UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE ODONTOLOGIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA – NÍVEL MESTRADO

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO CLÍNICA ODONTOLÓGICA – ENDODONTIA

JORDANA DA SILVA KOCH

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIMICROBIANO DA ÁGUA ELETROLISADA COM ÁCIDO HIPOCLOROSO ASSOCIADA A UM PROTÓTIPO DE DESINFECÇÃO FOTOCATALÍTICA CONTRA O BIOFILME DE *ENTEROCOCCUS FAECALIS*

Porto Alegre

2022

JORDANA DA SILVA KOCH

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIMICROBIANO DA ÁGUA ELETROLISADA COM ÁCIDO HIPOCLOROSO ASSOCIADA A UM PROTÓTIPO DE DESINFECÇÃO FOTOCATALÍTICA CONTRA O BIOFILME DE *ENTEROCOCCUS FAECALIS*

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como pré-requisito final para a obtenção do título de Mestre em Clínica Odontológica – Endodontia.

Linha de Pesquisa: Biomateriais e Técnicas Terapêuticas em Odontologia

Orientador: Prof. Dr. José Antônio Poli de Figueiredo

Porto Alegre, 25 de abril de abril de 2022

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. José Antônio Poli de Figueiredo
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. Ricardo Abreu da Rosa
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dra. Mariana De Carlo Bello
Universidade Luterana do Brasil

Prof. Dr. Marcelo dos Santos
Universidade de São Paulo

CIP - Catalogação na Publicação

KOCH, Jordana da Silva Koch
AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIMICROBIANO DA ÁGUA ELETROLISADA COM ÁCIDO HIPOCLOROSO ASSOCIADA A UM PROTÓTIPO DE DESINFECÇÃO FOTOCATALÍTICA CONTRA O BIOFILME DE ENTEROCOCCUS FAECALIS / Jordana da Silva Koch KOCH. -- 2022.
52 f.
Orientador: José Antônio Poli de Figueiredo FIGUEIREDO.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Odontologia, Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Porto Alegre, BR-RS, 2022.

1. Enterococcus faecalis. 2. Ácido Hipocloroso. 3. desinfecção de canais radiculares. 4. Microscopia Eletrônica de Varredura. I. FIGUEIREDO, José Antônio Poli de Figueiredo, orient. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

AGRADECIMENTOS

Agradeço muito a Deus por me permitir viver este grande sonho que é o mestrado, e por sempre abençoar todos os meus sonhos e realizações.

Aos meus pais *João Tadeu Koch e Maria Claudete Koch*, à minha irmã e parceira de vida *Rariane Koch*. Obrigada por serem a minha base, meu apoio, incentivo e por terem me passado tantos valores como: educação, respeito, humildade e que com dedicação vencemos qualquer uma de nossas limitações. Vocês sempre fizeram os meus estudos uma prioridade na minha vida e na de vocês também.

Ao meu orientador *prof. Dr José Antônio Poli de Figueiredo* obrigada por eu ter sido uma das suas selecionadas, por ter feito o mestrado ser uma realidade em minha vida. Obrigada por toda a tua atenção, paciência e conhecimentos passados. O senhor é uma pessoa a qual eu sempre admirei muito! Jamais imaginaria que seria sua orientada enquanto era aluna do 2º semestre de odontologia, estudando pelos seus livros de histologia. Conte comigo sempre, para todos os projetos! És um exemplo para a minha carreira, de coração muito obrigada *"profe Fig"*.

À *prof. Dra. Mariana De Carlo Bello*, obrigada por tanto! Você despertou em mim essa vontade de querer ser mestre, e esse apreço e respeito enorme pela Endodontia. Obrigada por ter me mostrado esse caminho e por todos os conselhos. Eu admiro muito você, obrigada por todas as oportunidades em que pude aprender com você e os demais professores da odontologia da ULBRA-CS. Lugar onde vivi durante cinco anos da minha vida, carregarei para sempre lembranças de vocês em meu coração.

Obrigada às minhas amigas de longa data *Thaís Haeser e Meiriane Gaedke* por me ouvirem, por serem positivas e por todos os momentos. Com certeza minha vida seria incompleta sem vocês, mesmo longe se fazem presente todos os dias, eu tenho muito orgulho em ter vocês ao meu lado, amo vocês!

Aos meus amigos de faculdade, que ser tornaram para a vida, *Suélen Santos, Douglas Krug, Eduardo Kaefer, Daniela Denardi e Micheli Kremer*. Obrigada por serem como são, por todas as risadas e momentos felizes, vocês por muito tempo foram a minha família e eu sinto muitas saudades de conviver 12 horas por dia com vocês.

As amizades que fiz durante o mestrado, *Matheus Reolon, Gabriel Só* e as meninas do meu grupo de pesquisa, que se tornaram amigonas de coração, *Lívia Alvariza, Thaís Marchand, Marieli Pradebon e Kellyn Souza.* Obrigada por tudo! Acredito que sou privilegiada em poder contar com o apoio de vocês nessa fase. Além de colegas/amigos (as) incríveis vocês são profissionais brilhantes, com certeza terão uma carreira contemplada de sucessos.

Em especial gostaria de agradecer a parceira que ganhei nesses dois anos à *Kellyn Rocca Souza*, jamais imaginaria que aquela menina que encontrei no corredor da faculdade de odontologia no dia da prova de seleção para o mestrado, super "nervosa" com a ocasião, seria a minha dupla desses dois anos. Tu és uma pessoa de luz que encontrei nesse caminho, super batalhadora, faz tudo acontecer! Pode ter certeza que tu deixas um pouquinho da tua energia em cada pessoa que tu passas, independente de nossas escolhas tu estarás sempre em meu coração. Amo você!

À *Isadora Basso*, outra "coincidência" da vida, obrigada por tornar esses dois anos mais leves, por ser essa pessoa com um coração tão lindo. Obrigada por todos os conselhos e cafés de reflexões que sempre acabam com boas risadas. Obrigada por tudo Isa, amo você!

Um grande obrigada aos meus colegas de especialização *Marcella Cassal, Matheus Reolon e a Thaty* por serem tão parceiros nas idas para São Paulo, cada módulo uma história boa para contar e relembrar. Obrigada por tornar esse período mais leve, sentirei muitas saudades dos nossos "perrengues" endodônticos que já estão acabando.

Aos professores da banca *prof. Dr. Marcelo dos Santos* e *prof. Dr. Ricardo Abreu da Rosa*, me sinto lisonjeada em tê-los como contribuintes neste trabalho, com certeza terão muito à acrescentar. Aprendender endodontia com vocês é motivo de orgulho, obrigada por tudo!

Sou grata **à Escola de Ciências da Saúde da PUCRS** pela oportunidade de aprofundar meus conhecimentos através da pesquisa laboratorial e aprendizado com a *Maila, Vanessa, Ingrid e a Professora Dra. Silvia Dias de Oliveira*, e por abraçarem este projeto conosco. Serem tão pacientes e prestativas, vocês são excelentes! Aos funcionários *Leandro e Wagner* do **Laboratório Central de Microscopia e Microanálise da PUCRS (LabCEMM)** pelo preparo e aquisições das imagens em MEV.

Aos **professores da área de Endodontia do programa de pós-graduação da UFRGS** pelos ensinamentos ao longo desses dois anos. Agradecimentos aos Professores do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da UFRGS, pelos ensinamentos e oportunidades.

Ao **Programa de Pós-graduação em Odontologia** da UFRGS e a **Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)** pelo ensino gratuito e de qualidade. Grata pela oportunidade de estudo.

De modo geral, agradeço de coração a todos que, direta ou indiretamente, estiveram comigo durante esses anos e me apoiaram para que eu conseguisse percorrer esse caminho da melhor forma possível.

Seja sincero em sua busca.
Faça tudo por ela.
-Osho

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....12

1.1 Biofilmes bacterianos em Endodontia.....13

1.2 Enterococcus faecalis.....15

1.3 Hipoclorito de Sódio.....16

1.4 Água eletrolisada com ácido hipocloroso.....17

1.5 Água Eletrolisada e NaOCl.....20

1.6 Protótipo para desinfecção fotocatalítica.....21

2. OBJETIVOS.....21

2.1 *Objetivo Geral.....21*

2.2 Objetivos Específicos.....21

3. METODOLOGIA.....22

3.1 Seleção das amostras.....22

3.2 Preparo das amostras.....23

3.3 Preparo da Cultura e Inoculação.....26

3.3.1 E. faecalis.....26

3.3.2 Trocas de meio.....27

3.4 Classificação dos grupos de tratamento.....28

3.5 Água eletrolisada com ácido hipocloroso.....29

3.6 Germinator.....30

3.7 Microscopia eletrônica de varredura.....31

3.8 Análise estatística.....32

4.0 RESULTADOS.....32

5.0 DISCUSSÃO.....39

6.0 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....43

7.0 REFERÊNCIAS.....44

Anexo 1 – Lista de Projetos Aprovados pela Comissão de Pesquisa (COMPESQ) da faculdade de Odontologia da UFRGS.....52

RESUMO

O *Enterococcus faecalis* é uma bactéria facultativa que se encontra presente em canais infectados provocando infecções de difícil tratamento, apresentando capacidade de aderência e resistência aos antimicrobianos. Nesse sentido, este trabalho tem como objetivo avaliar o potencial antimicrobiano da água eletrolisada com ácido hipocloroso associada a uma fonte de luz fotocatalítica como estratégia de desinfecção de canais radiculares e sistemas de túbulos dentinários contaminados com o biofilme de *Entetococcus faecalis.* Através de um estudo experimental laboratorial realizado em 56 dentes unirradiculares bovinos, os dentes foram contaminados com a cepa *E.faecalis* por um período de 7 dias. Após este período foram divididos aleatoriamente em 7 grupos de tratamento, são eles: controle negativo; controle positivo; água eletrolisada com ácido hipocloroso; água eletrolisada com ácido hipocloroso + Germinator; Hipoclorito de Sódio; Hipoclorito de Sódio + Germinator e apenas Germinator. As amostras foram submetidas à análise pela Microscopia eletrônica de varredura (MEV) e classificados em rankings, para possibilitar a análise estatística através dos testes Kruskal Wallis e Mann Whitney adotando o nível de significância de P valor <0.001. Os resultados se mostraram satisfatórios frente ao uso do Hipoclorito de Sódio, porém esse irrigante demonstrou causar erosões na estrutura dentinária. Quando o hipoclorito de sódio foi associado ao Germinator, houve uma melhor taxa de desinfecção, mas sem diferença estatisticamente relevante. A água eletrolisada demonstrou potencial antimicrobiano, mas inferior ao do hipoclorito de sódio. Seus efeitos também foram potencializados pelo uso do Germinator. Esta avaliação nos permitiu delinear uma alternativa de estudo frente ao biofilme endodôntico, buscando entender melhor o mecanismo de ação dos irrigantes e da terapia auxiliar bem como de suas aplicações e contribuições na endodontia.

Palavras-chave: *Enterococcus faecalis*; Ácido Hipocloroso; desinfecção de canais radiculares; Microscopia Eletrônica de Varredura.

Abstract

Enterococcus faecalis is a facultative bacterium present in infected canals, causing infections that are difficult to treat and have adherence capacity and resistance to antimicrobials. In this sense, this work aims to evaluate the antimicrobial potential of water electrolyzed with hypochlorous acid associated with a photocatalytic light source as a disinfection strategy for root canals and dentinal tubule systems contaminated with E.faecalis biofilm. Fifty-six single-rooted bovine teeth were contaminated with the E.faecalis strain for seven days. After this period, they were randomly divided into seven treatment groups. They are: negative control, positive control, water electrolyzed with HOCl, water electrolyzed with HOCl + Germinator, NaOCl, NaOCl + Germinator and Germinator.They are negative control, positive control, water electrolyzed with HOCl, water electrolyzed with HOCl + Germinator, NaOCl, NaOCl + Germinator, and Germinator. They were submitted to analysis by Scanning Electron Microscopy (SEM) and classified into rankings to enable statistical analysis through the Kruskal Wallis and Mann Whitney tests, adopting the significance level of $P < 0.001$. The results were effective against the use of NaOCl, but this irrigant showed to cause erosion in the dentin structure. When associated with the Germinator, there was a better disinfection rate but without a statistically relevant difference. The electrolyzed water showed cleaning potential but was lower than that of NaOCl. The use of the Germinator also potentiated its effects. This study allowed us to outline an alternative action against endodontic biofilm, seeking to understand better the action mechanism of irrigants and auxiliary therapy and their applications and contributions to endodontics.

Keywords: *Enterococcus faecalis*; Hypochlorous Acid; disinfection root canals; Scanning Electron Microscopy.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Mecanismo de ação germicida da água eletrolisada com ácido hipocloroso.....19

Figura 2 - Corte em 16mm da porção radicular.....23

Figura 3 - Sulcos nas faces vestibular e lingual preservando as paredes do canal radicular.....23

Figura 4 -Cera obstruindo o forame dos dentes.....24

Figura 5- Confecção de orifício central e laterais nos microtubos, para possibilitar inoculação e trocas de meio de crescimento.....25

Figura 6 - Disposição das amostras em caixa de polipropileno.....25

Figura 7 - Placas de ágar sangue confirmando a cultura pura.....27

Figura 8 - Análise de Gram realizada a partir das placas de ágar sangue.....28

Figura 9 - Protótipo de protetor bucal e sua bateria.....30

Figura 10 - Protótipo de protetor bucal, com luz LED ligada, sobre as amostras.....30

Figura 11- Unidade esterelizadora.....31

Figura 12: amostras metalizadas e acopladas em stub do MEV.....32

Figura 13: ilustração do dente hemiseccionado, apontando as áreas de análise em MEV.....32

Figura 14- MEV (10.000x) do controle negativo.....36

Figura 15-MEV (10.000x) do controle positivo.....36

Figura 16- MEV (10.000x) grupo 3.....36

Figura 17- MEV (10.000x) grupo 4.....37

Figura 18- MEV (10.000x) grupo 5.....37

Figura 19- MEV (10.000x) grupo 6.....38

Figura 20- MEV (10.000x) grupo 5 (interface).....38

Figura 21- MEV (10.000x) grupo 7.....39

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

µL - microlitro

µm – Micrômetro

BHI – Brain heart infusion (ágar cérebro coração)

CEP-UFRGS - Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Rio Grande do Sul

COMPESQ - Comitê de Pesquisa do ICBS da Universidade Federal do Rio Grande do Sul

CHX- Clorexidina

DNA - ácido desoxirribonucleico

dpi - Dots per inch (Pontos por Polegada)

***E. faecalis* –** Enterococcus faecalis

EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético (Ethylenediamine tetraacetic acid)

HP- Peróxido de Hidrogenio

ICBS – Instituto de Ciências Básicas da Saúde

ICTV - Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus

HOCl- Ácido Hipocloroso

MEV- Microscopia eletrônica de varredura

mL – Mililitro (unidade de medida)

NAOCL – Hipoclorito de sódio

Nm – nanômetro

pH - potencial de hidrogênio, representação da escala na qual uma solução neutra é igual a 7

PUI – Passive Ultrassonic Irrigation (Irrigação ultrassônica passiva)

TIFF - Tagged Image File Format (Formato de Arquivo de Imagem com Tags)

VNC - Estado viável, mas não cultivável

1. INTRODUÇÃO

A importância dos microrganismos na perpetuação da periodontite apical está bem consolidada (MILLER et al, 1894; KAKEHASHI et al., 1965). Quando estes microrganismos estão organizados em biofilmes, eles apresentam vantagens que os fortalecem em relação ao hospedeiro, sendo resistentes às medidas de desinfecção (COSTERTON, 2005).

As bactérias persistentes nos sistemas de canais radiculares se configuram como uma das principais causas na falha do tratamento endodôntico (SIQUEIRA, 2001). Poucas espécies possuem essa habilidade e podem estar envolvidas no fracasso endodôntico. Devido à sua capacidade, o microrganismo mais prevalente encontrado em insucessos endodônticos é o *E. faecali*s (PINHEIRO et al., 2003) sendo capaz de formar biofilmes em diferentes substratos (GUERREIRO et al., 2013) e ter fatores de virulência associados ao patógeno (PECIULIENE et al, 2008).

O uso de soluções irrigadoras faz parte do protocolo endodôntico. Os irrigantes são usados durante toda a terapêutica para remover debris, lubrificar as paredes dentinárias, dissolver matéria orgânica e ser antimicrobiano (SIQUEIRA et al., 1999). O Hipoclorito de Sódio (NaOCl) é o irrigante endodôntico mais utilizado pelas suas propriedades, porém tem efeito citotóxico, mau cheiro, gosto desagradável e potencial de induzir reações alérgicas (TANOMARU et al., 2002; KAUFMAN & KEILA 1989).

Além disso Foi relatado na literatura que o NaOCl é capaz de alterar estruturas morfológicas da dentina (WAGNER et al., 2016) efeitos estes que podem comprometer a elasticidade da mesma (OYARZÚN et al., 2002) levando à fratura e afetando a adesão de materiais restauradores (QIAN et al., 2011; MORRIS et al., 2001; MARENDING et al., 2007).

Nesse contexto, é desejável um irrigante igualmente eficaz, mas mais seguro. A água eletrolisada com ácido hipocloroso (HOCl) vem sendo estudada e reportada com bons resultados. Além de um amplo espectro, traz consigo um conceito sustentável e pode ser aplicada em vários setores, como: hospitais, agricultura, higienização de alimentos, escritórios e locais de entretenimento, como desinfetante de superfícies (RAHMAN et al., 2016). Porém a sua fórmula neutra ainda não foi relatada na literatura frente ao biofilme de *E. faecalis* e nem os seus efeitos nos componentes orgânicos e inorgânicos da dentina.

Como terapia coadjuvante, foi criado um dispositivo protótipo ("Germinator"™ by Designs For Vision, Bohemia, NY, USA) que permite a fotocatálise por meio de 4 LEDs usando um comprimento de onda de 405nm. O Germinator apresentou resultados satisfatórios quando aplicado para desinfecção da cavidade oral. Uma ação antimicrobiana foi observada quando aplicado de forma singular e com aditivos (Clorexidina e Peróxido de Hidrogênio) potencializando o efeito das soluções (SOUZA et al., 2021). Porém, não se sabe o seu efeito quando aplicado em canais

radiculares, mais especificamente no biofilme de *E. faecalis*, sendo esse um estudo pioneiro nessa associação.

Toda falta de consenso e lacunas deixadas na literatura dos efeitos do uso do NaOCl podendo ser associado com uma terapia coadjuvante, levaram a nossa busca com o objetivo de avaliar o potencial antimicrobiano da água eletrolisada neutra com HOCl associada a uma fonte de luz fotocatalítica contra o biofilme de *E.faecalis.*

1.1 Biofilmes bacterianos em Endodontia

A descoberta da relação entre bactérias e periodontite apical foi considerada um marco. Miller e colaboradores (1894) foram pioneiros nessa associação, afirmando que microrganismos são agentes importantes no desenvolvimento da doença na polpa dentária. Kakehaski e colaboradores (1965) demonstraram que a necrose pulpar e a perda óssea periapical são desenvolvidas na presença de microrganismos. Göran (1976) confirmou que a presença de destruição óssea periapical está intimamente relacionada com a presença de bactérias no canal radicular e sugere que a resposta aguda ou crônica é gerada por certas espécies bacterianas.

Os microrganismos são membros de uma comunidade, referida como biofilme. Essa agregação traz às bactérias uma série de habilidades e vantagens, como um amplo crescimento e maior patogenicidade (COSTERTON, 2005). Os principais componentes envolvidos na formação do biofilme são: células bacterianas, superfície sólida e um meio fluido. Assim, as bactérias são capazes de se unir em comunidades em qualquer superfície que contenha fluido rico em nutrientes, condições estas que tornam o modo de crescimento do biofilme vantajoso para os microrganismos (USHA et al., 2010; COSTERTON et al., 1987).

A estrutura do biofilme é modificada à medida em que ele amadurece, sendo que condições ambientais têm forte influência nessa transição (DONLAN e COSTERTON, 2002). É descrito como totalmente desenvolvido quando se apresenta como um arranjo heterogêneo de células microbianas, composto por uma matriz de proteínas, polissacarídeos, ácidos nucléicos e sal (WINGENDER, NEU e FLEMMING, 1999). Circundado por componentes orgânicos, como: carboidratos, proteínas e lipídios e inorgânicos: cálcio, fósforo, magnésio e fluoreto (TRONSTAD e SUNDE, 2003).

Quando maduro, as bactérias do mesmo têm capacidade de sobreviver em um ambiente crítico. Isso porque elas possuem uma cooperação metabólica entre si. As espécies bacterianas são capazes de se comunicar, trocar material genético e adquirir novas características (LEWIS, 2001). Dessa forma, a comunidade não fornece somente proteção às bactérias contra as defesas do hospedeiro, mas também as torna mais resistentes a uma variedade de protocolos de desinfecção.

É importante compreender como o biofilme formado no canal radicular se comporta e quais

os mecanismos adotados para resistir aos protocolos de desinfecção. Parsek e Singh (2003) estabeleceram critérios importantes para definir o comportamento do biofilme frente às infecções, sendo: **(1)** As bactérias são aderentes a algum substrato ou estão aderidas a alguma superfície; **(2)** Bactérias vivendo em aglomerados de células, micro colônias, envoltas por matriz extracelular; **(3)** A infecção é confinada a um local específico, a disseminação pode ocorrer, mas é um evento secundário; **(4)** A infecção é difícil ou impossível de erradicar com antibióticos. Mais tarde, Ricucci e colaboradores (2005) definiram que a eliminação ou desorganização significativa da estrutura e ecologia do biofilme levam à remissão do processo da doença.

Em Endodontia nenhum padrão único de estrutura morfológica de biofilme foi encontrado (NAIR et al., 2006). Entretanto, o canal radicular é um território crítico para a terapêutica (RÔÇAS, SIQUEIRA, 2005). A organização bacteriana é estratégica, o biofilme da porção apical de dentes com periodontite apical é significante na patogênese da doença (RICUCCI et al., 2006).

As infecções endodônticas têm sua classificação conforme a sua localização anatômica: intra-radicular ou extraradicular. E também quanto ao momento de colonização do canal radicular: primária, secundária ou persistente (SIQUEIRA, 2002). A composição da microbiota varia dependendo do tipo de infecção e das diferentes formas de periodontite apical (SIQUEIRA, RÔÇAS, 2019).

A periodontite apical primária é causada por bactérias que colonizaram a polpa necrótica, o número e complexidade das espécies está relacionado com as complicações do caso (MUNSON, 2002). Por exemplo, dentes com lesões extensas ou que apresentam fístula, têm mostrado uma microbiota mais complexa e de difícil erradicação (RÔÇAS e SIQUEIRA, 2008). Predominantemente a colonização primária conta com espécies anaeróbias, particularmente as espécies Gram-negativas pertencentes aos gêneros *Fusobacterium* , *Treponema* , *Tannerella*, *Dialister*, *Porphyromonas* , *Prevotella* e *Campylobacter*. Gram-positivas dos gêneros *Parvimonas*, *Filifator*, *Actinomyces*, *Olsenella* e *Pseudoramibacter* (SIQUEIRA e RÔÇAS, 2019).

As infecções secundárias são causadas por microrganismos que foram introduzidos no sistema de canais radiculares, durante ou após a intervenção endodôntica. Esses conseguiram sobreviver e estabeleceram uma infecção secundária. A espécie dominante da infecção secundária está relacionada com a fonte da contaminação, a espécie mais frequentemente encontrada é o *E. faecalis* (HAAPASALO, RANTA e RANTA, 1983; RANTA, 1988).

As infecções persistentes são causadas por bactérias que de alguma forma resistiram aos procedimentos do tratamento endodôntico. Clinicamente não é possível diferenciar uma infecção secundária de uma infecção persistente. Bactérias Gram-positivas são mais prevalentes, fungos também são encontrados com maior significância quando comparados às infecções primárias (MOLANDER, 1998; SIQUEIRA, 2004).

O estudo do biofilme endodôntico é fundamental para entendermos o potencial patogênico da microbiota que coloniza o canal radicular, para assim discutirmos novas abordagens de desinfecção, que tenha aplicabilidade em infecções primárias, secundárias e persistentes.

1.2 Enterococcus faecalis

A principal causa de insucesso endodôntico é a persistência de microrganismos que causam uma infecção intrarradicular ou extratradicular e que se tornam resistentes às medidas de desinfecção (preparo químico mecânico e medicação intracanal). Para sobreviver em canais obturados, é necessário que se adaptem a um ambiente com pouca disponibilidade de nutrientes (SIQUEIRA, 2001).

A capacidade de sobreviver em condições desfavoráveis é muito importante para as bactérias. Muitas vezes passam por períodos de escassez de nutrientes. Poucas espécies possuem essa capacidade, e isso ocorrerá se suas toxinas e endotoxinas forem patogênicas e atingirem um número suficiente para induzir ou perpetuar lesões periapicais (SIQUEIRA, 2001).

Estatisticamente o microrganismo mais prevalente encontrado em insucessos endodônticos é o *E. faecali*s (PINHEIRO et al., 2003). Independentemente da qualidade de obturação o *E. faecalis* está predominantemente associado às falhas no tratamento, sendo a espécie dominante (SIQUEIRA e ROÇAS, 2004). Além disso, também é encontrado ocasionalmente nos casos de infecções endodônticas primárias (SUNDQVIST et al., 1989; BAUMGARTNER, FALKLER,1991).

O *E. faecalis* é um coco facultativo Gram-positivo, anaeróbio, classificado como patógeno oportunista, que demonstra diferentes mecanismos que lhe permitem sobreviver em um ambiente exigente. É capaz de crescer em pH alcalino de 11,5 tornando-o resistente ao hidróxido de cálcio (SIQUEIRA, UZEDA, 1996).

Sobrevive a temperaturas entre 10°C e 60ºC para suprir a ação dos linfócitos e ainda demonstrou ter capacidade de invadir túbulos dentinários até 100μm do lúmen do canal, o que pode permitir que ele resista ao preparo químico mecânico (SIQUEIRA et al., 1997; JHAJHARIA et al., 2015). Para sobreviver sem nutrientes o *E faecalis* utiliza fluidos do ligamento periodontal. O colágeno também parece ter um papel importante na nutrição desse microrganismo (NARAYANAN, VAISHNAVI, 2010; LOVE, 2001).

Possui a capacidade de formar biofilmes em diferentes substratos, produz uma interação com o substrato e induz a dissolução mineral da dentina o que o torna mais resistentes aos protocolos de desinfecção (GUERREIRO et al., 2013; KISHEN ET al., 2006). Os fatores de virulência associados ao patógeno também desempenham uma atividade importante: fatores secretados, adesinas, estruturas superficiais como polissacarídeo capsular e a resistência a antibióticos (PECIULIENE et

al, 2008).

O ácido lipoteicóico (LTA) envolvido na adesão às superfícies do hospedeiro estimula a produção de citocinas pelos monócitos, possui enzimas líticas, como gelatinase e hialuronidase que podem estar envolvidas no dano ao tecido (JETT et al., 1994). A endotoxina LTA é liberada durante a duplicação ou morte da bactéria (ENDO et al., 2012). Cavalli et al. (2017) afirmam que o irrigante mais comumente utilizado em endodontia - o hipoclorito de sódio (NaOCl) - é capaz de remover endotoxinas, mas não completamente.

Quando está em condições ambientais desfavoráveis o *E. faecalis* pode adquirir um estado viável, mas não cultivável (VNC). Um mecanismo de sobrevivência, onde o patógeno mantém a sua viabilidade e patogenicidade, mas perde a sua capacidade de crescer, podendo adotar esse mecanismo por até 12 meses. Quando as condições ambientais são restauradas, voltam a crescer recuperando-se de um longo período de inativação (SEDGLEY et al., 2005).

A resistência do *E. faecalis* à ação do hidróxido de cálcio, acontece devido a sua capacidade de sobrevivência a altos valores de pH. Possui uma bomba de prótons que é capaz de lançá-los nas células para acidificar o citoplasma, permitindo a adaptação do microrganismo ao ambiente (SUNDQVIST et al., 1998**;** EVANS et al., 2002).

1.3 Hipoclorito de Sódio (NaOCl)

O NaOCl possui ação antimicrobiana e tem a capacidade de dissolução tecidual (SEDGLEY, 2004; LUEBKE, 1967; TAYLOR, AUSTIN 1918). O irrigante é capaz de se ligar às paredes celulares bacterianas e alterar o equilíbrio osmótico das mesmas (GREENSTEIN et al., 1986). A sua atividade antimicrobiana é proporcional à sua concentração (VIANNA et al., 2004).

Na literatura ainda não há um consenso quanto à concentração ideal a ser utilizada, sendo que a concentração ideal é aquela que possui baixa toxicidade e efeitos antibacterianos adequados, capaz de destruir microrganismos e neutralizar seus produtos sem danificar os tecidos do hospedeiro.

Byström & Sundqvist (1985) em estudo clínico não encontraram diferença significativa no efeito antibacteriano entre 0,5% e 5% de NaOCl. Em contrapartida outros estudos relatam que a eficácia antibacteriana está associada com a concentração do NaOCl, e que quando diluído compromete significativamente o efeito bactericida da solução (SIQUEIRA et al., 1998; RUTALA, WEBER 1997; YESILSOY et al., 1995).

Siqueira e colaboradores (2000) sugerem que a irrigação abundante e com renovação frequente é mais importante do que a concentração do irrigante. Uma concentração de 1% de NaOCl pode eliminar um número significativo de células bacterianas. No entanto, pode não

dissolver totalmente toda matéria orgânica e, o material orgânico em contato com soluções de NaOCl consome o cloro disponível e reduz a atividade antibacteriana.

Para compensar esse efeito, Haapasalo et al. (2010) afirmaram que é necessário aumentar a concentração e o tempo de exposição do NaOCl no interior do canal. O que vai ao encontro de Retamozo et al. (2010), que preconiza alta concentração (NaOCl 5,25%) e exposição de 40 minutos do NaOCl na dentina contaminada, para a completa eliminação do *E. faecalis*.

A atividade antimicrobiana também pode ser otimizada através da modificação do pH da solução: uma redução do pH em torno de 6,0 a 7,5 tem uma melhora na sua eficácia, porém dificulta a ação de dissolução tecidual (ROSSI-FEDELE et al., 2011). A capacidade de dissolver tecidos orgânicos contendo ácidos graxos e lipídios ocorre devido a uma reação de saponificação (ESTRELA et al., 2002).

O tempo, concentração e sequência de uso têm influência na estrutura mineral da dentina (MAI et al., 2010). O NaOCl é capaz de alterar a estrutura morfológica do colágeno da dentina e provocar uma erosão significativa na dentina peritubular (WAGNER et al., 2016). Esses efeitos aplicados à dentina orgânica e inorgânica podem levar a alterações na elasticidade da dentina (OYARZÚN et al., 2002) e na tenacidade, o que pode levar à fratura radicular, e prejudicar a resistência de união de cimentos e materiais restauradores (qian et al., 2011; morris et al., 2001; marending et al., 2007).

1.4 Água Eletrolisada com Ácido Hipocloroso

A água eletrolisada é conhecida como um novo desinfetante de amplo espectro, é um conceito sustentável e tem demonstrado desinfecção eficaz. Pode ser aplicada em vários setores, como: hospitais, na agricultura, higienização de alimentos, e em escritórios e locais de entretenimento como desinfetante de superfícies (RAHMAN et al., 2016). O tipo de superfície parece estar relacionado com a sua eficácia, e tem demonstrado limitações na presença de matéria orgânica (OOMORI et al., 2000).

A água eletrolisada exibe atividade antimicrobiana contra uma variedade de microrganismos e elimina os tipos mais comuns de vírus, bactérias, fungos e esporos em uma quantidade relativamente curta de tempo (entre 5 e 20 segundos) (DING et al., 2015). Muitos sistemas para produção de água eletrolisada estão disponíveis no mercado mundial, sendo que existem mais de 20 empresas fabricando-os (RAHMAN et al., 2016).

A água eletrolisada é produzida por um equipamento de eletrólise que contenha uma solução diluída de Cloreto de Sódio (NaCl). No início do processo de eletrólise o NaCl se dissolve em água e dissocia-se em íons carregados positivamente e negativamente. Enquanto isso o Hidróxido e

Hidrogênio também são formados na solução. Os íons carregados negativamente se movem em direção ao ânodo onde são liberados elétrons, ácido hipocloroso, ácido clorídrico, gás oxigênio e cloro. E os íons carregados positivamente se movem em direção ao cátodo, onde ganham elétrons, resultando na formação de Hidróxido de Sódio e gás Hidrogênio (RAHMAN et al., 2016).

Dois tipos de água eletrolisada são gerados simultaneamente no ânodo, uma solução ácida com um pH de 2 a 3 com óxido redução (ORP) >1100 mV e com concentração de cloro disponível de 10 a 90 ppm, essa solução é referida como água eletrolisada ácida. No cátodo é gerada uma solução básica com um pH de 10 a 13 e ORP de -800 a -900 mV é produzido, esta solução é denominada como água eletrolisada básica (RAHMAN et al., 2016).

É possível encontrá-las nas seguintes apresentações: água eletrolisada alcalina, água eletrolisada ácida e água eletrolisada neutra. Todas elas têm excelente atividade bactericida. Elementos desfavoráveis para a água ácida são a corrosividade em metais e menor durabilidade da atividade bactericida, características essas que foram acentuadamente melhoradas com o aumento do valor de pH (NAGAMATSU et al., 2002). Essas várias formulações mostram valores individuais de pH e ORP, a concentração do produto e a quantidade cloro ativo também são afetadas (MOLINARI, COTTONE et al., 1994). Para a aplicabilidade odontológica, autores recomendam a água neutra, considerando-a como a mais segura (NAGAMATSU et al., 2008).

Relatos sobre o mecanismo da ação germicida da água eletrolisada são escassos. É bem conhecido que as espécies de cloro ativo (Cl_2, HOCl e $^{-}$OCl) contribuem para a inativação de células microbianas. Além do cloro ativo, outros oxidantes como as espécies reativas de oxigênio (ozônio e peróxido de hidrogênio) são gerados durante a eletrólise, o que também contribui para a ação antimicrobiana. A ação germicida do HOCl foi atribuída à sua penetração nas células microbianas através das paredes celulares e membranas (figura 1) (JEONG et al., 2007).

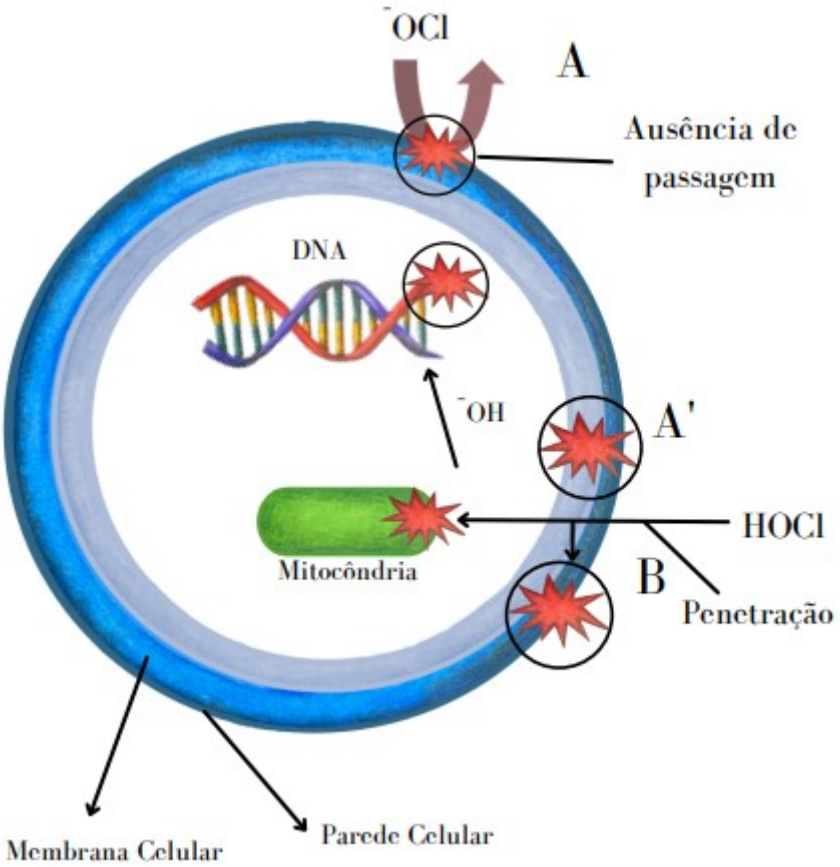


Figura 1: modelo desenvolvido por Fukuzaki (2006) e reproduzido por Marchand T. (2022). Representando a atividade germicida da água eletrolisada com HOCl. O íon Hipoclorito (-OCl) isolado, não consegue penetrar no interior do microrganismo devido à presença da bicamada lipídica e acaba atacando somente a membrana externa na bactéria (A). O Íon HOCl penetra na membrana bacteriana (círculo A'), se difunde através da membrana celular (figura B) e causa dano irreversível ao DNA.

Na odontologia a água eletrolisada tem sido utilizada nos reservatórios de água das cadeiras odontológicas, que fornecem água para irrigar as superfícies dos dentes durante procedimentos odontológicos, seringas tríplice, resfriamento para os equipamentos odontológicos como peças de mão e ultrassom e para as saídas de água da cuspideira. Boyle e colaboradores (2010) afirmam que essa é a uma solução plausível no controle do biofilme das saídas de água, com qualidade superior à água potável. Ainda de acordo com os mesmos autores, a água eletrolisada não demonstrou nenhum efeito adverso na viabilidade celular de queratinócitos orais.

Nagamatsu e colaboradores (2016) investigaram o efeito bactericida da água eletrolisada neutra para impressão de alginato em comparação as outras águas eletrolisadas. Um minuto de imersão de água eletrolisada neutra foi suficiente para desinfetar a impressão de alginato, sem diferenças significativas de águas eletrolisadas ácidas. Quando foi usada como água de adição ao pó de alginato nenhum efeito bactericida foi encontrado.

Castillo et al. (2015) estudaram os efeitos da CHX e da água eletrolisada com HOCl sobre a viabilidade bacteriana de *S. mutans*, *A. israelii* , *P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans* , *E.*

corrodens , *C. rectus* , *K. oxytoca* , *K. pneumoniae* e *E. cloacae*. A CHX mostrou uma maior eficácia do que água eletrolisada com ácido hipocloroso contra *S. mutans, A. israelii , E. corrodens e E. cloacae.* Enquanto que a água eletrolisada com HOCl foi mais eficaz do que CHX contra *P. gingivalis, A. actinomycetemcomitans* , *C. rectus* e *K. oxytoca*. CHX e HOCl tiveram eficácia semelhante contra *K. pneumoniae*, proteínas de *P. gingivalis* e *S. mutans*. HOCl reduziu a viabilidade bacteriana especialmente em bactérias periodontopáticas, o que pode sugerir o seu uso no controle do biofilme subgengival em pacientes periodontais.

1.5 Água Eletrolisada e NaOCl

O efeito da água eletrolisada ácida no biofilme de *E.faecalis* cultivado na dentina humana foi testado e demonstrou ser promissor-em 5 minutos. Notou-se uma redução considerável das células de *E.faecalis.* Após 10 e 15 minutos as bactérias foram completamente eliminadas. O número de células bacterianas diminuiu com o aumento do tempo de contato. Em comparação ao NaOCl 5,25%, mostrou a mesma eficácia antimicrobiana em diferentes tempos de tratamento sendo potencializada quando usados insertos ultrassônicos (CHEN et al., 2013).

Biofilmes estáticos e de fluxo de *E. faecalis* também foram avaliados frente ao efeito bactericida da água eletrolisada ácida. Em comparação ao NaOCl, os dois irrigantes demonstraram redução bacteriana, e entre eles nenhuma diferença estatística foi encontrada (CHENG et al., 2016). Gomi et al. (2010) afirmam que em comparação ao NaOCl, a água eletrolisada ácida tem um odor mais agradável e é muito mais suave a citotoxicidade às células pulpares.

A água eletrolisada ácida pode ser gerada com pH estável e concentração de cloro ativo, mas possui sua estabilidade limitada e deve ser utilizada imediatamente após a preparação (KIURA et al., 2002). Chen et al. (2016) também afirmam que quando em contato com o ar uma diminuição na eficácia antibacteriana foi percebida.

Nesse mesmo estudo, os autores citados acima observaram que a água eletrolisada neutra alcançou maior eficácia antibacteriana à medida que o tempo de tratamento foi aumentado na superfície do titânio de pacientes acometidos por periimplantite. Na comparação com o NaOCl e CHX a água eletrolisada demonstrou significativamente maior redução de LPS bacteriano de *P. gingivalis.* Os autores recomendam fortemente o uso de água eletrolisada para a limpeza de superfícies de implantes contaminados por biofilme (CHEN et al., 2016).

Hsieh et al. (2020) com o propósito de investigar as propriedades antibacterianas e citotóxicas da água eletrolisada com HOCl em relação ao NaOCl, verificaram que uma concentração baixa de ÁGUA ELETROLIADA COM HOCl (0,0125% e 0,0250%) é igualmente eficaz como 1,5% e 5,25% NaOCl contra biofilmes de *S. mutans e E. faecalis.* Para testar a biocompatibilidade das soluções foram utilizadas amostras de embriões de peixe-zebra, que ao entrar em contato com NaOCl

1,5% foram totalmente dissolvidos. HOCl (0,0125% e 0,0250%) mostrou uma taxa de sobrevivência semelhante ao meio, demonstrando pouca toxicidade in vivo. Nesse contexto, os autores qualificam como uma potencial solução alternativa de irrigação de polpa vital.

1.6 Protótipo para desinfecção fotocatalítica

Como estratégia auxiliar de desinfecção com o propósito de melhorar o potencial de descontaminação bacteriana, foi criado um protótipo de luz fotocatalítica ("Germinator"™ por Designs For Vision, Bohemia, NY, EUA) que permite fotocatálise através de 4 LEDs usando comprimento de onda de 405 nm (SOUZA et al., 2021).

Souza e colaboradores (2021) tinham o objetivo de avaliar a eficácia de Germinator nas descontaminações da cavidade oral. Na tentativa de reduzir infecções cruzadas de pacientes e profissionais expostos aos riscos da prática clínica odontológica (GRALTON et al., 2011). Nesse cenário o Germinator foi testado como estratégia de desinfecção associado a agentes antimicrobianos como peróxido de hidrogênio (HP) e CHX 0,12% e também de forma singular (SOUZA et al., 2021).

A luz azul de alta energia (no espectro de 405 nm) foi capaz de melhorar com sucesso a descontaminação oral isoladamente ou em conjunto com aditivos. O Germinator™ elevou a capacidade de desinfecção do HP em concentrações de 3% e 1,5%, e mais do que duplicou a eficácia bactericida da CHX (SOUZA et al., 2021).

2. Objetivos

2.1 Objetivo geral

Avaliar o potencial antimicrobiano da água eletrolisada com HOCl associada a uma fonte de luz fotocatalítica como estratégia de desinfecção de canais radiculares e sistemas de túbulos dentinários contaminados com o biofilme de *E.faecalis.*

2.2 Objetivos Específicos

Avaliar por terços as hemisecções através da visualização do biofilme por meio da MEV.

Avaliar o potencial bactericida de um protótipo de luz fotocatalítica quando aplicado em conjunto com irrigantes e de forma isolada.

3. Metodologia

Dissertação de Mestrado desenvolvida para o uso da água eletrolisada com HOCl como estratatégia antimicrobiana contra o biofilme de *Enterococcus faecalis*, foi encaminhada à

Comissão de Pesquisa do Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS/COMPESQ) sob número 34070 (Anexo 1) .

As amostras e o preparo dos canais radiculares foram realizados no Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. (UFRGS). A cultura bacteriana, sua inoculação e seu crecimento, foram realizadas no Laboratório de Imunologia e Microbiologia da Escola de Ciências da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUC-RS).

A microscopia eletrônica de varredura foi realizada no Centro de Microscopia e Microanálises da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUC-RS).

3.1 Seleção das amostras

Cinquenta e seis (56) dentes permanentes bovinos, de canal único foram coletados para este estudo. Foram utilizados devido à semelhança na morfologia e na histologia dos dentes humanos com dentes de outros mamíferos, a disponibilidade dos mesmos faz dos dentes bovinos uma preferência para as pesquisas odontológicas (CAMPOS et al, 2008). Os mesmos foram selecionados e armazenados em água destilada até serem usados.

Os critérios para que os dentes selecionados fossem incluídos no estudo foram: canais predominantemente retos, os quais possuiam diâmetros similares e que apresentavam ápices desenvolvidos por completo; como critérios de exclusão foram considerados dentes com presença de reabsorções dentárias visíveis, fraturas de um modo geral, dilacerações e ápices não desenvolvidos completamente.

O cálculo final da amostra corresponde a 8 amostras por grupo, perfazendo um total de N=56. A estimativa do tamanho da amostra foi obtida através de estudo prévio realizado, em que um tamanho de efeito padronizado de 0,4 que foi detectado por uma ANOVA de medidas repetidas a 80% do poder e com uma probabilidade bicaudal de tipo alfa erro de 0,05 (HARTMANN et al., 2019).

3.2 Preparo das amostras

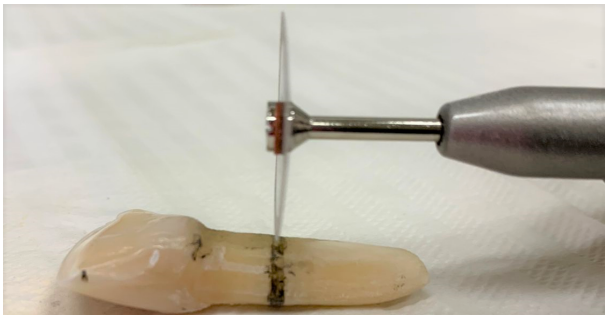
Com as amostras selecionadas, a limpeza externa dos dentes foi realizada por meio de raspagem radicular, com cureta periodontal tipo *Gracey* nº 1/2, 3/4 e 5/6 (*Neumar Instrumentos Cirúrgicos Ltda.* - Brasil), promovendo a remoção do ligamento periodontal remanescente que se encontrava aderido às raízes dos dentes. Após a raspagem radicular, as amostras foram lavadas em água corrente, pelo tempo de 1 minuto. A secagem dos dentes foi realizada em temperatura ambiente.

Os dentes tiveram suas coroas removidas, abaixo da junção amelocementária, perpendicular ao longo eixo do dente com o auxílio de um disco diamantado (*KG Sorensen* Indústria e Comércio Ltda., Barueri, São Paulo, Brasil) em peça reta de mão (*Kavo Kerr*) de modo que todas as raízes mantivessem o mesmo comprimento de 16 mm (figura 2).

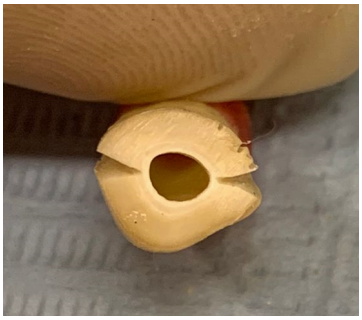
Também com o auxílio de peça reta de mão, foram realizados sulcos no sentido longitudinal das faces vestibular e lingual das amostras, sem que as paredes do canal radicular fossem atingidas, mas com profundidade suficiente para que no fim do experimento pudessem ser clivados com maior facilidade em duas hemisecções (figura 3). Para a confecção dos sulcos, os mesmos discos diamantados dupla face foram usados (*KG Sorensen* Indústria e Comércio Ltda., Barueri, São Paulo, Brasil). Tal procedimento foi feito para que posteriormente pudessem ser analisados através da microscopia eletrônica de varredura (MEV).

Para a exploração dos canais radiculares, limas manuais do tipo K (Dentsply Sirona Maillefer, Catanduva, São Paulo - SP) de 21mm, de tamanho #10, calibradas em 16mm foram utilizadas. Com auxílio de solução de hipoclorito de sódio a 2,5% (*Iodontec* Indústria e Comércio de Produtos Odontológicos Ltda., Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil). Após, foi realizada a secagem do canal das amostras com pontas de papel absorvente esterilizadas previamente, compatíveis com o calibre do canal (Tanari Indústria Ltda., Manaus, Amazonas, Brasil).

Finalizada a exploração dos canais radiculares, uma camada de cera utilidade New Max U (Technew Comércio e Indústria Ltda, Quintino Bocaiuva, RJ, Brasil) foi acoplada ao forame radicular objetivando vedamento apical (figura 4). Dessa forma, foi possível realizar a irrigação dos dentes. As amostras foram ajustadas em uma morsa torno de bancada; as faces sulcadas ficaram presas perpendicularmente aos dentes da morsa. Abaixo desse sistema foi instalado um recipiente para coleta dos resíduos.



Fonte: acervo do autor
Figura 2: corte em 16mm da porção radicular



Fonte: acervo do autor
Figura 3: sulcos nas faces vestibular e lingual preservando paredes do canal radicular.

Fonte: acervo do autor
Figura 4: cera obstruindo o forame dos dentes.

Os dentes receberam protocolo de irrigação adaptado para a desinfecção dos canais radiculares: protocolo de Grundling et al. (2011). Insertos ultrassônicos Helse E1 Irrisonic (Helse, Santa Rosa de Viterbo, SP, Brasil) foram utilizados para a limpeza das amostras. O inserto foi posicionado a 3mm do comprimento de trabalho que era de 16mm e acionados com potência correspondente a 1/3 (um terço) do equipamento (Jet Sonic, Gnatus, Barretos, São Paulo, Brasil). O protocolo utilizado para a limpeza das amostras foi composto por uma irrigação inicial com água destilada (Asfer, São Caetano do Sul, São Paulo, Brasil) e ativação por um tempo de três segundos, após, a irrigação foi realizada com hipoclorito de sódio 2,5% (Soda Clorada Asfer 2,5%, Dental Marc, Caxias do Sul, Rio Grande do Sul, Brasil) e novamente ativado por três segundos, seguiu-se com a irrigação utilizando EDTA trissódico a 17% (Iodontec Indústria e Comércio de Produtos Odontológicos Ltda, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil) e ativação por três segundos. Repetiu-se por três vezes o protocolo de irrigação. Para a lavagem final, foi utilizada água destilada. A secagem dos dentes foi realizada em temperatura ambiente.

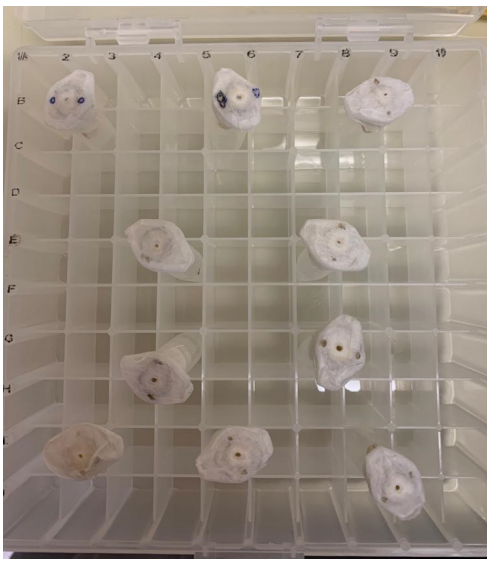
Em seguida, os dentes descoronados foram secos em temperatura ambiente e após posicionados em microtubos de polipropileno de 1,5 ml (Kasvi, São José dos Pinhais, PR, Brasil) com a porção cervical para cima, para minimizar os riscos de contaminações e realizar as trocas de meio. Um orifício foi realizado na região central das tampas dos microtubos com auxílio de instrumentos aquecidos em chama, na qual os dentes foram posicionados e fixados.

Nas laterais do microtubo próximas ao orifício principal (central), um pequeno orifício foi realizado para as trocas do meio de cultura, este foi realizado com agulha descartável para irrigação (Injex 21G, Ourinhos, São Paulo, SP). No conjunto microtubos e dentes, uma pequena quantidade

de Fita Micropore (Nexcare de 25MM X 1,35M, Sumaré, SP, Brasil) envolvendo as tampas e os microtubos, foi colocada com objetivo de diminuir uma possível contaminação (figura 5).

Fonte: acervo do autor
Figura 5: confecção de orifício central e laterais nos microtubos, para possibilitar inoculação e trocas de meio de crescimento.

Os microtubos com os dentes foram acomodados em caixas de polipropileno (Heathrow Scientific, Vernon hills, IL, EUA) embaladas individualmente em embalagens para autoclave (Hospflex, Sorocaba, São Paulo, Brasil), e posteriormente esterilizados em autoclave Vertical (Laboratório de Imunologia e Microbiologia da Escola de Ciências da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul). O tempo de esterilização das amostras ocorreu em um ciclo de 15 minutos à temperatura de 120ºC (figura 6).



Fonte: acervo do autor
Figura 6 : disposição das amostras em caixa de polipropileno

Antes da inoculação das amostras, as mesmas passaram por um teste de esterilidade utilizando cones de papel (Pontas de papel absorventes 15-40 e 45-80, Diadent/TDK, Dental Web, Porto Alegre- RS) estéreis. Estas pontas foram introduzidas no interior do canal radicular. Em seguida estes cones foram transferidos para um tubo de 3ml de BHI, incubados a uma temperatura de 37ºC por um período de 24 horas. Isto foi realizado em todos os dentes das amostras. Não havendo crescimento bacteriano no caldo, as amostras seguiram para a próxima etapa do experimento, que foi a inoculação com *Enterococcus faecalis*. Caso algum crescimento bacteriano fosse notado o procedimento seria repetido.

3. 3 Preparo da Cultura e Inoculação

3.3.1 Enterococcus faecalis

O biofilme de *E. faecalis* foi cultivado no Laboratório de Imunologia e Microbiologia da Escola de Ciências da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUC - RS) em meio BHI contendo 1% de tripticase (BBL, Cockeysville, MD), 1% de proteose peptone (Difco, Detroit, MI), 0,5% de extrato de levedura (Difco, Detroit, MI), 0,5% de cloreto de sódio, 5mg/mg de hemina e 0,5% mg/ml de vitamina K suplementado com 0.2% de glicose, a 37°C (Takahashi et al., 1997) durante 24 horas (PUC-RS).

A cepa bacteriana selecionada para a realização deste trabalho foi a ATCC 29212. O preparo do inóculo foi realizado a partir de estoque -20, cultivado em uma alíquota de 200ul em 3ml de caldo BHI, incubados por um período de 24 horas. Em seguida uma alíquota de 200ul foi retirada e recultivada em novo caldo de BHI de 3ml e incubados novamente por 24 horas.

A partir do preparo do inóculo, a contagem inicial do mesmo foi realizada através de diluição feita até a -9. Na caixa de diluição, foi adicionada 450ul de solução salina em 9 poços, cada um correspondente a cada diluição. No primeiro poço foi acrescentado 50ul do inóculo inicial. Em seguida, foi realizada diluição seriada, em que 50ul do primeiro poço era passado para o segundo poço, e assim sucessivamente, homogeneizando o caldo. Após a diluição seriada, 10ul de cada diluição eram inoculados através da técnica de gota, em triplicata em placas de ágar sangue e mantidas à 37ºC durante 24 horas, após foi realizado o teste de coloração de Gram para verificar se havia contaminação.

A cultura de *E. faecalis* foi adicionada de forma igualitária a cada amostra, com auxílio de uma seringa ultra fina (BD, Curitiba, Brasil) através do orifício na tampa dos microtubos para que ocorresse o desenvolvimento de biofilme. As estirpes de *E. faecalis* foram cultivadas em caldo de infusão de cérebro coração (BHI), seguida de realização de Gram para verificar se houve algum tipo de contaminação, e após confirmação foi mantida em estufa a 37º C até a nova troca de meio BHI.

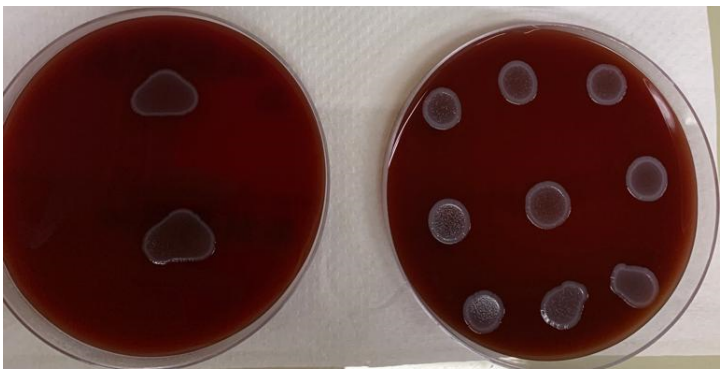
3.3.2 Trocas de meio

A renovação do meio de cultivo era realizada a cada 48h através do orifício lateral no dente em capela de fluxo laminar, para que tivéssemos áreas de trabalho estéreis para a manipulação de materiais biológicos, evitando que as amostras sofressem contaminação do meio ambiente, garantindo a segurança no momento da manipulação das mesmas. O meio cultivado era removido com auxílio de uma seringa descartável e agulha descartável, para que em seguida novo meio fosse inserido.

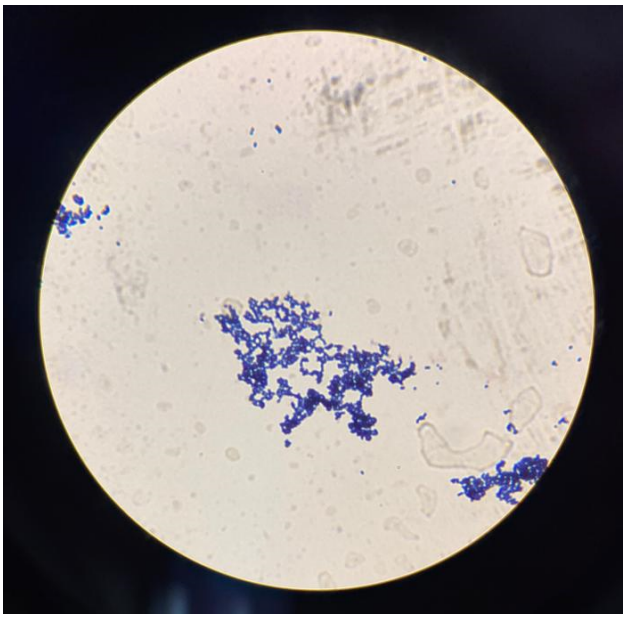
A troca do meio de cultivo era realizada com auxílio de agulhas (Injex 21G, Ourinhos, São Paulo, SP - Dental Web, Porto Alegre, Rio Grande do Sul) e seringas descartáveis luer lock (Injex, 5ml, Ourinhos, São Paulo, SP - Dental Web, Porto Alegre, Rio Grande do Sul). Onde 2/3 da quantidade de caldo BHI era removido através do orifício lateral nas tampas dos microtubos e descartado posteriormente, para que posteriormente um novo meio de cultivo fosse inserido. As amostras em seguida eram novamente embaladas em plástico filme e levadas a estufa a uma temperatura de 37ºC por 48 horas, até nova troca por um período de 7 dias, para que ocorresse o desenvolvimento de biofilme, com renovação do meio de cultivo no período de 3 vezes por semana.

Durante as trocas de meio de cultivo, uma gota do material coletado do interior dos microtubos era disposta em placa ágar sangue, e levados à estufa a 37ºC por um período de 48 horas, para posterior avaliação visual e contagem bacteriana, verificando se houve contaminação em alguma amostra, através de coleta para análise de Gram (figura 7).

A partir das placas de ágar sangue, a coloração de Gram era realizada com auxílio de uma alça aquecida e estéril, colônias eram depositadas em lâminas de vidro e coradas, para que em seguida pudessem ser analisadas em microscópio (objetiva de 1000x) para observar se houve presença de bactérias, do tipo estafilococos, sem presença de contaminação e com ausência de colônias diferentes (figura 8).



Fonte: acervo do autor
Figura 7: placas de ágar sangue confirmando a cultura pura.



Fonte: acervo do autor
Figura 8: Análise de Gram realizada a partir das placas de ágar sangue.

3.4 Classificação dos Grupos de Tratamento

A divisão das amostras ocorreu de forma randomizada em 7 grupos, levando-se em conta os grupos contaminados, o grupo de controle negativo e o grupo de controle positivo, cada grupo com 8 amostras.

Conforme os grupos, os procedimentos que foram realizados estão descritos abaixo:

GRUPO 1 (G1) - Controle Negativo (n=8): para fins de comprovação de ausência de microrganismos as amostras foram esterilizadas e testadas, não foram inoculadas com cepas de *E. faecalis*, e passaram pelos procedimentos experimentais.

GRUPO 2 (G2) - Controle Positivo (n=8): As amostras foram esterilizadas e inoculadas, e passaram pelos procedimentos experimentais, com presença de crescimento de biofilme dentário, mas não foram submetidas a nenhum tratamento.

GRUPO 3 (G3) - (n=8): As amostras foram esterilizadas e inoculadas, e passaram por procedimentos experimentais, com presença de crescimento de biofilme dentário. Receberam o tratamento: água eletrolisada com HOCl (Dentaqua®, São Francisco, EUA) 3 ciclos de irrigação de 3 segundos, movimento de vai e vem da agulha de irrigação que foi calibrada -3mm do comprimento de trabalho.

GRUPO 4 (G4) - (n=8): As amostras foram esterilizadas e inoculadas, e passaram por procedimentos experimentais, com presença de crescimento de biofilme dentário. Receberam o tratamento: água eletrolisada com HOCl, 3 ciclos de irrigação de 3 segundos, movimento de vai e vem da agulha de irrigação que foi calibrada -3mm do comprimento de trabalho. Entre um ciclo e outro receberam a fonte de luz Germinator durante 3 minutos com o canal inundado de água eletrolisada.

GRUPO 5 (G5) - (n=8): As amostras foram esterilizadas e inoculadas, e passaram por procedimentos experimentais, com presença de crescimento de biofilme dentário. Entraram em contato com o NaOCl 2,5%, 3 ciclos de irrigação de 3 segundos, movimento de vai e vem da agulha de irrigação que foi calibrada -3mm do comprimento de trabalho.

GRUPO 6 (G6) - (n=8): As amostras foram esterilizadas e inoculadas, e passaram por procedimentos experimentais, com presença de crescimento de biofilme dentário. Entraram em contato com o NaOCl 2,5%, 3 ciclos de irrigação de 3 segundos, movimento de vai e vem da agulha de irrigação que foi calibrada -3mm do comprimento de trabalho. Entre um ciclo e outro receberam a fonte de luz Germinator durante 3 minutos com o canal inundado de NaOCl.

GRUPO 7 (G7) - (n=8): As amostras foram esterilizadas e inoculadas, e passaram por procedimentos experimentais, com presença de crescimento de biofilme dentário. Entraram em contato com o Germinator, 2 ciclos de 3 minutos com o canal inundado de água destilada.

3.5 Água eletrolisada com HOCl

A água eletrolisada com HOCl foi obtida através do equipamento Dentaqua® Device Dw-8 fornecido pela empresa Dentaqua®, localizada em San Francisco, EUA, para realizarmos o estudo experimental. Os procedimentos foram realizados no laboratório de Imunologia e Microbiologia da Escola de Ciências da PUC-RS.

A Formulação de HOCl foi manipulada conforme as instruções do fabricante descrita como *"brine",* composta por 450 ml de água deionizada, 50ml de Cloreto de Sódio e 25 ml de ácido clorídrico 9%. O equipamento Dentaqua® foi operado conforme as indicações do fabricante, descritas no manual de uso.

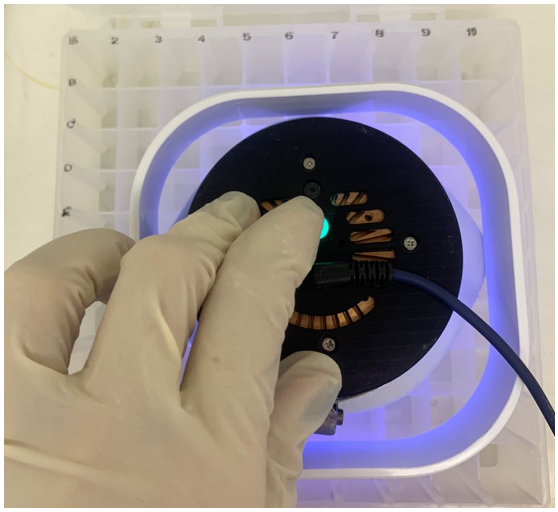
3.6 Germinator

É um Protótipo que permite a fotocatálise por meio de luzes de LED, com comprimento de onda de 405nm, denominado Germinator (Germinator—Designs For Vision, Bohemia, NY, EUA). O Germinator é composto pelo protótipo de protetor bucal para descontaminação oral e sua bateria com unidades conectoras de USB (Figura 5). Para ligar o dispositivo o botão liga/desliga deve ser pressionado e configurado em alta potência (400 mA) fornecendo a emissão de luzes LED.

Quando o protocolo foi realizado o operador segurou o protetor bucal sobre os dentes por 3 minutos, 2 ciclos em cada amostra, totalizando 6 minutos (figura 9). Antes de ser usado, o dispositivo foi envolto em filme plástico. O mesmo dispositivo foi usado em todas as amostras. Após cada uso, o filme plástico foi removido e o dispositivo inserido em sua caixa esterilizadora UVC-LED (WillBrite International Ltda.—Taiwan) (figura 11). Após o ciclo de esterilização de 3 minutos, o dispositivo foi removido da caixa esterilizadora e embrulhado em filme plástico, ficando pronto para ser usado novamente (SOUZA et al., 2021).

(SOUZA et al., 2021)

Figura 9: Protótipo de protetor bucal e sua bateria.



Fonte: acervo do autor

Figura 10: protótipo de protetor bucal, com luz LED ligada, sobre as amostras.

Fonte: acervo do autor

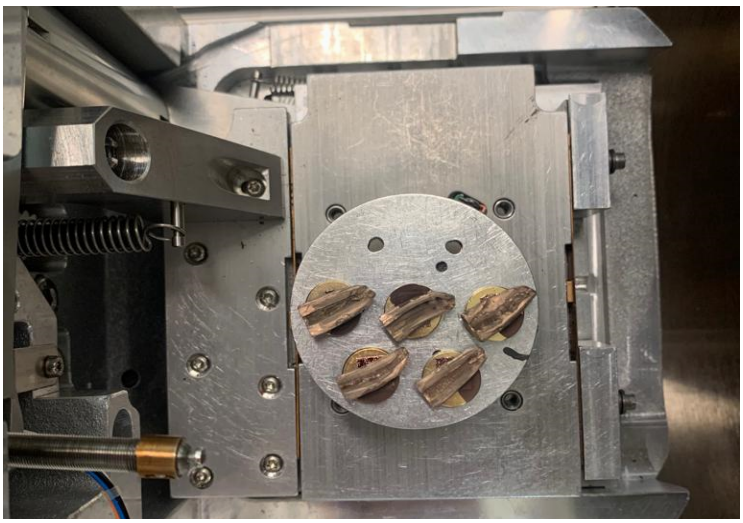
Figura 11: unidade esterilizadora.

3.7 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As amostras permaneceram em solução de glutaraldeído a 2,5% (Glicolabor – Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil). Através da imersão em soluções de acetona em concentrações de 10, 30, 50, 70, 90 até 100% foram desidratadas e secas usando uma ponta de papel absorvente 15-40 e 45-80 (Diadent/TDK, Dental Web, Porto Alegre- RS), em uma superfície com a porção do canal voltada para cima.

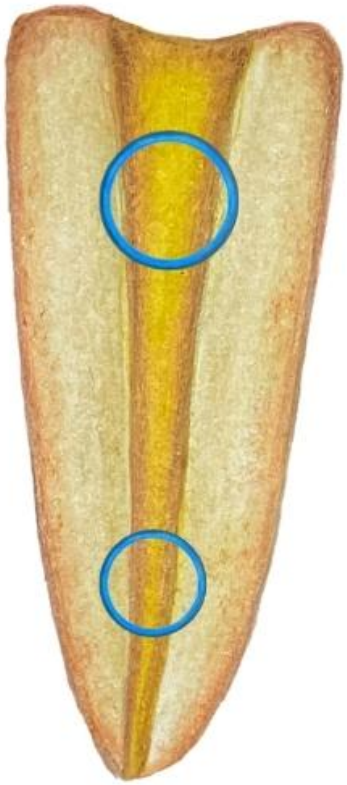
A microscopia eletrônica de varredura foi realizada no Centro de Microscopia e Microanálises da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUC – RS). As amostras foram cobertas com aproximadamente 30nm de espessura de liga ouro/paládio (Emitech K650 Sputter Coater, London, England), em máquina Sputter Coater BAL-TEC SCD 005 (BAL-TEC AG, Liechtenstein, Alemanha), em que a deposição da liga ocorreu nas amostras a um nível de vácuo de aproximadamente 5 x 10-2 mbar (figura 12).

As observações em microscopia eletrônica de varredura (XL 30; Philips, Eindhoven, Netherlands) foram realizadas com magnificações de 500x, 2000x, 5000x, 10000x e 20000x, as áreas de aquisição foram padronizadas entre terço cervical e médio e médio e apical (figura 13). O objetivo foi analisar o canal principal e os túbulos dentinários e foi realizada uma análise observacional descritiva por um pesquisador experiente e cegado.



Fonte: acervo do autor

Figura 12: amostras metalizadas e acopladas em stub do MEV.



(Marchand T., 2022)

Figura 13: ilustração do dente hemissecionado, apontando as áreas de análise em MEV.

3.8 Análise Estatística

A análise estatística foi realizada em duas etapas. Em um primeiro momento foi realizada uma análise observacional dos aumentos 5.000x e 10.000x, por um avaliador treinado, experiente e cegado, foi realizado o ranqueamento de escores em ordem cronológica (0-100) sendo: 0 livre de

contaminação e 100 contaminado. Estabelecidos os escores, os resultados foram analisados no software SPSS (21.0 version, IBM Corp, Somers, NY) através de Kruskal Wallis e Mann-Whitney.

4. RESULTADOS

As hemissecções correspondentes ao controle negativo (CN) passaram pelos procedimentos experimentais de trocas de meio BHI, mas não foram submetidas a inoculação bacteriana, servindo como um mapeamento do experimento. Em MEV foi possível verificar a ausência de *E. faecalis* em todas as amostras, oferecendo maior confiabilidade ao estudo (figura 14). O controle positivo (CP) passou pelos procedimentos experimentais com inoculação da cepa bacteriana, mas não recebeu nenhum protocolo de tratamento. Em MEV foi possível visualizar a cultura pura e na região de túbulos dentinários foi possível notar uma grande presença desta bactéria (figura 15).

As amostras analisadas em MEV do Grupo 3, apresentaram-se com uma quantidade grande de bactérias, mostrando maior similaridade com as amostras correspondentes ao CP, principalmente na região apical com discos diploides bem definidos (gráfico 01; figura 16) sendo o grupo de tratamento que apresentou menor desempenho antimicrobiano.

Uma melhora na ação antimicrobiana foi observada no grupo 4, o qual recebeu a terapia auxiliar com Germinator, demonstrando em MEV discrepâncias na presença de *E.faecalis* entre terço cervical e médio, mas sem diferença estatisticamente relevante (figura 17; gráfico 01). Os grupos 5 e 6 demonstraram melhores resultados antimicrobianos; à análise microscópica notamos que o NaOCl em contato com o canal radicular infectado com *E. faecalis* possui capacidade de levar à lise de suas células. A parede celular da bactéria apresentou-se rompida sinalizando sua morte, assim como também foi possível verificar uma grande erradicação do microrganismo (figuras 18 e 19). Os *E. faecalis* apresentavam-se com formato ovalado, podendo ser vistos isoladamente, aos pares, em cadeias curtas em áreas de túbulo dentinário (figura 20).

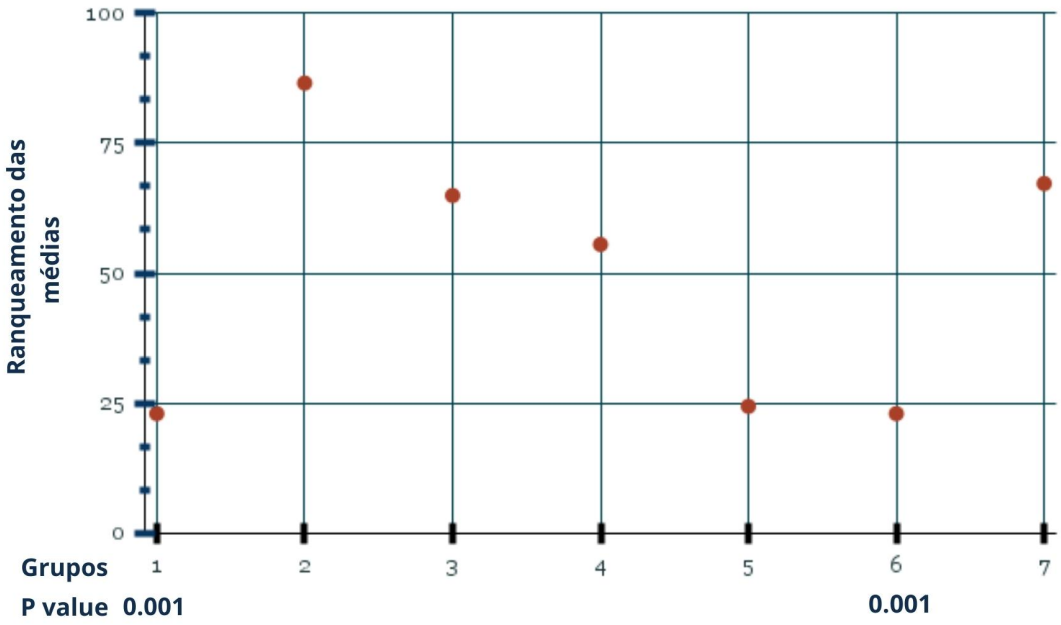
Na análise estatística quando comparado ao grupo CP, os protocolos de tratamento aplicados nos grupos 5 e 6 foram estatisticamente relevantes (tabela 01), mostrando maior similaridade com às amostras correspondentes ao CN, embora ainda seja possível denotar invasão bacteriana nos túbulos dentinários (figura 20). Em particular, o grupo que apresentou melhor ação antimicrobiana foi o grupo 6 de forma uniforme em cervical e apical. A MEV revelou grande ação antimicrobiana proporcionada pelo protocolo de tratamento, porém uma perda na irregularidade do contorno dos túbulos dentinários, afetando as propriedades da dentina (figura 19).

Uma análise dos terços do canal radicular foi realizada através do teste Kruskall-Wallis, proporcionando uma comparação das médias dos escores do ranking (gráfico 02). Nos grupos 3 e 4 houve discrepâncias das médias entre os terços cervicais e apicais, mas sem relevância estatística

(figura 16). Os grupos 5 e 6 demonstraram uma descontaminação uniforme nos terços cervicais e apicais (figuras 18 e 19). Pode-se observar também que o NaOCl causou áreas de erosão na dentina, comprometendo a estrutura dos túbulos dentinários, e uma perda no contorno de sua estrutura (figuras 18 e 19).

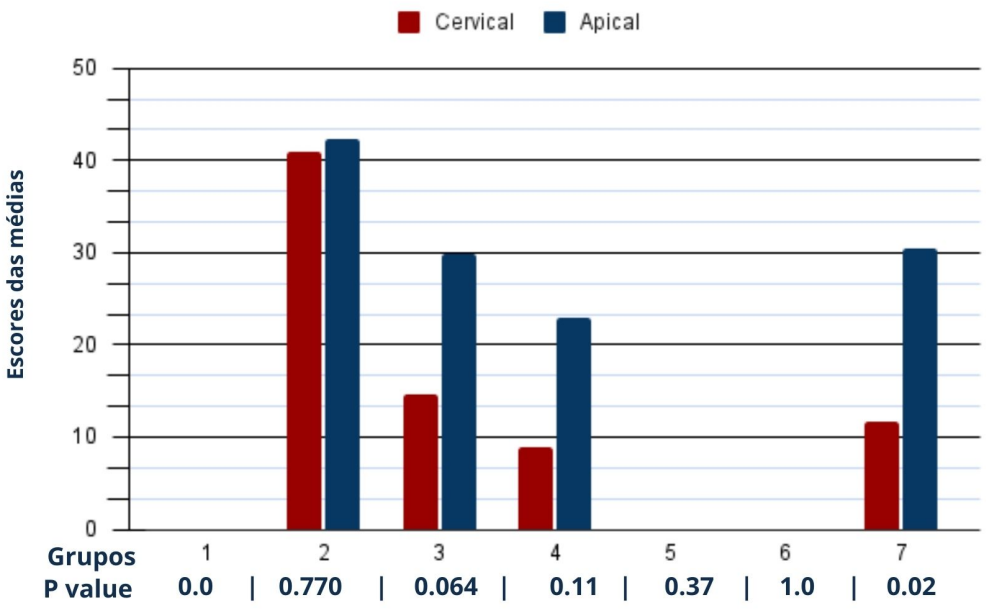
Um ponto importante que deve ser destacado nessa análise é o grupo 7, nesse protocolo houve uma maior discrepância entre as médias, em comparação aos outros grupos, mas sem relevância estatística (p>0.001), o terço cervical demonstrou maior descontaminação em comparação ao apical (figura 21). O Germinator (grupo 7) quando aplicado de forma isolada não teve uma grande ação antimicrobiana (gráfico 01), porém quando associado aos irrigantes (grupos 4 e 6) teve uma pequena redução de *E.faecalis* (gráfico 01).

Uma análise entre os grupos foi realizada através de Kruskall-Wallis (tabela 01), podemos observar que os grupos 5 e 6 foram os únicos protocolos de tratamento estatisticamente relevantes quando comparado aos demais, demonstrando maior sucesso antimicrobiano.



Fonte: Elaboração própria

Gráfico 01: KRUSKAL WALLIS TEST- Comparação entre os protocolos de tratamento



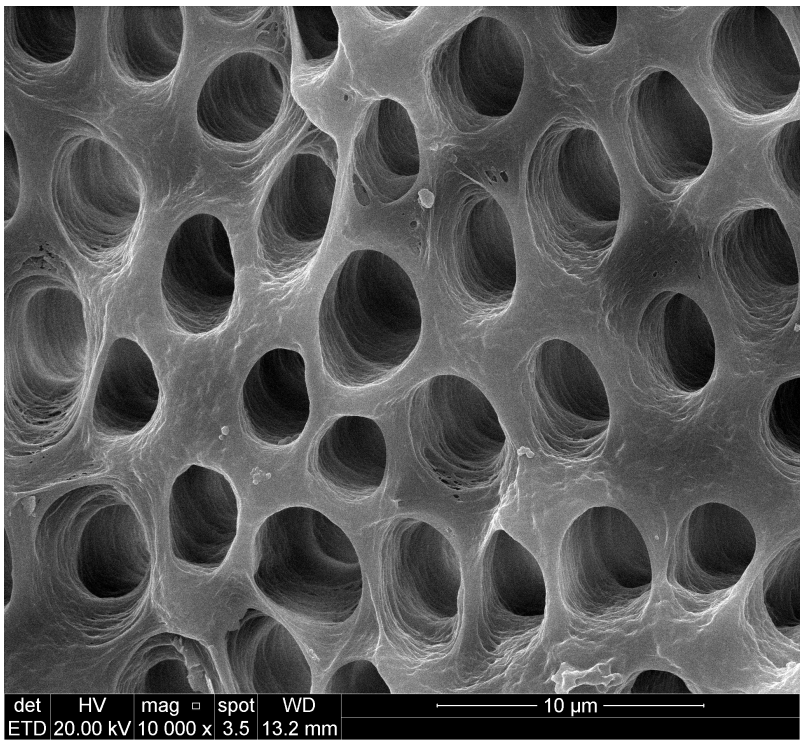
Fonte: Elaboração própria

Gráfico 02: MANN-WHITNEY TEST - Comparação entre terços

Grupos	1	2	3	4	5	6	7
1	x						
2	<0.001	x					
3	<0.001	0.002	x				
4	0.002	<0.001	0.151	x			
5	0.480	<0.001	<0.001	<0.001	x		
6	>0.999	<0.001	<0.001	<0.001	0.317	x	
7	<0.001	0.002	0.937	0.342	<0.001	<0.001	x

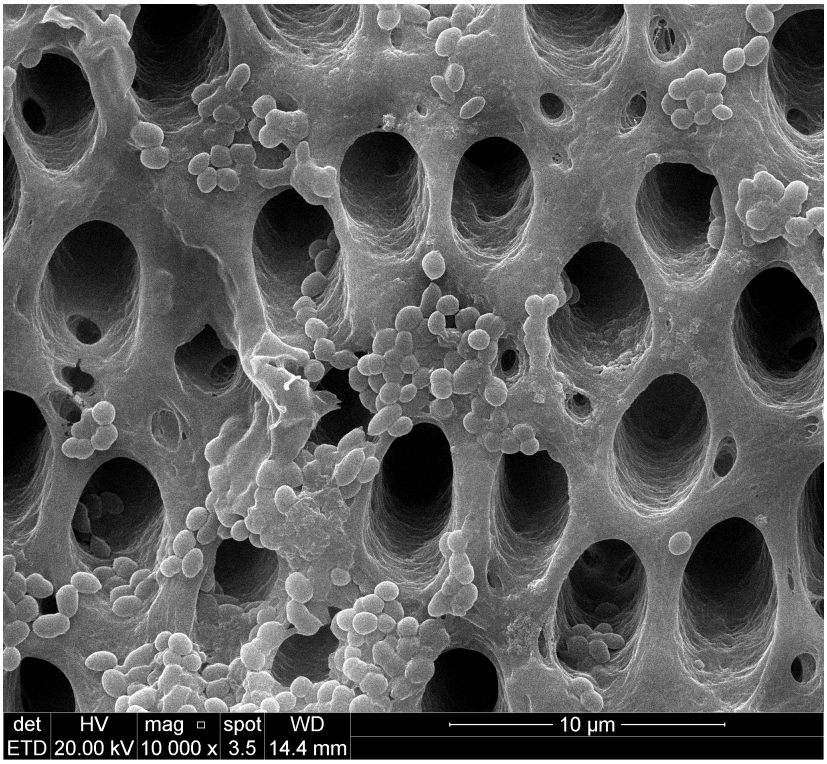
Fonte: Elaboração própria

Tabela 01: MANN-WHITNEY TEST - Comparação entre os grupos de tratamento



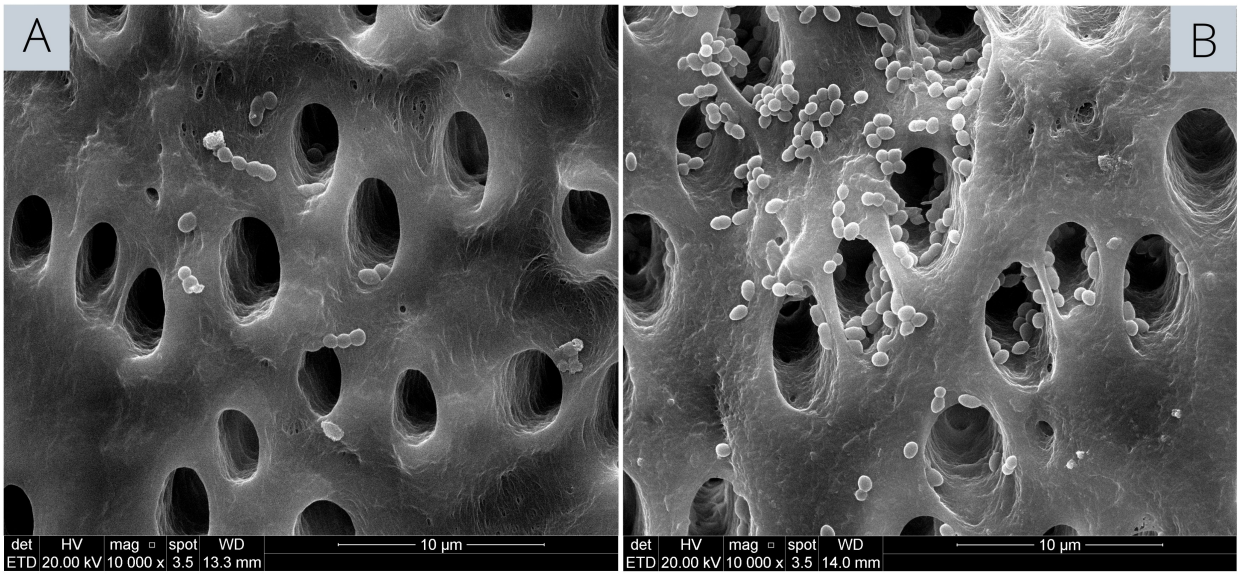
Fonte: acervo do autor

Figura 14- MEV (10.000x) do **controle negativo**, ilustração dos túbulos dentinários evidenciando ausência de microrganismos.



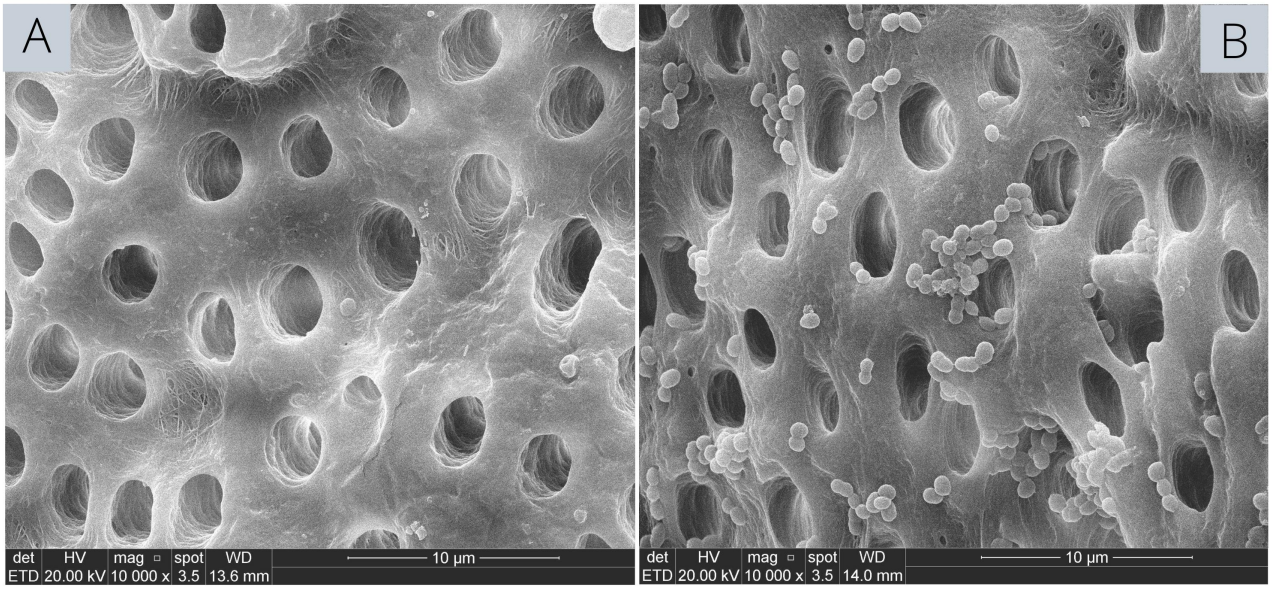
Fonte: acervo do autor

Figura 15- MEV (10.000x) **Controle positivo,** ilustração dos túbulos dentinários evidenciando a contaminação bacteriana com *E. faecalis.*



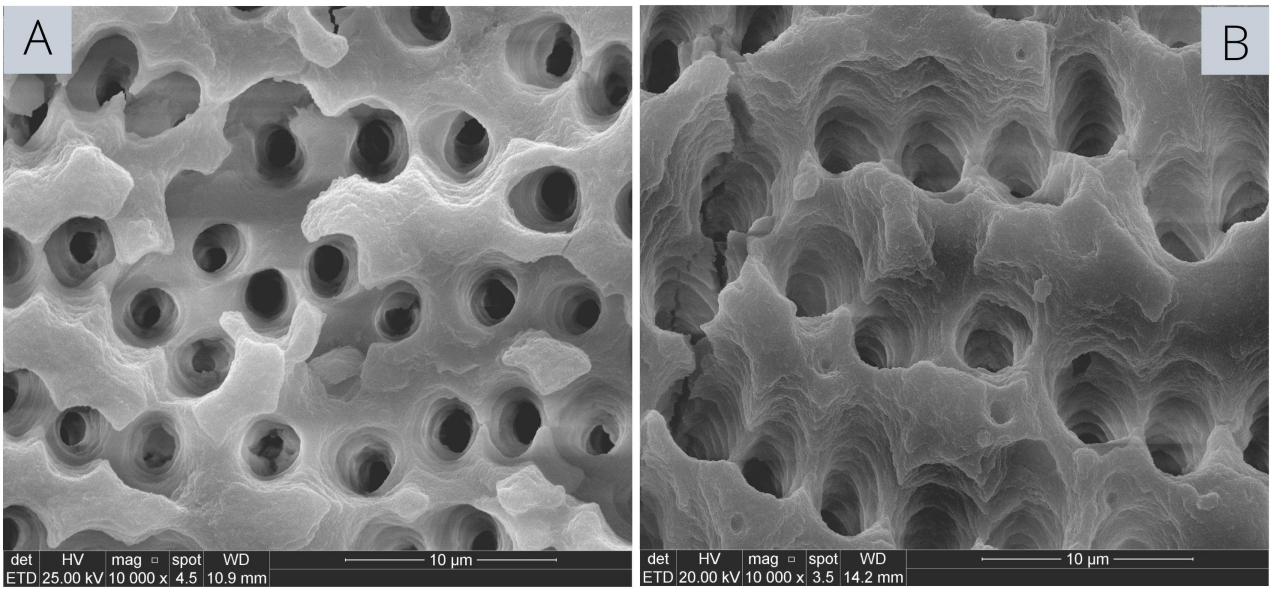
Fonte: acervo do autor

Figura 16 (A) MEV (10.000x) **Grupo 3,** terço cervical. Observa-se uma redução dos *E.faecalis* na superfície da dentina e no interior dos túbulos dentinários, em comparação ao CP; **(B) grupo 3**; MEV (10.000X), terço apical, é possível notar a presença de E.faecalis em túbulos dentinários em profundidade, em maior quantidade quando comparado ao terço cervical.



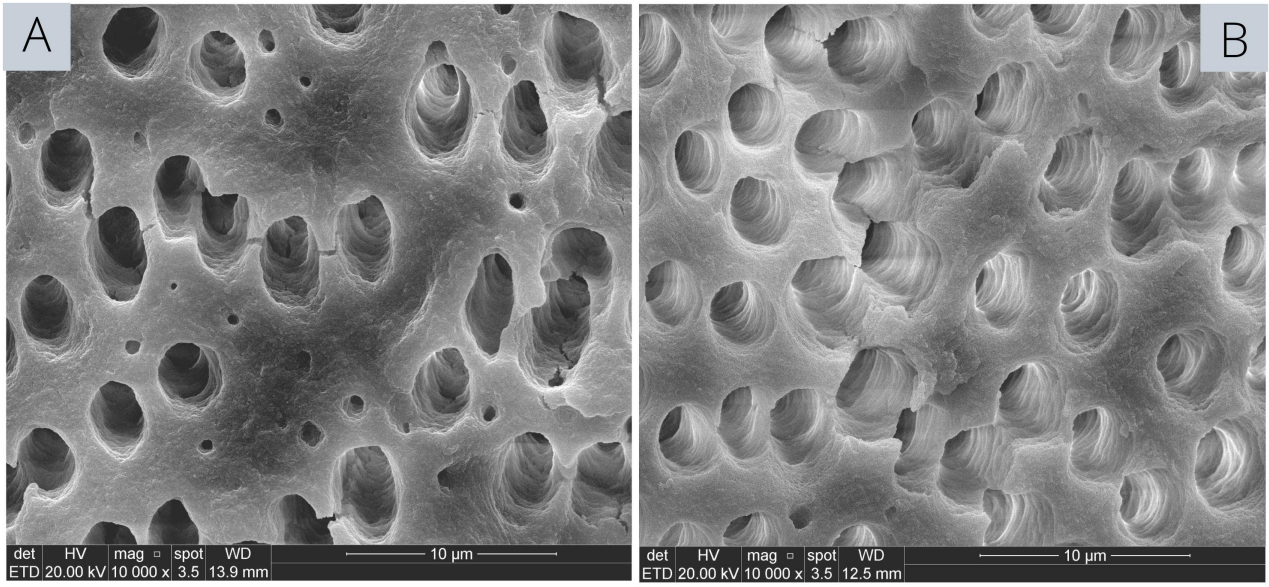
Fonte: acervo do autor

Figura 17 (A) MEV (10.000x) **grupo 4**, terço cervical. Observe redução dos *E.faecalis* na superfície da dentina e no interior dos túbulos dentinários, em comparação ao CP e ao grupo 3; **(B) grupo 4;** MEV (10.000X), terço apical, é possível notar a presença de *E.faecalis* em maior quantidade quando comparado ao terço cervical.



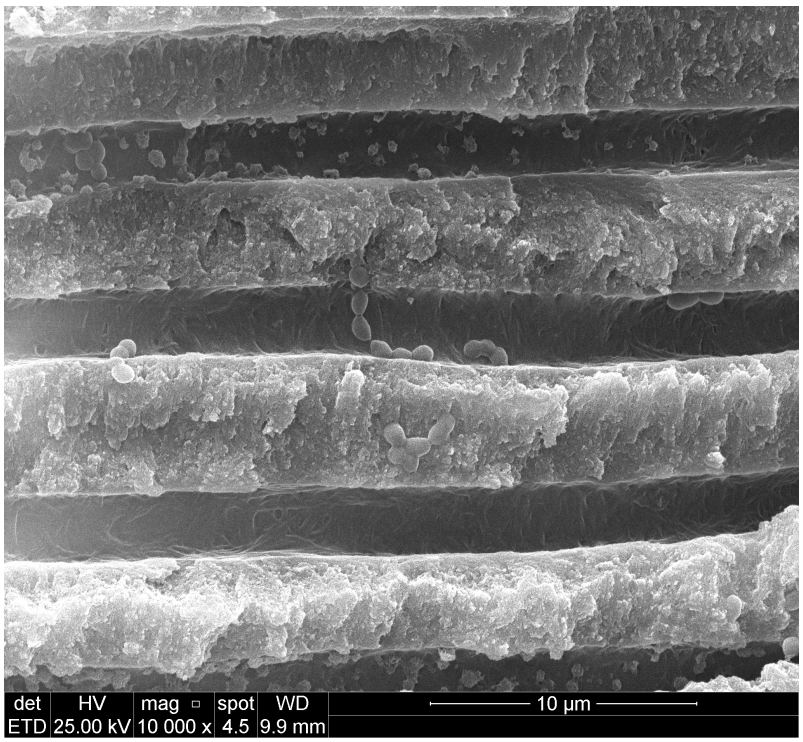
Fonte: acervo do autor

Figura 18 (A) MEV (10.000x) **grupo 5**, terço cervical. Observe a ausência de *E.faecalis* na superfície da dentina, semelhante ao CN, porém é possível visualizar a perda do contorno dos túbulos dentinários; **(B) grupo 5**; MEV (10.000X), terço apical semelhante ao CN e com zonas erosivas.



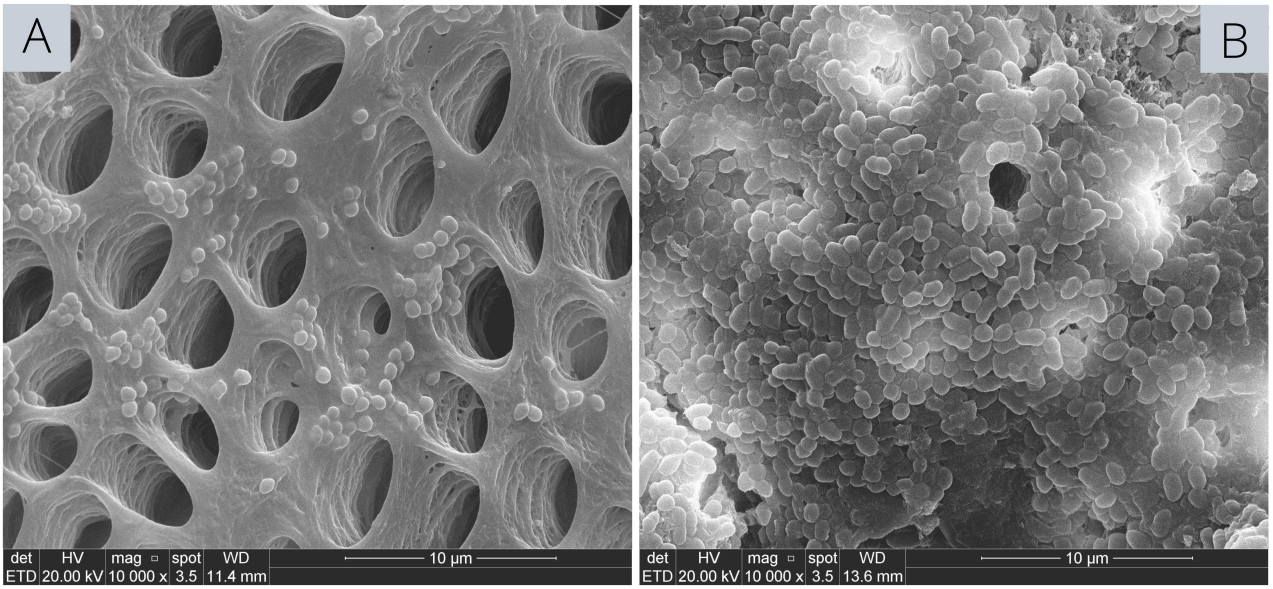
Fonte: acervo do autor

Figura 19 (A) MEV (10.000x) **grupo 6**, terço cervical semelhante ao CN e ao grupo 5. Ausência de *E.faecalis* na superfície da dentina e no interior dos túbulos dentinários. Perda de contorno dos túbulos; **(B) grupo 6,** MEV (10.000X), terço apical semelhante ao terço cervical. Limpeza uniforme em todo o canal radicular.



Fonte: acervo do autor

Figura 20 - (A) MEV (10.000x) **grupo 5** em área de túbulos dentinários (interface), é possível observar presença de *E. faecalis*.



Fonte: acervo do autor

Figura 21- (A) MEV (10.000x) **grupo 7**, terço cervical. Redução dos *E.faecalis* na superfície da dentina e no interior dos túbulos dentinários, em comparação ao CP; **(B) grupo 7,** MEV (10.000X), terço apical, é possível notar a presença de *E.faecalis* em toda a superfície da dentina, dificultando a visualização dos túbulos dentinários.

5. DISCUSSÃO

Os experimentos foram bem sucedidos em testar o objetivo que foi avaliar a capacidade antimicrobiana de dois irrigantes: NaOCl 2,5% e água eletrolisada com HlOC, à uma fonte de luz

fotocatalítica como estratégia auxiliar de desinfecção. A cepa de eleição foi o *E. faecalis* devido à sua importância nas infecções secundárias e persistentes, traz consigo fatores de virulência e características que agregam na sua resistência aos protocolos endodônticos.

Em nossos achados foi observado que nenhum irrigante foi capaz de eliminar totalmente o *E.faecalis* dos canais radiculares e sistemas de túbulos dentinários. Uma redução maior foi observada no canal principal, porém ainda foi possível denotar sua presença em túbulos dentinários. Atribuímos esse resultado aos achados de Distel e colaborados (2002), em que os autores relatam que o *E. faecalis* é um patógeno capaz de se mineralizar à superfície da dentina, através de uma dissolução mineral que leva ao aumento dos íons cálcio e fosfato, favorecendo a calcificação do biofilme. Onde nem mesmo o Hidróxido de Cálcio mantido no conduto radicular é capaz de eliminá-lo, a bactéria se mantém formando um biofilme que à torna 1000 vezes mais resistente à fagocitose (SEDGLEY et al., 2005).

Nesse sentido, Siqueira e seus colaboradores (1997) observaram que a cepa de *E.faecalis* é suscetível à solução NaOCl 4%, porém algumas amostras ainda renderam culturas com presença de crescimento de *E. faecalis.* Os autores relacionaram esse achado com a presença de células bacterianas nas irregularidades do canal e também com a capacidade de invasão nos túbulos dentinários. Isto vai ao encontro de Jhajharia e seus colaboradores (2015) que denotam a capacidade de invasão bacteriana aos túbulos dentinários de até 100nm do lúmen do canal.

Uma estratégia documentada na literatura que aumenta os efeitos antibacterianos é o uso do ultrassom (SJÖGREN & SUNDQVIST 1987). A ativação ultrassônica passiva (PUI) produz um efeito de cavitação, aumentando a área de contato dos irrigantes com os nichos bacterianos, possibilita a penetração dos irrigantes nos túbulos dentinários e melhora a ação do NaOCl na forma de solução e em gel, sobre o biofilme de *E.faecalis* e suas endotoxinas (LTA) (HASNA et al, 2020; FARIA et al., 2019). No presente estudo não adotamos os protocolos de PUI na metodologia pois em um primeiro momento não fez parte dos nossos objetivos. Para estudos futuros, o uso de PUI se configura como uma associação relevante a ser explorada.

Em nossos achados, a substância que teve um melhor desempenho foi o NaOCl 2,5% (grupos 5 e 6) em ambos os protocolos de tratamento, demonstrando diferença estatisticamente relevante ($P<0.001$). Tal observação está em consonância com o estudo de Gulabivala e colaboradores (2004) em que observaram que a água eletrolisada (ácida e alcalina) produz diferentes efeitos na dentina contaminada com *E.faecalis*. A substância tem potencial antimicrobiano para ser um irrigante do canal radicular, mas seus efeitos não foram superiores aos do NaOCl 3%.

Em estudos anteriores, o NaOCl já tem suas propriedades reconhecidas e bem exploradas na literatura. De encontro a isto, Siqueira e colaboradores (2000) demonstraram que o NaOCl foi

eficaz na redução bacteriana do *E. faecalis* em diferentes concentrações (1%, 2,5% e 5,25%). Valera et al. (2009) também concordam com esse achado, em seu experimento envolvendo crescimento de *E.faecalis* na forma de biofilme por 21 dias e observaram que o NaOCl 1% reduziu de forma significativa as contagens de *E.faecalis* dos canais radiculares. Porém, o irrigante também demonstrou capacidade limitada em penetrar em túbulos dentinários.

Plutzer e seus colaboradores (2018) também corroboram com os resultados dos autores citados acima, mas com erradicação quase que completa dos microrganismos. Relataram que NaOCl 4% produziu uma queda de 95% na viabilidade bacteriana do *E.faecalis* em 1 minuto de exposição e aumentou para 99,99% em 10 minutos de exposição e qualificam o NaOCl como o padrão ouro na terapia endodôntica.

Porém, Jhajaria e colaboradores (2015) sugerem fortemente que os estudos laboratoriais que testam o crescimento da cepa de E.*faecalis* na forma planctônica não simulam de forma fiel o crescimento *in vivo* encontrado em um dente infectado. Justificando os resultados dos estudos que apresentam erradicação bacteriana quase que completa com baixo tempo de exposição. Pois como Ratamozo e colaboradores (2020) citam são necessários 40 minutos de exposição do NaOCl 5,25% para a eliminação completa do *E. faecalis* na dentina contaminada. Jhajaria e colaboradores (2015) preconizam que todos os estudos que tiverem como objetivo avaliar ação clínica de irrigantes endodônticos devem simular o crescimento bacteriano na forma de biofilme, como foi realizado no presente estudo.

Outra razão pela qual o *E.faecalis* permaneceu em superfície após o protocolo de desinfecção com NaOCl é atribuído às modificações nas propriedades físico-químicas da dentina que o mesmo causou (imagens 18 e 19) onde é possível observar áreas de erosão, com superfície rugosa. Kishen e colaboradores (2008) estão de acordo com esse achado. Os autores relataram em seu estudo que quando os irrigantes EDTA e NaOCl foram utilizados, isoladamente, modificaram as propriedades da dentina. Os autores sugerem que a desmineralização e a exposição ao colágeno podem resultar em uma melhor adesão do *E.faecalis* à dentina. Stoodley e colaboradores (2002) explicam que o evento fornece condições para que os microrganismos resistam aos protocolos de desinfecção e as ações normais dos fluidos teciduais, lhes permitindo sobreviver em condições ambientais difíceis.

Em nosso estudo, a água eletrolisada com HClO demonstrou capacidade antimicrobiana inferior ao NaOCl (gráfico 01). O que está em desacordo com os achados de Chen et al. (2013) após testarem a água eletrolisada com HClO (ácido) contra o biofilme de *E.faecalis* os autores relataram resultados semelhantes em comparação ao NaOCl 5,25%. Em 5 minutos de contato entre o biofilme de 28 dias, a água eletrolisada com HClO (ácida) reduziu a viabilidade do biofilme de *E. faecalis*, a proporção de bactérias mortas aumentou de acordo com aumento de tratamento, com uma erradicação quase que total em 10 minutos.

É difícil comparar os achados deste estudo com o restante da literatura devido a diferenças metodológicas. Essa disparidades entre desfechos pode ser atribuída a isso, em nosso experimento o tempo de contato entre o biofilme e as soluções antimicrobianas foi menor em comparação ao experimento de Chen et al. (2013), pois adotamos o protocolo de irrigação de Grundling et al. (2011) que foi padronizado para os grupos NaOCl e água eletrolisada, na tentativa de aproximar o máximo possível com a realidade clínica e com o uso do NaOCl.

Outra variável a ser julgada é a microbiológica. Castillo e colaboradores (2015) avaliaram a viabilidade bacteriana de bactérias Gram positivas de Gram negativas, frente aos antimicrobianos HClO e CHX. O HClO mostrou um efeito significativo nas bactérias Gram positivas, mas não excedeu o efeito da CHX. Porém, a ação de HClO em bactérias Gram negativas foi vantajosa em comparação a CHX. Chen et al. (2016) também estão de acordo que a atividade antimicrobiana do HClO contra bactérias Gram negativas e sua endotoxina (LPS) é superior quando comparada a outros antissépticos (NaOCl 1,3% e CHX 0,2%).

Meckenna & Davies (1988) explicam que bactérias Gram negativas possuem grupos de enxofre rico em ferro em sua membrana, onde o HClO provoca uma ação irreversível que altera a permeabilidade da membrana, afetando a viabilidade bacteriana. Nesse sentido HClO pode ter um efeito significativo sobre as bactérias periodontopáticas que podem colonizar e agregar o biofilme dental e em superfícies de implantes (CASTILLO et al., 2015; CHEN et al., 2016).

Cheng e colaboradores (2016) qualificam a água eletrolisada ácida, como um irrigante eficaz na desinfecção de canais radiculares infectados com *E.faecalis*, o desempenho antimicrobiano foi tão eficaz quanto do NaOCl 5,25%. Após o tratamento com água eletrolisada ácida, a MEV ilustrou bactérias com superfícies ásperas, encolhidas e lisadas. Os autores indicam o seu uso por ser muito mais biocompatível e por apresentar um odor mais suave em comparação ao NaOCl. Há diferenças metodológicas entre o nosso estudo e o de Cheng et al. (2016). O experimento dos autores testou o biofilme de *E. faecalis* cultivado em placas durante 72 horas, e não simularam o crescimento na superfície dentinária. É sugerível que a maturidade do biofilme e a sua superfície de crescimento sejam as causas da contraposição dos achados.

Por ser um irrigante bem tolerado aos tecidos, Hsieh e colaboradores (2020) indicaram o uso do HClO para limpeza de cavidades de dentes que receberão um dos tratamentos conservadores da polpa como na pulpotomia, os autores afirmam que o irrigante tem capacidade bactericida contra o *S. Mutans.* Cheng et al (2016) e Hsieh et al. (2020) estão de acordo que a água eletrolisada com HClO não possui capacidade de dissolução tecidual, achado que corrobora com o nosso. Dessa forma, no tratamento endodôntico da polpa vital (biopulpectomia) e para a dissolução de tecido necrótico, o seu uso deve ser aprimorado para ser aplicado com segurança.

Não há um consenso quanto ao mecanismo de ação da água eletrolisada, o que se sabe é que

as mudanças de pH afetam na atividade bactericida da solução, um baixo valor de pH implica em um maior potencial antimicrobiano, assim como a concentração de cloro disponível e um alto ORP (FABRIZIO et al., 2002). O *E. faecalis* é capaz de sobreviver em ambientes ácidos e alcalinos. Contudo, a mudança de pH não implicaria em sua sobrevivência. Para futuros experimentos com essa cepa, é sugerível aumentar o teor de cloro disponível e um alto ORP, que irá permitir que a solução penetre a célula bacteriana, afete os compostos metabólicos e inative a célula (FABRÍZIO et al., 2002).

Com resultados inéditos na literatura, o Germinator demonstrou ter capacidade de desinfecção e associado aos irrigantes foi capaz de potencializar o efeito antimicrobiano das soluções NaOCl e a água eletrolisada, atuando com maior efetividade na região cervical dos canais radiculares, onde é possível identificar células lisadas. Porém, na porção apical parece não exercer efeito. A chave para esta observação parece estar associada à área de contato da luz com o canal radicular. Uma alternativa para aprimorar a técnica seria desenvolver ponteiras de aplicação que percorram todo o leito do canal radicular.

A aplicação do Germinator de forma isolada serviu como maneira de avaliar a capacidade da luz LED azul em 405nm como protocolo de desinfecção por si só, o que demonstrou ter uma redução da microbiota (gráfico 01) mas sem relevância estatística ($P>0.001$). Porém, quando associada a aditivos, potencializou o efeito destes. Souza e colaboradores (2021) já haviam relatado resultados promissores quanto ao uso do Germinator, onde elevou a capacidade de desinfecção do peróxido de hidrogênio em concentrações de 3% e 1,5%, e mais que dobrou a eficácia bactericida de CHX.

A adição de radiação não ionizante aos protocolos de desinfecção pode exercer um papel essencial na eficácia dos agentes antimicrobianos (IKAI et a., 2011). Ocorre uma reação, denominada de Fenton, onde radicais hidroxila são gerados pela autólise de aditivos, potencializando o efeito das soluções (LIOCHEV et al., 2002). Esses benefícios adicionais podem ser uma opção para reduzir a concentração da solução, minimizando os efeitos colaterais dos agentes químicos, como os efeitos na dentina causados no presente estudo, devido a ação do NaOCl 2,5%.

6.0 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados do presente estudo permitem ensejar objetivos futuros, no que diz respeito à água eletrolisada, o aumento na sua concentração e tempo de contato, visto a sua biocompatibilidade com os tecidos. A PUI poderá ser associada para otimizar a desinfecção em túbulos dentinários e o Germinator poderá ter sua forma de contato aprimorada por meio de

ponteiras que permitam o contato da luz com todo o leito do canal radicular, desejando o espalhamento da radiação não ionizante. Ansiamos explorar o uso destas estratégias antimicrobianas para além do *E.faecalis*, incluindo uma gama maior de bactérias encontradas no biofilme endodôntico, como em infecções mistas.

6.0 REFERÊNCIAS

BAUMGARTNER, J. Craig; FALKLER, William A. Bacteria in the apical 5 mm of infected root canals. **Journal of endodontics**, v. 17, n. 8, p. 380-383, 1991.

BOYLE, M. A. et al. Lack of cytotoxicity by Trustwater Ecasol™ used to maintain good quality dental unit waterline output water in keratinocyte monolayer and reconstituted human oral epithelial tissue models. **journal of dentistry**, v. 38, n. 11, p. 930-940, 2010.

BYSTRÖM, A.; SUNVQVIST, G. The antibacterial action of sodium hypochlorite and EDTA in 60 cases of endodontic therapy. **International endodontic journal**, v. 18, n. 1, p. 35-40, 1985.

CAMPOS, Maria Inês; CAMPOS, Celso Neiva; VITRAL, Robert Willer Farinazzo. O Uso de dentes bovinos como substitutos de dentes humanos em pesquisas odontológicas: uma revisão da literatura. **Pesquisa Brasileira em Odontopediatria e Clínica Integrada**, v. 8, n. 1, p. 127-132, 2008.

CASTILLO, Diana Marcela et al. Viability and effects on bacterial proteins by oral rinses with hypochlorous acid as active ingredient. **Brazilian Dental Journal**, v. 26, p. 519-524, 2015.

CAVALLI, Daiana et al. Effectiveness in the removal of endotoxins and microbiological profile in primary endodontic infections using 3 different instrumentation systems: a randomized clinical study. **Journal of endodontics**, v. 43, n. 8, p. 1237-1245, 2017.

CHEN, Chun-Ju; CHEN, Chun-Cheng; DING, Shinn-Jyh. Effectiveness of hypochlorous acid to reduce the biofilms on titanium alloy surfaces in vitro. **International journal of molecular sciences**, v. 17, n. 7, p. 1161, 2016.

CHEN, X. et al. Ex vivo antimicrobial efficacy of strong acid electrolytic water against Enterococcus faecalis biofilm. **International Endodontic Journal**, v. 46, n. 10, p. 938-946, 2013.

CHENG, Xiaogang et al. Bactericidal effect of strong acid electrolyzed water against flow enterococcus faecalis biofilms. **Journal of endodontics**, v. 42, n. 7, p. 1120-1125, 2016.

COSTERTON, J. William et al. Bacterial biofilms in nature and disease. **Annual Reviews in Microbiology**, v. 41, n. 1, p. 435-464, 1987.

COSTERTON, J. William; STEWART, Philip S.; GREENBERG, E. Peter. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. **science**, v. 284, n. 5418, p. 1318-1322, 1999.

DING, Tian et al. Impact of slightly acidic electrolyzed water (SAEW) and ultrasound on microbial loads and quality of fresh fruits. **LWT-food Science and Technology**, v. 60, n. 2, p. 1195-1199, 2015.

DISTEL, John W.; HATTON, John F.; GILLESPIE, M. Jane. Biofilm formation in medicated root canals. **Journal of endodontics**, v. 28, n. 10, p. 689-693, 2002.

DONLAN, Rodney M.; COSTERTON, J. William. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. **Clinical microbiology reviews**, v. 15, n. 2, p. 167-193, 2002.

ENDO, M. S. et al. Quantification of cultivable bacteria and endotoxin in post-treatment apical periodontitis before and after chemo-mechanical preparation. **European journal of clinical microbiology & infectious diseases**, v. 31, n. 10, p. 2575-2583, 2012.

ESTRELA, Carlos et al. Mecanismo de ação do hipoclorito de sódio. **Brazilian Dental Journal**, v. 13, p. 113-117, 2002.

EVANS, Matthew et al. Mechanisms involved in the resistance of Enterococcus faecalis to calcium hydroxide. **International endodontic journal**, v. 35, n. 3, p. 221-228, 2002.

FABRIZIO, K. A. et al. Comparison of electrolyzed oxidizing water with various antimicrobial interventions to reduce Salmonella species on poultry. **Poultry science**, v. 81, n. 10, p. 1598-1605, 2002.

FARIA, G. et al. Penetration of sodium hypochlorite into root canal dentine: effect of surfactants, gel form and passive ultrasonic irrigation. **International Endodontic Journal**, v. 52, n. 3, p. 385-392, 2019.

GOMI, Kazuhiro et al. Microbicidal and cytotoxic effects of functional water in vitro. **Quintessence International**, v. 41, n. 9, 2010.

GREENSTEIN, Gary; BERMAN, Charles; JAFFIN, Robert. Chlorhexidine: an adjunct to periodontal therapy. **Journal of periodontology**, v. 57, n. 6, p. 370-377, 1986.

GRALTON, Jan et al. The role of particle size in aerosolised pathogen transmission: a review. **Journal of Infection**, v. 62, n. 1, p. 1-13, 2011.

GRÜNDLING, Grasiela Longhi et al. Effect of ultrasonics on Enterococcus faecalis biofilm in a bovine tooth model. **Journal of Endodontics**, v. 37, n. 8, p. 1128-1133, 2011.

GUERREIRO-TANOMARU, Juliane Maria et al. Comparative analysis of Enterococcus faecalis

biofilm formation on different substrates. **Journal of endodontics**, v. 39, n. 3, p. 346-350, 2013.

GULABIVALA, K. et al. Effectiveness of electrochemically activated water as an irrigant in an infected tooth model. **International endodontic journal**, v. 37, n. 9, p. 624-631, 2004.

HAAPASALO, Markus et al. Irrigation in endodontics. **Dental Clinics**, v. 54, n. 2, p. 291-312, 2010.

HAAPASALO, Markus; RANTA, Helena; RANTA, Kari T. Facultative gram-negative enteric rods in persistent periapical infections. **Acta Odontologica Scandinavica**, v. 41, n. 1, p. 19-22, 1983.

HARTMANN, R.C. et al. Antimicrobial efficacy of 0.5% peracetic acid and EDTA with passive ultrasonic or manual agitation in an Enterococcus faecalis biofilm model. **Australian Endodontic Journal,** v.45, p.57–63, 2019.

HASNA, Amjad Abu et al. Effect of sodium hypochlorite solution and gel with/without passive ultrasonic irrigation on Enterococcus faecalis, Escherichia coli and their endotoxins. **F1000Research**, v. 9, 2020.

HSIEH, Sung-Chih et al. The antibacterial efficacy and in vivo toxicity of sodium hypochlorite and electrolyzed oxidizing (EO) water-based endodontic irrigating solutions. **Materials**, v. 13, n. 2, p. 260, 2020.

IKAI, Hiroyo et al. Bactericidal effect of hydroxyl radical generated by photolysis of hydrogen peroxide. In: **Interface Oral Health Science 2011**. Springer, Tokyo, 2012. p. 86-88.

JHAJHARIA, Kapil et al. Biofilm in endodontics: a review. **Journal of International Society of Preventive & Community Dentistry**, v. 5, n. 1, p. 1, 2015.

JEONG, Joonseon et al. Inactivation of Escherichia coli in the electrochemical disinfection process using a Pt anode. **Chemosphere**, v. 67, n. 4, p. 652-659, 2007.

JETT, Bradley D.; HUYCKE, Mark M.; GILMORE, Michael S. Virulence of enterococci. **Clinical microbiology reviews**, v. 7, n. 4, p. 462-478, 1994.

KAKEHASHI, S.; STANLEY, H. R.; FITZGERALD, R. J. The effects of surgical exposures of dental pulps in germ-free and conventional laboratory rats. **Oral surgery, oral medicine, oral pathology**, v. 20, n. 3, p. 340-349, 1965.

KAUFMAN, Arieh Y.; KEILA, Senia. Hypersensitivity to sodium hypochlorite. **Journal of endodontics**, v. 15, n. 5, p. 224-226, 1989.

KISHEN, A.; GEORGE, S.; KUMAR, R. Enterococcus faecalis-mediated biomineralized biofilm

formation on root canal dentine in vitro. **Journal of Biomedical Materials Research Part A: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials**, v. 77, n. 2, p. 406-415, 2006.

KISHEN, Anil et al. Influence of irrigation regimens on the adherence of Enterococcus faecalis to root canal dentin. **Journal of endodontics**, v. 34, n. 7, p. 850-854, 2008.

KIURA, Hiromasa et al. Bactericidal activity of electrolyzed acid water from solution containing sodium chloride at low concentration, in comparison with that at high concentration. **Journal of Microbiological methods**, v. 49, n. 3, p. 285-293, 2002.

LEWIS, Kim. Riddle of biofilm resistance. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 45, n. 4, p. 999-1007, 2001.

LIOCHEV, Stefan I.; FRIDOVICH, Irwin. The Haber-Weiss cycle—70 years later: an alternative view. **Redox report**, v. 7, n. 1, p. 55-57, 2002.

LOVE, R. M. Enterococcus faecalis–a mechanism for its role in endodontic failure. **International endodontic journal**, v. 34, n. 5, p. 399-405, 2001.

LUEBKE, R. G. Pulp cavity debridement and disinfection. **Dental Clinics of North America**, p. 603-613, 1967.

MARENDING, M. et al. Effect of sodium hypochlorite on human root dentine–mechanical, chemical and structural evaluation. **International endodontic journal**, v. 40, n. 10, p. 786-793, 2007.

MAI, Sui et al. Differential aggressiveness of ethylenediamine tetraacetic acid in causing canal wall erosion in the presence of sodium hypochlorite. **Journal of dentistry**, v. 38, n. 3, p. 201-206, 2010.

MCKENNA, Susan M.; DAVIES, K. J. A. The inhibition of bacterial growth by hypochlorous acid. Possible role in the bactericidal activity of phagocytes. **Biochemical Journal**, v. 254, n. 3, p. 685-692, 1988.

MILLER, Willoughby Dayton. An introduction to the study of the bacterio-pathology of the dental pulp. **Dental Cosmos**, v. 36, p. 505-528, 1894.

MOLANDER, A. et al. Microbiological status of root-filled teeth with apical periodontitis. **International endodontic journal**, v. 31, n. 1, p. 1-7, 1998.

MOLINARI, J. A. Infection control in dentistry: update for the 1990s. **Clinical Dentistry**, v. 1, p. 1-11, 1994.

MORRIS, Mitzi D. et al. Effects of sodium hypochlorite and RC-prep on bond strengths of resin cement to endodontic surfaces. **Journal of Endodontics**, v. 27, n. 12, p. 753-757, 2001.

MUNSON, M. A. et al. Molecular and cultural analysis of the microflora associated with endodontic infections. **Journal of dental research**, v. 81, n. 11, p. 761-766, 2002.

NAIR, P. N. R. On the causes of persistent apical periodontitis: a review. **International endodontic journal**, v. 39, n. 4, p. 249-281, 2006.

NAGAMATSU, Y. et al. Application of electrolyzed neutral water to dental practice—effects on human enamel surface—. **JJ Dent Mater**, v. 27, p. 283-290, 2008.

NAGAMATSU, Yuki et al. Application of neutral electrolyzed water to disinfection of alginate impression. **Dental Materials Journal**, v. 35, n. 2, p. 270-277, 2016.

NARAYANAN, L. Lakshmi; VAISHNAVI, C. Endodontic microbiology. **Journal of conservative dentistry: JCD**, v. 13, n. 4, p. 233, 2010.

OOMORI, Toshihiro et al. The efficiency of disinfection of acidic electrolyzed water in the presence of organic materials. **Analytical sciences**, v. 16, n. 4, p. 365-369, 2000.

OYARZÚN, Alejandro; CORDERO, Ana M.; WHITTLE, Marta. Immunohistochemical evaluation of the effects of sodium hypochlorite on dentin collagen and glycosaminoglycans. **Journal of Endodontics**, v. 28, n. 3, p. 152-156, 2002.

PARSEK, Matthew R.; SINGH, Pradeep K. Bacterial biofilms: an emerging link to disease pathogenesis. **Annual Reviews in Microbiology**, v. 57, n. 1, p. 677-701, 2003.

PECIULIENE, V. et al. Microorganisms in root canal infections: a review. **Stomatologija**.v.10,n.1, p.4-9, 2008.

PINHEIRO, E. T. et al. Microorganisms from canals of root-filled teeth with periapical lesions. **International endodontic journal**, v. 36, n. 1, p. 1-11, 2003.

PLUTZER, B. et al. Comparative efficacy of endodontic medicaments and sodium hypochlorite against Enterococcus faecalis biofilms. **Australian dental journal**, v. 63, n. 2, p. 208-216, 2018.

QIAN, Wei; SHEN, Ya; HAAPASALO, Markus. Quantitative analysis of the effect of irrigant solution sequences on dentin erosion. **Journal of endodontics**, v. 37, n. 10, p. 1437-1441, 2011.

QING, Yu et al. Cleaning efficacy and dentin micro-hardness after root canal irrigation with a strong acid electrolytic water. **Journal of Endodontics**, v. 32, n. 11, p. 1102-1106, 2006.

RAHMAN, S. M. E.; KHAN, Imran; OH, Deog-Hwan. Electrolyzed water as a novel sanitizer in the food industry: current trends and future perspectives. **Comprehensive Reviews in Food**

Science and Food Safety, v. 15, n. 3, p. 471-490, 2016.

RANTA, Helena et al. Bacteriology of odontogenic apical periodontitis and effect of penicillin treatment. **Scandinavian journal of infectious diseases**, v. 20, n. 2, p. 187-192, 1988.

RETAMOZO, Bonnie et al. Minimum contact time and concentration of sodium hypochlorite required to eliminate Enterococcus faecalis. **Journal of Endodontics**, v. 36, n. 3, p. 520-523, 2010.

RICUCCI, Domenico; SIQUEIRA JR, José F. Biofilms and apical periodontitis: study of prevalence and association with clinical and histopathologic findings. **Journal of endodontics**, v. 36, n. 8, p. 1277-1288, 2010.

RICUCCI, Domenico et al. Epithelium and bacteria in periapical lesions. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology**, v. 101, n. 2, p. 239-249, 2006.

ROSSI-FEDELE, Giampiero et al. Antagonistic interactions between sodium hypochlorite, chlorhexidine, EDTA, and citric acid. **Journal of endodontics**, v. 38, n. 4, p. 426-431, 2012.

RÔÇAS, Isabela N.; HÜLSMANN, Michael; SIQUEIRA JR, José F. Microorganisms in root canal–treated teeth from a German population. **Journal of endodontics**, v. 34, n. 8, p. 926-931, 2008.

RÔÇAS, Isabela N.; SIQUEIRA JR, José F.; SANTOS, Kátia RN. Association of Enterococcus faecalis with different forms of periradicular diseases. **Journal of endodontics**, v. 30, n. 5, p. 315-320, 2004.

RÔÇAS, Isabela N.; SIQUEIRA JR, José F. Detection of novel oral species and phylotypes in symptomatic endodontic infections including abscesses. **FEMS microbiology letters**, v. 250, n. 2, p. 279-285, 2005.

RUTALA, William A.; WEBER, David J. Uses of inorganic hypochlorite (bleach) in health-care facilities. **Clinical microbiology reviews**, v. 10, n. 4, p. 597-610, 1997.

SEDGLEY, Christine. Root canal irrigation--a historical perspective. **Journal of the history of dentistry**, v. 52, n. 2, p. 61-65, 2004.

SEDGLEY, C. M.; LENNAN, S. L.; APPELBE, O. K. Survival of Enterococcus faecalis in root canals ex vivo. **International endodontic journal**, v. 38, n. 10, p. 735-742, 2005.

SOLOVYEVA, A. M.; DUMMER, P. M. H. Cleaning effectiveness of root canal irrigation with electrochemically activated anolyte and catholyte solutions: a pilot study. **International Endodontic Journal**, v. 33, n. 6, p. 494-504, 2000.

SIQUEIRA JR, José F. et al. Antibacterial effects of endodontic irrigants on black-pigmented gram-negative anaerobes and facultative bacteria. **Journal of endodontics**, v. 24, n. 6, p. 414-416, 1998.

SIQUEIRA JR, J. F. et al. Evaluation of the effectiveness of sodium hypochlorite used with three irrigation methods in the elimination of Enterococcus faecalis from the root canal, in vitro. **International endodontic journal**, v. 30, n. 4, p. 279-282, 1997.

SIQUEIRA JR, Jose F.; DE UZEDA, Milton. Disinfection by calcium hydroxide pastes of dentinal tubules infected with two obligate and one facultative anaerobic bacteria. **Journal of endodontics**, v. 22, n. 12, p. 674-676, 1996.

SIQUEIRA JR, José F. Aetiology of root canal treatment failure: why well-treated teeth can fail. **International endodontic journal**, v. 34, n. 1, p. 1-10, 2001.

SIQUEIRA JR, José F. et al. Chemomechanical reduction of the bacterial population in the root canal after instrumentation and irrigation with 1%, 2.5%, and 5.25% sodium hypochlorite. **Journal of endodontics**, v. 26, n. 6, p. 331-334, 2000.

SIQUEIRA JR, José F. Endodontic infections: concepts, paradigms, and perspectives. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology**, v. 94, n. 3, p. 281-293, 2002.

SIQUEIRA JR, José F.; RÔÇAS, Isabela N. Microbiology of apical periodontitis. **Essential Endodontology: Prevention and Treatment of Apical Periodontitis**, p. 91-142, 2019.

SIQUEIRA JR, J. F.; LOPES. Mechanisms of antimicrobial activity of calcium hydroxide: a critical review. **International endodontic journal**, v. 32, n. 5, p. 361-369, 1999.

SJÖGREN, Ulf; SUNDQVIST, Göran. Bacteriologic evaluation of ultrasonic root canal instrumentation. **Oral surgery, oral medicine, oral pathology**, v. 63, n. 3, p. 366-370, 1987.

STOODLEY, Paul et al. Biofilms as complex differentiated communities. **Annual Reviews in Microbiology**, v. 56, n. 1, p. 187-209, 2002.

SOUZA, Matheus Albino et al. Oral bacterial decontamination using an innovative prototype for photocatalytic disinfection. **Clinical Oral Investigations**, p. 1-6, 2021.

SUNDQVIST, Göran. **Bacteriological studies of necrotic dental pulps**. 1976. Tese de Doutorado. Umeå University.

SUNDQVIST, Göron; JOHANSSON, Eva; SJÖGREN, Ulf. Prevalence of black-pigmented bacteroides species in root canal infections. **Journal of endodontics**, v. 15, n. 1, p. 13-19, 1989.

SUNDQVIST, Göran et al. Microbiologic analysis of teeth with failed endodontic treatment and the outcome of conservative re-treatment. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology**, v. 85, n. 1, p. 86-93, 1998.

TANOMARU FILHO, M. et al. Inflammatory response to different endodontic irrigating solutions. **International endodontic journal**, v. 35, n. 9, p. 735-739, 2002.

TAKAHASHL, N. et al. Acid tolerance and acid-neutralizing activity of Porphyromonas gingivalis, Prevotella intermedia and Fusobacterium nucleatum. **Oral microbiology and immunology**, v. 12, n. 6, p. 323-328, 1997.

TAYLOR, Herbert D.; AUSTIN, J. Harold. The solvent action of antiseptics on necrotic tissue. **The journal of experimental medicine**, v. 27, n. 1, p. 155, 1918.

TRONSTAD, Leif; SUNDE, Pia Titterud. The evolving new understanding of endodontic infections. **Endodontic Topics**, v. 6, n. 1, p. 57-77, 2003.

USHA, H. L. Biofilm in endodontics: New understanding to an old problem. **International Journal of Contemporary Dentistry**, v. 1, n. 3, 2010.

VALERA, Marcia Carneiro et al. Antimicrobial activity of sodium hypochlorite associated with intracanal medication for Candida albicans and Enterococcus faecalis inoculated in root canals. **Journal of Applied Oral Science**, v. 17, p. 555-559, 2009.

VIANNA, Morgana Eli et al. In vitro evaluation of the antimicrobial activity of chlorhexidine and sodium hypochlorite. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology**, v. 97, n. 1, p. 79-84, 2004.

WAGNER, Márcia Helena et al. Final irrigation protocols may affect intraradicular dentin ultrastructure. **Clinical oral investigations**, v. 21, n. 7, p. 2173-2182, 2017.

WINGENDER, Jost; NEU, Thomas R.; FLEMMING, Hans-Curt. What are bacterial extracellular polymeric substances?. In: **Microbial extracellular polymeric substances**. Springer, Berlin, Heidelberg, 1999. p. 1-19.

YESILSOY, Cemil et al. Antimicrobial and toxic effects of established and potential root canal irrigants. **Journal of endodontics**, v. 21, n. 10, p. 513-515, 1995.

7.0 ANEXOS

Anexo I:

UFRGS

Projetos

Bolsas

Programa de Fomento à Pesquisa(auxílio)

Sistema Pesquisa - Pesquisador: Jordana Da Silva Koch

Retornar

Dados Gerais:

Projeto Nº:	34070	**Título:**	UTILIDADE DA UTILIZACAO DE TECNICAS DE HIBRIDIZACAO IN SITU COMPARADAS AS TECNICAS MICROSCOPICAS TRADICIONAIS PARA O ESTUDO DA MICROBIOTA INTRA-RADICULAR DE DENTES COM PERIODONTITE APICAL
Área de conhecimento:	Odontologia	**Início:**	02/01/2018 **Previsão de conclusão:** 31/12/2022
Situação:	Projeto em Andamento		
Origem:	Instituto de Ciências Básicas da Saúde Departamento de Ciências Morfológicas		**Projeto Isolado**
Local de Realização:	não informado		

Não apresenta relação com Patrimônio Genético ou Conhecimento Tradicional Associado.

Objetivo:

É objetivo de o presente projeto avaliar a técnica de hibridização in situ comparada às técnicas microscópicas convencionais, de avaliação do biofilme, para estudar a infecção endodôntica em dentes com periodontite apical associada.

UFRGS

Projetos

Bolsas

Programa de Fomento à Pesquisa(auxílio)

Palavras Chave:

MICROSCOPIA, PERIODONTITE APICAL

Equipe UFRGS:

Nome: JOSE ANTONIO POLI DE FIGUEIREDO
Coordenador - Início: 02/01/2018 Previsão de término: 31/12/2022

Nome: THAIS MARCHAND RIBEIRO
Técnico: Assistente de Pesquisa - Início: 02/01/2018 Previsão de término: 31/12/2022

Nome: Marieli Chitolina Pradebon
Ensino: mestrado - Início: 19/03/2019 Término: 30/04/2021

Nome: Jordana da Silva Koch
Ensino: mestrado - Início: 04/03/2020 Previsão de término: 31/12/2022

Nome: KELLYN ROCCA SOUZA
Ensino: mestrado - Início: 22/03/2022 Previsão de término: 31/12/2022

Avaliações:

Comissão de Pesquisa de Ciências Básicas da Saúde - Aprovado em 22/11/2017 Clique aqui para visualizar o parecer

Anexos:

Projeto Completo **Data de Envio:** 08/11/2017

Bolsas:

Projeto associado à bolsa PIBIC CNPq-UFRGS **No Período:** 01/08/2019 **a** 31/08/2020
Bolsista: THAIS MARCHAND RIBEIRO **no período de** 01/08/2019 **a** 31/08/2020

Solicitação de Bolsa:

Projeto associado à solicitação de bolsa na situação aprovada quanto ao mérito **no processo** IC2019