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

RONALD ORDINOLA ZAPATA

**Efeito da irrigação e medicação endodôntica em dentina
infectada por biofilmes orais**

**BAURU
2013**

RONALD ORDINOLA ZAPATA

Efeito da irrigação e medicação endodôntica em dentina infectada por biofilmes orais

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências Odontológicas Aplicadas.

Área de Concentração: Endodontia

Orientador: Prof. Dr. Clóvis Monteiro Bramante

Versão Corrigida

BAURU
2013

Or12e Ordinola Zapata, Ronald
Efeito da irrigação e medicação endodôntica em
dentina infectada por biofilmes orais / Ronald Ordinola
Zapata. -- Bauru, 2013.
122 p. : il. ; 30 cm.

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

Orientador: Prof. Dr. Clóvis Monteiro Bramante

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

Autorizo, exclusivamente pra fins acadêmicos e científicos, a
reprodução total ou parcial desta tese, por processo
fotocopiadores e/ou meios eletrônicos.

Assinatura do autor:

Data:

Comitê de Ética da FOB-USP

Protocolo n.º: 134/2010
Data: 03/11/2010

Dados Curriculares

Ronald Ordinola Zapata

<i>21 de Maio de 1976</i>	<i>Nascimento</i> <i>Lima-Peru</i>
<i>Filiação</i>	<i>Luciano A. Ordinola Rueda</i> <i>Paula R. Zapata Velit</i>
<i>1993-2000</i>	<i>Graduação na Universidade Inca</i> <i>Garcilaso de La Vega, Lima-Peru</i>
<i>2005</i>	<i>Prêmio Grunenthal em Odontologia</i> <i>Colegio Odontológico del Peru</i>
<i>2007-2009</i>	<i>Curso de pós-graduação, mestrado,</i> <i>área de Endodontia pela</i> <i>Faculdade de Odontologia de Bauru</i> <i>Universidade de São Paulo</i>
<i>2010-2013</i>	<i>Curso de pós-graduação, doutorado,</i> <i>área de Endodontia pela</i> <i>Faculdade de Odontologia de Bauru</i> <i>Universidade de São Paulo</i>
<i>2012</i>	<i>Membro revisor International Endodontic</i> <i>Journal</i>
<i>Associação</i>	<i>SBPQO</i> <i>COP-Peru</i>

DEDICATÓRIA

A Deus, por conceder vida, saúde, trabalho e oportunidades.

A meus pais Luciano e Paula e à minha irmã Daisy, por todo o amor, vida e carinho que me brindam sempre. Vocês são o exemplo maior que tenho de trabalho, amor e sacrifício.

À minha esposa Luciana: “esses últimos 7 anos foram os mais bonitos e divertidos que já vivi; aprendi muito com você e espero que Deus nos dê muitos e muitos anos mais juntos, com tranquilidade e muita felicidade!” À minha sogra Maria Eugênia, por ter me acolhido em sua casa como seu filho, e por dar sempre o exemplo de inteligência e perseverança.

AGRADECIMENTOS

Em meados do ano 1993, iniciei o curso de graduação em Odontologia, na Faculdade de Estomatologia da Universidade Inca Garcilaso de la Vega, em Lima, Peru. Após 5 anos e 1 semestre acadêmico, iniciei o último ano letivo do curso; ocasião em que fiz internado multidisciplinar no Hospital Militar Central. Lá, era possível praticar 6 especialidades da Odontologia, 40 horas por semana, sendo os outros 6 meses de estágios em 6 especialidades médicas. Duas disciplinas mudaram minha vida como dentista: o estágio no laboratório clínico, que permitia compreender os métodos diagnósticos, incluindo o microbiológico, e o treinamento em Endodontia. Na área endodôntica, ganhei um mentor clínico e grande amigo: Gustavo de la Sotta. Devido à grande amizade que surgiu, meu treinamento foi estendido até completar 2 meses. Ao finalizar o internado, decidi aperfeiçoar minha técnica de preparo e procurei meus professores Carlos Ortiz Franco e Guillermo Angulo Ocampo, para me orientarem com os experimentos da minha tese de graduação, que versou sobre o uso da técnica de forças balanceadas com instrumentos de níquel-titânio para preparar raízes curvas. A revisão da literatura foi realizada na biblioteca do Colégio Odontológico do Peru, onde existia a única coleção completa do "Journal of Endodontics", o qual sempre me chamava a atenção, bem como as revistas de Periodontia e Implante. Acredito que não exista coisa melhor do que ler informação em abundância para uma mente com vontade de aprender...

Assim, paralelamente ao trabalho clínico que fazia todos os dias, nascia minha vocação de pesquisador amador. Conheci professores e amigos de um grupo comum à área endodôntica, dentre eles Carlos Mendiola, Martin Vargas Acevedo e Christian Nole. Os congressos anuais de Endodontia eram ansiosamente esperados e foram minha única oportunidade de poder mostrar meus trabalhos durante 5 anos. A interação com diversos palestrantes estimulava minha vocação docente. Dentre as palestras que mais me recordo estão as dos doutores Kaare Langeland, James Gutmann, Domenico Ricucci, Arturo Lopez Begazo e José Siqueira.

Foi durante um desses congressos, no ano de 2005, que conheci o meu orientador, o Prof. Dr. Clovis Monteiro Bramante, que me abriu as portas para iniciar os estudos de pós-graduação na Faculdade de Odontologia de Bauru, no Brasil. Assim, após trabalhar como clínico durante 6 anos, decidi iniciar os estudos de Endodontia na vida acadêmica. Durante estes últimos 6 anos (2007-2013), “vivi” no Departamento de Endodontia da Faculdade de Odontologia de Bauru; tive o privilégio de poder planejar e ajudar a desenvolver experimentos científicos junto a pessoas dedicadas e de bom coração. Conheci amigos e parceiros; fato que levou à publicação de 34 artigos científicos internacionais sobre diversas áreas do conhecimento endodôntico, sendo alguns deles apresentados nessa tese. Meus sinceros agradecimentos a todos os que contribuíram para a realização dos estudos, os quais ajudam no engrandecimento da disciplina de Endodontia da Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo.

AGRADECIMENTOS

A Deus agradeço pela saúde, oportunidades, por iluminar a mente para as buscas no campo científico e, principalmente, pelo dom da vida.

“Ninguém acende uma lâmpada e a cobre com um vaso ou a põe debaixo da cama; mas a põe sobre um castiçal, para iluminar os que entram. Porque não há coisa oculta que não acabe por se manifestar, nem secreta que não venha a ser descoberta.”

Lucas 8.16-17 (Bíblia Sagrada)

AGRADECIMENTOS

Ao Prof.Dr. Clóvis Monteiro Bramante, por ser exemplo de professor ativo, de trabalho árduo e dedicado. “Esses últimos anos foram muito produtivos e devo isso ao senhor. Muito obrigado pela confiança, amizade e oportunidade de poder seguir o curso de pós-graduação e de me realizar como docente e pesquisador. Serei eternamente grato!”

Agradeço aos queridos professores da disciplina de Endodontia:

Prof. Dr. Ivaldo Gomes de Moraes, com quem aprendi muito sobre materiais obturadores. “O seu jeito para a docência e a forma simples de ver a vida me ajudam bastante nessa época em que a informação avança muito rapidamente. Muito obrigado!”

Prof. Dr. Roberto Brandão Garcia, sempre disposto a resolver minhas dúvidas na área biológica. “O conhecimento sobre interpretação da biocompatibilidade devo ao senhor. Muito obrigado!”

Prof. Dr. Norberti Bernardineli, cuidando sempre da parte clínica na graduação, com muito bom humor. “Muito obrigado por todos os seus ensinamentos!”

Prof. Dr. Marco Antônio Húngaro Duarte; O “Sal” é o irmão mais velho que todos querem ter e um exemplo de professor e pesquisador incansável. “Muito obrigado por toda a ajuda e parceria nesses últimos anos!”

Profa. Dra. Flaviana Bombarda de Andrade; sempre sorridente e paciente para atender a todos os que precisam de sua ajuda. “Você é uma pessoa muito amável; muito obrigado pela parceria.”

A todos, muito obrigado por proporcionarem maior conhecimento sobre a biologia e a ciência dos materiais dentários aplicada à Endodontia; pela dedicação, amizade, afinho e perfeccionismo, e por tratar-me com tanto respeito e carinho durante o curso de Mestrado e Doutorado.

Aos professores doutores da área de Estomatologia, Ana Lúcia Álvares Capellozza, Izabel Regina Fischer Rubira-Bullen, Paulo Sérgio da Silva Santos e José Humberto Damante, pela ajuda sempre disponibilizada.

Ao Prof. Dr. Vinicius Carvalho Porto, diretor do Centro Integrado de Pesquisa da FOB-USP, pela disponibilização do microscópio confocal de varredura a laser utilizado nessa pesquisa.

Ao professor e amigo Dr. David Jaramillo, da Universidade de Loma Linda e à sua esposa Monica, pela ajuda disponibilizada com muito carinho durante a nossa estadia na cidade de Loma Linda. Meus agradecimentos também aos professores e funcionários da área de Endodontia da Universidade de Loma Linda, representados pelos professores Leif Bakland, Robert Handysides, Bonnie Retamozo, M. Torabinejad e Yiming Lee; pelas secretárias Luci Denger e Shannon Kokanour e pelos funcionários Dr. Dong e especialmente para meu grande amigo Ray Aprecio.

Muito obrigado!

AGRADECIMENTOS

*Agradeço a enorme ajuda de **Marcia Graeff** do Centro Integrado de Pesquisas, com quem aprendi muito durante todo esse período. “Você é um grande exemplo de pessoa batalhadora. Obrigado por tudo!”*

*A **Marcelo Milanda** do Centro Integrado de Pesquisas, pela ajuda com a preparação dos meios de cultura e corante utilizados nesses experimentos.*

*A **Edimauro de Andrade**, grande parceiro e amigo, sempre colaborando com o bom andamento do departamento e auxiliando nas pesquisas, disponibilizando ajuda quando mais necessitamos. “Muito obrigado pela amizade e companheirismo!”*

*A **Suely Regina Bettio**, secretária do Departamento de Endodontia. “Muito obrigado pela amizade e por todo o auxílio prestado em todos esses anos.”*

*A funcionárias da disciplina de Endodontia **Neide Leandro, Cleide Martins e Andressa Tiossi**, sempre prontas a ajudar. “Muito obrigado pela grande ajuda e pelo bom trabalho que desempenham no departamento.”*

*A meus professores da graduação e da Sociedade Peruana de Endodontia, por me iniciarem na pesquisa e docência em Endodontia, e por confiarem em meu trabalho, especialmente **Carlos Ortiz Franco, Guillermo Angulo Ocampo, Luis Cabrejos, Edwin Cervantes, Felipe Hurtado, Carlos Mendiola Aquino, Martin Vargas Acevedo, Arturo Lopez Begazo, Hernan Villena, Christian Nole e Augusto Vertiz Falla**.*

*A meus amigos **Martin Vargas Acevedo, Carlos Mendiola e Carlos Ortiz Franco**, grandes endodontistas, que me iniciaram na leitura crítica de artigos. “Passamos dias discutindo sobre instrumentos e cinemática. Vocês são pessoas muito especiais e verdadeiros exemplos para mim. Muito obrigado!”*

*Ao **Prof.Dr. Luis Chavez de Paz**, pela disponibilização do software “bioimageL”, sem o qual essa pesquisa não poderia ter sido concluída.*

*Aos diversos amigos do Mestrado, Doutorado e Pós-Doutorado: **Ericson Camargo, Natasha Fidelis, Marcela Borgo, Melina Bortolo, Tatiana Assumpção, Lourdes Chiok, Jarcio Baldi, Augusto Bodanezi, Fernando Orosco, Arnaldo Sant’anna, Ricardo Bernardes, Fausto Victorino, Rodrigo Vivan, Aldo Del Carpio, Christian Brandão, Bruno Cavenago, Clarissa Telles, Elaine Consolmagno, Marina Marciano, Paloma Minotti, Raquel Miden, Marcelo Haas, Thais Rizzo, Bruno Guimarães, Murilo Alcalde, Marcela Arias, Amanda Maliza, Milena Silva, Pablo Amoroso, Marcela Milanezi, Marcelo Victoriano, Carolina Filpo e Samuel “Tupi”**. “Muito obrigado pela convivência e aprendizado. Guardo de cada um de vocês muitas lembranças, com muito carinho. Desejo muito sucesso a todos!”*

*À minha esposa e parceira científica **Luciana Fernandes**, pela oportunidade de estudar mais sobre tomografia computadorizada cone beam, a sua grande paixão.*

*Agradeço especialmente às minhas colegas **Paloma Minotti, Raquel Miden, Marcela Milanezi e Marina Marciano**, pela companhia e por sempre me auxiliarem quando precisei nas pesquisas.*

*Ao amigo **Aldo Del Carpio**, meu compatriota e amigo durante esses últimos 6 anos. “Fico feliz que você tenha crescido muito profissionalmente, alcançando suas metas”.*

*A meu grande amigo **Bruno Cavenago**; “Meu irmão, você é uma pessoa incansável e responsável. Muito obrigado pela ajuda incondicional durante os diversos trabalhos nesses últimos anos.”*

*As funcionárias da pós-graduação **Giane Tenório Quintela, Leila Sanches, Fátima Carvalho, Margareth Mokarzel, Ana Letícia Momesso** e as funcionárias da Biblioteca, por todo apoio para a realização desse trabalho, especialmente **Rita Paglione, Maristela Ferrari e Maria Helena Ronchesel**.*

*Aos amigos ao redor do mundo, que compartilharam sua experiência, colaborando para que eu aprendesse mais sobre diversos assuntos, e que conheci graças à Endodontia: **Gustavo De-Deus, Carlos Murgel, Marco Versiani, Gilberto Debelian, Mario Leonardo, Mario Tanomaru, Leandro Pereira, Carlos Bueno, Paulo Weckwerth, Patrícia Ferrari, Emilio Serena, Mirtha Perdomo, Freddy Belliard, Jorge Vera, Carlos Saucedo, Alejandro Podolski, Augusto Vertiz, Sergio Rosler, Jhon Torres, Diogo Guerreiro, Rui Pereira da Costa, Terry Pankkuk e Antonis Chaniotis**.*

AGRADECIMENTOS INSTITUCIONAIS

À Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, na pessoa do diretor, Prof. Dr. José Carlos Pereira e da vice-diretora, Profa. Dra. Maria Aparecida de Andrade Moreira Machado.

Ao presidente do programa de pós-graduação da Faculdade de Odontologia de Bauru, Prof. Paulo César Rodrigues Conti.

Ao Vice-Presidente do programa de pós-graduação da Faculdade de Odontologia de Bauru, Prof. Guilherme dos Reis Pereira Janson

Ao coordenador do programa de pós-graduação em Endodontia Prof. Dr. Marco Antônio Húngaro Duarte.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, (FAPESP), pela concessão de bolsa de estudos para a realização dessa pesquisa na Faculdade de Odontologia de Bauru, com estágio de pesquisa na Faculdade de Odontologia da Universidade de Loma Linda, Califórnia, EUA.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão de bolsa de estudos durante meu primeiro ano de doutorado.

*In pulp biology, or in endodontology, opinions may differ, but
only cells distinguish between facts and fiction.*

Kaare Langeland

R*ESUMO*

RESUMO

O objetivo desse estudo foi avaliar o efeito antimicrobiano da irrigação e da medicação endodôntica em dentina infectada por biofilmes orais. Na primeira parte do estudo, avaliaram-se as seguintes soluções irrigadoras: hipoclorito de sódio a 1%, clorexidina a 2%, ácido cítrico a 10% e EDTA a 17%. Na segunda parte, avaliaram-se soluções irrigadoras contendo associações (“MTAD”, “Smear Clear”, “Qmix”, ácido maleico a 7%, iodo-iodeto de potássio a 2% e ácido peracético a 4%), sendo essas soluções comparadas a 2 concentrações de hipoclorito de sódio. Na terceira parte, avaliou-se o efeito de dispositivos sônicos, ultrassônicos e de laser na capacidade de limpeza do hipoclorito de sódio a 6%, com uso de microscópio eletrônico de varredura. Na quarta parte, avaliaram-se os efeitos antimicrobianos de 3 pastas de hidróxido de cálcio contendo 3 radiopacificadores diferentes (óxido de zinco, sulfato de bário e iodofórmio). No último experimento, foram avaliadas as propriedades antimicrobianas da pasta triantibiótica, da clorexidina em gel e da pasta aquosa de hidróxido de cálcio. Os resultados mostraram que todas as soluções de hipoclorito de sódio testadas e o ácido peracético a 4% foram mais efetivas sobre o biofilme em comparação a todos os irrigantes testados. As soluções de hipoclorito de sódio propiciaram significativamente uma melhor limpeza da dentina. O ácido peracético foi também efetivo para dissolver células do biofilme. A ativação do hipoclorito de sódio com o ultrassom e com laser interferiu favoravelmente na limpeza da dentina infectada. A pasta triantibiótica e o hidróxido de cálcio associado ao iodofórmio foram os medicamentos mais efetivos na descontaminação da dentina infectada. Portanto, o protocolo ideal que deve ser adotado para garantir uma descontaminação efetiva da dentina contaminada por biofilmes orais inclui o uso de hipoclorito de sódio ativado por ultrassom ou laser e medicação intracanal de hidróxido de cálcio com iodofórmio. O ácido peracético e a pasta triantibiótica apresentaram resultados promissores.

Palavras chave: Biofilmes. Desinfecção. Ultrassom. Lasers. Endodontia.

***A*bstract**

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the antimicrobial effect of endodontic irrigation and medication on biofilm infected dentin. In the first part, we evaluated the following irrigant solutions: 1% sodium hypochlorite, 2% chlorhexidine, 10% citric acid and 17% EDTA. In the second part, irrigant solutions containing combinations of antimicrobials such as "MTAD," "Smear Clear", "Qmix", 7% maleic acid and 2% iodine-potassium iodide and 4% peracetic acid were evaluated. These solutions were compared to 2 concentrations of sodium hypochlorite. In the third part, we evaluated the effect of sonic, ultrasonic and laser irrigation on the cleaning ability of biofilm infected dentin using 6% sodium hypochlorite under scanning electron microscope. In the fourth part, we evaluated the antimicrobial effects of 3 calcium hydroxide pastes containing 3 different radiopacifiers (zinc oxide, barium sulfate and iodoform). In the last experiment, we evaluated the antimicrobial properties of the triantibiotic paste, 2% chlorhexidine gel and calcium hydroxide paste. The results showed that the sodium hypochlorite and the peracetic acid solutions were more effective to decontaminate the biofilm infected dentin in comparison to all of the tested irrigants. The sodium hypochlorite solutions allowed significantly better cleaning of the dentine. The peracetic acid was also effective to dissolve the biofilm cells. Activation of 6% sodium hypochlorite with ultrasonic and laser increased the cleaning of biofilm infected dentin. The triantibiotic paste and calcium hydroxide associated to iodoform were the most effective intracanal dressings available for the decontamination of the infected dentin. Therefore, the ideal protocol to be adopted in order to ensure an effective decontamination of biofilm infected dentin includes the use of sodium hypochlorite, specially activated by ultrasound or laser; and the use of calcium hydroxide with iodoform intracanal dressing. The peracetic acid and the triantibiotic paste also showed promising results.

Keywords: Biofilms. Disinfection. Ultrasonics. Lasers. Endodontics.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- FIGURAS

- Figura 1. (A) microscópio confocal de varredura a laser Leica TCS-SPE utilizado durante a análise da viabilidade microbiana no biofilme. Blocos de dentina imersos em solução irrigadora por 5 minutos (B) ou em medicação intracanal por 7 dias (C). 50
- Figura 2. *Software* “bioimageL” utilizado para a avaliação dos diferentes parâmetros de viabilidade e arquitetura do biofilme. 51
- Figura 3. Representação esquemática da raiz bovina (a) com o bloco de dentina infectado (b). Silicone foi utilizado para possibilitar um sistema fechado (c). 52
- Figura 4. Agulha de irrigação de dupla saída (A), ponta do “endoactivator” (B) e ponta ultrassônica “irrisafe” (C) utilizadas nos procedimentos de irrigação. 54
- Figura 5. Equipamento Laser Er:YAG Fotona utilizado para induzir cavitação da solução irrigadora (A). Peça de mão incluindo a fibra endodôntica de quartzo (B-C). 54
- Figura 6. Imagens representativas dos escores utilizados. A limpeza é catalogada iniciando-se a partir da superfície dentinária limpa, escore 1 (a) até a superfície dentinária coberta por estruturas residuais do biofilme, cobrindo mais de 2/3 da superfície dentinária, escore 4 (d). Estágios intermediários de limpeza foram catalogados como escores 2 e 3 (b-c). Asteriscos indicam resíduos celulares sobre a superfície dentinária. Setas indicam camadas de biofilmes residuais. 56
- Figura 7. (A) Viabilidade representativa de biofilme aderido sobre dentina após tratamento com água destilada. Fluorescência verde representa células vivas; fluorescência vermelha representa células mortas. (B) Microscopia eletrônica de varredura (MEV) da superfície de dentina contaminada. Os túbulos dentinários não são visíveis e uma densa camada de microorganismos está aderida sobre a superfície de dentina. Escala representa 100µm. (C) Magnificação da superfície dentinária; diversos morfotipos microbianos como cocos e bacilos podem ser observados. Escala representa 5µm. 59
- Figura 8. Microscopia confocal de varredura a laser de dentina infectada tratada com hipoclorito de sódio a 1% (A), ácido cítrico a 10% (B), EDTA a 17% (C) e clorexidina a 2% (D). Fluorescência verde representa viabilidade microbiana; fluorescência vermelha representa morte microbiana. Barra representa 20µm. 65
-

-
- Figura 9. Microscopia confocal de varredura a laser de dentina infectada tratada com ácido maleico a 7% (A), “MTAD” (B), iodo-iodeto de potássio a 2% (C) e ácido peracético a 4% (D). Fluorescência verde representa viabilidade microbiana; fluorescência vermelha representa morte microbiana. Observar a viabilidade microbiana nos túbulos dentinários infectados (A, B) e a dificuldade da solução iodetada para penetrar no biofilme (C). Barra representa 20µm. 67
- Figura 10. Imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) de dentina infectada tratada com hipoclorito de sódio a 6% e irrigação com seringa e pressão positiva. Imagens de 2.400X mostram resíduos microbianos amorfos (A, C, E); quando a dentina é observada a mais de 9.000X podem ser observados os perfis dos microorganismos residuais (B, D, F). 71
- Figura 11. Imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) de dentina infectada tratada com hipoclorito de sódio a 6% e irrigação com a técnica ultrasônica passiva (A-D). A primeira imagem mostra resíduos sobre a superfície dentinária. Em maior aumento, podem-se observar resíduos amorfos do biofilme (B). A imagem em (C) mostra um efeito benéfico da técnica; túbulos dentinários limpos podem ser observados (D). Dentina infectada após o tratamento com a técnica PIPS ou irrigação assistida por laser (E). A superfície dentinária apresenta-se livre de resíduos ou microorganismos. Uma magnificação dos túbulos dentinários mostra uma colônia microbiana com morfologia inalterada, mesmo após uso de uma alta concentração de hipoclorito de sódio (F). 73
- Figura 12. Microscopia confocal de varredura a laser de dentina infectada tratada com hidróxido de cálcio + propilenoglicol (A), hidróxido de cálcio + sulfato de bário + propilenoglicol (B), hidróxido de cálcio + propilenoglicol + óxido de zinco (C) e hidróxido de cálcio + propilenoglicol + iodofórmio (D). Fluorescência verde representa viabilidade microbiana; fluorescência vermelha representa morte microbiana. Barra representa 20µm. 77
- Figura 13. Microscopia confocal de varredura a laser de dentina infectada após 7 dias de tratamento com diferentes medicamentos intracanaais. Controle (A), pasta aquosa de hidróxido de cálcio (B), clorexidina em gel a 2% (C) e pasta triantibiótica (D). Fluorescência verde representa viabilidade microbiana; fluorescência vermelha representa morte microbiana. Barra representa 20µm. 79
-

- GRÁFICO

Gráfico 1. Representação da mediana, valores mínimo e máximo da cobertura do substrato.....	65
--	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Resultados do biovolume, número de células vivas, cobertura do substrato e altura do biofilme após uso de diferentes soluções irrigadoras: hipoclorito de sódio (NaOCl) a 1%, EDTA a 17%, ácido cítrico a 10%, clorexidina a 2%. Água destilada foi utilizada como controle.	62
Tabela 2.	Mediana, 25 – 75% percentil e valores mínimo e máximo do biovolume total, das células vivas e proporção de células vivas. Letras diferentes nas colunas representam significância estatística ($P < 0,05$).	64
Tabela 3.	Distribuição dos escores obtidos mediante microscopia eletrônica de varredura. A média e mediana também são apresentadas. Letras minúsculas diferentes representam diferenças estatísticas significativas ($P < 0,05$).	69
Tabela 4.	Mediana e valores mínimo e máximo da porcentagem de células viáveis. Letras diferentes em cada coluna representam significância estatística ($P < 0,05$).	76
Tabela 5.	Mediana e valores mínimo e máximo da porcentagem de células viáveis. Letras diferentes em cada coluna representam significância estatística ($P < 0,05$).	76

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

MCVL	microscopia confocal de varredura a laser
MEV	microscopia eletrônica de varredura
Laser	<i>light amplification by stimulated emission of radiation</i>
PIPS	<i>photon induced photoacoustic streaming</i>
PUI	<i>passive ultrasonic irrigation</i>
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético
NaOCl	hipoclorito de sódio
Ca(OH)₂	hidróxido de cálcio
BHI	<i>brain heart infusion</i>
PG	propilenoglicol
PBS	<i>phosphate buffer solution</i>
EPS	matriz exopolissacarídica
DNA	ácido desoxirribonucleico
pH	potencial hidrogeniônico
°C	grau Celsius
mJ	milijoule (s)
W	watt (s)
Hz	hertz (s)
µs	microsegundo (s)
mm	milímetro (s)
µm	micrometro (s)
nm	nanometro (s)
mL	mililitro (s)
µL	microlitro (s)
g	grama (s)
mg	miligrama (s)
P	significância estatística
%	porcentagem
+	mais
X	vezes/ aumento
<	menor
>	maior
=	igual

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	23
2	REVISÃO DA LITERATURA	29
3	PROPOSIÇÃO	39
4	MATERIAL E MÉTODOS	43
4.1	PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS GERAIS	45
4.1.1	Avaliação da capacidade antimicrobiana de diferentes soluções irrigadoras	45
4.1.2	Avaliação da capacidade antimicrobiana de diferentes medicamentos intracanal	47
4.2	MICROSCOPIA CONFOCAL DE VARREDURA A LASER	48
4.3	Análise da dissolução de biofilme pelo hipoclorito de sódio a 6% com uso de microscopia eletrônica de varredura	51
4.4	ANÁLISE ESTATÍSTICA	56
5	RESULTADOS.....	57
5.1	Análise dos componentes base: hipoclorito de sódio a 1%, EDTA, clorexidina a 2% e ácido cítrico a 10%	61
5.2	Análise do hipoclorito de sódio a 2,5%, a 5,25% e de soluções irrigadoras antimicrobianas sem capacidade de dissolução.....	62
5.3	Efeito dos meios físicos utilizados na irrigação endodôntica	69
5.4	Análise da medicação intracanal.....	75
6	DISCUSSÃO.....	81
6.1	Das soluções irrigadoras testadas.....	85
6.2	Dos métodos físicos da irrigação endodôntica.....	91
6.3	Da capacidade antimicrobiana da medicação endodôntica	94

7	CONCLUSÕES	99
	REFERÊNCIAS	103
	ANEXOS.....	119

1 **I***NTRODUÇÃO*

1 INTRODUÇÃO

Os biofilmes são definidos como conjuntos de células aderidas a uma superfície embebida em uma matriz de exopolissacarídeos, que preenche o espaço entre as células (COSTERTON; STEWART; GREENBERG, 1999). Biofilmes estão presentes no canal radicular com polpa necrótica e com infecções primárias ou secundárias (RICUCCI; SIQUEIRA, 2011; RICUCCI, *et al.*, 2009). Como o canal radicular é estéril em condições normais, a formação dos biofilmes vai desencadear uma reação inflamatória na região periapical. RICUCCI & SIQUEIRA, (2010) mostraram que a periodontite apical preenche os critérios propostos por PARSEK & SINGH (2003), que definem os seguintes pontos: as bactérias precisam estar associadas ao substrato; as bactérias devem estar imersas em uma matriz produzida pelos próprios microorganismos ou pelos elementos do hospedeiro; e, a infecção é de natureza localizada e resistente aos antibióticos.

Experimentos de laboratório têm utilizado bactérias em estado planctônico de espécies aeróbicas ou anaeróbicas com a finalidade de demonstrar a capacidade antimicrobiana de numerosas soluções irrigadoras, tais como: ceftriaxona (PAPPEN, *et al.* 2010; PORTENIER, *et al.*, 2006), clorexidina (VIANNA, *et al.*, 2004; PORTENIER, *et al.*, 2006), hipoclorito de sódio (VIANNA, *et al.*, 2004) iodo-iodeto de potássio (HAAPASALO, H.K., *et al.*, 2000) ou “MTAD” (TORABINEJAD, *et al.*, 2003). No entanto, pesquisas sugeriram que esse método pode não refletir a real efetividade das soluções (PAPPEN, *et al.* 2010), considerando que o modo de crescimento dos microorganismos nos canais radiculares é na forma de biofilme (RICUCCI; SIQUEIRA 2010; NAIR, 1997; NAIR, *et al.*, 2005; NAIR, 2006). Por esses motivos, biofilmes polimicrobianos formados de placa subgengival são comumente utilizados, a fim de gerar uma representação mais realista da capacidade antimicrobiana de diferentes soluções irrigadoras (STOJICIC, *et al.* 2012; SHEN, *et al.*, 2009).

A dentina é um tecido conjuntivo mineralizado e permeável, devido à presença de túbulos dentinários. Os microorganismos podem se aderir a essa superfície e penetrar no interior dos túbulos (LOVE; JENKINSON, 2002). Por esse motivo, dentina infectada é comumente encontrada nas infecções endodônticas primárias e secundárias (RICUCCI; SIQUEIRA, 2009; RICUCCI; SIQUEIRA, 2010). A dentina tem sido frequentemente utilizada como substrato para induzir biofilmes microbianos e para o teste de efeitos de procedimentos endodônticos e, principalmente, para avaliação dos resultados com o uso de métodos de cultura ou por microscopia. Uma limitação dos métodos de cultura é a dependência de uma amostra representativa tomada após a desorganização da superfície infectada. Comparações diretas utilizando quantificação tridimensional de um biofilme tratado com soluções ou medicamentos endodônticos são desconhecidas. A avaliação direta por meio da microscopia confocal de varredura a laser (MCVL) pode proporcionar dados sólidos de quantificação microbiana, principalmente quando é comparada ao método de contagem de cultura (SHEN; STOJICIC; HAAPASALO, 2010). Esse é um dado importante para quando os limites dos compostos antimicrobianos utilizados no tratamento endodôntico precisam ser determinados.

Normalmente os experimentos que utilizam biofilmes estudam a eficácia das soluções irrigadoras ou dos medicamentos contendo antibióticos ou antisépticos (PAPPEN, *et al.* 2010). Entretanto, poucas pesquisas têm sido realizadas no intuito de comparar a eficácia de diferentes categorias de antimicrobianos, tais como: antibióticos, antisépticos, compostos oxidativos; ou a eficácia de novos irrigantes/medicamentos propostos, tais como: ácido peracético (LOTTANTI, *et al.*, 2009), “Qmix” (mistura de clorexidina, cetrimida e EDTA) (S. STOJICIC, 2012), ácido maleico a 7% (FERRER-LUQUE, *et al.* 2010), clorexidina em gel a 2% (SENA, *et al.*, 2006) ou pasta triantibiótica (HOSHINO, *et al.*, 1996).

Um outro ponto importante é a maneira como as soluções irrigadoras ou medicamentos se distribuem pelo interior do sistema de canais radiculares. Sabe-se que o uso do efeito de cavitação pode melhorar a distribuição de soluções irrigadoras pelos canais radiculares (DE GREGORIO, *et al.*, 2010). Embora haja relatos sobre a melhora na capacidade de limpeza ou na eliminação de *debris*, (JIANG, *et al.*, 2010) pouco se sabe sobre o efeito do uso combinado de efeito sônico, ultrassônico ou da cavitação induzida por laser sobre biofilmes aderidos à dentina.

A avaliação do efeito dos diferentes medicamentos intracanal na dentina infectada com biofilmes também é importante. O uso do hidróxido de cálcio na Endodontia como medicação intracanal foi consagrado na literatura ao longo das últimas décadas (HOLLAND, *et al.*, 1977), embora mudanças na composição ou no veículo tenham afetado algumas das suas propriedades, incluindo a antimicrobiana. Recentemente, medicações alternativas têm sido utilizadas, como a clorexidina em gel a 2% (WANG, C.S., *et al.*, 2007) ou a pasta triantibiótica (BANCHS; TROPE, 2004), utilizada durante a revascularização de dentes permanentes jovens que sofreram trauma.

Em vista disso, os objetivos deste trabalho foram: avaliar o uso de diferentes soluções irrigadoras e medicamentos sobre a dentina infectada por biofilmes orais; e determinar a influência dos fenômenos sônico, ultrassônico e do laser (PIPS) na limpeza de dentina infectada por biofilmes orais.

2 **REVISÃO DA** **LITERATURA**

2 REVISÃO DA LITERATURA

Biofilmes

Os biofilmes são agregações celulares de bactérias, aderidas a uma superfície, que estão embebidas numa matriz extracelular produzida por esses microorganismos (COSTERTON; STEWART; GREENBERG, 1999). Na área endodôntica essas superfícies são: dentina, cimento radicular ou materiais obturadores.

Os biofilmes são prejudiciais em algumas indústrias, tais como a de alimentos e as de tratamento de água. Os biofilmes têm sido reconhecidos como uma fonte de infecções persistentes de caráter crônico, principalmente quando estão associados à válvulas cardíacas, próteses intra-ósseas ou catéteres (COSTERTON; STEWART; GREENBERG, 1999). A presença de biofilmes na ocasião da instalação de novas interfaces biológicas ao corpo humano (por exemplo: um catéter) leva à difícil eliminação da infecção mesmo após o uso de antibióticos, ou ainda pelos próprios elementos de defesa, uma vez que se estabelece uma zona de nula vascularização (SIQUEIRA, 2001).

Devido ao processo destrutivo da cárie dentária ou de fraturas, o canal radicular e a polpa dentária ficam expostos à invasão de bactérias da microbiota oral. Isso leva a pensar, hipoteticamente, que o canal com polpa necrótica possua um mecanismo de infecção similar a uma infecção por catéter e, sendo assim, em ambas as situações, existe um espaço vazio comunicando o meio externo ao interno, o qual possui fluidos que favorecem a proliferação de microorganismos oriundos de zonas vizinhas para uma área onde não existem elementos de defesa do hospedeiro (SIQUEIRA; ROCAS, 2008).

Eliminação de biofilmes na área endodôntica

Soluções irrigadoras

O objetivo principal do preparo químico-mecânico é a completa eliminação dos microorganismos e de seus produtos associados. Apesar de que a eliminação dos biofilmes intrarradiculares deva ser realizada idealmente por processos mecânicos, o processo de instrumentação pode não afetar diretamente uma quantidade considerável de tecido infectado, devido às irregularidades presentes na anatomia do canal radicular, como istmos e canais laterais. Após o processo químico-mecânico, vários fenômenos acontecem: a) eliminação de maior volume de biofilmes, principalmente da luz do canal principal (NAIR, *et al.*, 2005); b) formação de *smear layer* sobre as paredes dentinárias instrumentadas; e c) acúmulo de *debris* dentinários nas áreas não instrumentadas (PAQUE, *et al.*, 2009).

As soluções irrigadoras apresentam numerosas vantagens durante a terapia endodôntica, principalmente desde o ponto de vista antimicrobiano, embora também sejam úteis para a lubrificação e eliminação de *debris* produzidos durante a instrumentação. O hipoclorito de sódio (NaOCl) é considerado a principal solução irrigadora, devido às propriedades antimicrobianas e de capacidade de dissolução de tecido orgânico. Apesar de estudos microscópicos *in vitro* terem demonstrado que a completa dissolução dos biofilmes pelo hipoclorito de sódio é possível quando se encontra em contato direto com os microorganismos (DEL CARPIO-PEROCHENA, *et al.*, 2011), quando é utilizado em condições clínicas, um efeito de dissolução incompleta e biofilmes residuais são comumente encontrados, ainda que utilizando hipoclorito de sódio a 5,25% (VERA, *et al.* 2012.; NAIR, *et al.*, 2005). Esses resultados mostram que existem fenômenos adicionais que podem alterar a capacidade antimicrobiana da solução, incluindo fatores anatômicos, presença de compostos

orgânicos ou inorgânicos, tempo de exposição e volume da solução em contato com a dentina infectada.

Uma limitação importante do hipoclorito de sódio é que ele não remove a *smear layer*, nem evita o acúmulo de *debris* dentinários nas irregularidades do sistema de canais radiculares (ZEHNDER, *et al.*, 2005; PAQUE, *et al.*, 2009). Os *debris* dentinários e a *smear layer* podem agir como barreiras físicas, limitando a adequada difusão do hipoclorito de sódio nessas irregularidades. Os *debris* também podem inativar ou diminuir a capacidade antimicrobiana do hipoclorito de sódio, pois a dentina pode consumir parte da quantidade de cloro disponível da solução (HAAPASALO, M., *et al.*, 2007).

Outro grupo de soluções incluem o EDTA e o ácido cítrico. Essas soluções são utilizadas com o objetivo de eliminar a *smear layer* produzida pelos instrumentos endodônticos (VIOLICH; CHANDLER, 2010). Outras soluções como a clorexidina a 2% são propostas para melhorar a fase de controle antimicrobiano no final do preparo químico-mecânico (ZAMANY; SAFAVI; SPANGBERG, 2003). Apesar de estudos prévios terem reportado que o EDTA e ácido cítrico possuem um leve efeito antimicrobiano (SIQUEIRA, *et al.*, 1998; ARIAS-MOLIZ, *et al.*, 2009), outros estudos mostraram que o EDTA pode remover até 83% do volume de biofilme de *Streptococcus gordonii* (CHAVEZ DE PAZ; BERGENHOLTZ; SVENSATER, 2010). Devido às limitações do preparo químico-mecânico para eliminar completamente a infecção do sistema de canais radiculares, o uso de irrigantes que removam a *smear layer* e apresentem capacidade antimicrobiana é altamente desejável, já que o efeito antimicrobiano do EDTA é limitado. Muitas soluções irrigadoras, tais como “MTAD”, “Qmix”, “Smear Clear” ou “Tetraclean” possuem EDTA ou ácido cítrico em combinação com antisépticos ou antibióticos como clorexidina, cetrimida ou doxiciclina. O objetivo destas combinações é proporcionar atividade antimicrobiana, sendo a eliminação da *smear layer* um passo inicial. Estudos demonstraram atividade antimicrobiana principalmente

quando o EDTA ou ácido cítrico foram associados à cetrimida ou a antibióticos (PAPPEN, *et al.* 2010; STOJICIC, *et al.* 2012; DUNAVANT, *et al.*, 2006). Muitos desses trabalhos não utilizaram a solução de hipoclorito de sódio como grupo controle e, portanto, comparações com essa solução são ainda limitadas.

É interessante notar que o EDTA, além de eliminar a *smear layer*, pode reduzir a quantidade de *debris* acumulado nas irregularidades anatômicas após o preparo químico-mecânico. Essa irrigação final, teoricamente, pode expor áreas contaminadas previamente, não tratadas pelo trabalho inicial de desinfecção. Estudos relataram que, quando o hipoclorito de sódio era utilizado após o uso do EDTA, o efeito antimicrobiano melhorava significativamente em comparação ao hipoclorito de sódio sem o uso do EDTA (BYSTROM; SUNDQVIST, 1985; SOARES, *et al.*, 2010). No entanto, é pouco conhecido o benefício de soluções contendo antibióticos ou antimicrobianos sobre biofilmes intactos, os quais podem estar presentes em irregularidades onde os *debris* dentinários foram acumulados.

Métodos físicos de irrigação endodôntica

Muitas informações significativas sobre os efeitos físicos dos fluidos nos canais radiculares foram obtidas nos últimos anos (CHOW, 1983; AHMAD; PITT FORD; CRUM, 1987; DE GREGORIO, *et al.* 2010; JIANG, *et al.*, 2010). Estudos mostraram que a pressão da irrigação apical positiva ou negativa pode alterar a difusão da solução irrigadora no interior do sistema de canais radiculares, interferindo, conseqüentemente, na capacidade de limpeza (CHOW, 1983; DE GREGORIO, *et al.* 2010). Além disso, o uso da irrigação ultrassônica tem sido recomendado, no intuito de aumentar a eficácia das soluções, mostrando, em muitos casos, superioridade em comparação às técnicas de pressão apical positiva (BURLESON, *et*

al., 2007). No entanto, a maior parte dos trabalhos sobre o benefício da irrigação ultrassônica passiva estudou a eliminação de *debris* dentinários, e não a eliminação de microorganismos.

Nos últimos anos, o uso do laser tem sido também proposto como método para produzir cavitação de líquidos, aumentando, assim, a capacidade de limpeza (FRENZ; PALTAUF; SCHMIDTKLOIBER, 1996; LAUTERBORN; OHL, 1997; HELLMAN, *et al.*, 2007; J.W BLANKEN, 2007; PEEL; FANG; AHMAD, 2011). Quando os pulsos de laser são focados dentro de um fluido ocorre a produção de plasma. A formação de plasma pode levar a um aquecimento do material seguido de uma explosão e de emissão de uma onda de choque. Essa técnica já foi utilizada para eliminar a *smear layer* (GEORGE, R.; MEYERS; WALSH, 2008) ou *debris* dentinários com resultados promissores (DE GROOT, *et al.*, 2009). A irrigação assistida por laser (DE GROOT, *et al.*, 2009) foi avaliada utilizando intensidades que variaram de 25-300mJ (J.W BLANKEN, 2007; GEORGE, R.; MEYERS; WALSH, 2008; BLANKEN, *et al.*, 2009; MATSUMOTO; YOSHIMINE; AKAMINE, 2011; PETERS, *et al.*, 2011). A transição da luz do laser da ponta de ativação ao fluido cria uma onda de pressão fotoacústica, a qual pode induzir cavitação de líquidos no interior do canal radicular sem ocasionar efeitos térmicos sobre a superfície dentinária (DIVITO; PETERS; OLIVI, 2012). Entretanto, a eficácia da técnica de irrigação ativada por laser para limpar dentina contaminada por biofilmes orais não foi completamente estudada.

Medicamentos intracanal

Um medicamento é um agente que possui propriedades antimicrobianas, que deve ser inserido no sistema de canais radiculares entre as sessões endodônticas com o intuito de eliminar microorganismos residuais que tenham sobrevivido ao preparo químico-mecânico e também de prevenir a reinfecção. Dentre os medicamentos disponíveis, o hidróxido de cálcio

[Ca(OH)₂] é o mais utilizado devido à sua capacidade antimicrobiana (LEONARDO, *et al.*, 2006), e mineralizadora (HOLLAND, *et al.*, 1977; HOLLAND, *et al.*, 2003). O hidróxido de cálcio foi introduzido por Herman em 1920, como agente de capeamento pulpar. Esse medicamento apresenta-se como um pó branco, alcalino (pH 12,8) e de baixa solubilidade. As propriedades do hidróxido de cálcio derivam de sua dissociação iônica em íons cálcio e íons hidroxila, sendo que a ação desses íons sobre os tecidos e sobre os microrganismos explica as propriedades biológicas e antimicrobianas dessa substância (SIQUEIRA; LOPES, 1999).

Muitos autores testaram a atividade antimicrobiana do hidróxido de cálcio em estudos clínicos e de laboratório (BYSTROM; CLAEISSON; SUNDQVIST, 1985; SJOGREN, *et al.*, 1997; SIQUEIRA, *et al.*, 2008). No entanto, o efeito contra a bactéria *Enterococcus faecalis* parece ser limitado, principalmente quando é avaliada a desinfecção dentro dos túbulos dentinários (HAAPASALO, M.; ORSTAVIK, 1987; SIQUEIRA; DE UZEDA, 1997; PORTENIER, *et al.*, 2001) o qual foi confirmado por alguns estudos clínicos (KVIST, *et al.*, 2004; WALTIMO, *et al.*, 2005). Apesar da atividade antimicrobiana do hidróxido de cálcio ser discutível, a desintoxicação do canal radicular pelo uso desse medicamento foi comprovada em outros estudos (NELSON-FILHO, *et al.*, 2002; SILVA, *et al.*, 2002; TANOMARU, *et al.*, 2003).

Numerosas pastas de hidróxido de cálcio são utilizadas em combinação com outros componentes do tipo antimicrobiano ou também em associação a diferentes radiopacificadores. Dentre esses componentes, podem ser citados: paramonoclorofenol (SIQUEIRA; DE UZEDA, 1996; BERBERT, *et al.*, 2002), óxido de zinco (LEONARDO, *et al.*, 2000), iodofórmio (CWIKLA, *et al.*, 2005; ESTRELA, *et al.*, 2006) ou sulfato de bário (SEVIMAY; KALAYCI; YILMAZ, 2003). É possível que a atividade antimicrobiana das pastas de hidróxido de cálcio seja influenciada por esses componentes. Além disso, a eficácia do hidróxido de cálcio sobre microorganismos no estágio de biofilme é ainda pouco

conhecida. Por isso, é importante determinar o efeito de diferentes formulações das pastas de hidróxido de cálcio sobre microorganismos no estágio de biofilme.

Outros antimicrobianos utilizados na terapia endodôntica incluem a clorexidina em gel a 2% e a pasta triantibiótica. A clorexidina em gel foi utilizada como medicamento intracanal por (BARTHEL, *et al.*, 2002; GOMES, *et al.*, 2003; DAMETTO, *et al.*, 2005; WANG, C.S., *et al.*, 2007). Uma vantagem desse medicamento é que apresenta efetiva atividade antimicrobiana, especialmente quando comparado ao hidróxido de cálcio (MANZUR, *et al.*, 2007). A pasta triantibiótica foi introduzida na Endodontia por (HOSHINO, *et al.*, 1996) e logo recomendada para uma técnica de tratamento de dentes imaturos denominada de revascularização (BANCHS; TROPE, 2004). No entanto, o efeito dessas medicações contra biofilmes microbianos não foi completamente testado.

3 **P***ROPOSIÇÃO*

3 PROPOSIÇÃO

Considerando a importância dos biofilmes microbianos na persistência da periodontite apical crônica e os questionamentos levantados durante a revisão da literatura, este trabalho propõe-se a:

- 3.1 - Avaliar a capacidade antimicrobiana de diferentes soluções irrigadoras sobre dentina infectada por biofilmes orais.
 - 3.2 - Avaliar a capacidade de dissolução de biofilme microbiano pelo hipoclorito de sódio ativado por laser, irrigação sônica e ultrassônica.
 - 3.3 - Avaliar a capacidade antimicrobiana de diferentes medicamentos sobre a dentina infectada por biofilmes orais.
-

4 MATERIAL E MÉTODOS

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS GERAIS

Previamente ao início do estudo, o projeto de pesquisa foi submetido à apreciação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP – Protocolo n° 134/2010), sendo aprovado em 03/11/2010 (ANEXO A).

Para a realização dos experimentos de infecção, foram utilizados blocos de dentina bovina estéril (2x2mm). Os blocos foram tratados com uma solução de EDTA a 17% por 3 minutos para eliminar a *smear layer* produzida durante os procedimentos de corte. Para induzir a infecção dentinária, esses blocos foram colocados em uma placa ortodôntica de Hawley, 1mm abaixo de sua superfície, a fim de possibilitar o acúmulo de biofilme. A placa foi utilizada por um voluntário por 48-72 horas para induzir a infecção dentinária. Após o processo de infecção intraoral, cada bloco foi incubado em meio de cultura de BHI, a 37°C, por 24-48 horas, em condições de aerobiose. Após esse período, 1mL de água destilada foi utilizado para eliminar o meio de cultura e as células não aderidas.

4.1.1 Avaliação da capacidade antimicrobiana de diferentes soluções irrigadoras

Para o teste de contato direto, os blocos de dentina foram imersos por 5 minutos em 1mL da solução irrigadora a ser testada (Fig. 1B), utilizando placas de cultura de 24 poços. As soluções irrigadoras foram testadas em 2 experimentos independentes. No primeiro experimento foram testados os componentes base da maior parte das soluções irrigadoras disponíveis no mercado, sendo:

- Hipoclorito de sódio a 1% (CloroRio, São José do Rio Preto, SP, Brasil).
- Clorexidina a 2% (Villevie, Joinville, SC, Brasil)
- Ácido cítrico a 10% (Farmacia Específica, Bauru, SP, Brasil).
- EDTA a 17% (Biodinamica, Ibiporã, PR, Brasil).
- Água destilada utilizada como grupo controle.

Na segunda parte, foram testadas soluções com atividade antimicrobiana, comparadas com 2 concentrações de hipoclorito de sódio. Assim, as soluções testadas foram:

- “MTAD” (Dentsply Tulsa Dental, OK, EUA).
- “Qmix” (Dentsply, Tulsa Dental, OK, EUA).
- “Smear Clear” (SybronEndo, Orange, CA, EUA).
- Ácido maleico a 7% (Sigma, MI, EUA).
- Iodo-iodeto de potássio a 2% (Farmacia Específica, Bauru, SP, Brasil).
- Ácido peracético a 4% (Peresal, Acolab, Alemanha).
- Hipoclorito de sódio a 2,5% (CloroRio, São José do Rio Preto, SP, Brasil).
- Hipoclorito de sódio a 5,25 % (Clorox Indústria Química, Peru).
- Água destilada (controle).

Cinco blocos independentes foram utilizados para cada uma das soluções irrigadoras testadas. Após o teste de contato, os blocos tratados com hipoclorito de sódio e ácido peracético foram tratados com 1mL de uma solução de tiosulfato de sódio a 5%. Um estudo piloto mostrou que essa solução tem efeito nulo sobre o biofilme e melhora a qualidade do procedimento de coloração quando a dentina é tratada com agentes oxidantes. As demais soluções irrigadoras foram eliminadas com água destilada.

4.1.2 Avaliação da capacidade antimicrobiana de diferentes medicamentos intracanal

Para o teste das diferentes medicações intracanal, foram realizados 2 experimentos. No primeiro, os blocos de dentina ficaram em contato com os diferentes fármacos pelo período de 7 dias (Fig. 1C). Os medicamentos testados foram:

- Hidróxido de cálcio* + iodofórmio*.
- Hidróxido de cálcio* + sulfato de bário**.
- Hidróxido de cálcio* + óxido de zinco*.
- Hidróxido de cálcio*

*(Biodinamica, Ibiporã, PR, Brasil)

** (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha)

Cinco blocos independentes foram utilizados para cada um dos medicamentos testados. As pastas foram preparadas utilizando a proporção de 5 partes de hidróxido de cálcio para 1 parte de radiopacificador em peso. Um grama dessa mistura foi mesclado com 0,4mL de propilenoglicol.

No segundo experimento, foram utilizados os novos medicamentos clorexidina em gel e a pasta triantibiótica, os quais foram comparados à pasta de hidróxido de cálcio. Foram utilizados 10 blocos para cada medicamento. Cinco blocos foram avaliados após 1 semana de contato com os medicamentos e 5 foram reincubados em caldo de BHI por 24 horas após a eliminação dos medicamentos com 2mL de solução salina, para poder observar se o efeito de substantividade interferia na avaliação. Os medicamentos avaliados foram:

- Hidróxido de cálcio* + água destilada (proporção 1gr/1mL água destilada)
-

- Clorexidina em gel a 2%. *

- Pasta triantibiótica.

- Solução salina.

*(Biodinamica, Ibiporã, PR, Brasil)

Para o preparo da pasta triantibiótica foram utilizados os seguintes antibióticos: metronidazol 250mg (Flagyl Aventis Pharma, São Paulo, SP, Brasil), minociclina 100mg (Ranbaxy, Jacksonville, FL, EUA), e ciprofloxacino 250mg (Neoquímica, Anápolis, GO, Brasil). Quinhentos miligramas de cada antibiótico foram homogeneizados para obtenção de um pó uniforme. Propilenoglicol (PG) foi utilizado na proporção de 7:4 pó/PG e misturado até obtenção da consistência de pasta.

4.2 MICROSCOPIA CONFOCAL DE VARREDURA A LASER

Após o teste de contato, os blocos de dentina foram lavados com 100µl de PBS para eliminar resíduos e foram corados com 50µl de uma solução de Syto 9/Iodeto de propídio (Live/Dead technique-In Vitro Gen, Eugene, OR, USA). O tempo de coloração foi de 10 minutos. O Syto 9 é um corante fluorescente seletivo do ácido nucleico, útil para corar células vivas e mortas (corante geral). A fluorescência é verde. O iodeto de propídio visa identificar a população microbiana com membrana celular afetada ou com células mortas e tem fluorescência vermelha. Ao penetrar nas células, a fluorescência vermelha diminui a fluorescência do Syto 9, tendo as células mortas uma fluorescência vermelha ou amarelada.

Após os procedimentos de coloração, os blocos de dentina foram avaliados imediatamente no microscópio confocal de varredura a laser do Centro Integrado de Pesquisas

da Faculdade de Odontologia de Bauru (Fig. 1A). Inicialmente foram avaliados com uso da lente de 10X, sendo os blocos que apresentavam inadequada colonização descartados. Foram analisados corpos de prova que apresentaram no mínimo 75% da superfície colonizada. O biofilme foi examinado em várias localizações para encontrar os pontos de maior espessura. Foram tomadas de 4 a 5 fotografias “stacks” após o uso das soluções irrigadoras ou medicamentos com uso da lente de 40X por cada bloco. As imagens foram feitas a intervalos de 1µm desde a parte mais superior do biofilme até 5-7µm dentro da superfície dentinária. As imagens foram capturadas utilizando a lente de 40X. Foram obtidas de 20-30 secções escaneadas a intervalo de 1µm, utilizando o formato de 512 X 512 pixels. As imagens foram adquiridas utilizando o programa “Leica Application Suite-Advanced Fluorescence software” (LAS AF, Leica Mannheim, Alemanha). No total foram avaliados de 20 – 25 “stacks” para cada grupo experimental.

Os arquivos do microscópio confocal foram armazenados em formato .lif; a série completa foi exportada em formato .TIFF e analisados posteriormente utilizando o *software* “bioimageL” (Fig. 2) desenvolvido na Universidade de Malmo (Suécia), cedido gentilmente pelo Dr. Luis Chávez de Paz (CHAVEZ DE PAZ, 2009).

Para descrever os resultados, diferentes parâmetros foram utilizados em função do experimento analisado, obedecendo os seguintes critérios:

1. **Biomassa de bactérias vivas e total de microorganismos:** os valores foram expressos em números absolutos, utilizando porcentagem ou pela proporção de células viáveis.
 2. **Porcentagem de área colonizada da dentina:** esse parâmetro determina a expansão horizontal do biofilme, também denominada cobertura do substrato.
 3. **Biovolume/área** ($\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$): esse parâmetro representa a biomassa total ou de células vivas, realizando a divisão do número absoluto pela área analisada de cada
-

campo operatório ($275\mu\text{m} \times 275\mu\text{m}$). Essa variável facilita a interpretação, uma vez que os valores absolutos são, geralmente, transformados a um número entre 1 - 10.

4. Porcentagem de células vivas.

5. Proporção de células vivas: é o resultado da divisão do número de células vivas sobre o total. O valor resultante é um número entre 0 - 10.

Os experimentos de soluções irrigadoras foram expressos em termos de biomassa absoluta, pela fórmula $\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$, ou pela proporção de células vivas. Os experimentos envolvendo medicação intracanal tiveram seus resultados expressos pela porcentagem de células vivas.

Figura 1. (A) microscópio confocal de varredura a laser Leica TCS-SPE utilizado durante a análise da viabilidade microbiana no biofilme. Blocos de dentina imersos em solução irrigadora por 5 minutos (B) ou em medicação intracanal por 7 dias (C).

Figura 2. Software “bioimageL” utilizado para a avaliação dos diferentes parâmetros de viabilidade e arquitetura do biofilme.

4.3 Análise da dissolução de biofilme pelo hipoclorito de sódio a 6% com uso de microscopia eletrônica de varredura

A solução irrigadora utilizada foi o hipoclorito de sódio a 6% (Clorox, Company, Oakland, EUA). Cinquenta blocos de dentina estéril de 2 x 2mm foram utilizados. As amostras foram tratadas com uma solução de EDTA a 17% por 3 minutos para eliminar a *smear layer* produzida durante os procedimentos de corte. Para induzir a infecção dentinária, os blocos de dentina foram fixados em uma placa ortodôntica de Hawley. O bloco de dentina em contato com a cavidade oral foi fixado a 1mm abaixo da superfície da placa para possibilitar o acúmulo de biofilme. A placa foi utilizada por um voluntário por 72 horas para indução da infecção dentinária. Após o processo de infecção intraoral, cada bloco foi incubado no meio de cultura de BHI, a 37°C, por 48 horas em condições de aerobiose. Após esse período, 1mL de água destilada foi utilizado para eliminar o meio de cultura e as células não aderidas.

Para o teste de irrigação dos canais radiculares, os blocos infectados foram adaptados a perfurações de 2,5 x 2,5mm feitas a 3mm do ápice de incisivos bovinos. O lado infectado foi colocado em direção ao canal radicular. O bloco de dentina foi fixado utilizando cera vermelha e silicone fluido (Fig. 3). O forame apical foi selado com silicone no intuito de obter-se um sistema fechado. Esse método permite adaptar uma área de dentina infectada ao mesmo nível do terço apical de um canal de dente bovino. O diâmetro do canal radicular foi padronizado utilizando uma broca de Gates Glidden #5 (1,30mm) no nível apical e o comprimento do canal foi padronizado em 12mm.

Figura 3. Representação esquemática da raiz bovina (a) com o bloco de dentina infectada (b). Silicone foi utilizado para possibilitar um sistema fechado (c).

O protocolo de irrigação foi dividido em 2 etapas. Na primeira, 2mL de hipoclorito de sódio a 6% foi colocado no canal radicular utilizando-se uma seringa de 10mL e uma agulha de dupla saída, inserida até 2mm do forame, por meio de irrigação com pressão positiva. A velocidade de injeção foi de 1mL/10 segundos e a solução irrigadora foi deixada no canal por 2 minutos. Após a aspiração da solução, esse procedimento foi repetido mais uma vez. O tempo total desses procedimentos foi de 4 minutos, sendo 4mL de hipoclorito de sódio a 6% utilizado em todos os grupos experimentais.

Na segunda etapa, foi aplicado um protocolo final de irrigação durante 1 minuto. As seguintes técnicas foram utilizadas (Figs. 4 e 5):

- **Irrigação convencional utilizando agulhas de dupla saída:** nessa técnica, após os 4 minutos iniciais, 1mL de hipoclorito de sódio foi aplicado a uma velocidade de 1mL/10 segundos e deixado no canal por 20 segundos. Esse procedimento foi repetido mais 2 vezes até totalizar 1 minuto (Fig. 4A).

- **“Endoactivator”:** nessa técnica, após os primeiros 4 minutos da primeira etapa, 1mL de hipoclorito de sódio foi utilizado seguido de ativação sônica, utilizando-se a ponta amarela do “endoactivator” por 20 segundos (Fig. 4B). Esse procedimento (irrigação/ativação sônica) foi repetido mais 2 vezes, sendo o período total de uso de 1 minuto. A quantidade final de hipoclorito utilizada foi de 3mL no último minuto.

- **Irrigação Ultrassônica Passiva (PUI):** nessa técnica, foi adotado um procedimento similar ao do grupo 2, com a diferença que uma ponta “irrisafe” (Satelec, Acteongroup, Merignac, França) (Fig. 4C) foi utilizada em uma unidade ultrassônica P5 (Suprasson PMax; Satelec Acteon). A potência foi selecionada em 4. A quantidade final de hipoclorito utilizada foi de 3mL no último minuto.

- **Irrigação ativada por laser (PIPS):** um laser Er:YAG, com comprimento de onda de 2.940 nm (Fidelis; Fotona, Ljubljana, Eslovênia) foi utilizado para irradiar a câmara pulpar de dentes incisivos bovinos, utilizando-se uma fibra endodôntica de quartzo de 12mm e 400µm de diâmetro (PIPS, Fotona, Ljubljana, Eslovênia) (Fig. 5). Os parâmetros do laser foram: 20mJ, 0,30W, 15Hz, e 50µs de duração de pulso. Um mL de hipoclorito de sódio foi aplicado na câmara pulpar e ativado por 20 segundos. Este procedimento foi repetido mais 2 vezes. A quantidade final de hipoclorito de sódio utilizado foi de 3mL no último minuto.

- **Controle:** os procedimentos foram similares aos do grupo 1, com a diferença que a solução irrigadora utilizada no primeiro passo (4mL) e na etapa final (3mL) foi a água destilada.

Figura 4. Agulha de irrigação de dupla saída (A), ponta do “endoactivator” (B) e ponta ultrassônica “irrisafe” (C) utilizadas nos procedimentos de irrigação.

Figura 5. Equipamento Laser Er:YAG Fotona utilizado para induzir cavitação da solução irrigadora (A). Peça de mão incluindo a fibra endodôntica de quartzo (B-C).

Após o teste de contato, os blocos de dentina foram separados das raízes, tratados por 1 minuto com uma solução de tiosulfato de sódio a 5% e fixados em solução de formalina buffer a 10% por 24 horas. Os blocos foram desidratados com álcool, metalizados com platina e montados em bases para a posterior análise no microscópio eletrônico de varredura (XL30 FEG, Phillips, Eindhoven, Holanda). Quinze áreas selecionadas aleatoriamente foram escaneadas de cada bloco, utilizando-se um aumento de 2.400X. No total, 150 áreas foram avaliadas para cada grupo. Para a quantificação foram utilizados escores modificados seguindo as recomendações de Bhuva *et al.* (2010) (Fig. 6).

Escore 1: Dentina limpa ou células microbianas residuais isoladas que cobrem menos de 5% da superfície da dentina. Ausência de camadas do biofilme.

Escore 2: Células microbianas residuais isoladas que cobrem entre 5% a 33% da superfície dentinária. Ausência de camadas do biofilme.

Escore 3: Estruturas do biofilme e células microbianas podem ser identificadas cobrindo entre 34 a 66% da dentina.

Escore 4: Estruturas do biofilme e células microbianas podem ser identificadas cobrindo mais dos 2/3 da superfície dentinária (>66%).

Dois avaliadores, com experiência na leitura de fotografia de microscopia eletrônica de varredura, catalogaram as imagens de um modo cego. As avaliações foram realizadas por 2 vezes com intervalos de 4 semanas. Em caso de falta de consenso para determinar o escore de uma microfotografia, o escore mais alto foi selecionado. Devido ao conhecido efeito de dissolução do hipoclorito de sódio, não houve discriminação entre as camadas residuais organizadas ou não.

Figura 6. Imagens representativas dos escores utilizados. A limpeza é catalogada iniciando-se a partir da superfície dentinária limpa, escore 1 (a) até a superfície dentinária coberta por estruturas residuais do biofilme, cobrindo mais de 2/3 da superfície dentinária, escore 4 (d). Estágios intermediários de limpeza foram catalogados como escores 2 e 3 (b-c). Asteriscos indicam resíduos celulares sobre a superfície dentinária. Setas indicam camadas de biofilmes residuais.

4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a análise estatística foram utilizados, basicamente, testes não-paramétricos. O teste de Kruskal-Wallis Dunn foi utilizado para realizar comparações de mais de 2 grupos. O teste U-Mann Whitney foi utilizado quando 2 grupos precisaram ser comparados. O teste de Spearman foi utilizado para observar a correlação entre a proporção de células vivas e o biovolume do biofilme tratado com algumas soluções irrigadoras. Os escores foram avaliados mediante o teste de Kruskal-Wallis e também pelo teste de Chi-quadrado. A significância estatística foi estabelecida em $P < 0,05$. A concordância entre os examinadores foi estabelecida pelo teste de Kappa.

5 **RESULTADOS**

5 RESULTADOS

As amostras de controle tratadas com água destilada se caracterizaram pela presença de um biofilme denso cobrindo a estrutura dentinária. A presença de numerosos morfotipos bacterianos como bacilos e cocos pôde ser observada (Fig. 7).

Figura 7. (A) Viabilidade representativa de biofilme aderido sobre dentina após tratamento com água destilada. Fluorescência verde representa células vivas; fluorescência vermelha representa células mortas. (B) Microscopia eletrônica de varredura (MEV) da superfície de dentina contaminada. Os túbulos dentinários não são visíveis e uma densa camada de microorganismos está aderida sobre a superfície de dentina. Escala representa 100 μ m. (C) Magnificação da superfície dentinária; diversos morfotipos microbianos como cocos e bacilos podem ser observados. Escala representa 5 μ m.

5.1 Análise dos componentes base: hipoclorito de sódio a 1%, EDTA, clorexidina a 2% e ácido cítrico a 10%

O total de 100 campos microscópicos foram analisados (20 para cada solução irrigadora incluindo o controle). A mediana, média e valores mínimo e máximo do biovolume total, biovolume das células vivas expressado em μm^3 estão apresentados na Tabela 1. Não foram encontradas diferenças estatísticas nesses parâmetros avaliados quando os biofilmes foram tratados com água destilada, ácido cítrico a 10%, EDTA a 17% ou clorexidina a 2% ($P > 0,05$). Os menores valores foram encontrados na dentina tratada com hipoclorito de sódio a 1% ($P < 0,05$).

Os biofilmes tratados com clorexidina mostraram uma discreta redução das células viáveis em comparação à água destilada, porém sem diferença significativa. A mediana e valores mínimo e máximo da porcentagem de cobertura do substrato pelo biofilme estão apresentados na Tabela 2. O hipoclorito de sódio apresentou a menor área de superfície com microorganismos ($P < 0,05$) em comparação às outras soluções irrigadoras.

Embora algumas áreas de dentina limpa fossem observadas no grupo tratado com hipoclorito de sódio a 1%, biofilmes residuais apareceram firmemente compactados à estrutura dentinária. A completa limpeza da dentina não foi observada em nenhuma das soluções testadas. Imagens representativas dos biofilmes tratados estão apresentados na figura 8.

Tabela 1. Resultados do biovolume, número de células vivas, cobertura do substrato e altura do biofilme após uso de diferentes soluções irrigadoras: hipoclorito de sódio (NaOCl) a 1%, EDTA a 17%, ácido cítrico a 10%, clorexidina a 2%. Água destilada foi utilizada como controle.

Biovolume Total (μm^3)	NaOCl 1%	EDTA 17%	Ácido cítrico 10%	Clorexidina 2%	Água destilada
Mediana	$3,04 \times 10^5$	$5,30 \times 10^6$	$5,39 \times 10^6$	$7,26 \times 10^6$	$5,42 \times 10^6$
Média	$7,88 \times 10^5$	$6,36 \times 10^6$	$6,37 \times 10^6$	$7,33 \times 10^6$	$7,68 \times 10^6$
Mínimo-máximo	$1,60 \times 10^3$ – $4,35 \times 10^6$	$1,02 \times 10^6$ – $1,79 \times 10^7$	$1,23 \times 10^6$ – $1,36 \times 10^7$	$7,11 \times 10^5$ – $1,68 \times 10^7$	$2,72 \times 10^6$ – $1,64 \times 10^7$
Células vivas (μm^3)					
Mediana	$5,98 \times 10^3$	$4,23 \times 10^6$	$4,44 \times 10^6$	$2,14 \times 10^6$	$4,69 \times 10^6$
Média	$3,24 \times 10^5$	$4,60 \times 10^6$	$4,87 \times 10^6$	$2,76 \times 10^6$	$6,67 \times 10^6$
Mínimo-máximo	0 – $2,30 \times 10^6$	$3,84 \times 10^5$ – $1,20 \times 10^7$	$2,53 \times 10^5$ – $1,20 \times 10^7$	$1,92 \times 10^4$ – $7,71 \times 10^6$	$1,69 \times 10^6$ – $1,52 \times 10^7$
Cobertura do substrato (%)					
Mediana	1,98	38,34	31,94	39,28	29,42
Média	6,10	38,65	35,14	38,72	34,30
Mínimo-máximo	0,01 – 33,99	11,24 – 71,50	8,21 – 86,10	6,00 – 79,51	11,58 – 75,85

5.2 Análise do hipoclorito de sódio a 2,5%, a 5,25% e de soluções irrigadoras antimicrobianas sem capacidade de dissolução

O total de 225 campos microscópicos foram avaliados, sendo 25 de cada solução irrigadora. A mediana, 25 e 75% percentil e valores mínimo e máximo do biovolume total e biovolume das células vivas estão mostrados na Tabela 2. Não foram encontradas diferenças nesses parâmetros quando foram utilizados “Qmix”, “Smear Clear”, “MTAD”, ácido maleico a 7% e iodo-iodeto de potássio a 2% ($P > 0,05$). Os menores valores de biovolume foram encontrados nos grupos de hipoclorito de sódio e ácido peracético ($P < 0,05$). O hipoclorito a

5,25% e a 2,5% apresentaram 99,4% e 84,3% de redução do biovolume em comparação ao grupo controle. O biovolume do ácido peracético foi 90% menor que o do grupo controle.

O parâmetro classificado como proporção de células vivas está apresentado na Tabela 2. Esse modelo *in situ/ in vivo* apresenta 89% de viabilidade quando o biofilme fica exposto ao controle (água). Em geral, os menores valores foram encontrados nos grupos de hipoclorito de sódio a 5,25% e ácido peracético a 4% ($P < 0,05$). Não foram encontradas diferenças estatísticas entre as soluções de hipoclorito de sódio e “Qmix” ($P > 0,05$)

O teste de Spearman não mostrou correlação entre o biovolume e a proporção de células vivas nos grupos de água destilada, “Qmix”, “MTAD”, “Smear Clear”, iodo-iodeto de potássio a 2% e ácido maleico a 7%, o que mostrou que o aumento ou a diminuição do biovolume não influenciou na proporção de células vivas nesses grupos. O resultado de hipoclorito de sódio a 5,25% e ácido peracético a 4% mostrou uma correlação inversa entre o biovolume residual e a proporção de células vivas ($r=-0.51$) ($r=-0.46$), respectivamente ($P < 0,05$). Nessas soluções maiores índices de células vivas foram encontrados em presença de menores valores de biovolume.

Os valores da superfície do substrato colonizado em termos de porcentagem (%) estão apresentados no Gráfico 1. Valores significativos desse parâmetro foram encontrados quando o ácido peracético a 4%, e hipoclorito de sódio a 2,5% ou a 5,25% foram utilizados em comparação às outras soluções ($P < 0,05$). As imagens de microscopia confocal mostraram uma intensa colonização da dentina sem evidência visível de alterações estruturais ou efeito de dissolução quando água destilada, “MTAD”, “Qmix”, “Smear Clear”, iodo-iodeto de potássio a 2% ou ácido maleico a 7% foram utilizados (Fig. 9). Evidência de desorganização de biofilme foi encontrada nos tratados com hipoclorito de sódio ou ácido peracético. Nesses grupos, camadas residuais de biofilmes foram evidentes na entrada dos túbulos dentinários e estiveram frequentemente associadas com a presença de células vivas.

Tabela 2. Mediana, 25 – 75% percentil e valores mínimo e máximo do biovolume total, das células vivas e proporção de células vivas. Letras diferentes nas colunas representam significância estatística ($P < 0,05$).

	Biovolume $\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$		Proporção células vivas
	Total	Vivas	Proporção[Vivas/(vivas+mortas)]
Controle	3,32 (1,79 – 5,58)a [0,94- 9,07]	2,91 (1,58 – 4,94)a [0,68- 7,59]	0,89 (0,82 – 0,92)a [0,72 – 0,98]
“MTAD”	3,80 (2,86 - 4,92)a [0,85- 7,43]	3,44 (1,78 – 4,28)a [0,37- 6,20]	0,92 (0,71 – 0,97)ab [0,25 – 0,99]
“Qmix”	3,49 (1,62 – 5,14)a [0,67- 8,11]	1,53 (0,72 – 3,26)a [0,05- 8,04]	0,56 (0,28 – 0,77)bc [0,02 – 0,99]
“Smear Clear”	3,69 (2,27 – 5,77)a [1,14- 8,30]	3,09 (1,65 – 4,39)a [0,84- 8,29]	0,90 (0,72 – 0,97)a [0,38 – 0,99]
Ácido Maleico 7%	3,60 (1,37 – 5,27)a [0,85- 8,07]	1,89 (0,98 – 4,01)a [0,53- 5,24]	0,70 (0,58 – 0,84)ab [0,34 – 0,99]
Iodo-iodeto de potássio 2%	3,50 (2,12 – 4,94)a [0,95 – 7,30]	2,68 (1,52 – 3,68)a [0,67 – 5,24]	0,74 (0,67 – 0,85)ab [0,29 – 0,98]
Ácido peracético 4%	0,31 (0,09 – 0,52)b [0,01 – 0,95]	0,01 (0 – 0,03)b [0 – 0,10]	0,04 (0 – 0,21)d [0 – 0,92]
NaOCl 2,5%	0,52 (0,10 – 0,87)b [0 – 1,36]	0,05 (0 – 0,31)b [0 – 1,02]	0,36 (0,05 – 0,77)cd [0 – 0,97]
NaOCl 5,25%	0,02 (0,01 – 0,17)b [0 – 0,64]	0 (0 – 0,01)b [0 – 0,24]	0,07 (0 – 0,68)cd [0 – 0,86]

Gráfico 1 . Representação da mediana, valores mínimo e máximo da cobertura do substrato.

Figura 8 . Microscopia confocal de varredura a laser de dentina infectada tratada com hipoclorito de sódio a 1% (A), ácido cítrico a 10% (B), EDTA a 17% (C) e clorexidina a 2% (D). Fluorescência verde representa viabilidade microbiana; fluorescência vermelha representa morte microbiana. Barra representa 20µm.

Figura 9. Microscopia confocal de varredura a laser de dentina infectada tratada com ácido maleico a 7% (A), “MTAD” (B), iodo-iodeto de potássio a 2% (C) e ácido peracético a 4% (D). Fluorescência verde representa viabilidade microbiana; fluorescência vermelha representa morte microbiana. Observar a viabilidade microbiana nos túbulos dentinários infectados (A, B) e a dificuldade da solução iodetada para penetrar no biofilme (C). Barra representa 20µm.

5.3 Efeito dos meios físicos utilizados na irrigação endodôntica

Os blocos irrigados com água destilada apresentaram uma camada espessa de biofilme cobrindo a estrutura dentinária. A variabilidade entre os examinadores medida pelo teste de Kappa foi de 0,78. A concordância entre os observadores foi de 0,82 e 0,85 para o primeiro e segundo avaliador, respectivamente. A média e mediana dos escores dos diferentes grupos estão apresentados na Tabela 3. A irrigação com água destilada foi classificada como 4 em todas as microscopias de varredura avaliadas. Os testes estatísticos Kruskal-Wallis e chi-quadrado mostraram diferenças significativas entre os grupos.

A técnica de irrigação ativada por laser mostrou os menores valores em comparação à técnica de irrigação ultrassônica passiva, sônica (“endoactivator”) e irrigação clássica (agulha) ($P < 0,05$). A técnica de irrigação passiva ultrassônica aumentou a capacidade de limpeza em comparação à irrigação auxiliada pelo “endoactivator” e irrigação clássica ($P < 0,05$); essas últimas 2 técnicas não mostraram diferenças estatísticas ($P > 0,05$). O pior resultado foi encontrado no grupo controle, o qual não apresentou nenhum efeito contra o biofilme ($P < 0,05$). Resultados similares foram encontrados quando o teste de chi-quadrado foi utilizado para comparar os escores. Imagens representativas de microscopia eletrônica de varredura são apresentadas nas figuras 10 e 11.

Tabela 3. Distribuição dos escores obtidos mediante microscopia eletrônica de varredura. A média e mediana também são apresentadas. Letras minúsculas diferentes representam diferenças estatísticas significativas ($P < 0,05$).

	Escore 1	Escore 2	Escore 3	Escore 4	Média	Mediana	Total
Controle	0	0	0	150	4	4 ^a	150
Clássica	23	40	56	31	2,63	3 ^b	150
Sônica	31	35	52	32	2,56	3 ^b	150
Ultrassom	72	33	25	20	1,95	2 ^c	150
Laser	107	21	10	12	1,52	1 ^d	150

Figura 10. Imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) de dentina infectada tratada com hipoclorito de sódio a 6% e irrigação com seringa e pressão positiva. Imagens de 2.400X mostram resíduos microbianos amorfos (A, C, E); quando a dentina é observada a mais de 9.000X podem ser observados os perfis dos microorganismos residuais (B, D, F).

Figura 11. Imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) de dentina infectada tratada com hipoclorito de sódio a 6% e irrigação com a técnica ultrasônica passiva (A-D). A primeira imagem mostra resíduos sobre a superfície dentinária. Em maior aumento, podem-se observar resíduos amorfos do biofilme (B). A imagem em (C) mostra um efeito benéfico da técnica; túbulos dentinários limpos podem ser observados (D). Dentina infectada após o tratamento com a técnica PIPS ou irrigação assistida por laser (E). A superfície dentinária apresenta-se livre de resíduos ou microorganismos. Uma magnificação dos túbulos dentinários mostra uma colônia microbiana com morfologia inalterada, mesmo após uso de uma alta concentração de hipoclorito de sódio (F).

5.4 Análise da medicação intracanal

A mediana, valores mínimo e máximo da porcentagem de células viáveis nos grupos avaliados nos 2 experimentos sobre medicação intracanal estão apresentados nas Tabelas 4 e 5. Imagens representativas dos biofilmes tratados com os diferentes medicamentos estão apresentadas nas figuras 12 e 13.

O primeiro experimento, referente à influência dos radiopacificadores sobre a atividade antimicrobiana do hidróxido de cálcio, mostrou uma alta presença de células viáveis quando não foi adicionado nenhum radiopacificador à pasta ($P < 0,05$). A maior atividade antimicrobiana foi encontrada quando o hidróxido de cálcio foi associado ao iodofórmio ($P < 0,05$).

Na segundo experimento, encontrou-se que a pasta aquosa de hidróxido de cálcio teve a menor atividade antimicrobiana e a pasta triantibiótica a mais alta, com ou sem 24 horas de pré-incubação adicional.

A pasta aquosa de hidróxido de cálcio e a clorexidina em gel a 2% não mostraram diferenças significativas na avaliação imediata ($P > 0,05$). Porém, após a incubação no meio de BHI por 24 horas, a clorexidina em gel mostrou menor porcentagem de células viáveis em comparação à pasta aquosa de hidróxido de cálcio ($P < 0,05$). Esse efeito foi observado porque o biofilme tratado com a pasta aquosa de hidróxido de cálcio aumentou significativamente a porcentagem de células vivas de 63,71% a 83,88%, após incubação adicional no meio BHI (U-Mann Whitney $P < 0,05$). O tratamento adicional do biofilme com BHI não mostrou efeitos favoráveis sobre os grupos tratados com clorexidina em gel a 2% ou com a pasta triantibiótica (U-Mann Whitney $P > 0,05$). A pasta triantibiótica mostrou significativamente a menor porcentagem de células vivas em comparação à clorexidina em gel a 2% e ao hidróxido de cálcio na avaliação mediata e após 24 horas ($P < 0,05$).

Tabela 4. Mediana e valores mínimo e máximo da porcentagem de células viáveis. Letras diferentes em cada coluna representam significância estatística ($P < 0,05$).

Grupos	Porcentagem do volume de células viáveis. Mediana (Min-Max)
Ca(OH) ₂	83,59 (38,42 – 99,82) ^a
Propileno (controle)	75, 07 (41,86 – 95,60) ^{ab}
Ca(OH) ₂ +óxido de zinco	66,56 (16,74 – 90,38) ^{ab}
Ca(OH) ₂ + sulfato de bário	43,35 (5,00 – 98,39) ^b
Ca(OH) ₂ + iodoformio	9,47 (0,22 – 50,04) ^c

Tabela 5. Mediana e valores mínimo e máximo da porcentagem de células viáveis. Letras diferentes em cada coluna representam significância estatística ($P < 0,05$).

	Vivas %	Vivas % após 24h
Salina (controle)	93,36 (45,87 – 98,98) a	82,69 (35,49- 97,74) a
Ca(OH) ₂	63,71 (9,20 – 99,23) ab	83,88 (55,46 – 96,51) a
Clorexidina a 2%	28,33 (0 – 78,32) b	18,70 (5,53 – 74,69) b
Pasta triantibiótica	1,37 (0 – 13,18) c	1,57 (0,00 – 25,68) c

Figura 12 . Microscopia confocal de varredura a laser de dentina infectada tratada com hidróxido de cálcio + propilenoglicol (A), hidróxido de cálcio + sulfato de bário + propilenoglicol (B), hidróxido de cálcio + propilenoglicol + óxido de zinco (C) e hidróxido de cálcio + propilenoglicol + iodofórmio (D). Fluorescência verde representa viabilidade microbiana; fluorescência vermelha representa morte microbiana. Barra representa 20μm.

Figura 13 . Microscopia confocal de varredura a laser de dentina infectada após 7 dias de tratamento com diferentes medicamentos intracanaais. Controle (A), pasta aquosa de hidróxido de cálcio (B), clorexidina em gel a 2% (C) e pasta triantibiótica (D). Fluorescência verde representa viabilidade microbiana; fluorescência vermelha representa morte microbiana. Barra representa 20µm.

6 **D***ISSCUSSÃO*

6 DISCUSSÃO

O recurso da microscopia confocal de varredura a laser tem sido adotado paulatinamente na pesquisa endodôntica nos últimos anos (SHEN, *et al.*, 2010; HAAPASALO, M., *et al.* 2010). O uso de modelos de biofilme para testar soluções irrigadoras derivados da placa dentária ou desenvolvidos intraoralmente tem sido feito com a finalidade de testar antimicrobianos de aplicação endodôntica (BARTHEL, *et al.*, 2002; VIRTEJ, *et al.*, 2007; SHEN, *et al.*, 2009). Com exceção do hipoclorito de sódio, os agentes quelantes que possuem antimicrobianos são utilizados após os procedimentos de limpeza e têm como objetivo eliminar a microflora residual, que é basicamente composta por bactérias facultativas (CHAVEZ DE PAZ, *et al.*, 2003). Por esse motivo, condições de anaerobiose não foram utilizadas, uma vez que a microbiota anaeróbica não representa a microflora encontrada nos dentes tratados químico-mecanicamente. O modelo de biofilme utilizado pode reproduzir relativamente a condição clínica, já que a exposição da dentina radicular ao meio oral e sua subsequente contaminação é provável em condições clínicas (CHU, *et al.*, 2005).

Os modelos *in vitro* não necessariamente simulam as limitadas condições de falta de nutriente dos canais radiculares. O uso da incubação adicional utilizando o meio BHI foi necessário, no intuito de homogeneizar e estabelecer uma alta porcentagem de viabilidade dos microorganismos do biofilme. Isso deve-se ao fato de que o número de bactérias mortas no biofilme pode ser considerado variável (AUSCHILL, *et al.*, 2001; ARWEILER, *et al.*, 2004). O uso desse método permitiu pelo menos 85% de biomassa viável quando o biofilme foi tratado com um componente não-antimicrobiano (água).

Um outro ponto importante é a interpretação das variáveis utilizadas na pesquisa de biofilme. No presente estudo, foi encontrada uma proporção de células vivas similar entre as soluções de hipoclorito de sódio e o “Qmix”, estando concorde com o trabalho de (S.

STOJICIC *et al.*, 2012). No entanto, a quantidade de biovolume de células vivas foi significativamente menor nos grupos de hipoclorito de sódio. Isso demonstra que o parâmetro isolado de proporção de células vivas não leva em consideração o efeito de dissolução. Assim, é possível observar que esse parâmetro pode superestimar o efeito antimicrobiano, já que não leva em conta o biovolume (BRYCE, *et al.*, 2009). Esses resultados mostram que vários parâmetros são necessários para uma apropriada interpretação dos mesmos. Nesse contexto, os valores volumétricos estiveram suportados por uma diminuição significativa da cobertura do substrato encontrada nos grupos de hipoclorito de sódio e ácido peracético.

Apesar das vantagens do modelo de biofilme utilizado no presente estudo, é difícil reproduzir no laboratório as condições clínicas sob as quais os agentes antimicrobianos se difundem no nível apical em dentes com anatomia complexa. O uso do presente modelo de biofilme pode servir para identificar variáveis nas quais a bactéria pode sobreviver à aplicação de compostos antimicrobianos. Uma dessas variáveis, aparentemente, é a presença de irregularidades anatômicas. As zonas irregulares e os istmos dos canais radiculares não só podem aumentar a massa vertical do biofilme na estrutura dentinária, como também podem limitar a ação antimicrobiana (DENG; TEN CATE, 2004). Outras variáveis a serem testadas são: se as células sobreviventes ou novos colonizadores podem se aderir ao biofilme residual, ou se o uso dos meios físicos da irrigação tem um efeito adicional na dissolução do biofilme. Considerando que uma descrição detalhada das espécies orais que sobreviveram ao estresse antimicrobiano esteja fora dos objetivos deste estudo, novas pesquisas sobre esse tópico são necessárias para o futuro.

O uso de dentina como substrato permite a identificação da presença de células microbianas por vários micrometros abaixo da superfície (7µm). No entanto, a detecção de bactérias viáveis nas camadas profundas da dentina é limitada, devido à pouca penetração do laser dentro de estruturas opacas como a dentina.

A inativação de medicamentos é essencial para testes microbiológicos baseados no método de cultura (PORTENIER, *et al.*, 2006). Nessa metodologia, a capacidade antimicrobiana é medida pela capacidade das bactérias sobreviventes em produzir clones. Esse processo é realizado após a desorganização do biofilme aderido às superfícies infectadas, o transporte em um meio apropriado e a inoculação em placas de ágar. Quando resíduos do antimicrobiano utilizado para tratar o biofilme são introduzidos durante esses procedimentos, as condições para o crescimento de novas células ou clones são alteradas. Por outro lado, uma vantagem da microscopia confocal é a possibilidade de avaliar *in situ*, por observação direta, a viabilidade dos microorganismos da dentina infectada, com avaliação da permeabilidade da membrana, ainda sem desorganizar a estrutura do biofilme nem as células aderidas (SHEN, *et al.*, 2009). O procedimento de avaliação utilizado, onde a viabilidade microbiana é diretamente avaliada sobre a superfície contaminada, é similar às condições clínicas, onde não são realizados procedimentos de inativação do medicamento.

6.1 Das soluções irrigadoras testadas

Esse estudo mostrou as limitações de numerosas soluções irrigadoras para eliminar biofilmes em um teste de contato direto, no qual fatores externos foram eliminados. Em média, com exceção do ácido peracético e do hipoclorito de sódio, uma área de 2 x 2 mm (4mm²) de dentina infectada não pôde ser adequadamente descontaminada por uma quantidade razoável de solução irrigadora (1mL ou 1.000mm³). Enquanto uma variedade de substratos como nitrocelulose (BRYCE, *et al.*, 2009), hidroxiapatita ou poliestireno (CHAVEZ DE PAZ; BERGENHOLTZ; SVENSATER, 2010) tem sido utilizada, a vantagem de utilizar o substrato dentinário é simular melhor as micro-irregularidades da superfície encontradas no canal radicular.

Variações do biovolume foram encontradas nesse experimento. No entanto, com exceção dos agente oxidantes, essa variabilidade parece ser irrelevante, já que valores do biovolume altos ou baixos apresentaram uma baixa correlação com a proporção de células vivas. A variabilidade no modelo de biofilme utilizado pode ser explicada pelas características comuns da arquitetura do biofilme, bem como a presença de canais, cavidade e vazios.

Estudos anteriores e revisões na área microbiológica mostraram que uma grande porcentagem de células no biofilme não é resistente aos agentes antimicrobianos em comparação ao modo planctônico. Quando as células do biofilme são dispersadas, os agentes antibióticos podem eliminá-las (WILLIAMS, *et al.*, 1997), apesar da presença de microorganismos persistentes também ter sido relatada (CHAMBLESS; HUNT; STEWART, 2006). A resistência do biofilme tem sido também atribuída a outros fatores, tais como: a) reação dos componentes antimicrobianos com os componentes orgânicos do biofilme onde o efeito antimicrobiano é consumido pela reação (DODDS; GROBE; STEWART, 2000), e b) maior resistência das células nas camadas profundas do biofilme devido à limitada difusão do agente antimicrobiano nas estruturas orgânicas. (DODDS; GROBE; STEWART, 2000).

A atividade neutralizante dos compostos orgânicos como células mortas ou matriz extracelular (EPS) sobre os agentes antimicrobianos está bem documentada (PORTENIER, *et al.*, 2006) (PORTENIER, *et al.*, 2002; MULCAHY; CHARRON-MAZENOD; LEWENZA, 2008; TOTE, *et al.* 2010). Apesar do fato de que 90% do EPS seja água, a presença de células, polímeros, proteínas ou DNA atuam como uma barreira difusiva aos agentes antimicrobianos, o que leva à diminuição da atividade antimicrobiana (DODDS; GROBE; STEWART, 2000). Portanto, é esperado que células dentro do biofilme estejam expostas a concentrações diferentes do agente antimicrobiano. Tal fato depende da localização espacial (STEWART, 2002; CHAMBLESS; HUNT; STEWART, 2006). Esta teoria é muito aceita na pesquisa de biofilme (STEWART, 2002), e pode explicar o padrão irregular da atividade

antimicrobiana encontrada no “Qmix” e no ácido maleico, os quais afetam numerosas áreas do biofilme, porém, apresentam efeitos nulos em outras áreas. Outra explicação pode ser que o tempo de contato tenha sido insuficiente para permitir uma melhor distribuição dos antimicrobianos dentro do biofilme. No entanto, o tempo de exposição de 5 minutos parece razoável, considerando que muitas soluções, como as quelantes, utilizados neste estudo são recomendados por 60-90 segundos (S. STOJICIC, *et al.*, 2012).

A inativação de uma mistura de 0,1% de cetrimida e clorexidina, iodo-iodeto de potássio e “MTAD” por compostos orgânicos, tais como soro bovino ou substrato dentinário foi reportada em outros trabalhos e está de acordo com os resultados do presente estudo (PORTENIER, *et al.*, 2001; PORTENIER, *et al.*, 2002; PORTENIER, *et al.*, 2006). Uma limitada capacidade antimicrobiana foi encontrada em alguns estudos para a clorexidina (CHAVEZ DE PAZ; BERGENHOLTZ; SVENSATER 2010; DUNAVANT, *et al.*, 2006; PAQUETTE, *et al.*, 2007), “MTAD” (S. STOJICIC, 2011) (DUNAVANT, *et al.*, 2006; JOHAL; BAUMGARTNER; MARSHALL, 2007; MALKHASSIAN, *et al.*, 2009), iodo-iodeto de potássio a 2%, principalmente quando curtos períodos foram utilizados (TELLO-BARBARAN, *et al.* 2010).

É também aceito que os biofilmes que se apresentam nas camadas profundas estejam em estado alterado de metabolismo e sejam mais difíceis de serem eliminados pelos antibióticos (ROBERTS; STEWART, 2005; CHAMBLESS; HUNT; STEWART, 2006). Modelos matemáticos na área de biofilme mostraram 2 etapas na sua dissolução química (XAVIER, *et al.*, 2005). A primeira etapa promove uma rápida dissolução seguida de um longo período para remover as finas camadas residuais que permanecem nas proximidades do substrato. Também foi relatado que a velocidade de desorganização diminui conforme a espessura do biofilme diminui (XAVIER, *et al.*, 2005). Como resultado, não foi surpreendente que um alto índice de células vivas tenha sido encontrado na dentina tratada com hipoclorito

de sódio a 5,25% e ácido peracético. Essa alta viabilidade é unida a uma reduzida biomassa próxima à interface dentinária.

O hipoclorito de sódio é um agente oxidante muito reativo, que tem um efeito bem documentado de dissolução do biofilme (DEL CARPIO-PEROCHENA, *et al.* 2011; TOTE, *et al.* 2010; CLEGG, *et al.*, 2006). É possível que a reação de dissolução neutralize ou consuma a quantidade de cloro disponível mais rapidamente do que se difunde pelas camadas profundas do biofilme (CHEN; STEWART, 1996). Como resultado, uma maior quantidade de células vivas foi observada no grupo de hipoclorito de sódio a 2,5%, em comparação à concentração de 5,25%. A presença de células viáveis pode também ter sido facilitada pela característica irregular e rugosa da dentina que inclui os túbulos dentinários. Um estudo recente mostrou que o hipoclorito de sódio a 1-2% pode destruir biofilmes de *Enterococcus faecalis* em 3 minutos (S. STOJICIC, 2012). De maneira similar a estudos clínicos (MCGURKIN-SMITH, *et al.*, 2005), os resultados dessa pesquisa mostraram que a eliminação completa de células microbianas não pôde ser atingida em todos os casos utilizando hipoclorito de sódio a 5%. Esses dados sugerem que as condições do crescimento do biofilme *in vitro* ou *in situ* podem alterar a resistência dos microorganismos do biofilme aos agentes antimicrobianos.

Foi reportado que os principais componentes do “Smear Clear”, “MTAD” e “Qmix” são EDTA e ácido cítrico. Conforme observado no primeiro experimento, esses agentes não promovem a eliminação ou dissolução do biofilme em um curto período de tempo. Apesar de estudos mostrarem a capacidade antimicrobiana das soluções de ácido maleico (FERRER-LUQUE, *et al.* 2010) e de iodo-iodeto de potássio a 2% (PORTENIER, *et al.*, 2002), essas soluções não possuem capacidade de limpeza ou dissolução. Pesquisas no campo de biofilme têm mostrado que a estratégia mais efetiva para eliminar os biofilmes é a dissolução da sua

estrutura (TOTE, *et al.* 2010). Assim, parece que esse foi o mecanismo que possibilitou obter melhores resultados quando os irrigantes com capacidade de dissolução foram utilizados.

Estudos mostraram que a irrigação de hipoclorito de sódio não evita o crescimento de microorganismos residuais nos canais radiculares (BYSTROM; SUNDQVIST, 1985; MCGURKIN-SMITH, *et al.*, 2005). Assim, o uso de medicação intracanal e a obturação do canal radicular são necessários. Nessa perspectiva, a eliminação da *smear layer* é importante. Como o hipoclorito de sódio não remove a *smear layer*, possíveis alternativas para reduzir a carga antimicrobiana são: a) o uso de uma solução quelante durante a instrumentação para prevenir o acúmulo de *smear layer*, melhorando a difusão do hipoclorito de sódio; b) o uso de uma mistura de etidronato e hipoclorito de sódio, os quais podem manter a capacidade antimicrobiana e evitam a formação de *smear layer* (ZEHNDER, *et al.*, 2005; DE-DEUS, *et al.*, 2008); c) irrigação com hipoclorito de sódio a 1- 2,5% após o uso de quelante, no intuito de melhorar a capacidade de dissolução dos biofilmes residuais sem diminuir as propriedades mecânicas da dentina (RAJASINGHAM, *et al.* 2010; ZHANG, *et al.* 2010).

Um resultado interessante foi encontrado quando a solução de ácido peracético a 4% foi utilizada. A solução utilizada neste estudo possui 24% de peróxido de hidrogênio em sua composição e está indicada para desinfecção e descalcificação de equipamentos de hemodiálise. Um estudo mostrou que a solução de peróxido de hidrogênio a 5% possui a capacidade de dissolver 89% de biofilmes de *Staphylococcus aureus* e de *Pseudomonas aeruginosa* em 1 minuto em comparação ao 66% de capacidade de dissolução com o hipoclorito de sódio a 1% (TOTE, *et al.* 2010). O fato de o ácido peracético desinfetar e dissolver os biofilmes mistos requer maiores pesquisas, já que essa solução é capaz de eliminar a *smear layer*. No entanto, um equilíbrio entre toxicidade, atividade antimicrobiana e eliminação de *smear layer* precisa ser determinado em estudos futuros.

RETAMOZO, *et al.* (2010) mostraram que são necessários de 40-60 minutos de exposição ao hipoclorito de sódio a 5,25% para obter uma cultura negativa em dentina infectada previamente pela bactéria *Enterococcus faecalis*. Essa informação confirma a dificuldade que pode ser encontrada para a descontaminação das camadas profundas do biofilme presentes no interior dos túbulos dentinários. O modelo utilizado no presente estudo possui facilidades para a detecção de viabilidade na superfície da dentina e possui limitações para a avaliação de túbulos dentinários infectados.

Os menores valores de cobertura do substrato encontrados nos grupos de hipoclorito de sódio podem ser explicados pelo efeito de dissolução dos compostos orgânicos que a solução irrigadora possui, a qual pode diminuir o biovolume na dimensão horizontal. A atividade antimicrobiana é desejável para todas as soluções irrigadoras utilizadas durante o tratamento endodôntico, incluindo os quelantes. No entanto, as limitações das soluções endodônticas devem ser identificadas. O tempo de contato de 5 minutos de EDTA a 17% e ácido cítrico a 10% não apresentou efeito sobre a viabilidade do biofilme. Esses resultados estão em concordância com os de ARIAS-MOLIZ, *et al.*, (2009). O efeito da clorexidina a 2% sobre a viabilidade do biofilme também foi limitada. Esse efeito considerado inferior à atividade do hipoclorito de sódio foi observado em outros estudos (HOPE; WILSON, 2004; CLEGG, *et al.*, 2006; DUNAVANT, *et al.*, 2006; CHAVEZ DE PAZ; BERGENHOLTZ; SVENSATER, 2010). Aparentemente, em condições clínicas, a atividade antimicrobiana da clorexidina a 2% poderia ser esperada somente em canais preparados e limpos. Por outro lado, poderia não existir efeito desse composto na arquitetura e viabilidade dos biofilmes situados em áreas não afetadas pelo processo químico-mecânico. Em média, o hipoclorito de sódio pode remover até 90% do volume do biofilme, tendo maior capacidade antimicrobiana que as outras soluções irrigadoras avaliadas. No entanto, a biomassa residual não foi completamente eliminada utilizando o hipoclorito de sódio, provavelmente devido ao curto período de uso.

Períodos mais longos não foram avaliados, pois o EDTA, ácido cítrico e a clorexidina são comumente utilizados por curtos períodos de tempo durante o tratamento endodôntico.

6.2 Dos métodos físicos da irrigação endodôntica

O presente estudo mostrou que a capacidade de limpeza do hipoclorito de sódio pode ser melhorada com uso das técnicas de irrigação assistida por laser ou por ultrassom. A maior parte das pesquisas disponíveis sobre a capacidade de limpeza dessas técnicas comparou a eficácia para eliminar *debris* dentinários (DE GROOT, *et al.*, 2009; JIANG, *et al.*, 2010). No entanto, faltam estudos comparando a habilidade das técnicas ultrassônicas e irrigação ativada por laser para melhorar a limpeza da dentina infectada por biofilmes (PETERS, *et al.*, 2011).

Numerosos modelos de biofilme são utilizados na pesquisa endodôntica e a eficácia do hipoclorito de sódio depende de muitas variáveis tais como: concentração (DEL CARPIO-PEROCHENA, *et al.* 2011), método de crescimento do biofilme (WANG, Z.; SHEN; HAAPASALO, 2012) e tempo (DEL CARPIO-PEROCHENA, *et al.* 2011). BHUVA *et al.* (2010) encontraram diferenças entre a irrigação convencional e a técnica de irrigação passiva ultrassônica. Os autores encontraram que biofilmes de *Enterococcus faecalis* podem ser completamente dissolvidos utilizando 6mL de hipoclorito de sódio a 1% por 2 minutos (BHUVA, *et al.* 2010). STOJICIC, *et al.* (2012) encontraram que o hipoclorito de sódio 1-2% pode destruir biofilmes de *Enterococcus faecalis* por 3 minutos. Em nosso estudo, de maneira similar a outros estudos (BARTHEL, *et al.*, 2002; PETERS, *et al.*, 2011), foi utilizado o modelo de biofilme de placa bacteriana desenvolvida intraoralmente. Os resultados mostraram a dificuldade da irrigação convencional em associação ao hipoclorito de sódio a 6% para dissolver completamente o biofilme, confirmando os estudos de (NAIR, *et al.*, 2005; VERA, *et al.* 2012).

Embora essa pesquisa não tenha sido realizada utilizando dentes com anatomia complexa, o método empregado permitiu comparar diferentes protocolos de irrigação que utilizam o hipoclorito de sódio sobre uma área padronizada de dentina infectada no nível apical.

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) é comumente utilizada como método de avaliação para observar dentina infectada (GEORGE, S.; KISHEN; SONG, 2005; NORRINGTON, *et al.*, 2008). Embora essa técnica permita apenas uma análise bidimensional e semiquantitativa, apresenta como vantagem a produção de imagens de alta resolução das estruturas analisadas em comparação ao microscópio confocal ou estereomicroscópio. Para minimizar o viés, uma considerável quantidade de figuras foi obtida de uma pequena área pré-definida no terço apical.

De forma similar aos resultados de outros estudos, não foram encontradas diferenças entre a irrigação convencional e o método de irrigação sônica (“endoactivator”) (UROZ-TORRES; GONZALEZ-RODRIGUEZ; FERRER-LUQUE; BRITO, *et al.*, 2009; JOHNSON, *et al.*, 2012; SEET, *et al.* 2012). Os resultados encontrados com o “endoactivator” foram inferiores aos do ultrassom (JIANG, *et al.*, 2010), o qual utiliza frequências mais altas, a fim de melhorar o efeito da solução irrigadora. De acordo com JIANG, *et al.*, (2010), o uso de frequências altas ou baixas e o uso de pontas pequenas ou maiores não melhora a capacidade de limpeza da técnica sônica. Os autores encontraram que a amplitude de vibração da ponta do “endoactivator” foi de 1mm, o qual pode levar a uma alta probabilidade de contato com as paredes dentinárias, diminuindo, portanto, a eficácia em comparação aos movimentos ultrassônicos, que estão na escala de 75µm (JIANG, *et al.*, 2010).

No presente estudo, esperou-se um contato mínimo ou negativo das pontas sônicas e ultrassônicas empregadas devido ao diâmetro de canal utilizado (1,3mm). É importante ressaltar que os sistemas sônicos e ultrassônicos foram ativados ao mesmo nível da área

infectada em comparação à técnica de laser, a qual ativa a solução irrigadora por vários milímetros em sentido coronal, distante do ponto de contaminação.

O uso de ondas de choque tem chamado a atenção de diversas áreas médicas para tratar doenças relacionadas a biofilmes. Um estudo mostrou que essa técnica é efetiva para desagregar biofilmes de *Staphylococcus aureus* e placa bacteriana em ausência de antimicrobianos (KRESPI; STOODLEY; HALL-STOODLEY, 2008; KRESPI, *et al.* 2011). A desorganização do biofilme pode mudar o estado das bactérias; da agregação até a forma planctônica. Nesse estágio, os microorganismos são muito susceptíveis aos antimicrobianos (KIZHNER, *et al.* 2011).

Comparações entre irrigação ativada por laser e irrigação passiva ultrassônica são limitadas a poucos estudos (DE GROOT, *et al.*, 2009; DE MOOR, *et al.*, 2009; PETERS, *et al.*, 2011). A deposição local de energia como luz ou calor é necessária para induzir cavitação (LAUTERBORN; OHL, 1997) e o fenômeno fotoacústico parece ser o mecanismo de limpeza na interface líquido/dentina (FRENZ; PALTAUF; SCHMIDTKLOIBER, 1996; BLANKEN, *et al.*, 2009; DE GROOT, *et al.*, 2009). Um efeito associado à aplicação de ondas acústicas ou fotoacústicas nos sistemas químicos é chamado de sonoquímica. Isso pode ser definido como a capacidade da energia transportada por ondas acústicas em provocar ou acelerar reações químicas.

Estudos na área industrial mostraram que o ultrassom pode melhorar a capacidade de desinfecção do hipoclorito de sódio (DUCKHOUSE, *et al.*, 2004; ZIFU LI, 2012). Outro estudo mostrou que a reatividade do hipoclorito de sódio aumenta significativamente após a aplicação de laser ou ultrassom (MACEDO, *et al.* 2010). As diferenças significativas da técnica de irrigação assistida por laser em comparação à ultrassônica podem ser devidas aos baixos pulsos do laser (50µs), o que leva a solução irrigadora a lugares distantes do ponto de aplicação. A melhor limpeza da técnica que utiliza laser está em concordância com um estudo

anterior (PETERS, *et al.*, 2011). No entanto, é importante observar que, devido ao fato de que o efeito do hipoclorito de sódio seja um fenômeno dependente do tempo (DEL CARPIO-PEROCHENA, *et al.* 2011), os resultados também podem refletir a existência de uma aceleração do processo de dissolução do biofilme quando a irrigação por laser ou ultrassônica é utilizada.

No entanto, devido às limitadas comparações entre os métodos ultrassônico e fotoacústico, futuros estudos são necessários para o completo entendimento do fenômeno.

6.3 Da capacidade antimicrobiana da medicação endodôntica

Por motivos metodológicos, o estudo foi realizado para testar o efeito isolado dessas medicações endodônticas, embora, na situação clínica, a medicação intracanal seja somente um dos passos para tratar as infecções endodônticas. A fase de controle antimicrobiano também inclui o uso de instrumentação mecânica e a irrigação com soluções antimicrobianas.

Dentre os medicamentos estudados, o hidróxido de cálcio é provavelmente o mais pesquisado na literatura endodôntica (HOLLAND, *et al.*, 1977; SIQUEIRA; LOPES, 1999). Numerosos estudos mostraram que a pasta de hidróxido de cálcio, quando misturada a um veículo inerte, é ineficaz para desinfetar dentina contaminada (HAAPASALO, M.; ORSTAVIK, 1987; ORSTAVIK; HAAPASALO, 1990). Para ser efetiva contra bactérias situadas no interior dos túbulos dentinários, os íons hidroxila devem difundir-se e alcançar níveis suficientes para terem efeito letal. De acordo com estudos anteriores, o efeito alcalino não é tão efetivo para eliminar bactérias na forma de biofilme (DISTEL; HATTON; GILLESPIE, 2002; NAKAJO, *et al.*, 2004; CHAVEZ DE PAZ, *et al.*, 2007). Os resultados do presente estudo são consistentes com os estudos citados. O motivo é que, provavelmente, a

quantidade de íons hidroxila após 1 semana de medicação não seja tão alta para permitir atividade antimicrobiana. Nesse estudo observou-se que o hidróxido de cálcio utilizado em 2 veículos, aquoso ou oleoso, não teve efeito significativo sobre a viabilidade do biofilme. Os mecanismos de inativação desse medicamento parecem ser similares aos resultados encontrados na maior parte das soluções irrigadoras testadas, isto é: componentes orgânicos possuem efeito inativador (PORTENIER, *et al.*, 2001). No entanto, um efeito interessante foi encontrado quando iodofórmio foi adicionado à pasta, propiciando um importante efeito antimicrobiano.

O uso do iodofórmio na Odontologia como antimicrobiano mostrou resultados satisfatórios ao longo dos anos e diversas pastas foram utilizadas como as de Walkhoff, Maisto e a de Maisto e Capurro (BERBERT; BRAMANTE; BERNARDINELI; 1980). A capacidade antimicrobiana da associação de hidróxido de cálcio e iodofórmio tem sido demonstrada por diversos autores (THOMAS, *et al.*, 1994; CWIKLA, *et al.*, 2005; ESTRELA, *et al.*, 2006). O iodofórmio também proporciona radiopacidade à pasta, o que permite verificar o adequado preenchimento do canal radicular. No entanto, os resultados sugerem que a desorganização prévia do biofilme pelo hipoclorito de sódio seja uma condição necessária para melhorar o efeito dos medicamentos intracanais utilizados.

A desinfecção de dentes imaturos é um desafio que requer procedimentos específicos de desinfecção quando comparado ao tratamento endodôntico convencional. Nesse contexto, o uso da pasta triantibiótica tem sido recomendado para o tratamento de dentes com ápice aberto e polpas necrosadas (BANCHS; TROPE, 2004). A clorexidina em gel a 2% tem sido proposta como medicação intracanal devido à sua efetiva ação antimicrobiana (LENET, *et al.*, 2000; GOMES, *et al.*, 2003; DAMETTO, *et al.*, 2005). Entretanto, outros estudos mostraram uma limitada capacidade dessa medicação para eliminar microorganismos (SOUZA FILHO, *et al.*, 2008) (MALKHASSIAN, *et al.*, 2009). No presente estudo, diferentemente dos

resultados encontrados na pasta triantibiótica, a variabilidade de células vivas encontradas na dentina tratada com a clorexidina e o hidróxido de cálcio foi alta. Isso, provavelmente, pode ser explicado novamente pelo efeito neutralizante de substâncias que podem ser encontradas no biofilme, tais como células mortas e matriz de exopolissacarídeo (EPS) (PORTENIER, *et al.*, 2001; PORTENIER, *et al.*, 2006).

A pasta triantibiótica contém em sua fórmula os antibióticos metronidazol, ciprofloxacino e minociclina. Esses antibióticos têm sido empregados na área da Periodontia com o intuito de suprimir a microbiota subgengival como terapia coadjuvante (GREENSTEIN; TONETTI, 2000; QUIRYNEN, *et al.*, 2002). Estudos mostraram a atividade antimicrobiana dessas medicações contra microorganismos orais e a sua capacidade para descontaminar dentina (HOSHINO, *et al.*, 1996; SATO, *et al.*, 1996; WINDLEY, *et al.*, 2005). Nossos resultados mostraram uma melhor capacidade da pasta triantibiótica em eliminar as bactérias do biofilme em comparação a hidróxido de cálcio e clorexidina em gel a 2%.

As medicações antimicrobianas avaliadas (hidróxido de cálcio, clorexidina em gel a 2% e pasta triantibiótica) não conseguiram eliminar 100% das bactérias dentro do biofilme. Portanto, era importante testar se as bactérias residuais poderiam recolonizar o biofilme quimicamente tratado ou não. Para testar essa hipótese, uma avaliação adicional do biofilme tratado foi feita após 24 horas do tratamento, incubando as amostras em meio de cultura (BHI). Os resultados mostraram que a pasta triantibiótica e a clorexidina em gel não aumentaram significativamente o número de bactérias viáveis em comparação ao hidróxido de cálcio. É sabido que a minociclina (derivado da tetraciclina) presente na pasta triantibiótica e a clorexidina possuem efeito de substantividade (BAKER, *et al.*, 1983; BAKER, *et al.*, 1985; LENET, *et al.*, 2000). Tal fato poderia explicar a dificuldade das bactérias residuais em recolonizar os biofilmes tratados com esses antimicrobianos. Por outro lado, a dentina tratada

com hidróxido de cálcio aumentou significativamente a porcentagem de células viáveis de 63,71 para 83,88% após a reincubação da dentina no meio BHI. Esses resultados mostraram que o efeito alcalino do hidróxido de cálcio pode ser neutralizado, e que o biofilme pode aumentar a proporção de células viáveis se novos nutrientes estão disponíveis. Apesar da pasta triantibiótica ter apresentado boa capacidade antimicrobiana, ela apresenta efeitos indesejáveis como tingimento dentinário ocasionado pela minociclina (KIM, *et al.*, 2010). Além disso, uma adequada concentração do antibiótico que evite a toxicidade para as células pluripotenciais da polpa ainda não foi esclarecida (RUPAREL N, *et al.*, 2012). Portanto, existe a necessidade da busca de outras medicações com propriedades similares às da pasta triantibiótica mas que não apresentem os efeitos deletérios associados ao uso dessa medicação.

7 *CONCLUSÕES*

7 CONCLUSÕES

Diante dos resultados obtidos e respeitando-se as limitações da metodologia empregada, pôde-se verificar que:

- 1 - O hipoclorito de sódio e o ácido peracético foram as soluções irrigadoras que apresentaram a maior capacidade antimicrobiana frente ao modelo de estudo utilizado, além de possuir efeito de limpeza.
 - 2 - O uso das técnicas de irrigação ultrassônica passiva e irrigação ativada por laser podem melhorar significativamente a capacidade de limpeza do hipoclorito de sódio.
 - 3 - A pasta triantibiótica e a associação hidróxido de cálcio/iodofórmio foram os medicamentos mais eficazes para a desinfecção da dentina contaminada por biofilmes orais.
-

R*EFERÊNCIAS*

REFERÊNCIAS

- Ahmad M, Pitt Ford TJ, Crum LA. Ultrasonic debridement of root canals: acoustic streaming and its possible role. *J Endod.* 1987;13(10):490-9.
- Arias-Moliz MT, Ferrer-Luque CM, Espigares-Garcia M, Baca P. Enterococcus faecalis biofilms eradication by root canal irrigants. *J Endod.* 2009;35(5):711-4.
- Arweiler NB, Hellwig E, Sculean A, Hein N, Auschill TM. Individual vitality pattern of in situ dental biofilms at different locations in the oral cavity. *Caries Research.* 2004;38(5):442-7.
- Auschill TM, Artweiler NB, Netuschil L, Brex M, Reich E, Sculean A. Spatial distribution of vital and dead microorganisms in dental biofilms. *Archives of Oral Biology.* 2001;46(5):471-6.
- Baker PJ, Evans RT, Coburn RA, Genco RJ. Tetracycline and its derivatives strongly bind to and are released from the tooth surface in active form. *J Periodontol.* 1983;54(10):580-5.
- Baker PJ, Evans RT, Slots J, Genco RJ. Susceptibility of human oral anaerobic bacteria to antibiotics suitable for topical use. *J Clin Periodontol.* 1985;12(3):201-8.
- Banchs F, Trope M. Revascularization of immature permanent teeth with apical periodontitis: new treatment protocol? *J Endod.* 2004;30(4):196-200.
- Barthel CR, Zimmer S, Zilliges S, Schiller R, Gobel UB, Roulet JF. In situ antimicrobial effectiveness of chlorhexidine and calcium hydroxide: gel and paste versus gutta-percha points. *J Endod.* 2002;28(6):427-30.
- Berbert A, Bramante CM, Bernardineli N. *Endodontia Prática.* 1ed, São Paulo: Ed Sarvier, 1980
- Berbert FL, Leonardo MR, Silva LA, Tanomaru Filho M, Bramante CM. Influence of root canal dressings and sealers on repair of apical periodontitis after endodontic treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2002;93(2):184-9.
- Bhuva B, Patel S, Wilson R, Niazi S, Beighton D, Mannocci F. The effectiveness of passive ultrasonic irrigation on intraradicular Enterococcus faecalis biofilms in extracted single-rooted human teeth. *Int Endod J.* 2010; 43(3):241-50.
-

Blanken J, De Moor RJG, Meire M, Verdaasdonk R. Laser Induced Explosive Vapor and Cavitation Resulting in Effective Irrigation of the Root Canal. Part 1: A Visualization Study. *Lasers in Surgery and Medicine*. 2009;41(7):514-9.

Brito PR, Souza LC, Machado de Oliveira JC, Alves FR, De-Deus G, Lopes HP, et al. Comparison of the effectiveness of three irrigation techniques in reducing intracanal *Enterococcus faecalis* populations: an in vitro study. *J Endod*. 2009;35(10):1422-7.

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

Burleson A, Nusstein J, Reader A, Beck M. The in vivo evaluation of hand/rotary/ultrasound instrumentation in necrotic, human mandibular molars. *J Endod*. 2007;33(7):782-7.

Bystrom A, Claesson R, Sundqvist G. The antibacterial effect of camphorated paramonochlorophenol, camphorated phenol and calcium hydroxide in the treatment of infected root canals. *Endod Dent Traumatol*. 1985;1(5):170-5.

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.

Chambless JD, Hunt SM, Stewart PS. A three-dimensional computer model of four hypothetical mechanisms protecting biofilms from antimicrobials. *Appl Environ Microbiol*. 2006;72(3):2005-13.

Chavez de Paz LEC, Dahlen G, Molander A, Moller A, Bergenholtz G. Bacteria recovered from teeth with apical periodontitis after antimicrobial endodontic treatment. *International Endodontic Journal*. 2003;36(7):500-8.

Chavez de Paz LE. Image analysis software based on color segmentation for characterization of viability and physiological activity of biofilms. *Appl Environ Microbiol*. 2009;75(6):1734-9.

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

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

Chen X, Stewart PS. Chlorine penetration into artificial biofilm is limited by a reaction-diffusion interaction. *Environmental Science & Technology*. 1996;30(6):2078-83.

Chow TW. Mechanical effectiveness of root canal irrigation. *J Endod*. 1983;9(11):475-9.

Chu FC, Tsang CS, Chow TW, Samaranayake LP. Identification of cultivable microorganisms from primary endodontic infections with exposed and unexposed pulp space. *J Endod*. 2005;31(6):424-9.

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

Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*. 1999;284(5418):1318-22.

Cwikla SJ, Belanger M, Giguere S, Progulske-Fox A, Vertucci FJ. Dentinal tubule disinfection using three calcium hydroxide formulations. *J Endod*. 2005;31(1):50-2.

Dametto FR, Ferraz CC, Gomes BP, Zaia AA, Teixeira FB, de Souza-Filho FJ. In vitro assessment of the immediate and prolonged antimicrobial action of chlorhexidine gel as an endodontic irrigant against *Enterococcus faecalis*. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2005;99(6):768-72.

de Gregorio C, Estevez R, Cisneros R, Paranjpe A, Cohenca N. Efficacy of different irrigation and activation systems on the penetration of sodium hypochlorite into simulated lateral canals and up to working length: an in vitro study. *J Endod*. 2010 36(7):1216-21.

de Groot SD, Verhaagen B, Versluis M, Wu MK, Wesselink PR, van der Sluis LWM. Laser-activated irrigation within root canals: cleaning efficacy and flow visualization. *International Endodontic Journal*. 2009;42(12):1077-83.

De Moor RJG, Blanken J, Meire M, Verdaasdonk R. Laser Induced Explosive Vapor and Cavitation Resulting in Effective Irrigation of the Root Canal. Part 2: Evaluation of the Efficacy. *Lasers in Surgery and Medicine*. 2009;41(7):520-3.

De-Deus G, Zehnder M, Reis C, Fidel S, Fidel RA, Galan J, Jr., et al. Longitudinal co-site optical microscopy study on the chelating ability of etidronate and EDTA using a comparative single-tooth model. *J Endod*. 2008;34(1):71-5.

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

Deng DM, ten Cate JM. Demineralization of dentin by *Streptococcus mutans* biofilms grown in the constant depth film fermentor. *Caries Res.* 2004;38(1):54-61.

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

DiVito E, Peters OA, Olivi G. Effectiveness of the erbium:YAG laser and new design radial and stripped tips in removing the smear layer after root canal instrumentation. *Lasers Med Sci.* 2012; 27(2):273-80.

Dodds MG, Grobe KJ, Stewart PS. Modeling biofilm antimicrobial resistance. *Biotechnol Bioeng.* 2000;68(4):456-65.

Duckhouse H, Mason TJ, Phull SS, Lorimer JP. The effect of sonication on microbial disinfection using hypochlorite. *Ultrasonics Sonochemistry.* 2004;11(3-4):173-6.

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

Estrela C, Estrela CR, Hollanda AC, Decurcio Dde A, Pecora JD. Influence of iodoform on antimicrobial potential of calcium hydroxide. *J Appl Oral Sci.* 2006;14(1):33-7.

Ferrer-Luque CM, Arias-Moliz MT, Gonzalez-Rodriguez MP, Baca P. Antimicrobial activity of maleic acid and combinations of cetrinimide with chelating agents against *Enterococcus faecalis* biofilm. *J Endod.* 2010; 36(10):1673-5.

Frenz M, Paltauf G, SchmidtKloiber H. Laser-generated cavitation in absorbing liquid induced by acoustic diffraction. *Physical Review Letters.* 1996;76(19):3546-9.

George R, Meyers IA, Walsh LJ. Laser Activation of Endodontic Irrigants with Improved Conical Laser Fiber Tips for Removing Smear Layer in the Apical Third of the Root Canal. *Journal of Endodontics.* 2008;34(12):1524-7.

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

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*. 2003;36(4):267-75.

Greenstein G, Tonetti M. The role of controlled drug delivery for periodontitis. The Research, Science and Therapy Committee of the American Academy of Periodontology. *J Periodontol*. 2000;71(1):125-40.

Haapasalo HK, Siren EK, Waltimo TM, Orstavik D, Haapasalo MP. Inactivation of local root canal medicaments by dentine: an in vitro study. *Int Endod J*. 2000;33(2):126-31.

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

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

Haapasalo M, Shen Y, Qian W, Gao Y. Irrigation in endodontics. *Dent Clin North Am*. 2010;54(2):291-312.

Hellman AN, Rau KR, Yoon HH, Bae S, Palmer JF, Phillips KS, et al. Laser-induced mixing in microfluidic channels. *Analytical Chemistry*. 2007;79(12):4484-92.

Holland R, de Mello W, Nery MJ, Bernabe PF, de Souza V. Reaction of human periapical tissue to pulp extirpation and immediate root canal filling with calcium hydroxide. *J Endod*. 1977;3(2):63-7.

Holland R, Otoboni Filho JA, de Souza V, Nery MJ, Bernabe PF, Dezan E, Jr. A comparison of one versus two appointment endodontic therapy in dogs' teeth with apical periodontitis. *J Endod*. 2003;29(2):121-4.

Hope CK, Wilson M. Analysis of the effects of chlorhexidine on oral biofilm vitality and structure based on viability profiling and an indicator of membrane integrity. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004;48(5):1461-8.

Hoshino E, Kurihara-Ando N, Sato I, Uematsu H, Sato M, Kota K, et al. In-vitro antibacterial susceptibility of bacteria taken from infected root dentine to a mixture of ciprofloxacin, metronidazole and minocycline. *Int Endod J*. 1996;29(2):125-30.

J.W Blanken RMV. Cavitation as a working mechanism of the Er, Cr: YSGG laser in endodontics: a visualization study. *Jounal of Oral Laser Applications*. 2007;7(2):97-106.

Jiang LM, Verhaagen B, Versluis M, van der Sluis LWM. Evaluation of a Sonic Device Designed to Activate Irrigant in the Root Canal. *J Endod*. 2010;36(1):143-6.

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

Johnson M, Sidow SJ, Looney SW, Lindsey K, Niu LN, Tay FR. Canal and Isthmus Debridement Efficacy Using a Sonic Irrigation Technique in a Closed-canal System. *J Endod*. 2012;38(9):1265-8.

Kim JH, Kim Y, Shin SJ, Park JW, Jung IY. Tooth discoloration of immature permanent incisor associated with triple antibiotic therapy: a case report. *J Endod*. 2010; 36(6):1086-91.

Kizhner V, Krespi YP, Hall-Stoodley L, Stoodley P. Laser-generated shockwave for clearing medical device biofilms. *Photomed Laser Surg*. 2011;29(4):277-82.

Krespi YP, Kizhner V, Nistico L, Hall-Stoodley L, Stoodley P. Laser disruption and killing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* biofilms. *Am J Otolaryngol*. 2011;32(3):198-202.

Krespi YP, Stoodley P, Hall-Stoodley L. Laser disruption of biofilm. *Laryngoscope*. 2008;118(7):1168-73.

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

Lauterborn W, Ohl CD. Cavitation bubble dynamics. *Ultrasonics Sonochemistry*. 1997;4(2):65-75.

Lenet BJ, Komorowski R, Wu XY, Huang J, Grad H, Lawrence HP, et al. Antimicrobial substantivity of bovine root dentin exposed to different chlorhexidine delivery vehicles. *J Endod.* 2000;26(11):652-5.

Leonardo MR, da Silva LA, Tanomaru Filho M, Bonifacio KC, Ito IY. In vitro evaluation of antimicrobial activity of sealers and pastes used in endodontics. *J Endod.* 2000;26(7):391-4.

Leonardo MR, Hernandez ME, Silva LA, Tanomaru-Filho M. Effect of a calcium hydroxide-based root canal dressing on periapical repair in dogs: a histological study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2006;102(5):680-5.

Lottanti S, Gautschi H, Sener B, Zehnder M. Effects of ethylenediaminetetraacetic, etidronic and peracetic acid irrigation on human root dentine and the smear layer. *Int Endod J.* 2009;42(4):335-43.

Love RM, Jenkinson HF. Invasion of dentinal tubules by oral bacteria. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2002;13(2):171-83.

Macedo RG, Wesselink PR, Zaccheo F, Fanali D, Van Der Sluis LW. Reaction rate of NaOCl in contact with bovine dentine: effect of activation, exposure time, concentration and pH. *Int Endod J.* 2010; 43(12):1108-15.

Malkhassian G, Manzur AJ, Legner M, Fillery ED, Manek S, Basrani BR, et al. Antibacterial efficacy of MTAD final rinse and two percent chlorhexidine gel medication in teeth with apical periodontitis: a randomized double-blinded clinical trial. *J Endod.* 2009;35(11):1483-90.

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

Matsumoto H, Yoshimine Y, Akamine A. Visualization of Irrigant Flow and Cavitation Induced by Er:YAG Laser within a Root Canal Model. *Journal of Endodontics.* 2011;37(6):839-43.

McGurkin-Smith R, Trope M, Caplan D, Sigurdsson A. Reduction of intracanal bacteria using GT rotary instrumentation, 5.25% NaOCl, EDTA, and Ca(OH)₂. *J Endod.* 2005;31(5):359-63.

Mulcahy H, Charron-Mazenod L, Lewenza S. Extracellular DNA chelates cations and induces antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *PLoS Pathog.* 2008;4(11):e1000213.

Nair PN. Apical periodontitis: a dynamic encounter between root canal infection and host response. *Periodontol 2000.* 1997;13:121-48.

Nair PN. On the causes of persistent apical periodontitis: a review. *Int Endod J.* 2006;39(4):249-81.

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.

Nakajo K, Nakazawa F, Iwaku M, Hoshino E. Alkali-resistant bacteria in root canal systems. *Oral Microbiol Immunol.* 2004;19(6):390-4.

Nelson-Filho P, Leonardo MR, Silva LA, Assed S. Radiographic evaluation of the effect of endotoxin (LPS) plus calcium hydroxide on apical and periapical tissues of dogs. *J Endod.* 2002;28(10):694-6.

Norrington DW, Ruby J, Beck P, Eleazer PD. Observations of biofilm growth on human dentin and potential destruction after exposure to antibiotics. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2008;105(4):526-9.

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

Pappen FG, Shen Y, Qian W, Leonardo MR, Giardino L, Haapasalo M. In vitro antibacterial action of Tetraclean, MTAD and five experimental irrigation solutions. *Int Endod J.* 43(6):528-35.

Parsek MR, Singh PK. Bacterial biofilms: an emerging link to disease pathogenesis. *Annu Rev Microbiol.* 57: 677-701.

Paque F, Laib A, Gautschi H, Zehnder M. Hard-tissue debris accumulation analysis by high-resolution computed tomography scans. *J Endod.* 2009;35(7):1044-7.

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

Peel CS, Fang X, Ahmad SR. Dynamics of laser-induced cavitation in liquid. *Applied Physics a-Materials Science & Processing*. 2011;103(4):1131-8.

Peters OA, Bardsley S, Fong J, Pandher G, DiVito E. Disinfection of Root Canals with Photon-initiated Photoacoustic Streaming. *Journal of Endodontics*. 2011;37(7):1008-12.

Portenier I, Haapasalo H, Orstavik D, Yamauchi M, Haapasalo M. Inactivation of the antibacterial activity of iodine potassium iodide and chlorhexidine digluconate against *Enterococcus faecalis* by dentin, dentin matrix, type-I collagen, and heat-killed microbial whole cells. *J Endod*. 2002;28(9):634-7.

Portenier I, Haapasalo H, Rye A, Waltimo T, Orstavik D, Haapasalo M. Inactivation of root canal medicaments by dentine, hydroxylapatite and bovine serum albumin. *Int Endod J*. 2001;34(3):184-8.

Portenier I, Waltimo T, Orstavik D, Haapasalo M. Killing of *Enterococcus faecalis* by MTAD and chlorhexidine digluconate with or without cetrimide in the presence or absence of dentine powder or BSA. *J Endod*. 2006;32(2):138-41.

Quirynen M, Teughels W, De Soete M, van Steenberghe D. Topical antiseptics and antibiotics in the initial therapy of chronic adult periodontitis: microbiological aspects. *Periodontol* 2000. 2002;28:72-90.

Rajasingham R, Ng YL, Knowles JC, Gulabivala K. The effect of sodium hypochlorite and ethylenediaminetetraacetic acid irrigation, individually and in alternation, on tooth surface strain. *Int Endod J*. 43(1):31-40.

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

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

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

Ricucci D, Siqueira JF, Jr. Recurrent apical periodontitis and late endodontic treatment failure related to coronal leakage: a case report. *J Endod*. 2011; 37(8):1171-5.

Roberts ME, Stewart PS. Modelling protection from antimicrobial agents in biofilms through the formation of persister cells. *Microbiology-Sgm*. 2005;151:75-80.

Ruparel N TF, Ferraz C, Diogenes A. Direct Effect of Intracanal Medicaments on Survival of Stem Cells of the Apical Papilla. *J Endodon*. 2012;38:1372-5.

S. Stojicic YSWQ, B. Johnson, M. Haapasalo. Antibacterial and smear layer removal ability of a novel irrigant QMiX. *Int Endod J*. 2012;45:363-71.

Sato I, Ando-Kurihara N, Kota K, Iwaku M, Hoshino E. Sterilization of infected root-canal dentine by topical application of a mixture of ciprofloxacin, metronidazole and minocycline in situ. *Int Endod J*. 1996;29(2):118-24.

Seet AN, Zilm PS, Gully NJ, Cathro PR. Qualitative comparison of sonic or laser energisation of 4% sodium hypochlorite on an *Enterococcus faecalis* biofilm grown in vitro. *Aust Endod J*. 2012; 38(3):100-6.

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

Sevimay S, Kalayci A, Yilmaz S. In vitro diffusion of hydroxyl ions through root dentine from various calcium hydroxide medicaments. *J Oral Rehabil*. 2003;30(10):1047-51.

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

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

Silva L, Nelson-Filho P, Leonardo MR, Rossi MA, Pansani CA. Effect of calcium hydroxide on bacterial endotoxin in vivo. *J Endod*. 2002;28(2):94-8.

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., Batista MM, Fraga RC, de Uzeda M. Antibacterial effects of endodontic irrigants on black-pigmented gram-negative anaerobes and facultative bacteria. *J Endod.* 1998;24(6):414-6.

Siqueira JF, Jr., de Uzeda M. Disinfection by calcium hydroxide pastes of dentinal tubules infected with two obligate and one facultative anaerobic bacteria. *J Endod.* 1996;22(12):674-6.

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 JF, Jr., Lopes HP. Mechanisms of antimicrobial activity of calcium hydroxide: a critical review. *Int Endod J.* 1999;32(5):361-9.

Siqueira JF, Jr., Rocas IN. Clinical implications and microbiology of bacterial persistence after treatment procedures. *J Endod.* 2008;34(11):1291-301 e3.

Siqueira JF, Jr., Rocas IN, Riche FN, Provenzano JC. Clinical outcome of the endodontic treatment of teeth with apical periodontitis using an antimicrobial protocol. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2008;106(5):757-62.

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

Soares JA, de Carvalho MAR, Santos SMC, Mendonca RMC, Ribeiro-Sobrinho AP, Brito M, et al. Effectiveness of Chemomechanical Preparation with Alternating Use of Sodium Hypochlorite and EDTA in Eliminating Intracanal *Enterococcus faecalis* Biofilm. *J Endod.* 2010;36(5):894-8.

Souza Filho FJ, Soares AJ, Vianna ME, Zaia AA, Ferraz CC, Gomes BPFA. Antimicrobial effect and pH of chlorhexidine gel and calcium hydroxide alone and associated with other materials. *Braz Dent J.* 2008; 19(1):28-33

Stewart PS. Mechanisms of antibiotic resistance in bacterial biofilms. *Int J Med Microbiol.* 2002;292(2):107-13.

Tanomaru JM, Leonardo MR, Tanomaru Filho M, Bonetti Filho I, Silva LA. Effect of different irrigation solutions and calcium hydroxide on bacterial LPS. *Int Endod J*. 2003;36(11):733-9.

Tello-Barbaran J, Nakata HM, Salcedo-Moncada D, Bramante CM, Ordinola-Zapata R. The antimicrobial effect of iodine-potassium iodide after cleaning and shaping procedures in mesial root canals of mandibular molars. *Acta Odontol Latinoam*. 23(3):244-7.

Thomas AM, Chandra S, Pandey RK. Elimination of infection in pulpectomized deciduous teeth: a short-term study using iodoform paste. *J Endod* 1994;20:233-35.

Torabinejad M, Shabahang S, Aprecio RM, Kettering JD. The antimicrobial effect of MTAD: an in vitro investigation. *J Endod*. 2003;29(6):400-3.

Tote K, Horemans T, Vanden Berghe D, Maes L, Cos P. Inhibitory effect of biocides on the viable masses and matrices of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Appl Environ Microbiol*. 2010; 76(10):3135-42.

Uroz-Torres D, Gonzalez-Rodriguez MP, Ferrer-Luque CM. Effectiveness of the EndoActivator System in removing the smear layer after root canal instrumentation. *J Endod*. 36(2):308-11.

Vera J, Siqueira JF, Jr., Ricucci D, Loghin S, Fernandez N, Flores B, et al. One- versus two-visit endodontic treatment of teeth with apical periodontitis: a histobacteriologic study. *J Endod*. 2012; 38(8):1040-52.

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.

Violich DR, Chandler NP. The smear layer in endodontics - a review. *Int Endod J*. 2010; 43(1):2-15.

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

Waltimo T, Trope M, Haapasalo M, Orstavik D. Clinical efficacy of treatment procedures in endodontic infection control and one year follow-up of periapical healing. *J Endod*. 2005;31(12):863-6.

Wang CS, Arnold RR, Trope M, Teixeira FB. Clinical efficiency of 2% chlorhexidine gel in reducing intracanal bacteria. *J Endod.* 2007;33(11):1283-9.

Wang Z, Shen Y, Haapasalo M. Effectiveness of endodontic disinfecting solutions against young and old *Enterococcus faecalis* biofilms in dentin canals. *J Endod.* 2012; 38(10):1376-9.

Williams I, Venables WA, Lloyd D, Paul F, Critchley I. The effects of adherence to silicone surfaces on antibiotic susceptibility in *Staphylococcus aureus*. *Microbiology.* 1997;143 (Pt 7):2407-13.

Windley W, 3rd, Teixeira F, Levin L, Sigurdsson A, Trope M. Disinfection of immature teeth with a triple antibiotic paste. *J Endod.* 2005;31(6):439-43.

Xavier JB, Picioreanu C, Rani SA, van Loosdrecht MC, Stewart PS. Biofilm-control strategies based on enzymic disruption of the extracellular polymeric substance matrix--a modelling study. *Microbiology.* 2005;151(Pt 12):3817-32.

Zamany A, Safavi K, Spangberg LS. The effect of chlorhexidine as an endodontic disinfectant. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2003;96(5):578-81.

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

Zhang K, Kim YK, Cadenaro M, Bryan TE, Sidow SJ, Loushine RJ, et al. Effects of different exposure times and concentrations of sodium hypochlorite/ethylenediaminetetraacetic acid on the structural integrity of mineralized dentin. *J Endod.* 2010; 36(1):105-9.

Zifu Li XZ, Furong Deng, Xin Jin, Hao Wu. Experimental Study on Secondary Effluent Disinfection with Ultrasound and Chlorine. *Advanced Materials Research.* 2012;383-390:3786-91.

Anexos

Anexo A. Comitê de Ética

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

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

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

Processo nº 134/2010

Bauru, 3 de novembro de 2010.

Senhor Professor,

O projeto de pesquisa encaminhado a este Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos, denominado **"Efeito das soluções químicas e dos meios físicos utilizados na irrigação endodôntica na dentina infectada por biofilmes orais"**, de autoria de Ronald Ordinola Zapata, sob sua orientação, foi enviado ao relator para avaliação.

Na reunião de 27 de outubro de 2010 o parecer do relator, **aprovando o projeto**, foi aceito pelo Comitê, considerando que não existem infrações éticas pendentes.

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

Atenciosamente,

Prof. Dr. Flávio Augusto Cardoso de Faria
Coordenador

Prof. Dr. Clóvis Monteiro Bramante

Docente do Departamento de Dentística, Endodôntia e Materiais Dentários.

Anexo B. Lista de publicações associadas a esta teses.

R. Ordinola-Zapata, C. M. Bramante, B. Cavenago, M. S. Graeff, I. Gomes de Moraes, M. Marciano and M. A. Duarte

Title: Antimicrobial effect of endodontic solutions used as final irrigants on a dentine biofilm model

Journal: Int Endod J 2012 **Volume:** 45 **Issue:** 2 **Pages:** 162-8

R. Ordinola-Zapata, C. M. Bramante, R. Brandao Garcia, F. Bombarda de Andrade, N. Bernardineli, I. Gomes de Moraes and M. A. Duarte

Title: The antimicrobial effect of new and conventional endodontic irrigants on intra-orally infected dentin

Journal: Acta Odontol Scand 2013 **Volume:** 71 **Issue:** 3-4 **Pages:** 424-31

R. Ordinola-Zapata, C. M. Bramante, P. G. Minotti, B. C. Cavenago, R. B. Garcia, N. Bernardineli, D. E. Jaramillo and M. A. Hungaro Duarte

Title: Antimicrobial activity of triantibiotic paste, 2% chlorhexidine gel, and calcium hydroxide on an intraoral-infected dentin biofilm model

Journal: J Endod 2013 **Volume:** 39 **Issue:** 1 **Pages:** 115-8