UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU

Amanda Garcia Alves Maliza

**Desinfecção intratubular de dentes bovinos por soluções de
hipoclorito de sódio acidificadas**

BAURU
2013

AMANDA GARCIA ALVES MALIZA

Desinfecção intratubular de dentes bovinos por soluções de hipoclorito de sódio acidificadas

Dissertação apresentada a Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências Odontológicas Aplicadas, na área de concentração Endodontia.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Flaviana Bombarda de Andrade

Versão corrigida

BAURU
2013

M295a Maliza, Amanda Garcia Alves
Desinfecção intratubular de dentes bovinos por
soluções de hipoclorito de sódio acidificadas./
Amanda Garcia Alves Maliza – Bauru, 2013.

120 p. : il. ; 30cm.

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

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Flaviana Bombarda de
Andrade

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

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

Assinatura:

Data:

Amanda García Alves Maliza

DADOS CURRICULARES

Nascimento	18 de novembro de 1987 Marília – SP – Brasil
Filiação	Antonio Carlos Alves Maliza Christina Prado Garcia Alves
2005-2008	Graduação na Universidade Sagrado Coração. Bauru – SP
2010-2012	Especialização em Endodontia pelo Hospital de Reabilitações de Anomalias Craniofaciais (HRAC/USP). Bauru – SP
2011-2013	Mestrado em Ciências Odontológicas Aplicadas. Área de concentração em Endodontia na Faculdade de Odontologia de Bauru – Universidade de São Paulo.
Associações	APCD – Associação Paulista dos Cirurgiões Dentistas. SBPqO – Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica IADR – International Association for Dental Research

DEDICATÓRIA

À Deus, por seu infinito amor, por ser meu escudo, por sua presença constante me iluminando e me guiando em minha caminhada. Por me permitir terminar mais um ciclo em minha vida e começar um novo.

Aos meus queridos pais, Antonio Carlos Alves Malíza e Christina Prado Garcia Alves. Ninguém melhor do que vocês sabem o quanto mais essa conquista é importante para mim, a qual sem dúvida nenhuma, sem o amor e o apoio de vocês eu jamais teria conseguido.

Paí, você é o maior exemplo de paciência e caráter que eu, como filha, poderia ter. Você me ensinou o valor do trabalho e do sacrifício. Sua integridade moral o torna um grande homem.

Minha maior referência em honestidade. Uma vida não é suficiente para agradecer sua incansável luta para me ajudar a realizar os meus sonhos. À você minha eterna gratidão. Te amo!

Mãe, você sempre me mostrou que tudo o que fazemos com amor, boa vontade e dedicação, sempre valerá a pena. Me ensinou a sorrir frente as conquistas e as derrotas, pois sua alegria de viver e seu amor incondicional sempre foram o que me deram força para me levantar e continuar sempre que preciso. Obrigada por sonhar os meus sonhos junto comigo e por ser minha fortaleza. À você, toda a minha gratidão, meu reconhecimento e meu mais puro amor. Te amo!

Ao meu amor Fábio Portaluppi Marinho, o melhor homem que Deus poderia colocar em minha vida. Com sua humildade e alegria de viver, me ensinou o que é o amor. Você é meu maior companheiro, amigo de todas as horas. Obrigada pela paciência e por me fazer sentir amada todos os dias. Te amo hoje e sempre!

Aos meus irmãos, Renan, Eduardo e Matheus, simplesmente por existirem em minha vida e fazerem dela a melhor que eu poderia ter desejado. Obrigada pelos apoios constantes, pelos carinhos demonstrados. Vocês são parte de mim e mais essa conquista também é de vocês! Amo vocês.

À minha cunhada Bárbara Fortunato Prohmann pelo apoio demonstrado em todo esse tempo. Sempre pronta a me ajudar quando preciso, me socorreu várias vezes em momentos de desespero. Sei que posso contar com você hoje e sempre. Obrigada por fazer parte de nossa família. Amo você.

À minha cunhada Jéssica Cristina Melice Gouveia Alves, que sabe tanto quanto eu, a importância de mais essa conquista. Obrigada pelas trocas de experiências intermináveis nas festas de família. Hoje, juntamente com meu irmão Renan Garcia Alves Maliza estão me proporcionando um dos momentos mais felizes da minha vida: ser "tília". Não sei como agradecer por me deixarem viver tudo isso ao lado de vocês. Tenho dentro de mim um amor tão forte por um ser que ainda nem vi. Obrigada por serem parte da minha felicidade. Amo vocês.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Professora Dr^a. Flaviana Bombarda de Andrade, por depositar em mim sua confiança, pelos ensinamentos e pelas palavras de incentivo na superação dos obstáculos para a concretização deste trabalho. Agradeço os momentos vividos, aprendendo com seu inesgotável conhecimento e extrema competência. Com sua humildade e simplicidade, conquista todos ao seu redor. Sinto-me honrada e ter sido sua aluna. Minha eterna gratidão por me permitir ser sua amiga.

Ao Professor Dr. Marco Antonio Hungaro Duarte que me ensinou a dar os primeiros passos na Endodontia e por força do destino o encontrei novamente nessa caminhada. Tenho orgulho em dizer que foi você quem me ensinou a gostar de Endodontia. Você é digno de admiração por onde passa, pois não mede esforços para ajudar sempre que precisamos. Obrigada por sua generosidade em compartilhar seus conhecimentos com seus alunos. À você, toda a minha gratidão e meu reconhecimento.

Aos Professores Drs. Clóvis Monteiro Bramante, Ivaldo Gomes de Moraes, Roberto Brandão Garcia e Norberti Bernardineli da disciplina de Endodontia da FOB-USP, pela educação, disponibilidade em sempre esclarecer minhas dúvidas sempre que preciso e pelos ensinamentos divididos.

Aos funcionários do Departamento de Endodontia da FOB-USP, Sueley, Andressa e Edímauro pelo carinho e convivência agradável durante esses anos.

À especialista em laboratório do Centro Integrado de Pesquisa da FOB-USP, Márcia Sirlene Zardin Graeff, pela ajuda no Microscópio Confocal de Varredura a Laser. Obrigada por sempre estar disposta a me atender, independente das repetições necessárias. Você foi fundamental para a realização deste trabalho. Obrigada de coração.

Aos técnicos de laboratório do Centro Integrado de Pesquisas da FOB-USP, Marcelo Milanda Ribeiro Lopes, Rafaela Alves da Silva e Renato Pereira Murbach que não mediram esforços para me ensinar a manusear e usar os equipamentos do laboratório. Obrigada pela generosidade e atenção.

À Thelma Lopes Silva, funcionária do Departamento de Bioquímica da FOB-USP que esteve sempre pronta a me ajudar e me explicar sempre com paciência as difíceis fórmulas químicas. Você também foi fundamental para a realização dessa pesquisa. Obrigada.

A minha amiga de turma, Marcela Paola de Castro Arias que por inúmeras vezes recorri a ela para me ajudar em vários momentos de dificuldade. Com sua inteligência e paciência, sempre de prontidão a me atender, muitas vezes tornou claro para mim o que parecia impossível de entender. Sua calma me manteve no

foco sempre que eu estava prestes a fugir dele. Obrigada por ser quem você é e por permitir dividir tantos momentos com você.

Quero levá-la em meu coração por toda a vida.

Ao meu amigo de turma, Pablo Andrés Amoroso Silva, sempre com sua generosidade e educação, estive pronto a me ajudar nos momentos em que precisei. Agradeço por ter dividido seus conhecimentos e experiências comigo. Obrigada por tudo sempre.

Ao meu amigo de turma Bruno Martiní Guimarães, por termos dividido bons momentos juntos. Continue com sua alegria contagiando a todos ao seu redor. Obrigada pela amizade.

A minha amiga de turma Marcela Milanezi de Almeida, que com seu jeito alegre de ser sempre me proporcionou bons momentos que ficarão guardados para sempre. Obrigada por fazer parte disso tudo.

A amiga de turma Carolina Filpo Pérez por seu jeito meigo de ser. Sempre me ajudou, me ouviu quando precisei. Companheira, inteligente, alegre. Continue assim. Obrigada por tudo, sempre.

A amiga de turma Milena Silva que sempre esteve presentes nos momentos de encontros dividindo boas risadas conosco.
Obrigada pela amizade.

Ao amigo de turma Marcelo de Moraes Vitoriano pelos momentos mais que divertidos que passamos juntos. Você é diferente de todos que eu já havia conhecido. Com seu jeito peculiar, conquistou a todos. Agradeço pelos bons momentos e pela amizade.

A amiga doutoranda, Raquel Zanin Mídina, que fez parte de todas as minhas fases acadêmicas, desde a minha graduação, especialização até o presente momento. Não consigo contar nos dedos quantos momentos de felicidade e tristeza passamos juntas.

Tantos anos de amizade, que se fortaleceram com o passar do tempo. Agradeço por estar sempre presente em minha vida, pelas risadas, choros, por vibrar com minhas conquistas e me acalmar nas dificuldades. Minha admiração e amizade por você só crescem a cada dia. Obrigada por tudo sempre. Saiba que te amo e terei você em meu coração por toda a vida.

Aos meus amigos doutorandos Aldo del Carpio Perocheña, Bruno Cavalini Cavenago, Marcelo Haas Villas Boas, Marina Angélica Marciano da Silva, Paloma Monotti Bonfante e Ronald Ordínola Zapata todo o meu agradecimento por dividir conhecimentos e experiências comigo. A vocês todo o meu carinho e gratidão.

AGRADECIMENTOS INSTITUCIONAIS

À Faculdade de Odontologia de Bauru da 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. Marco Antonio Hungaro Duarte.

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

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq, pelo apoio financeiro para a realização deste trabalho.

*“Não tenha medo da vida, tenha medo de não vivê-la.
Não há céu sem tempestades, nem caminhos sem acidentes.
Só é digno do pódio quem usa as derrotas para alcançá-lo.
Só é digno da sabedoria quem usa as lágrimas para irrigá-la.
Os frágeis usam a força; os fortes, a inteligência.
Seja um sonhador, mas una seus sonhos com disciplina,□
pois sonhos sem disciplina produzem pessoas frustradas.□
Seja um debatedor de ideias. Lute pelo que você ama.”*

Augusto Cury

Resumo

RESUMO

A total descontaminação do sistema de canais radiculares e da massa dentinária é uma constante preocupação clínica. Diante disso, esta pesquisa teve o objetivo de avaliar o nível de descontaminação dentinária alcançada após irrigação com soluções de hipoclorito de sódio em diferentes concentrações valores de pH. Oitenta dentes bovinos unirradiculados foram divididos em 9 grupos experimentais diferentes. As coroas foram seccionadas e despregadas das raízes. Foram obtidos segmentos de 12mm e os canais instrumentados até a lima K120, preenchidos com EDTA 17%, durante 10 minutos. As raízes foram impermeabilizadas externamente com duas camadas de esmalte. Suspensões de *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) foram padronizadas em espectrofotômetro (3×10^8 UFC/mL) e depositadas em microtubos com caldo BHI e um espécime. O protocolo de contaminação seguiu a metodologia de MA et al. (2011) com adaptações. Após 5 dias, os espécimes foram fixados em um dispositivo de apoio esterilizado e irrigados durante 5 minutos com as soluções-teste estabilizadas com tampões: (G1) NaOCl 1% - pH5; (G2) NaOCl 1% - pH7; (G3) NaOCl 1% - pH10; (G4) NaOCl 2,5% - pH5; (G5) NaOCl 2,5% - pH 7; (G6) NaOCl 2,5% - pH10; (G7) NaOCl 5% - pH5; (G8) NaOCl 5% - pH7; (G9) NaOCl 5% - pH10, contendo 8 espécimes cada, além dos grupos controles. Após o tratamento com as soluções irrigadoras, metade dos espécimes é avaliada por cultura microbiológica (contagem de unidades formadoras de colônias – UFC/mL – das raspas de dentina retiradas das paredes dos canais) e a outra metade do mesmo grupo avaliada por microscopia confocal de varredura a laser (MCVL) e corante Live & Dead. Houve diferença estatística entre diversos grupos, analisados pelos testes de Kruskal-Wallis e Dunn. ($p < 0,05$) Concluiu-se que a solução de hipoclorito de sódio acidificada provocou uma redução significativa no número de bactérias. Essa redução foi ainda maior quando a concentração da solução era elevada.

Palavras-chave: Hipoclorito de Sódio. Acidificação. *Enterococcus faecalis*.

Abstract

ABSTRACT

Intratubular decontamination of bovine teeth by acidified sodium hypochlorite solutions

The complete decontamination of root canal system and dentinal mass is a constant clinical concern. Therefore, this study aimed to evaluate the level of dentin decontamination achieved after irrigation with sodium hypochlorite solutions at different concentrations and pH values. Eighty single rooted bovine teeth were divided into 9 different groups. The crowns were sectioned and separated from the roots. Then, there was obtained segments of 12mm and the root canals were instrumented until size #120 K-file and filled with 17% EDTA during 10 minutes. The roots were externally sealed with two layers of nail polish. Suspensions of *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) were standardized using a spectrophotometer (3×10^8 CFU/mL) and placed in microtubes containing BHI broth and one sample. The protocol of contamination followed the methodology of MA et al. (2011) with some adjustments. After five days, the samples were fixed in a sterilized device and irrigated during 5 minutes with the tested solutions stabilized by buffers substances: (G1) 1% NaOCl - pH5; (G2) 1% NaOCl - pH7; (G3) NaOCl 1% - pH10; (G4) 2.5% NaOCl - pH5, (G5) 2.5% NaOCl - pH 7, (G6) 2.5% NaOCl - pH10; (G7) 5% NaOCl - pH5; (G8) NaOCl 5% - pH 7 (G9) 5% NaOCl - pH10, containing 8 specimens each, and the control groups. After the treatment with the irrigating solutions, half of the specimens were evaluated by microbiological cultures (counting colony forming units – CFU/mL – of dentine chips removed from the wall of root canals) and the other half of the same group were evaluated by confocal laser scanning microscopy (CLSM) with fluorescent Live & Dead stain. There was statistical difference among various groups ($p < 0.05$) by Kruskal-Wallis and Dunn's test. It was concluded that the acidified sodium hypochlorite solution resulted in a significant reduction in the number of bacteria.

Key words: Sodium hypochlorite. Acidification. *Enterococcus faecalis*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- FIGURAS

- Figura 1.** Ilustração do preparo dos espécimes: dente bovino (A) foi padronizado em espécimes de 12mm (B); instrumentados até lima K#120 (C); remoção da *smear layer* com EDTA 17% durante 10 minutos (D). Após lavagem com água destilada, foram passadas duas camadas de esmalte vermelho sobre a superfície externa de cada espécime (E).46
- Figura 2.** Ilustração das substâncias utilizadas para o preparo das soluções irrigadoras: solução de hipoclorito de sódio 10-15% (A); acetato de sódio (B); cacodilato de sódio (C); glicina (D) e ácido acético (E).48
- Figura 3.** Ilustração do preparo das soluções irrigadoras: substância tampão sendo pesada em balança de precisão (A); dissolução da substância com o auxílio de barra e agitador magnéticos (B-C); adição de hipoclorito de sódio e ácido acético para ajuste da concentração e do pH (D); aferindo pH ajustado (E); adicionando água destilada para alcançar o volume desejado (40mL).49
- Figura 4.** Ilustração do armazenamento em frasco âmbar das soluções irrigadoras, após o preparo.49
- Figura 5.** Ilustração do processo de contaminação: espectrofotômetro para ajuste do inóculo na concentração desejada (A); inserção do caldo BHI nos microtubos contendo a amostra (B); agitação ultrassônica para melhor penetração do caldo BHI no interior dos túbulos dentinários (C); centrifuga utilizada para a sequência de centrifugação (D).51
- Figura 6.** Ilustração da câmara de fluxo laminar utilizada durante a pesquisa.52
- Figura 7.** Ilustração das metodologias utilizadas para avaliação da viabilidade bacteriana: MCVL (A) e cultura microbiológica (B).52
- Figura 8.** Ilustração do dispositivo de apoio utilizado durante a pesquisa para irrigação e desgaste com as brocas de Largo nº5 e nº6.54
-
-

Figura 9.	Ilustração da sequência de fotos tiradas dos espécimes no MCVL. A – região mais superficial da dentina radicular; B – região mais profunda da dentina radicular em relação ao canal principal.....	55
Figura 10.	Gráfico representativo da porcentagem de bactérias viáveis após o tratamento com as soluções irrigadoras. Análise por MCVL.	63
Figura 11.	Porcentagem de bactérias viáveis na região mais superficial em relação a luz do canal (A) após o tratamento com as soluções irrigadoras. Análise por MCVL.	65
Figura 12.	Porcentagem de bactérias viáveis na região mais profunda em relação a luz do canal (B) após o tratamento com as soluções irrigadoras. Análise por MCVL.	67
Figura 13.	Representação dos grupos NaOCl 1%-pH5 (A-B); NaOCl 1%-pH7 (C-D) e NaOCl 1%-pH10 (E-F) através do MCVL.	69
Figura 14.	Representação dos grupos NaOCl 2,5%-pH5 (A-B); NaOCl 2,5%%-pH7 (C-D) e NaOCl 2,5%-pH10 (E-F) através do MCVL.....	71
Figura 15.	Representação dos grupos NaOCl 5%-pH5 (A-B); NaOCl 5%-pH7 (C-D) e NaOCl 5%-pH10 (E-F) através do MCVL.	73
Figura 16.	Gráfico representativo da porcentagem de bactérias viáveis após o tratamento com as soluções irrigadoras. Análise por cultura microbiológica de contagem de colônias (UFC/mL).	76
Figura 17.	Representação dos grupos NaOCl 1%-pH5 (A); NaOCl 1%-pH7 (B); NaOCl 1%-pH10 (C) através da cultura microbiológica.	77
Figura 18.	Representação dos grupos NaOCl 2,5%-pH5 (A); NaOCl 2,5%-pH7 (B); NaOCl 2,5%-pH10 (C) através da cultura microbiológica.....	77
Figura 19.	Representação dos grupos NaOCl 5%-pH5 (A); NaOCl 5%-pH7 (B); NaOCl 5%-pH10 (C) através da cultura microbiológica.	79
Figura 20.	Representação dos grupos controles positivo (A) e negativo (B) através da cultura microbiológica.....	79

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Distribuição dos espécimes em função das soluções irrigadoras testadas, sua concentração e pH, e metodologia de análise utilizada.	53
Tabela 2.	Grupos que apresentaram diferenças significativas pela análise do MCVL após aplicação dos testes estatísticos Kruskal Wallis-Dunn ($p<0.05$).....	62
Tabela 3.	Grupos que apresentaram diferenças significativas na região superficial (A) após aplicação dos testes estatísticos Kruskal Wallis-Dunn ($p<0.05$).....	64
Tabela 4.	Grupos que apresentaram diferenças significativas na região profunda (B) após aplicação dos testes estatísticos Kruskal Wallis-Dunn ($p<0.05$).....	66
Tabela 5.	Grupos que apresentaram diferenças significativas pela cultura microbiológica após aplicação dos testes estatísticos Kruskal Wallis-Dunn ($p<0.05$).....	75

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

atm	Atmosfera
BHI	Infusão cérebro-coração
CLX	Clorexina
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético.
g	gramas
HOCl	Ácido hipocloroso
l	litros
MCVL	Microscópio Confocal e Varredura a Laser
MEV	Microscópio Eletrônico de Varredura
min	Minutos.
mL	Mililitros.
mm	Milímetros.
Na ₂ CO ₃	Carbonato de sódio
NaHCO ₃	Bicarbonato de sódio
NaOCl	Hipoclorito de sódio
Nm.....	Nanômetro
ns	nenhuma significância
nº	Número
°C	Graus Celsius
OCl ⁻	Íon hipoclorito
°F	Graus Fahrenheit
p	Significância estatística.□
PCR	Reação em cadeia da polimerase
pH	Potencial hidrogeniônico
PVPI	Solução iodo iodeto de Potássio
rpm	Rotações por minuto
UFC	Unidade Formadoras de Colônia
x	Aumentos
µl	microlitros
µm	Micrometros

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	25
2.1	<i>Enterococcus faecalis</i>	27
2.2	Hipoclorito de sódio e suas propriedades.....	30
2.3	Efeito do hipoclorito de sódio sobre o <i>Enterococcus faecalis</i>	34
3	PROPOSIÇÃO	39
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	43
4.1	Preparo das soluções irrigadoras	46
4.2	Contaminação das amostras por <i>Enterococcus faecalis</i>	50
4.3	Tratamento das amostras com as soluções irrigadoras	52
4.4	Análise no Microscópio Confocal de Varredura a Laser (MCVL)	54
4.5	Análise por cultura microbiológica	56
4.6	Análise estatística.....	57
5	RESULTADOS	59
5.1	Avaliação pela microscopia confocal de varredura a laser (MCVL)	61
5.2	Avaliação pela cultura microbiológica.....	75
6	DISCUSSÃO	81
7	CONCLUSÕES	91
	REFERÊNCIAS	95
	ANEXOS	107

1 Introdução

1 INTRODUÇÃO

As bactérias e suas toxinas, na dentina e no sistema de canais radiculares, são consideradas os principais agentes etiológicos no desenvolvimento de lesões pulpares e perirradiculares, além de serem os maiores responsáveis pelo insucesso endodôntico devido à sua persistência (GOMES; LILLEY; DRUCKER, 1996b; GOMES et al., 2004; KAKEHASHI; STANLEY; FITZGERALD, 1965; LIN; SKRIBNER; GAENGLER, 1992; NAIR et al., 2005; NAIR et al., 1990; SIQUEIRA, J.F., JR., 2001). Uma das razões para a persistência da infecção deve-se ao fato das bactérias penetrarem nos túbulos dentinários em grande profundidade (KANDASWAMY et al., 2010; LOVE, 2001), dificultando sua eliminação (HAAPASALO; ORSTAVIK, 1987).

Tem sido estimado que mais de 500 espécies diferentes de bactérias habitam a cavidade oral (MOORE; MOORE, 1994), onde aproximadamente 300 delas podem ser encontradas facilmente em infecções do interior do sistema de canais radiculares (SUNDQVIST, 1992).

Levando em consideração a complexidade da anatomia interna (VILLAS-BOAS et al., 2011) e a limitação no acesso dos sistemas de canais radiculares (KANDASWAMY et al., 2010), a eficaz limpeza não depende apenas da instrumentação (BYSTROM; SUNDQVIST, 1981; INGLE; ZELDOW, 1958), mas também de meios coadjuvantes como as soluções irrigadoras e os curativos intracanaís, que por meio do somatório de suas propriedades químicas, físicas e biológicas favorecem a eliminação dos micro-organismos com eficácia.

Bactérias do gênero *Enterococcus faecalis* podem ser encontradas em diversos ambientes, tais como trato gastrointestinal de humanos, outros animais, solo e plantas, podendo também colonizar o trato genitourinário e a cavidade oral. São anaeróbias facultativas, Gram-positivas e fermentativas. Suas células são ovóides, podendo ter de 0,5 a 1 µm de diâmetro. Na maioria das vezes, se organizam individualmente, em pares ou em cadeias curtas (RÔÇAS; SIQUEIRA; SANTOS, 2004). Estudos mostram que essas bactérias apresentam maior prevalência em infecções endodônticas persistentes (MOLANDER et al., 1998; SUNDQVIST et al., 1998).

Com o propósito de melhorar a eliminação das bactérias no sistema de canais radiculares, o hipoclorito de sódio, em diferentes concentrações, tem sido amplamente utilizado como irrigante, desde a sua introdução na Endodontia (WALKER, 1936) e suas importantes propriedades enfatizadas por inúmeros trabalhos (BAUMGARTNER; CUENIN, 1992; CHÁVEZ DE PAZ; BERGENHOLTZ; SVENSATER, 2010; ESTRELA et al., 2008; GOMES; MARTINHO; VIANNA, 2009; RADCLIFFE et al., 2004; SIQUEIRA JR. et al., 2000).

O hipoclorito de sódio, em suas várias concentrações, é um composto halogenado e teve o seu primeiro uso registrado em 1792, quando era chamado “água de Javele”. Este produto era obtido através da associação do hipoclorito de sódio com potássio. Em 1820, Labarraque obteve o hipoclorito de sódio a uma concentração de 2,5% de cloro ativo, o qual era utilizada como desinfetante de feridas. Em 1915, durante a primeira guerra mundial, Dakin propôs a concentração de 0,5% para a solução de hipoclorito de sódio associada a sua neutralização com ácido bórico para o tratamento das feridas dos soldados. Segundo Dakin, as feridas tratadas com o hipoclorito de sódio a 2,5% demoravam a cicatrizar devido ao alto teor de hidróxido de sódio presente na solução (DAKIN, 1915; HAUMAN; LOVE, 2003). Por fim, em 1936, Walker introduziu o uso do hipoclorito de sódio (NaOCl) na Endodontia. Desde então, o NaOCl em diferentes concentrações, tornou-se a solução auxiliar da instrumentação mais utilizada na terapia endodôntica (SIQUEIRA, J.F., JR.; DE UZEDA, 1997), por conta de suas excelentes propriedades como capacidade antimicrobiana, dissolvente de tecidos vivos ou necróticos, baixa tensão superficial, baixo custo entre outras (MERCADE et al., 2009; ZEHNDER et al., 2002). No entanto, como consequência das propriedades de dissolução tecidual e atividade antimicrobiana, o NaOCl é altamente tóxico em altas concentrações causando danos pelo seu efeito oxidativo quando em contato com o tecido periapical (BECKING, 1991; FERRAZ et al., 2001; HÜLSMANN; HAHN, 2000; SPANGBERG; ENGSTROM; LANGELAND, 1973). Odor e gosto desagradável, tendência a manchar roupas, potencial corrosivo (BAUMGARTNER; CUENIN, 1992; NEAL; CRAIG; POWERS, 1983) e capacidade de causar reações alérgicas (KAUFMAN; KEILA, 1989), também são outras características negativas do hipoclorito de sódio.

As soluções de NaOCl, normalmente, possuem pH alcalino, sendo bastante instáveis, liberando os íons cloro principalmente em condição de luz e calor aumentados. O NaOCl apresenta excelente atividade antimicrobiana frente à

microbiota endodôntica (BYSTROM; SUNDQVIST, 1981; FOLEY et al., 1983; HAUMAN; LOVE, 2003) devido à formação de compostos contendo cloro ativo, como o ácido hipocloroso (HOCl) e o íon hipoclorito (OCl⁻) (LOPES; SIQUEIRA JR., 1999). Solução de NaOCl com pH baixo favorece o aumento de HOCl, o que possui de 80 a 100 vezes maior potencial desinfetante que o íon hipoclorito (BREMER; MONK; BUTLER, 2002). O HOCl possui uma melhor capacidade de penetrar na membrana da célula bacteriana devido à sua falta de carga elétrica e estrutura molecular semelhante à água. Uma vez dentro da célula, o HOCl apresenta o efeito bacteriostático reagindo com o DNA, RNA, e outros nucleotídeos. Além disso, esta substância atua como um agente bacteriostático, reagindo com aminoácidos e produzindo cloraminas (HAWKINS; DAVIES, 2002). Portanto, o efeito antimicrobiano do hipoclorito de sódio pode potencialmente, ser melhorado através da redução do pH da solução (CAMPS et al., 2009; MERCADE et al., 2009).

Dessa forma, a efetividade antibacteriana do NaOCl dentro dos canais radiculares não depende somente da concentração do irrigante, mas também do tempo de contato, do pH e da concentração do ácido hipocloroso (MERCADE et al., 2009), que é a forma mais bactericida da molécula (ZEHNDER et al., 2002).

Baseado nestas informações, justifica-se avaliar a efetividade antimicrobiana intratubular dentinária do hipoclorito de sódio em diferentes concentrações e em diferentes valores de pH, em dentes bovinos contaminados *in vitro* por *Enterococcus faecalis*.

2 Revisão de Literatura

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Enterococcus faecalis*

A habilidade da bactéria *Enterococcus faecalis* em causar doenças periapicais e insucessos em dentes tratados endodonticamente é devido a sua capacidade de invadir túbulos dentinários e de permanecer viável em seu interior (LOVE, 2001). Esses fatos indicam o seu papel no desenvolvimento das lesões periapicais resistentes ao tratamento (GOMES et al., 2001; GOMES; LILLEY; DRUCKER, 1996a; LOVE, 2001; SIREN et al., 1997) e sua associação com o insucesso (DAHLEN; BERGENHOLTZ, 1980; LOVE, 2001; PECIULIENE et al., 2001; SUNDQVIST et al., 1998).

SIREN et al. (1997) estudaram a ocorrência de bactérias entéricas facultativas em canais infectados, em relação aos procedimentos clínicos do tratamento endodôntico. A bactéria mais comumente isolada foi o *Enterococcus faecalis*, sendo que a maior incidência ocorreu nos casos de reintervenção endodôntica quando em comparação aos casos de tratamento inicial.

MOLANDER et al. (1998) examinaram microbiologicamente 100 dentes com canais obturados, que apresentavam lesões periapicais. As bactérias anaeróbias facultativas predominaram, correspondendo a 69% de todas as bactérias identificadas. Concluíram que o *Enterococcus faecalis* estava presente em 32% dos dentes estudados.

PECIULIENE et al. (2001) analisaram a presença de fungos e bactérias entéricas em dentes com canais obturados e com lesão periapical. O *Enterococcus faecalis* estava presente em 21 de 33 dentes, sendo onze em cultura pura, ou seja, como o único microrganismo presente. O crescimento foi detectado após a segunda cultura em 10 dentes.

PINHEIRO et al. (2003) objetivaram identificar micro-organismos presentes no interior de canais radiculares tratados e portadores de lesão periapical persistente. Coletaram amostras de 60 dentes com essas características, utilizando técnicas microbiológicas para resgate de espécies anaeróbias. Foram isolados micro-organismos em 51 dos 60 canais avaliados, sendo encontradas uma ou duas

espécies por canal. Do total de bactérias isoladas, 57,4% eram anaeróbias facultativas e 83,3% Gram-positivas. O *Enterococcus faecalis* foi a espécie mais frequente nos canais que apresentaram crescimento de micro-organismos (52,94%), e em 18 deles estava presente na forma de cultura pura.

MCHUGH et al. (2004) analisaram o pH requerido para destruir o *Enterococcus faecalis*, concluindo que o pH ideal para sua eliminação deve ser de 11,5 ou maior, visto que os pHs 10,5 e 11 apenas retardaram o seu crescimento.

RADCLIFFE et al. (2004) confirmaram a resistência do *Enterococcus faecalis* às manobras utilizadas rotineiramente no combate à infecção do sistema de canais radiculares. A proposta deste estudo foi determinar a resistência de micro-organismos associados à presença de infecções endodônticas refratárias, frente ao hipoclorito de sódio em diferentes concentrações. Concluíram que o *Enterococcus faecalis* foi a bactéria que mais apresentou resistência, já que precisou de um tempo maior em contato com o hipoclorito de sódio para sua eliminação quando comparada com outras bactérias no estudo.

RÔÇAS; SIQUEIRA; SANTOS (2004) observaram a presença do *Enterococcus faecalis* em 7 de 21 dentes com lesão perirradicular crônica assintomática; em 1 caso de 10 dentes com periodontite apical aguda e em 1 de 19 amostras de pus aspirado de abscesso perirradicular agudo. Verificaram que o *Enterococcus faecalis* está significativamente associado mais com casos assintomáticos do que com casos sintomáticos. Quanto aos fracassos endodônticos, o *Enterococcus faecalis* estava presente em 20 de 30 dentes.

VIVACQUA-GOMES et al. (2005) avaliaram *in vitro* a presença do *Enterococcus faecalis* após a realização da terapia endodôntica em uma ou mais sessões. Os autores concluíram que o *Enterococcus faecalis* não foi completamente eliminado em nenhuma das situações experimentais e que, mesmo após 60 dias da obturação endodôntica, permaneciam viáveis, principalmente, no grupo onde não foi utilizado o cimento endodôntico na obturação.

GOMES et al. (2006) investigaram a prevalência do *Entrococcus faecalis* em canais com necrose pulpar e em canais com insucesso no tratamento endodôntico utilizando a cultura e a reação em cadeia da polimerase (PCR), como métodos de avaliação. Para o estudo, foram selecionados 50 dentes com insucesso endodôntico e 50 dentes com infecções primárias. Nos retratamentos, o *Enterococcus faecalis* foi encontrado em 21 casos (42%), detectados pela cultura e em 38 casos (76%) pela

análise de PCR. Já nos 50 casos de infecção primária, esta espécie esteve presente em 2 canais (4%), detectados pela cultura e 41 canais (82%) canais pela análise de PCR. Estes resultados mostraram que o *Enterococcus faecalis* está presente em canais com polpas necrosadas, porém, em quantidades bem pequenas, não detectáveis pelo método da cultura.

NAKAJO et al. (2006) estudaram a resistência apresentada por *Enterococcus faecalis* e *Streptococcus mutans* em ambientes ácidos ou alcalinos. Os resultados mostraram que o crescimento do *Enterococcus faecalis* ocorreu em pH entre 4,0 e 11, enquanto o *Streptococcus mutans* cresceu em pH entre 4,0 e 9,0. As duas espécies mostraram-se resistentes em ambas situações (ambientes ácidos ou alcalinos), sendo que o *Enterococcus faecalis* manteve seu pH interno entre 7,5 e 10. Além disso, sua membrana externa mostrou-se resistente ao meio ácido, mantendo seu pH próprio para o crescimento, mesmo frente a valores de pH abaixo de 5. A maior resistência em meio extremamente alcalino, como aquele oferecido pela presença de hidróxido de cálcio, foi apresentada pelo *Enterococcus faecalis*, devido à capacidade de sua membrana em manter o pH interno relativamente neutro.

CHIVATXARANUKUL; DASHPER; MESSER (2008) investigaram a invasão e a predileção de *Enterococcus faecalis* nas paredes dos túbulos dentinários. Após 8 semanas de incubação, *E. faecalis* mostrou invasão tubular considerada moderada a pesada. Quanto à adesão, foi maior no interior dos túbulos dentinários do que na parede externa da dentina. Concluíram que, embora *E. faecalis* invadiram túbulos, não possuem grande aderência às paredes.

ZHU et al. (2010) investigaram a prevalência, fenótipo e genótipo do *Enterococcus faecalis* isolados de saliva e de canais radiculares em pacientes com falha do tratamento endodôntico. Observaram que a prevalência do *E. faecalis* foi de 18.8% na saliva e 40.6% no canal radicular. Além do mais, *E. faecalis* apresentou potencial de virulência tanto na saliva, quanto em canais radiculares, concluindo que um único paciente pode possuir diferentes cepas de *E. faecalis*.

VAGHELA et al. (2011) avaliaram a desinfecção dos túbulos dentinários contra *E. faecalis* e *C. Albicans*, utilizando hidróxido de cálcio associado ao propilenoglicol e do hidróxido de cálcio com iodofórmio em óleo de silicone, em comparação ao gel de clorexidina a 2%. Os três medicamentos utilizados neste

estudo exerceram atividade antibacteriana. Clorexidina em gel a 2% foi eficaz tanto contra *E. faecalis* quanto contra *C. albicans*. O hidróxido de cálcio associado ao propilenoglicol foi a medicação intracanal mais efetiva, juntamente com a clorexidina a 2%, contra *E. faecalis*, enquanto que, o hidróxido de cálcio com iodofórmio em óleo de silicone foi a medicação intracanal mais efetiva, juntamente com clorexidina a 2%, contra *C. albicans*.

WANG et al. (2012) investigaram a prevalência de *Enterococcus faecalis* em saliva e em canais tratados endodonticamente de pacientes com periodontite apical que necessitavam de retratamento endodôntico. Um total de 32 mulheres, 22 homens e 58 dentes foram estudados. A prevalência de *E. faecalis* foi de 19% na saliva e 38% nos canais radiculares. As chances dos canais radiculares apresentarem maior número de *E. faecalis* eram aumentadas quando este também estava presente na saliva. Concluíram que, *E. faecalis* é mais comum em canais radiculares de dentes com periodontite apical do que na saliva e que a prevalência de *E. faecalis* em canais radiculares está associada à sua presença na saliva.

2.2 Hipoclorito de sódio e suas propriedades

A fase de irrigação durante o preparo biomecânico é uma das mais importantes do tratamento endodôntico (LEONARDO, 2005). A irrigação exerce o papel fundamental na movimentação ou solubilização do tecido pulpar, remoção dos micro-organismos, seus produtos e subprodutos, partículas teciduais ou estranhas ao canal e toxinas, permitindo a ação da medicação intracanal e, consequentemente, facilitar o reparo.

O hipoclorito de sódio tem sido utilizado há décadas como auxiliar químico na desinfecção dos canais radiculares. É uma solução alcalina, que possui um duplo modo de ação: habilidade de dissolução de tecidos vivos ou necróticos além da propriedade antimicrobiana.

SPANGBERG; ENGSTROM; LANGE LAND (1973) definiram que a concentração de 0,5% de hipoclorito de sódio tem o mais baixo grau de toxicidade, porém, propriedades bacterianas diminuídas. Já o hipoclorito de sódio a 5%, apesar de eficiente agente antimicrobiano, apresenta a maior reação tóxica. Concluíram também, que o desejado efeito antibacteriano começa a ocorrer a partir da

concentração de 1%.

ABOU-RASS; OGLESBY (1981) investigaram o efeito de soluções de hipoclorito de sódio a 5.25% e a 2.5%, em diferentes temperaturas (73,2°F ou 23°C e 140°F ou 60°C), avaliando a capacidade de dissolução de tecidos conjuntivos de ratos. Concluíram que, a solução de hipoclorito de sódio foi mais eficaz a 140°F (60°C) que a 73,2°F (23°C), sendo que o hipoclorito de sódio a 5.25% foi mais eficaz que a 2.5%, em ambas as temperaturas.

GORDON; DAMATO; CHRISTNER (1981) observaram que soluções de hipoclorito de sódio nas concentrações de 1%, 3% e 5%, utilizadas sobre tecido necrótico, apresentaram efeitos similares, promovendo remoção de 90% do conteúdo necrótico após 5 minutos. Sobre tecido vivo, a efetividade foi menor, onde a concentração de 1% dissolveu cerca de 37% do tecido pulpar e nas concentrações maiores, a dissolução foi, aproximadamente, de 70%.

MOORER; WESSELINK (1982) investigaram os fatores que auxiliam na capacidade de dissolução tecidual da solução de hipoclorito de sódio. Os autores constataram que o princípio ativo dessa solução depende das moléculas de ácido hipocloroso (HOCl) presente, sendo esse ácido consumido na sua interação com a matéria orgânica. Assim, os autores concluíram que o poder de dissolução do tecido orgânico depende, fortemente, da quantidade de matéria orgânica e hipoclorito de sódio presente, frequência e intensidade de fluxo irrigante, e a superfície de contato entre o tecido e a solução.

BYSTROM; SUNDQVIST (1985) compararam em estudo *in vivo*, a capacidade antimicrobiana do hipoclorito de sódio a 0,5% e a 5% e do hipoclorito de sódio a 5% associado ao EDTA, em 60 dentes humanos unirradiculados com necrose pulpar. Os autores concluíram que o emprego do hipoclorito de sódio, em associação ao EDTA, apresentou os melhores resultados, pelo fato de ter ocorrido maior remoção da camada residual de *smear layer* das paredes do canal radicular, promovendo ação mais efetiva do hipoclorito de sódio a 5%. Em relação ao uso isolado das soluções de hipoclorito de sódio a 0,5% e 5%, os resultados não mostraram diferença significativa.

PASHLEY et al. (1985) concluíram que, apesar do hipoclorito de sódio a 5% ser, clinicamente, aceitável para o preparo biomecânico e muito efetivo como irrigante, deveria ser empregado de forma cautelosa, para evitar sua chegada ao periápice, pois, poderia causar severa reação inflamatória.

PECORA et al. (1987) estudaram o tempo de vida da solução de Dakin (hipoclorito de sódio a 0,5%) armazenada em vidro âmbar, em várias condições de temperatura. Notou-se que após quatro meses, a solução perdia 80% de seu teor de cloro quando recebia luz solar, 60% à temperatura ambiente e apenas 20% quando conservada em baixa temperatura e na ausência de luz.

SIMÕES; SAMPAIO; DEBELIAN (1989) investigaram o poder bactericida do hipoclorito de sódio sobre as bactérias encontradas nos canais radiculares e a tolerância tecidual das suas formas de apresentação (biofilme, suspensão planctônica ou forma de “pellet”), em tecido conjuntivo de camundongo. Concluíram que, nas concentrações estudadas (0,5% e 1%), foi bem tolerado pelos tecidos; todas as soluções mostraram poder bactericida e o hipoclorito de sódio a 1% mostrou-se mais efetivo do que as diversas marcas comerciais do líquido de Dakin.

SPANÓ et al. (2001) estudaram a ação solvente da solução de hipoclorito de sódio nas concentrações 0.5%, 1%, 2.5% e 5% sobre o tecido pulpar bovino. Os resultados obtidos mostraram que, quanto maior a concentração da solução, maior a velocidade de dissolução do tecido pulpar.

ZEHNDER et al. (2002) compararam em estudo *in vitro*, a capacidade de dissolução tecidual de quatro diferentes tipos de soluções de hipoclorito de sódio: hipoclorito de sódio a 2.5%, em pH 12, preparada a partir da solução pura de NaOCl a 9%; hipoclorito de sódio a 0.5% em pH 12, preparada a partir da solução pura de NaOCl a 9%; hipoclorito de sódio a 0.5% em pH 12, tamponada com solução de Na₂CO₃ (carbonato de sódio) a 5% e hipoclorito de sódio a 0.5% em pH 9, tamponada com NaHCO₃ (bicarbonato de sódio) a 5%. Segundo os autores, a solução de hipoclorito de sódio a 2.5% apresentou capacidade de dissolução tecidual, significativamente, maior do que as demais. Os autores compararam ainda, o efeito antibacteriano das soluções de hipoclorito de sódio a 0.5%, tamponadas ou não, e observaram não haver diferenças significativas entre elas.

SENA (2004) estudou a atividade antimicrobiana do hipoclorito de sódio a 2,5 e 5,25% e da clorexidina (CLX) 2,0%, tanto na forma gel como líquida, utilizados como substâncias químicas auxiliares durante o preparo químico-mecânico, empregando biofilmes de espécie única (*Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Prevotella intermedia*, *Porphyromonas gingivalis*, *Porphyromonas endodontalis*, *Fusobacterium nucleatum* e *Candida albicans*). O hipoclorito de sódio a 5,25% eliminou todos os micro-organismos testados em 30 segundos de contato.

Frente aos micro-organismos anaeróbios estritos, todas as substâncias químicas obtiveram o mesmo desempenho, sendo efetivas em 30 segundos. A solução salina permitiu o crescimento microbiano de todas as cepas. Concluiu-se que o NaOCl a 5,25% foi mais efetiva das substâncias químicas testadas, seguido pela CLX líquida 2%. Os resultados demonstraram que a efetividade do agente antimicrobiano depende dos micro-organismos que constituem o biofilme, do tempo de contato dos micro-organismos com a substância química, da ação ou não da agitação mecânica e forma de apresentação da substância.

SIQUEIRA, E.L. (2004) comparou a capacidade de dissolução de polpas de dentes bovinos da clorexidina a 2% com a de soluções de hipoclorito de sódio, sob diferentes concentrações e valores de pH, frente a duas diferentes temperaturas. Os resultados mostraram que as soluções de hipoclorito de sódio sofrem influência do pH, temperatura e concentração no quesito dissolução do tecido pulpar. A clorexidina a 2%, bem como, as soluções de hipoclorito de sódio a 0,5% (pH 7 e temperatura entre 27 e 37°C), não dissolveram o tecido durante o tempo experimental de 120 minutos. No pH 11, soluções menos concentradas de hipoclorito de sódio mantiveram sua capacidade de dissolução tecidual. O aquecimento de soluções de hipoclorito de sódio aumentou sua eficácia sobre a dissolução de tecidos. Recomendou, o autor, que para se potencializar o efeito das soluções de hipoclorito de sódio sobre a dissolução de tecidos, deve-se optar, em primeiro lugar, pela elevação do pH, seguido do aquecimento da mesma e por último aumentar sua concentração.

OKINO et al. (2004) avaliaram a capacidade de dissolução de matéria orgânica de soluções de NaOCl a 0,5; 1 e 2,5% comparando a duas formulações de clorexidina (solução aquosa e gel a 2%) tendo, por controle, a água destilada. Utilizando como substrato polpas de origem bovina, verificaram que a clorexidina e a água não foram capazes de dissolver tecidos, enquanto ambas as soluções de hipoclorito de sódio foram eficientes na dissolução dos tecidos, porém, a velocidade da dissolução variou de acordo com as concentrações. Quanto maior a concentração, maior a velocidade de dissolução.

SIQUEIRA, J.F., JR et al. (2007) realizaram um estudo clínico para comparar a eficiência do NaOCl a 2,5% e digluconato de clorexidina a 0,12%, como irrigante, na redução da população bacteriana em canais radiculares infectados de dentes com infecções crônicas primárias e periodontite apical. Não houve diferença

significativa entre o NaOCl e clorexidina no que diz respeito ao número de casos, produzindo culturas negativas ou redução bacteriana quantitativa. Os grupos irrigados com NaOCl ou clorexidina revelaram um número médio de 1,3 e 1,9 espécies bacterianas cultiváveis por canais, respectivamente.

VALERA et al. (2009) avaliaram a ação do hipoclorito de sódio associado a uma medicação intracanal (pasta de hidróxido de cálcio, clorexidina em gel a 2% e clorexidina em gel a 2% associada com hidróxido de cálcio) contra *Candida albicans* e *Enterococcus faecalis* inoculados em canais radiculares. Concluíram que tanto a solução irrigadora de NaOCl a 1% quanto os medicamentos intracanaís foram eficazes na eliminação de *E. faecalis* e *C. albicans* inoculada em canais radiculares.

2.3 Efeito do hipoclorito de sódio sobre o *Enterococcus faecalis*

HARRISON; WAGNER; HENRY (1990) compararam a ação antimicrobiana do hipoclorito de sódio, utilizado em duas concentrações diferentes (5,25% e 2,62%), sobre o *Enterococcus faecalis* e *Candida albicans*, variando os períodos entre 15 e 120 segundos. Após 45 segundos de exposição ao NaOCl a 5,25%, e 60 segundos a 2,62%, não houve crescimento do *E. faecalis*. *C. albicans* foi eliminada com 15 segundos de exposição nas duas soluções testadas. Concluíram que ambas as soluções mostraram-se igualmente efetivas contra esses micro-organismos.

ORSTAVIK; HAAPASALO (1990) compararam, em um estudo *in vitro*, o poder de desinfecção de soluções e curativos intracanal em túbulos de dentina bovina contaminados com *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus sanguis*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*. As soluções testadas foram gluconato de clorexidina a 0,2%, hipoclorito de sódio a 5,25%, solução iodo iodeto de potássio (PVPI), EDTA a 17% e os curativos, Calapset (solução saturada de hidróxido de cálcio) e Paramonoclorofenol canforado (PMCC). A eficácia das soluções variou de acordo com as espécies bacterianas e com o tempo de contato com as paredes da dentina. A solução PVPI mostrou-se mais efetiva do que as outras. No entanto, o hipoclorito de sódio também apresentou boa atividade antimicrobiana; a clorexidina foi menos eficiente que o hipoclorito; o EDTA apresentou pouco ou quase nenhum efeito antimicrobiano.

VAHDATY; PITT FORD; WILSON (1993) estudaram a propriedade

antimicrobiana do gluconato de clorexidina a 0,2% e a 2% e do hipoclorito de sódio a 0,2% e a 2% sobre o *Enterococcus faecalis* em túbulos dentinários de incisivos bovinos. Os resultados demonstraram que tanto a clorexidina quanto o hipoclorito de sódio em ambas as concentrações tiveram ação parecidas na eliminação dos micro-organismos. Ocorreu diminuição significativa do número de bactérias nos primeiros 100µm de profundidade, enquanto que, em profundidade maior, houve a permanência da contaminação, evidenciando assim, a importância do uso do curativo de demora entre as sessões.

SIQUEIRA JR. et al. (2000) realizaram estudo *in vitro* para avaliar a ação antimicrobiana do hipoclorito de sódio em diferentes concentrações (1%, 2,5% e 5%) sobre o *E. faecalis* após o preparo biomecânico de canais radiculares. Os resultados mostraram que todas as soluções testadas reduziram significativamente o número de células bacterianas nos canais radiculares. Os autores sugeriram ainda que a renovação e o volume da solução empregada são fatores capazes de manter a efetividade antimicrobiana da solução, compensando os efeitos irritantes quando da utilização de concentrações mais elevadas.

ABDULLAH et al. (2005) investigaram e compararam a ação bactericida frente ao *E. faecalis* obtido isoladamente, formando biofilme ou em suspensão, de cinco soluções utilizadas na irrigação de canais radiculares: solução de hidróxido de cálcio, hipoclorito de sódio 3%, povidine iodine a 10%, gluconato de clorexidina a 0,2% e EDTA a 17%. Os períodos de contato das substâncias com as bactérias variaram de 1 a 60 minutos. Os autores notaram que houve diferença estatisticamente significativa, de acordo com a forma de apresentação da bactéria, tipo de agente e tempo de contato. O hipoclorito de sódio foi o agente mais efetivo, eliminando 100% do *Enterococcus faecalis* após dois minutos de contato.

SIRTES et al. (2005) avaliaram *in vitro* os efeitos da variação de temperatura (20°C, 45°C e 60°C) das soluções de hipoclorito de sódio, na capacidade de dissolução tecidual de polpas humanas e no poder antimicrobiano sobre o *Enterococcus faecalis*, pelo método de cultura. Os autores concluíram que o pré-aquecimento das soluções de hipoclorito de sódio aumenta o poder de dissolução tecidual e a sua eficácia contra o *E. faecalis*.

BERBER et al. (2006) observaram que soluções de hipoclorito de sódio a 5.25% possuem maior atividade antibacteriana no interior de túbulos dentinários infectados com *Enterococcus faecalis* do que tais soluções em menores

concentrações (0.5% e 2.5%).

CAMPS et al. (2009) avaliaram a validade, capacidade de dissolução pulpar e a ação antimicrobiana da solução de NaOCl a 2,5%, ajustada ao pH 7,5. A perda de íons cloro disponível e o pH da solução foram observados para determinar a sua validade. A ação de dissolução pulpar do dente bovino foi avaliada medindo a perda de peso, a variação do pH e diminuição do teor de cloro disponível. A atividade antibacteriana foi avaliada *in vitro* em dentes humanos infectados com *Enterococcus faecalis*. Os autores concluíram que a solução de NaOCl a 2,5% ajustada ao pH 7,5 deve ser utilizada dentro de 2 horas após o preparo, pois, o teor de cloro foi de 72% após duas horas e 53% após 3 horas do preparo. Os autores concluíram, ainda, que a capacidade de dissolução da solução em teste diminuiu quando comparada com a solução de NaOCl a 2,5%, não modificada. Portanto, eles aconselham que a solução de NaOCl a 2,5% pH 7,5 deve ser frequentemente renovada para manter suas capacidades de dissolução. Entretanto, a solução em teste apresentou melhores propriedades antibacterianas quando comparada às soluções de NaOCl a 0,5% e a 2,5% não modificadas, eliminando os micro-organismos de 14 espécimes de um total de 20, quando em contato por 5 min e de 19 espécimes em um total de 20, quando em contato durante 20 minutos.

MERCADE et al. (2009) avaliaram a ação antimicrobiana do hipoclorito de sódio a 4,2% ajustado aos pHs 12, 7.5 e 6.5 em 165 dentes humanos unirradiculados infectados por *Enterococcus faecalis*. Os autores notaram que nenhuma das soluções foi 100% eficaz contra o *E. faecalis*, embora tenha havido diferença significativa entre a solução de hipoclorito de sódio a 4,2% pH 6.5 (mais eficiente) quando comparada com a solução de hipoclorito de sódio a 4,2% pH 12, que foi menos efetiva.

DORNELLES-MORGENTHAU et al. (2011) avaliaram a ação de diferentes soluções irrigadoras sobre *Enterococcus faecalis*. As soluções avaliadas foram: solução de NaOCl a 2,5%; solução de NaOCl a 2,5% + ácido cítrico a 10%; solução de NaOCl a 2,5% + vinagre de maçã; vinagre de maçã; solução de clorexidina a 2%; ácido peracético a 1% e solução salina. Os autores observaram que os espécimes de todos os grupos tiveram o número de bactérias diminuído, com exceção da solução salina. Os grupos que apresentaram maior ação antimicrobiana foram referentes à solução de NaOCl a 2,5%, solução de clorexidina a 2% e ácido peracético a 1%. Porém, os autores concluíram que nenhuma das soluções foi

capaz de erradicar em 100% o *Enterococcus faecalis*, do sistema de canais radiculares.

GUERREIRO-TANOMARU et al. (2011) avaliaram a ação antimicrobiana de diferentes soluções, sobre dentes contaminados *in vitro* com *Enterococcus faecalis*. As soluções em teste foram: solução de NaOCl a 2,5%; solução de NaOCl a 2,5% combinada com ácido acético a 10%; solução de NaOCl a 2,5% combinada com vinagre de maçã; somente o ácido acético a 10%; somente o vinagre de maçã.; solução salina para grupo controle. Os autores observaram que as soluções de NaOCl a 2,5% acidificadas diminuíram o teor de cloro, porém, não interferiu na ação antimicrobiana e que o NaOCl a 2,5% sem modificação ou acidificadas foram capazes de eliminar o *Enterococcus faecalis* em 30 segundos, enquanto que o ácido acético eliminou os micro-organismos após 10 minutos de contato. Já o vinagre de maçã eliminou apenas 32% das bactérias após 10 minutos de contato. Assim, os autores concluíram que as soluções de NaOCl a 2,5% acidificadas não apresentaram maior atividade antimicrobiana quando comparadas com a solução de NaOCl a 2,5%, sem modificação.

Baseando-se nestes achados da literatura, idealizou-se este estudo, utilizando uma metodologia de contaminação dentinária modificada e padronizada, com avaliação por meio de cultura microbiológica e microscopia confocal, visando o maior esclarecimento quanto ao real efeito das soluções de hipoclorito de sódio acidificadas e tamponadas, sobre micro-organismos alojados na superfície dos canais e em profundidade nos túbulos dentinários.

3 Proposição

3 PROPOSIÇÃO

Este estudo objetivou avaliar e quantificar o grau de desinfecção da dentina parietal de canais radiculares de dentes bovinos, previamente contaminados por *Enterococcus faecalis*, após irrigação com hipoclorito de sódio em diferentes concentrações (1%, 2,5% e 5%) e em diferentes valores de pH (5, 7 e 10), analisando e quantificando o número residual de bactérias viáveis, na massa dentinária, por meio de leitura em Microscópio Confocal de Varredura a Laser (MCVL) e da Cultura Microbiológica (contagem das Unidades Formadoras de Colônias).

4 Material e Métodos

4 MATERIAL E MÉTODOS

Toda a parte experimental da pesquisa foi realizada no Centro Integrado de Pesquisas (CIP) da Faculdade de Odontologia de Bauru – Universidade de São Paulo (FOB-USP), exceto a etapa de preparo das soluções que foi realizada no Departamento de Bioquímica da mesma Instituição. Para a realização da pesquisa foram utilizados 80 dentes bovinos, unirradiculados, recém-extraídos (Figura 1A) que permaneceram armazenados em solução de hipoclorito de sódio a 1% (Rioquímica Ltda., São José do Rio Preto, SP, Brasil) durante 48 horas para descontaminação inicial.

Após esse período, os dentes foram fixados com godiva tipo I (Kerr Co., Romulus MI, USA) em uma placa de acrílico e tiveram as coroas e os 5mm apicais seccionados com disco diamantado, em máquina metalográfica de corte ISOMET 1000 (Buehler Ltd, Lake Bluff, IL, EUA) a 250 rpm, sob refrigeração. Posteriormente, ainda com o auxílio do disco diamantado de precisão em máquina de corte, os blocos de dentina foram padronizados em 12mm e os canais radiculares dos blocos obtidos foram instrumentados até a lima K#120 (Dentsply Maillefer, Suíça). A *smear layer* foi removida com ácido etileno diamino tetracético (EDTA) a 17% (Biodinâmica Química e Farmacêutica Ltda., Ibiporã, PR, Brasil) durante 5 minutos e em seguida, os blocos de dentina foram lavados com água deionizada. Após a secagem, duas camadas de esmalte vermelho (L'Oréal Colorama, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) foram passadas sobre a superfície externa dos espécimes (para certificar-se que a contaminação seria somente via canal). Os mesmos secaram durante 24 horas e depois foram esterilizados (Figura 1E), em microtubos tipo eppendorf de 1,5mL (Axygen® Scientific, Union City, CA, EUA). A esterilização foi realizada em autoclave (Sercon-Modelo HS-Mogi das Cruzes, SP, Brasil) por 30 min, a 121°C e 1 atm.

Figura 1. Ilustração do preparo dos espécimes: dente bovino (A) foi padronizado em espécimes de 12mm (B); instrumentados até lima K#120 (C); remoção da *smear layer* com EDTA 17% durante 10 minutos (D). Após lavagem com água destilada, foram passadas duas camadas de esmalte vermelho sobre a superfície externa de cada espécime (E).

4.1 Preparo das soluções irrigadoras

Para o preparo das soluções irrigadoras, utilizou-se a solução de hipoclorito de sódio 10-15% (Sigma-Aldrich Co., St Louis, MO, EUA), a qual foi ajustada à concentração desejada (1%, 2,5% ou 5%). Para o ajuste do pH, foi utilizado o ácido acético e as respectivas substâncias tampão para cada valor de pH, como se segue: acetato de sódio (Synth®, Diadema, SP, Brasil) para o pH5, cacodilato de sódio (Eletron Microscopy Sciences, Ft. Washington, PA, EUA) para o pH 7 e glicina (Bio Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, EUA) para o pH 10 (Figura 2). As concentrações e os valores de pHs foram ajustados de acordo com as fórmulas químicas, respectivamente:

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

Onde,

C_1 = concentração do NaOCl (13%);

V_1 = volume necessário do NaOCl (13%);

C_2 = concentração do NaOCl que se deseja obter;

V_2 = volume total de solução (40mL)

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

Onde,

C = massa molar (0,1);

m = massa da substância (em gramas);

PM = peso molecular da substância;

V = volume da solução (em litros).

A massa molar (C) e o volume (V) para as soluções foram padronizados para o cálculo nas fórmulas, sendo 0,1 e 40mL, respectivamente. Devido à oscilação que o hipoclorito de sódio sofre, conforme especificado pelo próprio fabricante (10-15%), optou-se em utilizar a média dessa concentração (13%) para evitar resultados “falsos-negativos”.

Após o cálculo do volume do hipoclorito de sódio e da massa da substância tampão, para cada concentração e pH, a substância tampão foi pesada em balança de precisão analítica (Mettler Toledo International Inc., Modelo PB303-S, Greifensee, Suíça) e colocada em um becker (Uniglas Carvalhaes Produtos para Laboratório Ltda., Alvorada, RS, Brasil) contendo 15mL de água destilada e uma barra magnética (Synth®, Diadema, SP, Brasil). Na sequência, a fim de promover a dissolução da substância, o becker foi colocado em um agitador magnético (Quimis Aparelhos Científicos Ltda., Diadema, SP, Brasil) durante 2 minutos. Em seguida, ainda com o agitador ligado, com uma pipeta (Eppendorf®, Hamburgo, Alemanha) acrescentou-se o volume de hipoclorito de sódio a 13% necessário para se obter a concentração desejada, realizando a homogeneização por mais 2 minutos.

O valor do pH foi aferido com um pHmetro modelo Thermo Scientific Orion 3 Star (Thermo Fisher Scientific Inc., Ayer Rajah Crescent, Singapura). Para o ajuste do pH desejado, ainda com o agitador ligado, foi adicionado ácido acético (Merck S.A Indústria Químicas, Rio de Janeiro, RJ, Brasil), quando necessário. Quanto menor o valor do pH desejado, maior a quantidade de ácido acético acrescentada. À medida que o ácido ia sendo adicionado, o pHmetro ia aferindo o novo valor. Após se obter o pH desejado e uma solução homogênea, esta foi transferida para uma proveta (Pyrex®, Union City, CA, USA) para ser avaliada e, quando necessário acrescentar, o volume de água destilada suficiente para completar os 40mL (Figura 3). Após o término do preparo, a solução foi acondicionada em um frasco âmbar, devidamente etiquetada e identificada (Figura 4), que foi armazenada em geladeira a 2°C. Cada solução foi preparada individualmente.

Figura 2. Ilustração das substâncias utilizadas para o preparo das soluções irrigadoras: solução de hipoclorito de sódio 10-15% (A); acetato de sódio (B); cacodilato de sódio (C); glicina (D) e ácido acético (E).

Figura 3. Ilustração do preparo das soluções irrigadoras: substância tampão sendo pesada em balança de precisão (A); dissolução da substância com o auxílio de barra e agitador magnéticos (B-C); adição de hipoclorito de sódio e ácido acético para ajuste da concentração e do pH (D); aferindo pH ajustado (E); adicionando água destilada para alcançar o volume desejado (40mL).

Figura 4. Ilustração do armazenamento em frasco âmbar das soluções irrigadoras, após o preparo.

4.2 Contaminação das amostras por *Enterococcus faecalis*

Inicialmente, foram desenvolvidas duas metodologias de contaminação padrão presentes na literatura (HAAPASALO; ORSTAVIK, 1987; MA et al., 2011). Surgiram algumas dificuldades para se obter uma contaminação dentinária homogênea e profunda, além da dificuldade em se manter as bactérias vivas, dentro dos túbulos dentinários (anexos A e B), devido ao comprimento e à forma de seccionamento do presente modelo experimental. Em decorrência disso, foi necessário fazer algumas modificações até chegar a um novo protocolo.

Cepas de *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) foram cultivadas em caldo BHI - Brain Heart Infusion (Difco®, Detroit, MI, EUA) e mantidas em estufa modelo Orion 502 (FANEM® Ltda., São Paulo, SP, Brasil) a 37°C, durante 48 horas.

Após a esterilização, 800µL de BHI esterilizado foram colocados em cada microtubo contendo o espécime. Os microtubos foram depositados em cuba ultrassônica (Odontobras, Ribeirão Preto, SP, Brasil) durante 15 minutos para melhor penetração do caldo BHI dentro dos túbulos dentinários (Figura 5). O protocolo de contaminação foi adaptado com base na metodologia de MA et al. (2011), que preconiza ciclos de centrifugação para colonização dos túbulos. No presente trabalho, as centrifugações foram realizadas em dias alternados totalizando 5 dias.

1º dia: Após decorridas as 48 horas para o cultivo do *Enterococcus faecalis*, a concentração dessas bactérias foi padronizada em 3×10^8 UFC/mL com o auxílio de espectrofotômetro em comprimento de onda de 540nm (Modelo 1105, Bel Photonics do Brasil Ltda., Osasco, SP, Brasil) em novo caldo BHI e mantidas durante 7 horas em estufa, a 37°C, para crescimento exponencial das mesmas. Este período de 7 horas foi determinado a partir da obtenção da curva de crescimento da bactéria, obtida em experimento piloto.

Dentro da câmara de fluxo laminar (Filterflux®, Piracicaba, São Paulo, Brasil), 800µL do inóculo bacteriano foram colocados dentro de cada microtubo e, estes, dentro da centrífuga Eppendorf 5417R (Eppendorf®, Hamburgo, Alemanha), realizando uma sequência de centrifugação nas velocidades de 1400g, 2000g, 3600g e 5600g, sendo duas vezes cada, a 25°C. A cada ciclo de centrifugação, o meio de cultura antigo era descartado e colocado um novo inóculo também padronizado, totalizando 8 trocas. As trocas dos inóculos foram realizadas, sempre,

dentro do fluxo laminar (Figura 6). Por último, após toda a sequência, foi colocado novo BHI esterilizado nos microtubos e feita uma última centrifugação de 3600g, a 25°C. Os microtubos foram armazenados em estufa a 37°C, durante 24 horas.

2º dia: Decorridas as 24 horas, foi feito o descarte do inóculo contido nos microtubos e colocado novo BHI esterilizado para renovação das bactérias e uma única centrifugação de 3600g, a 25°C. Os microtubos, com os espécimes contaminados, foram armazenados novamente em estufa a 37°C, durante 24 horas.

3º dia: Decorridas as 24 horas, todos os procedimentos da sequência de centrifugação do primeiro dia foram repetidos e os microtubos armazenados em estufa novamente, a 37°C, por mais 24 horas.

4º dia: Foi semelhante ao 2º dia, com o descarte do inóculo contido nos microtubos e colocado novo BHI esterilizado para renovação das bactérias e uma única centrifugação de 3600g, a 25°C. Os microtubos, com os espécimes contaminados, foram armazenados novamente em estufa a 37°C, durante 24 horas.

5º dia: Experimento com as soluções irrigantes e avaliação no Microscópio Confocal de Varredura a Laser (MCVL) e cultura microbiológica, ilustrados na figura 7.

Figura 5. Ilustração do processo de contaminação: espectrofotômetro para ajuste do inóculo na concentração desejada (A); inserção do caldo BHI nos microtubos contendo a amostra (B); agitação ultrassônica para melhor penetração do caldo BHI no interior dos túbulos dentinários (C); centrifuga utilizada para a sequência de centrifugação (D).

Figura 6. Ilustração da câmara de fluxo laminar utilizada durante a pesquisa.

Figura 7. Ilustração das metodologias utilizadas para avaliação da viabilidade bacteriana: MCVL (A) e cultura microbiológica (B).

4.3 Tratamento das amostras com as soluções irrigadoras

Os espécimes contaminados foram divididos em 9 grupos experimentais com 8 espécimes cada, em função das soluções avaliadas, considerando a concentração e o pH da solução. Cada grupo foi dividido em 2 subgrupos de 4 espécimes. Além disso, os grupos controles positivo e negativo com 4 espécimes cada também foram divididos, em 2 subgrupos de 2 espécimes cada um. A divisão dos grupos está ilustrada na tabela 1.

Tabela 1. Distribuição dos espécimes em função das soluções irrigadoras testadas, sua concentração e pH, e metodologia de análise utilizada.

Grupos	Solução + concentração	pH	Metodologia	Espécimes (n)
1	NaOCl 1%	5	MCVL	4
			CM	4
2	NaOCl 1%	7	MCVL	4
			CM	4
3	NaOCl 1%	10	MCVL	4
			CM	4
4	NaOCl 2,5%	5	MCVL	4
			CM	4
5	NaOCl 2,5%	7	MCVL	4
			CM	4
6	NaOCl 2,5%	10	MCVL	4
			CM	4
7	NaOCl 5%	5	MCVL	4
			CM	4
8	NaOCl 5%	7	MCVL	4
			CM	4
9	NaOCl 5%	10	MCVL	4
			CM	4
Controle +	Soro fisiológico (espécimes com contaminação bacteriana)	—	MCVL	2
			CM	2
Controle -	Soro fisiológico (espécimes sem contaminação bacteriana)	—	MCVL	2
			CM	2

Para o tratamento dos espécimes com as soluções irrigadoras, os mesmos foram fixados em um dispositivo de apoio esterilizado, dentro do fluxo laminar (Figura 8). Com o auxílio de uma pipeta (Eppendorf®, Hamburgo, Alemanha), 500µL da solução irrigadora foram depositados dentro dos canais dos espécimes, onde permaneceram por 5 minutos, contados com um cronômetro digital. Após a irrigação com as soluções em teste, os espécimes receberam uma irrigação de 500µL de solução salina esterilizada, seguida de mais 500µL de tiosulfato de sódio 5% (Farmácia de Manipulação Específica, Bauru, São Paulo) durante 5 minutos, visando neutralizar o efeito residual do hipoclorito de sódio. Finalmente, os espécimes receberam irrigação de 500µL de solução salina esterilizada.

Figura 8. Ilustração do dispositivo de apoio utilizado durante a pesquisa para irrigação e desgaste com as brocas de Largo nº5 e nº6.

4.4 Análise no Microscópio Confocal de Varredura a Laser (MCVL)

Uma vez realizada a irrigação, os espécimes do subgrupo referente à análise do MCVL foram seccionados longitudinalmente com auxílio de disco diamantado de precisão em máquina de corte, sob refrigeração. Em seguida, foram colocados em placa de cultura celular de 24 poços para remoção da *smear layer* com EDTA a 17% durante 5 minutos e, posteriormente, lavados com 500µL de soro fisiológico, esterilizado. Na sequência, os espécimes foram corados por um período de 20 minutos com 30µL de LIVE/DEAD® BacLight™ Bacterial Viability Kit (Invitrogen Molecular Probes, Eugene, OR, EUA). Este kit contém o corante verde SYTO®9 e o corante vermelho iodeto de propídio, corando assim, as bactérias vivas e mortas, respectivamente.

Os espécimes foram visualizados no MCVL Leica TCS-SPE (Leica Microsystems GmbH, Mannheim, Alemanha) totalizando oito imagens por espécime, sendo quatro do terço cervical e quatro do terço médio, de modo sequencial (Figura 9). O escaneamento foi realizado com a objetiva de 40X, a cada 1µm de profundidade até o limite de 12 a 14 µm em alta resolução (1024 X 1024 pixels). As imagens foram adquiridas por meio do programa Leica Application Suite-Advanced Fluorescence (LAS AF, Leica Mannheim, Alemanha) e levadas ao software Leica LAS AF Lite para fragmentação das camadas de cada imagem. No programa bioImager v2-1 (CHÁVEZ DE PAZ, 2009) as bactérias vivas e mortas foram quantificadas por meio da fluorescência verde (viva) e vermelha (morta) emitida pelas mesmas nas imagens avaliadas.

Figura 9. Ilustração da sequência de fotos tiradas dos espécimes no MCVL. A – região mais superficial da dentina radicular; B – região mais profunda da dentina radicular em relação ao canal principal.

4.5 Análise por cultura microbiológica

Inicialmente, placas de Petri foram preenchidas com 20mL de ágar-BHI (Difco®, Detroit, MI, USA), conforme instruções do fabricante, e armazenadas em geladeira, a 2°C, até o momento do seu uso.

Os espécimes de cada subgrupo fixados no dispositivo de apoio esterilizado (Figura 8), foram irrigados com a solução em teste, e após este procedimento foi colocado na base de cada lacuna um microtubo, tipo eppendorf, contendo 1mL de BHI esterilizado. Uma broca de Largo nº5 (Microdont, São Paulo, São Paulo, Brasil) esterilizada, foi acoplada em um contra-ângulo do motor rotatório X-Smart (Dentsply Maillefer, Suíça) configurado a uma velocidade de 12.000 rpm. Após acionada, a broca foi inserida dentro do canal radicular de cada espécime. O movimento de inserir e retirar foi repetido sete vezes e sempre sob o acompanhamento de um cronômetro, para certificar-se que em todos os espécimes o tempo de desgaste e a frequência de inserção foram os mesmos. À medida que a broca ia entrando e desgastando a superfície do canal radicular, as raspas de dentina caíam dentro do microtubo fixado abaixo do dispositivo.

Na sequência, o microtubo fixado no dispositivo era trocado por outro, também contendo 1mL de BHI esterilizado, para um novo desgaste do mesmo espécime, agora, com a broca de Largo nº6 (Microdont, São Paulo, São Paulo, Brasil). O mesmo procedimento descrito anteriormente foi realizado. Terminado o desgaste, os microtubos contendo as raspas de dentina, foram diluídos a 10^{-3} em caldo BHI. Na troca do espécime, as brocas utilizadas foram descartadas e novas esterilizadas foram utilizadas.

Para a diluição, o microtubo inicial (identificado com a letra A) contendo as raspas de dentina foi agitado no vórtex (Quimis® Aparelhos Científicos Ltda., Diadema, SP, Brasil), e em seguida foram retirados 100µL do seu conteúdo e colocados em outro microtubo contendo 900µL de BHI esterilizado (identificado com a letra B). Esse microtubo foi agitado no vórtex, retirados 100µL e inseridos em um novo microtubo (identificado com a letra C) contendo 900µL. O procedimento foi repetido mais uma vez onde, por fim, se obteve um microtubo (identificado com a letra D) com as raspas diluídas a 10^{-3} . Finalmente, o microtubo D foi agitado no vórtex, retirados 50µL, que foram semeados em uma placa de Petri contendo ágar-BHI, devidamente identificada de acordo com a solução irrigadora e o número da

broca de Largo. O volume adicionado foi espalhado com o uso de alça de Drigalski (Kyma, Americana, SP, Brasil) e as placas colocadas em estufa, a 37°C. Após 48 horas, foi realizada a contagem das unidades formadoras de colônia, nas placas de cada grupo e broca.

4.6 Análise estatística

Para a análise estatística foi utilizado o programa GraphPad Prism 6 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, EUA). Para uma comparação global, foi utilizado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, enquanto que para comparações múltiplas entre os grupos foi utilizado o teste de Dunn, onde o nível de significância foi fixado em 5%.

5 Resultados

5 RESULTADOS

5.1 Avaliação pela microscopia confocal de varredura a laser (MCVL)

Um total de 320 imagens foram avaliadas no MCVL nas regiões dos terços cervical e médio dos espécimes. Foram quantificadas as bactérias presentes vivas e mortas, após o procedimento de irrigação, em cada espécime.

Com os valores obtidos foi possível aplicar os testes estatísticos, onde observou-se uma diferença significativa entre alguns grupos, quanto à viabilidade bacteriana. Na tabela 2, estão dispostas somente as relações entre os grupos que apresentaram diferença estatisticamente significativa e na figura 10, o gráfico representativo da viabilidade bacteriana, em todos os grupos.

Das 320 imagens, 160 se referiam à região mais próxima a luz do canal (A) e 160 à região mais profunda (B). Elas foram submetidas aos testes estatísticos para avaliar se houve diferença de um grupo para o outro especificando a região. As diferenças significativas apresentadas estão demonstradas nas tabelas 3 e 4 e as ilustrações gráficas da viabilidade bacteriana representadas nas figuras 11 e 12.

Na figura 13 é possível observar algumas imagens de MCVL, obtidas a partir dos espécimes submetidos à irrigação com solução de NaOCl a 1%, com diferentes valores de pH.

Na figura 14, observam-se imagens obtidas dos espécimes irrigados com solução de NaOCl a 2,5% e na figura 15, imagens dos espécimes irrigados com NaOCl a 5%.

Tabela 2. Grupos que apresentaram diferenças significativas pela análise do MCVL após aplicação dos testes estatísticos Kruskal Wallis-Dunn ($p < 0.05$).

ANÁLISE DO MCVL		
Grupos	Valor de p	
1% - pH 5 vs. 1% - pH7	<0,0001	****
1% - pH 5 vs. 1% - pH10	<0,0001	****
1% - pH 5 vs. 2,5% - pH10	0,0058	**
1% - pH7 vs. 2,5% - pH5	<0,0001	****
1% - pH7 vs. 5% - pH5	<0,0001	****
1% - pH7 vs. 5% - pH7	0.002	**
1% - pH10 vs. 2,5% - pH5	<0,0001	****
1% - pH10 vs. 5% - pH5	<0,0001	****
1% - pH10 vs. 5% - pH7	0.001	***
2,5% - pH5 vs. 2,5% - pH7	0.0023	***
2,5% - pH5 vs. 2,5% - pH10	0.0001	***
2,5% - pH5 vs. 5% - pH10	0.0094	**
2,5% - pH7 vs. 5% - pH5	<0,0001	****
2,5% - pH10 vs. 5% - pH5	<0,0001	****
5% - pH5 vs. 5% - pH7	0.0464	*
5% - pH5 vs. 5% - pH10	<0,0001	****

Figura 10. Gráfico representativo da porcentagem de bactérias viáveis após o tratamento com as soluções irrigadoras. Análise no MCVL.

Tabela 3. Grupos que apresentaram diferenças significativas na região superficial (A) após aplicação dos testes estatísticos Kruskal Wallis-Dunn ($p < 0.05$).

ANÁLISE DO MCVL (REGIÃO MAIS SUPERFICIAL - A)		
Grupos	Valor de p	
1% - pH5 (A) vs. 1% - pH7 (A)	0.0201	*
1% - pH5 (A) vs. 1% - pH10 (A)	0.0006	***
1% - pH7 (A) vs. 2,5% - pH5 (A)	0.0004	***
1% - pH7 (A) vs. 5% - pH5 (A)	<0.0001	****
1% - pH10 (A) vs. 2,5% - pH5 (A)	<0.0001	****
1% - pH10 (A) vs. 5% - pH5 (A)	<0.0001	****
1% - pH10 (A) vs. 5% - pH7 (A)	0.222	*
2,5% - pH5 (A) vs. 2,5% - pH10 (A)	0.0054	**
2,5% - pH5 (A) vs. 5% - pH10 (A)	0.009	**
2,5% - pH7 (A) vs. 5% - pH5 (A)	0.0170	*
2,5% - pH10 (A) vs. 5% - pH5 (A)	0.0007	***
5% - pH5 (A) vs. 5% - pH10 (A)	0.0012	**

Figura 11. Porcentagem de bactérias viáveis na região mais superficial, em relação a luz do canal (A), após o tratamento com as soluções irrigadoras. Análise por MCVL.

Tabela 4. Grupos que apresentaram diferenças significativas na região profunda (B) após aplicação dos testes estatísticos Kruskal Wallis-Dunn ($p < 0.05$).

ANÁLISE NO MCVL (REGIÃO MAIS PROFUNDA - B)		
Grupos	Valor de p	
1% - pH5 (B) vs. 1% - pH7 (B)	0.0005	***
1% - pH5 (B) vs. 1% - pH10 (B)	0.0037	**
1% - pH5 (B) vs. 2,5% - pH10 (B)	0.0417	*
1% - pH7 (B) vs. 2,5% - pH5 (B)	0.0001	***
1% - pH7 (B) vs. 5% - pH5 (B)	<0.0001	****
1% - pH7 (B) vs. 5% - pH7 (B)	0.0197	*
1% - pH10 (B) vs. 2,5% - pH5 (B)	0.0011	**
1% - pH10 (B) vs. 5% - pH5 (B)	<0.0001	****
2,5% - pH5 (B) vs. 2,5% - pH10 (B)	0.0141	*
2,5% - pH7 (B) vs. 5% - pH5 (B)	0.0001	***
2,5% - pH10 (B) vs. 5% - pH5 (B)	<0.0001	****
5% - pH 5 (B) vs. 5% - pH10 (B)	0.0156	*

Figura 12. Porcentagem de bactérias viáveis na região mais profunda em relação a luz do canal (B) após o tratamento com as soluções irrigadoras. Análise por MCVL.

Figura 13. Representação dos grupos NaOCl 1%-pH5 (A-B); NaOCl 1%-pH7 (C-D) e NaOCl 1%-pH10 (E-F) através do MCVL.

Figura 14. Representação dos grupos NaOCl 2,5%-pH5 (A-B); NaOCl 2,5%%-pH7 (C-D) e NaOCl 2,5%-pH10 (E-F) através do MCVL.

Figura 15. Representação dos grupos NaOCl 5%-pH5 (A-B); NaOCl 5%-pH7 (C-D) e NaOCl 5%-pH10 (E-F) através do MCVL.

5.2 Avaliação pela cultura microbiológica

Um total de 36 placas de Petri foram avaliadas pelo método da cultura microbiológica, por meio da contagem de unidades formadoras de colônias (UFC/mL) independente do tipo da broca utilizada – (Largo 5 ou Largo 6). Os resultados gerados pelas raspas obtidas por ambas as brocas foram agrupados de maneira a conseguir uma maior amostragem, uma vez que, isoladamente, estes resultados não proporcionaram diferenças entre os grupos. Após a aplicação dos testes estatísticos, observou-se uma única diferença significativa entre dois grupos, como demonstrado na tabela 5.

Na figura 16 observa-se a viabilidade bacteriana por meio de contagem de colônias obtidas na cultura microbiológica após a irrigação dos espécimes dos diferentes grupos testados. O grupo menos efetivo foi o grupo 3, constituído por NaOCl a 1%, em pH 10.

Na figura 17 é possível observar as placas de cultura com as colônias após irrigação dos espécimes com NaOCl a 1% com diferentes valores de pH.

Na figura 18 se observam placas obtidas dos espécimes irrigados com solução de NaOCl a 2,5% e na figura 19, imagens dos espécimes irrigados com NaOCl a 5%.

A figura 20 evidencia os controles da cultura microbiológica negativo, com ausência total de crescimento colonial e positivo com número incontável de colônias.

Tabela 5. Grupos que apresentaram diferenças significativas pela cultura microbiológica após aplicação dos testes estatísticos Kruskal Wallis-Dunn ($p < 0.05$).

ANÁLISE POR CONTAGEM DE UFC		
Grupos	Valor de p	
1% - pH 10 vs. 5% - pH 5	0.0315	*

Figura 16. Gráfico representativo da porcentagem de bactérias viáveis após o tratamento com as soluções irrigadoras. Análise por cultura microbiológica de contagem de colônias (UFC/mL).

Figura 17. Representação dos grupos NaOCl 1%-pH5 (A); NaOCl 1%-pH7 (B); NaOCl 1%-pH10 (C) através da cultura microbiológica.

Figura 18. Representação dos grupos NaOCl 2,5%-pH5 (A); NaOCl 2,5%-pH7 (B); NaOCl 2,5%-pH10 (C) através da cultura microbiológica.

Figura 19. Representação dos grupos NaOCl 5%-pH5 (A); NaOCl 5%-pH7 (B); NaOCl 5%-pH10 (C) através da cultura microbiológica.

Figura 20. Representação dos grupos controles positivo (A) e negativo (B) através da cultura microbiológica.

6 Discussão

6 DISCUSSÃO

Desde a descoberta dos micro-organismos no interior dos canais radiculares e principalmente, no interior da dentina radicular (BRÄNSTRÖM, 1982; CHIRNSIDE, 1961; GROOVE, 1929; SHOVELTON, 1964), sabe-se que eles são o principal agente etiológico no desenvolvimento da doença pulpar e periapical, assim como sua responsabilidade no insucesso do tratamento endodôntico (GOMES; LILLEY; DRUCKER, 1996b; KAKEHASHI; STANLEY; FITZGERALD, 1965; LIN; SKRIBNER; GAENGLER, 1992; NAIR et al., 1990; SIQUEIRA, J.F., JR., 2001).

Em decorrência disso, a propriedade antimicrobiana de medicamentos e irrigantes intracanais é estudada há anos, utilizando-se diferentes modelos experimentais. Vários autores utilizaram modelos *in vivo* (BYSTROM; SUNDQVIST, 1985; NAIR et al., 2005) e outros autores utilizaram modelos *in vitro*, tais como: dentes humanos infectados (GULABIVALA et al., 2004; MENEZES et al., 2004) ou dentes bovinos infectados (GOMES et al., 2003b; HAAPASALO; ORSTAVIK, 1987).

Devido ao fato de possuir importantes propriedades (dentre elas, ação antimicrobiana e dissolução tecidual), as soluções de hipoclorito de sódio tornaram-se as soluções mais utilizadas na Endodontia (SIQUEIRA, J.F., JR.; DE UZEDA, 1997).

Neste estudo, foram utilizados incisivos de dentes bovinos, unirradiculados, pois apresentam-se em maior disponibilidade e morfologia básica bem próxima dos dentes humanos. Além disso, os túbulos dentinários são parecidos, em relação ao tamanho e densidade, com dentes humanos, tornando a pesquisa o mais próximo do real (MA et al., 2011).

Optou-se por utilizar o modelo de bloco de dentina bovino introduzido há mais de 20 anos na literatura (HAAPASALO; ORSTAVIK, 1987), que foi um dos primeiros modelos que visavam padronizar a eficácia dos testes *in vitro* de agentes de desinfecção do canal radicular, seus túbulos e ramificações. No entanto, a padronização do tamanho do espécime foi alterada, pois no estudo anterior foram utilizados blocos de dentina no tamanho de 4mm, enquanto que na presente pesquisa foram utilizados blocos de dentina de 12mm de comprimento, para facilitar a manipulação, a visualização no MCVL e aproximar-se da condição real clínica dos dentes humanos, que são mais longos.

É importante ressaltar, que as variações anatômicas do sistema de canais radiculares servem como proteção para bactérias ali alojadas, constituindo reentrâncias que impedem a penetração dos antimicrobianos (NAIR et al., 2005). Portanto, a falta de variações anatômicas nos corpos de prova foi uma limitação do presente estudo, no entanto, possibilitou a padronização das amostras. A principal avaliação se deu na descontaminação dos túbulos dentinários, que são francamente colonizados pelas bactérias. Mais ainda, a padronização dos espécimes permite a presença de menos viés quando se comparam diversas soluções.

O *Enterococcus faecalis* foi escolhido como um organismo teste devido a vários fatores: é encontrado com maior frequência em cenários de retratamento; tem sido amplamente utilizado em trabalhos experimentais de Endodontia; sobrevive em canais radiculares como um organismo isolado sem o apoio de outras bactérias (SUNDQVIST et al., 1998); apresenta facilidade no cultivo em laboratório (ORSTAVIK; HAAPASALO, 1990); e, diâmetro relativamente pequeno, facilitando sua penetração no interior dos túbulos dentinários (MA et al., 2011).

Após o desenvolvimento de estudos piloto, seguindo duas metodologias diferentes para a contaminação dos espécimes (HAAPASALO; ORSTAVIK, 1987; MA et al., 2011), não foi obtido resultado satisfatório de homogeneidade de contaminação em túbulos dentinários verificada por meio da MCVL. Dessa forma, foi necessário realizar algumas modificações no protocolo de contaminação, associando as duas metodologias, para se obter uma contaminação densa e homogênea. Para isso, vários testes preliminares foram desenvolvidos no início da pesquisa. Após o desenvolvimento da metodologia preconizada por HAAPASALO; ORSTAVIK (1987), notou-se que decorrido o tempo de contaminação (21 dias), os túbulos apresentavam-se bastante contaminados, porém, a viabilidade bacteriana era mínima, ou seja, a maior parte das bactérias estava morta, coradas em vermelho, conforme demonstrada no anexo A, provavelmente devido ao longo período de incubação, mesmo com trocas diárias de caldo BHI. De acordo com a metodologia preconizada por MA et al. (2011), os espécimes utilizados seriam de 4mm apenas, com cortes longitudinais e contaminação via interna e externa ao canal radicular. Neste trabalho, os espécimes possuíam 12mm, sem corte longitudinal, selados externamente com esmalte de unha, para que a contaminação ocorresse somente por via interna ao canal radicular, ou seja, situação semelhante à encontrada na realidade clínica.

Ao invés de ser feita uma contaminação de 24 horas, optou-se em fazer a contaminação em 3 dias, onde a sequência de centrifugação preconizada por MA et al. (2011) foi feita no 1º dia, a troca de caldo BHI com uma única centrifugação em uma única velocidade no 2º dia, e a análise da contaminação no 3º dia. Notou-se que após o tempo de contaminação, juntamente com as centrifugações, a contaminação foi mínima, apesar das poucas bactérias presentes permanecerem vivas. Isso ocorreu provavelmente, porque foi utilizado uma metodologia, com um espécime diferente do original, onde a contaminação foi somente via canal e não por todas as faces expostas.

Assim, após análise das vantagens e desvantagens das duas metodologias em questão, optou-se por associar as duas, além de acrescentar alguns fatores, a fim de obtermos uma contaminação mais densa e homogênea em um tempo relativamente pequeno.

Previamente à contaminação, os espécimes receberam caldo BHI esterilizado nos microtubos e foram submetidos à agitação ultrassônica durante 15 minutos para a penetração do caldo nos túbulos dentinários. Com isso, as bactérias que penetrassem no interior dos túbulos, teriam nutrientes para sobreviverem até a próxima troca de caldo BHI.

Antes de se iniciar a contaminação, a curva de crescimento do *E. faecalis* foi estabelecida. Assim, o *E. faecalis* foi cultivado em caldo BHI e aguardou-se a incubação a 37°C durante 7 horas para haver a multiplicação exponencial das bactérias, utilizando-as para o teste em fase de crescimento ótimo e só depois dessas horas iniciou-se o processo de contaminação.

A sequência de centrifugações estipulada por MA et al. (2011) foi adotada, associada às trocas diárias de caldo BHI de acordo com HAAPASALO; ORSTAVIK (1987). O tempo de contaminação foi aumentado para 5 dias, onde a sequência de centrifugação foi feita em dias alternados (1º e 3º dia), a troca de caldo BHI com uma única centrifugação em uma única velocidade nos outros dias (2º e 4º dia) e a análise da contaminação no 5º dia. Após essa modificação, notou-se uma contaminação bastante densa e homogênea com grande viabilidade bacteriana (bactérias coradas em verde no MCVL). Para validar a metodologia desenvolvida, foi comprovada a intensa contaminação por meio de imagens adquiridas por Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV) e Microscópio Confocal de Varredura a Laser (MCVL), conforme demonstrados no anexo D.

Durante os últimos anos, várias metodologias têm sido utilizadas para quantificação da viabilidade bacteriana dentro dos túbulos dentinários (NAGAYOSHI et al., 2004; PARMAR et al., 2011; ZAPATA et al., 2008). Na presente pesquisa foram utilizadas duas metodologias diferentes: análise por MCVL e cultura microbiológica (contagem de colônias - UFC/mL).

O MCVL oferece diversas vantagens, tais como: o processamento das amostras não é destrutivo, portanto tem menos probabilidades de produzir artefatos (DEL CARPIO-PEROCHENA, 2008); as amostras não precisam de um tratamento prévio para sua análise microscópica; há a possibilidade de medir a espessura dos biofilmes antes e após o contato com as soluções experimentais; é possível a determinação da viabilidade bacteriana mediante o uso de corantes específicos. No entanto, possui algumas desvantagens, como: as amostras não são reutilizadas, uma vez que, a energia gerada pelo laser com os fluoróforos fazem este processo irreversível pela paulatina perda da fluorescência (WHITE; AMOS; FORDHAM, 1987); diferente da análise histológica, o MCVL não tem a capacidade de medir cortes de pequena espessura, limitando o número de cortes da amostra e, conseqüentemente, o estudo de áreas importantes, como por exemplo, o terço apical da raiz (ORDINOLA-ZAPATA, 2009) e, também, não possibilita campos extremamente aumentados como ocorre na microscopia eletrônica.

A solução de NaOCl foi acidificada pela adição de ácido acético. KUROIWA et al. (2003) relataram que este ácido é o mais conveniente para a acidificação da solução de hipoclorito de sódio devido à sua atividade bactericida e por ser mais seguro. As misturas com outros ácidos (como o ácido láctico e o ácido cítrico), consomem o cloro disponível da solução, resultando na redução da atividade bactericida (KUROIWA et al., 2003; ZEHNDER et al., 2005), enquanto que o ácido acético não manifesta nenhum efeito sobre o cloro dessa solução.

Como já foi comprovada a diminuição da eficácia do hipoclorito de sódio em função do tempo de preparo, temperatura e condições de armazenamento (PECORA et al., 1987), optou-se neste estudo, que todas as substâncias a serem utilizadas, fossem preparadas um dia antes do seu uso, para prevenir possíveis alterações de suas propriedades.

Para prolongar as propriedades das soluções de hipoclorito de sódio e evitar modificações das mesmas, as soluções avaliadas neste trabalho foram armazenadas em frascos âmbar, hermeticamente fechados (MCCLELLAND; WASS,

1922), ao abrigo de luz e calor (CLARKSON; MOULE; PODLICH, 2001).

Há vários trabalhos na literatura avaliando soluções de NaOCl acidificadas (DORNELLES-MORGENTAL et al., 2011; GUERREIRO-TANOMARU et al., 2011; MERCADE et al., 2009) , porém, nenhum optou por manter a solução com pH estável, obtendo maior quantidade de cloro ativo disponível por mais tempo. ZEHNDER et al. (2005) estudaram a combinação do NaOCl a 1% associado ao ácido cítrico a 10% em proporções diferentes. Observaram ausência de cloro disponível após o primeiro minuto. Uma possível explicação para este fato seria a evaporação do cloro na forma de gás durante a interação das substâncias, como relatado por BAUMGARTNER; IBAY (1987). MERCADE et al. (2009) avaliaram as soluções (preparadas previamente à irrigação) durante 5 minutos dentro do canal radicular, enquanto GUERREIRO-TANOMARU et al. (2011) avaliaram soluções irrigadoras (preparadas previamente à irrigação) durante 30 segundos, 1, 3 e 10 minutos dentro do canal radicular. Portanto, estima-se que, após o primeiro minuto do preparo, o teor de cloro já havia diminuído ou estava ausente, alterando os resultados da pesquisa. Com esses dados na literatura, subentende-se que as soluções deveriam ser colocadas diretamente dentro do canal radicular, ao invés de serem misturadas previamente, para evitar a perda potencial de cloro no primeiro minuto. Um minuto de acidificação somente no canal radicular não seria suficiente para o intento antimicrobiano em nível de ramificações e túbulos dentinários. Clinicamente, esse processo é inviável, já que dependeria de tempo e equipamentos laboratoriais para a realização do mesmo.

Assim, a fim de evitar alteração do pH das soluções testadas neste trabalho e, conseqüentemente, manter o teor de cloro, foram utilizadas soluções tampões, com o propósito de manter o pH estável por mais tempo. O pH das soluções acidificadas foram aferidos a cada 7 dias a partir de sua data de preparo, onde notou-se manutenção dos valores para todas as soluções de pH 5 e pH 10 até o 14º dia, enquanto as soluções de pH 7 foram as mais instáveis, apresentando alterações em seus valores a partir do 7º dia após sua data de preparo.

Para certificar-se de que as substâncias tampões não iriam interferir na ação antimicrobiana das soluções, foi feito um estudo piloto para avaliar sua ação sobre os espécimes previamente contaminados. Foi feito o cálculo para obtenção do volume necessário para a dissolução de cada substância, em um volume final de 40 mL de água destilada. Em seguida, foi feita a irrigação com as soluções tampões

apenas nos dentes contaminados. Após análise no MCVL, observou-se que as bactérias mantiveram-se vivas, concluindo que as substâncias tampões não possuíam nenhuma ação sobre as mesmas e poderiam ser utilizadas na pesquisa sem nenhum risco de resultados “falsos-positivos”, conforme demonstrado no anexo E.

Neste trabalho, os micro-organismos tiveram eliminação maior na região mais superficial, como visto nas figuras 11 e 12, porém, sem diferença estatística entre as duas regiões. Este resultados estão de acordo com VAHDATY; PITT FORD; WILSON (1993) que observaram com significância a diminuição do número de bactérias nos primeiros 100µm de profundidade, enquanto em profundidade maior, houve a permanência da contaminação, evidenciando assim, a importância do uso do curativo de demora entre as sessões.

No presente estudo observou-se que quanto maior a concentração da solução, maior a sua eficácia antimicrobiana. Esse resultado corrobora com o estudo de BERBER et al. (2006), que observaram que soluções de hipoclorito de sódio a 5.25% possuem maior atividade antibacteriana no interior de túbulos dentinários infectados com *E. faecalis* quando comparadas com soluções em menores concentrações (0.5% e 2.5%). Além disso, os resultados também mostraram que quando a solução de NaOCl se apresenta mais próxima do pH 5, maior é a ação antimicrobiana da solução, como foi sugerido por CAMPS et al. (2009) e MERCADE et al. (2009), corroborando também com (HUGO; RUSSEL, 1983). Uma possível explicação para esse fato pode ser que a solução de NaOCl com pH baixo favorece o aumento de HOCl, que possui de 80 a 100 vezes maior potencial desinfetante que o íon hipoclorito (BREMER; MONK; BUTLER, 2002). Além disso, o HOCl possui uma melhor capacidade de penetrar na membrana da célula bacteriana reagindo com o seu DNA, RNA e outros nucleotídeos, além da reação com aminoácidos, produzindo cloraminas, promovendo o efeito bacteriostático (HAWKINS; DAVIES, 2002).

Entretanto, nenhuma das soluções testadas, independente da concentração ou do pH, foi capaz de eliminar 100% dos *Enterococcus faecalis*, não apresentando concordância com os resultados de ABDULLAH et al. (2005) e RADCLIFFE et al. (2004), que concluíram que soluções de hipoclorito de sódio em concentrações mais elevadas (2,5% ou 5%) eliminam 100% de *E. faecalis* em 5 minutos ou menos.

Os resultados obtidos na metodologia de cultura microbiológica seguiram o mesmo padrão daquele evidenciado pela análise em MCVL, como é possível

constatar pelas figuras 10 e 11. Foram feitas repetições do experimento da cultura quando se havia feito a diluição até 10^{-2} , pois o crescimento colonial nas placas de agar foi muito exuberante inviabilizando a contagem. Com mais uma diluição decimal, o número de colônias produzidos foi bem reduzido, havendo alguns resultados “zero”. Estes valores diminutos prejudicaram a avaliação estatística, no entanto, o padrão de comparação entre os grupos foi bastante semelhante ao MCLV. Na metodologia da cultura foi possível evidenciar diferença estatística somente entre os dois grupos extremos, o grupo 3, de NaOCl a 1% pH 10 (menor concentração e pH mais alcalino) que pouco atuou sobre os micro-organismos, diferente estatisticamente do grupo 7, NaOCl a 5% pH 5 (maior concentração e pH mais ácido) que mostrou maior efeito antimicrobiano.

Com relação ao uso de soluções acidificadas, neste trabalho foi obtido o aumento do efeito antimicrobiano, comprovado pelas duas metodologias utilizadas, MCVL e cultura microbiológica. Porém, na literatura, há algumas controvérsias. MERCADE et al. (2009) observaram haver diferença significativa entre NaOCl a 4,2% pH 6,5% comparado com NaOCl a 4,2% pH 12, que foi menos efetivo, corroborando nossos achados, na acidificação.

Já ZEHNDER et al. (2002), compararam o efeito antibacteriano das soluções de hipoclorito de sódio a 0,5%, tamponadas ou não, e observaram não haver diferenças significativas entre elas. Neste caso o tamponamento foi nos valores de pH 12 e 9, valores muito mais alcalinos que do nosso estudo, assim como a concentração de 0,5% é bastante baixa, com efeito antimicrobiano menor também. GUERREIRO-TANOMARU et al. (2011) observaram também que as soluções de NaOCl a 2,5% acidificadas não apresentaram maior atividade antimicrobiana quando comparada com a solução de NaOCl a 2,5%, sem modificação. Obtiveram resultados antimicrobianos mais rápidos quando associaram NaOCl a determinados ácidos do que quando utilizaram estes ácidos sozinhos para a descontaminação.

É importante ressaltar neste contexto, as diferenças metodológicas, de cultura, *in vitro*, em dentes ou em placas somente, o controle do pH das soluções e as concentrações e valores utilizados. Nenhum destes autores utilizou a MCVL e, além disso, também não utilizaram soluções tamponadas que permitisse manter o pH pesquisado por mais tempo, como já discutido anteriormente.

É importante lembrar que, embora o hipoclorito de sódio seja o irrigante mais comumente utilizado na terapia endodôntica, ele pode causar alterações no

conteúdo orgânico e mineral da estrutura dentinária quando utilizado em altas concentrações (MCCOMB; SMITH, 1975). Além disso, sua toxicidade está diretamente relacionada com a sua concentração: quanto mais alta sua concentração, maior é a sua toxicidade (FERRAZ et al., 2001; GOMES et al., 2003a; HÜLSMANN; HAHN, 2000; VIANNA et al., 2004).

SIQUEIRA JR. et al. (2000) recomendam a renovação e uso de maior volume de solução de baixa concentração de hipoclorito de sódio empregada como irrigante para manter a efetividade antimicrobiana da solução, compensando os efeitos irritantes quando da utilização de concentrações mais elevadas.

Pelos resultados obtidos e semelhança estatística entre alguns grupos, após a análise em MCVL, cabe uma ressalva interessante. Alguns autores (CHANDRA et al., 2010; PASQUALINI et al., 2010; PRABHAKAR et al., 2010) preconizam o uso de soluções concentradas de NaOCl, a 5,25% por exemplo, que pode ser criticada devido à toxicidade exercida caso extravase para a região periapical. Nos resultados da presente pesquisa, não houve diferença estatisticamente significativa quanto à eliminação bacteriana nos túbulos dentinários quando se usou o grupo 1 (NaOCl 1% pH 5) ou os grupos 7 (NaOCl 5% pH 5), 8 (NaOCl 5% pH 7) e 9 (NaOCl 5% pH 10), que são soluções mais concentradas. Desta forma, uma alternativa seria utilizar soluções menos concentradas (1%) para que a toxicidade seja reduzida, com valores de pH mais ácidos (pH 5) como no grupo 1. O produto final seria uma solução menos tóxica, com o mesmo efeito antimicrobiano, evidenciado neste estudo. Cabe ressaltar a importância da solução tampão associada, para que a solução mantenha o valor de pH por períodos prolongados.

Os irrigantes acidificados podem, por outro lado, reduzir a capacidade de dissolução tecidual (SIQUEIRA et al., 2004), de forma que essas soluções acidificadas e tamponadas deveriam ser utilizadas somente quando os tecidos pulpare vivos ou necróticos já tivessem sido dissolvidos, aumentando o efeito antimicrobiano.

Dessa forma, como alternativa em situações clínicas, os resultados deste estudo sugerem que quando a solução de hipoclorito de sódio é combinada com uma solução ácida, a eliminação dos micro-organismos é maior. Este estudo pode sugerir utilizar a solução de NaOCl a 1% com pH 5 como irrigante final, antes da obturação, complementando a atividade antimicrobiana imprescindível para o êxito do tratamento endodôntico.

7 Conclusões

7 CONCLUSÕES

Dentro do que se propôs analisar e baseado nos resultados obtidos sobre o efeito antimicrobiano das soluções irrigadoras aqui testadas, pode-se concluir que a diminuição do pH do hipoclorito de sódio propiciou uma redução significativa no número de bactérias. Essa redução foi, ainda, maior quando a concentração da solução era elevada.

Referências

REFERÊNCIAS

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.

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

Baumgartner JC, Cuenin PR. Efficacy of Several Concentrations of Sodium-Hypochlorite for Root-Canal Irrigation. *Journal of Endodontics*. 1992;18(12):605-12.

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

Becking AG. Complications in the use of sodium hypochlorite during endodontic treatment. Report of three cases. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1991;71(3):346-8.

Berber VB, Gomes BP, Sena NT, Vianna ME, Ferraz CC, Zaia AA, et al. Efficacy of various concentrations of NaOCl and instrumentation techniques in reducing *Enterococcus faecalis* within root canals and dentinal tubules. *Int Endod J*. 2006;39(1):10-7.

Bränström M. *Dentin and pulp restorative dentistry*. London: Wolf Medial; 1982.

Bremer PJ, Monk I, Butler R. Inactivation of *Listeria monocytogenes*/Flavobacterium spp. biofilms using chlorine: impact of substrate, pH, time and concentration. *Lett Appl Microbiol*. 2002;35(4):321-5.

Bystrom A, Sundqvist G. Bacteriologic evaluation of the efficacy of mechanical root canal instrumentation in endodontic therapy. *Scand J Dent Res*. 1981;89(4):321-8.

Bystrom A, Sundqvist G. The antibacterial action of sodium hypochlorite and EDTA in 60 cases of endodontic therapy. *Int Endod J*. 1985;18(1):35-40.

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

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.

Chávez de Paz LE, Bergenholtz G, Svensater G. The Effects of Antimicrobials on Endodontic Biofilm Bacteria. *Journal of Endodontics.* 2010;36(1):70-7.

Chirnside IM. Bacterial invasion of non-vital dentin. *J Dent Res.* 1961;40:134-40.

Chivatxaranukul P, Dashper SG, Messer HH. Dentinal tubule invasion and adherence by *Enterococcus faecalis*. *Int Endod J.* 2008;41(10):873-82.

Clarkson RM, Moule AJ, Podlich HM. The shelf-life of sodium hypochlorite irrigating solutions. *Aust Dent J.* 2001;46(4):269-76.

Dahlen G, Bergenholtz G. Endotoxic activity in teeth with necrotic pulps. *J Dent Res.* 1980;59(6):1033-40.

Dakin HD. On the Use of Certain Antiseptic Substances in the Treatment of Infected Wounds. *Br Med J.* 1915;2(2852):318-20.

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.

Dornelles-Morgental R, Guerreiro-Tanomaru JM, de Faria-Junior NB, Hungaro-Duarte MA, Kuga MC, Tanomaru-Filho M. Antibacterial efficacy of endodontic irrigating solutions and their combinations in root canals contaminated with *Enterococcus faecalis*. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2011;112(3):396-400.

Estrela C, Silva JA, de Alencar AH, Leles CR, Decurcio DA. Efficacy of sodium hypochlorite and chlorhexidine against *Enterococcus faecalis*--a systematic review. *J Appl Oral Sci.* 2008;16(6):364-8.

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.

Foley DB, Weine FS, Hagen JC, deObarrio JJ. Effectiveness of selected irrigants in the elimination of *Bacteroides melaninogenicus* from the root canal system: an in vitro study. *J Endod.* 1983;9(6):236-41.

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, Lilley JD, Drucker DB. Variations in the susceptibilities of components of the endodontic microflora to biomechanical procedures. *Int Endod J.* 1996a;29(4):235-41.

Gomes BP, Lilley JD, Drucker DB. Associations of endodontic symptoms and signs with particular combinations of specific bacteria. *Int Endod J.* 1996b;29(2):69-75.

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.

Gomes BP, Pedroso JA, Jacinto RC, Vianna ME, Ferraz CC, Zaia AA, et al. In vitro evaluation of the antimicrobial activity of five root canal sealers. *Braz Dent J.* 2004;15(1):30-5.

Gomes BP, Pinheiro ET, Sousa EL, Jacinto RC, Zaia AA, Ferraz CC, et al. *Enterococcus faecalis* in dental root canals detected by culture and by polymerase chain reaction analysis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2006;102(2):247-53.

Gomes BP, Sato E, Ferraz CC, Teixeira FB, Zaia AA, Souza-Filho FJ. Evaluation of time required for recontamination of coronally sealed canals medicated with calcium hydroxide and chlorhexidine. *Int Endod J.* 2003a;36(9):604-9.

Gomes BP, Souza SF, Ferraz CC, Teixeira FB, Zaia AA, Valdrighi L, et al. Effectiveness of 2% chlorhexidine gel and calcium hydroxide against *Enterococcus faecalis* in bovine root dentine in vitro. *Int Endod J.* 2003b;36(4):267-75.

Gordon TM, Damato D, Christner P. Solvent effect of various dilutions of sodium hypochlorite on vital and necrotic tissue. *J Endod.* 1981;7(10):466-9.

Groove CJ. An acurated new technic for filling root canal to the destino cemental junction with impermeable materials. J Am Dent Assoc. 1929;17(3):1915-7.

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

Gulabivala K, Stock CJ, Lewsey JD, Ghorri S, Ng YL, Spratt DA. Effectiveness of electrochemically activated water as an irrigant in an infected tooth model. Int Endod J. 2004;37(9):624-31.

Haapasalo M, Orstavik D. In vitro infection and disinfection of dentinal tubules. J Dent Res. 1987;66(8):1375-9.

Harrison JW, Wagner GW, Henry CA. Comparison of the antimicrobial effectiveness of regular and fresh scent Clorox. J Endod. 1990;16(7):328-30.

Hauman CH, Love RM. Biocompatibility of dental materials used in contemporary endodontic therapy: a review. Part 1. Intracanal drugs and substances. Int Endod J. 2003;36(2):75-85.

Hawkins CL, Davies MJ. Hypochlorite-induced damage to DNA, RNA, and polynucleotides: formation of chloramines and nitrogen-centered radicals. Chem Res Toxicol. 2002;15(1):83-92.

Hugo WB, Russel AD. Pharmaceutical microbiology. 3rd ed. Oxford: Blackwell Science; 1983.

Hülsmann M, Hahn W. Complications during root canal irrigation--literature review and case reports. Int Endod J. 2000;33(3):186-93.

Ingle JI, Zeldow BJ. An evaluation of mechanical instrumentation and the negative culture in endodontic therapy. J Am Dent Assoc. 1958;57(4):471-6.

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

- Kandaswamy D, Venkateshbabu N, Gogulnath D, Kindo AJ. Dentinal tubule disinfection with 2% chlorhexidine gel, propolis, morinda citrifolia juice, 2% povidone iodine, and calcium hydroxide. *Int Endod J*. 2010;43(5):419-23.
- Kaufman AY, Keila S. Hypersensitivity to sodium hypochlorite. *J Endod*. 1989;15(5):224-6.
- Kuroiwa K, Nakayama H, Kuwahara T, Tamagawa K, Hattori K, Murakami K, et al. Augmenting effect of acetic acid for acidification on bactericidal activity of hypochlorite solution. *Lett Appl Microbiol*. 2003;36(1):46-9.
- Leonardo MR. *Endodontia - Tratamento de canais radiculares*. 4ª ed: Artes Médicas; 2005.
- Lin LM, Skribner JE, Gaengler P. Factors associated with endodontic treatment failures. *J Endod*. 1992;18(12):625-7.
- Lopes HP, Siqueira Jr. JF. *Endodontia-biologia e técnica*. 1ª ed: MEDSI; 1999.
- Love RM. *Enterococcus faecalis*--a mechanism for its role in endodontic failure. *Int Endod J*. 2001;34(5):399-405.
- Ma J, Wang Z, Shen Y, Haapasalo M. A new noninvasive model to study the effectiveness of dentin disinfection by using confocal laser scanning microscopy. *J Endod*. 2011;37(10):1380-5.
- McClelland JR, Wass MJA. Contribution to the study of the chlorin disinfectants. *Dent Cosmos*. 1922;64(1):56-65.
- McComb D, Smith DC. A preliminary scanning electron microscopic study of root canals after endodontic procedures. *J Endod*. 1975;1(7):238-42.
- McHugh CP, Zhang P, Michalek S, Eleazer PD. pH required to kill *Enterococcus faecalis* in vitro. *J Endod*. 2004;30(4):218-9.
- Menezes MM, Valera MC, Jorge AO, Koga-Ito CY, Camargo CH, Mancini MN. In vitro evaluation of the effectiveness of irrigants and intracanal medicaments on microorganisms within root canals. *Int Endod J*. 2004;37(5):311-9.

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

Molander A, Reit C, Dahlen G, Kvist T. Microbiological status of root-filled teeth with apical periodontitis. *Int Endod J*. 1998;31(1):1-7.

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

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

Nagayoshi M, Kitamura C, Fukuizumi T, Nishihara T, Terashita M. Antimicrobial effect of ozonated water on bacteria invading dentinal tubules. *J Endod*. 2004;30(11):778-81.

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.

Nair PN, Sjogren U, Krey G, Kahnberg KE, Sundqvist G. Intraradicular bacteria and fungi in root-filled, asymptomatic human teeth with therapy-resistant periapical lesions: a long-term light and electron microscopic follow-up study. *J Endod*. 1990;16(12):580-8.

Nakajo K, Komori R, Ishikawa S, Ueno T, Suzuki Y, Iwami Y, et al. Resistance to acidic and alkaline environments in the endodontic pathogen *Enterococcus faecalis*. *Oral Microbiol Immunol*. 2006;21(5):283-8.

Neal RG, Craig RG, Powers JM. Effect of sterilization and irrigants on the cutting ability of stainless steel files. *J Endod*. 1983;9(3):93-6.

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.

- 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.
- Parmar D, Hauman CH, Leichter JW, McNaughton A, Tompkins GR. Bacterial localization and viability assessment in human ex vivo dentinal tubules by fluorescence confocal laser scanning microscopy. *Int Endod J*. 2011;44(7):644-51.
- Pashley EL, Birdsong NL, Bowman K, Pashley DH. Cytotoxic effects of NaOCl on vital tissue. *J Endod*. 1985;11(12):525-8.
- Pasqualini D, Cuffini AM, Scotti N, Mandras N, Scalas D, Pera F, et al. Comparative evaluation of the antimicrobial efficacy of a 5% sodium hypochlorite subsonic-activated solution. *J Endod*. 2010;36(8):1358-60.
- Peciuliene V, Reynaud AH, Balciuniene I, Haapasalo M. Isolation of yeasts and enteric bacteria in root-filled teeth with chronic apical periodontitis. *Int Endod J*. 2001;34(6):429-34.
- Pecora JD, Murgel CA, Savioli RN, Costa WF, Vansan LP. [The shelf life of Dakin solution]. *Rev Odontol Univ Sao Paulo*. 1987;1(1):3-7.
- Pinheiro ET, Gomes BP, Ferraz CC, Sousa EL, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. Microorganisms from canals of root-filled teeth with periapical lesions. *Int Endod J*. 2003;36(1):1-11.
- 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.
- Radcliffe CE, Potouridou L, Qureshi R, Hababbeh N, Qualtrough A, Worthington H, et al. Antimicrobial activity of varying concentrations of sodium hypochlorite on the endodontic microorganisms *Actinomyces israelii*, *A. naeslundii*, *Candida albicans* and *Enterococcus faecalis*. *Int Endod J*. 2004;37(7):438-46.

Rôças IN, Siqueira JF, Jr., Santos KR. Association of *Enterococcus faecalis* with different forms of periradicular diseases. *J Endod*. 2004;30(5):315-20.

Sena NT. Estudo in vitro da atividade antimicrobiana do hipoclorito de sódio e da clorexidina usados como substâncias químicas auxiliares frente a biofilmes de espécie única. Piracicaba [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: UNICAMP; 2004.

Shovelton DS. The presence and distribution of micro-organism within non-vital teeth. *Br Dent J*. 1964;117(3):101-7.

Simões W, Sampaio JMP, Debelian GD. Verificação da tolerância tecidual a poder bactericida do hipoclorito de sódio a 0,5% e 1% usados na clínica odontológica. *Rev Paul Odontol*. 1989;11(4):35-8.

Siqueira EL. Dissolução de tecido pulpar bovino por duas composições químicas utilizadas em Endodontia. [Tese de Doutorado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo; 2004.

Siqueira JF, Jr, 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 JF, Jr. Aetiology of root canal treatment failure: why well-treated teeth can fail. *Int Endod J*. 2001;34(1):1-10.

Siqueira JF, Jr., de Uzeda M. Intracanal medicaments: evaluation of the antibacterial effects of chlorhexidine, metronidazole, and calcium hydroxide associated with three vehicles. *J Endod*. 1997;23(3):167-9.

Siqueira Jr. JF, Rocas IN, Favieri A, Lima KC. Chemomechanical reduction of the bacterial population in the root canal after instrumentation and irrigation with 1%, 2.5%, and 5.25% sodium hypochlorite. *J Endod*. 2000;26(6):331-4.

Siren EK, Haapasalo MP, Ranta K, Salmi P, Kerosuo EN. Microbiological findings and clinical treatment procedures in endodontic cases selected for microbiological investigation. *Int Endod J*. 1997;30(2):91-5.

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

Spangberg L, Engstrom B, Langeland K. Biologic effects of dental materials. 3. Toxicity and antimicrobial effect of endodontic antiseptics in vitro. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1973;36(6):856-71.

Spanó 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.

Sundqvist G. Associations between microbial species in dental root canal infections. *Oral Microbiol Immunol.* 1992;7(5):257-62.

Sundqvist G, Figdor D, Persson S, Sjogren U. Microbiologic analysis of teeth with failed endodontic treatment and the outcome of conservative re-treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 1998;85(1):86-93.

Vaghela DJ, Kandaswamy D, Venkateshbabu N, Jamini N, Ganesh A. Disinfection of dentinal tubules with two different formulations of calcium hydroxide as compared to 2% chlorhexidine: As intracanal medicaments against *Enterococcus faecalis* and *Candida albicans*: An in vitro study. *J Conserv Dent.* 2011;14(2):182-6.

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, Silva KC, Maekawa LE, Carvalho CA, Koga-Ito CY, Camargo CH, et al. Antimicrobial activity of sodium hypochlorite associated with intracanal medication for *Candida albicans* and *Enterococcus faecalis* inoculated in root canals. *J Appl Oral Sci.* 2009;17(6):555-9.

Vianna ME, Gomes BP, Berber VB, Zaia AA, Ferraz CC, de Souza-Filho FJ. In vitro evaluation of the antimicrobial activity of chlorhexidine and sodium hypochlorite. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2004;97(1):79-84.

Villas-Boas MH, Bernardineli N, Cavenago BC, Marciano M, Del Carpio-Perochena A, de Moraes IG, et al. Micro-computed tomography study of the internal anatomy of mesial root canals of mandibular molars. *J Endod.* 2011;37(12):1682-6.

Vivacqua-Gomes N, Gurgel-Filho ED, Gomes BP, Ferraz CC, Zaia AA, Souza-Filho FJ. Recovery of *Enterococcus faecalis* after single- or multiple-visit root canal treatments carried out in infected teeth ex vivo. *Int Endod J*. 2005;38(10):697-704.

Walker A. Definite and dependable therapy for pulpless teeth. *J Am Dent Assoc*. 1936;23(8):1418 - 25.

Wang QQ, Zhang CF, Chu CH, Zhu XF. Prevalence of *Enterococcus faecalis* in saliva and filled root canals of teeth associated with apical periodontitis. *Int J Oral Sci*. 2012;4(1):19-23.

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.

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

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

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

Zhu X, Wang Q, Zhang C, Cheung GS, Shen Y. Prevalence, phenotype, and genotype of *Enterococcus faecalis* isolated from saliva and root canals in patients with persistent apical periodontitis. *J Endod*. 2010;36(12):1950-5.

Anexos

ANEXO A. Imagens representativas dos espécimes após desenvolvimento do protocolo de contaminação preconizado por HAAPASALO; ORSTAVIK (1987). Pode-se observar contaminação relativamente grande, porém, grande quantidade de bactérias mortas (vermelhas) (A-B-C-D).

ANEXO B. Imagens representativas dos espécimes após desenvolvimento do protocolo de contaminação preconizado por MA et al. (2011). Pode-se observar grande viabilidade bacteriana (bactérias coradas em verde), porém, a contaminação não está tão densa e homogênea como o desejado (A-B-C-D).

ANEXO C. Imagens representativas dos espécimes após desenvolvimento do protocolo de contaminação desenvolvido durante a presente pesquisa. Pode-se observar que a contaminação está bastante densa e homogênea, além do grande número de bactérias vivas (A-B-C-D).

ANEXO D. Imagens representativas das amostras após desenvolvimento do protocolo de contaminação desenvolvido durante a presente pesquisa. Pode-se observar que a contaminação está bastante densa e homogênea. Imagens obtidas através do MEV (A-B) e do MCVL (C-D).

ANEXO E. Imagens representativas dos espécimes após irrigação com as substâncias tampões diluídas em água destilada. Pode-se observar grande viabilidade bacteriana, podendo concluir que as substâncias tampões não têm atividade antimicrobiana. Imagens referentes a irrigação com soluções contendo: acetato de sódio (A), cacodilato de sódio (B) e glicina (C).

ANÁLISE DO MCVL		
Grupos	Valor de p	
NaOCl 1% - pH5 vs. NaOCl 1% - pH7	< 0,0001	****
NaOCl 1% - pH5 vs. NaOCl 1% - pH10	< 0,0001	****
NaOCl 1% - pH5 vs. NaOCl 2,5% - pH5	> 0,9999	ns
NaOCl 1% - pH5 vs. NaOCl 2,5% - pH7	0,0651	ns
NaOCl 1% - pH5 vs. NaOCl 2,5% - pH10	0,0058	**
NaOCl 1% - pH5 vs. NaOCl 5% - pH5	> 0,9999	ns
NaOCl 1% - pH5 vs. NaOCl 5% - pH7	> 0,9999	ns
NaOCl 1% - pH5 vs. NaOCl 5% - pH10	0,2021	ns
NaOCl 1% - pH7 vs. NaOCl 1% - pH10	> 0,9999	ns
NaOCl 1% - pH7 vs. NaOCl 2,5% - pH5	< 0,0001	****
NaOCl 1% - pH7 vs. NaOCl 2,5% - pH7	> 0,9999	ns
NaOCl 1% - pH7 vs. NaOCl 2,5% - pH10	> 0,9999	ns
NaOCl 1% - pH7 vs. NaOCl 5% - pH5	< 0,0001	****
NaOCl 1% - pH7 vs. NaOCl 5% - pH7	0,0020	**
NaOCl 1% - pH7 vs. NaOCl 5% - pH10	0,7098	ns
NaOCl 1% - pH10 vs. NaOCl 2,5% - pH5	< 0,0001	****
NaOCl 1% - pH10 vs. NaOCl 2,5% - pH7	> 0,9999	ns
NaOCl 1% - pH10 vs. NaOCl 2,5% - pH10	> 0,9999	ns
NaOCl 1% - pH10 vs. NaOCl 5% - pH5	< 0,0001	****
NaOCl 1% - pH10 vs. NaOCl 5% - pH7	0,0010	**
NaOCl 1% - pH10 vs. NaOCl 5% - pH10	0,4620	ns
NaOCl 2,5% - pH5 vs. NaOCl 2,5% - pH7	0,0023	ns
NaOCl 2,5% - pH5 vs. NaOCl 2,5% - pH10	0,0001	***
NaOCl 2,5% - pH5 vs. NaOCl 5% - pH5	> 0,9999	ns
NaOCl 2,5% - pH5 vs. NaOCl 5% - pH7	> 0,9999	ns
NaOCl 2,5% - pH5 vs. NaOCl 5% - pH10	0,0094	**

<i>Continuação</i>		
<i>NaOCl 2,5% - pH7 vs. NaOCl 5% - pH5</i>	<i>< 0,0001</i>	<i>****</i>
<i>NaOCl 2,5% - pH7 vs. NaOCl 5% - pH7</i>	<i>> 0,9999</i>	<i>ns</i>
<i>NaOCl 2,5% - pH7 vs. NaOCl 5% - pH10</i>	<i>> 0,9999</i>	<i>ns</i>
<i>NaOCl 2,5% - pH10 vs. NaOCl 5% - pH5</i>	<i>< 0,0001</i>	<i>****</i>
<i>NaOCl 2,5% - pH10 vs. NaOCl 5% - pH7</i>	<i>0,2481</i>	<i>ns</i>
<i>NaOCl 2,5% - pH10 vs. NaOCl 5% - pH10</i>	<i>> 0,9999</i>	<i>ns</i>
<i>NaOCl 5% - pH5 vs. NaOCl 5% - pH7</i>	<i>0,0464</i>	<i>*</i>
<i>NaOCl 5% - pH5 vs. NaOCl 5% - pH10</i>	<i>< 0,0001</i>	<i>****</i>
<i>NaOCl 5% - pH7 vs. NaOCl 5% - pH10</i>	<i>> 0,9999</i>	<i>ns</i>

ANEXO F. Representação dos testes estatístico (Kruskal Wallis-Dunn) após análise do MCVL, demonstrando os grupos com ($p < 0.05$) e sem diferenças significativas.