

UNESP – Universidade Estadual Paulista
Faculdade de Odontologia de Araraquara



CAMILA ALMEIDA NASCIMENTO

**AÇÃO ANTIBACTERIANA DA CETRAMIDA ASSOCIADA ÀS SOLUÇÕES
IRRIGADORAS SOBRE *ENTEROCOCCUS FAECALIS***

Araraquara

2013



UNESP – Universidade Estadual Paulista
Faculdade de Odontologia de Araraquara



CAMILA ALMEIDA NASCIMENTO

**AÇÃO ANTIBACTERIANA DA CETRAMIDA ASSOCIADA ÀS SOLUÇÕES
IRRIGADORAS SOBRE *ENTEROCOCCUS FAECALIS***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Odontologia – Área de Endodontia – da Faculdade de Odontologia de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista para o título de Mestre em Odontologia.

Orientadora: Profa. Dra. Juliane Maria
Guerreiro Tanomaru

Araraquara

2013

CAMILA ALMEIDA NASCIMENTO

**AÇÃO ANTIBACTERIANA DA CETRAMIDA ASSOCIADA ÀS SOLUÇÕES
IRRIGADORAS SOBRE *ENTEROCOCCUS FAECALIS***

COMISSÃO JULGADORA

DISSERTAÇÃO PARA A OBTENÇÃO DE GRAU DE MESTRE

Presidente e orientadora: Profa. Dra. Juliane Maria Gueirreiro Tanomaru

2º Examinador: Prof. Dr. Idomeo Bonetti Filho

3º Examinador: Prof. Dra. Flaviana Bombarda de Andrade

Araraquara, 11 de março de 2013

DADOS CURRICULARES

CAMILA ALMEIDA NASCIMENTO

- Nascimento:** 12 de maio de 1986 – Votuporanga-SP
- Filiação:** Carlos Rosa do Nascimento
Natalina Alves Almeida Nascimento
- 2002-2004** Curso Normal Superior em Nível Médio
Centro de Formação e Aperfeiçoamento para o Magistério – CEFAM- Santa Fé do Sul-SP
- 2005-2009** Curso de Graduação em Odontologia
Faculdades Integradas de Santa Fé do Sul - FUNEC – Santa Fé do Sul-SP
- 2010** Curso de Aperfeiçoamento em Endodontia
Faculdade de Odontologia de Araraquara – Universidade Estadual Paulista- FOAr UNESP- Araraquara-SP
- 2011-2013** Curso de Pós Graduação em Endodontia - Nível Mestrado
Faculdade de Odontologia de Araraquara – Universidade Estadual Paulista- FOAr UNESP- Araraquara-SP
- Associações** Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica – SBPqO
International Association for Dental Research – IADR

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho...

A **Deus**, que guia a minha vida. Se não fosse a **Tua** vontade, eu não estaria neste mundo, a escolha certa não teria acontecido, o caminho a ser percorrido seria muito mais difícil. Ele é quem me dá forças para atravessar os obstáculos, me proporciona saúde, paz, amigos, uma família espetacular, e é o responsável por todas as minhas conquistas. Não consigo viver longe de **Ti**, Senhor!

Aos meus pais, **Carlos Rosa do Nascimento** e **Natalina Alves Almeida Nascimento**, que optaram por ter um filho e permitiram que eu nascesse nesta família exemplar, que eu amo tanto. Nas maiores dificuldades, sempre estivemos juntos. Ainda que a maior parte do tempo foi marcada pela distância, nunca deixamos de estar unidos no amor de Deus. Sempre confiaram muito em mim e vibraram muito a cada conquista alcançada. Vocês são minha estrutura, meu conforto, estão sempre me orientando nas dificuldades, permitindo que os meus caminhos sejam mais facilmente percorridos. E eu descobri que, seguindo os conselhos de vocês, tudo acontece da melhor forma! É difícil expressar neste espaço tudo o que vocês representam para mim. Agradeço pela paciência, pela atenção, pela dedicação que vocês sempre tiveram para a minha educação, pelos ensinamentos, pelo carinho, pelas comidas gostosas que sempre me esperam na volta para a casa. Agradeço também por todo apoio emocional e financeiro. Peço desculpas pelos momentos de incompreensão e por aqueles que agi de forma grossa, explodindo nos momentos de estresse. Sem a confiança e ajuda de vocês eu não chegaria onde estou. Esta conquista, portanto, é nossa! Amo muito vocês!

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Agradeço de forma muito especial...

Ao meu irmão, **Carlos Eduardo Almeida Nascimento**, que sempre me acompanhou na infância e fez com que meus dias fossem repletos de alegrias. Agradeço pelo amor, pelos ensinamentos, pelos momentos que passamos juntos. Agradeço por você permanecer junto com nossos pais na minha ausência, sempre disposto a ajudá-los. Agradeço também pelo apoio dado em diversas circunstâncias. Peço desculpas pelos momentos em que agi com impaciência e incompreensão. Tenho muito orgulho de você e falo para todo mundo que tenho o irmão mais lindo do mundo! Muita sorte no seu curso de engenharia civil. Eu te amo, “Nê”!

A minha cunhada **Luana Mayra Fernandes**, que é companheira, amiga, uma namorada dedicada e que cuida muito bem do meu querido irmão. Agradeço pela presença constante na minha família, pelo amor que tem dado ao meu irmão e meus pais e pelos momentos de alegria em família.

Ao meu noivo, **Rafael Carlos Mendes**, que com todo amor, me apoiou desde o início. Ele que, após anos de convívio na mesma cidade do interior, apoiou a ideia de morarmos distantes um do outro para que eu realizasse o curso de Mestrado em Araraquara. Agradeço pela compreensão e respeito com os meus compromissos, pelo amor, carinho, pelo esforço para ficarmos juntos, pela dedicação ao namoro, e mais recentemente, ao noivado, pelo orgulho que você tanto demonstra. Peço desculpas pela ausência em momentos especiais e às vezes, pela impaciência. Peço desculpas também pelas circunstâncias que agi de forma rude ou grosseira nos momentos de estresse. Obrigada por fazer parte da minha vida! Estar com você, meu amor, é maravilhoso.

Agradeço pelo seu amor, por me compreender, me acalmar, me aconselhar e pelo companheirismo. Tenho muito orgulho de ser sua noiva. Te amo muito!

Aos meus sogros **Maria Suerli Piloni e Erotides Ferreira Mendes**, que com muito amor e dedicação criaram seus filhos de forma inquestionável. Agradeço pela acolhida na vossa família, pelo carinho, pelos ensinamentos, pelos momentos maravilhosos que passamos juntos. Que Deus os abençoe! Estimo muito vocês dois!

A minha cunhada **Sandra Marcella Mendes**, minha comadre. Agradeço muito pela sua amizade, pelos conselhos e ensinamentos, pelos incontáveis momentos deliciosos que sempre nos esperava em Três Fronteiras. Agradeço pela incansável dedicação aos nossos cabelos e por cada mensagem no celular, que inspiravam os meus dias. Agradeço pela confiança de ter sido escolhida para ser madrinha de batismo da sua filha encantadora. Que Deus abençoe muito vocês! Amo vocês!

À minha afilhada **Mary Éllen Mendes Gonçalves**, que veio neste mundo para iluminar a família com sua alegria, inteligência e inocência. É muito bom receber o seu carinho e ver seu lindo sorriso no rosto. Que os anjos da guarda sempre te protejam e que Deus te abençoe muito. A “madrinha” te ama!

Aos meus cunhados **Alexandro Renato Mendes e Celiana Tessaro**, um casal ímpar onde a alegria está sempre presente. Impossível passar momentos que não são repletos de sorrisos, estando junto destas pessoas maravilhosas. Agradeço pela amizade, confiança e pelos deliciosos momentos que passamos juntos. Que Deus os abençoe e proteja. Amo vocês!

À minha família, representada pelos meus tios - **Gilmar de Souza e Almeida e Rosana Franco de Camargo de Souza e Almeida, Lindolpho de Souza e Almeida Filho, João Rosa do Nascimento e Aparecida Nascimento, Salvador Rosa do**

Nascimento (*in memoriam*) e **Joana Nascimento**, - e primos - **Ana Beatriz**, **Ana Carolina** e **Nelson** – agradeço pelo imenso carinho, pelo apoio e pela torcida contínua para que eu pudesse correr atrás dos meus sonhos e conquistar meus objetivos.

AGRADECIMENTOS

À **Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP)**, na presença de seu Magnífico Reitor **Prof. Dr. Júlio César Durigan** e Vice Reitora **Profa. Dra. Marilza Vieira Cunha Rudge**.

À **Faculdade de Odontologia de Araraquara (FOAr)** da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), na pessoa de sua diretora **Profa. Dra. Andreia Affonso Barreto Montandon** e de sua vice-diretora **Profa. Dra. Elaine Maria Sgavioli Massucato**, pela oportunidade de crescimento profissional concedida.

Ao **Departamento de Odontologia Restauradora** da Faculdade de Odontologia de Araraquara (UNESP), representado pelo Chefe de Departamento **Prof. Dr. Fábio Luiz Camargo Villela Berbert** e pelo vice-chefe **Prof. Dr. Edson Alves Campos**.

Ao **Programa de Pós-Graduação em Odontologia** da Faculdade de Odontologia de Araraquara (UNESP), na pessoa de seu coordenador **Prof. Dr. Mário Tanomaru Filho** e de seu vice-coordenador **Prof. Dr. Carlos Rossa Junior**, pela oportunidade de ser aluno deste tão conceituado programa.

À minha orientadora, **Profa. Dra. Juliane Maria Guerreiro Tanomaru**, exemplo de professora e pesquisadora. Uma pessoa determinada, sábia e muito dedicada. Agradeço muito pela oportunidade de ser sua orientada, pela paciência durante os ensinamentos, pelos momentos de muita aprendizagem compartilhados, pela confiança depositada no meu trabalho, pela amizade e respeito. Muito obrigada pela companhia durante os experimentos, mesmo nas etapas realizadas na USP em Bauru - SP, quando a senhora sempre se dispunha a me acompanhar. Espero que a nossa parceria não se limite ao mestrado, porque sei que ainda tenho muito a aprender com o

seu vasto conhecimento sobre endodontia, microbiologia e sobre a vida. Deixo aqui os meus sinceros agradecimentos.

Ao **Prof. Dr. Mário Tanomaru Filho**, docente da disciplina de Endodontia da Faculdade de Odontologia de Araraquara (UNESP), que desde a primeira vez que estive em Araraquara, me acolheu muito bem e permitiu que as portas da FOAr se abrissem para mim. Agradeço pelos ensinamentos, paciência, respeito, confiança e amizade durante estes três anos de convivência. Sou eternamente grata por tudo o que o senhor e a profa. Juliane fizeram por mim desde que vim para Araraquara e tenho muito orgulho de ser aluna de vocês. Obrigada por tudo!

Ao **Prof. Dr. Idomeo Bonetti Filho**, docente da disciplina de Endodontia da Faculdade de Odontologia de Araraquara (UNESP), pelo carinho e atenção. Agradeço pela paciência na transmissão dos conhecimentos e acima de tudo pela amizade. Sempre abriu as portas de sua casa para confraternização entre os pós-graduandos e docentes, onde passamos momentos deliciosos. Muito obrigada, professor!

Ao **Prof. Dr. Fábio Luiz Camargo Villela Berbert**, docente da disciplina de Endodontia da Faculdade de Odontologia de Araraquara (UNESP), pelo convívio enriquecedor durante estes anos. Agradeço pela disponibilidade, paciência, respeito e pela vontade de ensinar Endodontia.

Ao **Prof. Dr. Milton Carlos Kuga**, docente da disciplina de Urgência em Odontologia da Faculdade de Odontologia de Araraquara (UNESP), o principal responsável pela minha vinda para Araraquara. Agradeço pela contagiante orientação de TCC durante a graduação na FUNEC, em Santa Fé do Sul – SP, onde descobri o prazer de realizar pesquisa. Obrigada pela confiança e pelo imenso apoio para a minha vinda para a FOAr. Agradeço pela sua forma de ensinar endodontia, que faz com que todos se

apaixonem pela disciplina, e comigo não poderia ter sido diferente. Muito obrigada pela sua amizade.

À **Profa. Dra. Gisele Faria**, docente da disciplina de Urgência em Odontologia da Faculdade de Odontologia de Araraquara (UNESP), que com seu jeito meigo e delicado, sempre foi muito querida por todos. Agradeço muito pela paciência, pelos constantes ensinamentos, pelo carinho e respeito. Muito mais que professora, encontro em você, uma companheira. Muito obrigada pelos conselhos sábios e pela grande amizade construída. Agradeço ainda o apoio imenso durante este período de convivência na FOAr, e principalmente, para a realização desta dissertação.

Ao **Prof. Dr. Renato de Toledo Leonardo**, docente da disciplina de Endodontia da Faculdade de Odontologia de Araraquara (UNESP), pela amizade, respeito e dedicação para ensinar endodontia. Graças a ele, o nome da Faculdade de Odontologia de Araraquara é levado para o mundo inteiro, contribuindo para que ela se torne cada vez mais conhecida. Agradeço muito pela sua disponibilidade em ajudar a todos os pós-graduandos quando necessário.

Aos **funcionários do Departamento de Odontologia Restauradora** da Faculdade de Odontologia de Araraquara (UNESP), **Marinho, Wanderley, Creusa, Dona Conceição, Dona Cida, Priscila, Diva, Denise, Rosângela, Ana Maria e Lucinha**, pelo convívio agradável e pela prontidão e simpatia com que sempre me ajudaram.

Aos **funcionários da Seção de Pós-Graduação** da Faculdade de Odontologia de Araraquara (UNESP), **Mara Cândida Munhoz do Amaral, José Alexandre Garcia e Sergio Luiz Gusmão Gimenes Romero**, pelo auxílio prestado durante todo o período que estive em Araraquara, mesmo antes de iniciar o curso de mestrado, pela disponibilidade e pela atenção com que sempre atenderam às minhas solicitações.

Aos **funcionários da Biblioteca** da Faculdade de Odontologia de Araraquara (UNESP), pela preparação da ficha catalográfica, pelas orientações quanto às normas de preparação deste trabalho e pela ajuda na busca de dissertações, teses, livros artigos e revistas. Gostaria de deixar registrado um agradecimento adicional para **Ceres Maria Carvalho Galvão de Freitas** e **Marley Cristina Chiusoli Montagnoli** pela grande ajuda na revisão final desta dissertação.

Ao **Prof. Dr. Marco Antônio Húngaro Duarte** da Faculdade de Odontologia de Bauru (FOB) da Universidade de São Paulo (USP), **Prof. Dr. Arnaldo Sant'Anna Junior** e **Prof. Guilherme Hiroshi Yamanari**, meus professores durante a graduação na FUNEC em Santa Fé do Sul – SP, que transmitiram seus conhecimentos de maneira excelente e fizeram com que muitos alunos pudessem se encantar pela disciplina, e sem dúvida, também são responsáveis pelo caminho por mim percorrido.

A **Márcia Sirlene Zardin Graeff** do Laboratório Multi-usuário da Faculdade de Odontologia de Bauru (FOB) da Universidade de São Paulo (USP), por sua atenção, disponibilidade, simpatia, e ajuda na aquisição das imagens no microscópio confocal.

Ao **Prof. Dr. Luiz Chávez de Paz** da Universidade de *Connecticut*, pela gentileza em permitir que o nosso grupo de pesquisa utilizasse o programa *BioImage_L*.

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)**, pela bolsa de estudos concedida durante todo o curso de mestrado.

Aos colegas da pós-graduação, **Ariele Patrícia Rabello**, **Flávia Angélica Guiotti**, **Rafael Vicente Ferino**, **Rosymere Freitas de Souza**, **Arturo Javier Aranda Garcia**, **Arnaldo Sant'Anna Júnior**, **Adriana Simionatto Guinesi**, **Érica Gouveia Jorge**, **Guilherme Ferreira da Silva**, **Loise Pedrosa Salles**, **Norberto Batista de Faria Júnior**, **Rodrigo Ricci Vivan**, **Adinael Trindade Junior**, **Camila Galletti Espir**, **Carolina Venção**, **Fernando Vasquez Garcia**, **Katia Keine**, **Letícia Boldrin**

Mestieri, Miriam Magro, Tiago Fonseca, Alana Priscila Souza Aguiar, Carolina Andolfatto, Ana Livia Gomes Cornélio, Gisselle Moraima Chavez Andrade, Paula Nakazone, Roberta Bosso, Raqueli Viapiana e Elisandra Márcia Rodrigues , pela amizade, confiança e agradável convivência.

Aos colegas da minha turma de mestrado **Matheus Franco da Frota e Natália Kalatzis**, pela força durante o decorrer do curso. Obrigado pela amizade e pelo apoio.

Gostaria de deixar um agradecimento muito especial a **Norberto Batista de Faria Júnior**, pelo imenso apoio durante o curso, e principalmente, pela ajuda nas etapas experimentais do meu trabalho. Agradeço também pela dedicação e paciência para me ensinar a trabalhar com o software para a análise dos biofilmes. Mesmo à distância, não hesitou em ajudar. Você é merecedor de tudo que está acontecendo na sua vida. Que Deus te abençoe muito!

Agradeço de forma muito carinhosa à **Gisselle Moraima Chavez Andrade**, minha amiga, companheira, que sempre teve paciência para me ouvir e me acalmar diante das dificuldades. Obrigada pela sua presença constante! Você é muito especial! À **Roberta Bosso**, que desde quando cheguei nesta casa, sempre se mostrou disposta a ajudar. Dona de um coração enorme e encanta a todas as pessoas com seu jeito de ser. Obrigada pela amizade, confiança e compreensão. Nunca me esquecerei de você! À **Leticia Boldrin Mestieri, Camila Galletti Espir e Ana Livia Gomes Cornélio**, pela grande amizade construída, pela paciência e ajuda para a conclusão deste trabalho. Vocês foram são muito importantes para mim! À **Rosymere Freitas de Souza Cruvinel**, muito mais que companheira de quarto, minha amiga. Agradeço pelos momentos vividos durante os dois anos que você esteve em Araraquara. Agradeço pelos conselhos, carinho e amizade. Sinto muita falta de você! À **Mara Cândida Munhoz do Amaral**, uma pessoa maravilhosa tanto pessoal quando profissionalmente. Agradeço

pela sua ajuda desde o início, pela amizade, carinho e confiança. Muito obrigada pelo convite para a experiência maravilhosa no “Seminário de Vida no Espírito Santo”.

Enfim, sou muito grata a todas as pessoas que fizeram parte destes anos maravilhosos que estive em Araraquara. **Meus sinceros agradecimentos!**

*“Se eu vi mais longe, foi
por estar de pé sobre
ombros de gigantes.”*

Isaac Newton

Nascimento CA. Ação antibacteriana da cetramida associada às soluções irrigadoras sobre *Enterococcus faecalis* [Dissertação de Mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2013.

RESUMO

O objetivo do estudo foi avaliar a ação das soluções de hipoclorito de sódio e clorexidina associadas à cetramida e do QMiX, produto comercial que combina clorexidina, EDTA e cetramida, sobre *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) em fase planctônica e biofilme. As soluções avaliadas foram: G1: Hipoclorito de sódio (NaOCl) a 2,5%; G2: NaOCl a 2,5% + cetramida (CTR) a 0,2%; G3: Clorexidina (CLX) a 2%; G4: CLX a 2% + CTR a 0,2%; G5: CTR a 0,2%; G6: QMiX. Como controle negativo foi utilizada solução salina. O estudo foi dividido em dois capítulos. No capítulo 1, foi realizada a avaliação da atividade antibacteriana sobre os micro-organismos em fase planctônica e biofilme. Para o contato direto com *E. faecalis* em fase planctônica, 50 µl da suspensão bacteriana foram colocados em tubos contendo 1,45 mL de cada solução irrigadora ou associações e, após os períodos de 1 e 3 minutos foram utilizadas soluções neutralizantes da ação antimicrobiana dos irrigantes. Em seguida, foi realizada diluição decimal seriada e plaqueamento em meio Tryptic Soy agar (TSa). Para a indução dos biofilmes foram utilizados blocos de dentina bovina como substrato no período de 14 dias. Os biofilmes foram colocados em contato com as soluções avaliadas, e transferidos para tubos de ensaio contendo soluções neutralizantes. Após agitação por 60 segundos para a suspensão das células remanescentes, foi realizada diluição decimal seriada e plaqueamento em TSa em triplicata. A incubação foi realizada em microaerofilia a 37°C por 24 horas e a análise efetuada por meio da contagem de UFC mL⁻¹. Os resultados foram submetidos aos testes ANOVA e Tukey, com nível de significância de 5%. Todas as soluções irrigadoras e associações avaliadas eliminaram

completamente os micro-organismos em fase planctônica. Sobre biofilme, somente NaOCl e NaOCl+CTR apresentaram 100% de eliminação bacteriana. A CLX mostrou ação semelhante à CLX+CTR, CTR e QMiX após 1 min ($p>0,05$). A CTR e QMiX foram similares após 3 min. CLX e CLX+CTR mostraram atividade antibiofilme comparável à NaOCl e NaOCl+CTR após 3 min, no entanto não foram capazes de eliminar os micro-organismos do biofilme. Conclui-se que a associação da CTR às soluções irrigadoras não altera a efetividade antibiofilme. No Capítulo 2, foi realizada a análise da atividade antibiofilme das soluções irrigadoras e associações por microscopia confocal de varredura a laser. Os biofilmes de 14 dias foram colocados em contato direto com as soluções irrigadoras por 1 minuto, e após a lavagem em soluções neutralizantes, foram corados com Live/Dead® BacLight, sendo levados para a análise em microscópio confocal de varredura a laser. As imagens foram avaliadas no software BioImage_L, sendo analisados biovolume total (μm^3), biovolume verde (μm^3) e percentual de cobertura do substrato. Os dados foram submetidos ao teste não paramétrico de Kruskal-Wallis e de Dunn, com nível de significância de 5%. Os menores valores de biovolume total e verde foram apresentados por NaOCl e NaOCl+CTR ($p<0,05$). CTR e QMiX mostraram valores intermediários para o biovolume verde após sua utilização, com atividade superior à CLX e CLX+CTR ($p<0,05$). NaOCl e NaOCl+CTR mostraram maior capacidade de remoção de micro-organismos e limpeza do substrato. QMiX não proporcionou eliminação bacteriana sobre a dentina, com resultados intermediários. Conclui-se que NaOCl a 2,5% e NaOCl+CTR a 0,2% são os únicos irrigantes com maior atuação sobre a viabilidade, arquitetura e eliminação de biofilme.

Palavras-chave: Biofilme; Endodontia; *Enterococcus faecalis*; Irrigantes do Canal Radicular.

Nascimento CA. Antibacterial action of cetrimide associated irrigants solutions on *Enterococcus faecalis* [Dissertação de Mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2013.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the action of conventional endodontic solutions such as sodium hypochlorite and chlorhexidine associated with cetrimide and QMiX, a commercial product composed by chlorhexidine, EDTA and cetrimide, on biofilm and planktonic phase of *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212). The evaluated solutions were: G1: 2.5% Sodium Hypochlorite (NaOCl); G2: 2.5% NaOCl + 0.2% cetrimide (CTR); G3: 2% Chlorhexidine (CLX) 2%; G4: 2% CLX + 0.2% CTR; G5: 0.2% CTR; G6: QMiX. Saline solution was used as negative control. The study was divided into two chapters. In Chapter 1, the antibacterial activity of the solutions on microorganisms in planktonic phase and biofilm was evaluated. For direct contact with *E. faecalis* in planktonic phase, 50 μ L of bacterial suspension were placed in tubes containing 1.45 mL of each irrigation solution or associations and after 1 and 3 minutes, neutralizing solutions were used to stop of the antimicrobial action of endodontic solutions. Decimal serial dilutions were performed and the suspensions were plated in Tryptic Soy agar medium (TSA). Dentin bovine blocks were used as substrate for induction of biofilms for 14 days. The biofilms were placed in contact with the solutions evaluated and transferred to test tubes containing neutralizing solution. After agitation for 60 seconds to suspend the remaining cells, decimal serial dilutions were performed and the suspensions were cultivated in triplicate on TSA plates. The incubation was held in microaerophilic at 37 ° C for 24 hours and the analysis was performed by counting CFU mL⁻¹. The results were submitted to ANOVA and Tukey test, with significance level of 5%. All irrigating solutions and

associations evaluated completely eradicated the microorganisms in planktonic phase. On biofilm, only NaOCl and NaOCl+CTR showed 100%- of bacterial elimination. CLX showed similar activity to CLX+CTR, CTR and QMiX after 1 min ($p>0.05$). CTR were similar QMiX after 3 min. CLX and CLX+CTR presented similar antibiofilm activity to NaOCl and NaOCl + CTR after 3 min, however, these solutions were not able to eradicate micro-organisms of the biofilm. It is concluded that the association of the CTR does not alter the antibiofilm effectiveness of endodontic solutions. In Chapter 2, the antibiofilm activity of endodontic solutions and associations was analysed by confocal laser scanning. Biofilms were cultivated for 14 days and then placed in direct contact with the irrigating solutions for 1 minute, after this period they were washed in neutralizing solutions and stained with dye Live/Dead® BacLight for analysis under a confocal laser scanning microscope. The images were evaluated using the software BioImage_L and the parameters total biovolume (μm^3), green biovolume (μm^3) and percent substratum coverage were evaluated. The data were analysed to nonparametric Kruskal-Wallis and Dunn, with a significance level of 5%. The lowest values of total biovolume and green biovolume were presented by NaOCl and NaOCl+CTR ($p<0.05$). CTR and QMiX showed intermediate values for the green biovolume after use and higher activity than CLX and CLX+CTR ($p<0.05$). NaOCl and NaOCl+CTR showed better microorganism's removal capacity and substrate cleaning. QMiX did provided bacterial elimination on dentin, with intermediate results. It is concluded that 2.5% NaOCl and NaOCl+ 0.2% CTR are the only solutions with higher acting on the viability, architecture and removal of biofilm.

Keywords: Biofilm; Endodontics; *Enterococcus faecalis*; Root Canal Irrigants

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BHI: Brain Heart Infusions

CLX: Clorexidina

CTR: Cetramida

DO₆₀₀: densidade óptica de 600 nm

EDTA: Ácido etilenodiaminotetracético

E. faecalis: *Enterococcus faecalis*

HOCl: Ácido hipocloroso

mJ m⁻²: Megajoule por milímetro quadrado

NaOCl: Hipoclorito de Sódio

NaOH: Hidróxido de sódio

SCR: sistema de canais radiculares

TSA: Tryptic Soy Agar

UFC mL⁻¹: unidades formadoras de colônia por mililitro

μL: microlitro

μm: micrômetro

μm³: micrometro cúbico

SUMÁRIO

1 Introdução.....	21
2 Proposição.....	28
3 Capítulo 1.....	29
4 Capítulo 2.....	50
5 Discussão.....	69
6 Conclusão.....	72
Referências.....	73
Apêndice.....	82

1 INTRODUÇÃO

Bactérias e seus subprodutos representam fatores importantes para o estabelecimento da inflamação pulpar e periapical²⁹. Após o tratamento endodôntico, a persistência de micro-organismos no sistema de canais radiculares contribui para o desenvolvimento e/ou manutenção da lesão periapical⁵⁹.

Enterococcus faecalis é um micro-organismo anaeróbio facultativo presente na microbiota intestinal humana, trato genital feminino e em menor quantidade, na cavidade oral⁶⁵. Porém pode estar presente em infecções endodônticas primárias em um percentual que varia de 4 a 40% e em maior proporção, entre 24 a 77%, em canais radiculares em casos de insucesso após tratamento endodôntico^{49, 51, 52, 59, 61, 63, 65}. É altamente resistente, capaz de sobreviver em condições extremas de oxigênio e nutrientes^{17, 45, 54}, pH alcalino e concentração salina⁶⁵. Apresenta ainda como fator de virulência, a habilidade de competir com outras células e alterar a resposta do hospedeiro, suprimir a ação dos linfócitos, liberar enzimas líticas como as citolisinas, ácido lipoteicóico, feromonas e substâncias de agregação^{65, 67}. Além disso, este micro-organismo é capaz de penetrar nos túbulos dentinários³⁵ podendo atingir uma profundidade média de 653 μm ⁴⁸, aderindo às paredes do canal radicular e formando comunidades organizadas em biofilme^{12, 13, 24}

O biofilme é uma comunidade microbiana que consiste na agregação de células aderidas a uma superfície (substrato) e entre si, incorporados por uma matriz polimérica extracelular produzida pelos próprios micro-organismos, que confere estabilidade mecânica³¹ e impede o contato direto dos agentes antimicrobianos, fagócitos e anticorpos. Bactérias em biofilme podem ser até 1000 vezes mais resistentes do que as células planctônicas⁶⁵, o que dificulta a sua eliminação por meio do uso de soluções

irrigadoras e medicação intracanal durante a terapia endodôntica. Além disso, os micro-organismos presentes no biofilme apresentam alteração fenotípica com relação à taxa de crescimento e transcrição e caso o biofilme seja desestruturado, as células sobreviventes podem manter características de resistência adquiridas¹³.

O preparo biomecânico do canal radicular realizado durante o tratamento endodôntico inclui meios químicos, físicos e mecânicos³². As soluções irrigadoras utilizadas como auxiliar no preparo biomecânico, favorecem a remoção de restos orgânicos, *smear layer* e micro-organismos e a inativação dos seus subprodutos, além de servir como lubrificante^{27, 30, 62, 76}. Entretanto, ainda que a solução irrigadora apresente potencial antimicrobiano, micro-organismos podem persistir no sistema de canais radiculares (SCR) após a instrumentação do canal radicular⁵⁷.

O hipoclorito de sódio (NaOCl), é usualmente recomendado como solução irrigadora em Endodontia^{38, 53, 70}. Em meio aquoso, se dissocia em hidróxido de sódio (NaOH) e ácido hipocloroso (HOCl). Quando o NaOH entra em contato com os ácidos graxos, ocorre uma reação de saponificação, dando origem a sabão e glicerol, que reduzem a tensão superficial e é responsável pela alcalinidade da solução, atingindo pH em torno de 12^{16, 25, 27, 30, 76}. O alto pH prejudica a integridade da membrana citoplasmática, altera o metabolismo celular e provoca a degradação de fosfolípidos¹⁶. O HOCl é o responsável pela dissolução de matéria orgânica e atividade antimicrobiana, uma vez que realiza hidrólise e degradação de aminoácidos, interfere no metabolismo celular bacteriano, além de inibir enzimas e provocar oxidação irreversível dos grupos sulfidril, que são enzimas essenciais bacterianas, acarretando na morte celular^{16, 27, 30}.

O NaOCl vem sendo utilizado como solução irrigadora do canal radicular em concentrações que variam de 0,5 a 6%²⁷. Apresenta efetividade na dissolução de colágeno, que é o principal componente orgânico dentinário, solubiliza restos pulpares e

tem grande atuação sobre a microbiota endodôntica^{26, 30, 37, 76}, inclusive na dissolução de biofilme^{3, 9, 11, 15, 20, 44}.

As soluções de NaOCl mais concentradas apresentam maior efeito antimicrobiano, entretanto, mostram maior citotoxicidade^{5, 28} e podem ser prejudiciais aos tecidos periapicais se extravasado. Quanto a penetrabilidade, o NaOCl pode atingir cerca de 300µm de profundidade nos túbulos dentinários, sendo esta capacidade influenciada pelo tempo de uso, concentração da solução e temperatura⁷⁷.

A clorexidina (CLX) é uma bis-guanida sintética catiônica e também é utilizada durante a terapia endodôntica. A concentração de 2% é recomendada quando é empregada como solução irrigadora durante o preparo biomecânico⁷⁵. Sua carga positiva hidrofóbica e lipofílica permite uma interação com os lipopolissacarídeos e fosfolípidos da membrana celular bacteriana, que por sua vez é carregada negativamente. Desta forma, há um desequilíbrio osmótico na parede celular, aumentando a permeabilidade da membrana e assim, a molécula de CLX adentra para o citoplasma, promovendo a lise celular e morte bacteriana³⁰. Além disso, as moléculas de CLX são adsorvidas pela hidroxiapatita, sendo liberadas gradualmente, proporcionando efeito residual denominado substantividade^{33, 39, 73}.

A CLX é considerada menos cáustica que o NaOCl mais concentrado e apresenta maior atividade antibacteriana sobre os micro-organismos Gram-positivos, incluindo *E. faecalis*⁷⁶. Entretanto, não promove a dissolução tecidual e de resíduos orgânicos⁴¹.

Estudos avaliando a ação da CLX líquida e em gel mostraram capacidade de eliminação de *E. faecalis* em 30 segundos^{23, 69} ou 1 minuto⁷⁰ de contato com a suspensão bacteriana. Durante o preparo biomecânico in vitro, a CLX e o NaOCl tem mostrado semelhante ação antimicrobiana sobre *E. faecalis*^{14, 42}. Entretanto, a CLX não

mostra-se efetiva na remoção de biofilme^{9, 11, 15, 44}, apresentando maior atuação sobre as bactérias na forma planctônica^{1, 64}.

A partir de diluições realizadas nas soluções de NaOCl a 0,1% e CLX a 4%, Arias-Moliz et al.³, asseguraram que NaOCl é altamente eficaz na eliminação de biofilmes de *E. faecalis* de 24 horas, após 1 minuto de exposição em concentrações a partir de 0,00625%, enquanto a CLX mostra-se menos eficaz, sendo necessário pelo menos 5 minutos de contato em concentrações de 2% ou superior. No entanto, uma diminuição da atividade antibiofilme do NaOCl e CLX é observada com o amadurecimento do biofilme e em função das suas condições nutricionais^{34, 56, 71}

Apesar do amplo emprego das duas soluções citadas acima, a busca por soluções irrigadoras que proporcionem a eliminação de micro-organismos do SCR, complexidades anatômicas e dos túbulos dentinários torna-se necessária, podendo aumentar as taxas de sucesso do tratamento endodôntico. Soluções com maior capacidade de molhamento apresentam maior penetrabilidade²². Assim, a alta molhabilidade de soluções irrigadoras permite o maior contato da solução à dentina radicular e maior penetração no interior dos túbulos dentinários e reentrâncias^{19, 46} e esta característica depende diretamente da tensão superficial da substância utilizada como irrigante².

A tensão superficial de um líquido é definida como a força exercida pelas moléculas que o compõe, para diminuir sua área de superfície⁷. No interior do canal radicular, uma alta tensão superficial dificulta a difusão da solução irrigadora em maior profundidade dos túbulos dentinários, regiões de istmos e irregularidades anatômicas^{7, 72}. Quando a força de atração entre as moléculas de uma solução é quebrada, ocorre a diminuição da tensão superficial e isto permite o aumento da molhabilidade e sua maior dispersão pelo complexo SCR^{2, 7, 19, 22, 46, 72}.

Os surfactantes são compostos que possuem atividade detergente e podem alterar a superfície dos líquidos, diminuindo a tensão superficial. Sendo assim, é possível diminuir a tensão superficial de uma solução irrigadora por meio da adição de um surfactante⁴⁶ o que irá proporcionar maior contato com as paredes dentinárias e maior difusão e penetrabilidade em áreas inacessíveis à instrumentação endodôntica^{19, 46, 66}.

Atualmente vêm sendo avaliadas soluções de NaOCl e CLX associadas à surfactantes. O Quadro 1 descreve produtos comerciais que associam soluções irrigadoras convencionais a surfactantes:

Quadro 1 - Descrição de produtos comerciais que combinam agentes irrigantes convencionais à surfactantes

Produtos comerciais	Composição
Chlor-Xtra	NaOCl a 5,8% + Triton-X ^{18, 46, 72}
CHX-Plus	CLX a 2% + surfactante não divulgado ^{46, 72}
Hypoclean	NaOCl a 5,25% + polipropilenoglicol + cetramida ²¹
Cloreximid	CLX a 0,2% + cetramida ²¹
QMIX	CLX a 2% + EDTA a 17% + cetramida ⁶⁴
Biopure MTAD	Doxiciclina a 3% + Ácido cítrico a 4,25% + Tween 80 a 0,5% ⁶⁸
SmearClear	EDTA a 17% + cetramida ¹⁰
Tetraclean	Doxiciclina a 1% + Ácido cítrico a 10% + cetramida a 0,2% ²¹

A tensão superficial de NaOCl a 5,25% foi comparada à de Chlor-Xtra, Hypoclean A e B, sendo que a primeira solução apresenta 1% a mais de surfactante na composição. Água destilada demonstrou um valor equivalente a $72,13 \text{ mJ m}^{-2}$, enquanto NaOCl a 5,25% apresentou $48,90 \text{ mJ m}^{-2}$. Hypoclean A e B mostraram os menores

valores de tensão superficial ($29,13 \text{ mJ m}^{-2}$ e $30,00 \text{ mJ m}^{-2}$, respectivamente), com diferença significativa em relação ao NaOCl e Chlor-Xtra⁴⁶.

Estudos relacionados à atividade antibacteriana das soluções irrigadoras contendo os modificadores de superfície vêm sendo realizados^{20, 21, 36, 40, 43, 47, 55, 64, 72}. A solução Chlor-Xtra foi avaliada sobre biofilme de *E. faecalis* e não mostrou superioridade à ação antibacteriana do NaOCl convencional a 6% quando utilizados por 1 e 3 minutos, contudo, após 5 minutos de contato sobre o biofilme, estas soluções não apresentaram diferença significativa sobre a CHX-Plus⁷⁴. CHX-Plus apresentou atividade antimicrobiana superior à CLX convencional sobre biofilme composto por microbiota subgingival humana em diferentes graus de maturidade e condições nutricionais^{55, 56}.

A cetramida é um agente amônio-quaternário pertencente ao grupo dos surfactantes catiônicos⁴, que normalmente apresentam baixa capacidade detergente e alta ação antimicrobiana. Este surfactante é capaz de promover desestruturação do biofilme bacteriano, sendo sua carga positiva passível de formar uma ligação eletrostática com os micro-organismos, e como possui atividade detergente, pode reduzir a força de coesão entre a matriz polimérica extracelular e a membrana celular bacteriana^{58, 72}.

Quando aplicada sobre biofilme de *E. faecalis* com maturidade de 24 horas, a cetramida é capaz de erradicar os micro-organismos em 30 segundos na concentração de 0,5%⁴. Após a sua utilização sobre biofilme de 21 dias, a cetramida a 0,2% oferece ação semelhante a do NaOCl a 2,5%, além de proporcionar efeito residual por 24 horas, inibindo a formação de biofilme⁶.

Em dentina infectada com *E. faecalis*, a análise por microscopia confocal de varredura a laser revela que a aplicação de QMiX por 1 e 3 minutos mantém atividade

semelhante à do NaOCl a 6% para a proporção de células mortas no interior dos túbulos dentinários, sendo ambos superiores à CLX a 2%^{36, 71} e maior ação de QMiX sobre a CLX também é evidenciada frente ao biofilme de *E. faecalis* induzidos em hidroxiapatita e sobre os micro-organismos planctônicos⁶⁴.

Estudos associando soluções irrigadoras convencionais à cetramida, simulando as combinações comercializadas, vêm sendo realizados. A cetramida a 0,1 ou 0,01% combinada à CLX nas mesmas concentrações, promove a eliminação de *E. faecalis* em 10 segundos de contato com a suspensão bacteriana⁵⁰. Em apenas 2 minutos, a cetramida a 0,01% associada à CLX diluída a 0,0078% é capaz de eliminar completamente um biofilme cultivado por 24 horas⁴.

A combinação de cetramida ao BioPure MTAD e em Tetraclean mostra aumento da ação antibacteriana sobre *E. faecalis* em fase planctônica e em biofilme multiespécies⁴⁷. A microscopia confocal de varredura a laser também confirma um aumento da atividade antibacteriana quando o NaOCl a 2% é acrescido de cetramida e quando CHX-Plus é comparada à CLX convencional sobre *E. faecalis* presente em túbulos dentinários⁷².

Quanto a capacidade de dissolução de biofilme, somente NaOCl a 2,5 ou 5,25% mostram ser capazes de diminuir significativamente o número de bactérias mortas e proporcionar a limpeza dentinária, de modo que outras soluções contendo surfactantes como BioPure MTAD, QMiX e SmearClear não apresentam a mesma efetividade⁴³, semelhante ao que ocorre quando a CLX a 2% convencional é empregada^{8, 9, 11, 44}.

Diante destes estudos, torna-se relevante a avaliação das propriedades antimicrobianas de soluções irrigadoras convencionais e possíveis associações com surfactantes, como a cetramida, sobre biofilme de *E. faecalis*, visando maior limpeza e desinfecção do SCR para aumentar o sucesso do tratamento endodôntico.

2 PROPOSIÇÃO

Objetivo geral:

Avaliar a ação antibacteriana e antibiofilme de soluções irrigadoras associadas ao surfactante cetramida, sobre *E. faecalis* (ATCC 29212).

Objetivos específicos:

1. Avaliar a atividade antibacteriana de NaOCl e CLX associados à cetramida e do QMiX sobre micro-organismos em fase planctônica e biofilme, pela contagem das UFC mL⁻¹.
2. Avaliar a atividade antibiofilme de NaOCl e CLX associados à cetramida e do QMiX, por meio da análise em microscopia confocal de varredura a laser.

**EFETIVIDADE ANTIMICROBIANA DE
SOLUÇÕES IRRIGADORAS ENDODÔNTICAS
ASSOCIADAS À CETRAMIDA SOBRE
*ENTEROCOCCUS FAECALIS***

CAPÍTULO 1

*Artigo a ser submetido ao periódico International Endodontic Journal

3.1 RESUMO

Introdução: A utilização de soluções irrigadoras antimicrobianas contribui na desinfecção dos canais radiculares. **Objetivo:** O objetivo do estudo foi avaliar a atividade antibacteriana das soluções irrigadoras hipoclorito de sódio (NaOCl) e clorexidina (CLX) associadas à cetramida (CTR) e do QMiX, sobre células planctônicas e biofilme de *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212). **Methodologia:** As soluções avaliadas foram 2,5% NaOCl, 2,5% NaOCl+0,2% CTR, 2% CLX, 2% CLX+0,2%CTR, 0,2% CTR, QMiX. Biofilmes de *E. faecalis* foram induzidos por 14 dias sobre blocos de dentina bovina. Suspensão e biofilme de *E. faecalis* foram expostos por 1 e 3 minutos às soluções irrigadoras. Após os períodos de exposição, foi realizada a diluição decimal seriada e plaqueamento em meio TSA. As placas foram incubadas por 24 horas a 37°C para a contagem das UFC mL⁻¹ e os dados foram submetidos aos testes ANOVA e Tukey, com nível de significância de 5%. **Resultados:** No contato direto entre *E. faecalis* em fase planctônica e soluções irrigadoras, todos os micro-organismos foram eliminados. Sobre biofilme, somente NaOCl e NaOCl+CTR apresentaram eliminação total de micro-organismos. A CLX mostrou efetividade semelhante à CLX+CTR, CTR e QMiX após 1 minuto e apresentou-se estatisticamente semelhante ao NaOCl e NaOCl+CTR após 3 minutos ($p>0,05$), embora sem capacidade de eliminar totalmente os micro-organismos. CTR e QMiX não mostraram diferença entre si. Associação de CTR à CLX e NaOCl não promoveu aumento da atividade antibiofilme das soluções. **Conclusões:** As soluções irrigadoras e associações avaliadas atuam de forma eficaz sobre *E. faecalis* em fase planctônica e que o NaOCl e NaOCl+CTR são os únicos irrigantes capazes de eliminar o biofilme após 1 e 3 minutos de contato direto. A CTR não altera a efetividade antibiofilme da CLX e NaOCl.

Palavras-chave: biofilmes, clorexidina, detergentes, *Enterococcus faecalis*, irrigantes do canal radicular, hipoclorito de sódio, QMiX

3.2 INTRODUÇÃO

O sucesso do tratamento endodôntico depende da desinfecção do sistema de canais radiculares (Sjogren et al. 1997; Siqueira & Rocas 2008). Durante o preparo de canais radiculares, soluções irrigadoras antimicrobianas são indicadas para promover redução da microbiota endodôntica (Camara et al. 2009; Dornelles-Morgental et al. 2011; Aranda-Garcia et al. 2012). *Enterococcus faecalis* é um micro-organismo predominante nos casos de insucesso após tratamento endodôntico (Stuart et al. 2006; Siqueira & Rocas 2008), sendo capaz de sobreviver em condições desfavoráveis e se organizar em biofilme.

Hipoclorito de sódio (NaOCl) é a solução irrigadora mais utilizada, em concentrações que variam de 0,5 a 6% (Haapasalo et al. 2010), apresentando capacidade de dissolução pulpar e atividade antimicrobiana (Stojicic et al. 2010; Ordinola-Zapata et al. 2012). A clorexidina (CLX) é também recomendada como irrigante do canal radicular, mas não dissolve restos pulpares e apresenta maior atividade sobre bactérias planctônicas, com menor atuação sobre biofilme (Abdullah et al. 2005; Dunavant et al. 2006; Haapasalo et al. 2010). A cetramida (CTR) é um surfactante catiônico que apresenta atividade detergente e pode reduzir a força coesiva entre a matriz polimérica extracelular e parede celular bacteriana (Simoes et al. 2005; Wang et al. 2012). Além disso, mostra ação residual, e demonstrou capacidade de inibir a formação de biofilme por 24 horas, e na concentração de 0,2%, elimina o biofilme de *E. faecalis* após 1 minuto de contato (Baca et al. 2011) ou em apenas 30 segundos quando a concentração aumenta para 0,5% (Arias-Moliz et al. 2010). A CTR a 0,2% associada ao EDTA ou

ácido cítrico a 15% também favorece a eliminação de biofilme em um curto período de contato (Ferrer-Luque et al. 2010). Quando combinada a outras soluções, diminui a tensão superficial, promovendo maior penetrabilidade nos túbulos dentinários e irregularidades do sistema de canais radiculares (Ma et al. 2011; Wang et al. 2012).

QMIX é uma solução irrigadora composta pela associação de CLX a 2%, EDTA e CTR (Stojicic et al. 2012). Tem demonstrado atividade antibacteriana comparável ao NaOCl a 6% em dentina infectada com *E. faecalis* (Ma et al. 2011; Wang et al. 2012). Sobre biofilme de *E. faecalis* e micro-organismos em fase planctônica, tem demonstrado ação superior à CLX convencional (Stojicic et al. 2012). No entanto, sobre biofilme composto por microbiota oral, a solução irrigadora não apresentou a capacidade de eliminar e remover totalmente os micro-organismos (Ordinola-Zapata et al. 2012). Sendo assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar a ação de NaOCl a 2,5% e CLX a 2% associadas à CTR a 0,2% e do QMiX, sobre *E. faecalis* em fase planctônica e biofilme.

3.3 MATERIAL E MÉTODO

Cepa padrão de *Enterococcus faecalis* (ATCC- 29212) foi empregada no estudo. Os espécimes foram divididos em 7 grupos (Tabela 1) e avaliados em dois períodos experimentais - 1 e 3 minutos de contato direto sobre suspensão e biofilme de *E. faecalis*. Toda a etapa experimental e procedimentos microbiológicos foram realizados em câmara de fluxo laminar (VecoFlow Ltda, Campinas, SP, Brasil).

3.3.1 Preparo da suspensão bacteriana

Técnica de coloração de gram e morfologia da colônia foram utilizadas para a confirmação da pureza da colônia de *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212). O microorganismo foi reativado em 4 mL de caldo Brain Heart Infusion (BHI) e mantido em estufa a 37°C por 12 horas. A densidade da suspensão bacteriana foi ajustada em $DO_{600}=0,060$, equivalente a $1,0 \times 10^7$ unidades formadoras de colônia por mL (UFC mL^{-1}), com o auxílio de espectrofotômetro (Modelo 600 Plus, Femto, São Paulo, SP, Brasil).

3.3.2 Contato direto entre suspensão bacteriana e soluções irrigadoras

A suspensão bacteriana foi utilizada no prazo máximo de 60 minutos após o ajuste correspondente a $1,0 \times 10^7$ UFC mL^{-1} . Por meio de pipetas automáticas, 1,45 mL de cada solução irrigadora ou associação foram levados a tubos teste (Eppendorf) de 2mL. A seguir, uma alíquota de 50 μ L da suspensão de *E. faecalis* foi adicionada ao tubo (Pappen et al. 2010). Os tempos de contato direto entre as soluções irrigadoras e associações à suspensão bacteriana foram de 1 e 3 minutos. Decorrido esse período, foram realizadas diluições decimais seriadas. Nesta etapa, alíquotas de 100 μ L da mistura foram transferidas para um segundo tubo teste contendo 0,9mL de agente neutralizante específico para cada solução irrigadora ou associações (Tabela 1). O conteúdo da primeira diluição foi homogeneizado e 100 μ L transferidos para um terceiro tubo teste, idêntico ao anterior, contendo 0,9 mL da solução neutralizante. Os quarto, quinto e sexto tubos continham 0,9 mL de solução salina esterilizada, como ilustrado na Figura 1.

Tabela 1 Soluções irrigadoras ou associações e neutralizantes utilizados após os períodos de contato direto com suspensão ou biofilme bacteriano:

Grupos experimentais	Soluções avaliadas	Soluções neutralizantes
Grupo I	NaOCl a 2,5%*	Tiosulfato de sódio a 1%**
Grupo II	NaOCl a 2,5% + CTR a 0,2%**	Tiosulfato de sódio 1% + Tween 80 3%** + α -Lecitina 0,7%**
Grupo III	CLX a 2%*	Tween 80 a 3% + α -Lecitina a 0,7%
Grupo IV	CLX a 2% + CTR a 0,2%	Tween 80 a 3% + α -Lecitina a 0,7%
Grupo V	CTR a 0,2%	Tween 80 a 3% + α -Lecitina a 0,7%
Grupo VI	QMIX***	Tween 80 a 3% + α -Lecitina a 0,7%
Grupo VII	Solução Salina a 0,85%	Solução Salina a 0,85%

*Farmácia de Manipulação da Faculdade de Farmácia de Araraquara, Araraquara, SP, Brasil.

** Sigma-Aldrich Brasil Ltda. São Paulo, SP, Brasil.

*** Dentsply Tulsa Dental Specialties, Tulsa, OK, Estados Unidos da América.

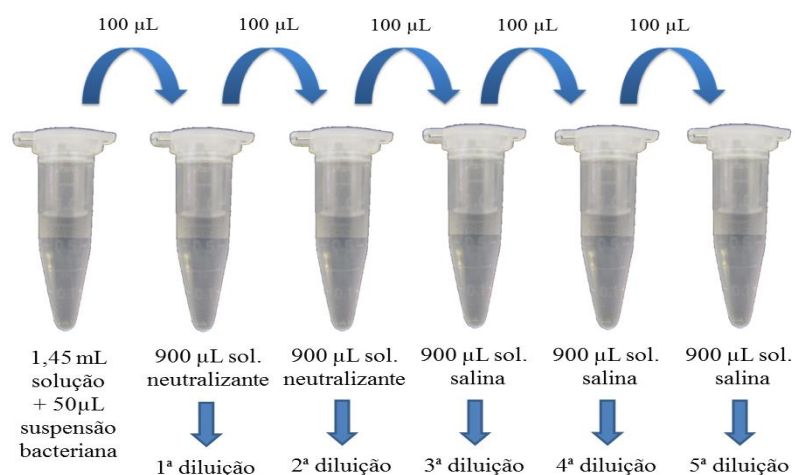


Figura 1 Esquema da diluição decimal seriada realizada no teste antibacteriano por contato direto com suspensão bacteriana.

Ao final deste processo, alíquotas de 20 µL de cada uma das diluições foram semeadas em triplicata na superfície de placas de Tryptic Soy Ágar (TSA) (Figuras 2 e 3). As placas foram incubadas a 37°C em microaerofilia. Após 24 horas de incubação foi realizada a leitura com auxílio de um estereomicroscópio. A leitura dos resultados de cada placa resultou da média do número de UFC das três áreas de crescimento

bacteriano, sempre na diluição da amostra com número de colônias entre 5 e 50. As médias foram submetidas à transformação logarítmica e aos testes ANOVA e Tukey com nível de significância de 5%.

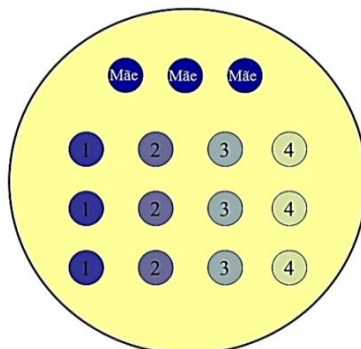


Figura 2 Ilustração de uma placa de TSA onde foram depositadas três alíquotas de 20µL de cada diluição mencionada para os grupos experimentais, após 1 ou 3 minutos de contato direto sobre suspensão de *E. faecalis*.

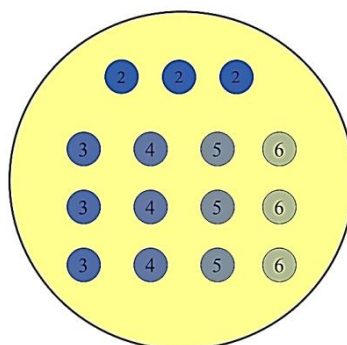


Figura 3 Ilustração de uma placa de TSA onde foram depositadas três alíquotas de 20 µL de cada diluição mencionada para o grupo controle, após 1 ou 3 minutos de contato direto sobre suspensão de *E. faecalis*.

3.3.3 Confeção dos blocos de dentina

Como substrato para os biofilmes foram utilizados blocos de dentina bovina. Incisivos centrais bovinos com raízes completamente formadas foram selecionados e as

coroas removidas. Em seguida, o remanescente radicular foi separado longitudinalmente em segmentos de 0,7 mm de espessura corretamente planificados e polidos com lixa d'água de granulação 600 (3M, Ribeirão Preto, SP, BR). Os segmentos obtidos foram cortados para a obtenção de blocos medindo 5mm x 5mm x 0,7mm (largura x comprimento x espessura). Todos esses cortes foram realizados por um disco diamantado em baixa velocidade (Isomet – Buehler, Lake Bluff, IL, EUA) com irrigação abundante. Os 84 blocos de dentina obtidos receberam uma marcação a grafite em uma das faces e posteriormente foram colocados em um tubo de ensaio contendo água destilada e levados a uma autoclave para esterilização a 121°C por 30 minutos, sob pressão (Del Carpio-Perochena et al. 2011; Guerreiro-Tanomaru et al. 2013).

3.3.4 Indução dos biofilmes

Em placas para cultura celular de 24 poços os blocos de dentina foram colocados com a superfície marcada voltada para baixo, de modo que cada bloco de dentina ocupasse um poço individual. Em cada poço foram dispensados 200µL da suspensão bacteriana de *Enterococcus faecalis* (ATCC- 29212), ajustada em espectrofotômetro com $DO_{600}=0,060$, equivalente a $1,0 \times 10^7$ unidades formadoras de colônia por mL (UFC mL⁻¹) e 1,8 mL de caldo BHI, deixando os corpos de prova totalmente submersos (Apêndice 1 e 2).

As placas foram incubadas durante 14 dias a 37° C, em incubadora de bancada com agitação orbital em ambiente de microaerofilia. O meio de cultura BHI de cada espécime foi renovado a cada 48 horas para que não houvesse deficiência de nutrientes para as células bacterianas. A avaliação da pureza da cepa de *E. faecalis* foi realizada por meio da coloração de Gram e morfologia das colônias.

3.3.5 Contato direto entre biofilme e soluções irrigadoras

Após o período de indução, os blocos de dentina com biofilme de *E. faecalis* foram enxaguados duas vezes em 1 mL de solução salina, para a eliminação do meio de cultura e das células não aderidas. Posteriormente foram imersos em 1 mL de cada solução irrigadora ou associações a serem avaliadas (Tabela 1) por 1 ou 3 minutos.

Passado cada período experimental, os blocos de dentina foram enxaguados novamente em solução salina e transferidos para um tubo de ensaio contendo pérolas de vidro (3 mm de diâmetro) e 1 mL de solução neutralizante (Pappen et al. 2010; Guerreiro-Tanomaru et al. 2011; Stojicic et al. 2012). Cada tubo foi agitado por 60 segundos (Vortex AP 56, Phoenix, Araraquara, SP, Brasil) para a suspensão dos microorganismos remanescentes sobre os blocos de dentina, e em seguida realizada a diluição decimal seriada, como ilustrado na Figura 4.

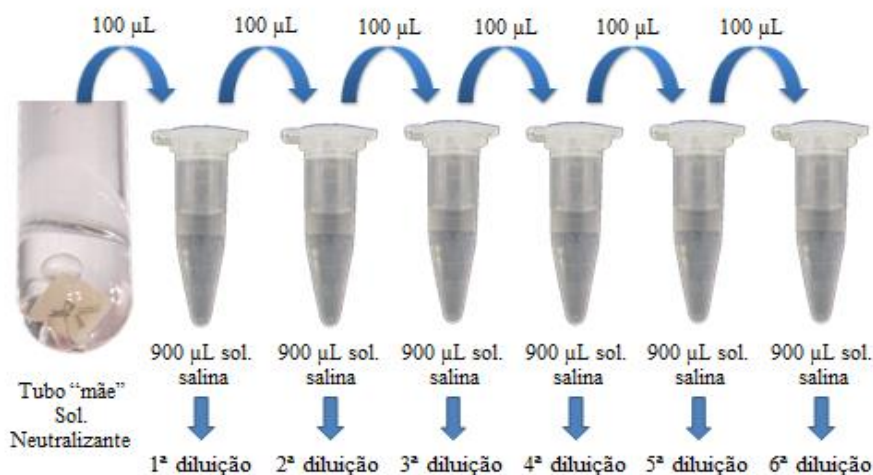


Figura 4 Representação esquemática da diluição decimal seriada realizada no teste de contato direto sobre o biofilme de *E. faecalis*.

Ao final das diluições, três alíquotas de 20 μL de cada diluição foram distribuídas em placas de TSA (Difco Detroit, MI, EUA). As placas foram incubadas a 37°C por 24 horas em microaerofilia. A leitura dos resultados de cada placa de cultura resultou da média do número de UFC das três áreas de crescimento bacteriano, na diluição onde havia em cada área um número de colônias entre 5 e 50. A partir destas médias foi calculado o número de UFC mL^{-1} de *E. faecalis* após cada um dos tempos de contato entre as soluções irrigadoras e os blocos de dentina com o biofilme bacteriano, como já descrito anteriormente.

3.4 RESULTADOS

As Figuras 5 e 6 ilustram as médias em logaritmo das UFC mL^{-1} de *E. faecalis* após o contato das soluções irrigadoras e associações com a suspensão bacteriana e biofilme por 1 e 3 minutos. De acordo com os resultados, todas as soluções irrigadoras e associações foram capazes de eliminar totalmente os micro-organismos em fase planctônica em 1 e 3 minutos de contato direto.

Atividade antimicrobiana sobre *E. faecalis* em fase planctônica

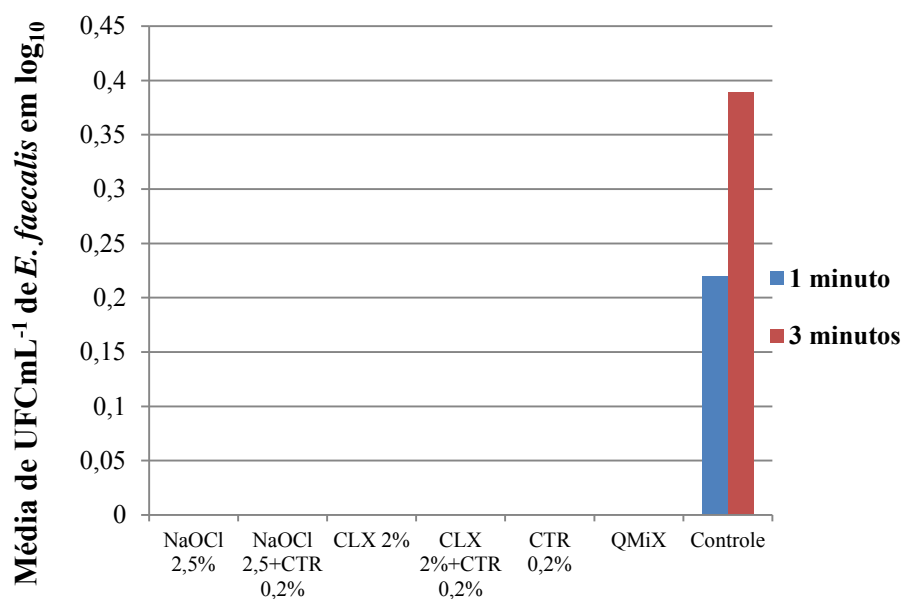


Figura 5 Médias UFC mL⁻¹ de *E. faecalis* após contato entre suspensão bacteriana e soluções irrigadoras por 1 ou 3 minutos.

Atividade antibiofilme sobre *E. faecalis*

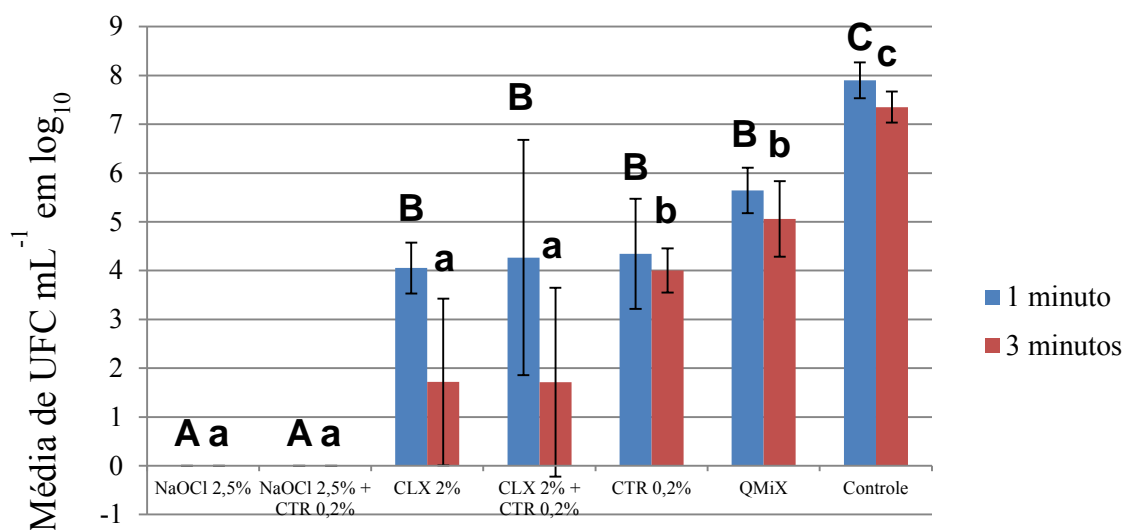


Figura 6 Médias e desvios padrão de UFC mL⁻¹ de *E. faecalis* após contato entre biofilme e soluções irrigadoras por 1 ou 3 minutos. Letras maiúsculas foram usadas para comparar a ação das soluções no período de 1 minuto e as letras minúsculas no período de 3 minutos. As letras diferentes indicam diferença estatística significativa entre os grupos em um mesmo período experimental ($p < 0,05$).

Sobre o biofilme, somente NaOCl e NaOCl+CTR eliminaram completamente os micro-organismos. CLX, CLX+CTR, CTR e QMiX mostraram efetividade semelhante após 1 minuto de contato com o biofilme ($p>0,05$), não sendo capazes de matar completamente as células bacterianas. A aplicação de CLX pura e associada à CTR por 3 minutos, demonstrou atividade similar ao NaOCl e NaOCl+CTR ($p>0,05$), porém sem capacidade de eliminação total de *E. faecalis*. CTR e QMiX não mostraram diferença significativa entre si ($p>0,05$), e após 3 minutos, apresentaram atividade antibiofilme inferior ao NaOCl e CLX pura ou associada a CTR (Apêndice 3).

3.5 DISCUSSÃO

Para o teste de contato direto entre as soluções irrigadoras e suspensão bacteriana, as células podem ser suspensas em água destilada, solução salina ou meio de cultura líquido esterilizado (Abdullah et al. 2005; Portenier et al. 2006; Pappen et al. 2010), sendo a suspensão bacteriana inicial ajustada de acordo com a concentração desejada. Para a indução de biofilme, as células bacterianas são suspensas em meio de cultura apropriado, sendo necessário o uso de um substrato. Como substrato para o biofilme, têm sido utilizados hidroxiapatita (Pappen et al. 2010; Guerreiro-Tanomaru et al. 2013) dentina humana (Norrington et al. 2008; Liu et al. 2010), dentina bovina (Ordinola-Zapata et al. 2012; Ordinola-Zapata et al. 2012), membrana de nitrocelulose (Bryce et al. 2009) ou poliestireno (Chavez de Paz et al. 2010; Liu et al. 2010). Deve ainda ser considerado que a condição do biofilme em relação a sua maturidade e estado nutricional pode modificar sua resposta frente aos antimicrobianos (Liu et al. 2010; Shen et al. 2011; Wang et al. 2012).

E. faecalis tem sido utilizado em avaliações antimicrobianas por estar presente nos insucessos após tratamento endodôntico (Siqueira & Rocas 2008) e apresentar capacidade de formação de biofilme, o qual pode ser induzido e organizado em 14 dias sobre blocos de dentina bovina (Guerreiro-Tanomaru et al. 2013). A dentina bovina foi empregada por se assemelhar à dentina humana e ser de fácil aquisição, sendo amplamente utilizada (Del Carpio-Perochena et al. 2011; Ordinola-Zapata et al. 2012; Guerreiro-Tanomaru et al. 2013). A renovação do meio de cultura foi realizada a cada dois dias para proporcionar nutrientes aos micro-organismos em crescimento (Guerreiro-Tanomaru et al. 2013).

O teste por contato direto permite quantificação do número de micro-organismos viáveis após diferentes períodos de contato com as soluções (Baca et al. 2011; Arias-Moliz et al. 2012). A utilização de substâncias neutralizantes impede a transferência de sua atividade no momento do plaqueamento, evitando resultado falso negativo (Abdullah et al. 2005; Pappen et al. 2010; Guerreiro-Tanomaru et al. 2011). Tween 80 e lecitina têm sido recomendadas como neutralizantes de clorexidina (Zamany & Spangberg 2002; Dornelles-Morgental et al. 2011). O tiosulfato de sódio é um inativador do hipoclorito de sódio (Giardino et al. 2007; Pappen et al. 2010; Dornelles-Morgental et al. 2011; Aranda-Garcia et al. 2012; Stojicic et al. 2012). Stojicic et al. em 2012 verificaram a neutralização de NaOCl a 1 e 2% frente tiosulfato de sódio a 0,5%. No mesmo estudo, para a clorexidina e QMiX, o efeito *carry over* foi impedido pela utilização de Tween 80 a 3% e α -lecitina 0,3% (Stojicic et al. 2012). No presente estudo, a concentração de tiosulfato de sódio empregada foi de 1% após uso de NaOCl e para a associação de Tween 80 e α -lecitina, as concentrações utilizadas foram de 3% e 0,7%, respectivamente, para neutralizar CHX, CTR e QMiX, de acordo com testes anteriores.

Todas as soluções irrigadoras e associações avaliadas promoveram a total eliminação dos micro-organismos em fase planctônica. Abdullah et al. (Abdullah et al. 2005) observaram que *E. faecalis* é eliminado em 1 minuto de contato com NaOCl a 3% e Gomes et al. (Gomes et al. 2001) verificaram eliminação dos micro-organismos em fase planctônica em menos de 30 segundos de contato com CLX a 2%. A associação de CLX com CTR, embora em concentrações inferiores à do presente estudo, demonstrou capacidade de eliminação de duas cepas de *E. faecalis* em fase planctônica em apenas 10 segundos (Portenier et al. 2006) e para o QMiX, em 5 segundos (Stojcic et al. 2012).

Entretanto, fica evidenciado que as soluções irrigadoras apresentam menor atuação quando os micro-organismos estão organizados em biofilme (Abdullah et al. 2005; Portenier et al. 2006; Stojcic et al. 2012), confirmando a maior resistência encontrada neste tipo de organização bacteriana. O NaOCl demonstra efetividade na eliminação do biofilme de *E. faecalis* em curto período de tempo, enquanto a CLX não apresenta esta capacidade quando utilizada por 1 minuto. Tem sido demonstrada a reduzida capacidade de eliminação de biofilme bacteriano apresentada pela CLX, pelo método da contagem das colônias (Abdullah et al. 2005; Dunavant et al. 2006), e por meio de microscopia eletrônica de varredura e microscopia confocal de varredura a laser (Clegg et al. 2006; Del Carpio-Perochena et al. 2011; Ordinola-Zapata et al. 2012; Ordinola-Zapata et al. 2012). No presente estudo, após 3 minutos de contato com o biofilme, ainda que a CLX tenha mostrado semelhança ao NaOCl, não foi capaz de eliminar os micro-organismos, concordando com Ariaz-Molis et al. (Arias-Moliz et al. 2010), os quais utilizaram-na em concentrações de até 4% por 2 minutos.

Estudos anteriores evidenciam atividade antibiofilme apresentada pela CTR. Baca et al. (Baca et al. 2011) mostram a capacidade de eliminação da biofilme de *E. faecalis* quando a CTR a 0,2% é utilizada por 1 minuto, com ação comparável à do

NaOCl a 1% e superior à da CLX a 2%. Outro estudo aponta que a CTR a 0,0078% elimina os micro-organismos após 2 minutos de contato direto com biofilme de *E. faecalis* e a CTR combinada a CLX é capaz de eliminar completamente o biofilme a partir de 30 segundos de contato direto (Arias-Moliz et al. 2010). A associação de CTR promove aumento da atividade antibiofilme de soluções como EDTA, ácido cítrico (Ferrer-Luque et al. 2010), ácido láctico (Arias-Moliz et al. 2012) e MTAD (Pappen et al. 2010). O presente estudo não demonstrou aumento da atividade antibiofilme quando a CTR foi associada à CLX.

Stojicic et al. (Stojicic et al. 2012) constataram maior atividade antibiofilme de QMiX quando comparada à CLX após 1 e 3 minutos sobre biofilme de *E. faecalis* isolados de canais radiculares (VP3-181 e Gel 31). A utilização de QMiX por 1 minuto não demonstrou maior atividade antimicrobiana, corroborando com Ordinola-Zapata et al. (Ordinola-Zapata et al. 2012) que evidenciaram pobre limpeza do substrato após utilização de QMiX por 5 minutos sobre biofilme oral.

Alguns componentes dentinários podem diminuir a ação de antimicrobianos endodônticos (Haapasalo et al. 2000; Portenier et al. 2002; Portenier et al. 2006; Morgental et al. 2013). Assim, CLX, CTR e QMiX podem ter apresentado menor atuação na presença de dentina bovina. Eliminação do biofilme foi demonstrada em outros estudos com indução de biofilme de *E. faecalis* sobre dispositivo de poliestireno (Arias-Moliz et al. 2010) e hidroxiapatita (Stojicic et al. 2012).

As células em fase planctônica são facilmente eliminadas pelos agentes antimicrobianos. No entanto, a forma de biofilme proporciona maior dificuldade para a penetração de moléculas antimicrobianas pela presença da matriz polimérica que envolve os micro-organismos (Donlan & Costerton 2002). Desta forma, os biofilmes maduros oferecem maior resistência, uma vez que as células bacterianas são sobrepostas

em camadas mais profundas e com maior organização, tornando menos sensíveis aos antimicrobianos (Roberts & Stewart 2005; Ordinola-Zapata et al. 2012; Wang et al. 2012). Sendo assim, a utilização de biofilmes maduros de 14 dias (Guerreiro-Tanomaru et al. 2013) além da utilização da dentina como substrato, justificam a dificuldade para sua completa eliminação.

3.6 CONCLUSÃO

De acordo com este modelo experimental, conclui-se que todas as soluções irrigadoras utilizadas no estudo eliminam os micro-organismos em fase planctônica em 1 e 3 minutos. NaOCl a 2,5% e NaOCl+CTR apresentam maior atividade antibiofilme após 1 e 3 minutos de contato com *E. faecalis*. A associação de CTR e CLX não proporcionou aumento da efetividade antibiofilme.

3.7 REFERÊNCIAS

- Abdullah M, Ng YL, Gulabivala K, Moles DR, Spratt DA (2005) Susceptibilities of two *Enterococcus faecalis* phenotypes to root canal medications. *J Endod* **31**(1), 30-36.
- Aranda-Garcia AR, Guerreiro-Tanomaru JM, Faria-Junior NB *et al.* (2012) Antibacterial effectiveness of several irrigating solutions and the Endox Plus system - an ex vivo study. *Int Endod J* **45**(12), 1091-1096.
- Arias-Moliz MT, Baca P, Ordonez-Becerra S, Gonzalez-Rodriguez MP, Ferrer-Luque CM (2012) Eradication of enterococci biofilms by lactic acid alone and combined with chlorhexidine and cetrimide. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* **17**(5), e902-906.
- Arias-Moliz MT, Ferrer-Luque CM, Gonzalez-Rodriguez MP, Valderrama MJ, Baca P (2010) Eradication of *Enterococcus faecalis* biofilms by cetrimide and chlorhexidine. *J Endod* **36**(1), 87-90.
- Baca P, Junco P, Arias-Moliz MT, Gonzalez-Rodriguez MP, Ferrer-Luque CM (2011) Residual and antimicrobial activity of final irrigation protocols on *Enterococcus faecalis* biofilm in dentin. *J Endod* **37**(3), 363-366.
- Bryce G, O'Donnell D, Ready D, Ng YL, Pratten J, Gulabivala K (2009) Contemporary root canal irrigants are able to disrupt and eradicate single- and dual-species biofilms. *J Endod* **35**(9), 1243-1248.
- Camara AC, de Albuquerque MM, Aguiar CM, de Barros Correia AC (2009) In vitro antimicrobial activity of 0.5%, 1%, and 2.5% sodium hypochlorite in root canals instrumented with the ProTaper Universal system. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* **108**(2), e55-61.

- Chavez de Paz LE, Bergenholtz G, Svensater G (2010) The effects of antimicrobials on endodontic biofilm bacteria. *J Endod* **36**(1), 70-77.
- Clegg MS, Vertucci FJ, Walker C, Belanger M, Britto LR (2006) The effect of exposure to irrigant solutions on apical dentin biofilms in vitro. *J Endod* **32**(5), 434-437.
- Del Carpio-Perochena AE, Bramante CM, Duarte MA *et al.* (2011) Biofilm dissolution and cleaning ability of different irrigant solutions on intraorally infected dentin. *J Endod* **37**(8), 1134-1138.
- Donlan RM, Costerton JW (2002) Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev* **15**(2), 167-193.
- Dornelles-Morgental R, Guerreiro-Tanomaru JM, de Faria-Junior NB, Hungaro-Duarte MA, Kuga MC, Tanomaru-Filho M (2011) Antibacterial efficacy of endodontic irrigating solutions and their combinations in root canals contaminated with *Enterococcus faecalis*. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* **112**(3), 396-400.
- Dunavant TR, Regan JD, Glickman GN, Solomon ES, Honeyman AL (2006) Comparative evaluation of endodontic irrigants against *Enterococcus faecalis* biofilms. *J Endod* **32**(6), 527-531.
- Ferrer-Luque CM, Arias-Moliz MT, Gonzalez-Rodriguez MP, Baca P (2010) Antimicrobial activity of maleic acid and combinations of cetrimide with chelating agents against *Enterococcus faecalis* biofilm. *J Endod* **36**(10), 1673-1675.
- Giardino L, Ambu E, Savoldi E, Rimondini R, Cassanelli C, Debbia EA (2007) Comparative evaluation of antimicrobial efficacy of sodium hypochlorite, MTAD, and Tetraclean against *Enterococcus faecalis* biofilm. *J Endod* **33**(7), 852-855.

- Gomes BP, Ferraz CC, Vianna ME, Berber VB, Teixeira FB, Souza-Filho FJ (2001) In vitro antimicrobial activity of several concentrations of sodium hypochlorite and chlorhexidine gluconate in the elimination of *Enterococcus faecalis*. *Int Endod J* **34**(6), 424-428.
- Guerreiro-Tanomaru JM, de Faria-Junior NB, Duarte MA, Ordinola-Zapata R, Graeff MS, Tanomaru-Filho M (2013) Comparative Analysis of *Enterococcus faecalis* Biofilm Formation on Different Substrates. *J Endod* **39**(3), 346-350.
- Guerreiro-Tanomaru JM, Morgental RD, Flumignan DL, Gasparini F, Oliveira JE, Tanomaru-Filho M (2011) Evaluation of pH, available chlorine content, and antibacterial activity of endodontic irrigants and their combinations against *Enterococcus faecalis*. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* **112**(1), 132-135.
- Haapasalo HK, Siren EK, Waltimo TM, Orstavik D, Haapasalo MP (2000) Inactivation of local root canal medicaments by dentine: an in vitro study. *Int Endod J* **33**(2), 126-131.
- Haapasalo M, Shen Y, Qian W, Gao Y (2010) Irrigation in endodontics. *Dent Clin North Am* **54**(2), 291-312.
- Liu H, Wei X, Ling J, Wang W, Huang X (2010) Biofilm formation capability of *Enterococcus faecalis* cells in starvation phase and its susceptibility to sodium hypochlorite. *J Endod* **36**(4), 630-635.
- Ma J, Wang Z, Shen Y, Haapasalo M (2011) A new noninvasive model to study the effectiveness of dentin disinfection by using confocal laser scanning microscopy. *J Endod* **37**(10), 1380-1385.

- Morgental RD, Singh A, Sappal H, Kopper PM, Vier-Pelisser FV, Peters OA (2013) Dentin Inhibits the Antibacterial Effect of New and Conventional Endodontic Irrigants. *J Endod* **39**(3), 406-410.
- Norrington DW, Ruby J, Beck P, Eleazer PD (2008) Observations of biofilm growth on human dentin and potential destruction after exposure to antibiotics. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* **105**(4), 526-529.
- Ordinola-Zapata R, Bramante CM, Brandao Garcia R *et al.* (2012) The antimicrobial effect of new and conventional endodontic irrigants on intra-orally infected dentin. *Acta Odontol Scand*, 2012/05/23 edn.
- Ordinola-Zapata R, Bramante CM, Cavenago B *et al.* (2012) Antimicrobial effect of endodontic solutions used as final irrigants on a dentine biofilm model. *Int Endod J* **45**(2), 162-168.
- Pappen FG, Shen Y, Qian W, Leonardo MR, Giardino L, Haapasalo M (2010) In vitro antibacterial action of Tetraclean, MTAD and five experimental irrigation solutions. *Int Endod J* **43**(6), 528-535.
- Portenier I, Haapasalo H, Orstavik D, Yamauchi M, Haapasalo M (2002) 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* **28**(9), 634-637.
- Portenier I, Waltimo T, Orstavik D, Haapasalo M (2006) 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* **32**(2), 138-141.
- Roberts ME, Stewart PS (2005) Modelling protection from antimicrobial agents in biofilms through the formation of persister cells. *Microbiology* **151**(Pt 1), 75-80.

- Shen Y, Stojicic S, Haapasalo M (2011) Antimicrobial efficacy of chlorhexidine against bacteria in biofilms at different stages of development. *J Endod* **37**(5), 657-661.
- Simoes M, Pereira MO, Vieira MJ (2005) Effect of mechanical stress on biofilms challenged by different chemicals. *Water Res* **39**(20), 5142-5152.
- Siqueira JF, Jr., Rocas IN (2008) Clinical implications and microbiology of bacterial persistence after treatment procedures. *J Endod* **34**(11), 1291-1301 e1293.
- Sjogren U, Figdor D, Persson S, Sundqvist G (1997) Influence of infection at the time of root filling on the outcome of endodontic treatment of teeth with apical periodontitis. *Int Endod J* **30**(5), 297-306.
- Stojicic S, Shen Y, Qian W, Johnson B, Haapasalo M (2012) Antibacterial and smear layer removal ability of a novel irrigant, QMiX. *Int Endod J.* **45**(4), 363-371.
- Stojicic S, Zivkovic S, Qian W, Zhang H, Haapasalo M (2010) Tissue dissolution by sodium hypochlorite: effect of concentration, temperature, agitation, and surfactant. *J Endod* **36**(9), 1558-1562.
- Stuart CH, Schwartz SA, Beeson TJ, Owatz CB (2006) Enterococcus faecalis: its role in root canal treatment failure and current concepts in retreatment. *J Endod* **32**(2), 93-98.
- Wang Z, Shen Y, Haapasalo M (2012) Effectiveness of endodontic disinfecting solutions against young and old Enterococcus faecalis biofilms in dentin canals. *J Endod* **38**(10), 1376-1379.
- Wang Z, Shen Y, Ma J, Haapasalo M (2012) The effect of detergents on the antibacterial activity of disinfecting solutions in dentin. *J Endod* **38**(7), 948-953.
- Zamany A, Spangberg LS (2002) An effective method of inactivating chlorhexidine. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* **93**(5), 617-620.

**ANÁLISE DA ATIVIDADE ANTIBIOFILME
DA CETRAMIDA ASSOCIADA ÀS SOLUÇÕES
IRRIGADORAS POR MICROSCOPIA
CONFOCAL DE VARREDURA A LASER**

CAPÍTULO 2

*Artigo a ser submetido ao periódico Journal of Endodontics

4.1 RESUMO

Introdução: O objetivo do estudo foi avaliar a atividade antibiofilme de NaOCl e CLX associadas à cetramida, e do QMiX, por meio da microscopia confocal de varredura a laser. **Métodos:** Biofilmes de *E. faecalis* (ATCC- 29212) foram induzidos sobre blocos de dentina bovina por 14 dias. Os blocos de dentina contendo biofilme foram mantidos por 1 minuto nas seguintes soluções: hipoclorito de sódio (NaOCl) 2,5%; NaOCl 2,5% + cetramida (CTR) 0,2%; clorexidina (CLX) 2%; CLX 2,5% + CTR 0,2%; CTR 0,2%; QMiX. Após contato com as soluções, o corante Live/Dead® BacLight foi aplicado sobre os blocos de dentina para a análise do biofilme remanescente em microscópio confocal de varredura a laser. As imagens foram avaliadas no software BioImage_L quanto ao biovolume total (μm^3), biovolume verde (células vivas) (μm^3) e percentual de cobertura do substrato (%). Os resultados foram submetidos ao teste não paramétrico de Kruskal-Wallis e Dunn, com nível de significância de 5%. **Resultados** Não foram observados diferentes valores do biovolume total de micro-organismos após uso de CLX, CLX+CTR, CTR, QMiX e água destilada ($p>0,05$). Os menores valores de biovolume total e verde foram apresentados por NaOCl e NaOCl+CTR. CTR e QMiX mostraram valores intermediários para o biovolume verde, com ação superior à CLX e CLX+CTR ($p<0,05$). NaOCl e NaOCl+CTR mostraram grande capacidade de remoção de micro-organismos e limpeza do substrato. QMiX não proporcionou eliminação bacteriana apresentando resultado intermediário. **Conclusão:** Conclui-se que a cetramida não influenciou na ação da CHX. NaOCl e NaOCl+CTR atuam sobre a viabilidade, arquitetura e eliminação de biofilme.

Palavras-chave: Agentes antibacterianos, biofilme, clorexidina, detergentes, *Enterococcus faecalis*, hipoclorito de sódio, irrigantes do canal radicular, microscopia confocal de varredura a laser, QMiX.

4.2 INTRODUÇÃO

O sucesso após o tratamento endodôntico está relacionado à atuação sobre micro-organismos (1). Agentes antimicrobianos são utilizados durante o preparo biomecânico e em medicações intracanaís. *Enterococcus faecalis* é um micro-organismo comumente relacionado ao insucesso após tratamento endodôntico (2-5), em função de sua persistência no sistema de canais radiculares ou pela recolonização via inadequado selamento (6, 7). Apresenta diversos mecanismos de defesa e resistência, destacando-se a capacidade de organização em biofilme (5). No biofilme, os micro-organismos envoltos pela matriz polimérica extracelular tendem a ter um baixo metabolismo, apresentando maior resistência aos antimicrobianos, além da própria matriz servir como barreira para o transporte de moléculas para o seu interior (8).

As soluções irrigadoras mais utilizadas no preparo de canais radiculares são hipoclorito de sódio (NaOCl) e clorexidina (CLX). O NaOCl apresenta ampla ação antimicrobiana e potencial de dissolução de material orgânico como tecido pulpar, fibras colágenas e biofilme bacteriano (9). A CLX também atua sobre uma gama de micro-organismos, além de apresentar substantividade (10), entretanto não tem ação de dissolução de matéria orgânica.

A microscopia eletrônica de varredura mostra que CLX a 2% por 15 minutos não é capaz de remover biofilme da microbiota endodôntica (11). A análise por microscopia confocal de varredura a laser demonstra que o NaOCl a 1% atua sobre a viabilidade e arquitetura do biofilme, o que não é observado para a CLX a 2% (12). Por outro lado, a CLX não mostra capacidade de dissolução do biofilme e limpeza do substrato após 30 minutos de aplicação (13).

A adição de um surfactante às soluções irrigadoras pode favorecer a ação antibiofilme. Surfactantes podem diminuir a força coesiva entre a matriz polimérica extracelular e a parede celular bacteriana, promovendo desestruturação do biofilme (14, 15). CHX-Plus, que contém CLX associada a um surfactante, apresenta melhores resultados que a CLX convencional sobre biofilme multiespécie (16, 17). Ao utilizar um modelo com bactérias no interior dos túbulos dentinários, Wang et al. em 2012 verificaram que após 1 minutos de aplicação em dentina infectada por *E. faecalis*, a CHX-Plus exibe ação semelhante ao NaOCl a 6% e à associação de NaOCl a 2% com cetramida (CTR), um surfactante catiônico (15).

QMiX (Dentsply Tulsa Dental, Tulsa, OK, USA) é uma solução irrigadora que associa CLX a 2%, EDTA a 17% e a CTR (18) e tem demonstrado atividade semelhante a do NaOCl a 6% na desinfecção de túbulos dentinários contaminados com *E. faecalis* (19, 20). Sobre biofilme de *E. faecalis*, QMiX apresenta atividade antibacteriana superior a CLX após 1 minuto de contato (18). A CTR também está presente em outras soluções irrigadoras comercializadas como Cloreximid, Tetraclean (21) Hypoclean (22) e SmearClear (23).

A CTR a 0,0312% promove culturas negativas quando aplicada por 1 minuto sobre biofilme de *E. faecalis* induzido por 24 horas (24). Na concentração de 0,2%, elimina 100% dos micro-organismos em 1 minuto (25). Segundo Arias-Moliz et al. (26), quando o ácido láctico foi combinado à CTR, o surfactante promoveu um aumento da atividade antibiofilme sobre três cepas de *E. faecalis*. A CTR também aumenta a ação antibiofilme de outras soluções como EDTA, ácido cítrico (27) e BioPure MTAD (28).

O presente estudo tem por objetivo a avaliação da atividade antibiofilme de NaOCl e CLX associadas à CTR e de QMiX, por meio de microscopia confocal de varredura a laser.

4.3 MATERIAL E MÉTODO

4.3.1 *Confecção dos blocos de dentina*

Como substrato para os biofilmes foram utilizados 42 blocos de dentina bovina medindo 5 mm x 5 mm x 0,7 mm (largura x comprimento x espessura) cortados por disco diamantado em baixa velocidade em máquina de corte Isomet (Buehler, LakeBluff, IL, EUA) e irrigação abundante. Após os cortes, foi realizado polimento com lixa d' água de granulação 600 (3M, Ribeirão Preto, SP, BR). Os blocos de dentina foram colocados em um tudo de ensaio contendo água destilada e levados a uma autoclave para esterilização a 121°C por 20 minutos (13, 29)

4.3.2 *Indução do biofilme sobre os blocos de dentina*

Os blocos de dentina foram posicionados em placa de cultura celular de 24 poços, individualmente. Foram dispensados 200µL da suspensão bacteriana de *E. faecalis* (ATCC- 29212), ajustada em espectrofotômetro com $DO_{600}=0,060$, equivalente a 1×10^7 unidades formadoras de colônia por mL (UFC mL⁻¹) e 1,8 mL de meio BHI, deixando os corpos de prova totalmente submersos. As placas foram incubadas durante 14 dias a

37°C, em incubadora de bancada com agitação orbital em ambiente de microaerofilia, sendo o meio de cultura BHI renovado a cada 48 horas.

4.3.3 Contato direto entre biofilme e soluções irrigadoras

Para avaliação da atividade antibiofilme, foram utilizadas soluções irrigadoras e associações divididas em 7 grupos (Tabela 1), por 1 minuto de contato.

Para a verificação do efeito das soluções irrigadoras sobre o biofilme, os blocos foram enxaguados cuidadosamente em solução salina e a seguir imersos em 1 mL de cada solução avaliada, por 1 minuto ($n=3$). No grupo controle negativo, os biofilmes foram apenas enxaguados com água destilada, sem sofrer nenhum tratamento. Após o período de contato entre os biofilmes e as soluções irrigadoras, os blocos de dentina foram imersos em soluções neutralizantes (Tabela 1) por 30 segundos e enxaguados novamente em solução salina.

Tabela 1. Divisão dos grupos de pesquisa

Grupos experimentais	Soluções avaliadas	Soluções neutralizantes
Grupo I	NaOCl a 2,5%*	Tiosulfato de sódio a 1%**
Grupo II	NaOCl a 2,5% + CTR a 0,2%**	Tiosulfato de sódio 1% + Tween 80 3%** + α -Lecitina 0,7%**
Grupo III	CLX a 2%*	Tween 80 a 3% + α -Lecitina a 0,7%
Grupo IV	CLX a 2% + CTR a 0,2%	Tween 80 a 3% + α -Lecitina a 0,7%
Grupo V	CTR a 0,2%	Tween 80 a 3% + α -Lecitina a 0,7%
Grupo VI	QMiX***	Tween 80 a 3% + α -Lecitina a 0,7%
Grupo VII	Solução Salina a 0,85%	Solução Salina a 0,85%

*Farmácia de Manipulação da Faculdade de Farmácia de Araraquara, Araraquara, SP, Brasil.

** Sigma-Aldrich Brasil Ltda. São Paulo, SP, Brasil.

*** Dentsply Tulsa Dental Specialties, Tulsa, OK, Estados Unidos da América.

4.3.4 Análise do biofilme em microscópio confocal de varredura a laser

Para a análise da ação antimicrobiana em microscópio confocal de varredura a laser, os blocos de dentina com o biofilme bacteriano foram corados com a solução Live/Dead® BacLight (Invitrogen, Eugene, OR, USA), que apresentam os corantes SYTO-9 e iodeto de propídio, e coram as células vivas (verde) e mortas (vermelho), preparados imediatamente antes do uso. 50 µL de corante foram gotejados sobre cada biofilme e as amostras foram incubadas por 15 minutos em temperatura ambiente e protegidos da luz. Posteriormente foram colocados sobre uma lâmina de vidro e levadas ao microscópio confocal de varredura a laser (Leica TCS-SPE; Leica Microsystems GmbH, Mannheim, Alemanha), sendo analisados individualmente.

A análise foi realizada com lente objetiva em aumento de 40X. Em cada uma das amostras, foram observados 6 campos aleatórios, totalizando 18 campos por grupo. As imagens foram capturadas a cada intervalo de 1,0 µm, no formato de 512 x 512 pixels, usando o programa *Leica Application Suite-Advanced Fluorescence* (LAS AF, Leica Microsystems GmbH). Cada imagem obtida representou uma área de 275 x 275 µm². As imagens foram transferidas para o programa BioImage_L(30). A ferramenta “biofilm analysis” foi empregada para avaliar os seis campos de cada amostra. Ao final do processo de análise, foi gerado um arquivo com extensão XLS, o qual apresenta várias planilhas, sendo duas com os dados de interesse. A primeira é denominada *biovolume-stack* e a segunda *substratum*, as quais nos fornece as variáveis de interesse, como biovolume total (µm³), biovolume verde (µm³) e percentual de cobertura do substrato (%). Os resultados de cada grupo foram reunidos em uma coluna para fornecer uma média única representativa dos 18 campos. Os resultados foram submetidos ao teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, para comparação entre os grupos, seguidos pelo teste de

Dunn, para detectar quais grupos diferem entre si em software *GraphPad Prism v. 5.0* (GraphPad Software, San Diego, Califórnia, EUA), com nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

4.4 RESULTADOS

A Figura 1 ilustra as imagens obtidas por microscopia confocal de varredura a laser dos biofilmes após 1 minuto de contato com as soluções irrigadoras e associações.

A média, mediana, valor máximo e valor mínimo do biovolume total (μm^3) e biovolume verde (μm^3) estão expressos na Tabela 2. O percentual de cobertura do substrato, representado pelo biofilme remanescente sobre a dentina após o tratamento com as soluções irrigadoras está apresentado na Figura 2:

Após um minuto de contato, NaOCl e NaOCl+CTR apresentaram maior redução do biovolume total e biovolume verde, com diferença significativa sobre todos os outros grupos experimentais ($p < 0,05$). Maior redução do biovolume verde, representados pelos micro-organismos vivos, foi observada com CTR e QMiX quando comparados à CLX e CLX+CTR ($p < 0,05$), que mostraram atividade semelhante à da água destilada ($p > 0,05$). NaOCl e NaOCl+CTR também mostraram grande capacidade de remoção de micro-organismos e limpeza da dentina após um minuto de contato com o biofilme, o que não foi observado com CLX, CLX + CTR e CTR. QMiX apresentou um valor intermediário para a eliminação de micro-organismos sobre o substrato, sem diferença estatística ao demais grupos ($p < 0,05$).

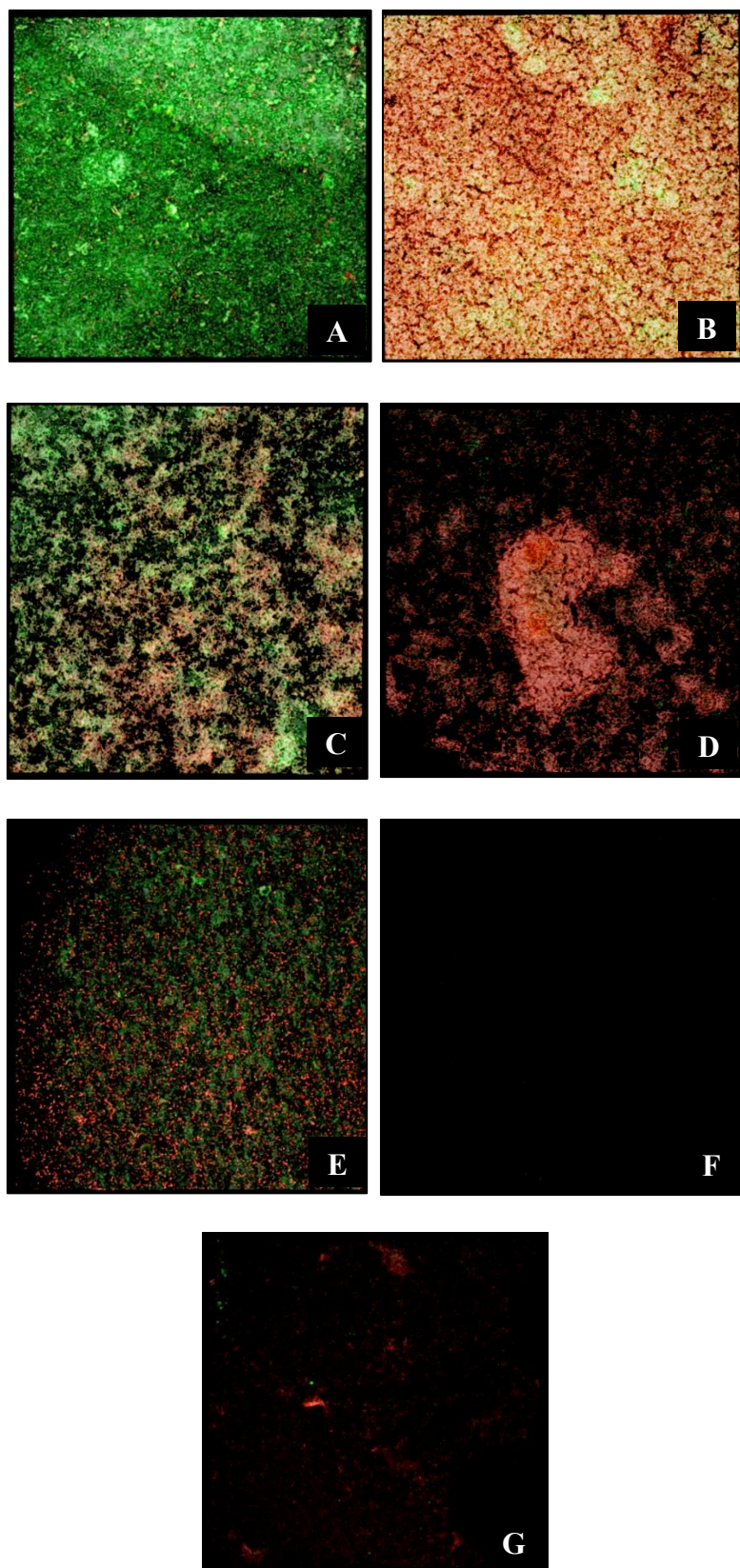


Figura 1. Reconstrução tridimensional dos biofilmes após o tratamento por 1 minuto com as soluções irrigadoras e associações: **A-** Água destilada, **B-** clorexidina, **C-** clorexidina + cetramida, **D-** cetramida, **E-** QMiX, **F-** hipoclorito de sódio, **G:** hipoclorito de sódio + cetramida.

Tabela 2. Média, mediana, valor mínimo e máximo do biovolume total e verde (μm^3) após 1 minuto de contato entre o biofilme de *E. faecalis* e soluções irrigadoras ou associações.

Biovolume total (μm^3)							
	Água destilada	NaOCl	NaOCl + CTR	CLX	CLX + CTR	CTR	QMiX
Média:	$4,03 \times 10^5$	$5,70 \times 10^2$	$1,32 \times 10^4$	$4,38 \times 10^5$	$4,34 \times 10^5$	$2,22 \times 10^5$	$1,05 \times 10^5$
Mediana:	$2,40 \times 10^5$	$2,66 \times 10^2$	$3,58 \times 10^2$	$1,21 \times 10^5$	$2,62 \times 10^5$	$1,63 \times 10^5$	$9,96 \times 10^4$
Mínimo:	$3,20 \times 10^4$	$3,8 \times 10^1$	0	$3,01 \times 10^4$	$5,68 \times 10^4$	$2,11 \times 10^3$	$2,55 \times 10^4$
Máximo:	$1,95 \times 10^6$	$1,50 \times 10^3$	$9,13 \times 10^4$	$2,9 \times 10^6$	$1,30 \times 10^6$	$6,64 \times 10^5$	$2,17 \times 10^5$
	A	B	B	A	A	A	A

Biovolume verde (μm^3)							
	Água destilada	NaOCl	NaOCl + CTR	CLX	CLX + CTR	CTR	QMiX
Média:	$3,06 \times 10^5$	$4,93 \times 10^2$	$4,06 \times 10^3$	$2,04 \times 10^5$	$3,27 \times 10^5$	$1,92 \times 10^4$	$1,72 \times 10^4$
Mediana:	$1,54 \times 10^5$	$2,21 \times 10^2$	$3,07 \times 10^2$	$3,01 \times 10^4$	$2,11 \times 10^5$	$5,59 \times 10^3$	$1,24 \times 10^4$
Mínimo:	$2,87 \times 10^4$	0	0	$7,98 \times 10^2$	$3,40 \times 10^3$	$1,71 \times 10^2$	$1,35 \times 10^3$
Máximo:	$1,89 \times 10^6$	$1,37 \times 10^3$	$3,43 \times 10^4$	$1,29 \times 10^6$	$1,15 \times 10^6$	$1,07 \times 10^5$	$5,82 \times 10^4$
	a	c	c	a	a	b	b

Os valores seguidos por letras maiúsculas diferentes apresentam diferença estatística significativa para o biovolume total (μm^3) verificado após 1 minuto de contato entre os biofilmes de *E. faecalis* com as soluções irrigadoras e associações ($p < 0,05$). Os valores seguidos por letras minúsculas diferentes apresentam diferença estatística significativa para o biovolume verde (μm^3) ($p < 0,05$).

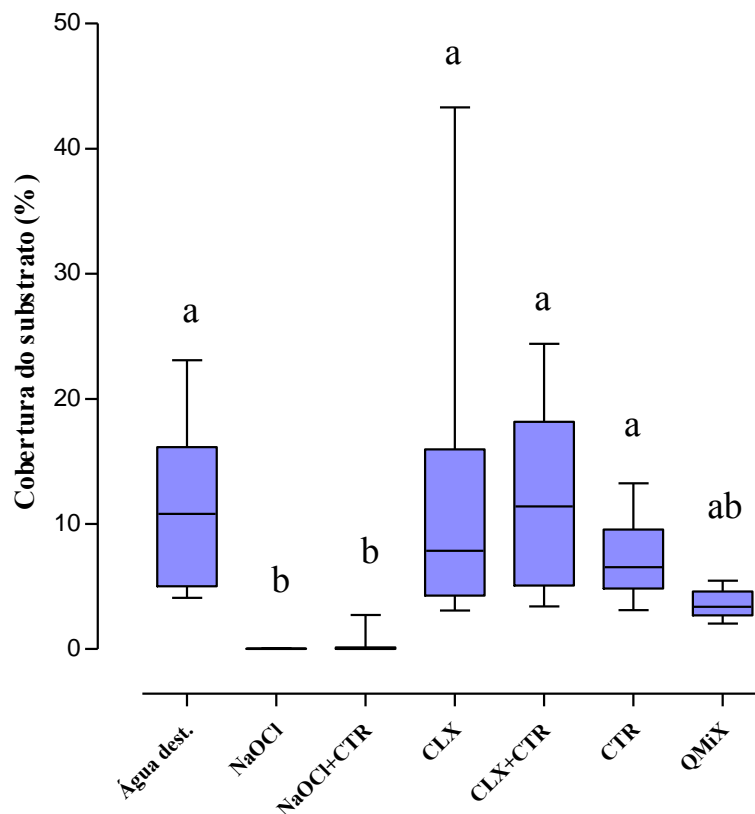


Figura 2. Box-plots dos percentuais de cobertura do substrato após 1 minuto de contato com as soluções irrigadoras e associações. As letras diferentes indicam diferença estatística significativa entre os grupos ($p < 0,05$).

4.5 DISCUSSÃO

A atividade antimicrobiana e de dissolução do biofilme por soluções irrigadoras permite atuação no sistema de canais radiculares e áreas como istmos, canais acessórios e irregularidades. Diferentes substratos podem ser usados para indução de biofilme *in vitro* como hidroxiapatita (28, 29) dentina humana (31, 32), dentina bovina (12, 33), membrana de nitrocelulose (34) ou poliestireno (32). O tipo de substrato utilizado para a indução influencia a capacidade de formação do biofilme (29, 32). A dentina bovina foi escolhida por apresentar semelhança à dentina humana, sendo de fácil obtenção e

comumente usada (12, 13, 29, 33), proporcionando adequada formação de biofilme (29).

A avaliação de agentes antimicrobianos pode ser realizada sobre biofilmes em diferentes estágios, desde 24 horas de indução até 16 semanas (16, 28, 35, 36). O biofilme maduro usualmente apresenta maior resistência aos antimicrobianos (16, 20, 32). O modelo de biofilme utilizado é baseado na análise em microscopia confocal de varredura a laser que demonstrou formação de biofilme maduro sobre blocos de dentina bovina após 14 e 21 dias (29).

A microscopia eletrônica de varredura permite a análise de micro-organismos na superfície radicular (37), dentina radicular e túbulos dentinários (11). Entretanto, apenas a camada superficial pode ser observada. Na microscopia confocal de varredura a laser, é possível a sobreposição de imagens e obtenção de uma imagem 3D. O uso de marcadores específicos fluorescentes permite a detecção de micro-organismos determinando aspectos bioquímicos, fisiológicos, físico-químicos e verificação da viabilidade celular (38).

O marcador Live/Dead® BacLight™ é utilizado para avaliar a integridade da membrana das células do biofilme. O kit é composto por SYTO-9 e iodeto de propídio. SYTO-9 marca com coloração verde fluorescente os ácidos nucleicos das células presentes, sejam micro-organismos vivos ou mortos, enquanto o iodeto de propídio penetra somente nas células que apresentam danos à membrana citoplasmática, marcando os micro-organismos mortos (12, 17, 28). A excitação máxima para o SYTO-9 é 480/500 nm e para o iodeto de propídio 490/635 nm (17).

Após a aquisição de imagens, é necessário o uso de programas específicos como o BioImage_L (30) que apresenta ferramentas para análise do biofilme, como

biovolume total, biovolume verde, biovolume vermelho, espessura média e percentual de cobertura do substrato. Durante as análises do biofilme no BioImage_L, o biovolume total representa o volume ocupado por todas as células do biofilme. Já o biovolume verde indica o volume ocupado apenas pelas células vivas e o percentual de cobertura do substrato, a quantidade de biofilme residual após determinado tratamento.

A análise da proporção do volume de células vivas e mortas sobre o biovolume total vem sendo aplicada em estudos que avaliam a atividade de soluções irrigadoras sobre biofilme (15, 17, 20, 28, 33). Entretanto, por se tratar de uma proporção, resultados semelhantes entre grupos podem representar realidades distintas quando o valor absoluto é analisado. No presente estudo foram utilizados os reais valores verificados em μm^3 para os biovolumes total e verde (12, 29).

De acordo com os resultados obtidos, somente NaOCl e NaOCl+CTR reduziram consideravelmente o volume total de células do biofilme e foi verificada uma quantidade mínima de células viáveis remanescentes após a utilização destas substâncias. Não houve redução satisfatória do biovolume total de células bacterianas após o uso das demais soluções irrigadoras e associações, porém uma pequena porção de micro-organismos permaneceram viáveis após a aplicação de CTR e QMiX, mostrando melhor ação que CLX e CLX+CTR sobre biofilme de *E. faecalis*. A superioridade de QMiX sobre a CLX também foi observada por Stojicic et al. em 2012 (18) e Wang et al. em 2012 (20) sobre biofilmes. Apesar disso, no presente estudo, QMiX não mostrou capacidade de reduzir a viabilidade celular sobre os biofilmes de forma semelhante ao NaOCl, concordando com Ordinola-Zapata et al. (33). Um estudo recente realizado por Morgental et al.(39) mostra que a dentina pode reduzir a atividade antimicrobiana de QMiX, e o substrato utilizado para a indução dos biofilmes no

presente estudo foi a dentina bovina, o que pode justificar a sua baixa ação sobre os micro-organismos.

Quanto à análise de limpeza da dentina, foi verificado que NaOCl e NaOCl+CTR apresentaram os melhores resultados. NaOCl tem apresentado atividade de desestruturação e dissolução do biofilme, proporcionando maior limpeza do substrato após sua aplicação, o que não pode ser observado quando a CLX é utilizada (11-13, 18, 33, 36).

A combinação de CLX, CTR e EDTA na composição de QMiX reduziu o percentual de células bacterianas sobre a dentina apresentando valores intermediários. Como a concentração de CTR em QMiX não é divulgada, uma maior quantidade do surfactante, além da combinação com EDTA, poderia justificar a maior remoção das células do biofilme sobre o substrato, quando comparado com a associação de CLX+CTR empregada no estudo.

No presente estudo nenhuma das soluções ou associações avaliadas foram semelhantes ao NaOCl sobre biofilme bacteriano e a presença de CTR a 0,2% não favoreceu a atividade antibiofilme da CLX. Outros estudos devem ser realizados avaliando possíveis associações com surfactantes em concentrações variadas.

4.6 CONCLUSÃO

Conclui-se que a cetramida não influenciou na ação da CHX. NaOCl e NaOCl+CTR são irrigantes com atuação sobre a viabilidade, arquitetura e eliminação de biofilme.

4.7 REFERÊNCIAS

1. 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.
2. Rocas IN, Siqueira JF, Jr., Santos KR. Association of *Enterococcus faecalis* with different forms of periradicular diseases. *J Endod* 2004;30(5):315-320.
3. Siqueira Jr JF, Rôças IN. Polymerase chain reaction-based analysis of microorganisms associated with failed endodontic treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2004;97(1):85-94.
4. Siqueira JF, Jr., Rocas IN. Clinical implications and microbiology of bacterial persistence after treatment procedures. *J Endod* 2008;34(11):1291-1301 e1293.
5. Stuart CH, Schwartz SA, Beeson TJ, Owatz CB. *Enterococcus faecalis*: its role in root canal treatment failure and current concepts in retreatment. *J Endod* 2006;32(2):93-98.
6. Oliveira AC, Tanomaru JM, Faria-Junior N, Tanomaru-Filho M. Bacterial leakage in root canals filled with conventional and MTA-based sealers. *Int Endod J* 2011;44(4):370-375.
7. Siqueira JF, Jr., Rocas IN. Distinctive features of the microbiota associated with different forms of apical periodontitis. In: *J Oral Microbiol.* 2009/01/01 ed.; 2009.
8. Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev* 2002;15(2):167-193.
9. Haapasalo M, Shen Y, Qian W, Gao Y. Irrigation in endodontics. *Dent Clin North Am* 2010;54(2):291-312.
10. Mohammadi Z, Abbott PV. The properties and applications of chlorhexidine in endodontics. *Int Endod J* 2009;42(4):288-302.

11. 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):434-437.
12. Ordinola-Zapata R, Bramante CM, Cavenago B, Graeff MS, Gomes de Moraes I, Marciano M, et al. Antimicrobial effect of endodontic solutions used as final irrigants on a dentine biofilm model. *Int Endod J* 2012;45(2):162-168.
13. 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):1134-1138.
14. Simoes M, Pereira MO, Vieira MJ. Effect of mechanical stress on biofilms challenged by different chemicals. *Water Res* 2005;39(20):5142-5152.
15. Wang Z, Shen Y, Ma J, Haapasalo M. The effect of detergents on the antibacterial activity of disinfecting solutions in dentin. *J Endod* 2012;38(7):948-953.
16. Shen Y, Stojicic S, Haapasalo M. Antimicrobial efficacy of chlorhexidine against bacteria in biofilms at different stages of development. *J Endod* 2011;37(5):657-661.
17. 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):981-985.
18. Stojicic S, Shen Y, Qian W, Johnson B, Haapasalo M. Antibacterial and smear layer removal ability of a novel irrigant, QMiX. *Int Endod J*. 2012;45(4):363-371.
19. Ma J, Wang Z, Shen Y, Haapasalo M. A new noninvasive model to study the effectiveness of dentin disinfection by using confocal laser scanning microscopy. *J Endod* 2011;37(10):1380-1385.

20. 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):1376-1379.
21. Giardino L, Savoldi E, Ambu E, Rimondini R, Palezona A, Debbia EA. Antimicrobial effect of MTAD, Tetraclean, Cloreximid, and sodium hypochlorite on three common endodontic pathogens. *Indian J Dent Res* 2009;20(3):391.
22. Palazzi F, Morra M, Mohammadi Z, Grandini S, Giardino L. Comparison of the surface tension of 5.25% sodium hypochlorite solution with three new sodium hypochlorite-based endodontic irrigants. *Int Endod J* 2011;45(2):129-135.
23. da Silva LA, Sanguino AC, Rocha CT, Leonardo MR, Silva RA. Scanning electron microscopic preliminary study of the efficacy of SmearClear and EDTA for smear layer removal after root canal instrumentation in permanent teeth. *J Endod* 2008;34(12):1541-1544.
24. Arias-Moliz MT, Ferrer-Luque CM, Gonzalez-Rodriguez MP, Valderrama MJ, Baca P. Eradication of *Enterococcus faecalis* biofilms by cetrимide and chlorhexidine. *J Endod* 2010;36(1):87-90.
25. Baca P, Junco P, Arias-Moliz MT, Gonzalez-Rodriguez MP, Ferrer-Luque CM. Residual and antimicrobial activity of final irrigation protocols on *Enterococcus faecalis* biofilm in dentin. *J Endod* 2011;37(3):363-366.
26. Arias-Moliz MT, Baca P, Ordonez-Becerra S, Gonzalez-Rodriguez MP, Ferrer-Luque CM. Eradication of enterococci biofilms by lactic acid alone and combined with chlorhexidine and cetrимide. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2012;17(5):e902-906.
27. Ferrer-Luque CM, Arias-Moliz MT, Gonzalez-Rodriguez MP, Baca P. Antimicrobial activity of maleic acid and combinations of cetrимide with chelating agents against *Enterococcus faecalis* biofilm. *J Endod* 2010;36(10):1673-1675.

28. 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* 2010;43(6):528-535.
29. 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. *J Endod* 2013;39(3):346-350.
30. 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):1734-1739.
31. 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):526-529.
32. Liu H, Wei X, Ling J, Wang W, Huang X. Biofilm formation capability of *Enterococcus faecalis* cells in starvation phase and its susceptibility to sodium hypochlorite. *J Endod* 2010;36(4):630-635.
33. Ordinola-Zapata R, Bramante CM, Brandao Garcia R, Bombarda de Andrade F, Bernardineli N, Gomes de Moraes I, et al. The antimicrobial effect of new and conventional endodontic irrigants on intra-orally infected dentin. In: *Acta Odontol Scand.* 2012/05/23 ed.; 2012.
34. Bryce G, O'Donnell D, Ready D, Ng YL, Pratten J, Gulabivala K. Contemporary root canal irrigants are able to disrupt and eradicate single- and dual-species biofilms. *J Endod* 2009;35(9):1243-1248.
35. Arias-Moliz MT, Ferrer-Luque CM, Espigares-Garcia M, Baca P. *Enterococcus faecalis* biofilms eradication by root canal irrigants. *J Endod* 2009;35(5):711-714.

36. Chavez de Paz LE, Bergenholtz G, Svensater G. The effects of antimicrobials on endodontic biofilm bacteria. *J Endod* 2010;36(1):70-77.
37. Leonardo MR, Rossi MA, Silva LA, Ito IY, Bonifacio KC. EM evaluation of bacterial biofilm and microorganisms on the apical external root surface of human teeth. *J Endod* 2002;28(12):815-818.
38. Wimpenny J, Manz W, Szewzyk U. Heterogeneity in biofilms. *FEMS Microbiol Rev* 2000;24(5):661-671.
39. Morgental RD, Singh A, Sappal H, Kopper PM, Vier-Pelisser FV, Peters OA. Dentin Inhibits the Antibacterial Effect of New and Conventional Endodontic Irrigants. *J Endod* 2013;39(3):406-410.

5 DISCUSSÃO

No primeiro capítulo desta dissertação foi comparada a atividade antibacteriana de soluções irrigadoras convencionais combinadas com ceftriaxona e também a do irrigante que associa CLX, EDTA e ceftriaxona (QMiX), sobre suspensão de *E. faecalis* (micro-organismos em fase planctônica) correlacionando com a atuação frente ao biofilme. Os resultados evidenciam aumento da resistência aos antimicrobianos quando os micro-organismos se encontram organizados em biofilme. Este fato pode ser explicado por diferentes mecanismos proporcionados por este tipo de organização, seja pela restrição física das moléculas oferecida pela matriz extracelular, seja pela redução de oxigênio e nutrientes que faz com que os micro-organismos entrem em um estágio estacionário de crescimento, ou pelas características de resistência adquiridas ¹³.

Como já descrito, *E. faecalis* além de ser um micro-organismo resistente, apresenta capacidade de formar biofilmes (Apêndice 4). Desta forma, a avaliação da atuação dos agentes antimicrobianos sobre esta forma de organização bacteriana tem grande importância. Grande parte dos estudos com *E. faecalis* utiliza monoculturas, entretanto, a infecção endodôntica apresenta natureza polimicrobiana e por isso torna-se importante em estudos futuros avaliar a ação dos antimicrobianos sobre este micro-organismo associados a outras espécies encontradas em canais radiculares infectados ⁵⁹,
61.

Outro fator importante durante o estudo com biofilmes diz respeito ao substrato utilizado. Alguns estudos demonstram que a dentina diminui consideravelmente a ação de agentes antimicrobianos ^{26, 40, 50}. Assim, pesquisas que relacionam uso de substâncias no sistema de canais radiculares devem, preferencialmente, utilizar a dentina como substrato, visando a aproximação da realidade clínica. O estágio de maturidade do

biofilme também apresenta relevância nos resultados, uma vez que há resistência progressiva às soluções antimicrobianas com o aumento da sua maturação^{34, 56, 71}, e desta forma, organizações em estágios avançados devem ser empregadas em testes como o contato direto entre substâncias antimicrobianas sobre o biofilme, para simular as condições encontradas no sistema de canais radiculares⁶⁰.

As soluções irrigadoras convencionais como NaOCl e CLX e associações, assim como CTR e QMiX mostraram atuação antimicrobiana sobre *E. faecalis* em fase planctônica, promovendo a total eliminação dos micro-organismos, da mesma forma que Abdullah et al.¹ (2005) notaram a presença de culturas negativas de *E. faecalis* em 1 minuto de contato com NaOCl, e em 15 minutos com a CLX a 0,2%. Portenier et al.⁵⁰ (2006) verificaram completa eliminação dos micro-organismos em 5 minutos de contato com CLX a 2% e em 10 segundos, quando a combinação de CLX e CTR foi empregada. Stojicic et al.⁶⁴ mostraram que QMiX apresenta atividade antimicrobiana sobre *E. faecalis* em fase planctônica em 5 segundos.

Sobre o biofilme de *E. faecalis*, o resultado de culturas negativas só foi apresentado por NaOCl e NaOCl+CTR, mostrando que as demais soluções possuem somente a capacidade de redução dos micro-organismos após 1 e 3 minutos de sua utilização.

No segundo capítulo, o mesmo modelo de biofilme empregado no capítulo 1 foi utilizado para a análise da atividade apresentada pelas soluções irrigadoras e associações por meio da visualização em microscopia confocal de varredura a laser. Por este método de análise, a atividade antibiofilme exercida pelo NaOCl confirma a maior capacidade de matar e remover os micro-organismos, promovendo a limpeza da dentina.

A CLX não apresenta potencial de dissolução de matéria orgânica²⁷, o que dificulta a sua atuação nos micro-organismos presentes na estrutura interna do biofilme

mantendo remanescente de biofilme sobre a dentina após o uso desta solução irrigadora (Apêndice 5).

Em canais radiculares infectados, a presença de biofilme nas paredes dentinárias e no interior de túbulos dentinários representa um desafio durante à terapia endodôntica. A dificuldade de matar e eliminar os micro-organismos do SCR pode promover o insucesso do tratamento endodôntico.

Diante da presença de micro-organismos planctônicos e em biofilme nos canais radiculares infectados, deve-se dar preferência para as soluções irrigadoras ou associações que atuem de forma efetiva na morte e eliminação dos mesmos contribuindo com o sucesso do tratamento. Assim, a solução de hipoclorito de sódio apresentou vantagens para o emprego durante o preparo biomecânico dos canais radiculares. A associação de CTR não mostrou aumento da atividade antibacteriana e antibiofilme sobre *E. faecalis*, porém, a presença do surfactante poderá influenciar em outras propriedades, como a penetrabilidade do irrigante para o interior dos túbulos dentinários, por exemplo, que deverão ser melhor avaliadas em estudos futuros.

6 CONCLUSÃO

Dentro das limitações do presente estudo, podemos concluir que:

- 1- NaOCl, NaOCl+CTR, CLX, CLX+CTR, CTR e QMiX eliminaram completamente *E. faecalis* em fase planctônica.
- 2- Somente NaOCl a 2% e NaOCl associado à CTR a 0,2% apresentam atividade significativa sobre a viabilidade, arquitetura e eliminação do biofilme de *E. faecalis*.
- 3- A cetramida a 0,2% não favorece a atividade antibiofilme das soluções irrigadoras.
- 4- QMiX apresentou atividade antibiofilme semelhante à CLX a 2% e à CLX+CTR após 1 minuto de contato.

7 REFERÊNCIAS

1. Abdullah M, Ng YL, Gulabivala K, Moles DR, Spratt DA. Susceptibilities of two *Enterococcus faecalis* phenotypes to root canal medications. *J Endod.* 2005; 31 (1): 30-6.
2. Abou-Rass M, Patonai FJ, Jr. The effects of decreasing surface tension on the flow of irrigating solutions in narrow root canals. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1982; 53 (5): 524-6.
3. 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.
4. Arias-Moliz MT, Ferrer-Luque CM, Gonzalez-Rodriguez MP, Valderrama MJ, Baca P. Eradication of *Enterococcus faecalis* biofilms by cetrimide and chlorhexidine. *J Endod.* 2010; 36 (1): 87-90.
5. Aubut V, Pommel L, Verhille B, Orsiere T, Garcia S, About I, et al. Biological properties of a neutralized 2.5% sodium hypochlorite solution. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2010; 109 (2): e120-5.
6. Baca P, Junco P, Arias-Moliz MT, Gonzalez-Rodriguez MP, Ferrer-Luque CM. Residual and antimicrobial activity of final irrigation protocols on *Enterococcus faecalis* biofilm in dentin. *J Endod.* 2011; 37 (3): 363-6.
7. Cameron JA. The effect of a fluorocarbon surfactant on the surface tension of the endodontic irrigant, sodium hypochlorite. A preliminary report. *Aust Dent J.* 1986; 31 (5): 364-8.
8. Chavez de Paz LE, Bergenholtz G, Svensater G. The effects of antimicrobials on endodontic biofilm bacteria. *J Endod.* 2010; 36 (1): 70-7.

*De acordo com o manual da FOAr/UNESP, adaptadas das normas Vancouver.

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
10. da Silva LA, Sanguino AC, Rocha CT, Leonardo MR, Silva RA. Scanning electron microscopic preliminary study of the efficacy of SmearClear and EDTA for smear layer removal after root canal instrumentation in permanent teeth. *J Endod.* 2008; 34 (12): 1541-4.
11. 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.
12. Distel JW, Hatton JF, Gillespie MJ. Biofilm formation in medicated root canals. *J Endod.* 2002; 28 (10): 689-93.
13. Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev.* 2002; 15 (2): 167-93.
14. Dornelles-Morgental R, Guerreiro-Tanomaru JM, de Faria-Junior NB, Hungaro-Duarte MA, Kuga MC, Tanomaru-Filho M. Antibacterial efficacy of endodontic irrigating solutions and their combinations in root canals contaminated with *Enterococcus faecalis*. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2011; 112 (3): 396-400.
15. 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.
16. Estrela C, Estrela CR, Barbin EL, Spano JC, Marchesan MA, Pecora JD. Mechanism of action of sodium hypochlorite. *Braz Dent J.* 2002; 13 (2): 113-7.

17. Figdor D, Davies JK, Sundqvist G. Starvation survival, growth and recovery of *Enterococcus faecalis* in human serum. *Oral Microbiol Immunol*. 2003; 18 (4): 234-9.
18. Garcia AJ, Kuga MC, Palma-Dibb RG, So MV, Matsumoto MA, Faria G, et al. Effect of sodium hypochlorite under several formulations on root canal dentin microhardness. *J Investig Clin Dent*. 2013.
19. Giardino L, Ambu E, Becce C, Rimondini L, Morra M. Surface tension comparison of four common root canal irrigants and two new irrigants containing antibiotic. *J Endod*. 2006; 32 (11): 1091-3.
20. Giardino L, Ambu E, Savoldi E, Rimondini R, Cassanelli C, Debbia EA. Comparative evaluation of antimicrobial efficacy of sodium hypochlorite, MTAD, and Tetraclean against *Enterococcus faecalis* biofilm. *J Endod*. 2007; 33 (7): 852-5.
21. Giardino L, Savoldi E, Ambu E, Rimondini R, Palezona A, Debbia EA. Antimicrobial effect of MTAD, Tetraclean, Cloreximid, and sodium hypochlorite on three common endodontic pathogens. *Indian J Dent Res*. 2009; 20 (3): 391.
22. Glantz PO, Hansson L. Wetting of dentine by some root canal medicaments. *Odontol Revy*. 1972; 23 (2): 205-10.
23. Gomes BP, Ferraz CC, Vianna ME, Berber VB, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. In vitro antimicrobial activity of several concentrations of sodium hypochlorite and chlorhexidine gluconate in the elimination of *Enterococcus faecalis*. *Int Endod J*. 2001; 34 (6): 424-8.
24. 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. *J Endod*. 2013; 39 (3): 346-50.
25. Guerreiro-Tanomaru JM, Morgental RD, Flumignan DL, Gasparini F, Oliveira JE, Tanomaru-Filho M. Evaluation of pH, available chlorine content, and antibacterial

activity of endodontic irrigants and their combinations against *Enterococcus faecalis*. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2011; 112 (1): 132-5.

26. 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.

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

28. Hidalgo E, Bartolome R, Dominguez C. Cytotoxicity mechanisms of sodium hypochlorite in cultured human dermal fibroblasts and its bactericidal effectiveness. *Chem Biol Interact*. 2002; 139 (3): 265-82.

29. Kakehashi S, Stanley HR, Fitzgerald RJ. The effects of surgical exposures of dental pulps in germ-free and conventional laboratory rats. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1965; 20 (3): 340-9.

30. Kandaswamy D, Venkateshbabu N. Root canal irrigants. *J Conserv Dent*. 2010; 13 (4): 256-64.

31. Korstgens V, Flemming HC, Wingender J, Borchard W. Uniaxial compression measurement device for investigation of the mechanical stability of biofilms. *J Microbiol Methods*. 2001; 46 (1): 9-17.

32. Leonardo MR. *Endodontia: tratamento de canais radiculares: princípios técnicos e biológicos*. São Paulo: Artes Médicas; 2005.

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

34. Liu H, Wei X, Ling J, Wang W, Huang X. Biofilm formation capability of *Enterococcus faecalis* cells in starvation phase and its susceptibility to sodium hypochlorite. *J Endod.* 2010; 36 (4): 630-5.
35. Love RM. *Enterococcus faecalis*--a mechanism for its role in endodontic failure. *Int Endod J.* 2001; 34 (5): 399-405.
36. Ma J, Wang Z, Shen Y, Haapasalo M. A new noninvasive model to study the effectiveness of dentin disinfection by using confocal laser scanning microscopy. *J Endod.* 2011; 37 (10): 1380-5.
37. Mehrvarzfar P, Saghiri MA, Asatourian A, Fekrazad R, Karamifar K, Eslami G, et al. Additive effect of a diode laser on the antibacterial activity of 2.5% NaOCl, 2% CHX and MTAD against *Enterococcus faecalis* contaminating root canals: an in vitro study. *J Oral Sci.* 2011; 53 (3): 355-60.
38. Mercade M, Duran-Sindreu F, Kuttler S, Roig M, Durany N. Antimicrobial efficacy of 4.2% sodium hypochlorite adjusted to pH 12, 7.5, and 6.5 in infected human root canals. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2009; 107 (2): 295-8.
39. Mohammadi Z, Abbott PV. The properties and applications of chlorhexidine in endodontics. *Int Endod J.* 2009; 42 (4): 288-302.
40. Morgental RD, Singh A, Sappal H, Kopper PM, Vier-Pelisser FV, Peters OA. Dentin Inhibits the Antibacterial Effect of New and Conventional Endodontic Irrigants. *J Endod.* 2013; 39 (3): 406-10.
41. Naenni N, Thoma K, Zehnder M. Soft tissue dissolution capacity of currently used and potential endodontic irrigants. *J Endod.* 2004; 30 (11): 785-7.
42. Oliveira DP, Barbizam JV, Trope M, Teixeira FB. In vitro antibacterial efficacy of endodontic irrigants against *Enterococcus faecalis*. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2007; 103 (5): 702-6.

43. Ordinola-Zapata R, Bramante CM, Brandao Garcia R, Bombarda de Andrade F, Bernardineli N, Gomes de Moraes I, et al. The antimicrobial effect of new and conventional endodontic irrigants on intra-orally infected dentin. *Acta Odontol Scand*. [Internet]. 2012 [acesso em May 21]. Disponível em http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=22607322
44. Ordinola-Zapata R, Bramante CM, Cavenago B, Graeff MS, Gomes de Moraes I, Marciano M, et al. Antimicrobial effect of endodontic solutions used as final irrigants on a dentine biofilm model. *Int Endod J*. 2012; 45 (2): 162-8.
45. Orstavik D, Haapasalo M. Disinfection by endodontic irrigants and dressings of experimentally infected dentinal tubules. *Endod Dent Traumatol*. 1990; 6 (4): 142-9.
46. Palazzi F, Morra M, Mohammadi Z, Grandini S, Giardino L. Comparison of the surface tension of 5.25% sodium hypochlorite solution with three new sodium hypochlorite-based endodontic irrigants. *Int Endod J*. 2011; 45 (2): 129-35.
47. 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*. 2010; 43 (6): 528-35.
48. Parmar D, Hauman CH, Leichter JW, McNaughton A, Tompkins GR. Bacterial localization and viability assessment in human ex vivo dentinal tubules by fluorescence confocal laser scanning microscopy. *Int Endod J*. 2011; 44 (7): 644-51.
49. Pinheiro ET, Gomes BP, Ferraz CC, Sousa EL, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. Microorganisms from canals of root-filled teeth with periapical lesions. *Int Endod J*. 2003; 36 (1): 1-11.

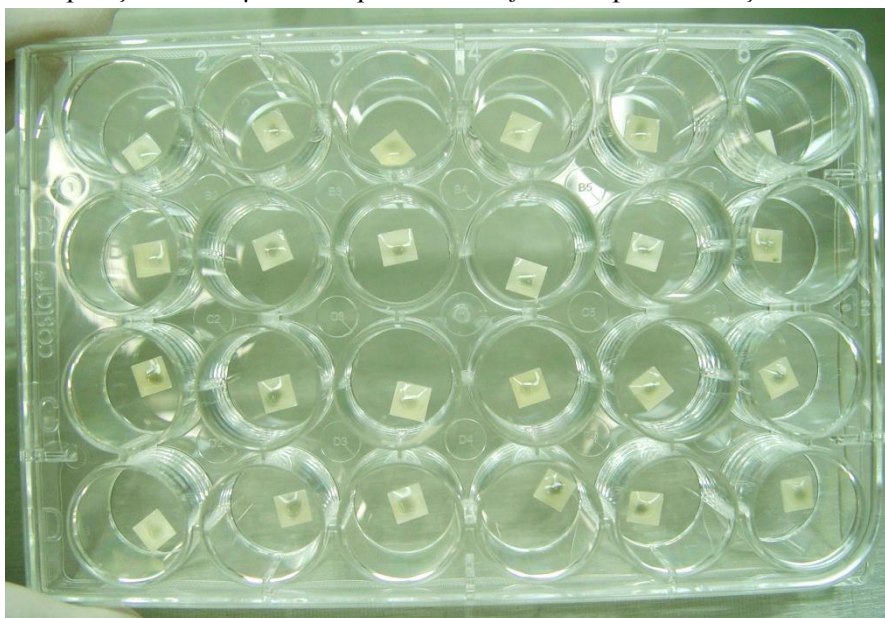
50. Portenier I, Waltimo T, Orstavik D, Haapasalo M. Killing of *Enterococcus faecalis* by MTAD and chlorhexidine digluconate with or without cetrimide in the presence or absence of dentine powder or BSA. *J Endod.* 2006; 32 (2): 138-41.
51. Rocas IN, Siqueira JF, Jr., Santos KR. Association of *Enterococcus faecalis* with different forms of periradicular diseases. *J Endod.* 2004; 30 (5): 315-20.
52. Rôças IN, Siqueira Jr JF, Aboim MC, Rosado AS. Denaturing gradient gel electrophoresis analysis of bacterial communities associated with failed endodontic treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2004; 98 (6): 741-9.
53. Ruff ML, McClanahan SB, Babel BS. In vitro antifungal efficacy of four irrigants as a final rinse. *J Endod.* 2006; 32 (4): 331-3.
54. Sedgley CM, Lennan SL, Appelbe OK. Survival of *Enterococcus faecalis* in root canals ex vivo. *Int Endod J.* 2005; 38 (10): 735-42.
55. 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.
56. Shen Y, Stojicic S, Haapasalo M. Antimicrobial efficacy of chlorhexidine against bacteria in biofilms at different stages of development. *J Endod.* 2011; 37 (5): 657-61.
57. 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.
58. Simoes M, Pereira MO, Vieira MJ. Effect of mechanical stress on biofilms challenged by different chemicals. *Water Res.* 2005; 39 (20): 5142-52.
59. Siqueira JF, Jr., Rocas IN. Clinical implications and microbiology of bacterial persistence after treatment procedures. *J Endod.* 2008; 34 (11): 1291-1301 e3.

60. Siqueira JF, Jr., Rocas IN. Distinctive features of the microbiota associated with different forms of apical periodontitis. *J Oral Microbiol.* [Internet]. 2009 [acesso em Dez 14]. Disponível em http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=21523208
61. Siqueira JF, Jr., Rocas IN, Debelian GJ, Carmo FL, Paiva SS, Alves FR, et al. Profiling of root canal bacterial communities associated with chronic apical periodontitis from Brazilian and Norwegian subjects. *J Endod.* 2008; 34 (12): 1457-61.
62. Siqueira JF, Jr., Rocas IN, Santos SR, Lima KC, Magalhaes FA, de Uzeda M. Efficacy of instrumentation techniques and irrigation regimens in reducing the bacterial population within root canals. *J Endod.* 2002; 28 (3): 181-4.
63. Siqueira Jr JF, Rôças IN. Polymerase chain reaction-based analysis of microorganisms associated with failed endodontic treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2004; 97 (1): 85-94.
64. Stojicic S, Shen Y, Qian W, Johnson B, Haapasalo M. Antibacterial and smear layer removal ability of a novel irrigant, QMiX. *Int Endod J.* 2012; 45 (4): 363-71.
65. Stuart CH, Schwartz SA, Beeson TJ, Owatz CB. *Enterococcus faecalis*: its role in root canal treatment failure and current concepts in retreatment. *J Endod.* 2006; 32 (2): 93-8.
66. Tasman F, Cehreli ZC, Ogan C, Etikan I. Surface tension of root canal irrigants. *J Endod.* 2000; 26 (10): 586-7.
67. Tendolkar PM, Baghdayan AS, Shankar N. Pathogenic enterococci: new developments in the 21st century. *Cell Mol Life Sci.* 2003; 60 (12): 2622-36.
68. Torabinejad M, Khademi AA, Babagoli J, Cho Y, Johnson WB, Bozhilov K, et al. A new solution for the removal of the smear layer. *J Endod.* 2003; 29 (3): 170-5.

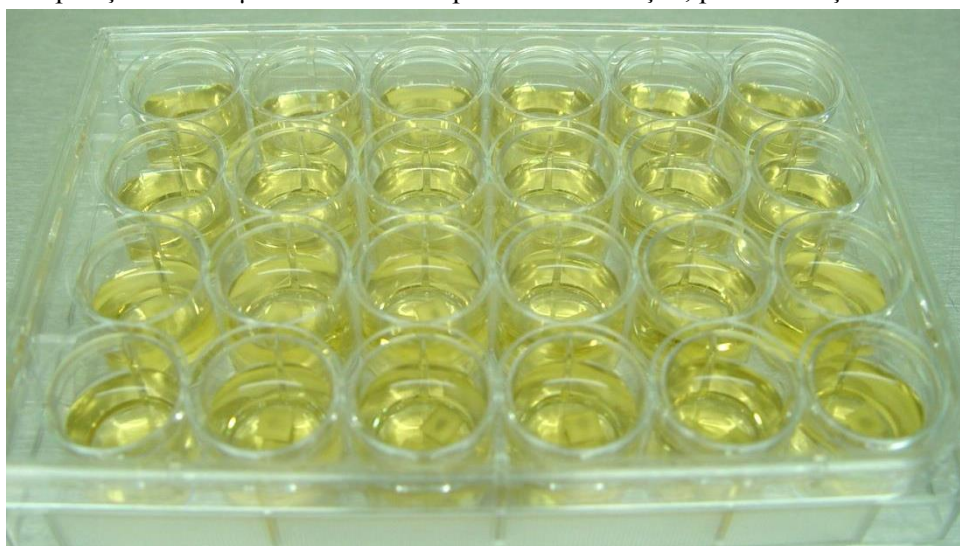
69. Vianna ME, Gomes BP. Efficacy of sodium hypochlorite combined with chlorhexidine against *Enterococcus faecalis* in vitro. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2009; 107 (4): 585-9.
70. Vianna ME, Gomes BP, Berber VB, Zaia AA, Ferraz CC, de Souza-Filho FJ. In vitro evaluation of the antimicrobial activity of chlorhexidine and sodium hypochlorite. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2004; 97 (1): 79-84.
71. 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.
72. Wang Z, Shen Y, Ma J, Haapasalo M. The effect of detergents on the antibacterial activity of disinfecting solutions in dentin. *J Endod.* 2012; 38 (7): 948-53.
73. White RR, Hays GL, Janer LR. Residual antimicrobial activity after canal irrigation with chlorhexidine. *J Endod.* 1997; 23 (4): 229-31.
74. Williamson AE, Cardon JW, Drake DR. Antimicrobial susceptibility of monoculture biofilms of a clinical isolate of *Enterococcus faecalis*. *J Endod.* 2009; 35 (1): 95-7.
75. 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.
76. Zehnder M. Root canal irrigants. *J Endod.* 2006; 32 (5): 389-98.
77. Zou L, Shen Y, Li W, Haapasalo M. Penetration of sodium hypochlorite into dentin. *J Endod.* 2010; 36 (5): 793-6.

APÊNDICE

Apêndice 1- Placa de cultura celular com os blocos de dentina posicionados individualmente e deposição de 200 μ L da suspensão de *E. faecalis* para a indução dos biofilmes.



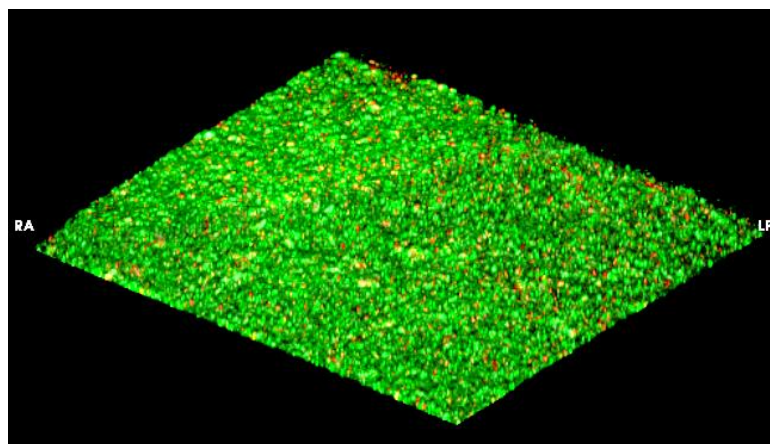
Apêndice 2- Placa de cultura celular com os blocos de dentina posicionados individualmente e deposição de 180 μ L de meio BHI após a contaminação, para a indução dos biofilmes.



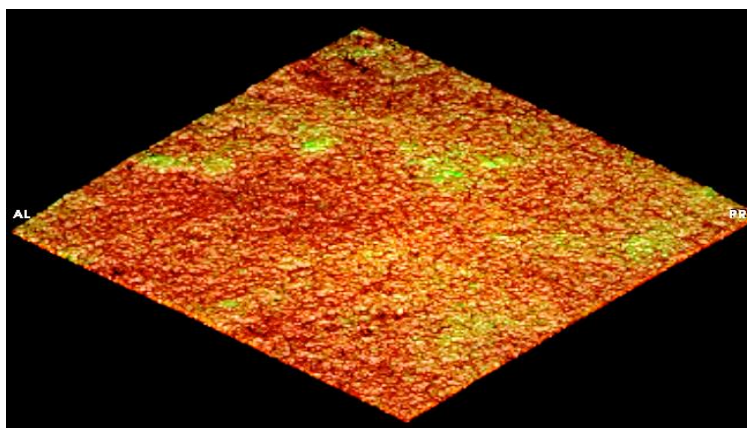
Apêndice 3- Placas de cultura com meio TSA nas quais foram semeadas as amostras após o contato direto entre as soluções irrigadoras ou associações e o biofilme de *E. faecalis*, para a contagem das UFC mL⁻¹. **I:** NaOCl a 2,5% após 3 minutos, **II:** CLX a 2%+CTR 0,2% após 3 minutos, **III:** QMiX após 3 minutos.



Apêndice 4- Reconstrução tridimensional do biofilme corado com Live/Dead® BacLight após tratamento com água destilada (controle negativo)



Apêndice 5- Reconstrução tridimensional do biofilme corado com Live/Dead® BacLight após tratamento por 1 minuto com clorexidina.



Autorizo a reprodução deste trabalho.

(Direitos de publicação reservados ao autor)

Araraquara, 11 de março de 2013.

CAMILA ALMEIDA NASCIMENTO