

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU

EVELYN GIULIANA VELASQUEZ ESPEDILLA

**Análise topográfica de biofilmes tratados com diferentes irrigantes
sobre substratos também tratados, em Microscopia de Força
Atômica**

**Topographic analysis of biofilms treated with different irrigants on
substrates also treated in Atomic Force Microscopy**

BAURU

2020

EVELYN GIULIANA VELASQUEZ ESPEDILLA

**Análise topográfica de biofilmes tratados com diferentes irrigantes
sobre substratos também tratados, em Microscopia de Força
Atômica**

**Topographic analysis of biofilms treated with different irrigants on
substrates also treated in Atomic Force Microscopy**

Dissertação constituída por artigo apresentada à Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências no Programa de Ciências Odontológicas Aplicadas, na área de concentração Endodontia.

Orientador: Profa. Dra. Flaviana Bombarda de Andrade

Versão Corrigida

BAURU

2020

Espedilla, Evelyn Giuliana Velásquez

Análise topográfica de biofilmes tratados com diferentes irrigantes sobre substratos também tratados em Microscopia de Força Atômica / Evelyn Giuliana Velásquez Espedilla. -- Bauru, 2020.

67p.: il.; 31 cm.

Dissertação de Mestrado-- Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, 2020.

Orientador: Profa. Dra. Flaviana Bombarda de Andrade

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

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

Assinatura:

Data:

Comitê de Ética da FOB-USP
Protocolo nº: 22819019.0.0000.5417
Data:

FOLHA DE APROVAÇÃO

DEDICATÓRIA

Primeiramente a **Deus**, por me guiar neste caminho da vida, por que sem Ele não teria chegado até aqui.

Aos meus pais **Hernán Velásquez Velásquez** e **Amelia Espedilla Ancco** pelo seu amor incondicional, por ser meu apoio sempre. Obrigada pelo seu carinho e paciência, não encontro palavras para dizer o que eu estou sentindo neste momento.

Para vocês com todo meu amor e carinho

AGRADECIMENTOS

A minha querida orientadora **Profa. Dra. Flaviana Bombarda de Andrade** pela orientação, confiança e carinho. A senhora é um exemplo de honestidade e humildade. Obrigada pelos ensinamentos daquele mundo complexo da Microbiologia.

Aos excelentes professores da disciplina de Endodontia que tive a oportunidade de conhecer, **Prof. Dr. Clovis Monteiro Bramante, Prof. Dr. Ivaldo Gomes de Moraes, Prof. Dr. Roberto Brandão Garcia, Prof. Dr. Norberti Bernardineli, Prof. Dr. Rodrigo Vivan Ricci e Prof. Dr. Marco Antônio Hungaro Duarte, obrigada.**

A minha querida turma do mestrado, **Jéssica, Gabriela, Pedro e Roberto** obrigada pelo seu carinho e amizade, levarei vocês no meu coração para sempre.

Aos funcionários do departamento de Endodontia, **Suely Regina Bettio e Edimauro de Andrade**, obrigada pelo seu carinho e ajuda.

Ao **Prof. Dr. Allan Victor Ribeiro** pela ajuda fornecida nesta conquista.

A minha querida amiga **Mariciel Rosário Cárdenas Cuellar**, só posso agradecer a Deus por me colocar uma pessoa maravilhosa quem me acolheu e deu uma amizade sincera. Obrigada por estar ao meu lado nesta conquista, levarei você no meu coração.

A meu amigo **Victor Feliz**, uma pessoa que conquista com o seu sorriso e pela sua companhia sincera, obrigada pelo seu carinho, eu desejo tudo de bom para você.

Agradeço ao **Instituto Federal de São Paulo, IFSP Câmpus Birigui**, onde foram realizadas as leituras no AFM

Agradeço à **Faculdade de Odontologia de Bauru – USP** e a **CAPES**

O presente trabalho foi realizado com o apoio da **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES)** – Código de Financiamento 001

RESUMO

RESUMO

Avaliou-se por meio da Microscopia de força atômica (AFM) a topografia de dentina radicular e biofilmes de *Enterococcus faecalis*, irrigados com soluções de uso endodôntico. Foram obtidos blocos de dentina da raiz de caninos humanos com o uso de uma trefina para osso e polidos até a espessura de 1 mm e esterilizados em autoclave. Foi reativada a cepa de *E. faecalis* (ATCC 29212) em culturas de 24h para atingir a concentração adequada de 12×10^8 UFC/mL. Os blocos de dentina foram divididos em dois experimentos diferenciados e com quatro grupos cada um quanto aos irrigantes (n=6): G1 (EDTA 17%), G2 (NaOCl 2,5%); G3 (NaOCl 2,5% + EDTA 17%), G4 (NaOCl 5% + HEBP 18%). As avaliações em AFM foram dispostas em duas etapas: Etapa I: primeira leitura da dentina, segunda leitura com o inóculo bacteriano e terceira leitura com o tratamento do biofilme pelas soluções. Etapa II: primeira leitura da dentina, segunda leitura do tratamento da superfície com as soluções e terceira leitura com o inóculo sobre a dentina radicular. As imagens foram avaliadas após padronização pelo teste Kappa por três examinadores. A análise estatística entre os grupos foi realizada com o teste de Kruskal-Wallis seguido de Dunn, entre as etapas o teste de Mann-Whitney e na avaliação da rugosidade foi empregado o teste ANOVA seguido de Tukey. Na etapa I os grupos mostraram diferenças entre si, sendo que o G2 e G3 demonstraram maior remoção de biofilme quando comparados ao G1 e na etapa II, o G3 mostrou menor adesão de *E. faecalis* após tratamento de superfície. A rugosidade do substrato também foi avaliada, demonstrando-se maior no grupo G3, diferente estatisticamente de G2, denotando a influência do agente quelante EDTA nesta propriedade. Concluiu-se que o tipo de solução irrigadora e a mistura delas é um fator importante para remover uma quantidade significativa de micro-organismos, como também podem alterar a superfície da dentina tratada dificultando a adesão dos mesmos. Dentre as soluções testadas, a associação NaOCl e EDTA eliminou maior quantidade de biofilmes formados assim como dificultou a adesão das bactérias sobre a dentina radicular.

Palavras chave: Adesão celular, *Enterococcus faecalis*, Microscopia de força atômica, irrigantes do canal radicular

ABSTRACT

ABSTRACT

The topography of root dentin and *Enterococcus faecalis* biofilms, irrigated with endodontic solutions, were evaluated using atomic force microscopy (AFM). Dentin blocks were obtained from the root of human canines using a bone trephine and polished to a thickness of 1 mm and sterilized in an autoclave. The strain of *E. faecalis* (ATCC 29212) was reactivated in 24h cultures to reach the appropriate concentration of 12×10^8 CFU/mL. Dentin blocks were divided into two different experiments with four groups each with regard to irrigants (n=6): G1 (17% EDTA), G2 (2.5% NaOCl); G3 (2.5% NaOCl + 17% EDTA), G4 (5% NaOCl + 18% HEBP). The evaluations in AFM were arranged in two stages. Stage I: first reading of the dentin, second reading with the bacterial inoculum and third reading with the treatment of the biofilm by the solutions. Stage II: first reading of the dentin, second reading of the surface treatment with the solutions and third reading with the inoculum over the treated substrate. The images were evaluated after standardization by the Kappa test by three examiners. The statistical analysis between the groups was performed with the Kruskal-Wallis test followed by Dunn, between the experiments the Mann-Whitney test and in the roughness the ANOVA test was used followed by Tukey test. In stage I the groups showed differences between them, with G2 and G3 showing greater removal of biofilm when compared to G1 and in stage II, G3 showed less adhesion of *E. faecalis* after surface treatment. The substrate roughness was also evaluated, being higher in the G3 group, statistically different from G2, showing the influence of the EDTA chelating agent in this property. It was concluded that the type of irrigation solution and the mixture of them is an important factor to remove a significant amount of microorganisms as it can also change the surface of the treated dentin making them difficult to adhere. Among the tested solutions, the association of NaOCl and EDTA eliminated greater amount of formed biofilms, as difficult the adhesion of bacteria on the root dentin.

Keywords: Cell adhesion, *Enterococcus faecalis*, Atomic force microscopy, root canal irrigants

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Imagens representativas em AFM (3D) da etapa I. A - G1: EDTA 17%; B - G2: NaOCl 2,5%; C - G3: NaOCl 2,5% + EDTA 17%; D - G4: NaOCl 5% + HEBP 18%..... 43
- Figura 2:** Imagens representativas em AFM (3D) da etapa II. A - G1: EDTA 17%; B - G2: NaOCl 2,5%; C - G3: NaOCl 2,5% + EDTA 17%; D - G4: NaOCl 5% + HEBP 18%..... 44
- Figura 3:** Imagens representativas em AFM (3D) quanto a rugosidade da dentina. A - G1: EDTA 17%; B - G2: NaOCl 2,5%; C - G3: NaOCl 2,5% + EDTA 17%; D - G4: NaOCl 5% + HEBP 18%..... 45
-
-

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1:** Valores de mediana (Me), mínimo e máximo dos escores da proliferação bacteriana visível nas diferentes etapas do tratamento (teste estatístico de Mann-Whitney) 40
- Tabela 2:** Valores medianos (Me), mínimos e máximos (mín-max) dos escores quanto a proliferação bacteriana visível em cada um dos grupos sob diferentes tratamentos (testes estatísticos Kruskal-Wallis seguido de Dunn)..... 41
- Tabela 3:** Valores de média (M) e desvio padrão (DP) quanto a rugosidade do substrato (nm) 42
-
-

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	13
2	ARTIGO.....	19
3	DISCUSSÃO.....	49
4	CONCLUSÕES.....	55
	REFERÊNCIAS	59
	APÊNDICE	67

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

Os microrganismos ocupam um papel importante na doença pulpar ou periapical, podendo ser encontrados na complexa anatomia dos canais radiculares, sendo um dos causantes do fracasso do tratamento endodôntico (Peters *et. al* 2001). A adesão destes microrganismos a uma superfície é muito importante para a formação de biofilme (Razatos *et. al* 1998) , desta forma, ao se encontrarem com meios adequados, tem a capacidade de criar uma comunidade estável e reprodutível (Chavez de Paz *et. al* 2012), posteriormente resultando em um biofilme estruturado (Kishen *et. al* 2006).

O biofilme resulta de um processo que envolve várias etapas e mecanismos complexos. Os microrganismos, ao entrarem em contato com uma superfície sólida, realizam uma serie de interações mediadas por forças de van der Waals e forças eletrostáticas (Razatos *et. al* 1998), tais forças são movidas por propriedades físico-químicas (reação ácido-base) do substrato e superfície bacteriana (Busscher *et. al* 1998; Busscher *et. al* 1998), ocorrendo, após um período de tempo, uma união irreversível com a agregação e produção de matriz de exopolissacarídeos (EPS) o que fortalece a adesão (Razatos *et. al* 1998).

Diversos autores pesquisaram quais microrganismos são achados com frequência no sistema de canais radiculares (Siqueira *et. al* 2003). *Enterococcus faecalis* é uma bactéria oportunista do tipo coco Gram-positiva anaeróbia facultativa, e um dos microrganismos comumente encontrado em casos de lesões periapicais persistentes relacionadas ao canal radicular (Kayaoglu *et. al* 2005). Os fatores de virulência principais são a capacidade de *E. faecalis* de sobreviver em pH alcalino (Appelbe *et. al* 2007), proliferação em profundidade nos túbulos dentinários e multiplicação utilizando poucos nutrientes. Esses microrganismos também tem a capacidade de proliferar em diversos substratos como dentina bovina, guta-percha, discos de hidroxiapatita e dentina humana (Guerreiro-Tanumaru *et. al* 2013).

No entanto, a problemática de conseguir um ambiente sem bactérias dentro do sistema de canais radiculares é ainda um desafio, porém, diversas soluções são pesquisadas para obter um irrigante para eliminação dos microrganismos, que ficam após instrumentação em uma porcentagem de 30% até 60% (Neves *et. al* 2016). O

uso de irrigantes na terapia endodôntica tem como principal objetivo eliminar o tecido pulpar residual, bactérias e detritos dentinários durante a instrumentação. Assim, a irrigação é um complemento fundamental durante o preparo biomecânico e o uso dessas substâncias promove a limpeza e desinfecção do sistema de canais radiculares (Gu *et. al* 2017). Ressalta-se dentre o uso das soluções irrigadoras, o hipoclorito de sódio (NaOCl) com várias vantagens, destacando a dissolução de tecido orgânico e efeito antisséptico (Siqueira *et. al* 2000). Porém, esta substância não apresenta eficácia nos componentes inorgânicos da denominada camada de *smear layer*. Para eliminação dessa camada é necessário o uso de quelantes como o ácido etilenodiaminotetraacético (EDTA) (Torabinejad *et. al* 2003; Scelza *et. al* 2004; Kishen *et. al* 2008; Paciornik *et. al* 2007). Outra alternativa que vem sendo pesquisada é o etidronato (HEBP), um quelante fraco e menos agressivo (Arias-Moliz *et. al* 2015). Não obstante, o HEBP é utilizado misturado com NaOCl, e ambos permanecem ativos, sem alteração nas suas propriedades de dissolução de tecidos pulpare e de redução dos debrís dentinários (Tartari *et. al* 2013a; Tartari *et. al* 2013b; Tartari *et. al* 2015; Tartari *et. al* 2018).

No entanto, o uso desses irrigantes não é suficiente para eliminar todos os microrganismos que ficam sequestrados nos túbulos dentinários e sua capacidade de formar biofilme pode continuar proporcionando sobrevivência, sob condições difíceis e de baixa quantidade de nutrientes (Love *et. al* 2001).

Diversos equipamentos fornecem imagens para análise morfológicas e estruturais dos biofilmes presentes no sistema de canais radiculares como: microscopia de luz, microscópio eletrônico de varredura (MEV), microscópio confocal de varredura a laser (MCVL) e a microscopia de força atômica (AFM) (Kishen *et. al* 2006; Zapata *et. al* 2008; Chavez de Paz *et. al* 2009). A microscopia de força atômica (AFM) é uma ferramenta que proporciona imagens topográficas da superfície em forma bi e tridimensionais, em função de uma fina ponta piramidal acoplada a um cantilever em um diâmetro de (100 A 200 μm). Esta ponta pode ser operada em três formas diferentes: contato, não contato e contato intermitente, de modo que, quando a ponta varre a amostra faz um rastreamento da superfície onde as imagens são detectadas, armazenadas e processadas por um computador. Esta leitura realizada pelo AFM é obtida pela deflexão do cantilever e pelas forças de van

der Waals (Worcester *et. al* 1988; Razatos *et. al* 1998; Dorobantu *et. al* 2010; Dorobantu *et. al* 2012; Kreplak *et. al* 2016)

Na literatura científica se observam estudos com microscopia de força atômica que avaliam a topografia da superfície dos substratos como a dentina, quando tratados com irrigantes, obtendo resultados interessantes relacionados ao tempo de exposição aos mesmos (Paciornik *et. al* 2007). Também é estudada a diferença da superfície tratada após uso de soluções irrigadoras quanto à aderência dos microrganismos (De-Deus *et. al* 2006; Kishen *et. al* 2008).

Deste modo, com o uso da Microscopia de Força Atômica como equipamento de análise para a medição e quantificação, objetivou-se mapear os biofilmes de *Enterococcus faecalis* em escala nanométrica, quanto ao tratamento ou não da superfície dentinária radicular com diferentes soluções irrigadoras, bem como o tratamento dos biofilmes com estas soluções.

A hipótese nula testada foi de que não há diferenças significantes quanto à remoção de biofilme pelas diferentes soluções irrigadoras investigadas e também quando utilizados antes do inóculo, as soluções irrigadoras não influenciam a formação do biofilme.

2 ARTIGO

2 ARTIGO

O artigo que compõe esta dissertação foi redigido conforme as normas de publicação da revista *Internacional Endodontic Journal*

Análise topográfica de biofilmes de *Enterococcus faecalis* tratados com diferentes irrigantes sobre substratos também tratados, em Microscopia de Força Atômica

Objetivo: Avaliou-se por meio da Microscopia de força atômica (AFM) a topografia de biofilmes de *Enterococcus faecalis* em dentina radicular, irrigados com soluções de uso endodôntico. **Metodologia:** Foram obtidos blocos de dentina da raiz de caninos humanos com o uso de uma trefina para osso e polidos até a espessura de 1 mm e esterilizados em autoclave. Foi reativada a cepa de *E. faecalis* (ATCC 29212) em culturas de 24h para atingir a concentração adequada de 12×10^8 UFC/mL. Os blocos de dentina radicular foram divididos em dois experimentos diferenciados e com quatro grupos cada um quanto aos irrigantes (n=6): G1 (EDTA 17%), G2 (NaOCl 2,5%); G3 (NaOCl 2,5% + EDTA 17%), G4 (NaOCl 5% + HEBP 18%). As avaliações em AFM foram dispostas em duas etapas: Etapa I: primeira leitura da dentina, segunda leitura com o inóculo bacteriano e terceira leitura com o tratamento do biofilme pelas soluções. Etapa II: primeira leitura da dentina, segunda leitura do tratamento da superfície com as soluções e terceira leitura com o inóculo sobre o substrato tratado. As imagens foram avaliadas após padronização pelo teste Kappa por três examinadores. A análise estatística entre os grupos foi realizada com o teste de Kruskal-Wallis seguido de Dunn, entre as etapas o teste de Mann-Whitney e na avaliação da rugosidade foi empregado o teste ANOVA seguido de Tukey. **Resultados:** Na etapa I os grupos mostraram diferenças entre si, sendo que o G2 e G3 demonstraram maior remoção de biofilme quando comparados ao G1 e na etapa II, o G3 mostrou menor adesão de *E. faecalis* após tratamento de superfície. A rugosidade do substrato também foi avaliada, demonstrando-se maior no grupo G3, diferente estatisticamente de G2, denotando a influência do agente quelante EDTA nesta propriedade. Concluiu-se que o tipo de solução irrigadora e a mistura delas é um fator importante para remover uma quantidade significativa de microrganismos, como também podem alterar a superfície da dentina radicular tratada dificultando a adesão dos mesmos. **Conclusões:** Outras análises são sugeridas para entender a força de adesão de bactérias sobre os diferentes substratos envolvidos na endodontia e como os irrigantes podem dificultar este processo.

Palavras chave: Adesão celular, *Enterococcus faecalis*, Microscopia de força atômica, irrigantes do canal radicular

INTRODUÇÃO

Os microrganismos são os principais causadores das patologias endodônticas já que tem a capacidade de invadir a complexa anatomia do sistema de canais radiculares (Peters *et al.* 2001). Certamente a persistência destes microrganismos está ligada à sua adesão a um substrato e a presença de meios adequados facilitando a sua virulência, para assim após um determinado tempo formarem uma comunidade microbiana estável (Razatos *et al.* 1998, Chávez de Paz *et al.* 2012).

Quando as bactérias entram em contato com um substrato sólido iniciam-se uma serie de reações mediadas por forças de van der Waals e forças eletrostáticas (Razatos *et al.* 1998). Inclusive, também ocorre uma reação ácido-base melhorando a adesão destes microrganismos à dentina (Busscher *et al.* 1998). *Enterococcus faecalis* é uma bactéria Gram-positiva anaeróbia facultativa oportunista, comumente relacionada a casos de lesões periapicais persistentes (Siqueira *et al.* 2003). Certamente, a sua presença no sistema de canais radiculares está relacionada a sua capacidade de invadir e proliferar nos túbulos dentinários (Love *et al.* 2001), como também a sua capacidade de sobreviver até o pH 11.5 (Kayaoglu *et al.* 2005).

A erradicação destas bactérias deixando um ambiente limpo dentro do sistema de canais radiculares é ainda um desafio (Siqueira *et al.* 2018). Por isso, diversas soluções são estudadas para eliminar estas bactérias que permanecem numa porcentagem de 30% até 60% dos casos após a instrumentação (Neves *et al.* 2016). De tal maneira, o uso desses irrigantes tem como objetivo eliminar bactérias, tecido pulpar e detritos dentinários oriundos da instrumentação (Kishen *et al.* 2008).

O hipoclorito de sódio é a solução irrigadora de escolha durante a terapêutica endodôntica devido a sua capacidade de dissolução de tecido orgânico e efeito antisséptico (Gu *et al.* 2017, Siqueira *et al.* 2000). Porém, esta substância não remove os componentes inorgânicos da *smear layer*. Em vista disso, o uso de um quelante é necessário, como o EDTA, uma substância frequentemente usada na irrigação final. Este irrigante reage com os íons cálcio da dentina favorecendo a

permeabilidade dentinária (Torabinajed *et al.* 2003, Scelza *et al.* 2004, Paciornik *et al.* 2007). Por outro lado, nos protocolos de irrigação atuais vem sendo pesquisada o etidronato (HEBP), um quelante fraco e menos agressivo (Arias-Moliz *et al.* 2015). Desta forma, o HEBP pode ser misturado com o NaOCl com a vantagem de ambos não sofrerem alterações em suas propriedades de dissolução de tecidos pulpaes e remoção da camada de debris dentinários (Tartari *et al.* 2013, Tartari *et al.* 2015, Tartari *et al.* 2018).

Conforme o exposto, o uso destes irrigantes nem sempre é suficiente para eliminar o *Enterococcus faecalis* da dentina radicular (Kishen *et al.* 2008). Em razão disso, a microscopia de força atômica (AFM) está sendo aplicada em estudos de comportamento nano mecânico das células, fornecendo imagens topográficas em formato bi e tridimensionais das superfícies (Paciornik *et al.* 2007, Kishen *et al.* 2008, Xu *et al.* 2019). Deste modo, com o uso da Microscopia de Força Atômica como equipamento de análise para a medição e quantificação, objetivou-se mapear os biofilmes de *Enterococcus faecalis* em escala nanométrica, quanto ao tratamento ou não da superfície dentinária com diferentes soluções irrigadoras, bem como o tratamento dos biofilmes com estas soluções.

A hipótese nula testada foi de que não há diferenças significantes quanto à remoção de biofilme pelas diferentes soluções irrigadoras investigadas e também quando utilizados antes do inóculo, as soluções irrigadoras não influenciam a formação do biofilme.

MATERIAL E METODOS

O presente trabalho foi encaminhado à Comissão de Ética e Pesquisa em Seres Humanos da Faculdade de Odontologia de Bauru, pelo uso de órgãos dentários extraídos, sendo aprovado com o número 22819019.0.0000.5417. Vinte e quatro caninos humanos íntegros extraídos foram cedidos por cirurgiões-dentistas para execução desta pesquisa, mediante termo de cessão devidamente assinados pelos mesmos.

PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS

Blocos de dentina humana

Vinte e quatro caninos superiores e inferiores humanos com raízes retas, completamente formadas e sem tratamento endodôntico. Os dentes obtidos foram armazenados em hipoclorito de sódio a 1% (Rioquímica Ltda., São Jose de Rio Preto, SP, Brasil) durante 48 horas. Blocos de dentina de 4 mm de diâmetro foram obtidos de cada dente, com uma broca de trefina para osso, das porções cervical e média da raiz para posterior suporte dos biofilmes.

Os respectivos blocos foram polidos em uma máquina de polimento (Politriz, Arotec, Cotia, SP, Brasil) sendo utilizadas lixas de água de granulometria 600, 900 e 1200 em formato de disco de diâmetro de 320 mm com a finalidade de conseguir uma superfície lisa, uniforme e paralela para as leituras em Microscopia de Força Atômica (AFM). Foi confirmada a espessura dos blocos de 1mm com a utilização de um paquímetro digital (Starret Industria e Comercio Ltda., São Paulo, Brasil).

Após a obtenção dos blocos de dentina, a face não analisada foi identificada com um lápis. Os blocos de dentina passaram por banho ultrassônico com hipoclorito de sódio a 1% (Rioquímica Ltda., São Jose de Rio Preto, SP, Brasil) por um período de 5 min, posteriormente com EDTA a 17% (Biodinâmica, Ibioporã, PR, Brasil) por 5 minutos, para eliminação de raspas de dentina oriundas do corte. Em seguida, os blocos foram armazenados, acondicionados em água destilada e levados para esterilização em autoclave a 121° C durante 20 min.

Ativação dos microrganismos

Foi utilizada a cepa de *Enterococcus faecalis* catalogada com o número de registro da American Type Culture Colection (ATCC 29212). Os procedimentos experimentais foram realizados dentro de uma câmara de fluxo laminar (Esco, Arstream, classe II A2, Jacareí, São Paulo, Brasil).

Foi verificada a pureza da colônia mediante a coloração de Gram. As cepas foram cultivadas em caldo BHI (Brain Heart Infusion, Difco, Detroit, Michigan, EUA), as quais passaram por crescimentos sucessivos e mantidas a 37°C dentro de uma estufa bacteriológica por 24 h. Após o tempo requerido foram utilizadas placas de ágar com BHI (Brain Heart Infusion, Difco, Detroit, Michigan, EUA), onde foi realizado o plaqueamento com 100µL do inóculo padronizado de acordo com a escala de Mc Farland e deixado na estufa bacteriológica por 24 horas. Foi confeccionada uma placa com a cultura para cada 3 espécimes (blocos), evitando exposição e consequente contaminação. Após o tempo requerido foi coletado 3mm da colônia com alças de 1 mm de diâmetro e espalhado direto no bloco de dentina com 10 µL de água Milli-Q adaptado da metodologia de Senechal *et al.* (2004). Em seguida o bloco foi deixado para secagem por 15 min para posterior leitura no AFM.

Divisão dos grupos de estudo

Os blocos de dentina humana foram distribuídos em quatro grupos com n=6 para tratamento com as seguintes soluções irrigadoras:

G1: EDTA 17% (Biodinâmica Química e Farmacêutica, Ibiporã, PR, Brasil);

G2: NaOCl a 2,5% (Fórmula e Ação, São Paulo, SP, Brasil);

G3: NaOCl 2,5% + EDTA 17%

G4: NaOCl 5 %+ HEBP 18% (Zschimmer & Schwarz Mohsdorf GmbH & Co KG, Burgstadt, Germany)

Tratamentos realizados:

ETAPA I - sem tratamento da superfície dentinária: foi realizada a primeira leitura do bloco de dentina íntegro sem nenhum tratamento feito na superfície. Após a leitura foi agregado o inóculo padronizado e deixados secar por 15 minutos para segunda leitura. Após leitura os blocos de dentina foram colocados em posição vertical e fixados com silicone de adição (3M ESPE, St. Paul, MN, EUA) em um poço de uma placa de poliestireno de 48 poços esterilizada TC (Cellstar; Greiner bio-one, Alphen aan den Rijn, Holanda), adaptado de Arias-Moliz, *et al.* (2014).

Para o primeiro grupo do EDTA 17%, foi dispensado 1,5 mL do irrigante por 3 min e posteriormente lavado com tiosulfato de sódio.

No segundo grupo foi utilizado o irrigante NaOCl a 2,5% com irrigação contínua de 20 segundos com um volume de 3,5 mL com sucção por bomba a vácuo concomitante. Os espécimes foram deixados em 1,5 mL da solução irrigadora por 3 minutos. A respectiva solução foi inativada pela adição de tiosulfato de sódio a 5% por 2 minutos em outro poço da placa de 48 poços, para depois ser deixado secar por 15 min e então analisados por microscopia de força atômica (AFM) (Flex AFM – Nano Surf).

Para o terceiro grupo de NaOCl 2,5% + EDTA 17%, os espécimes foram irrigados com hipoclorito de sódio 3,5 mL por 20 segundos e deixados 1,5 mL da solução por 3 minutos. Posteriormente foi sugado e dispensado 1,5 mL de EDTA por 3 minutos e, após esse tempo foi feita a neutralização com tiosulfato de sódio.

No quarto grupo de NaOCl 5% + HEBP 18% foi realizado a irrigação contínua de 20 segundos com 3,5 mL e deixado 1,5 mL por 5 minutos. Posteriormente foram lavados com tiosulfato de sódio a 5% e após a utilização dos irrigantes, os espécimes foram lidos em AFM.

ETAPA II - com tratamento da superfície radicular: neste segundo experimento, foi realizada a primeira leitura do bloco de dentina íntegro sem nenhum tratamento feito na superfície. Os blocos de dentina foram colocados em posição vertical e fixados com silicone de adição (3M ESPE, St. Paul, MN – USA) em um poço de uma placa de poliestireno de 48 poços esterilizada TC (Cellstar; Greiner bio-one, Alphen aan den Rijn, Holanda) (fig.2), os quais foram tratados com os irrigantes da mesma forma como anteriormente descrito na primeira etapa e então lidos pela segunda vez em AFM. Depois do tratamento com os irrigantes, os espécimes tratados receberam o inóculo padronizado como descrito anteriormente e deixados secar por 15 min. A terceira leitura foi realizada após o estabelecimento deste biofilme durante os 15 minutos.

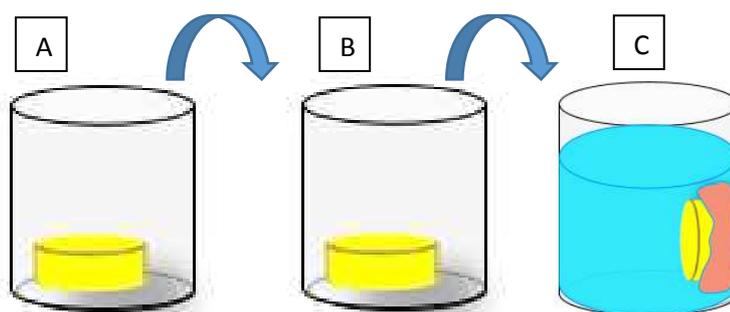


Fig. 1 – Sequência experimental para a Etapa I dos blocos de dentina. A) bloco de dentina íntegro para a 1ª leitura. B) bloco de dentina contaminado com *E. faecalis* para a 2ª leitura. C). Após a segunda leitura com o biofilme, os blocos foram tratados com os irrigantes, deixados secar por 15 minutos e realizada a 3ª leitura.

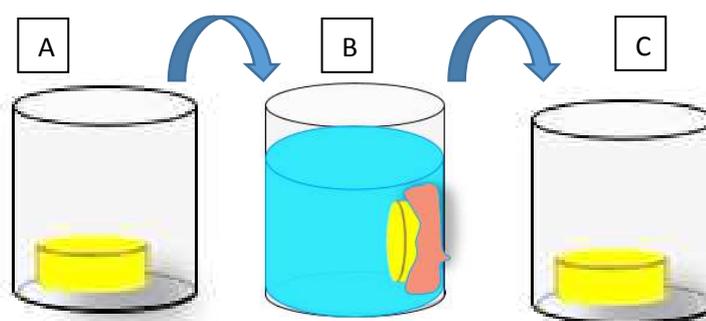


Fig. 2 – Sequência experimental para a Etapa II dos blocos de dentina. A) bloco de dentina íntegro – primeira leitura. B) bloco de dentina tratado com o irrigante – 2ª leitura C) Colocação do inóculo e secagem do bloco de dentina por 15 minutos para a 3ª leitura

AVALIAÇÃO EM MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA

A leitura foi realizada através do uso de um microscópio de força atômica (Flex AFM – Nano Surf com controlador C3000 com ADC e DAC de 24 bits) em modo não contato usando, processador FPGA de 32 bits NIOS-CPU; 80 MHz. Foram utilizadas pontas Tap 190Al-G-10, para modo não contato (Dynamic Force). As áreas das amostras foram escaneadas com uma força mínima, uma distância de 10µm para

atingir células individuais, área de 20µm x 20µm e uma resolução de 512 x 512 pixel por imagem.

Para cada bloco de dentina foram obtidas três imagens para depois serem comparadas as superfícies. As imagens foram submetidas à contagem do número de células bacterianas quando possível.

As imagens foram avaliadas por 3 examinadores calibrados através do teste de Kappa quanto aos escores de formação de biofilme, que foram estabelecidos após experimento piloto e padronização dos examinadores, para posterior análise estatística.

Os escores atribuídos foram:

Escore 0 - Bloco de dentina sem presença de *E. faecalis*

Escore 1 - 1-25% de *E. faecalis* no bloco de dentina

Escore 2 - 26-50% de *E. faecalis* no bloco de dentina

Escore 3 - 51-75% de *E. faecalis* no bloco de dentina

Escore 4 - 75-100% de *E. faecalis* no bloco de dentina

As imagens obtidas foram processadas pelo sistema de microscopia de força atômica Flex AFM – NanoSurf, fornecendo dados de rugosidade do substrato em cada um dos grupos avaliados.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

As imagens foram avaliadas após padronização pelo teste Kappa com três examinadores. Após as avaliações por escores, a análise estatística entre os grupos foi realizada com o teste de Kruskal-Wallis seguido de Dunn. A comparação entre as etapas I e II dos experimentos foi realizada através do teste de Mann-Whitney. Para a avaliação da rugosidade foi empregado o teste de ANOVA seguido de Tukey, com nível de significância de 5%.

RESULTADOS

A aderência do *Enterococcus faecalis* na dentina radicular foi maior na segunda etapa quando comparada com a primeira etapa, onde os blocos foram previamente tratados com as soluções irrigadoras. A coleta de dados da varredura na primeira etapa mostrou mais bactérias aderidas no substrato dentinário quando o biofilme foi tratado com EDTA a 17% ($P > 0.05$) (Tabela 1).

Observou-se na primeira etapa que o grupo do NaOCl 2,5% removeu 70% das bactérias aderidas ao substrato ($P < 0.05$). Porém, não se evidenciou diferença estatística com o grupo do NaOCl +HEBP. Por outro lado, o grupo do NaOCl + EDTA evidenciou diferença estatisticamente significativa na remoção de bactérias quando comparado ao grupo do EDTA 17% e NaOCl + HEBP.

Já os grupos de NaOCl 2,5% e o NaOCl + HEBP não demonstraram diferença estatisticamente significativa quanto a remoção de biofilme de *Enterococcus faecalis*. Ou seja, pela ordem do mais antimicrobiano para o menos as soluções irrigantes ficaram na seguinte ordem: NaOCl + EDTA (G3) > NaOCl (G2) > NaOCl + HEBP (G4) > EDTA (G1) (Tabela 2).

Na segunda etapa quando o substrato dentinário foi tratado com as soluções e houve maior aderência microbiana no grupo do EDTA a 17% ($P > 0.05$). Houve menor quantidade de bactérias aderidas no substrato dentinário quando este foi tratado com o grupo de NaOCl + EDTA ($P < 0.05$). A irrigação com NaOCl e NaOCl + HEBP não demonstrou diferença estatisticamente significativa entre si na aderência das bactérias *Enterococcus faecalis* ao substrato dentinário previamente tratado, sendo os grupos intermediários, assim como na etapa 1 (Tabela 2).

A rugosidade da superfície do substrato dentinário tratado com as soluções foram maiores no grupo do NaOCl + EDTA, evidenciando maior permeabilidade ou desobstrução de túbulos dentinários em comparação com o grupo do NaOCl, sendo estatisticamente diferentes. Os grupos de EDTA e NaOCl + HEBP demonstraram

valores intermediários e não estatisticamente diferentes entre si e também com os demais grupos ($P < 0.05$). Ressalta-se que, visualmente, o grupo de NaOCl + HEBP apresentou uma superfície mais regular e homogênea quando comparado com o grupo de NaOCl + EDTA (Tabela 3).

DISCUSSÃO

Os micro-organismos fazem parte da etiologia da doença pulpar ou periapical, com a capacidade de formar um biofilme estruturado (Kishen *et al.* 2006). No entanto, a sua capacidade de sobreviver no sistema de canais radiculares se encontra vinculada à sua adesão a um substrato adequado como a dentina (Razatos *et al.* 1998, Chavez de Paz *et al.* 2012).

No presente estudo verificou-se a adesão dos micro-organismos em dois experimentos diferenciados, sendo a etapa I quando o substrato com o biofilme aderido na sua superfície foi irrigado com as substâncias testadas e na etapa II o bloco de dentina foi tratado com as soluções irrigadoras antes da inoculação bacteriana, para entender melhor se ocorre alguma alteração quanto à adesão destas bactérias. A primeira etapa seguiu um tratamento na remoção do biofilme formado, obtendo melhores resultados quanto a visibilidade e quantificação de bactérias remanescentes.

Curiosamente para entender a força de adesão destes micro-organismos Razatos *et al.* (1998) detalham que quando as bactérias entram em contato com uma superfície ocorre uma série de interações mediadas por forças de van der Waals e forças eletrostáticas. A aderência microbiana em condições ambientais ocorre também de outra forma, por uma série de reações ácido-base entre a bactéria e a superfície dentinária (Busscher *et al.* 1984, Busscher *et al.* 1990). Foi relatado por Cowan *et al.* (1987) e Miron *et al.* (2001) que a força de adesão das bactérias se estabelece em duas fases, sendo que na primeira fase existe uma interação mediada por duas forças de acordo com a distância em que se encontra a bactéria, uma força atrativa e a outra repulsiva, e este tipo união pode-se dar em segundos ou minutos. Já na

etapa II, a adesão vai depender de uma série de fatores de virulência da própria bactéria favorecendo assim uma união irreversível e se tornando um biofilme estruturado em horas ou dias.

No presente estudo foram realizados estudos pilotos para padronizar um meio específico, a quantidade de bactérias e o tempo adequado para a adesão de uma camada de *Enterococcus faecalis* com a finalidade de observar o comportamento dela frente aos irrigantes. Após os testes foi determinado o tempo adequado de 15 minutos e com o meio água Milli-Q. Ao mesmo tempo, durante o teste observou-se que o tipo de meio influencia na multiplicação e formação de matriz extracelular. Quando foi utilizado o meio de cultura BHI para o inóculo sobre os blocos de dentina radicular, a partir dos 30 minutos havia uma grande quantidade de bactérias e matriz, inviabilizando a leitura, uma vez que esta vai ocorrer aos 40 minutos. Assim, foi selecionada a água Milli-Q como veículo para o inóculo bacteriano, diminuindo sua proliferação e evitando o máximo possível, alterações dos dados durante a leitura.

Infelizmente, na clínica endodôntica, o uso de instrumentos mecanizados ou manuais não garante a remoção completa desse biofilme estruturado, deixando áreas tocadas e não tocadas no sistema de canais radiculares (Siqueira *et al.* 2018). Certamente, as bactérias têm a capacidade de invadir em profundidade os túbulos dentinários e se multiplicam exponencialmente nestas áreas (Giardino *et al.* 2018). Com a presença de matéria orgânica e resíduos dentinários, os túbulos se tornam um ambiente ideal para a sua persistência e nova proliferação (Kayauglu *et al.* 2005).

A dentina consiste de dois tipos de substrato o colágeno tipo I e a apatita carbonatada (Love *et al.* 2001; Hubble *et al.* 2003). Neste estudo, analisou-se a capacidade do EDTA na remoção de *Enterococcus faecalis*. A irrigação com esta substância na etapa I não mostrou remoção de bactérias evidenciadas nas imagens, mostrando uma ligeira limpeza superficial, melhorando a definição dos *E. faecalis*. Na segunda etapa o tratamento prévio com EDTA gerou maior adesão de *E. faecalis*, mostrando diferenças estatisticamente significantes quando comparados

com os outros grupos ($P > 0.05$). De tal maneira, a persistência destes micro-organismos está ligada à capacidade do EDTA em descalcificar a dentina, expondo assim uma camada de fibrilas de colágeno e deixando os túbulos dentinários mais abertos ou permeáveis (Nallapareddy *et al.* 2000, Scelza *et al.* 2004). Kishen *et al.* (2008) e Xu *et al.* (2019), ao usar o EDTA mostraram também maior quantidade de bactérias aderidas ao substrato dentinário em acordo com nosso estudo. Nesse contexto, se explica também que a persistência destes micro-organismos está ligada à presença de soro humano (Love *et al.* 2001). Alguns estudos, evidenciaram que a presença de SBA (Albumina sérica bovina) modifica a expressão antigênica da superfície bacteriana sobretudo nos receptores D-galactose e L-fucose tornando-as mais virulentas do que quando cultivadas com o meio de cultura comumente usados, como o BHI (caldo infusão de cérebro e coração) (Cowan *et al.* 1987, Miron *et al.* 2001). Vários estudos verificaram que há maior predisposição na aderência de *E. faecalis* com a presença do colágeno que constitui a dentina (Kayauglu *et al.* 2005, Kowalski *et al.* 2006). Assim, o uso prolongado do EDTA pode variar a permeabilidade dos túbulos dentinários como também a quantidade de bactérias (Yang *et al.* 2005, Paciornik *et al.* 2019).

O hipoclorito de sódio tornou-se o irrigante de escolha comumente utilizado durante a limpeza e desinfecção no sistema de canais radiculares pela sua eficácia de dissolvente orgânico e a sua ação bactericida (Siqueira *et al.* 2000, Zhender *et al.* 2005). Nesse estudo, observou-se que na etapa I houve uma remoção quase completa das bactérias aderidas na dentina, no entanto, na etapa II o NaOCl ao ser utilizado como irrigante final sobre o substrato dentinário remove uma boa quantidade de colágeno exposto, impedindo que o *Enterococcus faecalis* se una na dentina novamente, ou seja, a presença de colágeno pode facilitar a adesão das bactérias ao substrato dentinário, de acordo com Yang *et al.* (2005). Os resultados deste estudo corroboram os achados de estudos prévios, que mostraram que o uso de NaOCl diminuiu a quantidade de bactérias nas paredes dos canais, assim, o tipo de solução influencia na adesão inicial dos micro-organismos (Yang *et al.* 2002, Kishen *et al.* 2006, Xu *et al.* 2019).

Por outro lado, em uma situação clínica, o uso de dois tipos de soluções como o NaOCl e o EDTA é comum durante a terapia endodôntica (Haapasalo *et al.* 2010). Neste estudo foi realizada a irrigação constante de 5 mL de NaOCl a 2,5% por 3 min e o EDTA 17% por 3 min, onde ambas soluções mostraram diferença estatisticamente significativa nas duas etapas removendo bactérias em quantidade como também alterando a superfície dentinária para posterior aderência das bactérias e, ao mesmo tempo observou-se o aumento da permeabilidade dos túbulos dentinários com o uso destes dois irrigantes. Este estudo teve concordância com pesquisas prévias (Kishen *et al.* 2006, Xu *et al.* 2019) que destacam que o uso destes produtos altera as propriedades físico-químicas do substrato dentinário afetando uma posterior aderência. Nesse contexto, nos últimos anos tem sido estudado o uso de HEBP (Hidroxietilideno bifosfonato) ou também conhecido como etidronato, um quelante fraco que é utilizado em combinação como o NaOCl durante a instrumentação visando a maior remoção de bactérias (Arias-Moliz *et al.* 2015, Tartari *et al.* 2013, Tartari *et al.* 2015, Tartari *et al.* 2018). Em contrapartida, neste estudo, observou-se nas duas etapas que o uso do NaOCl misturado com HEBP permitiu a permanência de uma quantidade significativa de bactérias, no entanto, segundo Xu *et al.* (2019), o tempo é um fator importante para remoção do *E. faecalis* por esse agente quelante.

Outro fator importante é a rugosidade do substrato, neste caso, o bloco de dentina que ao ser tratada pelos irrigantes adquire uma rugosidade diferente. Xu *et al.* (2019) observaram que a rugosidade da dentina tratada com EDTA teve a maior rugosidade, seguida da dentina tratada com NaOCl e a clorexidina. Neste estudo também ambos grupos G1 e G3 que foram tratados com EDTA apresentaram também os maiores valores de rugosidade. Neste estudo observou-se que o grupo do NaOCl + HEBP mostrou uma superfície mais homogênea e regular. Xu *et al.* (2019) descreveram que uma superfície lisa e regular teve maior aderência bacteriana, corroborando assim este estudo que apresentou o grupo do NaOCl + HEBP, com mais bactérias. Supõe-se assim, que outros fatores, além da rugosidade, estão envolvidos com maior adesão bacteriana. O EDTA, um quelante eficiente, mostrou diferenças na superfície como na permeabilidade de túbulos

dentinários em diferentes tempos e concentração, como demonstrado por Kishen *et al.* (2008), Paciornik *et al.* (2019) e Xu *et al.* (2019), devendo ser usado com cautela.

A microscopia de força atômica fornece imagens 2D e 3D em função de um rastreamento superficial de uma ponta associada a um cantilever, para análises de interação de células e substratos em escala nanométrica (Dorobantu *et al.* 2010, Dorobantu *et al.* 2012). No presente estudo, o uso do AFM forneceu imagens de 20 µm x 20 µm que foram padronizadas para todos os grupos. A incorporação deste instrumento de análise na endodontia facilitou estudos de substratos após uso de irrigantes (Paciornik *et al.* 2007), como também em testes de cultura microbiológica (Dorobantu *et al.* 2010, 2012). Neste estudo, o uso do AFM permitiu visualizar de forma detalhada o substrato com as bactérias aderidas ou quando tratadas com os irrigantes testados em escala manométrica fornecendo imagens relevantes. Ressaltasse que as leituras foram realizadas com diversos cuidados, parâmetros estritos e prévio treinamento. Por ser um equipamento de alta precisão, considera-se que o uso desta ferramenta é suscetível a vibrações alterando o mapeamento ou a varredura da amostra. Considera-se que mais estudos devam ser realizados como tempo de irrigação, quantidade (volume) e concentração das soluções, pois podem influenciar tanto na aderência como na remoção destas bactérias dentro do sistema de canais radiculares.

CONCLUSÃO

O tipo de solução irrigadora e a mistura delas é um fator importante para remover uma quantidade significativa de *Enterococcus faecalis*, assim como também a quantidade e a porcentagem destas substâncias irrigadoras pode alterar a superfície da dentina tratada dificultando a adesão dos mesmos. Dentre as soluções testadas, a associação NaOCl e EDTA eliminou maior quantidade de biofilmes formados assim como dificultou a adesão das bactérias sobre o substrato dentinário. Outras análises são sugeridas para entender a força de adesão de bactérias sobre os diferentes substratos envolvidos na endodontia e como os irrigantes podem dificultar este processo.

Agradecimentos

À Fundação CAPES (Coordenação de aperfeiçoamento de pessoal de nível superior) pela concessão de bolsa de estudos da Evelyn Giuliana Velásquez Espedilla.

Declaração de conflitos de interesse

Os autores desta pesquisa declaram não ter conflito de interesses relacionados a este artigo.

REFERÊNCIAS

Arias-Moliz MT, Ordinola-Zapata R, Baca P, Ruiz-Linarez M, Garcia EG, Duarte MAH, Bramante CM, Ferrer-Luque CM (2015) Antimicrobial activity of Chlorhexidine, Peracetic acid and Sodium hypochlorite/etidronate irrigant solutions against *Enterococcus faecalis* biofilms. *International Endodontic Journal* **48**(12):1188-1193.

Busscher HJ, Poortinga AT, Bos R (1998) Lateral and perpendicular interaction forces involved in mobile and immobile adhesion of microorganisms on model solid surfaces. *Current microbiology* **37**(5):319-23.

Busscher HJ, Weerkamp AH, van der Mei HC, van Pelt AW, de Jong HP, Arends J (1984) Measurement of the surface free energy of bacterial cell surfaces and its relevance for adhesion. *Applied and environmental microbiology* **48**(5):980-3

Chavez de Paz LE (2012) Development of a multispecies biofilm community by four root canal bacteria. *Journal of endodontics* **38**(3):318-23.

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

Cowan MM, Taylor KG, Doyle RJ (1987) Energetics of the initial phase of adhesion of streptococcus sanguis to hydroxylapatite. *Journal of Bacteriology* **169**(7), 2995-3000.

Dorobantu LS, Goss GG, Burrell RE (2012) Atomic force microscopy: a nanoscopic view of microbial cell surfaces. *Micron* **43**(12):1312-22.

Dorobantu LS, Gray MR (2010) Application of atomic force microscopy in bacterial research. *Scanning*. **32**(2):74-96.

Giardino L, Del Fabbro M, Cesario F, Fernandes FS, Andrade FB (2018) Antimicrobial effectiveness of combinations of oxidant and chelating agents in infected dentine: an ex vivo confocal laser scanning microscopy study. *International Endodontic Journal* **51**, 448-456.

Gu LS, Huang XQ, Griffin B, Bergeron BR, Pashley DH, Niu LN, et al (2017) Premium non nocere - The effects of sodium hypochlorite on dentine as used in endodontics. *Acta biomaterialis* **61**:144-56.

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

Hubble TS, Hatton JF, Nallapareddy SR, et al. (2003) Influence of *Enterococcus faecalis* proteases and the collagen-binding protein, Ace, on adhesion to dentin. *Oral Microbiol Immunol* **18**:121-6

Kayaoglu G, Erten H, Orstavik D (2005) Growth at high pH increases *Enterococcus faecalis* adhesion to collagen. *International Endodontic Journal* **38**(6):389-96.

Kishen A, George S, Kumar R (2006) *Enterococcus faecalis*-mediated biomineralized biofilm formation on root canal dentine in vitro. *Journal of biomedical materials research* **77**(2):406-15.

Kishen A, Sum CP, Mathew S, Lim CT (2008) Influence of irrigation regimens on the adherence of *Enterococcus faecalis* to root canal dentin. *Journal of endodontics* **34**(7):850-4.

Kowalski WJ, Kasper EL, Hatton JF, et al. (2006) *Enterococcus faecalis* adhesin, Ace, mediates attachment to particulate dentin. *Journal of Endodontics* **32**: 634-7

Love RM (2001) *Enterococcus faecalis*: a mechanism for its role in endodontic failure. *International Endodontic Journal* **34**:399-405

Miron J, Ben-Ghedalia D, Morrison M (2001) Invited review: adhesion mechanism of rumen cellulolytic bacteria. *J. Dairy Sci* **84**: 1294-1309

Nallapareddy SR, Qin X, Weinstock GM, Hook M, Murray BE. (2000) *Enterococcus faecalis* adhesin, ace, mediates attachment to extracellular matrix proteins collagen type IV and laminin as well as collagen type I. *Infect Immun* **68**: 264:3325-34

Paciornik S, De-Deus G, Reis CM, Pinho MMH, Prioli R (2007). In *situ* atomic force microscopy and image analysis of dentine submitted to acid etching. *J Microsc.* **225**, 236-43.

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

Razatos A, Ong YL, Sharma MM, Georgiou G (1998). Molecular determinants of bacterial adhesion monitored by atomic force microscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**(19):11059-64.

Scelza MF, Pierro V, Scelza P, Pereira M (2004) Effect of three different time periods of irrigation with EDTA-T, EDTA, and citric acid on smear layer removal. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics* **98**(4):499-503.

Senechal A, Carrigan SD, Tabrizian M (2004) Probing surface adhesion forces of *Enterococcus faecalis* to medical-grade polymers using atomic force microscopy. *Langmuir: the ACS Journal of surfaces and colloids* **20**(10):4172-7

Siqueira JF, Jr (2003) Microbial causes of endodontic flare-ups. *International Endodontic Journal*. **36**(7):453-63.

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

Tartari T, de Almeida Rodrigues Silva E Souza P, Vila Nova de Almeida B, Carrera Silva Júnior JO, Facíola Pessoa O, Silva E Souza Junior MH (2013) A new weak chelator in endodontics: effects of different irrigation regimens with etidronate on root dentin microhardness. *International Journal of Dentistry* 1-6

Tartari T, Duarte Junior AP, Silva Júnior JO, Klautau EB, Silva E Souza Junior MH, Silva E Souza Junior Pde A (2013) Etidronate from medicine to endodontics: effects of different irrigation regimes on root dentin roughness. *Journal of Applied Oral Science* **21**, 409-15

Tartari T, Guimarães BM, Amoras LS, Duarte MA, Silva e Souza PA, Bramante CM (2015) Etidronate causes minimal changes in the ability of sodium hypochlorite to dissolve organic matter. *International Endodontic Journal* **48**(4):399-404.

Tartari T, Bachmann L, Zancan RF, Vivian RR, Duarte MAH1, Bramante CM1(2018) Analysis of the effects of several decalcifying agents alone and in combination with sodium hypochlorite on the chemical composition of dentine. *International Endodontic Journal* **51** Suppl 1: e42-e54.

Torabinejad M, Khademi AA, Babagoli J, Cho Y, Johnson WB, Bozhilov K, et al. (2003) A new solution for the removal of the smear layer. *Journal of endodontics* **29**(3):170-5.

Worcester DL, Miller RG, Bryant PJ (1988) Atomic force microscopy of purple membranes. *Journal of microscopy* 152(Pt 3):817-21.

Xu J, He J, Shen Y, Zhou X, Huang D, Gao Y, Haapasalo M (2019) Influence of endodontic procedure on the adherence of *Enterococcus faecalis*. *Journal of Endodontics* 45(7): 943-949

Yang SE, Bae KS (2002) Scanning electron microscopy study of the adhesion of *Prevotella nigrescens* to the dentin of prepared root Canals. *Journal of Endodontics* 28: 433-7

Yang SE, Cha JH, Kim ES, et al. (2006) Effect of smear layer and chlorhexidine treatment on the adhesion of *Enterococcus faecalis* to bovine dentin. *Journal of Endodontics* 32: 634-7

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

Zehnder M, Schmidlin P, Sener B, Waltimo T (2005) Chelation in root canal terapia reconsidered. *Journal of Endodontics* 31, 817-20.

Legenda das Tabelas

Tabela 1: Valores de mediana (Me), mínimo e máximo dos escores da proliferação bacteriana visível nas diferentes etapas do tratamento (teste estatístico de Mann-Whitney).

Tabela 2: Valores medianos (Me), mínimos e máximos (mín-max) dos escores quanto a proliferação bacteriana visível em cada um dos grupos sob diferentes tratamentos (testes estatísticos Kruskal-Wallis seguido de Dunn).

Tabela 3: Valores de média (M) e desvio padrão (DP) quanto a rugosidade do substrato (nm) (teste estatístico ANOVA seguido de Tukey).

Legenda das Figuras

Figura 1: Imagens representativas em AFM (3D) da etapa I. A - G1: EDTA 17%; B - G2: NaOCl 2,5%; C - G3: NaOCl 2,5% + EDTA 17%; D - G4: NaOCl 5% + HEBP 18%.

Figura 2: Imagens representativas em AFM (3D) da etapa II. A - G1: EDTA 17%; B - G2: NaOCl 2,5%; C - G3: NaOCl 2,5% + EDTA 17%; D - G4: NaOCl 5% + HEBP 18%.

Figura 3: Imagens representativas em AFM (3D) quanto à rugosidade da dentina. A - G1: EDTA 17%; B - G2: NaOCl 2,5%; C - G3: NaOCl 2,5% + EDTA 17%; D - G4: NaOCl 5% + HEBP 18%.

Tabela 1: Valores de mediana (Me), mínimo e máximo dos escores da proliferação bacteriana visível nas diferentes etapas do tratamento (teste estatístico de Mann-Whitney)

	Me (mín-máx)	<i>p</i>
Etapa I	1,0 (0,0 – 4,0)	
Etapa II	2,0 (0,0 – 4,0)	<0,05

Tabela 2: Valores medianos (Me), mínimos e máximos (mín-max) dos escores quanto a proliferação bacteriana visível em cada um dos grupos sob diferentes tratamentos (testes estatísticos Kruskal-Wallis seguido de Dunn)

Bacterial proliferation		
	Etapa I	Etapa II
G1: EDTA 17%	3,0 ^A (0,0 - 4,0)	3,0 ^A (0,0 – 4,0)
G2: NaOCl 2,5%	0,0 ^{BC} (0,0 - 2,0)	2,0 ^{BC} (0,0 – 3,0)
G3: NaOCl 2,5%+EDTA 17%	0,0 ^C (0,0 - 0,0)	1,0 ^C (0,0 – 3,0)
G4: NaOCl 5 %+HEBP 18%	1,0 ^{AB} (0,0 – 3,0)	2,5 ^{AB} (0,0 – 4,0)

EDTA: ácido etilenodiaminotetracético; NaOCl: hipoclorito de sódio; HEBP: etidronato. Letras maiúsculas diferentes sobrescritas em uma coluna indicam diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p < 0.05$).

Tabela 3: Valores de média (M) e desvio padrão (DP) quanto à rugosidade do substrato (nm) teste estatístico ANOVA seguido de Tukey.

	M ± (DP)
G1: EDTA 17%	504,6 ^{AB} ± (219,8)
G2: NaOCI 2,5%	312,7 ^A ± (113,5)
G3: NaOCI 2,5% + EDTA 17%	643,0 ^B ± (143,8)
G4: NaOCI 5 % + HEBP 18%	432,9 ^{AB} ± (274,3)

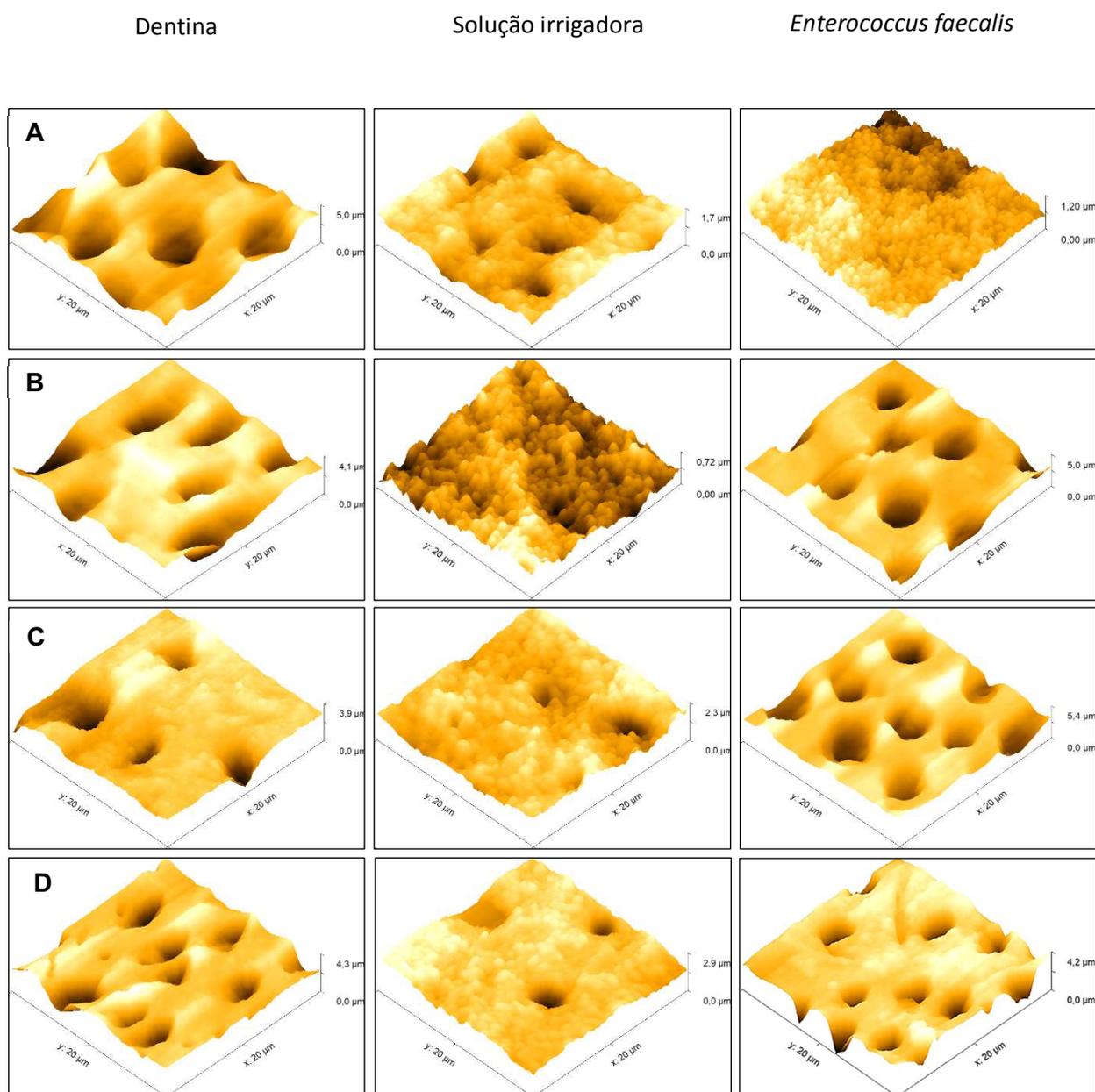


Figura 1: Imagens representativas em AFM (3D) da etapa I. A - G1: EDTA 17%; B - G2: NaOCl 2,5%; C - G3: NaOCl 2,5% + EDTA 17%; D - G4: NaOCl 5% + HEBP 18%.

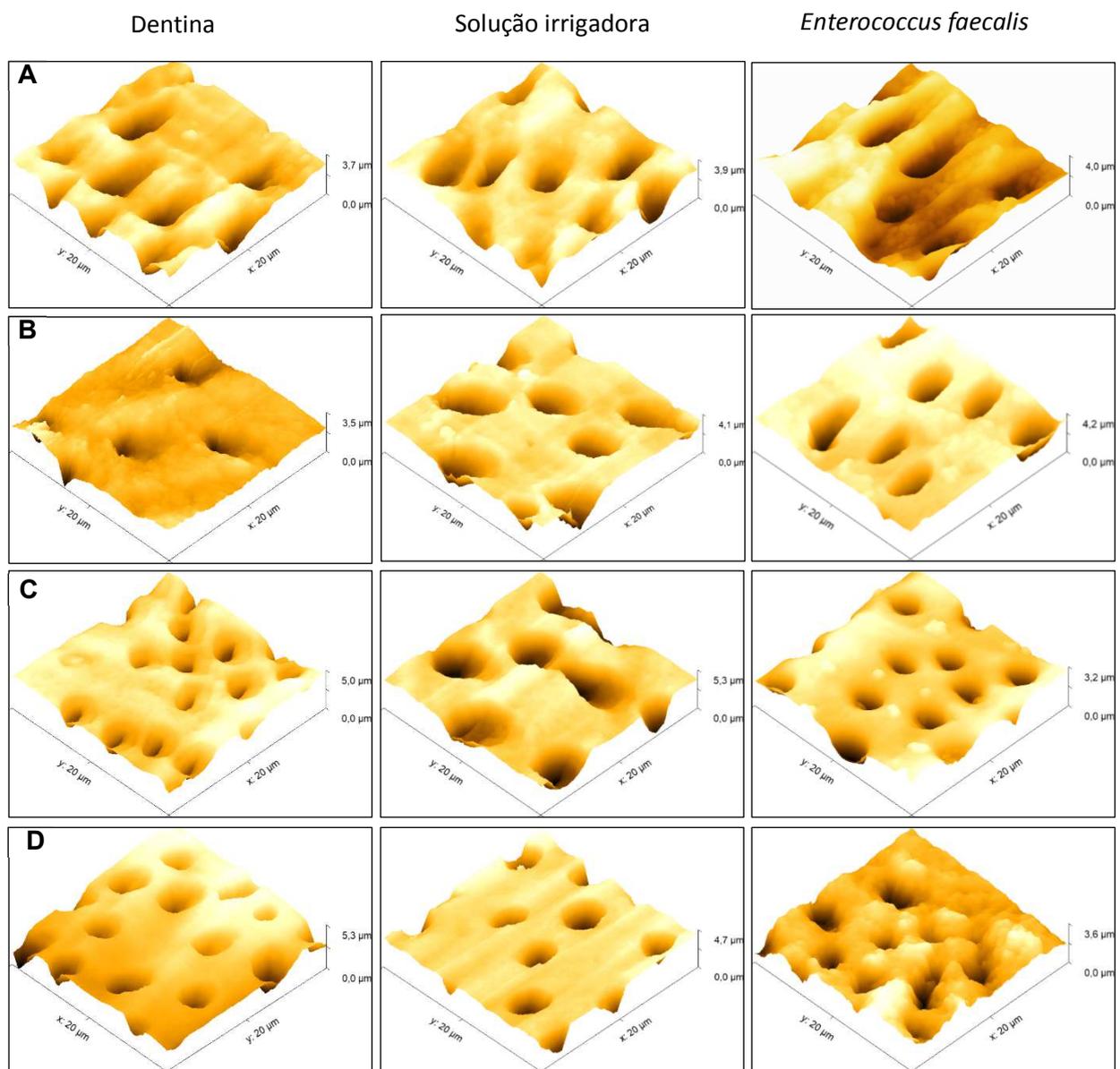


Figura 2: Imagens representativas em AFM (3D) da etapa II. A - G1: EDTA 17%; B - G2: NaOCl 2,5%; C - G3: NaOCl 2,5% + EDTA 17%; D - G4: NaOCl 5% + HEBP 18%.

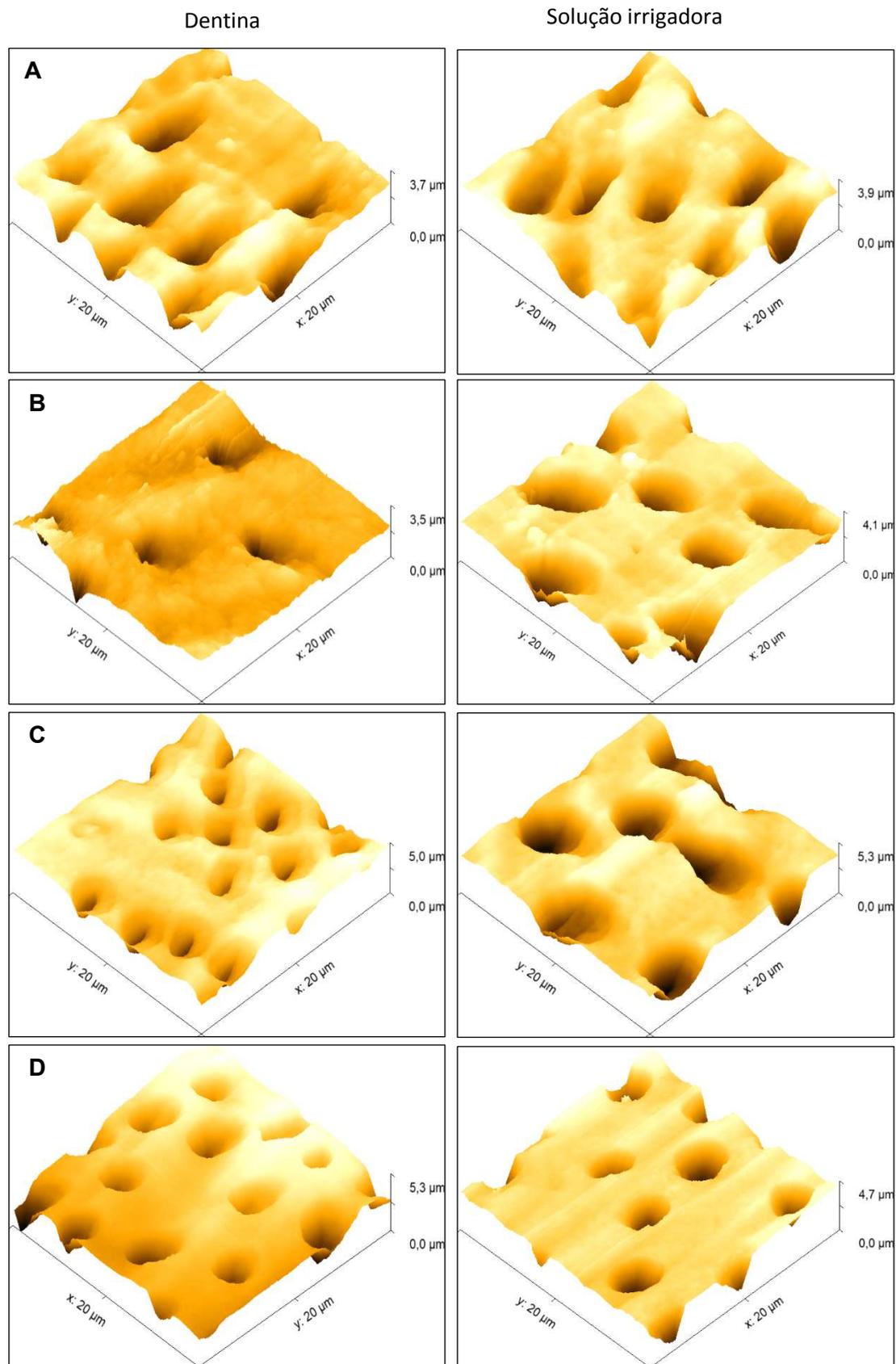


Figura 3: Imagens representativas em AFM (3D) quanto a rugosidade da dentina. A - G1: EDTA 17%; B - G2: NaOCl 2,5%; C - G3: NaOCl 2,5% + EDTA 17%; D - G4: NaOCl 5% + HEBP 18%.

3 DISCUSSÃO

3 DISCUSSÃO

A doença pulpar e periapical é o resultado de uma associação de micro-organismos presentes no sistema de canais radiculares (Kakekashi *et. al* 1965; Ricucci *et. al* 2010). Este dinamismo de sobrevivência está associado à sua adesão na dentina e os componentes desta como o colágeno e apatita carbonatada (Razatos *et. al* 1998; Love *et. al* 2001).

O presente estudo teve como objetivo analisar a adesão das bactérias ao substrato dentinário em dois diferentes experimentos. A etapa I promoveu a adesão de *E. faecalis* na dentina para depois passar pelo desafio dos irrigantes testados e já na etapa II foi tratada a superfície da dentina com as soluções antes da adesão das bactérias com a finalidade de entender se há mudança quanto a essa colonização. De acordo com os resultados deste estudo a hipótese nula ficou invalidada em vista de que se evidencia uma diferença estatisticamente significativa quanto aos grupos testados assim como nas duas etapas estudadas. Os resultados do presente estudo mostraram que o grupo do EDTA na primeira etapa teve maior quantidade de bactérias remanescentes e na etapa II maior adesão de bactérias após o tratamento da superfície dentinária.

Em vista destes resultados, segundo Razatos *et. al* (1998) a união destes micro-organismos a um substrato ocorre por duas interações denominadas como forças de van der Waals e forças eletrostáticas. Por outro lado, Cowan *et. al* (1987) e Miron *et. al* (2001) revelaram que existe duas formas de adesão das bactérias ao substrato. Na fase I se encontra relacionada a duas interações uma atrativa e outra repulsiva em virtude da distância entre microrganismo e substrato, e este tipo de união pode se dar em questão de segundos e minutos. Na fase II a adesão se encontra relacionada aos fatores de virulência da própria bactéria. Nesse contexto, durante o desenvolvimento deste trabalho estudos piloto foram executados para padronizar o tempo de adesão dos microrganismos, meio de cultura adequado e quantidade (concentração do inóculo) de *E. faecalis*. À vista disso observou-se que o tipo de meio influencia na formação de matriz extracelular e proliferação da bactéria como foi com meio de cultura BHI, no entanto, foram realizados teste de comparação com água Milli-Q que evidenciou melhor estabilidade durante o

processo de adesão diminuindo assim alterações durante as leituras em AFM. Além disso, todos os blocos de dentina foram irrigados com tiosulfato de sódio a 5% após uso das soluções com a finalidade de neutralizar e manter a estrutura das bactérias, como foi relatado por Quintana *et. al* (2017).

Outro fator importante, é a capacidade destas bactérias de invadir os túbulos dentinários e se manter em estado latente para logo se multiplicar e criar uma comunidade estável (Kowalski *et. al* 2006; Giardino *et. al* 2018). Em um ponto de vista clínico, o uso de instrumentos manuais ou mecanizados durante o preparo químico-mecânico não é suficiente para remover este biofilme estruturado, sendo que a anatomia de cada dente é diferente e deixa áreas tocadas e não tocadas pelo instrumento (Siqueira *et. al* 2018). Nesse contexto, a presença de matéria orgânica e os componentes da dentina deixam um ambiente adequado para que uma série de reações ácido-base melhorem sua adesão (Busscher *et. al*, 1984, Busscher *et. al*, 1998). De tal maneira, uma forma de explicar a persistência do *E. faecalis* é pela presença de colágeno tipo I e apatita carbonatada, dois componentes importantes da dentina (Love *et. al* 2001; Hubble *et. al* 2003; Kayauglu *et. al* 2005) onde essa bactéria pode aderir.

Os resultados do presente estudo, com uso do EDTA na primeira etapa teve pouca remoção de bactérias, porém, um fato interessante se observou nas imagens quanto à disposição e definição mais homogênea dos *E faecalis*. Outro fator relevante na etapa II foi a maior quantidade de bactérias aderidas mostrando diferenças estatisticamente significantes quando comparados com os outros grupos de estudo ($P > 0.05$). Estes achados estão de acordo com a literatura, que com o uso do EDTA como irrigante mostrou maior quantidade de bactérias aderidas ao substrato dentinário (Kishen *et. al* 2008; Xu *et. al* 2019). De acordo com Nallapareddy *et. al* (2000) a capacidade quelante do EDTA deixa exposta uma camada de colágeno e os túbulos dentinários permeáveis. Adicionalmente, Love *et. al* (2001) explicam que a persistência deste micro-organismo se encontra relacionada pela presença de soro humano. Isso foi evidenciado nos estudos de Cowan *et. al* (1987) e Miron *et. al* (2001) onde demonstraram que a presença de SBA (Albumina sérica bovina) pode alterar os receptores D-galactose e L-fucose da superfície bacteriana deixando o micro-organismo mais virulento. Isto não foi observado quando foi usado outro meio de cultura de uso comum como o BHI. Além

disso, o uso prolongado do EDTA modifica a superfície e permeabilidade dos túbulos dentinários como relatam Paciornik *et. al* (2019), influenciando também na adesão das bactérias (Yang *et. al* 2005).

A propriedade bactericida e dissolvente orgânica do hipoclorito de sódio o converte em um dos irrigantes mais utilizados durante a limpeza, instrumentação e desinfecção na terapia endodôntica (Siqueira *et. al* 2000, Zhender *et. al* 2005). Os resultados deste estudo, mostraram durante a etapa I a remoção de mais de 90% de bactérias aderidas na dentina como pode se observar na Figura 1 e, na etapa II foram visualizadas poucas bactérias aderidas ao substrato (Fig. 2). Tais efeitos, explicam que o NaOCl remove e dissolve o colágeno exposto, desta forma se evidencia que *E. faecalis* precisam de colágeno para aumentar a adesão na superfície da dentina (Yang *et. al* 2005). Este achado está de acordo com a literatura, que mostra que o uso do hipoclorito de sódio diminui a quantidade de bactérias durante a irrigação também afetando o colágeno (Yang *et. al* 2002; Zhender *et. al* 2005; Kishen *et. al* 2006). O uso sozinho do NaOCl como irrigante final afetou a superfície mostrando uma diminuição de bactérias aderidas (Xu *et. al* 2019).

Durante a terapia endodôntica, o uso de dois tipos de soluções é comum sendo os mais utilizados o NaOCl e um quelante como o EDTA (Zhender *et. al* 2005; Haapasalo *et. al* 2010). Durante o desenvolvimento deste estudo, empregou-se 5 mL de NaOCl 2,5% por 3 min e o EDTA 17% por 3 min. Na etapa I observou-se boa quantidade de biofilme removido quase da mesma forma ao usar o NaOCl sozinho com a diferença de obter túbulos dentinários mais permeáveis (devido ao EDTA), e, na etapa II a quantidade de bactérias aderidas foi mínima. Os resultados deste estudo têm concordância com os achados na literatura (Kishen *et. al* 2006) como o tipo de solução empregada altera a rugosidade da superfície como também sua composição química. Assim, o estudo de Xu *et. al* (2019) menciona que a quantidade do irrigante e tipo de solução altera a aderência dos micro-organismos. Não obstante, novas soluções estão sendo testadas nos últimos anos, entre eles o uso de um quelante fraco, o HEBP (Hidroxietilideno bifosfonato) ou também denominado como Etidronato, apresentando vantagens ao ser misturado com o NaOCl sem diminuir a eficácia bactericida deste, durante a instrumentação do sistema de canais radiculares e eliminação de micro-organismos que se encontram

protegidos nos túbulos dentinários pela presença de *smear layer* (Arias-Moliz *et. al* 2015, Tartari *et. al* 2013, Tartari *et. al* 2015, Tartari *et. al* 2018). Apesar destas características favoráveis do NaOCl em combinação com o Etidronato, neste estudo, observou-se que a remoção de bactérias foi mais de 50%, no entanto, na etapa II a adesão de bactérias foi significativa. Outro fator importante ressaltado por Arias-Moliz *et. al* (2015) e Deari *et. al* (2015) foi que a efetividade desta substância é dada pela quantidade e o tempo empregado durante a instrumentação e irrigação.

Outro fator importante é a rugosidade da superfície dentinária, neste caso, o bloco de dentina que ao ser tratada pelos irrigantes adquire uma rugosidade diferente. Xu *et al.* (2019) observaram que a rugosidade da dentina tratada com EDTA somente teve a maior rugosidade, seguida da dentina tratada com NaOCl e clorexidina. Neste estudo também ambos grupos G1 e G3 que foram tratados com EDTA apresentaram também os maiores valores de rugosidade. Neste estudo observou-se que o grupo do NaOCl + HEBP mostrou uma superfície mais homogênea e regular. Xu *et al* (2019) descreveram que uma superfície lisa e regular teve maior aderência bacteriana, corroborando assim este estudo que apresentou o grupo do NaOCl +HEBP, com mais bactérias. Supõe-se assim, que outros fatores, além da rugosidade, estão envolvidos com maior adesão bacteriana. O EDTA, um quelante eficiente, mostrou diferenças na superfície como na permeabilidade de túbulos dentinários em diferentes tempos e concentração, como demonstrado por Kishen *et al.* (2008), Paciornik *et al.* (2007) e Xu *et al.* (2019), devendo ser usado com cautela.

A microscopia de força atômica proporciona imagens topográficas em forma bi e tridimensional em escala nanométrica, isto em função de uma ponta fina com formato piramidal acoplada a um cantilever (Dorobantu *et. al* 2010) demonstrando ser eficaz na análise da interação de células e substratos como a dentina radicular (Dorobantu *et. al* 2012). Em vista disso, neste estudo foi empregado o microscópio de força atômica para realizar o mapeamento da dentina junto com as bactérias numa escala de 20 µm x 20 µm para todos os grupos. Considera-se que o uso desta ferramenta é suscetível a vibrações alterando o mapeamento ou varredura da amostra. Mais estudos devem ser realizados variando o tempo de irrigação, o volume e a concentração das soluções, podendo influenciar tanto na aderência como na remoção destas bactérias de dentro do sistema de canais radiculares.

4 CONCLUSÕES

4 CONCLUSÕES

O tipo de solução irrigadora e a mistura delas é um fator importante para remover uma quantidade significativa de micro-organismos assim como também pode alterar a superfície da dentina tratada dificultando a adesão dos mesmos. Dentre as soluções testadas, a associação NaOCl e EDTA (G3) eliminou maior quantidade de biofilmes formados assim como dificultou a adesão das bactérias sobre o substrato dentinário.

Outras análises são sugeridas para entender a força de adesão de bactérias sobre os diferentes substratos envolvidos na endodontia e como os irrigantes podem dificultar este processo.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

Appelbe OK, Sedgley CM Effects of prolonged exposure to alkaline pH on *Enterococcus faecalis* survival and specific gene transcripts. *Oral microbiology and immunology* (2007) **22**(3):169-74.

Arias-Moliz MT, Ordinola-Zapata R, Baca P, Ruiz-Linare M, García EG, Duarte MAH, Bramante CM, Ferrer-Luque CM Antimicrobial activity of Chlorhexidine, Peracetic acid and Sodium hypochlorite/etidronate irrigant solutions against *Enterococcus faecalis* biofilms. *International Endodontic Journal* Dec; (2015) **48**(12):1188-93;

Busscher HJ, Poortinga AT, Bos R Lateral and perpendicular interaction forces involved in mobile and immobile adhesion of microorganisms on model solid surfaces. *Current microbiology* (1998) **37**(5):319-23.

Busscher HJ, Weerkamp AH, van der Mei HC, van Pelt AW, de Jong HP, Arends J Measurement of the surface free energy of bacterial cell surfaces and its relevance for adhesion. *Applied and environmental microbiology* (1984) **48**(5):980-3

Chavez de Paz LE Development of a multispecies biofilm community by four root canal bacteria. *Journal of endodontics* (2012) **38**(3):318-23.

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

Cowan M, Taylor KG, Doyle RJ Energetics of the initial phase of adhesion to streptococcus sanguis to hydroxiapatite. *Journal of Bacteriology* (1987) **169**(7), 2995-3000

De-Deus G, Paciornik S, Pinho Mauricio MH, Prioli R Real-time atomic force microscopy of root dentine during demineralization when subjected to chelating agents. *International Endodontic Journal* (2006) **43**, 657-61

Dorobantu LS, Goss GG, Burrell RE Atomic force microscopy: a nanoscopic view of microbial cell surfaces. *Micron* (2012) **43**(12):1312-22.

Dorobantu LS, Gray MR Application of atomic force microscopy in bacterial research. *Scanning*. (2010) **32**(2):74-96.

Giardino L, Del Fabbro M, Cesario F, Fernandes FS, Andrade FB Antimicrobial effectiveness of combinations of oxidant and chelating agents in infected dentine: an ex vivo confocal laser scanning microscopy study. *International Endodontic Journal* (2018) **51**, 448-456.

Gu LS, Huang XQ, Griffin B, Bergeron BR, Pashley DH, Niu LN, et al Premium non nocere - The effects of sodium hypochlorite on dentine as used in endodontics. *Acta biomaterialis* (2017) **61**:144-56.

Guerreiro-Tanomaru JM, de Faria-Junior NB, Duarte MA, Ordinola-Zapata R, Graeff MS, Tanomaru-Filho M Comparative analysis of *Enterococcus faecalis* biofilm formation on different substrates. *Journal of Endodontics* (2013) **39**(3):346-50.

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

Hubble TS, Hatton JF, Nallapareddy SR, et al. Influence of *Enterococcus faecalis* proteases and the collagen-binding protein, Ace, on adhesion to dentin. *Oral Microbiol Immunol* (2003) **18**:121-6.

Kakekashi S, Stanley HR, Fitzgerald RJ. The effects of surgical exposures of dental pulps in germ-free and conventional laboratory rats. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology* (1965) **20**(3): 340-349

Kayaoglu G, Erten H, Orstavik D Growth at high pH increases *Enterococcus faecalis* adhesion to collagen. *International Endodontic Journal* (2005) **38**(6):389-96.

Kishen A, George S, Kumar R *Enterococcus faecalis*-mediated biomineralized biofilm formation on root canal dentine in vitro. *Journal of biomedical materials research* (2006) **77**(2):406-15.

Kishen A, Sum CP, Mathew S, Lim CT Influence of irrigation regimens on the adherence of *Enterococcus faecalis* to root canal dentin. *Journal of endodontics* (2008) **34**(7):850-4.

Kowalski WJ, Kasper EL, Hatton JF, et al. *Enterococcus faecalis* adhesin, Ace, mediates attachment to particulate dentin. *Journal of Endodontics* (2006) **32**: 634-7

Kreplak L Introduction to Atomic Force Microscopy (AFM) in Biology. *Current protocols in protein science*. (2016) **85**:17 7 1- 7 21.

Love RM Enterococcus faecalis: a mechanism for its role in endodontic failure. *International Endodontic Journal* (2001) **34**:399-405

Miron J, Ben-Ghedalia D, Morrison M Invited review: adhesion mechanism of rumen cellulolytic bacteria. *J. Dairy Sci* (2001) **84**: 1294-1309

Nallapareddy SR, Qin X, Weinstock GM, Hook M, Murray BE. *Enterococcus faecalis* adhesin, ace, mediates attachment to extracellular matrix proteins collagen type IV and laminin as well as collagen type I. *Infect Immun* (2000) **68**: 264:3325-34

Neves, MAS, Provenzano JC. Rôças IN, Siqueira JF Clinical Antibacterial Effectiveness of Root Canal Preparation with Reciprocating Single-instrument or Continuously Rotating Multi-instrument Systems. *Journal of Endodontics* Jan; (2016) **42**(1):25-9.

Paciornik S, De-Deus G, Reis CM, Pinho MMH, Prioli R. In *situ* atomic force microscopy and image analysis of dentine submitted to acid etching. *J Microsc.* (2007) **225**:236-43.

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

Quintana RM, Jardine AP, Montagner F, Parolo CCF, Morgental RD, Kooper PMP Effect of human, dentin, albumin and lipopolysaccharide on the antibacterial activity of endodontic activity of endodontic irrigants *J Conserv Dent.* Sep-Oct; (2017) **20**(5): 341–345

Razatos A, Ong YL, Sharma MM, Georgiou G Molecular determinants of bacterial adhesion monitored by atomic force microscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (1998) **95**(19):11059-64.

Ricucci D, Siqueira Jf Jr Biofilms and apical periodontitis: study of prevalence and association with clinical and histopathologic findings. *Journal of Endodontics* (2010) Aug;**36**(8): 1277-8

Scelza MF, Pierro V, Scelza P, Pereira M Effect of three different time periods of irrigation with EDTA-T, EDTA, and citric acid on smear layer removal. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics* (2004) **98**(4):499-503.

Senechal A, Carrigan SD, Tabrizian M Probing surface adhesion forces of *Enterococcus faecalis* to medical-grade polymers using atomic force microscopy. *Langmuir: the ACS Journal of surfaces and colloids* (2004) **20**(10):4172-7

Siqueira JF Jr, Roças JN, Marceliano-Alves MF, Perez AR, Ricucci D Unprepared root canal surface areas: causes, clinical implications, and therapeutic strategies. *Brazilian Oral Research* (2018) **18**;32 (suppl1): e65

Siqueira JF, Jr Microbial causes of endodontic flare-ups. *International Endodontic Journal*.(2003) **36**(7):453-63.

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

Tartari T, de Almeida Rodrigues Silva E Souza P, Vila Nova de Almeida B, Carrera Silva Júnior JO, Facíola Pessoa O, Silva E Souza Junior MH A new weak chelator in endodontics: effects of different irrigation regimens with etidronate on root dentin microhardness. *International Journal of Dentistry* (2013) 1-6

Tartari T, Duarte Junior AP, Silva Júnior JO, Klautau EB, Silva E Souza Junior MH, Silva E Souza Junior Pde A Etidronate from medicine to endodontics: effects of different irrigation regimes on root dentin roughness. *Journal of Applied Oral Science* (2013) **21**, 409-15

Tartari T, Guimarães BM, Amoras LS, Duarte MA, Silva e Souza PA, Bramante CM Etidronate causes minimal changes in the ability of sodium hypochlorite to dissolve organic matter. *International Endodontic Journal* (2015) **48**(4):399-404.

Tartari T, Bachmann L, Zancan RF, Vivan RR, Duarte MAH, Bramante CM1Analysis of the effects of several decalcifying agents alone and in combination with sodium hypochlorite on the chemical composition of dentine. *International Endodontic Journal* Jan (2018);**51** Suppl 1: e42-e54.

Torabinejad M, Khademi AA, Babagoli J, Cho Y, Johnson WB, Bozhilov K, et al. A new solution for the removal of the smear layer. *Journal of endodontics* (2003) **29**(3):170-5.

Worcester DL, Miller RG, Bryant PJ Atomic force microscopy of purple membranes. *Journal of microscopy* (1988) **152**(Pt 3):817-21.

Xu J, He J, Shen Y, Zhou X, Huang D, Gao Y, Haapasalo M Influence of endodontic procedure on the adherence of *Enterococcus faecalis* (2019) **45**(7): 943-949

Yang SE, Bae KS Scanning electron microscopy study of the adhesion of *Prevotella nigrescens* to the dentin of prepared root canals. *Journal of Endodontics* (2002) **28**: 433-7

Yang SE, Cha JH, Kim ES, et al. Effect of smear layer and chlorhexidine treatment on the adhesion of *Enterococcus faecalis* to bovine dentin. *Journal of Endodontics* (2006) **32**: 634-7

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

Zehnder M, Schmidlin P, Sener B, Waltimo T Chelation in root canal therapy reconsidered. *Journal of Endodontics* (2005) **31**, 817-20

APÊNDICE

APÊNDICE – DECLARAÇÃO DE USO EXCLUSIVO DE ARTIGO EM TESE

Declaramos que estamos cientes que o artigo Análise topográfica de biofilmes tratados com diferentes irrigantes sobre substratos também tratados, em Microscopia de Força Atômica, serão incluídos na tese de aluna (Evelyn Giuliana Velásquez Espedilla) e não poderão ser utilizados em outros trabalhos de programas de pós-graduação da Faculdade de Odontologia de Bauru da Univerdade de São Paulo.

Bauru, 30 de novembro de 2020

Evelyn Giuliana Velásquez Espedilla
Autor



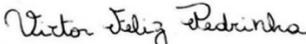
Assinatura

Mariciel Rosário Cárdenas Cuellar
Autor



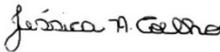
Assinatura

Victor Feliz Pedrinha
Autor



Assinatura

Jéssica de Almeida Coelho
Autor



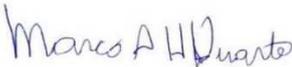
Assinatura

Allan Victor Ribeiro
Autor



Assinatura

Marco Antônio Hungaro Duarte
Autor



Assinatura

Flaviana Bombarda de Andrade
Autor



Assinatura