uniformemente distribuiu a luz sobre 360 graus. A terapia fotodinâmica (PDT) conseguiu a redução de até 80% de unidades contáveis da formação de colônias.

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 microscópio eletrônico de varredura (MEV) e a combinação de hibridação fluorescente in situ (FISH) com o microscópio confocal de varredura laser (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, SIQUEIRA, em 2010, avaliaram a prevalência de biofilmes em canais radiculares com e sem tratamento endodôntico de dentes com periodontite apical. A associação dos biofilmes com condições clínicas, tamanho radiográfico e tipo histopatológico da periodontite apical também foi investigado. O material constou de biopsias de 106 (64 sem tratamento e 42 tratados) canais de dentes com periodontite apical. Bactérias foram encontradas em todas as amostras. Em geral, o biofilme intraradicular foi observado na porção apical do 77% dos canais, o biofilme também foi observado cobrindo as paredes de ramificações e istmos. Biofilmes bacterianos foram visualizados em 62% e 82% dos canais de dentes com lesão radiográfica pequena e grande respectivamente. Todos os canais com lesão muito grande hospedaram biofilme intraradicular. Os biofilmes foram associados a lesões epitelizadas, com uma prevalência de 95% nos cistos, 83% nos granulomas epitelizados e 69.5% nos abscessos. Não se encontrou correlação entre biofilme e sintomas clínicos. Biofilmes extraradiculares foram observados só em 6% dos casos. Os pesquisadores concluíram que os biofilmes estão mais propensos a estar presentes em processos patológicos de longa data que incluem lesões de grande tamanho e cistos.

DELGADO et al., em 2010, avaliaram a eficácia de hidróxido de cálcio $[Ca(OH)_2]$ e clorexidina gel na eliminação de *E. faecalis* nos túbulos dentinários. Os dentes infectados foram tratados com $Ca(OH)_2$, clorexidina gel à 2% e a combinação de ambos. As amostras foram obtidas de uma profundidade de 0 a 100 μm e de 100 a 200 μm . Os resultados mostraram uma significativa diminuição no número das UFC e na porcentagem de células viáveis de *E. faecalis* após o tratamento com $Ca(OH)_2$ e clorexidina. Adicionalmente, a clorexidina gel teve uma eficácia antibacteriana alta em comparação com $Ca(OH)_2$. Não houve diferenças estatísticas entre as propriedades antibacterianas de clorexidina gel em ou sem associação a

Ca(OH)₂, mas este último em associação com a clorexidina mostrou um efeito antibacteriano similar à clorexidina só.

2.3 Efeito dos irrigantes endodônticos sobre biofilmes orais.

SPRATT et al., em 2001, estudaram, in vitro, a eficácia antibacteriana de diferentes irrigantes sobre biofilmes uni-espécie de *Prevotella intermedia*, *Peptostreptococcus micros*, *Streptococcus intermedius*, *Fusobacterium nucleatum* e *Enterococcus faecalis* desenvolvidos em membranas de nitrocelulose. Foi observado que Iodine à 10% e NaOCl à 2.25% foram mais efetivos que a clorexidina à 0.2% exceto contra *P. micros* e *P. intermedia* onde ambos foram 100% efetivos. Iodine e NaOCl foram 100% efetivos contra todas as espécies bacterianas após 1 hora de incubação, no entanto, após 15 min eles mostraram diferentes efeitos bactericidas dependendo da espécie. Nenhum dos irrigantes foi efetivo contra *F. nucleatum* após 15 min, mas foram efetivos após 1 hora. Concluíram que a efetividade de cada um dos agentes depende do microrganismo e o tempo de contato. Em geral o NaOCl foi o agente mais efetivo seguido pelo iodine.

ABDULLAH et al., em 2005, compararam a eficácia de vários irrigantes endodônticos e de um medicamento intracanal sobre biofilmes e células planctônicas de *E. faecalis* obtidos de dentes humanos e cultivados em agar. As amostras foram expostas ao hidróxido de cálcio, gluconato de clorexidina à 0.2%, EDTA à 17%, povidone iodado à 10% e hipoclorito de sódio à 3% por períodos de 1, 2, 4, 8, 15, 30 e 60 min. A diferença de gradientes na eliminação bacteriana entre os biofilmes e as células planctônicas foi significativa e dependente do agente testado, exceto no caso do Ca(OH)₂ e do NaOCl onde não foi possível determinar uma diferença. O NaOCl foi o irrigante mais efetivo e conseguiu 100% de eliminação do *E. faecalis* após o segundo min de contato com ambos fenótipos.

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 uma 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 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, NaOCl à 1% só e 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 encontrado 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*, *Prévotella 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 promoveu 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 demonstrou 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 dos seus extremos fechado em um aparelho intraoral durante 7 dias para facilitar a formação do biofilme, transcorrido este 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 fotosensibilizador e um diodo de luz laser de 660nm levados dentro do canal por meio de 200 µm de fibra. 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 incubados 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 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 áqueles 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 à 2.5% e medicação intracanal com hidróxido de cálcio associado a 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 incrementou 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. Peroxido 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.

LIM et al., em 2009, compararam o efeito antibacteriano do hipoclorito de sódio e a irradiação com luz laser em secções de dentes humanos infectados com *E. faecalis*. Em uma primeira etapa, a luz laser para desinfecção (LAD) convencional,

NaOCl à 5.25% e LAD potenciada por um fotosintetizador foram testadas sobre biofilmes imaturos (4 dias de crescimento). Na segunda etapa, a LAD convencional, a LAD potenciada e o NaOCl (só e em combinação com LAD potenciada) foram testadas sobre biofilmes maduros (4 semanas de crescimento). O NaOCl e a LAD potenciada mostraram capacidade para inativar significativamente o biofilme imaturo quando comparado com LAD convencional. Houve uma alta eliminação das bactérias intratubulares quando foi usada a LAD potenciada em comparação com NaOCl. No biofilme maduro, a combinação do NaOCl com a LAD potenciada produziu um alto efeito antibacteriano em comparação a quando foram usados por separado.

CAMARA et al., em 2009, estudaram a capacidade antimicrobiana da irrigação do hipoclorito de sódio à 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.

SHEN et al., em 2009, descreveram o efeito de duas concentrações de Clorexidina sobre biofilme formado in vitro. Discos de colágeno recobertos com Hidroxiapatita (C-HA) e sem recobrimento de Hidroxiapatita (HA) foram inoculados com microrganismos obtidos da placa subgengival durante 3 semanas. Em ambos substratos (C-HA e HA) formaram-se densos biofilmes ricos em espiroquetas, os quais foram irrigados com Clorexidina Plus e Clorexidina 2% (CHX) durante 1, 3 e 10 minutos. Após a irrigação, as amostras foram coradas com LIVE/DEAD para determinar a viabilidade celular do biofilme. A proporção de bactérias não viáveis dependeu do tipo de irrigante e o tempo de exposição em ambos modelos de biofilmes ($p = 0.00$). CHX-Plus mostrou altos níveis de atividade bactericida em todos os tempos de exposição, em comparação com CHX 2% ($p < 0.001$).

SHEN et al., em 2010, testaram, in vitro, se a agitação mecânica (ultrassônica e sônica) melhorava a efetividade da Clorexidina na eliminação do biofilme. Discos de colágeno recoberto com Hidroxiapatita (C-HA) foram inoculados

com microrganismos obtidos da placa subgengival durante 3 semanas. Os biofilmes formados foram irrigados com Clorexidina Plus e Clorexidina 2% durante 1 e 3 minutos. Após a irrigação, as amostras foram coradas com LIVE/DEAD para determinar a viabilidade celular do biofilme. Concluíram que não houve mudanças significativas na estrutura do biofilme quando a irrigação foi combinada com agitação ultrassônica e sônica.

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.

SOUZA et al., em 2010, investigaram o efeito antibacteriano de terapia fotodinâmica (PDT) com azul de metileno (MB) e azul de toluidina (TB) como um suplemento da instrumentação e irrigação de canais radiculares infectados com *E. faecalis*. Os dentes foram instrumentados com limas NiTi e irrigados com hipoclorito

de sódio (NaOCl) à 2.5% e cloreto de sódio (NaCl) à 0.85% e distribuídos aleatoriamente em 4 grupos experimentais: MB/NaOCl (PDT com MB e NaOCl como irrigante), TB/NaOCl (PDT com TB e NaOCl como irrigante), MB/NaCl (PDT com MB e NaCl como irrigante), TB/NaCl (PDT com TB e NaCl como irrigante). Para a PDT o fotosintetizador permaneceu no canal por 2 min antes de ser exposto a luz vermelha emitida por um diodo laser por 4 min. As amostras foram tomadas antes e após a instrumentação-irrigação e o procedimento da PDT específico para cada grupo. O NaOCl como irrigante foi significativamente mais efetivo que o NaCl, essa diferença persistiu após o uso da PDT sem importar o fotosintetizador usado. Concluíram que a PDT com MB ou TB não melhoraram significativamente a desinfecção dos canais radiculares após a sua instrumentação químico-mecânica.

JIANG et al., em 2010, 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 várias 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-espécie de *E. faecalis*. A contagem de células viáveis confirmou o resultado e mostrou um incremento na resistência do *E. faecalis* nos biofilmes bi-espécies.

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.

ARIAS-MOLIZ et al., em 2010, investigaram a eficácia da Cetramida e a Clorexidina, isoladas ou em associação, irrigada de forma combinada ou alternada na erradicação de *E. faecalis*. A Cetramida à 0.5%, 0.0312% e 0.0078% nos períodos de 30 segundos, 1 e 2 minutos respectivamente erradicou o *E. faecalis*; a Clorexidina não erradicou o biofilme em nenhuma concentração (concentração inicial 4%) e período de tempo. A associação da Cetramida à 0.1% e 0.05% com qualquer concentração de Clorexidina, aplicadas em forma combinada ou alternada, foram efetivas na erradicação do *E. faecalis* em todos os tempos testados. A erradicação foi também alcançada com a Cetramida à 0.02% e 0.01% em 2 minutos. Houve diferença estatística significativa entre a irrigação com Cetramida e Clorexidina na forma alternada (melhor) e combinada.

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.

3 *Proposição*

3 PROPOSIÇÃO

Observar o efeito do Hipoclorito de Sódio e Clorexidina sobre biofilme dental formado “*in situ*” com relação a:

- 1.- Concentração do Hipoclorito de Sódio (1% , 2.5%, 5%) e Clorexidina 2%
- 2.- Tempo de exposição à solução irrigadora (5, 15 e 30 minutos.).
- 3.- Volume de Hipoclorito de Sódio e Clorexidina (500 µl e 1 mL).
- 4.- Espessura do biofilme.
- 5.- Área de limpeza segundo Analise Morfométrica

4 Materiais e Métodos

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Delineamento experimental

Como requisito prévio ao início do estudo, o projeto de pesquisa foi submetido à apreciação do Comitê de Ética em Pesquisa em seres humanos da Faculdade de Odontologia de Bauru/Universidade de São Paulo (CEP-FOB/USP – Processo nº 064/2009) e aprovado em 17/05/2009 (ANE XO A). A alteração do título do projeto de pesquisa e apresentada no ANEXO B.

Os procedimentos experimentais utilizaram raízes de dentes bovinos que permaneceram armazenadas em uma solução de formaldeído a 10% até sua utilização. As raízes foram fixadas com godiva tipo I (Kerr Co., Romulus MI, USA) em uma placa de acrílico e seccionadas utilizando uma máquina metalográfica de corte ISOMET Low Speed Saw (Buehler Ltd, Lake Bluff IL, USA) até alcançar as medidas desejadas (4x4x2mm aproximadamente), obtendo-se 120 blocos de dentina bovina.

Esses blocos foram tratados com hipoclorito de sódio a 1% (Rioquímica Ltda., São Jose do Rio Preto, SP, Brasil) durante 15 minutos (com trocas da solução a cada 5 min) e EDTA 17% (Biodinâmica, Ibiporã, PR, Brasil) durante 5 minutos para a eliminação do *smear layer*. Para verificar o método de limpeza, dois blocos foram observados utilizando o Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV) (Jeol JSM T220; Jeol, Tokyo, Japan) e Microscópio Confocal (CLSM) (TCS-SPE, Leica Microsystem GmbH, Mannheim, Germany). (Figura 1).

Para a esterilização das amostras, os blocos de dentina foram distribuídos aleatoriamente em tubos de ensaio com tampas rosqueáveis contendo 5 mL de água destilada. A esterilização foi realizada em autoclave (Sercon-Modelo HS-Mogi das Cruzes, SP) por 30 min, a 121°C e 1 atm. (Figura 2). Os blocos esterilizados foram fixados com cera utilidade (Kota Ind. e Com. Ltda.; São Paulo, SP, Brasil) em placa ortodôntica removível

Figura 1. Dentina após tratamento com Hipoclorito de sódio e EDTA verificando a efetividade do método de limpeza observado com o MEV (esquerda) e CLSM (direita).

Figura 2. Raiz de dente bovino fixada em uma lâmina acrílica com godiva aquecida e máquina de corte Isomet utilizada para a confecção dos corpos de prova (A). Blocos colocados em tubos de ensaio com 5 mL de água destilada (B). Autoclave utilizada para esterilização dos blocos (C).

4.2 Formação do Biofilme Oral.

Para a formação do biofilme oral, *in situ*, foram feitas moldagens do arco superior do voluntário, para a posterior confecção dos modelos de gesso pedra. O aparelho intrabucal palatino foi confeccionado utilizando resina acrílica, no qual foram realizados 12 nichos (10 mm x 6 mm x 3 mm) dispostos em 3 fileiras de cada lado (4 espécimes por fileira). (Figura 3). O aparelho ortodôntico foi utilizado por um voluntário durante 3 dias para possibilitar a formação de biofilme sobre a superfície dos blocos de dentina. Os procedimentos de higiene do voluntário não foram interrompidos.

Figura 3. Modelo em gesso pedra do arco superior (A), aparelho intrabucal palatino (B), aparelho com os blocos de dentina (C).

4.3 Análise microscópica dos espécimes pré irrigação.

Transcorrido o período necessário para a colonização da dentina os blocos foram cuidadosamente separados e irrigados com 1 mL de água destilada estéril para eliminar células não aderidas. Os blocos de dentina infectados foram colocados em placas de cultura celular de 24 poços (TPP® Zellkultur testplate 24F, Switzerland). A seguir os blocos foram submersos em 50µl de Laranja de acridina 0.01% (Sigma Chemical Co., St Louis, Mo, USA) durante 5 minutos.

A Laranja de Acridina é um corante catiônico fluorescente seletivo do ácido nucléico útil para a determinação do ciclo celular (MASON; LLOYD, 1997). É permeável e interatua reciprocamente com o DNA e RNA por intercalação ou

atrações eletrostáticas respectivamente. Quando está ligada a DNA é muito similar à Fluoresceína, com uma excitação máxima de 502 nm e uma emissão máxima de 525 nm (verde). Quando se associa a ARN, o máximo de excitação é 460 nm (azul) e o máximo de emissão é 650 nm (vermelho)). (Figura 4). (MASON; LLOYD, 1997; RAPPOSCH; ZANGERL; GINZINGER, 2000).

Após os procedimentos de coloração as amostras foram avaliadas imediatamente no Microscópio Confocal de Varredura a Laser do Centro Integrado de Pesquisas-Faculdade de Odontologia de Bauru. O biofilme foi examinado em varias localizações para encontrar os pontos de maior espessura. Foi obtida 1 fotografia a 100X para ter uma visão panorâmica do segmento escolhido e 3 fotografias a 400X . As imagens foram feitas a intervalos de 1 µm desde a parte mais superior do biofilme até a superfície dentinária. A espessura do biofilme pôde ser então medida em micrometros contando o número de secções que foram necessárias para formar a imagem, somado ao intervalo utilizado durante o seccionamento do laser utilizando a ferramenta Z-stack do programa LAS-AF (AUSCHILL et al., 2005).

Obtiveram-se então os valores da espessura do biofilme antes de ser expostos às soluções irrigadoras com o uso do programa Leica Application Suite – Advance Fluorescence *software* (LAS AF, Leica, Mannheim, Germany).

Figura 4. Bloco de dentina após 72 horas de uso por um voluntário demonstrando a capacidade da laranja de acridina para corar as células bacterianas e a capacidade de formação do biofilme oral sobre a dentina *in situ*.

4.4 Tratamento dos blocos de dentina com as soluções irrigadoras.

As soluções irrigadoras selecionadas para este estudo foram o Hipoclorito de sódio 1%, 2.5% (Rioquímica Ltda., São Jose do Rio Preto, SP, Brasil) e 5% (Farmácia de manipulação Specifica, Bauru, SP, Brasil) e Clorexidina 2% (Villevie do Brasil Ltda., Joinville, SC, Brasil) (Figura 5).

Os blocos de dentina infetados foram divididos em 12 grupos experimentais com 10 blocos cada um, em função dos irrigantes avaliados, o tempo de exposição à solução irrigadora, a concentração e o volume da solução. Cada grupo teve 2 subgrupos de 5 blocos cada um. Para cada sub grupo se deixou um sexto bloco o qual foi irrigado com água destilada estéril que serviu de grupo controle. Nos grupos de 15 e 30 minutos a solução de Hipoclorito de sódio (NaOCl) e Clorexidina foi renovada a cada 5 minutos. A distribuição dos grupos esta apresentada na tabela 1.

Figura 5. Soluções experimentais: Hipoclorito de Sódio à 1%, 2.5% e 5% (A-B-C) e Clorexidina 2% (D)

Tabela 1. Distribuição dos espécimes em função das soluções irrigadoras testadas, concentração, tempo de exposição e volumes das soluções.

<i>Grupos</i>	<i>Solução</i>	<i>Concentração</i>	<i>Tempo de exposição</i>	<i>Volume</i>	<i>Espécimes (N)</i>
1	NaOCl	1%	05 min	500 µl	5
				1 mL	5
2	NaOCl	1%	15 min	500 µl	5
				1 mL	5
3	NaOCl	1%	30 min	500 µl	5
				1 mL	5
4	NaOCl	2.5%	05 min	500 µl	5
				1 mL	5
5	NaOCl	2.5%	15 min	500 µl	5
				1 mL	5
6	NaOCl	2.5%	30 min	500 µl	5
				1 mL	5
7	NaOCl	5%	05 min	500 µl	5
				1 mL	5
8	NaOCl	5%	15 min	500 µl	5
				1 mL	5
9	NaOCl	5%	30 min	500 µl	5
				1 mL	5
10	Clorexidina	2%	05 min	500 µl	5
				1 mL	5
11	Clorexidina	2%	15 min	500 µl	5
				1 mL	5
12	Clorexidina	2%	30 min	500 µl	5
				1 mL	5

Após a irrigação com as soluções em teste, os espécimes receberam uma irrigação final com 1 mL de água destilada estéril nos grupos de Clorexidina. Em todos os grupos de NaOCl, os blocos de dentina receberam uma irrigação com 1 mL de água destilada estéril seguido de Tiosulfato de sódio 5% durante 5 min, visando neutralizar o efeito residual do hipoclorito de sódio e pelo fato deste último interferir com a coloração das amostras e finalmente 1 mL de água destilada estéril. Uma vez realizados estes procedimentos, os blocos de dentina foram colocados em placas de cultura celular de 24 poços (TPP[®], Switzerland) e corados com uma solução de Laranja de Acridina 0.01% (Sigma Chemical Co., USA) durante 5 minutos, para sua posterior análise no CLSM. Desta forma, conseguiu-se obter os valores da espessura do biofilme após irrigação com as soluções mediante o uso do programa

Leica Application Suite-Advance Fluorescence software (LAS AF, Germany). (figura 6).

Finalmente as imagens foram ordenadas em pré e pós exposição às soluções irrigadora para sua posterior análise morfométrica. Para realizar a morfometria a imagem foi dividida em 100 quadrados iguais com o uso do programa PowerPoint 2010 (Microsoft Corp., Redmond, WA, USA) para a posterior contagem de cada um deles por dois avaliadores seguindo os critérios:

- Número de quadrados com biofilme: Presença de células inclusas em uma matriz extracelular unidas à dentina.
 - Número de quadrados com células isoladas: Presença de células individuais muito escassas, não coagregadas ou inclusas em uma matriz extracelular.
 - Número de quadrados com dentina limpa: Com ausência de estruturas bacterianas.
- (figura 7)

Figura 6. Blocos de dentina irrigados com água destilada estéril (A-B); blocos sendo corados com Laranja de acridina 0.01% durante 5 min (C); Microscópio Confocal de Varredura Laser (D); Ferramenta Z-Stack do software Leica LAS-AF (E).

Figura 7. Imagem representativa da dentina infectada intraoralmente mostrando a divisão da imagem em 100 quadrados iguais. Áreas de intensa colonização bacteriana são observadas na forma de biofilme. Presença de células isoladas (seta). A barra representa 20 μm .

4.5 Analise estatística

Para a análise estatística foi utilizado o programa GraphPad Prism 4 (GraphPad Software Inc, La Jolla, CA, EE.UU). O nível de significância foi fixado em $P < 0.05$. Para as comparações múltiplas entre os grupos e tempos foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis Dunn. A influencia do volume foi determinada mediante o teste de U-Mann Whitney.

5 *Resultados*

5 RESULTADOS

Um total de 720 imagens foram avaliadas. O teste de U-Mann Whitney não mostrou diferenças entre os grupos de 500µl e 1 mL. Isso significa que os resultados não foram dependentes do volume das soluções irrigadoras. Em consequência, os dados se combinaram para proporcionar uma média única de 10 amostras (30 imagens) por grupo.

Em geral, a espessura pré-operatória do biofilme esteve entre 30-50 µm sem diferença estatística significativa entre os grupos. A mediana e 25 - 75% percentil da porcentagem da espessura do biofilme em µm antes e após o contato com as soluções irrigadoras são apresentadas na tabela 2. No referente à espessura do biofilme após a irrigação com as soluções experimentais não foram encontradas diferenças estatísticas significantes entre os grupos irrigados com a solução de Clorexidina a 2% em nenhum dos 3 períodos de tempo ($P > 0.05$). A espessura do biofilme irrigado com NaOCl a 1% durante 5 minutos foi significativamente maior que os grupos de 15 e 30 minutos e o grupo de 15 minutos foi significativamente maior que o de 30 minutos ($P < 0.05$). Não houve diferenças estatísticas significantes entre os grupos de NaOCl a 2.5% em nenhum dos 3 tempos ($P > 0.05$). Não houve diferença estatística significativa entre 5 e 15 minutos de irrigação com NaOCl a 5%, nem entre 5 e 30 minutos. A espessura do biofilme após contato com NaOCl a 5% durante 15 minutos foi significativamente maior que a encontrada após 30 minutos.

No referente à análise morfométrica, a mediana e o 25 - 75% percentil dos parâmetros estudados como biofilme, células isoladas e dentina sem colonização bacteriana são apresentados na tabela 3. Não foram encontradas diferenças estatísticas entre os parâmetros pré-operatórios dos grupos ($P > 0.05$). Os valores mais altos na “dissolução do biofilme” foram encontrados nos grupos de NaOCl durante 30 minutos e NaOCl a 5% durante 5 e 15 minutos. As amostras tratadas com Clorexidina a 2% apresentaram os valores mais altos de “presença do biofilme” em comparação com todos os grupos de NaOCl ($P < 0.05$); com exceção do grupo de NaOCl a 1% durante 5 minutos ($P > 0.05$). Um grande aumento de “dentina limpa” foi encontrado após o tratamento com NaOCl durante 30 minutos ($P > 0.05$). Houve

um aumento significativo das “células isoladas” no grupo de NaOCl a 1% durante 15 minutos como consequência da desorganização incompleta do biofilme ($p < 0.05$).

A comparação dos tempos entre os grupos mostrou que ele não tem efeito sobre a clorexidina a 2% nem sobre o NaOCl a 5% em todos os parâmetros analisados ($P > 0,05$). Nos grupos de NaOCl a 1% e 2.5% o tempo alterou significativamente o biofilme e a dentina limpa ($P < 0.05$). Em ambos casos 5 minutos foi significativamente diferente que 15 minutos e este foi significativamente diferente que 30 minutos, com exceção do NaOCl a 1% durante 5 e 15 minutos que tiveram o mesmo efeito sobre a dentina limpa ($P < 0.05$). Imagens representativas das amostras pré e pós contato com as soluções irrigadoras são mostradas nos anexos C, D, E e F. A porcentagem da redução do biofilme e do incremento da dentina limpa após tratamento com as soluções irrigadoras é mostrada nos anexos G e H respectivamente.

Tabela 2. Mediana e 25 - 75% percentil da porcentagem da espessura do biofilme em μm antes e após o contato com Clorexidina a 2% (A), Hipoclorito de sódio a 1% (B), 2.5% (C) e 5% (D). Letras diferentes em cada coluna representam diferenças estadísticas significantes. Kruskal Wallis-Dunn ($P < 0.05$). (N=10).

	5 min		15 min		30 min		
	Pré	Pós	Pré	Pós	Pré	Pós	
A	36.00 (30.00 - 49.00) a	30.50 (23.00 - 43.00) a	30.00 (25.00 - 44.50) a	28.00 (16.00 - 36.00) a	30.00 (24.50 - 36.00) a	28.50 (19.50 - 35.00) a	
B	28.00 (23.00 - 60.00) a	18.00 (14.00 - 24.00) b	39.00 (28.00 - 45.50) a	14.00 (12.00 - 17.00) b	37.00 (23.00 - 44.00) a	10.00 (8.00 - 13.50) b	
C	31.00 (28.00 - 41.00) a	15.50 (13.00 - 21.50) bc	30.50 (26.00 - 36.00) a	13.50 (9.00 - 18.00) b	37.50 (29.50 - 45.00) a	12.00 (10.00 - 16.00) b	
D	32.00 (28.00 - 37.00) a	13.00 (10 - 16.00) c	37.50 (30.00 - 50.00) a	14.00 (13.00 - 18.00) b	40.00 (32.00 - 47.50) a	12.00 (10.00 - 16.00) b	

Tabela 3. Mediana e 25 - 75% percentil da porcentagem do Biofilme, células isoladas e dentina limpa antes e após o contato com Clorexidina a 2% (A), Hipoclorito de sódio a 1% (B), 2.5% (C) e 5% (D). Letras diferentes em cada coluna representam diferenças estadísticas significantes. Kruskal Wallis-Dunn ($P < 0.05$). (N=10).

Biofilme	5 min		15 min		30 min	
	Pré	Pós	Pré	Pós	Pré	Pós
A	92.00 (84.00 - 98.00) a	89.50 (83.00 - 95.50) a	96.00 (84.00 - 99.00)a	93.50 (87.00 - 98.50)a	92.00 (81.50 - 98.50) a	86.50 (64.50 - 94.00) a
B	94.00 (87.00 - 98.00) a	71.50 (32.0 - 92.00) ab	95.50 (92.00 - 100)a	30.50 (9.50 - 58.00) b	94.50 (87.00 - 100) a	3.00 (0.00 - 6.50) b
C	95.00 (89.00 - 99.50) a	60.50 (14.00 - 78.50) b	96.00 (86.00 - 100)a	12.00 (8.00 - 39.00) bc	96.00 (86.50 - 100) a	1.50 (0.00 - 7.50) b
D	92.00 (82.50 - 97.00) a	3.00 (0.00 - 8.50) c	93.50 (87.00 - 98.00)a	5.00 (2.00 - 12.00) c	91.00 (85.00 - 97.50) a	2.00 (0.00 - 9.00) b
Células isoladas						
A	1.00 (0.00 - 5.00) a	2.50 (0.00 - 7.00) ab	0.00 (0.00 - 1.50) a	0.00 (0.00 - 3.50) a	0.50 (0.00 - 2.50) a	0.00 (0.00 - 4.00) a
B	1.00 (0.00 - 5.50) a	1.00 (0.00 - 3.00) ab	2.00 (0.00 - 4.00) a	20.00 (6.00 - 39.50) b	0.50 (0.00 - 3.50) a	1.00 (0.00 - 3.00) a
C	1.00 (0.00 - 4.50) a	7.50 (0.00 - 21.00) b	0.00 (0.00 - 3.00) a	1.00 (0.00 - 10.00) a	0.00 (0.00 - 6.00) a	0.00 (0.00 - 4.50) a
D	2.50 (0.00 - 10.50) a	0.00 (0.00 - 4.00) a	1.50 (0.00 - 6.50) a	0.00 (0.00 - 1.00) a	0.00 (0.00 - 5.00) a	0.50 (0.00 - 3.50) a
Dentina						
A	3.50 (0.50 - 9.50) a	6.00 (1.00 - 10.50) a	2.50 (0.00 - 13.00) a	4.50 (1.00 - 12.00) a	7.00 (0.00 - 17.50) a	10.50 (4.00 - 31.00) a
B	3.00 (0.50 - 8.50) a	24.50 (5.00 - 58.00) ab	0.50 (0.00 - 5.00) a	36.00 (16.00 - 74.50) b	2.00 (0.00 - 11.50) a	96.00 (90.00 - 99.00) b
C	2.00 (0.00 - 5.50) a	31.00 (7.50 - 67.00) b	1.50 (0.00 - 12.00) a	83.50 (54.00 - 89.00) b	3.00 (0.00 - 8.00) a	96.00 (86.50 - 100.0) b
D	3.00 (0.50 - 7.00) a	96.00 (82.00 - 100) c	2.00 (0.00 - 5.50) a	93.00 (86.00 - 98.00) c	3.00 (1.50 - 9.50) a	94.00 (87.50 - 99.50) b

6 *Discussão*

6 DISCUSSÃO

O presente estudo teve como propósito analisar o efeito do hipoclorito de sódio em diferentes concentrações e da clorexidina a 2% na remoção de biofilme oral formado “in situ” por meio do Microscópio Confocal de Varredura a Laser.

Embora exista uma vasta literatura a respeito da utilização das soluções de hipoclorito de sódio e clorexidina como irrigantes na endodontia, pouca informação esta disponível sobre o efeito dessas soluções sobre biofilmes polimicrobianos. Diversos autores têm sugerido um aumento da resistência aos agentes antimicrobianos das bactérias na forma de biofilme em comparação com as bactérias em estado planctônico, devido a que a maioria das pesquisas sobre soluções irrigadoras utilizadas na endodontia foram baseadas em estudos que utilizaram bactérias em suspensão; o efeito destas soluções irrigadoras sobre os biofilmes pode ser questionável.

O estudo da relação entre a endodontia e os biofilmes microbianos, principalmente consiste na observação das condensações bacterianas no sistema de canais radiculares nos dentes com ou sem tratamento endodôntico (NAIR et al., 2005) e a habilidade das soluções irrigadoras ou procedimentos endodônticos para dissolvê-los (DISTEL; HATTON; GILLESPIE, 2002; WILLIAMSON; CARDON; DRAKE, 2009). Por outro lado, a persistência de infecção em canais tratados endodônticamente pode ocorrer devido à existência de bactérias nos túbulos dentinários ou até por bactérias introduzidas dentro do canal radicular (RINGEL et al., 1982, BUCK et al., 2001;). A grande implicação dos biofilmes residuais que sobrevivam ao tratamento endodôntico é que estes podem atuar como um escudo protetor para as bactérias que sobrevivam dentro dos túbulos dentinários. Adicionalmente, os biofilmes residuais podem ser considerados como uma camada orgânica a qual pode interferir com a adaptação dos materiais obturadores como cimentos endodônticos.

6.1 Da metodologia.

Os estudos *in vitro* são muito importantes para determinar as interações bacterianas que ocorrem em um biofilme (KOLENBRANDER et al., 1993; COOK; COSTERTON; LAMONT, 1998; PALMER et al., 2001; DIAZ et al., 2006; STANDAR et al., 2010), mas não são capazes de simular de uma forma exata as condições de crescimento bacteriano na boca, como por exemplo, a diversidade de nutrientes, mudanças de umidade e pH, temperatura, saliva; etc.

Visando resolver estas limitações, KOULOURIDES et al., em 1974 introduziram os modelos *in situ* idealizados para o estudo dos processos que envolvem as cáries dentárias, que no futuro foram adaptadas para pesquisas na endodontia. As vantagens e desvantagens do uso de modelos experimentais *in situ* para indução de cáries foram descritas por FEATHERSTONE, 1992; FEATHERSTONE; ZERO, 1992; ZERO, 1995; a aplicação desses modelos na Endodontia tem vantagens e desvantagens. Como vantagens citam-se:

- a) A infecção bacteriana das amostras é feita na cavidade oral humana, a qual oferece condições diferentes aos estudos *in vitro* e em animais;
 - b) Facilidade da microbiota oral humana para colonizar uma variedade de superfícies;
 - c) As variáveis experimentais são facilmente controladas e há flexibilidade do modelo experimental;
 - d) É possível a integração de várias técnicas de avaliação das ciências básicas, aumentando a sensibilidade e validade científica da pesquisa;
 - e) A formação do biofilme é realizada em um curto tempo experimental em comparação com os estudos *in vitro*. Esta redução no tempo facilita superar muitos aspectos éticos nas pesquisas em seres humanos;
 - f) O custo é muito menor que os estudos laboratoriais longitudinais;
 - g) Característica polimicrobiana do biofilme oral, o qual pode representar pelo menos 800 espécies bacterianas na boca. (AAS et al., 2008; PASTER et al., 2006; PREZA et al., 2008).
-

Desvantagens:

- a) Limitação do numero de participantes devido à incomodidade do uso do aparelho intraoral;
- b) Dependência da colaboração dos participantes.

Vale ressaltar, que as variações anatômicas do sistema de canais radiculares servem como proteção para bactérias alojadas nele, impedindo a penetração dos antimicrobianos (NAIR et al., 2005). Por esta razão, a falta de variações anatômicas nos corpos de prova e a incapacidade de determinar a viabilidade bacteriana foram as principais limitações do presente estudo.

Adicionalmente, neste estudo foi escolhido o biofilme oral polimicrobiano formado *in situ* pelas interações bacterianas apresentadas nele, as quais não são encontradas em biofilmes uni-espécie (COOK; COSTERTON; LAMONT, 1998; YOSHIDA et al., 2006; STANDAR et al., 2010) e pela presença de canais de água e matriz extracelular inexistente nas bactérias planctônicas. A matriz extracelular dificulta a penetração dos antimicrobianos na sua superfície, limitando a efetividade destes. (HSU; JAMIESON; BLACKWELL, 1994; ROBINSON et al., 2006).

Até a presente data, na literatura somente existem dois estudos que adaptaram o modelo de KOULOURIDES para pesquisas de infecção bacteriana *in situ* enfocadas na endodontia (BARTHEL et al., 2002; VIRTEJ et al., 2007).

BARTHEL et al., em 2002, utilizaram cilindros de dentina, colocados em um aparelho intraoral para obter infecção dentinária *in situ*; uma vez comprovado o crescimento bacteriano, os cilindros receberam medicação intracanal e foram levados à incubadora e, uma semana depois foi feita a sua remoção. Esta mesma metodologia foi utilizada por VIRTEJ et al., em 2007 os quais, para testar diferentes métodos de desinfecção do canal radicular, utilizaram um modelo experimental *in situ* para facilitar a colonização bacteriana. Diferentemente do nosso estudo, os pesquisadores utilizaram métodos laboratoriais para determinar o efeito dos grupos experimentais sobre as bactérias, deixando por 14 dias as amostras em incubadora, enquanto que, no presente estudo, a análise do biofilme pré e pós exposição às soluções irrigadoras, foi realizado imediatamente depois da remoção das amostras da cavidade oral.

Diversos substratos tem sido utilizados para induzir a colonização e formação dos biofilmes, como dentes humanos, dentes bovinos, discos de

hidroxiapatita, meio de cultivo, membranas de nitrocelulose e outros (HELMERHORST et al., 1999; SHU et al., 2000; ZAURA-ARITE; VAN MARLE; TEN CATE, 2001; DISTEL; HATTON; GILLESPIE, 2002; LEONARDO et al., 2002; DENG; BUIJS; TEN CATE, 2004; DUGGAN; SEDGLEY, 2007; CHAI et al., 2007; CHAVEZ DE PAZ; HAMILTON; SVENSATER, 2008; AL-AHMAD et al., 2009; SHEN; STOJICIC; HAAPASALO, 2010;). Nesta pesquisa foram utilizados blocos de dentina bovina como uma modificação da metodologia dos estudos tanto *in vitro* como *in situ* que utilizaram o esmalte bovino para investigar o processo de lesões cariosas e a composição do biofilme. (FEATHERSTONE; MELLBERG, 1981; ; ZERO et al., 1990; TENUTA et al., 2003; PAES LEME et al., 2004; PIN et al., 2005; MARTINHON et al., 2006) Adicionalmente, no presente estudo, foi utilizada dentina bovina devido a sua grande similaridade com a dentina humana (NAKAMICHI; IWAKU; FUSAYAMA, 1983). Embora, o numero e diâmetro dos túbulos dentinários seja significativamente maior na dentina bovina em comparação com a dentina humana (SCHILKE et al., 2000), este fator não foi relevante neste estudo, pela razão que foi estudada a formação de biofilme oral na superfície dentinária e não a penetração bacteriana intratubular.

Um problema importante na desinfecção de canais necróticos *in vivo* é o potencial de inativação antimicrobiana exercido pela presença de componentes orgânicos, bactérias não viáveis, pús, exsudado ou raspas de dentina, as quais, em altas concentrações podem inativar a efetividade antimicrobiana dos irrigantes endodônticos (HAAPASALO et al., 2007). Por esses motivos, as soluções experimentais foram renovadas a cada 5 minutos nos grupos que utilizaram os períodos de tempo de 15 e 30 minutos. No presente estudo, o hipoclorito de sódio e a Clorexidina foram usados como soluções irrigantes experimentais devido à vasta literatura que recomenda seu uso como irrigantes na endodontia, sendo utilizados por quase um século e mais de um quarto de século respetivamente. (COOLIDGE, 1919; WALKER, 1936; GROSSMAN, 1941; GROSSMAN; NEIMAN, 1941; SHIH; MARSHALL; ROSEN, 1970; MARTIN, 1975; TUCKER; MIZRAHI; SELTZER, 1976; GRULLIERO et al., 1978; CUNNINGHAM; BALEKJIAN, 1980; DELANY et al., 1982; RINGEL et al., 1982; ORSTAVIK; HAAPASALO, 1990; VAHDATY; PITTFORD; WILSON, 1993; OHARA; TORABINEJAD; KETTERING, 1993; JEANSONNE; WHITE, 1994; YESILSOY et al., 1995; WHITE, R.R.; HAYS; JANER, 1997; CHANDLER, 1998; SIQUEIRA et al., 1998; LEONARDO et al., 1999; AYHAN et al.,

1999; SEGURA et al., 1999; WHITE, R.R.; JANER; HAYS, 1999; BUCK, R.A. et al., 2001; FERRAZ et al., 2001; GOMES et al., 2001; SPRATT et al., 2001; SCHAFER; BOSSMANN, 2001; ESTRELA et al., 2003; ONCAG et al., 2003; SASSONE et al., 2003; WEBER et al., 2003; YAMASHITA et al., 2003; ARI; ERDEMIR; BELLI, 2004; ERCAN et al., 2004; SILVA et al., 2004; CARSON; GOODELL; MCCLANAHAN, 2005; CLEGG et al., 2006; DUNAVANT et al., 2006; SENA et al., 2006; TANOMARU FILHO et al., 2006; OLIVEIRA et al., 2007; SIQUEIRA et al., 2007; SASSONE et al., 2008; ARIAS-MOLIZ et al., 2009; BRYCE et al., 2009; VIANNA, 2009; VIANNA; GOMES, 2009; CHANDRA et al., 2010; CHAVEZ DE PAZ; BERGENHOLTZ; SVENSATER, 2010; GOMES; MARTINHO; VALERA et al., 2010).

Para o estudo do biofilme, tem sido utilizadas varias metodologias, entre as quais se encontram a Microscopia eletrônica de varredura e a Microscopia confocal de varredura laser. A microscopia eletrônica de varredura (MEV) é usada para visualizar microrganismos no canal radicular, no interior dos túbulos dentinários, na superfície externa das raízes e na região periapical (TRONSTAD; BARNETT; CERVONE, 1990; SEN; PISKIN; DEMIRCI, 1995; HULSMANN; RUMMELIN; SCHAFERS, 1997; GUTIERREZ; BRIZUELA; VILLOTA, 1999; LEONARDO et al., 2002; MICKEL et al., 2007; RICHARDSON et al., 2009), permitindo observar a morfologia do biofilme, morfologia celular e presença de matriz extracelular de polissacarídeo (PAPPEN et al., 2010). Além disso, as amostras metalizadas para sua posterior análise no MEV podem ser guardadas para futuros estudos. Todavia, este tratamento das amostras antes de sua análise ocasiona um ressecamento do biofilme e possível diminuição de sua espessura.

Utilizamos a Microscopia Confocal de Varredura Laser (CLSM) por oferecer algumas vantagens sobre o MEV no estudo dos biofilmes bacterianos, entre a quais podemos citar as seguintes:

- a) O processamento das amostras não é destrutivo, portanto tem menos probabilidades de produzir artefatos. (DEL CARPIO-PEROCHENA; 2008)
 - b) As amostras não precisam de um tratamento prévio para sua analise microscópica;
 - c) Possibilidade de medir a espessura do biofilme antes e após o contato com as soluções experimentais;
-

d) Determinação da viabilidade bacteriana mediante o uso de corantes específicos.

Como desvantagens podemos citar:

a) As amostras não são reutilizadas, uma vez que, a energia gerada pelo laser com os fluoróforos da amostra fazem este processo irreversível pela paulatina perda da fluorescência (WHITE, AMOS, FORDHAM, 1987);

b) Diferente da análise histológica, o CLSM não tem a capacidade de medir cortes de pequena espessura, limitando o numero de cortes da amostra e, conseqüentemente, o estudo de áreas de vital importância, como por exemplo, o terço apical da raiz. (ORDINOLA-ZAPATA; 2009)

É importante mencionar a intrínseca relação que houve, neste, estudo entre a Laranja de acridina e o CLSM para identificar o biofilme bacteriano. No entanto, é importante dar ênfase que a Laranja de acridina possui uma alta afinidade pela dentina peritubular, restos necróticos e DNA extracelular. Levando em consideração que 85% de um biofilme é matriz extracelular e DNA extracelular (BRANDA et al., 2005; STEINBERGER; HOLDEN, 2005; SIQUEIRA; ROCAS, 2009), este fato pode interferir com uma adequada visualização bacteriana, mas este fato foi desconsiderado pela razão que o foco da pesquisa foi analisar a espessura do biofilme e não espécies bacterianas isoladas ou a vitalidade das mesmas. A afinidade da Laranja de acridina para corar dentina peritubular foi um problema nas etapas iniciais da pesquisa, porque no momento de escanear as amostras desde a parte superior do biofilme até o começo da dentina, foi difícil diferenciar onde finalizava o biofilme e começava a dentina. Este problema foi resolvido com o tratamento dos corpos de prova com EDTA 17% antes de ser usados pelo voluntário durante 3 dias. Embora a Laranja de acridina corasse a dentina peritubular, foi possível diferenciá-la do biofilme pela visualização da entrada dos túbulos dentinários.

As imagens pré e pós irrigação foram submetidas a análise morfométrica, a qual foi utilizada para quantificar os restos de biofilme, células isoladas e dentina limpa. Esta análise consistiu em dividir a imagem em 100 quadrados, cada um com a

mesma área. Similar metodologia foi empregada por MARCHESAN et al., 2003; BARATTO-FILHO et al., 2004; FORNARI et al., 2010; GONÇALVES et al., 2010.

A análise morfométrica foi realizada em vista que a Ferramenta Z-Stack do software Leica LAS-AF, somente mede a espessura do biofilme desde sua parte mais alta até a superfície dentinária, sem ter em consideração a biomassa total na superfície dos blocos de dentina. (ANEXO I).

6.2 Dos resultados.

No presente estudo encontrou-se que a concentração de hipoclorito de sódio foi diretamente proporcional à dissolução do biofilme, enquanto que a Clorexidina a 2% não foi capaz de removê-lo. Estes resultados tem concordância com os de CLEGG et al., que em 2006, estudaram o efeito do hipoclorito de sódio à 1%, 3% e 6% e Clorexidina 2% durante 15 minutos sobre biofilmes polimicrobianos desenvolvidos em secções de ápices. As imagens obtidas por meio do MEV, mostraram que o NaOCl 3% e 6% foram capazes de dissolver o biofilme em 100%, seguido do NaOCl a 1% que o dissolveu parcialmente e a Clorexidina a 2% que o manteve intato. É importante ressaltar que nesse estudo, a análise em cultura celular revelou que o NaOCl a 6% e a Clorexidina a 2% apresentaram 0% crescimento bacteriano positivo, enquanto que o NaOCl a 1% e 3% apresentaram 90% e 20% de crescimento bacteriano positivo respectivamente.

Por outro lado, os resultados do presente estudo, mostraram que o NaOCl em sua menor concentração (1%) e tempo (5 min) foi mais eficaz que a Clorexidina a 2% na diminuição da espessura do biofilme. Resultados similares foram encontrados por CHAVEZ DE PAZ, BERGENHOLTZ, SVENSATER, em 2010, que analisaram o efeito de vários irrigantes durante 5 minutos sobre biofilmes uni-espécie formados durante 24 horas, encontrando que o NaOCl a 1% afetou a integridade da membrana celular de todos os microrganismos (*E. faecalis*, *L.paracasei*, *S. anginosus* e *S.gordonii*) além de remover o biofilme em 91%, 84%, 76% e 71% respectivamente. A Clorexidina a 2.5% teve um leve efeito na integridade da membrana celular bacteriana e removeu o biofilme em 49%, 9%, 79% e 13% respectivamente.

De igual forma BRYCE et al., em 2009, encontraram que em períodos de tempo de 1, 5 e 10 minutos, o NaOCl a 1% teve um efeito antibacteriano e

capacidade de dissolução significativamente maior que a Clorexidina a 0.2% nos 3 períodos de tempo experimentais sobre biofilmes uni e bi-espécies desenvolvidos em membranas de nitrocelulose durante 72 horas.

Em nosso estudo, nenhum volume nem período de tempo experimental da Clorexidina a 2% foi capaz de remover o biofilme bacteriano. Resultados similares foram encontrados por ZAURA-ARITE VAN MARLE, TEN CATE, em 2001, que estudaram o efeito da Clorexidina a 0.2% sobre biofilmes formados *in situ* durante 6, 24 e 48 horas em dentina bovina. Foi estudada a camada externa, média e interna do biofilme. Após 1 minuto de irrigação analisaram novamente as 3 camadas do biofilme e encontraram que a Clorexidina a 0.2% só teve efeito antibacteriano significativo sobre o biofilme formado por 6 horas e na camada externa do biofilme formado durante 48 horas. Os resultados desse estudo podem ser questionáveis pela baixa concentração de Clorexidina utilizada, pelo período de tempo experimental curto e pela falta de agitação mecânica. No entanto, SHEN et al., em 2009 encontraram que em períodos de tempo de 1, 3 e 10 minutos a Clorexidina a 2% não teve um efeito antibacteriano total sobre biofilme formado em discos de hidroxiapatita. Nesse estudo, segundo o observado nas imagens feitas com o CLSM, foi possível determinar que a Clorexidina a 2% não conseguiu dissolver o biofilme em nenhum dos 3 períodos.

SHEN et al., em 2010, encontraram que a Clorexidina a 2% em associação com a agitação sônica e ultrassônica durante 1 e 3 minutos não afetou significativamente a integridade da membrana celular bacteriana. As imagens obtidas por meio do CLSM revelaram uma grande colonização bacteriana sobre a hidroxiapatita após a agitação sônica e ultrassônica com Clorexidina a 2% nos dois períodos de tempo experimentais.

Constatamos a alta capacidade de dissolução de tecido orgânico que o Hipoclorito de sódio possui e que ela era diretamente proporcional ao tempo de exposição à solução irrigadora. Estes resultados coincidem com os de NAENNI, THOMA, ZEHNDER (2004) que estudaram a capacidade de dissolução do hipoclorito de sódio a 1%, Clorexidina a 10% e outras 5 soluções em polpas bovinas durante 15, 30, 60, 90 e 120 minutos. Só o NaOCl a 1% teve uma substancial capacidade de dissolução tecidual que foi aumentando juntamente ao tempo. O NaOCl a 1% teve aproximadamente 50% de eficácia na dissolução da polpa no período de 30 minutos. Esse resultado difere do nosso estudo, onde todas as

concentrações de NaOCl durante 30 minutos dissolveram quase 100% do biofilme. Este fato pode ser explicado pela renovação das soluções irrigadoras a cada 5 minutos efetuada em nosso estudo. É importante lembrar que a presença de componentes orgânicos em elevadas concentrações pode inativar a efetividade antimicrobiana dos irrigantes endodônticos (HAAPASALO et al., 2007).

De igual forma, OKINO et al., em 2004, compararam a capacidade de dissolução da Clorexidina a 2% em forma aquosa e gel e do Hipoclorito de sódio a 0.5, 1 e 2.5% sobre polpa bovina. Os resultados mostraram que a Clorexidina a 2% (aquosa e gel) não conseguiu dissolver a polpa em um período de tempo maior de 6 horas, enquanto que todas as concentrações de NaOCl dissolveram a polpa. A velocidade de dissolução variou de acordo com a concentração do NaOCl. Este último ponto, coincide com os resultados encontrados por SPANO et al., em 2001, que analisaram a capacidade de dissolução do NaOCl a 0.5, 1, 2.5 e 5%.

Outro estudo importante de mencionar é o realizado por BELTZ, TORABINEJAD, POURESMAIL (2003) que avaliaram a capacidade de dissolução do hipoclorito de sódio em várias concentrações sobre a polpa e dentina bovina necrótica. Apesar de todas as concentrações de NaOCl removerem o componente orgânico da polpa e da dentina com eficácia, somente o NaOCl a 2.6 e 5.25% a solubilizaram mais do que 90%. O NaOCl a 5.25% foi capaz de dissolver virtualmente todo o componente orgânico da dentina.

É importante lembrar que embora o hipoclorito de sódio seja o irrigante comumente utilizado na terapia endodôntica, ele pode causar alterações no conteúdo orgânico e mineral da estrutura dentinária quando é utilizado em altas concentrações (MCCOMB; SMITH, 1975). Este enunciado tem concordância com SLUTZKY-GOLDBERG et al., que em 2004 avaliaram o efeito do Hipoclorito de sódio a 2.5 e 6% em períodos de tempo de 5, 10 e 20 minutos sobre a microdureza da dentina. A microdureza foi medida a 500, 1000 e 1500 μm . Embora o NaOCl em ambas as concentrações diminua a microdureza dentinária a 500 μm de profundidade, houve uma diferença marcada entre os períodos de tempo de 10 e 20 minutos. Nas três profundidades, a diminuição da microdureza dentinária foi mais marcada após a irrigação com NaOCl a 6% em comparação com NaOCl a 2.5%. Estes resultados coincidem com o nosso trabalho, onde algumas vezes foi observado que o dano estrutural dentinário causado pelo NaOCl foi diretamente proporcional à concentração da solução e ao tempo de contato com a dentina. (ver ANEXO D)

Por todo o antes mencionado, pode-se concluir que o hipoclorito de sódio é uma solução irrigadora eficaz na dissolução do biofilme polimicrobiano. Adicionalmente, observou-se que os biofilmes microbianos aparentam não ter resistência intrínseca ao hipoclorito de sódio pelo qual pode ser deduzido que a dificuldade dele para sanificar canais radiculares necróticos se deve à falta de contato da solução irrigadora com os biofilmes do canal radicular, o qual se deve as irregularidades anatômicas do canal radicular ou pelo inadequado fluxo da solução irrigadora no terço apical (SUSIN et al., 2010).

7 *Conclusões*

7 CONCLUSÕES

1. O Hipoclorito de sódio foi capaz de dissolver o biofilme, sendo que o maior efeito foi conseguido na concentração de 5% em todos os tempos analisados.
2. A Clorexidina a 2% não foi capaz de eliminar o biofilme mesmo no tempo de 30 minutos

Referências

REFERÊNCIAS

Aas JA, Griffen AL, Dardis SR, Lee AM, Olsen I, Dewhirst FE, et al. Bacteria of dental caries in primary and permanent teeth in children and young adults. *J Clin Microbiol.* 2008;46(4):1407-17.

Abdullah M, Ng YL, Gulabivala K, Moles DR, Spratt DA. Susceptibilities of two *Enterococcus faecalis* phenotypes to root canal medications. *J Endod.* 2005;31(1):30-6.

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.

Ari H, Erdemir A, Belli S. Evaluation of the effect of endodontic irrigation solutions on the microhardness and the roughness of root canal dentin. *J Endod.* 2004;30(11):792-5.

Arias-Moliz MT, Ferrer-Luque CM, Gonzalez-Rodriguez MP, Valderrama MJ, Baca P. Eradication of *Enterococcus faecalis* biofilms by cetrimide and chlorhexidine. *J Endod.* 2010;36(1):87-90.

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.

Ayhan H, Sultan N, Cirak M, Ruhi MZ, Bodur H. Antimicrobial effects of various endodontic irrigants on selected microorganisms. *Int Endod J.* 1999;32(2):99-102.

Baratto-Filho F, de Carvalho JR, Jr., Fariniuk LF, Sousa-Neto MD, Pecora JD, Cruz-Filho AM. Morphometric analysis of the effectiveness of different concentrations of sodium hypochlorite associated with rotary instrumentation for root canal cleaning. *Braz Dent J.* 2004;15(1):36-40.

Barthel CR, Zimmer S, Zilliges S, Schiller R, Gobel UB, Roulet JF. In situ antimicrobial effectiveness of chlorhexidine and calcium hydroxide: gel and paste versus gutta-percha points. *J Endod.* 2002;28(6):427-30.

Beltz RE, Torabinejad M, Pouresmail M. Quantitative analysis of the solubilizing action of MTAD, sodium hypochlorite, and EDTA on bovine pulp and dentin. *J Endod.* 2003;29(5):334-7.

Branda SS, Vik S, Friedman L, Kolter R. Biofilms: the matrix revisited. *Trends Microbiol.* 2005;13(1):20-6.

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.

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.

Buck RA, Eleazer PD, Staat RH, Scheetz JP. Effectiveness of three endodontic irrigants at various tubular depths in human dentin. *J Endod.* 2001;27(3):206-8.

Camara AC, Albuquerque MM, Aguiar CM, 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.

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.

Carson KR, Goodell GG, McClanahan SB. Comparison of the antimicrobial activity of six irrigants on primary endodontic pathogens. *J Endod.* 2005;31(6):471-3.

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.

Chandra SS, Miglani R, Srinivasan MR, Indira R. Antifungal efficacy of 5.25% sodium hypochlorite, 2% chlorhexidine gluconate, and 17% EDTA with and without an antifungal agent. *J Endod.* 2010;36(4):675-8.

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(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.

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.

Cook GS, Costerton JW, Lamont RJ. Biofilm formation by *Porphyromonas gingivalis* and *Streptococcus gordonii*. *J Periodontal Res*. 1998;33(6):323-7.

Coolidge E. The diagnosis and treatment of conditions resulting from diseased dental pulps. *J Na Dent Assoc*. 1919; 6:337-49

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.

del Carpio-Perochena A. Penetração intratubular de diferentes cimentos endodônticos analisados em microscopia confocal de varredura laser. [Monografia (Especialização)]. Bauru. FOB, Univ. de São Paulo; 2008.

Delany GM, Patterson SS, Miller CH, Newton CW. The effect of chlorhexidine gluconate irrigation on the root canal flora of freshly extracted necrotic teeth. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1982;53(5):518-23.

Delgado RJ, Gasparoto TH, Sipert CR, Pinheiro CR, Moraes IG, Garcia RB, et al. Antimicrobial effects of calcium hydroxide and chlorhexidine on *Enterococcus faecalis*. *J Endod*. 2010;36(8):1389-93.

Deng DM, Buijs MJ, ten Cate JM. The effects of substratum on the pH response of *Streptococcus mutans* biofilms and on the susceptibility to 0.2% chlorhexidine. *Eur J Oral Sci*. 2004;112(1):42-7.

Diaz PI, Chalmers NI, Rickard AH, Kong C, Milburn CL, Palmer RJ, Jr., et al. Molecular characterization of subject-specific oral microflora during initial colonization of enamel. *Appl Environ Microbiol.* 2006;72(4):2837-48.

Distel JW, Hatton JF, Gillespie MJ. Biofilm formation in medicated root canals. *J Endod.* 2002;28(10):689-93.

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.

Eick S, Seltsmann T, Pfister W. Efficacy of antibiotics to strains of periodontopathogenic bacteria within a single species biofilm - an in vitro study. *J Clin Periodontol.* 2004;31(5):376-83.

Ercan E, Ozekinci T, Atakul F, Gul K. Antibacterial activity of 2% chlorhexidine gluconate and 5.25% sodium hypochlorite in infected root canal: in vivo study. *J Endod.* 2004;30(2):84-7.

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.

Estrela C, Ribeiro RG, Estrela CR, Pecora JD, Sousa-Neto MD. Antimicrobial effect of 2% sodium hypochlorite and 2% chlorhexidine tested by different methods. *Braz Dent J.* 2003;14(1):58-62.

Featherstone JD, Mellberg JR. Relative rates of progress of artificial carious lesions in bovine, ovine and human enamel. *Caries Res.* 1981;15(1):109-14.

Featherstone JD, Zero DT. An in situ model for simultaneous assessment of inhibition of demineralization and enhancement of remineralization. *J Dent Res.* 1992;71 Spec No:804-10.

Featherstone JD. Consensus conference on intra-oral models: evaluation techniques. *J Dent Res.* 1992;71 Spec No:955-6.

Ferraz CC, Gomes BP, Zaia AA, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. In vitro assessment of the antimicrobial action and the mechanical ability of chlorhexidine gel as an endodontic irrigant. *J Endod*. 2001;27(7):452-5.

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.

Fimple JL, Fontana CR, Foschi F, Ruggiero K, Song X, Pagonis TC, et al. Photodynamic treatment of endodontic polymicrobial infection in vitro. *J Endod*. 2008;34(6):728-34.

Fornari VJ, Silva-Sousa YT, Vanni JR, Pecora JD, Versiani MA, Sousa-Neto MD. Histological evaluation of the effectiveness of increased apical enlargement for cleaning the apical third of curved canals. *Int Endod J*. 2010;43(11):988-94.

Foschi F, Fontana CR, Ruggiero K, Riahi R, Vera A, Doukas AG, et al. Photodynamic inactivation of *Enterococcus faecalis* in dental root canals in vitro. *Lasers Surg Med*. 2007;39(10):782-7.

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.

George S, Kishen A. Photophysical, photochemical, and photobiological characterization of methylene blue formulations for light-activated root canal disinfection. *J Biomed Opt*. 2007;12(3):034029.

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.

Gomes BP, Martinho FC, Vianna ME. Comparison of 2.5% sodium hypochlorite and 2% chlorhexidine gel on oral bacterial lipopolysaccharide reduction from primarily infected root canals. *J Endod*. 2009;35(10):1350-3.

Gonçalves LCO, Junior ECS, Frota MF, Marques AAF, Garcia LFR. Morphometrical analysis of cleaning capacity of a hybrid instrumentation in mesial flattened root canals. *Aust Endod J*. Article in press. doi:10.1111/j.1747-4477.2010.00255.x

Grulliero A, Antonelli F, Bifano A, Luglio A, Parascandolo S, Perna G. [Sterility of endodontic instruments: chlorhexidine]. *Riv Ital Stomatol*. 1978;47(5):22-3.

Gutierrez JH, Brizuela C, Villota E. Human teeth with periapical pathosis after overinstrumentation and overfilling of the root canals: a scanning electron microscopic study. *Int Endod J*. 1999;32(1):40-8.

Haapasalo M, Qian W, Portenier I, Waltimo T. Effects of dentin on the antimicrobial properties of endodontic medicaments. *J Endod*. 2007;33(8):917-25.

Helmerhorst EJ, Hodgson R, van 't Hof W, Veerman EC, Allison C, Nieuw Amerongen AV. The effects of histatin-derived basic antimicrobial peptides on oral biofilms. *J Dent Res*. 1999;78(6):1245-50.

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.

Hsu S, Jamieson AM, Blackwell J. Viscoelastic studies of extracellular matrix interactions in a model native collagen gel system. *Biorheology*. 1994;31(1):21-36.

Hulsmann M, Rummelin C, Schafers F. Root canal cleanliness after preparation with different endodontic handpieces and hand instruments: a comparative SEM investigation. *J Endod*. 1997;23(5):301-6.

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.

Jacinto RC, Gomes BP, Ferraz CC, Zaia AA, Filho FJ. Microbiological analysis of infected root canals from symptomatic and asymptomatic teeth with periapical periodontitis and the antimicrobial susceptibility of some isolated anaerobic bacteria. *Oral Microbiol Immunol*. 2003;18(5):285-92.

Jeanson MJ, White RR. A comparison of 2.0% chlorhexidine gluconate and 5.25% sodium hypochlorite as antimicrobial endodontic irrigants. *J Endod.* 1994;20(6):276-8.

Jiang LM, Hoogenkamp MA, Van der Sluis LWM, Wesselink PR, Crielaard W, Deng DM. Resazurin Metabolism Assay for Root Canal Disinfectant Evaluation on Dual-species Biofilms. *J Endod.* Article in press. doi:10.1016/j.joen.2010.09.007

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.

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.

Kolenbrander PE, Ganeshkumar N, Cassels FJ, Hughes CV. Coaggregation: specific adherence among human oral plaque bacteria. *FASEB J.* 1993;7(5):406-13.

Koulourides T, Phantumvanit P, Munksgaard EC, Housch T. An intraoral model used for studies of fluoride incorporation in enamel. *J Oral Pathol.* 1974;3(4):185-96.

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.

Leonardo MR, Rossi MA, Silva LA, Ito IY, Bonifacio KC. SEM evaluation of bacterial biofilm and microorganisms on the apical external root surface of human teeth. *J Endod.* 2002;28(12):815-8.

Leonardo MR, Tanomaru Filho M, Silva LA, Nelson Filho P, Bonifacio KC, Ito IY. In vivo antimicrobial activity of 2% chlorhexidine used as a root canal irrigating solution. *J Endod.* 1999;25(3):167-71.

Lim Z, Cheng JL, Lim TW, Teo EG, Wong J, George S, et al. Light activated disinfection: an alternative endodontic disinfection strategy. *Aust Dent J.* 2009;54(2):108-14.

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.

Marchesan MA, Arruda MP, Silva-Sousa YTC, Saquy PC, Pecora JD, Sousa-Neto MD. Morphometrical analysis of cleaning capacity using nickel-titanium rotary instrumentation associated with irrigating solutions in mesiodistal flattened root canals. *J Appl Oral Sci* 2003; 11:55–9.

Marley JT, Ferguson DB, Hartwell GR. Effects of chlorhexidine gluconate as an endodontic irrigant on the apical seal: short-term results. *J Endod*. 2001;27(12):775-8.

Martin H. Quantitative bactericidal effectiveness of an old and a new endodontic irrigant. *J Endod*. 1975;1(5):164-7.

Martinhon CC, Italiani Fde M, Padilha Pde M, Bijella MF, Delbem AC, Buzalaf MA. Effect of iron on bovine enamel and on the composition of the dental biofilm formed "in situ". *Arch Oral Biol*. 2006;51(6):471-5.

Mason DJ, Lloyd D. Acridine orange as an indicator of bacterial susceptibility to gentamicin. *FEMS Microbiol Lett*. 1997;153(1):199-204.

McComb D, Smith DC. A preliminary scanning electron microscopic study of root canals after endodontic procedures. *J Endod*. 1975;1(7):238-42.

Mickel AK, Chogle S, Liddle J, Huffaker K, Jones JJ. The role of apical size determination and enlargement in the reduction of intracanal bacteria. *J Endod*. 2007;33(1):21-3.

Naenni N, Thoma K, Zehnder M. Soft tissue dissolution capacity of currently used and potential endodontic irrigants. *J Endod*. 2004;30(11):785-7.

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.

Noiri Y, Katsumoto T, Azakami H, Ebisu S. Effects of Er:YAG laser irradiation on biofilm-forming bacteria associated with endodontic pathogens in vitro. *J Endod*. 2008;34(7):826-9.

Ohara P, Torabinejad M, Kettering JD. Antibacterial effects of various endodontic irrigants on selected anaerobic bacteria. *Endod Dent Traumatol*. 1993;9(3):95-100.

Okino LA, Siqueira EL, Santos M, Bombana AC, Figueiredo JA. Dissolution of pulp tissue by aqueous solution of chlorhexidine digluconate and chlorhexidine digluconate gel. *Int Endod J*. 2004;37(1):38-41.

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.

Oncag O, Hosgor M, Hilmioglu S, Zekioglu O, Eronat C, Burhanoglu D. Comparison of antibacterial and toxic effects of various root canal irrigants. *Int Endod J*. 2003;36(6):423-32.

Ordinola-Zapata R. Periodontite apical induzida em cães. Estudo microbiológico, tomográfico e de microscopia confocal. [Dissertação (Mestrado)]. Bauru. FOB, Univ de São Paulo; 2009.

Orstavik D, Haapasalo M. Disinfection by endodontic irrigants and dressings of experimentally infected dentinal tubules. *Endod Dent Traumatol*. 1990;6(4):142-9.

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.

Paes Leme AF, Dalcico R, Tabchoury CP, Del Bel Cury AA, Rosalen PL, Cury JA. In situ effect of frequent sucrose exposure on enamel demineralization and on plaque composition after APF application and F dentifrice use. *J Dent Res*. 2004;83(1):71-5.

Palmer RJ, Jr., Kazmerzak K, Hansen MC, Kolenbrander PE. Mutualism versus independence: strategies of mixed-species oral biofilms in vitro using saliva as the sole nutrient source. *Infect Immun*. 2001;69(9):5794-804.

Pappen FG, Qian W, Aleksejuniene J, Leonardo RT, Leonardo MR, Haapasalo M. Inhibition of sodium hypochlorite antimicrobial activity in the presence of bovine serum albumin. *J Endod*. 2010;36(2):268-71.

Paquette L, Legner M, Fillery ED, Friedman S. Antibacterial efficacy of chlorhexidine gluconate intracanal medication in vivo. *J Endod*. 2007;33(7):788-95.

Paster BJ, Olsen I, Aas JA, Dewhirst FE. The breadth of bacterial diversity in the human periodontal pocket and other oral sites. *Periodontol* 2000. 2006;42:80-7.

Pin ML, Abdo RC, Machado MA, da Silva SM, Pavarini A, Marta SN. In vitro evaluation of the cariostatic action of esthetic restorative materials in bovine teeth under severe cariogenic challenge. *Oper Dent*. 2005;30(3):368-75.

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.

Preza D, Olsen I, Aas JA, Willumsen T, Grinde B, Paster BJ. Bacterial profiles of root caries in elderly patients. *J Clin Microbiol*. 2008;46(6):2015-21.

Rapposch S, Zangerl P, Ginzinger W. Influence of fluorescence of bacteria stained with acridine orange on the enumeration of microorganisms in raw milk. *J Dairy Sci*. 2000;83(12):2753-8.

Richardson N, Mordan NJ, Figueiredo JA, Ng YL, Gulabivala K. Microflora in teeth associated with apical periodontitis: a methodological observational study comparing two protocols and three microscopy techniques. *Int Endod J*. 2009;42(10):908-21.

Ricucci D, Siqueira Jr JF, 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.

Ricucci D, Siqueira Jr. JF. Biofilms and apical periodontitis: study of prevalence and association with clinical and histopathologic findings. *J Endod*. 2010;36(8):1277-88.

Ringel AM, Patterson SS, Newton CW, Miller CH, Mulhern JM. In vivo evaluation of chlorhexidine gluconate solution and sodium hypochlorite solution as root canal irrigants. *J Endod*. 1982;8(5):200-4.

Robinson C, Strafford S, Rees G, Brookes SJ, Kirkham J, Shore RC, et al. Plaque biofilms: the effect of chemical environment on natural human plaque biofilm architecture. *Arch Oral Biol*. 2006;51(11):1006-14.

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.

Sassone LM, Fidel RA, Fidel SR, Dias M, Hirata RJ. Antimicrobial activity of different concentrations of NaOCl and chlorhexidine using a contact test. *Braz Dent J*. 2003;14(2):99-102.

Sassone LM, Fidel RA, Murad CF, Fidel SR, Hirata R, Jr. Antimicrobial activity of sodium hypochlorite and chlorhexidine by two different tests. *Aust Endod J*. 2008;34(1):19-24.

Schafer E, Bossmann K. Antimicrobial efficacy of chloroxylonol and chlorhexidine in the treatment of infected root canals. *Am J Dent*. 2001;14(4):233-7.

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.

Schilke R, Lisson JA, Bauss O, Geurtsen W. Comparison of the number and diameter of dentinal tubules in human and bovine dentine by scanning electron microscopic investigation. *Arch Oral Biol*. 2000;45(5):355-61.

Sedlacek MJ, Walker C. Antibiotic resistance in an in vitro subgingival biofilm model. *Oral Microbiol Immunol*. 2007;22(5):333-9.

Segura JJ, Jimenez-Rubio A, Guerrero JM, Calvo JR. Comparative effects of two endodontic irrigants, chlorhexidine digluconate and sodium hypochlorite, on macrophage adhesion to plastic surfaces. *J Endod*. 1999;25(4):243-6.

Sen BH, Piskin B, Demirci T. Observation of bacteria and fungi in infected root canals and dentinal tubules by SEM. *Endod Dent Traumatol*. 1995;11(1):6-9.

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, Qian W, Chung C, Olsen I, Haapasalo M. Evaluation of the effect of two chlorhexidine preparations on biofilm bacteria in vitro: a three-dimensional quantitative analysis. *J Endod*. 2009;35(7):981-5.

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.

Shen Y, Stojicic S, Qian W, Olsen I, Haapasalo M. The synergistic antimicrobial effect by mechanical agitation and two chlorhexidine preparations on biofilm bacteria. *J Endod*. 2010;36(1):100-4.

Shih M, Marshall FJ, Rosen S. The bactericidal efficiency of sodium hypochlorite as an endodontic irrigant. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1970;29(4):613-9.

Shu M, Wong L, Miller JH, Sissons CH. Development of multi-species consortia biofilms of oral bacteria as an enamel and root caries model system. *Arch Oral Biol*. 2000;45(1):27-40.

Silva LA, Leonardo MR, Assed S, Tanomaru Filho M. Histological study of the effect of some irrigating solutions on bacterial endotoxin in dogs. *Braz Dent J*. 2004;15(2):109-14.

Siqueira Jr JF, 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 Jr JF, 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.

Siqueira Jr JF, Rocas IN, Paiva SS, Guimaraes-Pinto T, Magalhaes KM, Lima KC. Bacteriologic investigation of the effects of sodium hypochlorite and chlorhexidine during the endodontic treatment of teeth with apical periodontitis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2007;104(1):122-30.

Siqueira Jr JF, Rocas IN. Community as the unit of pathogenicity: an emerging concept as to the microbial pathogenesis of apical periodontitis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2009;107(6):870-8.

Skucaite N, Peciuliene V, Vitkauskiene A, Machiulskiene V. Susceptibility of endodontic pathogens to antibiotics in patients with symptomatic apical periodontitis. *J Endod*. 2010;36(10):1611-6.

Slutzky-Goldberg I, Maree M, Liberman R, Heling I. Effect of sodium hypochlorite on dentin microhardness. *J Endod*. 2004;30(12):880-2.

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.

Souza LC, Brito PR, Oliveira JC, Alves FR, Moreira EJ, Sampaio-Filho HR, et al. Photodynamic therapy with two different photosensitizers as a supplement to instrumentation/irrigation procedures in promoting intracanal reduction of *Enterococcus faecalis*. *J Endod*. 2010;36(2):292-6.

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.

Spratt DA, Pratten J, Wilson M, Gulabivala K. An in vitro evaluation of the antimicrobial efficacy of irrigants on biofilms of root canal isolates. *Int Endod J*. 2001;34(4):300-7.

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.

Steinberger RE, Holden PA. Extracellular DNA in single- and multiple-species unsaturated biofilms. *Appl Environ Microbiol*. 2005;71(9):5404-10.

Susin L, Liu Y, Yoon JC, Parente JM, Loushine RJ, Ricucci D, et al. Canal and isthmus debridement efficacies of two irrigant agitation techniques in a closed system. *Int Endod J*. 2010;43(12):1077-90.

Tanomaru JM, Leonardo MR, Tanomaru-Filho M, 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.

Tenuta LM, Lima JE, Cardoso CL, Tabchoury CP, Cury JA. Effect of plaque accumulation and salivary factors on enamel demineralization and plaque composition in situ. *Pesqui Odontol Bras*. 2003;17(4):326-31.

Tronstad L, Barnett F, Cervone F. Periapical bacterial plaque in teeth refractory to endodontic treatment. *Endod Dent Traumatol*. 1990;6(2):73-7.

Tucker JW, Mizrahi S, Seltzer S. Scanning electron microscopic study of the efficacy of various irrigation solutions: urea, Tubulicid Red, and Tubulicid Blue. *J Endod*. 1976;2(3):71-8.

Vahdaty A, Pitt Ford TR, Wilson RF. Efficacy of chlorhexidine in disinfecting dentinal tubules in vitro. *Endod Dent Traumatol*. 1993;9(6):243-8.

Valera MC, Chung A, Menezes MM, Fernandes CE, Carvalho CA, Camargo SE, et al. Scanning electron microscope evaluation of chlorhexidine gel and liquid associated with sodium hypochlorite cleaning on the root canal walls. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2010;110(5):e82-7.

Vianna ME, Gomes BP. Efficacy of sodium hypochlorite combined with chlorhexidine against *Enterococcus faecalis* in vitro. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2009;107(4):585-9.

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.

Walker A. A definite and dependable therapy for pulpless teeth. *J Am Dent Assoc*. 1936; 23(2):1418-25.

Weber CD, McClanahan SB, Miller GA, Diener-West M, Johnson JD. The effect of passive ultrasonic activation of 2% chlorhexidine or 5.25% sodium hypochlorite irrigant on residual antimicrobial activity in root canals. *J Endod*. 2003;29(9):562-4.

White JG, Amos WB, Fordham M. An evaluation of confocal versus conventional imaging of biological structures by fluorescence light microscopy. *J Cell Biol*. 1987;105(1):41-8.

White RR, Hays GL, Janer LR. Residual antimicrobial activity after canal irrigation with chlorhexidine. *J Endod*. 1997;23(4):229-31.

White RR, Janer LR, Hays GL. Residual antimicrobial activity associated with a chlorhexidine endodontic irrigant used with sodium hypochlorite. *Am J Dent*. 1999;12(3):148-50.

Williamson AE, Cardon JW, Drake DR. Antimicrobial susceptibility of monoculture biofilms of a clinical isolate of *Enterococcus faecalis*. *J Endod*. 2009;35(1):95-7.

Yamashita JC, Tanomaru Filho M, Leonardo MR, Rossi MA, Silva LA. Scanning electron microscopic study of the cleaning ability of chlorhexidine as a root-canal irrigant. *Int Endod J*. 2003;36(6):391-4.

Yesilsoy C, Whitaker E, Cleveland D, Phillips E, Trope M. Antimicrobial and toxic effects of established and potential root canal irrigants. *J Endod*. 1995;21(10):513-5.

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.

Zapata RO, Bramante CM, 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.

Zaura-Arite E, van Marle J, ten Cate JM. Confocal microscopy study of undisturbed and chlorhexidine-treated dental biofilm. *J Dent Res*. 2001;80(5):1436-40.

Zero DT, Rahbek I, Fu J, Proskin HM, Featherstone JD. Comparison of the iodide permeability test, the surface microhardness test, and mineral dissolution of bovine enamel following acid challenge. *Caries Res*. 1990;24(3):181-8.

Zero DT. In situ caries models. *Adv Dent Res*. 1995;9(3):214-30; discussion 31-4.

Zijnge 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

ANEXOS

**Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia de Bauru**

Al. Dr. Octávio Pinheiro Brisolla, 9-75 – Bauru-SP – CEP 17012-901 – C.P. 73
PABX (0XX14)3235-8000 – FAX (0XX14)3223-4679

Comitê de Ética em Pesquisa (14)3235-8356
e-mail: mferrari@fob.usp.br

Processo nº 064/2009

Bauru, 25 de junho de 2009.

Senhor Professor,

O projeto de pesquisa encaminhado a este Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos, denominado "Efeito do Hipoclorito de Sódio sobre dentina infectada por Biofilme oral formado "in situ"", de autoria de Aldo Enrique Del Carpio Perochena, que será desenvolvido sob sua orientação, foi enviado ao relator para avaliação.

Na reunião de 27 de maio de 2009 o parecer do relator, **aprovando o projeto**, foi aceito pelo Comitê, considerando que não existem infrações éticas pendentes.

Informamos que qualquer alteração efetuada no trabalho de pesquisa, o pesquisador/orientador deverá comunicar ao CEP-FOB/USP, bem como ao final do trabalho enviar um Relatório para novo parecer, o qual será utilizado para publicação científica.

Atenciosamente,

Profª Drª Maria Teresa Atta

Coordenadora

Prof. Dr. Clovis Monteiro Bramante

Docente do Departamento de Dentística, Endodontia e Materiais Dentários

ANEXO A. Aprovação do projeto pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Bauru/Universidade de São Paulo.

**Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia de Bauru**

Al. Dr. Octávio Pinheiro Brisolla, 9-75 – Bauru-SP – Brasil – CEP 17012-901 – C.P. 73
PABX (0XX14)3235-8000 – FAX (0XX14)3223-4679

Comitê de Ética em Pesquisa (14)3235-8356
e-mail: mferrari@fob.usp.br

Proc. CEP nº 064/2009

Bauru, 3 de março de 2011.

Senhor Professor,

Em atenção à solicitação de Vossa Senhoria para alteração do título do projeto de pesquisa "Efeito do Hipoclorito de Sódio sobre dentina infectada por Biofilme oral formado *"in situ"*", de autoria de Aldo Enrique Del Carpio Perochena, sob sua orientação, para CAPACIDADE DE DISSOLUÇÃO DO HIPOCLORITO DE SÓDIO E DA CLOREXIDINA SOBRE BIOFILME ORAL FORMADO "IN SITU", informamos a autorização deste Colegiado, considerando não haver impedimentos éticos.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Flavio Augusto Cardoso de Faria
Coordenador

Prof. Dr. Clovis Monteiro Bramante
Docente do Departamento de Dentística, Endodontia e Materiais Dentários

ANEXO B. Alteração do título do projeto de pesquisa.

ANEXO C. Imagens representativas dos corpos de prova, após 72 horas na cavidade oral, pode-se observar intensa colonização da dentina (A-C-E). Após contato com NaOCl 1% durante 5 minutos (B), 15 minutos (D) e 30 minutos (F) observa-se a limpeza progressiva da superfície dentinária.

ANEXO D. Imagens representativas dos corpos de prova, após 72 horas na cavidade oral, pode-se observar intensa colonização da dentina (A-C-E). Após contato com NaOCl 2.5% durante 5 minutos (B), 15 minutos (D) e 30 minutos (F) observa-se a limpeza progressiva da superfície dentinária.

ANEXO E. Imagens representativas dos corpos de prova, após 72 horas na cavidade oral, pode-se observar intensa colonização da dentina (A-C-E). Após contato com NaOCl 5% durante 5 minutos (B), 15 minutos (D) e 30 minutos (F), não se observa presença de biofilme nos campos mostrados em nenhum dos três períodos de tempo.

ANEXO F. Imagens representativas dos corpos de prova, após 72 horas na cavidade oral, pode-se observar intensa colonização da dentina (A-C-E). Após contato com Clorexidina 2% durante 5 minutos (B), 15 minutos (D) e 30 minutos (F), não se observa redução de biofilme nos campos mostrados em nenhum dos três períodos de tempo.

ANEXO G. Porcentagem da redução do biofilme após tratamento com as soluções irrigadoras.

ANEXO H. Porcentagem do aumento da dentina limpa após tratamento com as soluções irrigadoras.

ANEXO I. Superfície dentinária com abundante colonização bacteriana em quase toda sua extensão antes de ser exposta às soluções irrigadoras (A). Superfície dentinária com pouca colonização bacteriana após de ser exposta às soluções irrigadoras (B). Note-se que embora a altura do biofilme seja propriamente a mesma, a quantidade da biomassa decresceu consideravelmente de A para B.