

UNIVERSIDADE DE RIBEIRÃO PRETO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

MARIANA GUERRERA DE ALMEIDA

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE DICLOROISOCIANURATO  
DE SÓDIO E MONOPERSULFATO DE POTÁSSIO COMPOSTO PARA UTILIZAÇÃO  
COMO SOLUÇÕES IRRIGANTES EM ENDODONTIA

RIBEIRÃO PRETO  
2020

Mariana Guerrero de Almeida

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE DICLOROISOCIANURATO  
DE SÓDIO E MONOPERSULFATO DE POTÁSSIO COMPOSTO PARA UTILIZAÇÃO  
COMO SOLUÇÕES IRRIGANTES EM ENDODONTIA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em  
Odontologia da Universidade de Ribeirão Preto, como parte dos  
requisitos para obtenção do Título de Mestre em Odontologia, área de  
concentração Endodontia.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Eduardo Saraiva Miranda

Ribeirão Preto  
2020

Ficha catalográfica preparada pelo Centro de Processamento Técnico  
da Biblioteca Central da UNAERP

- Universidade de Ribeirão Preto -

Almeida, Mariana Guerrero de, 1994.  
A444a Avaliação da atividade antimicrobiana do dicloroisocianurato de sódio e monopersulfato de potássio composto para utilização como soluções irrigantes em Endodontia / Mariana Guerrero de Almeida.  
- - Ribeirão Preto, 2020.  
67 f.: il. color.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Eduardo Saraiva.

Dissertação (mestrado) – Universidade de Ribeirão Preto,  
UNAERP, Odontologia, área de concentração: Endodontia.  
Ribeirão Preto, 2020.

1. *E. faecalis*. 2. Atividade antimicrobiana. 3. Soluções irrigantes.  
I. Título.

Dedico este trabalho primeiramente a **Deus**, por estar sempre presente na minha vida, me amparando e capacitando a conquistar o meu propósito maior. Pela força em momentos em que não a tive, por toda coragem e luz. Devo a Ele, tudo o que sou. Sem Ele, nada disso seria possível.

A minha mãe, **Eliana Maria Guerrera de Almeida**, e ao meu irmão, **Guilherme Guerrera de Almeida**, que me incentivaram a alcançar meus objetivos e a nunca desistir dos meus sonhos. Obrigada por não medirem esforços para as minhas conquistas e pela força incondicional em todas as etapas da minha vida. Amo vocês!

Ao meu pai, **Paulo Garcia de Almeida**, minha fonte de inspiração, a quem dedico integralmente esse trabalho. Obrigada por acreditar em mim, muitas vezes, até mais que eu mesma, por todo ensinamento, incentivo e apoio, sem os quais eu não conseguiria chegar até aqui. Quero dizer que essa conquista é nossa! Amo você!

Ao meu noivo, **Rodrigo Papile Lunardelo da Silva**, meu grande companheiro, que se fez presente cuidando carinhosamente de nosso pequeno na minha ausência, sendo meu apoio e porto seguro. Obrigada por voar comigo neste sonho, me apoiando incondicionalmente nesse longo período. Amo você!

Ao meu filho, **Lorenzo de Almeida Lunardelo**, meu tudo, minha luz, meu motivo de querer evoluir sempre. Você chegou durante essa jornada e deu um motivo especial à minha existência. Assim que você nasceu, eu renasci. Sou completa e verdadeiramente apaixonada por você, meu anjo! Continuarei te amando por toda a eternidade.

## **AGRADECIMENTOS ESPECIAIS**

Ao meu orientador, **Prof. Dr. Carlos Eduardo Saraiva Miranda**, pela oportunidade de tê-lo como guia maior. Obrigada pela dedicação, paciência, palavras de sabedoria e por todos os ensinamentos transmitidos. Agradeço também por todo carinho, empatia e atenção que prestou a mim durante essa jornada. Seu profissionalismo vai muito além do que o dever impõe. Desejo que Deus continue abençoando grandemente a sua vida. Muitíssimo obrigada por tudo.

Ao **Prof. Dr. André Pitondo da Silva**, coordenador do Laboratório de Bacteriologia e Biologia Molecular da Universidade de Ribeirão Preto (UNAERP), pela parceria, prontidão, profissionalismo e disponibilidade em ceder o laboratório para execução da parte experimental. Muito obrigada por sua atenção em toda essa jornada.

## AGRADECIMENTOS

À Universidade de Ribeirão Preto, na pessoa da Magnífica Reitora, **Profa. Elmara Lúcia de Oliveira Bonini**, pela oportunidade e pelos conhecimentos adquiridos.

À Coordenadora do Curso de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade de Ribeirão Preto, **Profa. Dra. Yara Teresinha Corrêa Silva Sousa**, obrigada pelo empenho, dedicação e incentivo durante todos esses anos.

Ao corpo docente do curso do Programa de Pós-graduação da Universidade de Ribeirão Preto: **Prof. Dr. André Pitondo da Silva, Profa. Dra. Andrea Marcaccini, Prof. Dr. Carlos Eduardo Saraiva Miranda, Prof. Dr. Celso Bernardo de Sousa Filho, Profa. Dra. Danielle Cristine Furtado Messias, Prof. Dr. Edílson Carlos Caritá, Prof. Dr. Edson Alfredo, Profa. Dra. Érica Alves Gomes, Prof. Dr. Fuad Jacob Abi Rached Junior, Profa. Dra. Graziela Bianchi Leoni, Profa. Dra. Izabela Cristina Mauricio Moris, Dra. Larissa M. S. C. Raucci, Prof. Dr. Paulo Esteves Pinto Faria, Prof. Dr. Silvio Rocha Corrêa da Silva Prof. Dr. Walter Raucci Neto e a Profa. Dra. Yara T. Corrêa Silva Sousa**, pelos ensinamentos transmitidos.

Aos meus **amigos e familiares**. Vocês fazem parte da minha história e cada um contribuiu de uma forma especial nessa conquista. Amo cada um de vocês!

Aos meus colegas de Pós-Graduação, pela boa convivência que tivemos durante o curso, em especial, às minhas queridas amigas, **Elisabeth Helena Brazão e Letícia Cristina da Freiria Moretti**, que tornaram os meus dias mais felizes e que levarei para o resto da minha vida. Obrigada pelo companheirismo e verdadeira amizade!

Ao **Rafael da Silva Goulart**, mestre e colega de profissão, por todo o auxílio e suporte técnico nos experimentos, pela disponibilidade de seu precioso tempo, bem como por sua disposição para tanto.

Ao Laboratório de Bacteriologia e Biologia Molecular da Universidade de Ribeirão Preto (UNAERP), em especial à doutoranda **Mariana Oliveira**, por toda a colaboração

científica nos ensinamentos sobre microbiologia, pelo auxílio na execução prática do estudo e pela paciência e prontidão de sempre.

Ao aluno de iniciação científica, **Miguel Augusto de Moraes**, pela colaboração na parte experimental do trabalho.

Ao Laboratório Multiusuário de Microscopia Eletrônica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP-USP), em especial, ao técnico especialista **José Augusto Maulim**, pelo auxílio técnico na microscopia eletrônica de varredura.

Ao Laboratório de Microscopia Confocal a Laser da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FORP-USP), em especial, à especialista de laboratório **Bete Rosa**, pelo auxílio técnico na avaliação morfológica de superfície durante a utilização do microscópio confocal a laser.

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)**, pela concessão da bolsa de mestrado para o desenvolvimento deste projeto (número do processo: 88882.366451/2019-01).

“Os sonhos não determinam o lugar em que você vai estar, mas produzem a força necessária para tirá-lo do lugar em que está.”

(Augusto Cury)



## RESUMO

Durante o tratamento endodôntico, é fundamental que haja a realização de um preparo químico-mecânico, com protocolos de instrumentação e irrigação adequados, para diminuição bacteriana. Neste estudo foi avaliada a atividade antimicrobiana das soluções de hipoclorito de sódio (HS), dicloroisocianurato de sódio (DS), monopersulfato de potássio composto (MPC) e da associação dos dois últimos compostos (DS + MPC), em biofilmes maduros de *E. faecalis* no sistema de canais radiculares (SCR) de dentes bovinos. Foram realizados testes quantitativos (avaliação da concentração inibitória mínima - CIM; concentração bactericida mínima - CBM; contagem de unidades formadoras de colônia - UFC) e testes qualitativos (microscopia eletrônica de varredura- MEV e microscopia confocal de fluorescência), tanto em células planctônicas como em biofilme. Foram instrumentadas 50 raízes unirradiculares com o Sistema Protaper Universal até a lima F5 com irrigação com NaOCl 2,5% a cada troca. As amostras foram divididas em cinco grupos: solução de tampão fosfato salina (PBS), HS 2,5%, DS 2%, MPC 1%, e DS 1% + MPC 0,5%. Os valores de CIM (%) para os grupos HS, DS, MPC e DS + MPC foram, respectivamente, 0,039; 0,078; 0,039 e 0,039:0,002. Os valores de CBM (%) para os grupos HS, DS, MPC e DS + MPC foram, respectivamente, 0,3125; 0,25; 0,0625 e 0,0625:0,03125. O SCR dos corpos de provas foi inoculado com *E. faecalis* (escala 1 de McFarland) por 21 dias, com renovação do inóculo a cada 24 h. Finalizado esse processo, foi verificada a ação antimicrobiana das soluções. Foi feita a análise estatística do número de UFC empregando-se ANOVA, Brown-Forsythe ( $p=0,0015$ ) e, para comparação dois a dois, Holm-Sidak. Este revelou que os grupos HS ( $1.906.000\pm 1.235.913$ ), DS ( $1.165.750\pm 1.288.624$ ), MPC ( $148.000\pm 40.988$ ) e DS + MPC ( $42.000\pm 22.539$ ) eram estatisticamente semelhantes entre si ( $p > 0,05$ ) e diferentes do PBS ( $18.260.000\pm 4.420.443$ ). Os valores percentuais médios de redução da quantidade de UFC (%) para os grupos HS, DS, MPC e DS + MPC foram respectivamente de 89,56, 93,62, 99,19 e 99,76, quando comparados ao grupo PBS. O grupo DS + MPC apresentou uma redução de 10,20% em termos de quantidade de UFC quando comparado ao grupo HS. Nas imagens obtidas por MEV, nos três terços, identificaram-se superfícies desgastadas em todos os grupos, exceto no grupo MPC, e material depositado nas superfícies dos corpos de provas de todos os grupos, especialmente, do grupo HS. Nos demais grupos, houve prevalência de micro-organismos nos terços cervical e médio, exceto para o grupo MPC. Como esperado, no terço apical, foi observada inclusive a presença de biofilme no grupo PBS, bactérias planctônicas no grupo HS, e remanescentes camada de *smear* nos demais. A microscopia confocal de fluorescência revelou a prevalência de células inviáveis em todos os grupos exceto no grupo PBS, enquanto que, no grupo HS, não se observou a presença de células viáveis ou inviáveis. Apesar de nenhuma das soluções ter eliminado completamente o biofilme de *E. faecalis*, as análises qualitativas demonstraram o sinergismo e menor potencial de corrosão do grupo DS + MPC, quando comparado ao grupo HS, o que é bastante promissor.

**Palavras-chave:** *E. faecalis*. Atividade antimicrobiana. Soluções irrigantes.

## ABSTRACT

During endodontic treatment, it is essential to have a chemical-mechanical preparation, with appropriate instrumentation and irrigation protocols, for bacterial reduction. In this study, the antimicrobial activity of the solutions of sodium hypochlorite (SH), sodium dichloroisocyanurate (SD), compound potassium monopersulfate (CPM) and the association of the last two compounds (SD + CPM) in mature *E. faecalis* biofilms was evaluated in the root canal system (RCS) of bovine teeth. Quantitative tests were carried out (evaluation of the minimum inhibitory concentration - MIC; minimum bactericidal concentration - CBM; colony-forming units count - UFC) and qualitative tests (scanning electron microscopy - SEM and confocal fluorescence microscopy), both in planktonic cells and in biofilm. Fifty single-rooted roots were instrumented with the Universal Protaper System up to the F5 file with irrigation with 2.5% NaOCl at each change. The samples were divided into five groups: phosphate buffered saline solution (PBS), SH 2.5%, SD 2%, CPM 1%, and SD 1% + CPM 0.5%. The MIC values (%) for the SH, SD, CPM and SD + CPM groups were, respectively, 0.039; 0.078; 0.039 and 0.039: 0.002. The CBM values (%) for the SH, SD, CPM and SD + CPM groups were, respectively, 0.3125; 0.25; 0.0625 and 0.0625: 0.03125. The SCR of the specimens was inoculated with *E. faecalis* (McFarland scale 1) for 21 days, with inoculum renewal every 24 h. After this process was completed, the antimicrobial action of the solutions was verified. Statistical analysis of the number of UFC was performed using ANOVA, Brown-Forsythe ( $p = 0.0015$ ) and, for comparison two by two, Holm-Sidak. This revealed that the SH ( $1,906,000 \pm 1,235,913$ ), SD ( $1,165,750 \pm 1,288,624$ ), CPM ( $148,000 \pm 40,988$ ) and SD + CPM ( $42,000 \pm 22,539$ ) groups were statistically similar to each other ( $p > 0.05$ ) and different from the PBS ( $18,260,000 \pm 4,420,443$ ). The mean percentage values of reduction in the amount of CFU (%) for the SH, SD, CPM and SD + CPM groups were 89.56, 93.62, 99.19 and 99.76, respectively, when compared to the PBS group. The SD + CPM group showed a reduction of 10.20% in terms of quantity of CFU when compared to the SH group. In the images obtained by SEM, in the three thirds, worn surfaces were identified in all groups, except in the CPM group, and material deposited on the surfaces of the specimens of all groups, especially in the SH group. In the other groups, there was a prevalence of microorganisms in the cervical and middle thirds, except for the CPM group. As expected, in the apical third, the presence of biofilm was also observed in the PBS group, planktonic bacteria in the SH group, and the remaining smear layer in the others. Confocal fluorescence microscopy revealed the prevalence of non-viable cells in all groups except the PBS group, while in the SH group, the presence of viable or non-viable cells was not observed. Although none of the solutions completely eliminated the biofilm of *E. faecalis*, qualitative analyzes demonstrated the synergism and less potential for corrosion of the SD + CPM group, when compared to the SH group, which is very promising.

**Keywords:** *E. faecalis*. Antimicrobial activity. Irrigating solutions.

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	12
<b>2 PROPOSIÇÃO</b> .....	17
2.1 OBJETIVO GERAL .....	17
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	17
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	18
3.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	18
3.2 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA EM CÉLULAS PLANCTÔNICAS .....	19
3.2.1 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM).....	19
3.2.2 Determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM).....	21
3.3 SELEÇÃO E PREPARO DAS AMOSTRAS .....	22
3.4 PREPARO BIOMECÂNICO DOS ESPÉCIMES.....	242
3.5 PREPARO DOS CORPOS DE PROVA .....	244
3.6 LINHAGEM BACTERIANA .....	254
3.7 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA EM BIOFILME- UFC.....	25
3.7.1 Inserção do inóculo bacteriano nos canais radiculares para formação do biofilme.....	26
5	
3.7.2 Inserção das soluções irrigantes nos canais radiculares recobertos pelos biofilmes.....	27
6	
3.7.3 Coleta os biofilmes.....	287
3.7.4 Análise microbiológica-UFC.....	28
3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	300
3.9 ANÁLISE POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV) .....	32
3.10 ANÁLISE POR MICROSCOPIA CONFOCAL DE FLUORESCÊNCIA .....	32
<b>4 RESULTADOS</b> .....	33
4.1 DETERMINAÇÃO DE CIM E CBM.....	33
4.2 AVALIAÇÃO ESTATÍSTICA .....	353
4.3 AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA- UFC .....	34
4.4 ANÁLISE POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA .....	35
4.5 ANÁLISE POR MICROSCOPIA CONFOCAL DE FLUORESCÊNCIA .....	41
<b>5 DISCUSSÃO</b> .....	42
<b>6 CONCLUSÃO</b> .....	52
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	53

## 1 INTRODUÇÃO

A presença de micro-organismos e de seus subprodutos no sistema de canais radiculares (SCR) está diretamente relacionada às infecções endodônticas, portanto, é de suma importância que esses sejam eliminados durante as etapas clínico-operatórias (STABHOLZ et al., 2003). Com isso, o procedimento de limpeza, sanificação e modelagem do SCR tem um papel fundamental no êxito do tratamento endodôntico (CALLAHAN, 1895; MOHAMMADI; JAFARZADEH; SHALAVI, 2017). Desse modo, durante a terapia endodôntica, inicialmente, é realizado o preparo químico-mecânico, o qual envolve a modelagem do SCR (*cleaning and sheaping*), com protocolos de instrumentação e irrigação (SOUZA; SOUZA; MORAES, 2005), cuja finalidade é restabelecer a saúde dos tecidos periapicais. Durante o procedimento, na etapa mecânica, são utilizados os instrumentos endodônticos com ação de corte na dentina, enquanto que, na etapa envolvendo a ação química, são empregadas as soluções irrigantes com ação antimicrobiana e solvente (SJÖGREN et al., 1997; NAIR et al., 2005; ÖTER et al., 2018). A ação física, causada pelo movimento hidráulico de irrigação-aspiração possibilita o arraste dos detritos provenientes dos procedimentos prévios (SIQUEIRA JR.; LOPES, 2004). Essas etapas são auxiliares, uma vez que o preparo mecânico é complementado pela irrigação do SCR com o uso de soluções químicas específicas (LOPES; SIQUEIRA-JR, 2010).

O preparo mecânico do SCR compreende a utilização de técnicas de instrumentação manuais e mecanizadas. Sua principal função é a modelagem do canal, removendo a dentina infectada e possibilitando aos irrigantes alcançar áreas de difícil acesso do SCR, de modo a preservar, ao máximo, a integridade da estrutura dental (PAQUÉ; GANAHL; PETERS, 2009).

A utilização das soluções irrigantes, após o preparo mecânico, deve promover a limpeza do canal radicular, reduzindo a carga microbiana. A irrigação é, portanto, uma etapa fundamental para garantir o êxito do procedimento, já que é responsável por ações químicas e biológicas importantes que proporcionam a lubrificação e limpeza da superfície interna do canal radicular (SCELZA et al., 2012). Pesquisadores, como Yang et al. (2011), revelaram, em seus trabalhos, que há superfícies não tocadas pelos instrumentos durante o preparo biomecânico, enfatizando a importância da correta escolha de uma solução irrigante capaz de auxiliar de forma eficiente no processo de sanitização. Durante o procedimento de instrumentação, o papel das soluções irrigantes é o de auxiliar na lubrificação do instrumental e de reduzir a quantidade de bactérias, detritos e da camada de *smear*, principalmente, em

áreas que não são alcançadas pelos instrumentos endodônticos (HAAPASALO et al., 2005). Para isso, as soluções irrigantes devem possuir um amplo espectro de ação antimicrobiana e elevada eficácia contra micro-organismos, anaeróbicos e anaeróbicos facultativos, organizados em biofilmes, além de permitir a dissolução dos materiais remanescentes de tecido pulpar necrótico, a inativação de endotoxinas e a remoção da camada de *smear* após a instrumentação (ZEHNDER, 2006). Essas soluções devem apresentar propriedades como baixa citotoxicidade e biocompatibilidade, já que têm contato direto com os tecidos perirradiculares (SCELZA et al., 2012). Com isso, na literatura científica, os estudos visam melhorar a eficácia das soluções irrigantes e de seus sistemas de entrega para alcançarem as áreas de difícil acesso do canal radicular (GULABIVALA et al., 2005; ZEHNDER, 2006; BRITO et al., 2009; GU et al., 2010; OLIVEIRA et al., 2014).

Uma gama de soluções irrigantes, para uso durante o preparo mecânico do SCR, é proposta na literatura para sanificação do SCR, sendo que, nas etapas clínicas do tratamento endodôntico, as mais utilizadas são: compostos halogenados, tensoativos, clorexidina, quelantes, peróxidos, associações e outros (PÉCORA; SOUZA NETO; ESTRELA, 1999). Dentre os compostos halogenados, o mais utilizado é o hipoclorito de sódio (NaOCl), cuja reação em meio aquoso, forma ácido hipocloroso e hidróxido de sódio (ESTRELA et al., 2002b). Essa solução tem a capacidade de dissolver o tecido necrótico e os componentes orgânicos da camada de *smear*. A larga utilização dessa solução irrigante se deve às suas propriedades antimicrobianas, à capacidade de dissolução da matéria orgânica e de remoção de biofilmes sem produzir resíduos tóxicos, ao baixo custo e à ação rápida, como demonstrado nos estudos de Silva; Monteiro; Belladonna (2015) e Rôças et al. (2016). A ação desse composto é vinculada ao pH elevado de suas soluções, bem como à sua concentração. Quando em contato com a membrana citoplasmática de micro-organismos, o hipoclorito de sódio promove uma inibição enzimática irreversível, alterações biossintéticas e, no metabolismo celular, a destruição de fosfolipídios devido à peroxidação lipídica (ESTRELA et al., 1998; ESTRELA et al., 2001) decorrente de seu alto poder oxidante. A reação de cloroaminação, envolvendo o cloro e o grupo amina dos aminoácidos, garante a formação de cloroaminas, que interferem no metabolismo celular (ESTRELA et al., 2002a).

O hipoclorito de sódio é uma das soluções irrigantes mais utilizadas e, embora tenha demonstrado maior capacidade de desorganização do biofilme de *Enterococcus faecalis* em comparação a outras soluções irrigantes (CASE et al., 2012), apresenta toxicidade. Esse composto é altamente citotóxico para fibroblastos, células-tronco do ligamento periodontal, células-tronco da papila apical e outras células (MARTIN; SPRING, 1975; WENBERG,

1980; CHANG et al., 2001; HELING et al., 2001; RING; MURRAY; NAMEROW, 2008; BRYCE et al., 2009; TREVINO; PATWARDHAND; HENRY, 2011). Em função disso, é desejável a avaliação de outras soluções irrigantes auxiliares que apresentem propriedades semelhantes às daquelas do hipoclorito de sódio, mas como menor ação citotóxica.

Dentre as soluções irrigantes auxiliares alternativas e comercialmente disponíveis, que poderiam ser utilizadas nos protocolos de limpeza do SCR, encontram-se o dicloroisocianurato de sódio ( $C_3Cl_2N_3NaO_3$ ) e o monopersulfato de potássio composto ( $K_2SO_4.KHSO_4.2KHSO_5$ ).

O dicloroisocianurato de sódio é, geralmente, utilizado em procedimentos de sanificação de superfícies. Assim como o hipoclorito de sódio, esse composto também contém o cloro como princípio ativo, entretanto, libera mais lentamente o cloro ativo quando dissolvido (HELING et al, 2001). Desse modo, as duas soluções podem apresentar atividade antimicrobiana semelhante. Segundo Bolla et al. (2013), é sugerida a utilização de dicloroisocianurato de sódio em endodontia, como agente antisséptico, devido à sua atividade antimicrobiana, salientando-se que deve ser empregado em baixas concentrações. Na literatura atual, há poucos artigos que avaliam a ação desse composto como solução irrigante alternativa (HELING et al., 2001; Bolla et al., 2013).

Já o monopersulfato de potássio composto é um agente desinfetante hospitalar de largo espectro, cujo mecanismo de ação está diretamente relacionado à oxidação das ligações de enxofre das proteínas e enzimas do micro-organismo, gerando ruptura da membrana e parede celular (MOSLEHIFARD et al., 2015). Esse composto apresenta um alto nível de sanificação de superfícies contaminadas por vírus transmitidos pelo sangue, como hepatite, HIV, Norovírus, Coronavírus, bactérias Gram-negativas e Gram-positivas: *Escherichia coli* e estafilococos – cepas MRSA (*Staphylococcus aureus* resistente à meticilina), além de fungos (FERREIRA, 2012) e tem sido usado com eficiência na sanificação de brocas e escovas de dente (MOSLEHIFARD et al., 2015). A ação desse composto, o qual faz parte da composição de alguns produtos comerciais (MOSLEHIFARD et al., 2015), se baseia na liberação de oxigênio (GHANBARI; MORADI, 2017), garantindo-lhe um alto poder oxidante. Nas bases de dados reconhecidas, não há artigos que relatam o emprego de monopersulfato de potássio composto como solução irrigante, instigando o estudo para avaliação de sua atividade antimicrobiana.

Micro-organismos persistentes e provenientes da cavidade oral podem levar à recontaminação do SCR e dar origem a uma associação microbiana caracterizada por células que estão ligadas a um substrato, formado por uma matriz polimérica extracelular que

apresenta fenótipos alterados de crescimento, denominada biofilme (DONLAN, 2002; NAIR et al., 2005). Apesar desse tipo de infecção ser de natureza polimicrobiana, *E. faecalis* está entre as espécies bacterianas mais frequentemente isoladas, sendo um dos principais patógenos nosocomiais, responsável por originar diversas infecções em humanos (JETT; HUYCKE; GILMORE, 1994; RICHARDS et al., 2000). Esse micro-organismo também é responsável pela etiologia de periodontite apical persistente (EVANS et al., 2002; SUNDE et al., 2002; RÔÇAS; SIQUEIRA JR.; SANTOS, 2004; JOHNSON; FLANNAGAN; SEDGLEY, 2006; STUART et al., 2006; ARIAS-MOLIZ et al., 2009). *E. faecalis* é uma bactéria anaeróbia facultativa, Gram-positiva, sendo capaz de resistir a medicações intracanal, tornando-se, eventualmente, o único micro-organismo sobrevivente no interior do SCR (SJÖGREN, 1997; PORTENIER; WALTIMO; HAAPASALO, 2003). Dentre essas medicações intracanal, se destaca o hidróxido de cálcio, rotineiramente utilizado na prática odontológica (KAWASHIMA et al., 2009). Apesar desse composto promover ação antimicrobiana frente a micro-organismos responsáveis por infecções endodônticas primárias, sua ação sobre o *E. faecalis* é restrita em função de mecanismos intrínsecos da bactéria, como a bomba de prótons (SATHORN; PARASHOS; MESSER, 2007).

A complexidade do SCR é um fator limitante quanto à eficiência do processo de limpeza, pois dificulta a remoção dos materiais teciduais e bacterianos remanescentes, localizados em istmos, reentrâncias, ramificações, curvaturas e achatamentos (LEONI et al., 2014; VERSIANI et al., 2016; LEONI et al., 2017, SOUSA-NETO et al., 2018), o que compromete o processo de sanificação. A diversidade da anatomia interna é relativamente grande quanto ao número, forma, direção e comprimento dos canais radiculares, e também quanto à presença de ramificações apicais (GU et al., 2010; VERSIANI; PECORA; SOUSA-NETO, 2013; LEONI et al., 2014). Tal diversidade contribui, portanto, para a formação do biofilme bacteriano (SUNDQVIST et al., 1998; NAIR et al., 2005; ESTRELA et al., 2014). A avaliação da efetividade das substâncias químicas, utilizadas como agentes antimicrobianos durante a terapia endodôntica, é comprometida pela associação da complexidade anatômica do SCR com a capacidade de *E. faecalis* de resistir à ação de diferentes compostos. Isso se deve à sua capacidade de penetrar os túbulos dentinários (KAUFMAN et al., 2005; BERBER et al., 2006; GOMES et al., 2006), aderindo-se fortemente às paredes de dentina (SEDGLEY, 2005) e de se organizar em biofilme (LOVE, 2001), de modo a suportar condições severas com grande variações de pH, temperatura e tensão de O<sub>2</sub> (GOMES et al., 2008; BAIK et al., 2011; LEE; BAEK, 2012). Portanto, a essa bactéria, é atribuída à persistência das infecções

endodônticas e periapicais pela formação de biofilmes, assim como pela adesão e invasão de tecidos moles.

As soluções irrigantes nem sempre conseguem alcançar as regiões não tocadas pelos instrumentos endodônticos (SOUZA et al., 2010; DORNELLES-MORGENTAL et al., 2011; GIARDINO et al., 2014) ou têm a capacidade de penetração nos túbulos dentinários (VALERA et al., 2009; PLADISAI; AMPORNARAMVETH; CHIVATXARANUKUL, 2016). No entanto, é apreciável a contribuição das soluções irrigantes não somente para a diminuição da quantidade de micro-organismos, como também para a remoção do biofilme bacteriano formado em superfícies não instrumentadas (HAAPASALO et al., 2007). Considerando-se a alta citotoxicidade do hipoclorito de sódio, é interessante, portanto, a investigação de soluções irrigantes alternativas. Nesse sentido, em função de suas características e propriedades, foi proposto o estudo do dicloroisocianurato de sódio e monopersulfato de potássio composto como soluções irrigantes, para utilização em endodontia.



## 2 PROPOSIÇÃO

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a atividade antimicrobiana das soluções de hipoclorito de sódio 2,5% (m/m), como controle positivo, e de dicloroisocianurato de sódio 2% (m/v), monopersulfato de potássio composto 1% (m/v) e da associação de dicloroisocianurato de sódio 1% (m/v) e monopersulfato de potássio composto 0,5% (m/v), como soluções irrigantes alternativas, contra o biofilme de *E. faecalis* no sistema de canais radiculares de dentes bovinos.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Determinar a concentração inibitória mínima (CIM) e a concentração bactericida mínima (CBM) das soluções irrigantes investigadas.

Avaliar a atividade antimicrobiana empregando-se as soluções irrigantes investigadas contra o biofilme de *E. faecalis* aderido nas paredes do conduto radicular de dentes bovinos por meio da contagem de unidades formadoras de colônia (UFC).

Estabelecer, por meio de análise estatística, se existe ou não similaridade estatisticamente significativa considerando-se a contagem de UFC de *E. faecalis* entre os grupos avaliados.

Determinar o percentual de redução do número de UFC de *E. faecalis* no interior do conduto radicular considerando-se a ação das diferentes soluções irrigantes investigadas, por comparação com o grupo do tampão fosfato (PBS), controle negativo, e do hipoclorito de sódio (NaOCl), controle positivo.

Verificar a adesão de micro-organismos e alterações morfológicas ocorridas na superfície da dentina intrarradicular devido à ação das soluções irrigantes por microscopia eletrônica de varredura (MEV).

Analisar, qualitativamente, a viabilidade celular em função da ação das soluções irrigantes investigadas sobre os biofilmes de *E. faecalis* empregando-se um kit colorimétrico *live and dead* por microscopia confocal de fluorescência.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Para a realização do estudo, foram estabelecidos em cinco grupos experimentais com as seguintes soluções irrigantes: solução salina tamponada de fosfato (PBS), controle negativo; hipoclorito de sódio a 2,5% m/m (Bioflora, Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil), controle positivo; solução de dicloroisocianurato de sódio a 2% m/v (Hidrodomi, Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil); solução de monopersulfato de potássio composto a 1% m/v (Hidrodomi, Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil) e a associação de dicloroisocianurato de sódio a 1% e monopersulfato de potássio composto a 0,5% m/v (Tabela I).

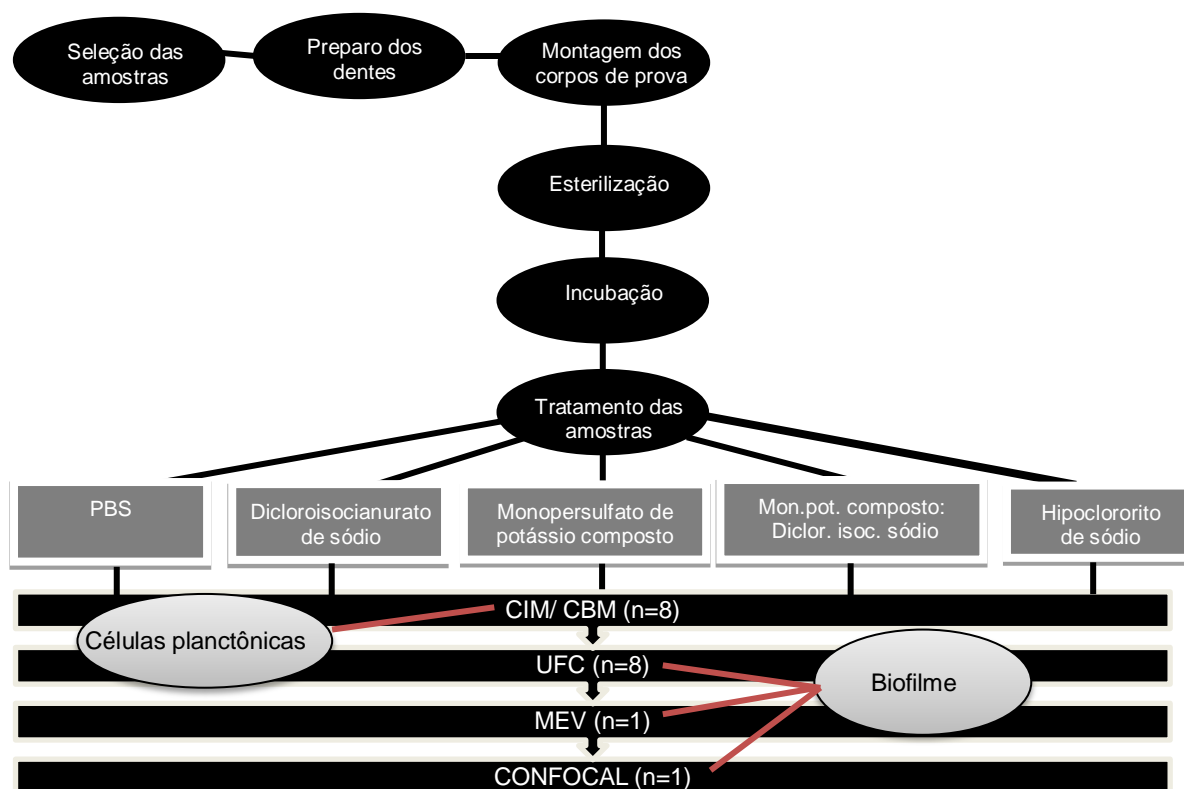
Tabela I - Grupos experimentais.

Grupos	Soluções irrigantes
1	Solução salina (PBS)
2	Dicloroisocianurato de sódio 2% ( $C_3Cl_2N_3NaO_3$ )
3	Monopersulfato de potássio composto 1% ( $K_2SO_4.KHSO_4.2KHSO_5$ )
4	Dicloroisocianurato de sódio 1% + Monopersulfato de potássio composto 0,5% ( $C_3Cl_2N_3NaO_3 + K_2SO_4.KHSO_4.2KHSO_5$ )
5	Hipoclorito de sódio a 2,5% (NaOCl)

Fonte: Autor.

Na Figura 1, é apresentado um diagrama esquemático com o procedimento experimental executado.

Figura 1 - Representação esquemática do delineamento experimental.



Fonte: Autor.

## 3.2 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA EM CÉLULAS PLANCTÔNICAS

### 3.2.1 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Para a determinação da CIM, foram utilizadas as seguintes concentrações iniciais do princípio ativo das soluções avaliadas: hipoclorito de sódio 1,25% (m/m), dicloroisocianurato de sódio 1% (m/v), monopersulfato de potássio composto 0,5% (m/v), e a associação dicloroisocianurato de sódio 0,5%: monopersulfato de potássio composto 0,25% (m/v). Nesse experimento, as concentrações dos agentes antimicrobianos caem à metade, pois é adicionado, ao poço, o meio de cultura que é metade do volume utilizado a fim de permitir a nutrição bacteriana.

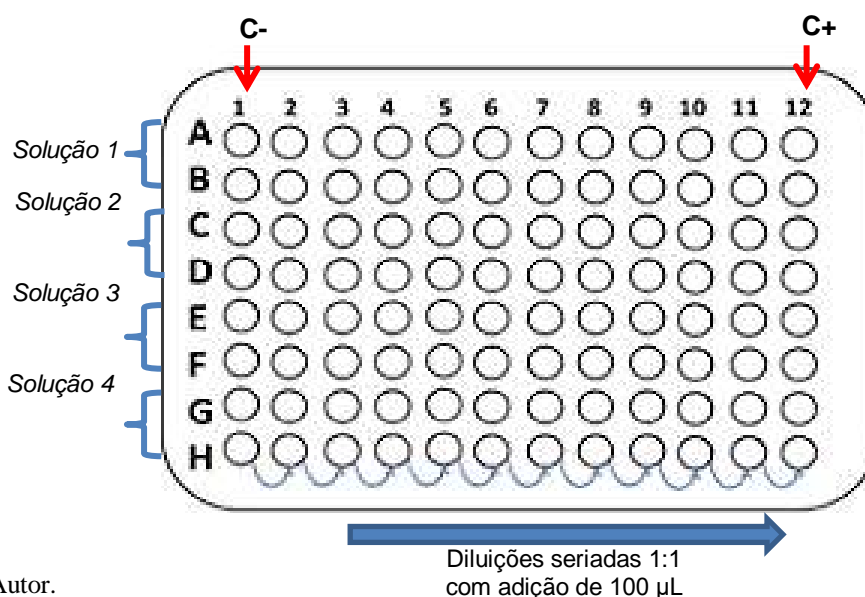
A determinação da CIM foi baseada no protocolo de atividade antimicrobiana utilizando-se o método de microdiluição em microplacas de 96 poços, conforme preconizado pelo “*Clinical and Laboratory Standards Institute*” (CLSI, 2016). No entanto, deve ser salientado que esse protocolo foi utilizado com a adaptação proposta por Pitondo-Silva et al.

(2016), com a inclusão da resazurina, empregada como indicador colorimétrico do crescimento bacteriano. Na placa de 96 poços de fundo chato, nos poços da primeira coluna, que serviram como controle negativo, foram adicionados 100 µL do meio de cultura Müeller-Hinton para verificar sua esterilidade. Nos poços da décima segunda coluna, que serviram como controle positivo, foram adicionados 90 µL do meio de cultura e 10 µL da suspensão bacteriana, totalizando um volume de 100 µL. Inicialmente, nos poços da segunda aos da décima primeira coluna da placa, foram acrescentados 100 µL de meio de cultura. Em seguida, nos poços da segunda coluna, foram adicionados 100 µL da solução avaliada e, após a homogeneização, foram tomados 100 µL que foram transferidos para os poços da coluna seguinte e, assim, sucessivamente. Por fim, os 100 µL tomados dos poços da décima primeira coluna foram descartados. Portanto, da segunda até a décima primeira coluna, foram feitas diluições seriadas 1:1 com as soluções avaliadas de forma que as suas concentrações iniciais foram reduzidas à metade com as transferências das soluções de uma coluna para a outra.

O inóculo foi obtido preparando-se suspensões bacterianas em solução salina esterilizada, a partir de culturas bacterianas recentes, visando obter uma turvação correspondente a 0,5 da escala de McFarland ( $1,5 \times 10^8$  UFC/mL). Dessa suspensão inicial, 500 µL foram pipetados e transferidos para um tubo de ensaio contendo 4,5 mL de solução salina também esterilizada de modo a alcançar  $1,7 \times 10^7$  UFC/mL.

A leitura das placas foi realizada após incubação por 18 h em estufa bacteriológica a 37°C. Realizaram-se, então, duas leituras qualitativas, uma sem revelação, observando-se apenas a turvação do caldo e, a outra, com revelação por resazurina (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA). Após realizada a primeira leitura, foram aplicados 30 µL do revelador resazurina (0,02% m/v) em todos os poços da placa. Após o acréscimo da resazurina, as placas foram reincubadas, nas mesmas condições, durante duas horas. Após a reincubação, as placas foram visualmente analisadas, verificando-se que alguns poços apresentavam a coloração azul, devido à reação redox envolvendo a resazurina, cuja forma oxidada é azul, indicando que não houve crescimento bacteriano. Em outros poços, observou-se a forma reduzida da resazurina, rosa ou roxo, indicando que ocorreu crescimento bacteriano, como pode ser observado na Figura 2. As leituras em triplicatas foram, então, comparadas, e a concentração inibitória mínima foi determinada considerando-se a concentração equivalente ao poço com a menor diluição onde não foi observado crescimento bacteriano.

Figura 2 - Placas de 96 poços para os testes de CIM. C +: controle positivo. C -: controle negativo.

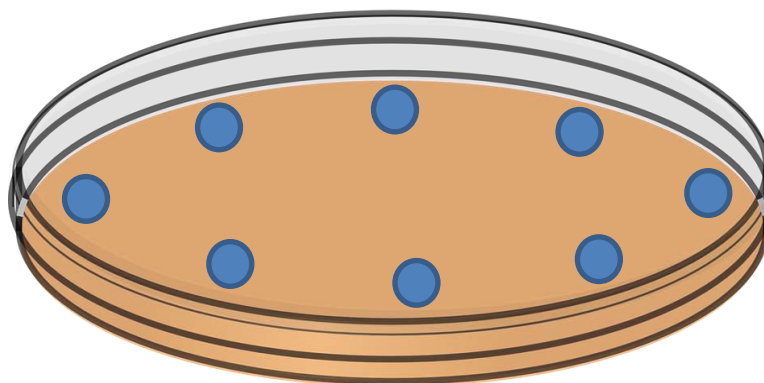


Fonte: Autor.

### 3.2.2 Determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM)

Para a determinação da CBM, foram levadas em consideração as leituras referentes aos valores de CIM obtidos para cada solução testada, frente à linhagem bacteriana em questão. Para isso, foram selecionados, para os testes de CBM, todos aqueles poços para os quais não houve crescimento bacteriano visível. Sendo assim, uma alíquota de 10 µL de cada poço selecionado foi transferida, com auxílio de uma micropipeta, para o meio de cultura Agar Müller Hinton (Kasvi, São José dos Pinhais, PR, Brasil), cujos locais de inoculação foram previamente demarcados nas placas de Petri, identificando a diluição do agente antimicrobiano testado para posterior determinação da CBM (Figura 3). As placas foram incubadas por 24 h a 37°C e, após esse período, foi feita uma avaliação visual para determinação da CBM, considerada como a menor concentração da solução para a qual não houve o crescimento bacteriano.

Figura 3 – Distribuição dos poços na placa de Petri para avaliação da CBM.



Fonte: Autor.

### 3.3 SELEÇÃO E PREPARO DAS AMOSTRAS

Inicialmente, um conjunto de 300 dentes incisivos bovinos foi conservado em solução de timol 0,1% (pH 7,0) (Sigma-Aldrich, Darmstádio, Hessen, Alemanha), a 9°C, durante 24 h e lavados com água corrente durante o mesmo período, para eliminação dos resíduos da solução. Dentre eles, foram selecionados 50 incisivos com canal único e reto, semelhantes em relação à forma, comprimento radicular, fechamento do forame apical, com dimensão vestibulo-lingual de 2 a 3 mm no terço cervical, avaliada por exame radiográfico digital, e livre de calcificações e de curvaturas acentuadas. Após isso, foram examinados, sob lupa estereoscópica com aumento de 10X, descartando-se aqueles com trincas, anomalias de estrutura e/ou fechamento incompleto do forame apical. Foram avaliados por imagens radiográficas, nos sentidos vestibulo-lingual e méso-distal, para manter a padronização das amostras.

### 3.4 PREPARO BIOMECÂNICO DOS ESPÉCIMES

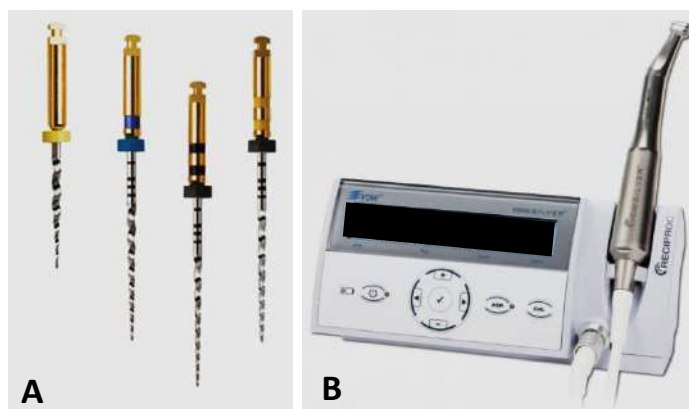
Todos os procedimentos do tratamento endodôntico foram realizados por um único operador experiente que foi calibrado para a técnica de instrumentação utilizada no presente estudo.

Os dentes selecionados foram seccionados perpendicularmente, 4 mm abaixo da junção amelocementária, com auxílio de disco de carborundum (KG Sorensen, Barueri, SP, Brasil), montado em peça reta e motor de baixa rotação (Beltec, Araraquara, SP, Brasil), de modo a padronizar o comprimento radicular em 15 mm.

Foi realizada a exploração do canal radicular com lima tipo K #15 (Dentsply-Sirona, Ballaigües, Vaud, Suíça), introduzida até a visualização do ápice radicular e o comprimento de trabalho (CT) foi determinado com o recuo de 1 mm aquém do ápice. Após isso, realizou-se o selamento na porção apical das raízes, com o objetivo de evitar o extravasamento da solução, com resina composta Z100 (3M, Maplewood, Minnesota, EUA). Inicialmente, foi feito o condicionamento com ácido fosfórico 37% (Dentsply, York, Pensilvânia, EUA) por 20 s a 3 mm em direção cervical, seguido de lavagem com água e secagem com jato de ar. Na etapa seguinte, foi realizada a aplicação do sistema adesivo Adper single bond (3M, Maplewood, Minnesota, EUA) com auxílio de microbrush, seguida de jato de ar e fotopolimerização por 40 s. A aplicação do adesivo foi repetida, seguida da inserção de resina composta e da fotopolimerização por 40 s.

O sistema rotatório utilizado para o preparo biomecânico foi o ProTaper Universal (Dentsply-Sirona, Petrópolis, Rio de Janeiro, Brasil), obedecendo-se à sequência: SX (torque de 300 g/cm e 350 rpm) no terço cervical; F3 (torque de 200 g/cm e 250 rpm), F4 (torque de 200 g/cm e 250 rpm) e F5 (torque de 200 g/cm e 250 rpm) (Figura 4 A) no comprimento de trabalho. Os instrumentos de NiTi foram adaptados a um contra ângulo de um motor elétrico (VDW Silver, GmbH, Munique, Baviera, Alemanha) (Figura 4 B) e introduzidos no canal com movimento de inserção/remoção, com amplitude controlada de aproximadamente 3 mm com leve pressão contra as paredes. O processo de irrigação e aspiração do canal radicular foi realizado a cada troca de instrumento com 2 mL de hipoclorito de sódio a 2,5% m/m (BioFlora, Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil) empregando-se uma seringa plástica descartável de 10 mL (BD, New Jersey, EUA) e agulha NaviTip (Ultradent, South Jordan, Utah, EUA), cânula de aspiração e limpeza do instrumento com gaze. A irrigação final foi realizada com a inundação do canal com 2 mL de EDTA a 17% m/v (Da Terra, Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil), por 5 min, seguida de 2 mL de hipoclorito de sódio a 2,5% m/m e 10 mL de água destilada.

Figura 4 - Instrumentos NiTi (A) e motor elétrico (B) utilizados no preparo biomecânico.



Fonte: Autor.

### 3.5 PREPARO DOS CORPOS DE PROVA

Inicialmente, foi feita uma fenda longitudinal em dez raízes selecionadas com 2 mm de profundidade de ambos os lados para facilitar a clivagem dos espécimes que, em uma etapa posterior, seriam analisados por microscopia eletrônica de varredura e microscopia confocal de fluorescência. Foram tomados, então, 50 tubos Eppendorf de 1,5 mL, devidamente posicionados em estantes, os quais foram preenchidos com 1 mL de resina acrílica incolor (pó/líquido), manipuladas de acordo com as orientações do fabricante, para garantir que os corpos de prova ficassem imobilizados no interior dos tubos. Em seguida, os 50 tubos de Eppendorf foram fechados e as estantes foram embaladas para a execução do procedimento de esterilização em uma autoclave (Phoenix Lufenco, Araraquara, SP, Brasil) durante 15 min a 121 °C. O teste com a fita de indicador químico de temperatura e o teste biológico com micro-organismo foram utilizados no controle de qualidade do procedimento de esterilização.

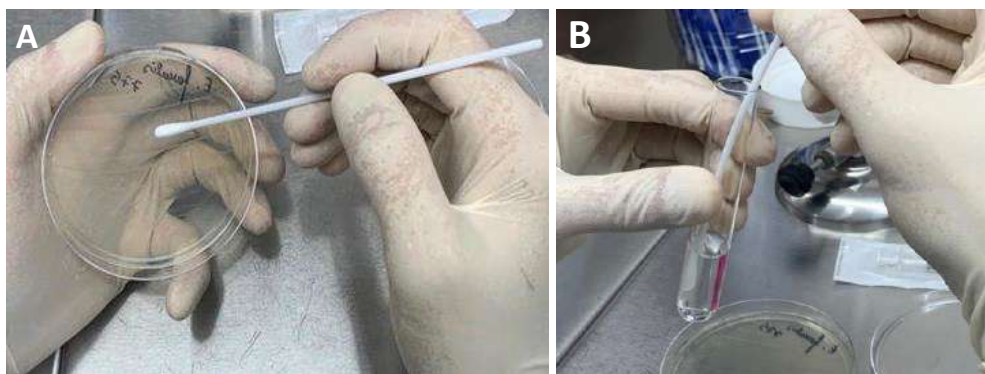
### 3.6 LINHAGEM BACTERIANA

Utilizou-se a linhagem de *E. faecalis* (NCTC 775) que foi devidamente ativada em placas de Petri contendo o meio de cultura Müller Hinton (Difco, Detroit, MI, EUA) e incubada em estufa a 37°C por 24 h para promover o crescimento das culturas bacterianas. Decorrido esse intervalo de tempo, com o auxílio de um *swab*, a cultura bacteriana foi coletada (Figura 5 A) e transferida para um tubo de ensaio contendo 2,5 mL de PBS, correspondente à escala 2 de McFarland. Em seguida, para se obter a concentração final de cerca de  $3 \times 10^8$  células/mL (equivalente à escala 1 de McFarland), foram acrescentados 2,5 mL de Brain Heart Infusion (BHI) aos 2,5 mL de PBS (Figura 5 B). Para promover a



viabilidade da cultura e garantir a formação do biofilme, esse processo foi realizado por 21 dias sequenciais.

Figura 5– A- Procedimento de ativação de *E. faecalis* em placa de Petri empregando-se o meio de cultura Müller Hinton. B- Procedimento de obtenção da turvação correspondente à escala 2 de McFarland.



Fonte: Autor.

### 3.7 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA EM BIOFILME- UFC

#### 3.7.1 Inserção do inóculo bacteriano nos canais radiculares para formação do biofilme

Os 50 canais radiculares de dentes incisivos bovinos selecionados foram inoculados com *E. faecalis* (NCTC 775) até o preenchimento do conduto radicular, conforme ilustrado na Figura 6. Foram tomados volumes, cuja média era de 30  $\mu$ L de suspensão bacteriana com concentração final de cerca de  $3 \times 10^8$  unidades formadoras de colônia por mL (UFC/mL), que foram inseridos nos canais radiculares utilizando-se uma seringa de insulina de 1 mL com ponta NaviTip devidamente esterilizada. O excesso de inóculo foi removido utilizando-se seringa de insulina e pontas Capillary tips 0,36 mm (Ultradent, Indaiatuba, São Paulo) esterilizadas. A cada 24 h, o conduto radicular era lavado e aspirado com 5 mL de PBS para a remoção de bactérias planctônicas e um novo inóculo era inserido no conduto até o preenchimento do mesmo. A adoção desse procedimento visava garantir a formação de um biofilme denso e maduro. Todas as amostras foram incubadas a 37°C por 21 dias em ambiente úmido, sob condições aeróbias.

Figura 6 - Aplicação do inóculo no interior do canal radicular, com o auxílio de uma seringa de insulina com ponta NaviTip.



Fonte: Autor.

### 3.7.2 Inserção das soluções irrigantes nos canais radiculares recobertos pelos biofilmes

Os canais radiculares foram completamente preenchidos com as soluções irrigantes correspondentes aos cinco grupos experimentais com o objetivo de expor os biofilmes às suas respectivas ações.

**Grupo PBS:** os canais foram preenchidos com PBS esterilizado que permaneceu em contato com os biofilmes por 5 min. Em seguida, foi realizado um enxágue com 5 mL de PBS esterilizado e os canais, novamente preenchidos com PBS esterilizado.

**Grupo  $C_3Cl_2N_3NaO_3$  2%:** os canais foram preenchidos com a solução que permaneceu em contato com os biofilmes por 5 min. Em seguida, foi realizado um enxágue com 5 mL de PBS esterilizado. Por fim, foi feito um novo enxágue com PBS esterilizado e o canal radicular, preenchido com PBS esterilizado.

**Grupo  $K_2SO_4.KHSO_4.2KHSO_5$  1%:** os canais foram preenchidos com a solução que permaneceu em contato com os biofilmes por 5 min. Em seguida, foi realizado um enxágue com 5 mL de PBS esterilizado. Por fim, foi feito um novo enxágue com PBS esterilizado e o canal radicular, preenchido com PBS esterilizado.

**Grupo  $C_3Cl_2N_3NaO_3$  1 % +  $K_2SO_4.KHSO_4.2KHSO_5$  0,5 %:** os canais foram preenchidos com a solução que permaneceu em contato com os biofilmes por 5 min. Em seguida, foi realizado um enxágue com 5 mL de PBS esterilizado. Por fim, foi feito um novo enxágue com PBS esterilizado e o canal radicular, preenchido com PBS esterilizado.

**Grupo NaOCl 2,5%:** os canais foram preenchidos com a solução que permaneceu em contato com os biofilmes por 5 min. Em seguida, foi realizado um enxágue com 5 mL de PBS esterilizado e utilização de tiosulfato de sódio ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ ) para inativar a ação do NaOCl. Por fim, foi feito um novo enxágue com PBS esterilizado e o canal radicular, preenchido com PBS esterilizado.

### 3.7.3 Coleta dos biofilmes

Os canais radiculares foram preenchidos com solução salina (PBS) esterilizada, como descrito anteriormente, e os corpos de prova transferidos para tubos Eppendorf de 5 mL com suas respectivas aberturas cervicais direcionadas para o fundo do tubo (Figura 7 A). Os oito corpos de prova de cada grupo foram submetidos ao processo de agitação em um equipamento tipo Vortex AV-2 (Gehaka, São Paulo, SP, Brasil) (Figura 7 B) com velocidade máxima durante 1 min. Na etapa seguinte, os tubos Eppendorf foram dispostos em estantes, as quais foram imersas em água no interior de uma cuba ultrassônica (Digital Ultrasonic Cleaner, Kondortech, São Carlos, SP, Brasil) (Figura 7 C) por 8 min. Esse procedimento foi adotado para promover o desprendimento do biofilme das paredes radiculares dos dentes bovinos. Finalmente, os tubos Eppendorf foram colocados em uma centrífuga Eppendorf (Centrifuge 5804R, Eppendorf AG, Hamburg, Germany) (Figura 7 D) para centrifugação a 2.000 giros por 60 s visando assegurar o completo desprendimento dos biofilmes remanescentes das paredes dos canais. Em uma avaliação prévia, constatou-se que, nessa velocidade, é mantida a viabilidade das células bacterianas. Por fim, foi realizada a coleta do material que se desprende das paredes do canal radicular. O procedimento descrito foi baseado no protocolo de coleta de biofilmes proposto por Goulart (2019).

Figura 7 – A- Espécime no interior de tubos Eppendorf com a região cervical voltada para o fundo do tubo. B- Tubos Eppendorf sob agitação no equipamento Vortex AV-2; C- Estante com os tubos Eppendorf imersa no interior da cuba ultrassônica; D- Tubos Eppendorf dispostos no interior da centrífuga.

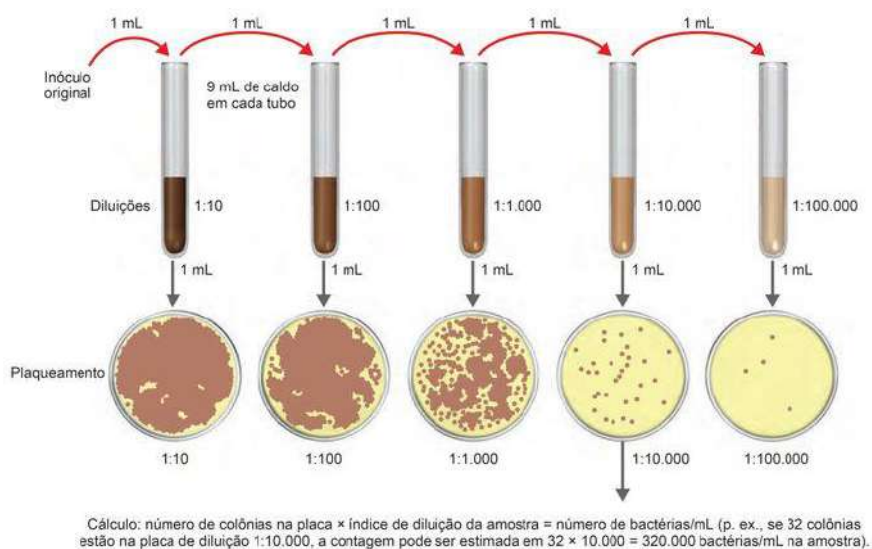


Fonte: Autor.

### 3.7.4 Análise microbiológica- UFC

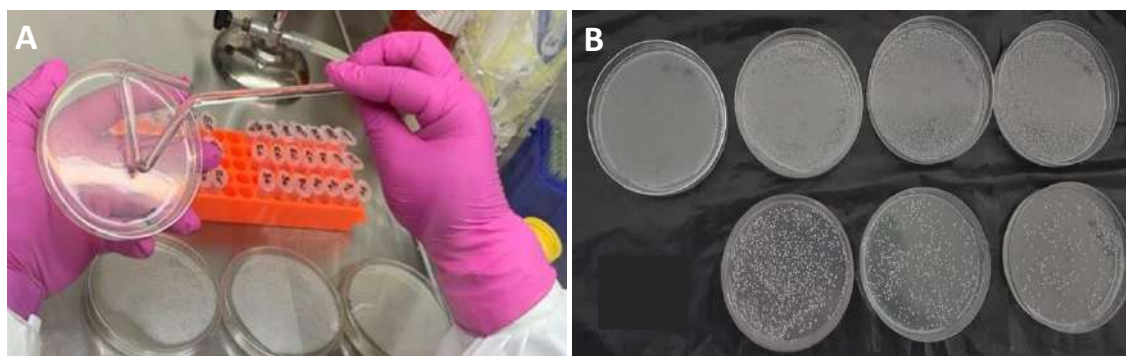
Foi feita uma diluição seriada 1:9 (A até G) em PBS do material coletado no interior dos canais radiculares das raízes bovinas empregando-se tubos tipos Eppendorf de 1,5 mL autoclavados. Após a diluição seriada (Figura 8) (A até G), alíquotas de 100  $\mu$ L de cada suspensão foram inoculadas em placas de Ágar Müeller Hinton pela técnica de espalhamento em placa, com o auxílio de alça Drigalski (Figura 9 A). As placas com suas respectivas diluições foram incubadas a 37 °C por 24 h, para posterior contagem das unidades formadoras de colônias (UFC), pelo software ImageJ (Figura 9 B).

Figura 8 - Representação esquemática do procedimento de diluição seriada.



Fonte: TORTORA; FUNKE; CASE, 2012.

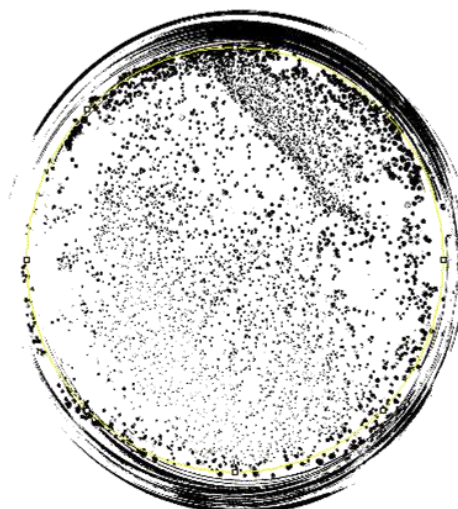
Figura 9 - Técnica de espalhamento em placa do inóculo empregando-se a alça Drigalski. B- Diluição seriada em placas de Petri (A : G).



Fonte: Autor.

Para cada grupo avaliado, a contagem das unidades formadoras de colônia (UFC), empregando-se o programa ImageJ, foi executada com a importação da imagem correspondente à placa com a maior quantidade de colônias, cujo número é ainda contável, convertendo-a para uma imagem com 8 *bytes*. Na placa, era realizada uma delimitação com circunferência, padronizando as partículas de 20 a 130 pixels, obtendo-se assim, o número de micro-organismos correspondente aos pontos de pixels (Figura 10).

Figura 10 – Contagem das unidades formadoras de colônias pelo software ImageJ.



Fonte: Autor.

### 3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

De acordo com o teste de Kolmogorov–Smirnov (KS), os dados da contagem de unidades formadoras apresentaram distribuição normal, de modo que foram utilizados testes paramétricos para a análise estatística. As análises foram realizadas empregando-se o *software* Graph Pad Prism 6.01. A análise de variância (ANOVA, fator único) foi utilizada para avaliar se os grupos eram estatisticamente diferentes entre si em função das soluções irrigantes utilizadas nos protocolos de sanificação com relação à redução da quantidade de UFC de *E. faecalis*. Uma vez verificada que havia diferença estatisticamente significativa, foi utilizado o pós-teste Brown-Forsythe para a confirmação de que havia diferença entre os grupos, enquanto o teste de Holm-Sidak foi utilizado para a comparação dos grupos, de dois a dois, com nível de significância de 5%.

Após a análise estatística, foram feitos cálculos, empregando-se as médias obtidas, para verificar o percentual de redução do número de UFC dos grupos avaliados em relação ao PBS que é o grupo controle negativo.

### 3.9 ANÁLISE POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

Um espécime de cada grupo experimental (n=1) foi submetido à clivagem com a utilização de Holleback 3S. Os espécimes foram fixados com glutaraldeído 2,5% e mantidos por uma noite a 4 °C e lavados com PBS. Em seguida, cada corpo de prova foi imerso, durante 1 h, em uma bateria de soluções com concentração ascendente (30%, 70%, 80%, 85%

e 100%) de etanol (Merck, Darmstadt, Alemanha), com posterior secagem à temperatura ambiente. Concluído o processo de desidratação das amostras, elas foram fixadas sobre estruturas cilíndricas, previamente identificadas de acordo com cada grupo experimental, denominadas *stubs* (Figura 11), utilizando-se fita adesiva de dupla face de carbono (Electron Microscopy Sciences, Washington, Estados Unidos). Na etapa seguinte, os corpos de prova foram metalizados com a deposição de uma fina camada de ouro (cerca de 30 nm) ou de uma liga de ouro e paládio. Esse procedimento foi executado em um equipamento de metalização a vácuo (SDC 050, Bal-Tec AG, Liechtenstein, Suíça) com pressão de 0,01 mbar, corrente de 40 mA, distância de trabalho de 50 mm, tempo de cobertura de 110 s e espessura média de deposição de 20 a 30 nm. Após a metalização, os corpos de prova foram analisados em um microscópio eletrônico de varredura (JSM 5410, JEOL Ltda, Tóquio, Japão), do Laboratório de Microscopia Eletrônica de Varredura do Departamento de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo (FMRP/USP). Após a análise, foram geradas micrografias eletrônicas de varredura das respectivas áreas centrais dos terços apical, médio, cervical e do longo eixo dos túbulos dentinários com aumentos de 500, 2000 e 5000 vezes (X). Para interpretação dos resultados, foram utilizados os aumentos de 5000 X. As micrografias obtidas foram avaliadas para verificar a ação de cada uma das soluções irrigantes investigadas sobre os biofilmes de *E. faecalis* formados no interior do canal radicular.

Figura 11- Corpos de prova depositados sobre o *stub*, após metalização para análise por MEV.



Fonte: Autor.

### 3.10 ANÁLISE POR MICROSCOPIA CONFOCAL DE FLUORESCÊNCIA

Para a realização dessa análise, um espécime de cada grupo experimental (n=1), foi submetido à clivagem com a utilização de Hollemback 3S.

Foi utilizado o kit de viabilidade bacteriana (Live/Dead Bac Light Bacterial Viability and Counting Kit, Molecular Probes, Eugene, OR, EUA). Os corpos de prova foram corados empregando-se o kit de viabilidade bacteriana por 15 min, de acordo com o protocolo descrito por JOSHI et al. (2010). O kit contém dois marcadores fluorescentes, SYTO 9, na cor verde fluorescente, que mancha células viáveis (penetra as células com membranas intactas) e o iodeto de propídio vermelho, que cora células mortas (penetra as células com membranas lesadas).

Para executar o processo de coração, os reagentes foram diluídos em água ultrapura esterilizada (121°C por 15 min) utilizando-se 1,5 µL de Syto9, 1,5 µL de Iodeto de propídio e 997 µL de água ultrapura. Após a lavagem com 1 mL de PBS, os corpos de prova foram depositados em lâminas de microscopia (26 × 76 mm) e, em seguida, 700 µL da solução diluída do kit *Live/Dead* foram pipetados e depositados sobre os corpos de prova. As lâminas foram envolvidas com papel alumínio para evitar contato com a luz (devido à fotossensibilidade dos marcadores) e os corpos de prova permaneceram à temperatura ambiente para secagem. Após 15 min, foram realizadas as análises com magnificação de 63X e escala de 25 µm por microscopia confocal de fluorescência (Microscópio Confocal Leica SP5, Wetzlar, Alemanha).



## 4 RESULTADOS

### 4.1 DETERMINAÇÃO DE CIM E CBM

De acordo com os resultados obtidos e apresentados na Tabela II, observou-se que a menor concentração inibitória mínima frente a *E. faecalis* deveu-se à associação das soluções irrigantes propostas.

A menor concentração bactericida mínima também foi obtida pela associação das soluções propostas para a qual não houve o crescimento bacteriano na região de inoculação.

Tabela II - Valores correspondentes a CIM e CBM das soluções irrigantes avaliadas.

Soluções irrigantes	CIM (%)	CBM (%)
C <sub>3</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>3</sub> NaO <sub>3</sub> 2%	0,0078	0,25
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> .KHSO <sub>4</sub> .2KHSO <sub>5</sub> 1%	0,0039	0,0625
C <sub>3</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>3</sub> NaO <sub>3</sub> 1%: K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> .KHSO <sub>4</sub> .2KHSO <sub>5</sub> 0,5%	0,0039 : 0,002	0,0625 : 0,03125
NaOCl 2,5%	0,039	0,3125

Fonte: Autor.

### 4.2 AVALIAÇÃO ESTATÍSTICA

No teste de KS, foi obtido valor de  $p=0,2$ , o que indicou que os dados da contagem de unidades formadoras apresentaram distribuição normal. Nas Tabelas V e VI, seguem os resultados das análises por ANOVA e Brown-Forsythe, para o qual se obteve um valor de  $p=0,0015$ .

Tabela V - Valores correspondentes aos resultados das análises por ANOVA.

Parâmetros	Resultados
F	64,39
P value	< 0,0001
P value summary	****
Are differences among means statistically significant? ( $P < 0.05$ )	Yes
R square	0,9279

Fonte: Autor.

Tabela VI - Valores correspondentes aos resultados das análises por Brown-Forsythe.

Parâmetros	Resultados
F (DFn, DFd)	6,547 (4, 20)
P value	0,0015
P value summary	**
Significantly different standard deviations? (P < 0.05)	Yes

Fonte: Autor.

Na Tabela VII, seguem os resultados estatísticos obtidos na comparação de grupos, de dois a dois, com o teste de Holm-Sidak.

Tabela VII - Valores correspondentes aos resultados das análises de Holm-Sidak.

Grupos	Valores	Resultados
PBS vs. NaOCl (A)	16.350.000	Yes
PBS vs. C <sub>3</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>3</sub> NaO <sub>3</sub> (A)	17.090.000	Yes
PBS vs. K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> .KHSO <sub>4</sub> .2KHSO <sub>5</sub> (A)	18.110.000	Yes
PBS vs. C <sub>3</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>3</sub> NaO <sub>3</sub> + K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> .KHSO <sub>4</sub> .2KHSO <sub>5</sub> (B)	18.220.000	Yes
NaOCl vs. C <sub>3</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>3</sub> NaO <sub>3</sub> (B)	740.250	No
NaOCl vs. K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> .KHSO <sub>4</sub> .2KHSO <sub>5</sub> (B)	1.758.000	No
NaOCl vs. C <sub>3</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>3</sub> NaO <sub>3</sub> + K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> .KHSO <sub>4</sub> .2KHSO <sub>5</sub> (B)	1.864.000	No
C <sub>3</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>3</sub> NaO <sub>3</sub> vs. K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> .KHSO <sub>4</sub> .2KHSO <sub>5</sub> (B)	1.018.000	No
C <sub>3</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>3</sub> NaO <sub>3</sub> vs. C <sub>3</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>3</sub> NaO <sub>3</sub> + K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> .KHSO <sub>4</sub> .2KHSO <sub>5</sub> (B)	1.124.000	No
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> .KHSO <sub>4</sub> .2KHSO <sub>5</sub> vs. C <sub>3</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>3</sub> NaO <sub>3</sub> + K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> .KHSO <sub>4</sub> .2KHSO <sub>5</sub> (B)	106.000	No

Fonte: Autor.

A partir da análise estatística realizada empregando-se o teste de comparações múltiplas Holm-Sidak, os valores obtidos demonstraram que os grupos das soluções avaliadas (C<sub>3</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>3</sub>NaO<sub>3</sub> 2%, K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.KHSO<sub>4</sub>.2KHSO<sub>5</sub> 1%, C<sub>3</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>3</sub>NaO<sub>3</sub> 1%: + K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.KHSO<sub>4</sub>.2KHSO<sub>5</sub> 0,5% e NaOCl 2,5%) são estatisticamente diferentes do grupo PBS e estatisticamente semelhantes entre si.

#### 4.3 AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA - UFC

Na Tabela III, são apresentados os respectivos valores de média e desvios-padrão de UFC de todos os grupos avaliados no trabalho.

Tabela III - Valores correspondentes a médias e desvio-padrão de UFC dos grupos avaliados.

Grupos	Média	Desvio-padrão
PBS	18.260.000	4.420.443
C <sub>3</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>3</sub> NaO <sub>3</sub> 2%	1.165.750	1.288.624
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> .KHSO <sub>4</sub> .2KHSO <sub>5</sub> 1%	148.000	40.988
C <sub>3</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>3</sub> NaO <sub>3</sub> 1%: K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> .KHSO <sub>4</sub> .2KHSO <sub>5</sub> 0,5%	42.000	22.539
NaOCl 2,5 %	1.906.000	1.235.913

Fonte: Autor.

Os valores percentuais médios de redução do número de unidades formadoras de colônias de todos os grupos avaliados foram tomados quando comparados aos valores do grupo controle negativo (PBS). De acordo com os resultados da Tabela IV, o grupo com o maior percentual de redução do número de UFC de *E. faecalis* foi o da associação. Em comparação com o hipoclorito de sódio, o grupo da associação de soluções, em termos de redução do número de UFC de *E. faecalis*, apresentou um percentual 10,20% maior.

Tabela IV - Valores correspondentes ao percentual de descontaminação das soluções irrigantes frente ao grupo PBS.

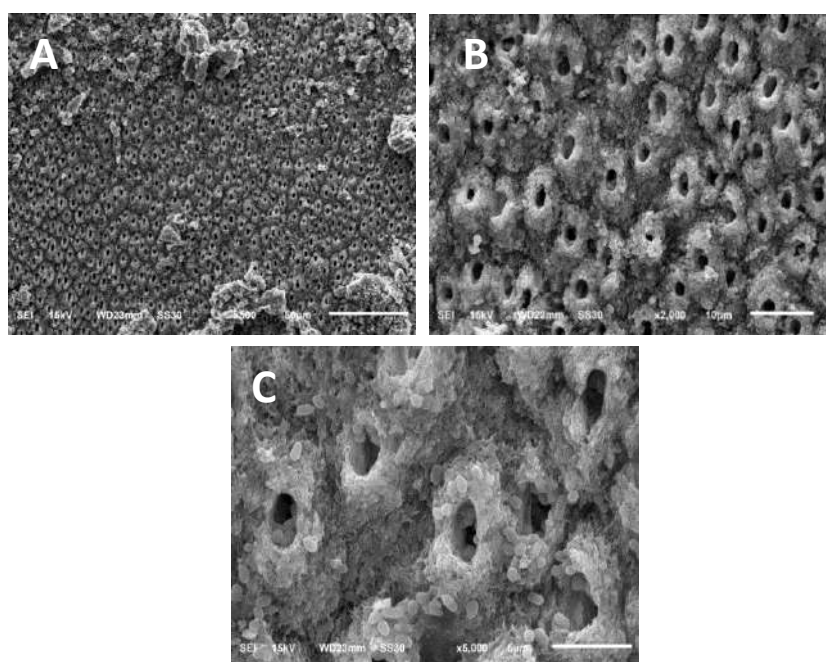
Grupos	Percentual de descontaminação
C <sub>3</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>3</sub> NaO <sub>3</sub> 2%	93,62%
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> .KHSO <sub>4</sub> .2KHSO <sub>5</sub> 1%	99,19%
C <sub>3</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>3</sub> NaO <sub>3</sub> 1% + K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> .KHSO <sub>4</sub> .2KHSO <sub>5</sub> 0,5%	99,76%
NaOCl 2,5 %	89,56%

Fonte: Autor.

#### 4.4 ANÁLISE POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

Foram obtidas micrografias com aumentos de 500, 2000 e 5000X (Figura 12). Para a interpretação dos resultados da ação das soluções irrigantes investigadas, foi utilizado o aumento de 5000X.

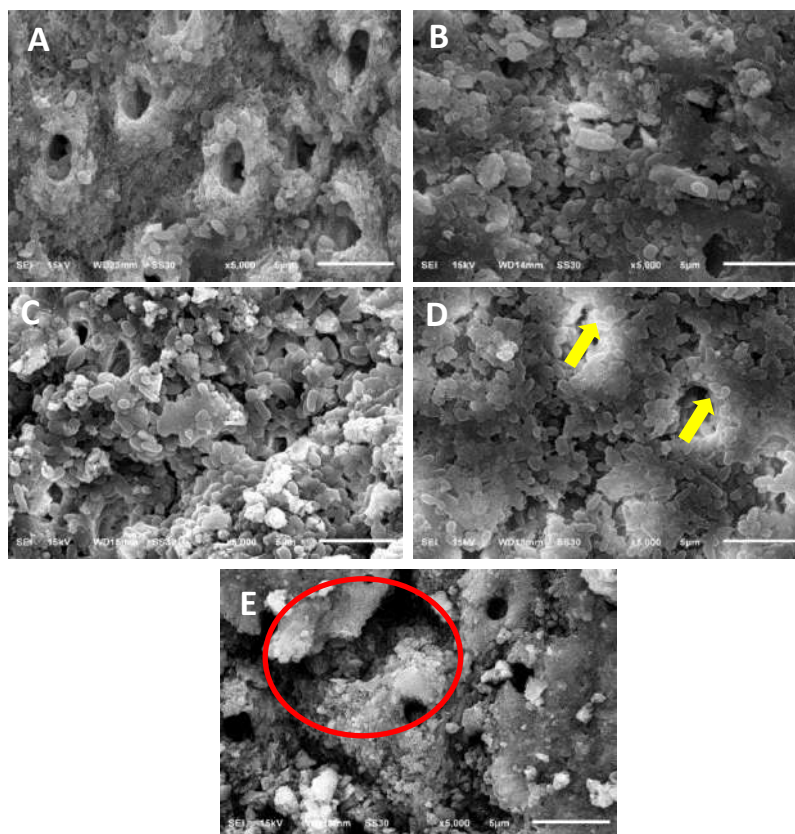
Figura 12 - Micrografias da região cervical do controle negativo (PBS) nos três aumentos. A- 500X; B- 2000X, C- 5000X.



Fonte: Autor.

No grupo PBS (Figura 13 A), observa-se a presença de uma grande quantidade de bactérias na superfície da dentina que se mostrou bem preservada. Nessa região, o biofilme está fortemente aderido às paredes da dentina, devido à ação da matriz de polissacarídeo (EPS). Para o grupo do monopersulfato de potássio composto (Figura 13 B), por sua vez, verifica-se a presença de biofilmes desorganizados remanescentes, bactérias planctônicas e alguns cristais depositados sobre uma superfície regular. No grupo do dicloroisocianurato de sódio (Figura 13 C), foi observado um grande número de bactérias planctônicas, remanescentes de biofilme e cristais depositados, incluindo alguns relativamente grandes sobre uma superfície que sofreu corrosão. No grupo da associação de dicloroisocianurato de sódio e monopersulfato de potássio composto (Figura 13 D), foi verificada maior quantidade de bactérias planctônicas (quando comparado aos três últimos grupos avaliados) e poucos cristais depositados, sendo praticamente impossível a visualização dos túbulos dentinários. As setas amarelas representam o início do processo de corrosão. Na superfície da dentina do grupo do hipoclorito de sódio (Figura 13 E), foi observada a presença de uma grande quantidade de materiais depositados e áreas de dentina intertubular com intenso processo de corrosão (delimitada pelo círculo vermelho).

Figura 13 - Micrografias do terço cervical do conduto radicular com aumento de 5000X; A –controle negativo (PBS), B- monopersulfato de potássio composto, C- dicloroisocianurato de sódio, D- associação, E- hipoclorito de sódio.

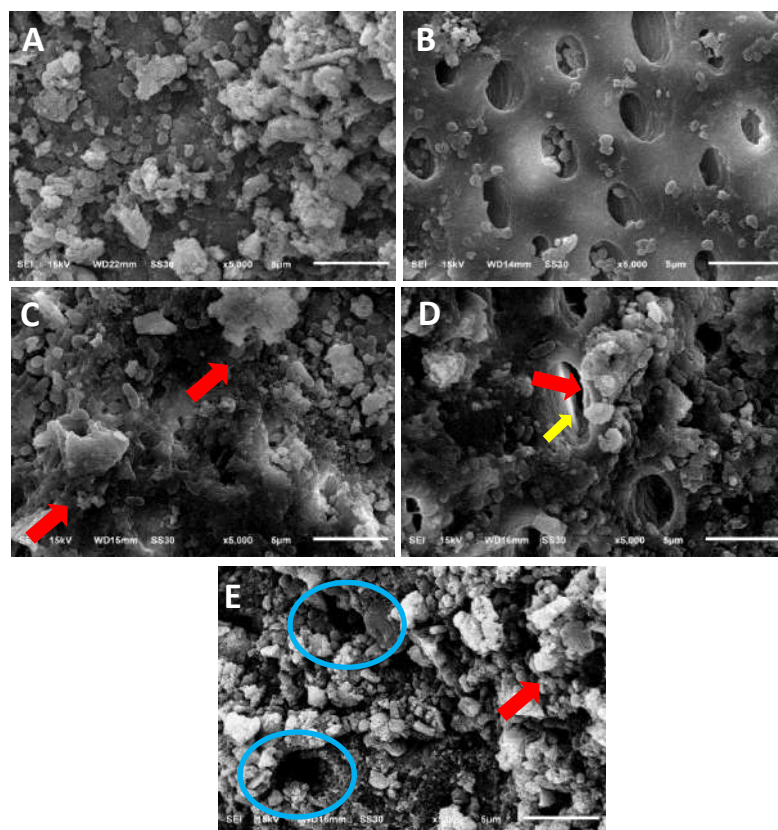


Fonte: Autor.

Já os resultados obtidos nas micrografias do terço médio, na superfície da dentina do grupo PBS (Figura 14 A), indicam a presença de grande quantidade de material depositado, cristais e biofilme desarranjado remanescente. A superfície da dentina correspondente ao grupo do monopersulfato de potássio composto (Figura 14 B) apresentou-se regular e sem sinais perceptíveis de corrosão. Esse grupo também apresentou bactérias planctônicas espalhadas sobre a superfície da dentina e na luz do canal, mas sem material depositado. O grupo do dicloroisocianurato de sódio (Figura 14 C) apresentou uma pequena quantidade de micro-organismos planctônicos, mas com grande quantidade de materiais depositados sobre a superfície da dentina, cristais e biofilmes desorganizados remanescentes, e com áreas de dentina intertubular corroídas. O grupo com soluções associadas (Figura 14 D) é caracterizado pela presença de certa quantidade de materiais depositados, semelhante ao grupo da Figura 14 C, observando o início do processo de corrosão (representado pela seta amarela). O grupo do hipoclorito de sódio (Figura 14 E) apresentou uma grande quantidade de materiais depositados e áreas de dentina intertubular corroídas (representadas por círculos azuis), que

foram maiores quando comparados ao grupo da associação das soluções. Não se observa a presença de bactérias nesse grupo. Para os grupos C, D e E, os remanescentes de biofilme são indicados pelas setas vermelhas.

Figura 14 - Micrografias do terço médio do conduto radicular com aumento de 5000X; A –controle negativo (PBS), B- monopersulfato de potássio composto, C- dicloroisocianurato de sódio, D- associação, E- hipoclorito de sódio.

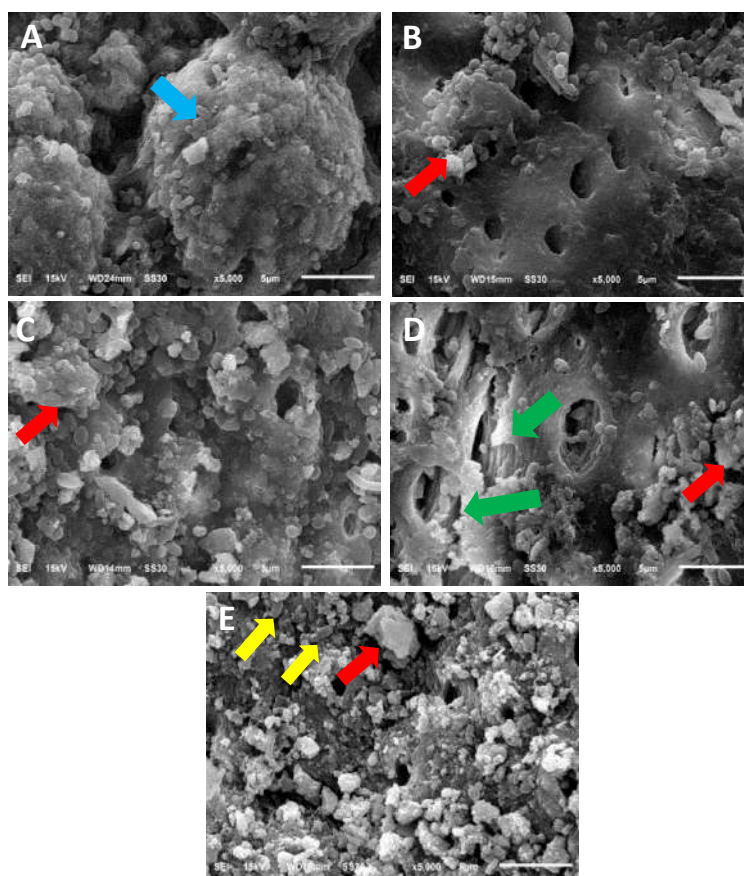


Fonte: Autor.

Nas micrografias obtidas no terço apical, para o grupo PBS (Figura 15 A), é possível observar a presença de um grande aglomerado de bactérias que caracteriza os biofilmes, recobrendo a superfície da parede radicular (representado pela seta azul), dificultando a visualização dos túbulos dentinários e canalículos. Já o grupo do monopersulfato de potássio composto (Figura 15 B), é marcado pela presença de uma menor quantidade de bactérias planctônicas e de materiais depositados, alguns cristais e biofilme desarranjado remanescente, sobre a superfície da dentina, a qual se apresenta íntegra e facilmente visualizada. O grupo do dicloroisocianurato de sódio (Figura 15 C) apresentou superfície irregular em função do biofilme aderido à superfície da dentina com certo número de bactérias se desprendendo da estrutura, passando à condição de células planctônicas. A visualização dos tubos é deficiente e

verifica-se a presença de áreas de dentina intertubular corroídas. Nesse grupo, foi observada menor quantidade de materiais depositados. No grupo da associação de soluções (Figura 15 D), percebe-se o início do processo de corrosão nos túbulos dentinários (representado pelas setas verdes). Verificou-se que ocorreu a desorganização do biofilme, uma vez que a superfície apresenta uma menor quantidade de bactérias planctônicas e certa quantidade de materiais depositados sobre a superfície da dentina, similarmente ao grupo apresentado na Figura 15 C. O grupo do hipoclorito de sódio apresentou uma grande quantidade de materiais depositados sobre a superfície da dentina e uma pequena quantidade de bactérias, indicadas pelas setas amarelas (Figura 15 E). Observou-se que houve processo de corrosão na superfície do corpo de prova desse grupo. Nesse terço, todas as soluções testadas promoveram o desarranjo do biofilme, quando comparadas ao controle negativo (PBS). Foi observada também a presença de vestígios da camada de *smear*, em forma de biofilme desarranjado. Na figura 15, a presença de remanescentes de biofilmes é indicada pelas setas vermelhas.

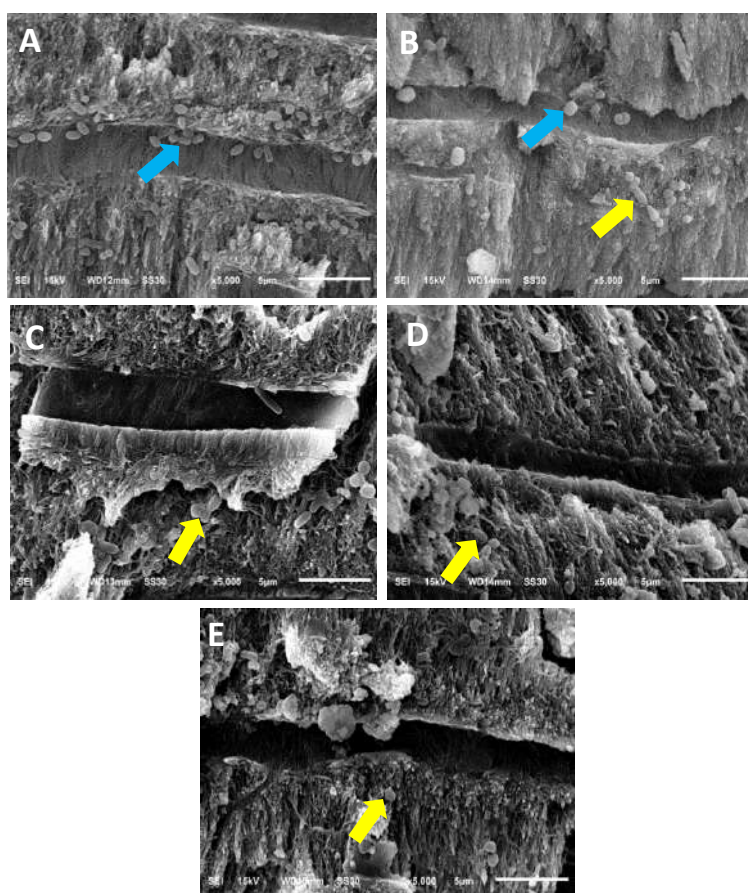
Figura 15 - Imagens da microscopia eletrônica de varredura no terço apical do conduto radicular com aumento de 5000X; A - controle negativo (PBS), B- monopersulfato de potássio composto, C- dicloroisocianurato de sódio, D- associação, E- hipoclorito de sódio.



Fonte: Autor.

Já nas micrografias do longo eixo dos túbulos dentinários, nos grupos do controle negativo (Figura 16 A) e do monopersulfato de potássio composto (Figura 16 B), foram observadas alguns micro-organismos planctônicos no interior do canal (representados pelas setas azuis). No grupo do dicloroisocianurato de sódio (Figura 16 C), no grupo da associação das soluções (Figura 16 D) e no grupo do hipoclorito de sódio (Figura 16 E), não foi observada a presença de micro-organismos. No entanto, sobre a superfície da região que sofreu a clivagem, foi verificada a presença de bactérias (apontadas por setas amarelas) indicando que, durante o procedimento de clivagem houve a contaminação dos corpos de prova. No caso dos grupos representados nas Figuras 16 B, 17 D e 17 E, foi observada também a presença de materiais depositados, especialmente do grupo do hipoclorito de sódio (figura E).

Figura 16 - Micrografias obtidas na varredura ao longo do eixo dos túbulos dentinários com aumento de 5000X. A- controle negativo (PBS), B- monopersulfato de potássio composto, C- dicloroisocianurato de sódio, D- associação, E- hipoclorito de sódio.



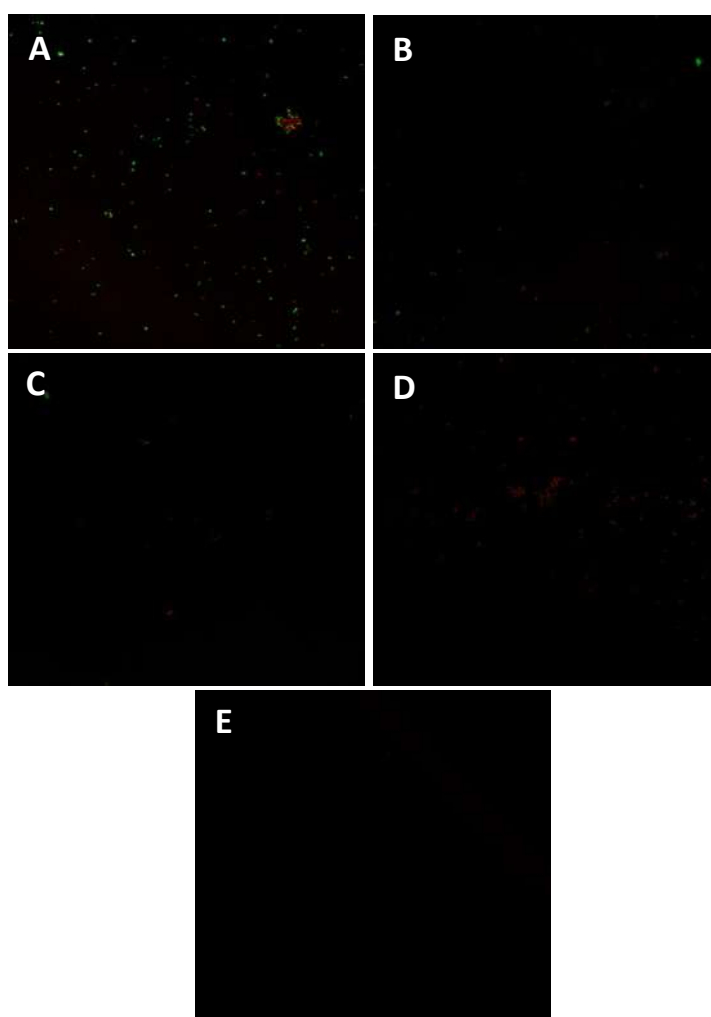
Fonte: Autor.



#### 4.5 ANÁLISE POR MICROSCOPIA CONFOCAL DE FLUORESCÊNCIA

O grupo PBS (Figura 17 A) apresentou a maior quantidade de bactérias viáveis, o que foi verificado pela prevalência da coloração verde, indicando a presença de bactérias vivas, sobre a coloração vermelha, indicativa da presença de bactérias mortas. Nos grupos do monopersulfato de potássio composto (Figura 17 B) e do dicloroisocianurato de sódio (Figura 17 C), foi observada a presença de células viáveis e mortas, sendo que as últimas são prevalentes. No grupo da associação (Figura 17 D), foi verificada a presença de uma grande quantidade de bactérias inviáveis, indicada pela prevalência da coloração vermelha. Para o grupo do hipoclorito de sódio (Figura 17 E), não foi observada nem a coloração verde, nem a coloração vermelha, indicando a ausência de bactérias.

Figura 17 - Imagens de microscopia confocal de fluorescência mostrando a presença de células viáveis e inviáveis dos diferentes grupos: A- PBS, B- monopersulfato de potássio composto, C- dicloroisocianurato de sódio, D- associação, E- hipoclorito de sódio. Magnificação original de 63X com escala de 25  $\mu\text{m}$ .



Fonte: Autor.

## 5 DISCUSSÃO

O preparo biomecânico, isoladamente, não é capaz de alcançar todas as regiões do SCR, de modo a assegurar a eliminação de micro-organismos responsáveis processos de infecções e reinfecções endodônticas (SIQUEIRA JR; RÔÇAS, 2014), necessitando da utilização concomitante das soluções irrigantes (AKPATA, 1976; BALDISSERA et al., 2012). No entanto, em função das limitações apresentadas pelas soluções comercialmente disponíveis, há uma demanda pela introdução de novos produtos no mercado que possam compensar tais limitações e que sejam compatíveis com as aplicações odontológicas. Diante disso, foi proposto, neste trabalho, o estudo da atividade antimicrobiana de dicloroisocianurato de sódio, monopersulfato de potássio composto e a associação de dicloroisocianurato de sódio e monopersulfato de potássio composto, como soluções irrigantes alternativas, as quais poderiam auxiliar no procedimento de limpeza do SCR em função de sua atividade antimicrobiana.

Para a avaliação das soluções irrigantes com ação antimicrobiana, optou-se, neste estudo, por realizar um estudo *in vitro* com espécimes dentais. No entanto, com a expansão dos tratamentos reabilitadores disponibilizados para um maior número de pessoas (REIS et al., 2004), houve uma redução da disponibilidade de espécimes dentais para a realização de tais estudos. Para contornar essa limitação, os dentes bovinos têm sido amplamente utilizados nas pesquisas odontológicas (NAKAMICHI; IWAKU; FUSAYAMA, 1983), uma vez que são morfológica e histologicamente similares aos dentes humanos (REEVES et al., 1995; SILVA et al., 2019). Assim, foram utilizados dentes bovinos neste estudo, buscando-se equalizar fatores como diferenças morfológicas (com a padronização vestibulo-lingual aferida) para assegurar que os resultados obtidos fossem fidedignos, uma vez que se pretendia simular a condição clínica com a máxima fidelidade (YASSEN; PLATT; HARA, 2011). Foram utilizados incisivos bovinos, uma vez que esses dentes caracterizam-se como excelentes substituintes dos dentes humanos em diversos experimentos na área odontológica (DA CRUZ CAMPOS; CAMPOS; VITRAL, 2008).

As infecções endodônticas têm um caráter polimicrobiano, com frequente predomínio de bactérias anaeróbias estritas (ANDERSON et al., 2012), organizadas em biofilme, responsáveis pela contaminação do SCR, o que compromete seriamente o êxito tratamento endodôntico (NAIR et al., 2005). Portanto, considerou-se, no planejamento dos experimentos, essa forma de organização bacteriana a fim de mimetizar a situação o mais próximo possível da realidade clínica.

Dentre os micro-organismos responsáveis pelas infecções e reinfecções endodônticas, destaca-se o *E. faecalis*, principal agente etiológico presente na maioria dos SCR com necessidade de retratamento endodôntico (SEDGLEY et al., 2005; SIQUEIRA JR.; RÔÇAS, 2004), observado em mais de 90% das infecções enterocócicas de seres humanos (KAYAOGLU; ØRSTAVIK, 2004). apresenta capacidade de penetrar os túbulos dentinários, de aderir às paredes de dentina (LACERDA et al., 2016), organizando-se em biofilmes densos (LOVE, 2001), de resistir à ação do hidróxido de cálcio (ØRSTAVIK; HAAPASALO, 1990) e de apresentar alta resistência (SEDGLEY et al., 2005; ØRSTAVIK; HAAPASALO, 1990) aos agentes antimicrobianos (PORTENIER; WALTIMO; HAAPASALO, 2003). Tais propriedades colocam *E. faecalis* como um permanente desafio que pode comprometer os tratamentos e retratamentos endodônticos. Em função disso, esse micro-organismo foi selecionado como modelo bacteriano de estudo para avaliação da atividade antimicrobiana das soluções irrigantes propostas.

Embora haja, na literatura, relatos descrevendo a formação de biofilme em um intervalo de tempo de 24 h, apenas a partir de 36 h, de acordo com Santos et al. (2008), observa-se a presença de EPS, etapa que consolida a formação do biofilme. Ainda que tenham sido propostos períodos de incubação um pouco mais longos, como 48 h (DE MEYER et al., 2017), a formação de um biofilme denso e maduro no interior do SCR só é alcançada em um período de três semanas (TIANFENG et al., 2014; KASIĆ, et al., 2017). Além disso, em biofilmes maduros de três semanas, há maior resistência à terapia antimicrobiana quando comparados àqueles obtidos em um período duas semanas ou menos de inoculação (SHEN; STOJICIC; HAAPASALO, 2011). Portanto, para assegurar a formação do biofilme, foi estabelecido um período de tempo de 21 dias, pois, nessas condições, não apenas se garantiria a formação de um biofilme denso e maduro, mas também se reproduziria as condições clínicas. Com a definição desse longo intervalo de tempo, para assegurar a viabilidade das células bacterianas, foi sugerido que as trocas de inóculo fossem realizadas em intervalos de, no mínimo, 48 h (KASIĆ, et al., 2017). No entanto, estudos previamente realizados em nosso grupo de pesquisa indicaram que o intervalo para a inoculação deveria ser de, pelo menos, 24 h a fim de manter as células viáveis, de modo que foi aqui adotado.

O processo de formação do biofilme possui uma dinâmica efetivamente longa, uma vez que abrange cinco etapas, as quais envolvem processos físicos, químicos e biológicos (PERCIVAL et al., 2011). Na primeira etapa, ocorre a fixação de células planctônicas em superfícies, enquanto que, na segunda etapa, a qual não ocorre antes de 36 h (SANTOS et al., 2008), há a formação do EPS que promove a fixação do biofilme. Já a fase de formação de

microcolônias se dá na terceira etapa, quando ocorre a multiplicação das células. A partir daí, a comunidade cresce em uma estrutura tridimensional, onde o biofilme atinge o estado maduro em aproximadamente três semanas (TIANFENG et al., 2014; KASIĆ, et al., 2017), o que justifica a seleção desse período. Nessa etapa, o biofilme encontra-se fortemente aderido ao EPS, garantindo proteção às bactérias e facilitando a distribuição de nutrientes entre elas. Isso foi observado no controle negativo, em cujos corpos de prova verificou-se a presença de biofilme distribuído por toda a superfície da dentina e a ela firmemente aderido. Por fim, na etapa cinco, algumas células se desprendem podendo formar novos biofilmes, o que permite a autorrenovação da comunidade, etapa que favorece a sua expansão para outras áreas do SCR (MONROE, 2007). Esse é um aspecto muito importante a ser considerado, pois os casos de reintervenção de tratamentos endodônticos estão justamente relacionados à presença de biofilme maduro no periápice radicular, causados por micro-organismos procedentes do SCR (FERRER-LUQUE et al., 2014).

Durante a realização dos experimentos relativos à formação de biofilmes, a coleta dos micro-organismos é uma etapa crítica. Na literatura, há descrição de coleta de micro-organismos do interior do canal radicular, empregando-se cones de papel esterilizados (SASANAKUL; AMPORNARAMVETH; CHIVATXARANUKUL, 2019). Por questões anatômicas e pela complexidade do SCR, esse protocolo apresenta muitas limitações, uma vez que desconsidera as regiões de difícil acesso como istmos, canais acessórios, reentrâncias, canais laterais, canais colaterais e outras variações anatômicas (LEONI et al., 2014; VERSIANI et al., 2016). Embora, neste trabalho, tenham sido utilizadas raízes com canal único, foi adotado o protocolo de coleta proposto por Goulart (2019) visando garantir a eficiência da coleta do material. Esse protocolo é caracterizado por assegurar o desprendimento do biofilme presente no SCR e mesmo nos canalículos dentinários, com maior efetividade.

As soluções irrigantes auxiliam na remoção da camada de *smear*, composta por um esfregaço, que reúne matéria orgânica, como bactérias e sangue, e inorgânica, sobretudo, fosfato de cálcio. Portanto, a eficácia dessas soluções está vinculada ao imprescindível contato com os micro-organismos, bem como à adequação de volume e da quantidade administrada (ESTRELA et al., 2012), ou seja, em última instância, depende de suas propriedades e características, conforme as considerações de Souza; Souza; Moraes (2005). Estes destacaram que as soluções irrigantes, idealmente, devem apresentar biocompatibilidade, baixa tensão superficial, assim como ações antimicrobiana, neutralizadora, lubrificante, clareadora e solvente, além de não promover alteração de cor, ser

de fácil aplicação e remoção. Reunir todos essas propriedades em um único produto é improvável, uma vez que, no mercado atual, não há uma solução irrigante que reúna todos os atributos desejáveis (ROSSI-FEDELE et al., 2012). Uma interessante alternativa seria a associação de duas ou mais soluções (HAAPASALO; SHEN; RICUCCI, 2008), visando agrupar o maior número possível de propriedades.

Grandes esforços têm sido feitos visando eliminar o biofilme de *E. faecalis* do SCR com o auxílio das soluções irrigantes comumente utilizadas na terapia endodôntica durante o preparo biomecânico (SVENSÄTER; BERGENHOLTZ, 2004). Tais esforços foram também aqui despendidos, tendo sido alcançados resultados muito satisfatórios com relação à ação das soluções investigadas. O tempo de exposição do biofilme às soluções irrigantes, no entanto, pode ter sido um fator limitante, uma vez que o intervalo de 5 min é considerado curto (DEL CARPIO-PEROCHENA et al., 2011). Contudo, apesar disso, os resultados obtidos demonstraram que todas as soluções irrigantes testadas, no presente estudo, apresentaram ação antimicrobiana efetiva contra *E. faecalis*, como o controle positivo, hipoclorito de sódio.

Há mais de quatro décadas, o hipoclorito de sódio é a principal solução irrigante utilizada em tratamentos endodônticos (PRETEL et al., 2011). Para uso odontológico, geralmente, são empregadas as concentrações de 1,0%, 2,5% e 5,25% (SALAS et al., 2012). Para a avaliação das soluções irrigantes propostas, foi selecionada a solução de hipoclorito de sódio a 2,5%, uma vez que é eficaz na redução do número de micro-organismos e, concomitantemente, apresenta menor efeito corrosivo em comparação às concentrações mais altas (CÁRDENAS-BAHENA et al., 2012).

A larga utilização de hipoclorito de sódio na área odontológica está inerentemente vinculada à eficiente atividade antimicrobiana, à capacidade de dissolução de matéria orgânica e de remoção de biofilme, ao menor custo e à ação rápida (ESTEVES; FROES, 2013; SILVA; MONTEIRO; BELLADONNA, 2015; RÔÇAS et al., 2016). Mesmo com as indiscutíveis vantagens dessa solução, muitas pesquisas vêm sendo desenvolvidas envolvendo o próprio hipoclorito de sódio, bem como soluções irrigantes alternativas. As pesquisas relativas ao hipoclorito de sódio devem-se à sua ação antimicrobiana limitada com relação a micro-organismos como *Candida albicans* e *E. faecalis* (MOHAMMADI; JAFARZADEH; SHALAVI, 2017). Além disso, outros estudos demonstram que o hipoclorito de sódio apresenta alta toxicidade e corrosividade, tem baixa estabilidade relativa e é incapaz de remover completamente a camada de *smear* (ARIAS-MOLIZ et al., 2014; RÔÇAS et al., 2016).

Em função dessas limitações e deficiências do hipoclorito de sódio, passou a haver uma demanda pelo desenvolvimento de soluções irrigantes alternativas que pudessem contornar e/ou sobrepujar tais desvantagens. O dicloroisocianurato de sódio está entre as potenciais substâncias que poderiam ser empregadas como solução irrigante, uma vez que já é utilizada nos processos de sanificação de águas de piscinas e de abastecimento público, na indústria de alimentos, de superfícies de alimentos, de equipamentos, de pisos e paredes, e do interior de tubulações (CUNHA et al., 2006). As ações oxidante e sanificante de hipocloritos, cloro e N-cloraminas (como o dicloroisocianurato de sódio) sobre a matéria orgânica e os micro-organismos, estão vinculadas ao ácido hipocloroso (HOCl) que, formado pela hidrólise dessas substâncias, gera um potencial antimicrobiano (CUNHA et al., 2006). Convém salientar, no entanto, que, embora tenham a ação do HOCl em comum, foi observado que a concentração bactericida mínima do dicloroisocianurato de sódio é 20% menor que aquela do hipoclorito de sódio, o qual, quando dissolvido, é mais propenso à inativação, quando comparado ao primeiro (COATES, 1988). Em seu experimento, Coates (1988) relatou que uma solução contendo 4.000 ppm de cloro ativo exibiu efeito antimicrobiano semelhante à solução de hipoclorito de sódio contendo 17.000 ppm de cloro ativo. Bolla et al. (2013) também demonstraram que o dicloroisocianurato de sódio se revelou mais efetivo na eliminação de *E. faecalis* quando comparado ao hipoclorito de sódio, o que foi corroborado pelos bons resultados obtidos neste trabalho.

A outra substância avaliada para o emprego como solução irrigante, o monopersulfato de potássio composto, é um forte agente oxidante, cuja atuação contra os micro-organismos está relacionada à produção de radicais altamente oxidantes (ZENG et al., 2020). Isso, provavelmente, poderia explicar o fato desse composto ter apresentado uma concentração bactericida mínima 80% menor que aquela obtida para o hipoclorito de sódio e 75% menor que aquela obtida para o dicloroisocianurato de sódio. Na literatura odontológica, não há estudos que avaliem sua ação como solução irrigante endontônica, fato que, associado à sua ação antimicrobiana, instigou este estudo visando tal aplicação.

A associação do dicloroisocianurato de sódio e do monopersulfato de potássio composto levou à menor concentração bactericida obtida, 75% menor que do dicloroisocianurato de sódio e 50% menor que do monopersulfato de potássio composto. Esse resultado demonstrou a sinergia da associação dos sais potencializando a sua ação em comparação ao efeito obtido individualmente. Tal resultado corrobora aqueles obtidos por Zeng et al. (2020) e Anipsitakis; Tufano; Dionysiou (2008), os quais observaram que a ação antimicrobiana do monopersulfato de potássio composto, quando associado a produtos

clorados, como o dicloroisocianurato de sódio, tem sua resposta antimicrobiana ampliada implicando em resultados estatisticamente melhores.

O comportamento observado para as concentrações inibitórias mínimas foi similar àquele observado para as concentrações bactericidas mínimas, tanto para as soluções individuais, como para a associação. Tomando-se como referência os valores obtidos para a concentração inibitória mínima dos grupos avaliados, verificou-se que tais valores são 256X menores que as concentrações originais de dicloroisocianurato de sódio e de monopersulfato de potássio composto. Para a associação, a concentração inibitória mínima foi 256X menor para o dicloroisocianurato de sódio e 250X menor para o monopersulfato de potássio composto em comparação às soluções originais. Considerando-se o arranjo bacteriano em biofilme, é sugerido, na literatura (SEDLACEK; WALKER, 2007; AIRES; BATISTA; PITONDO-SILVA, 2017), que as concentrações necessárias para inibir ou matar micro-organismos nos biofilmes podem ser de 100 a 1000 vezes maiores quando comparadas àquelas necessárias para inibir ou matar células planctônicas. Desse modo, em princípio, as soluções avaliadas e a associação de soluções poderiam eliminar as células bacterianas arranjadas em biofilme, considerando-se a concentração proposta. De acordo com os critérios estabelecidos na literatura, teoricamente, somente a solução de hipoclorito de sódio a 2,5% não seria capaz de eliminar o biofilme, uma vez que a concentração inibitória mínima é apenas 64X menor que a própria concentração original. No entanto, outros aspectos dessa solução precisam ser considerados como as propriedades oxidantes, capacidade de dissolução da matéria orgânica e pH (ESTEVES; FROES, 2013; SILVA; MONTEIRO; BELLADONNA, 2015; RÔÇAS et al., 2016; KUMAR et al., 2019), os quais influenciam de modo decisivo no ataque à estrutura do biofilme. Vale destacar que o pH é uma propriedade física, cuja ação depende da interação com outras propriedades, uma vez que o pH do dicloroisocianurato de sódio, por exemplo, varia no intervalo de 6 a 7, enquanto que o pH do hipoclorito de sódio varia 11 a 12 (GALLANDAT et al., 2019).

A análise estatística revelou que as soluções avaliadas foram estatisticamente diferentes de PBS, e semelhantes entre si. Ainda assim, verificou-se que o grupo da associação de soluções (dicloroisocianurato de sódio e monopersulfato de potássio composto), apresentou o melhor resultado, com 99,76% de redução do número de UFC de *E. faecalis*. Quando o grupo da associação de soluções é comparado ao grupo controle positivo (hipoclorito de sódio), verifica-se que foi obtida uma redução 10,20% maior do número de UFC de *E. faecalis*.

As técnicas de análise qualitativa utilizadas no presente trabalho, MEV e microscopia confocal de fluorescência, revelaram-se complementares, uma vez que permitiram verificar a adesão de micro-organismos e suas alterações morfológicas ocorridas na superfície da dentina intrarradicular (MEV), bem como a viabilidade ou não de *E. faecalis* (microscopia confocal de fluorescência).

A análise qualitativa das micrografias obtidas por MEV foi feita considerando-se os terços: cervical, médio e apical, além do eixo longitudinal dos túbulos dentinários, revelando a ação das soluções irrigantes dos diferentes grupos. Observou-se, no terço cervical, um grande número de bactérias para todos os grupos, exceto para o do hipoclorito de sódio. Isso se deve, possivelmente, ao fato de que *E. faecalis* é anaeróbica facultativa (PORTELA et al., 2014) e seu crescimento é facilitado, uma vez que o biofilme bacteriano consegue se manter viável, pois esse terço possui mais espaço e, conseqüentemente, tem mais oxigênio e menos competição, quando comparado aos terços médio e apical. O hipoclorito de sódio apresentou um comportamento diverso, para o qual prevaleceu a presença de material depositado sobre a superfície da dentina e foi observado desgaste da mesma. Isso se deve, provavelmente, à conjugação da ação oxidante e da capacidade de dissolução da matéria orgânica do hipoclorito de sódio (ESTEVES; FROES, 2013; SILVA; MONTEIRO; BELLADONNA, 2015; RÔÇAS et al., 2016).

No terço médio, o grupo do PBS, como esperado, apresentou características diferentes em relação aos outros três, com um maior número de micro-organismos sobre a superfície da dentina que se mostrava intacta. Para os outros grupos, exceto para o do monopersulfato de potássio composto, há prevalência de material depositado sobre a dentina, cuja superfície mostrava-se degradada. As soluções de dicloroisocianurato de sódio e hipoclorito de sódio apresentam o mesmo princípio ativo, o cloro, com ações antimicrobianas semelhantes, mas com valores de pH diferentes (GALLANDAT et al., 2019; COATES, 1985). Em função disso, era esperado que os corpos de prova submetidos à ação dessas soluções, apresentassem grande similaridade entre si. Embora existam relatos na literatura de que a solução de dicloroisocianurato de sódio seja mais eficaz na eliminação de *E. faecalis* do que hipoclorito de sódio (ESTRELA et al., 1999; HELING et al., 2001), tal fato não foi aqui observado, uma vez que, aparentemente, não se verificou a presença de micro-organismos no grupo do hipoclorito de sódio, como observado nos grupos do dicloroisocianurato de sódio e da associação. É preciso frisar, contudo, que a concentração do hipoclorito de sódio era superior tanto à concentração da solução de dicloroisocianurato de sódio como à da associação. Além disso, a capacidade de desagregação da matéria orgânica, característica do hipoclorito de



sódio (ESTEVEES; FROES, 2013; SILVA; MONTEIRO; BELLADONNA, 2015; RÔÇAS et al., 2016), poderia ter contribuído para o desarranjo da estrutura do biofilme e, portanto, para a eliminação dos micro-organismos. Deve ser salientado ainda que, como demonstra o estudo de Bloomfield; Uso (1985), o dicloroisocianurato de sódio, quando empregado em baixas concentrações, poderia ser utilizado como solução irrigante endodôntica, devido à sua atividade antibacteriana.

O grupo do monopersulfato de potássio composto apresentou um comportamento diferente, uma vez que não foi observada a presença de material depositado sobre a dentina, a qual se apresentava intacta. A diversidade de comportamento deve-se, provavelmente, ao fato de que esse composto é um agente oxidante assimétrico capaz de produzir dois radicais com ação oxidante, sulfato e hidroxila (ZENG et al., 2020). Esse sal de potássio vem do ácido peroximonossulfúrico, amplamente utilizado como agente oxidante e se caracteriza como alternativa ao peróxido de hidrogênio e ao persulfato (GHANBARI, MORADI, 2017). Neste estudo, o monopersulfato de potássio composto revelou possuir atividade antimicrobiana, utilizado em uma concentração de 1%, a qual é o limite superior do intervalo preconizado por Kunanusont et al. (2020) que variou de 0,25 a 1%, a partir da avaliação de diferentes tempos de aplicação e concentrações.

Como esperado, no terço apical, para o grupo PBS, foi observada a presença de biofilme praticamente intacto. Nos grupos, ainda há, aparentemente, a presença de partes remanescentes de biofilmes previamente desarranjados pela ação das soluções irrigantes para os demais grupos. Como relatado anteriormente, para os grupos do dicloroisocianurato de sódio, associação e hipoclorito de sódio, foi verificada a presença de materiais depositados, possivelmente, dos cristais dos sais utilizados, além das superfícies de dentina degradadas. Para o hipoclorito de sódio, embora prevaleça o material depositado sobre a dentina, é possível verificar a presença de bactérias planctônicas. A presença de bactérias para todos os grupos era esperada, uma vez que existe a dificuldade imposta pela anatomia da região que dificulta a ação tanto do instrumental como das soluções irrigantes (ESTRELA et al., 2002a; PÉCORA et al., 2013). No caso do grupo do PBS, a presença do biofilme praticamente intacto era esperada, uma vez que essa solução não possui qualquer ação antimicrobiana.

As análises por microscopia confocal de fluorescência revelaram que o grupo da associação assegurou a maior quantidade de micro-organismos inviáveis, indicada pela coloração vermelha, ao passo que o PBS, a maior quantidade de células viáveis, indicada pela coloração verde, o que confirma os resultados obtidos por MEV. Embora haja a presença de células bacterianas nos grupos do monopersulfato de potássio composto e do

dicloroisocianurato de sódio, aparentemente, há uma prevalência da cor vermelha. O melhor resultado decorrente do grupo da associação deve-se, provavelmente, à potencialização da ação antimicrobiana decorrente da utilização em conjunto do monopersulfato de potássio composto com um composto clorado, no caso, o dicloroisocianurato de sódio (ZENG et al., 2020; ANIPSITAKIS; TUFANO; DIONYSIOU, 2008). Além disso, o monopersulfato de potássio composto tem um impacto significativo no metabolismo celular de *E. faecalis*, uma vez que as células têm que lidar com o estresse oxidativo, nesse caso, provocado pela liberação de oxigênio. O estresse oxidativo causa alteração do metabolismo dos ácidos graxos e a degradação do benzoato que estão ligados a importantes alterações na composição da membrana bacteriana. Tais alterações são evidenciadas pelas modificações na composição dos ácidos graxos da membrana e pela diminuição no nível de desmetilmenaquinona associado à membrana (PORTELA et al., 2014), facilitando a sua degradação. Além disso, o monopersulfato de potássio composto pode ser utilizado para inativação de bactérias e vírus, na presença ou ausência de material orgânico, sendo útil como antimicrobiano alternativo, o qual abrange o mercado de biossegurança de fazendas e hospitais (SONTHIPET; RUENPHET; TAKEHARA, 2018).

A quase totalidade da ausência de micro-organismos (tanto viáveis como não viáveis), observada nas imagens do grupo do hipoclorito de sódio, se deve possivelmente, à ação do cloro presente na solução e à capacidade de dissolução da matéria orgânica (ESTEVES; FROES, 2013; SILVA; MONTEIRO; BELLADONNA, 2015; RÔÇAS et al., 2016). Somado a isso, o hipoclorito de sódio apresenta um valor de pH >11 (GALLANDAT et al., 2019) e é capaz de promover alterações celulares biossintéticas que modificam a estrutura celular e provocam a destruição de fosfolipídios. Como mencionado, a sua ação de dissolução se dá pela presença de ácido hipocloroso, que leva à hidrólise e à degradação de aminoácidos (ESTRELA et al., 2002a).

Embora nenhuma solução tenha eliminado os micro-organismos em sua totalidade, os resultados obtidos são bastante promissores, uma vez que se verificou que as soluções investigadas e sua associação apresentam atividade antimicrobiana. Por conseguinte, podem ser consideradas como potenciais soluções irrigantes para uso alternativo ao hipoclorito de sódio na terapia endodôntica, com base nos testes de avaliação antimicrobiana realizados. As análises qualitativas, por seu turno, indicaram que o grupo da associação de dicloroisocianurato de sódio e monopersulfato de potássio composto, aparentemente, apresentam menor poder de corrosão e maior quantidade de células inviáveis, quando comparado ao grupo do hipoclorito de sódio.

Cabe frisar ainda que a ação antimicrobiana das soluções avaliadas contra *E. faecalis* é realmente auspiciosa, uma vez que uma solução irrigante muito utilizada na endodontia, hidróxido de cálcio, tem uma ação deficiente contra esse micro-organismo. Há relatos na literatura acerca da formação de biofilme no SCR nos casos em que o hidróxido de cálcio foi administrado, o que pode ser atribuído ao mecanismo de ação da bomba de prótons (DISTEL; HATTON; GILLESPIE, 2002; NERY et al., 2012; FARAC et al., 2013). Esse mecanismo de defesa da bactéria permite a acidificação do citoplasma bacteriano (EVANS et al., 2002) quando em meio de pH alcalino.

Entretanto, ainda serão necessários outros estudos e experimentos complementares, tais como avaliação de outras concentrações dessas soluções e de suas respectivas citotoxicidades, estudos do efeito dessas soluções na interação dos materiais obturadores com a dentina. A investigação desses aspectos visa assegurar sua ação antimicrobiana contra biofilmes e, concomitantemente, a biocompatibilidade e a baixa citotoxicidade de tais soluções.

## 6 CONCLUSÃO

Diante dos resultados obtidos, é possível concluir que:

A concentração inibitória mínima (CIM) e a concentração bactericida mínima (CBM) da solução da associação de dicloroisocianurato de sódio e de monopersulfato de potássio composto apresentaram os menores valores em comparação às demais.

As soluções de hipoclorito de sódio, dicloroisocianurato de sódio, monopersulfato de potássio composto e a associação das duas últimas apresentaram atividade antimicrobiana.

Os resultados obtidos indicaram que as soluções de dicloroisocianurato de sódio, monopersulfato de potássio composto e a sua associação, potencialmente, poderiam ser utilizadas como soluções irrigantes alternativas à solução de hipoclorito de sódio, em relação à avaliação de atividade antimicrobiana.

A análise estatística do número de UFC de *E. faecalis* demonstrou que todos os grupos eram estatisticamente semelhantes entre si e diferentes do controle negativo.

Embora todos os grupos sejam estatisticamente semelhantes entre si, exceto o PBS, o grupo da associação de dicloroisocianurato de sódio e de monopersulfato de potássio composto apresentou um percentual de redução do número de UFC de *E. faecalis* de 99,76% quando comparado ao grupo PBS. Quando comparado ao hipoclorito de sódio, o grupo da associação das soluções apresentou uma redução 10,20% maior do número de UFC de *E. faecalis*.

A análise por MEV mostrou alterações morfológicas da superfície da dentina intrarradicular que sofreu desgaste pela ação das soluções que continham compostos clorados (hipoclorito de sódio, dicloroisocianurato de sódio e associação de dicloroisocianurato de sódio e de monopersulfato de potássio composto). Essa técnica também revelou a manutenção da estrutura do biofilme, no caso do PBS, principalmente nas regiões cervical e apical.

A análise por microscopia confocal de fluorescência demonstrou haver maior viabilidade celular para o grupo PBS e menor viabilidade celular para o grupo da associação de dicloroisocianurato de sódio e de monopersulfato de potássio composto. Para os grupos restantes, a prevalência foi de quantidade de células inviáveis, com exceção ao grupo do hipoclorito de sódio, para o qual não foi observada a presença nem de células viáveis, nem de inviáveis.

Nenhuma das soluções foi capaz de eliminar completamente o biofilme de *E. faecalis*.

## REFERÊNCIAS

- AIRES, C. P.; BATISTA, M. J. A.; PITONDO-SILVA, A. Decrease of ceftriaxone susceptibility in *Klebsiella pneumoniae* according to biofilm maturation. **J. Glob. Antimicrob. Resist.**, v. 9, p. 126, 2017.
- AKPATA, E. S. Effect of endodontic procedures on the population of viable microorganisms in the infected root canal. **J. Endod.**, v. 2, n. 12, p. 369-373, 1976.
- ANDERSON, A. C.; HELLWIG, E.; VESPERMANN, R.; WITTMER, A.; SCHMID, M.; KARYGIANNI, L.; AL-AHMAD, A. Comprehensive analysis of secondary dental root canal infections: a combination of culture and culture-independent approaches reveals new insights. **PloS one**, v. 7, n. 11, 2012.
- ANIPSITAKIS, G. P.; TUFANO, T. P.; DIONYSIOU, D. D. Chemical and microbial decontamination of pool water using activated potassium peroxymonosulfate. **Water research**, v. 42, n. 12, p. 2899-2910, 2008.
- ARIAS-MOLIZ, M. T.; FERRER-LUQUE, C. M.; ESPIGARES-GARCÍA, M.; BACA, P. *Enterococcus faecalis* biofilms eradication by root canal irrigants. **J. Endod.**, v. 35, n. 5, p. 711-714, 2009.
- ARIAS-MOLIZ, M. T.; ORDINOLA-ZAPATA, R.; BACA, P.; RUIZ-LINARES, M.; FERRER-LUQUE, C. M. Antimicrobial activity of a sodium hypochlorite/etidronic acid irrigant solution. **J. Endod.**, v. 40, n. 12, p. 1999-2002, 2014.
- BAIK, J. E.; JANG, K. S.; KANG, S. S.; YUN, C. H.; LEE, K.; KIM, B. G.; HAN, S. H. Calcium hydroxide inactivates lipoteichoic acid from *Enterococcus faecalis* through deacylation of the lipid moiety. **J. Endod.**, v. 37, n. 2, p. 191-196, 2011.
- BALDISSERA, R.; ROSA, R. A. D.; WAGNER, M. H.; KUGA, M. C.; GRECCA, F. S.; BODANEZI, A.; SÓ, M. V. R. Adhesion of real seal to human root dentin treated with different solutions. **Braz. Dent. J.**, v. 23, n. 5, p. 521-526, 2012.
- BERBER, V. B.; GOMES, B. P. F. A.; SENA, N. T.; VIANNA, M. E.; FERRAZ, C. C. R.; ZAIA, A. A.; SOUZA-FILHO, F. J. Efficacy of various concentrations of NaOCl and instrumentation techniques in reducing *Enterococcus faecalis* within root canals and dentinal tubules. **Int. Endod. J.**, v. 39, n. 1, p. 10-17, 2006.
- BLOOMFIELD, S. F.; USO, E. E. The antibacterial properties of sodium hypochlorite and sodium dichloroisocyanurate as hospital disinfectants. **J. Hosp. Infect.**, v. 6, n. 1, p. 20-30, 1985.
- BOLLA, N.; NALLI, S. M.; KUMAR, K. K.; RAJ, S. Cytotoxic evaluation of two chlorine-releasing irrigating solutions on cultured human periodontal ligament fibroblasts. **J. Dr. NTR Univ. Health Sci.**, v. 2, n. 1, p. 42, 2013.

- BRITO, P. R. R.; SOUZA, L. C.; DE OLIVEIRA, J. C. M.; ALVES, F. R.; DE-DEUS, G.; LOPES, H. P.; SIQUEIRA JR, J. F. Comparison of the effectiveness of three irrigation techniques in reducing intracanal *Enterococcus faecalis* populations: an in vitro study. **J. Endod.**, v. 35, n. 10, p. 1422–1427, 2009.
- BRYCE, G.; O'DONNELL, D.; READY, D.; NG, Y. L.; PRATTEN, J.; GULABIVALA, K. Contemporary root canal irrigants are able to disrupt and eradicate single-and dual-species biofilms. **J. Endod.**, v. 35, n. 9, p. 1243-1248, 2009.
- CALLAHAN, J. R. Sulfuric acid for opening root-canals. **Am. J. Dent. Sci.**, v. 28, n. 12, p. 564, 1895.
- CÁRDENAS-BAHENA, Á.; SÁNCHEZ-GARCÍA, S.; TINAJERO-MORALES, C.; GONZÁLEZ-RODRÍGUEZ, V. M.; BAIREZ-VÁRGUEZ, L. Use of sodium hypochlorite in root canal irrigation. Opinion survey and concentration in commercial products. **Rev. Odontol. (B Aires)**, v. 16, n. 4, p. 252-258, 2012.
- CARR, G. B.; SCHWARTZ, R. S.; SCHAUDINN, C.; GORUR, A.; COSTERTON, J. W. Ultrastructural examination of failed molar retreatment with secondary apical periodontitis: an examination of endodontic biofilms in an endodontic retreatment failure. **J. Endod.**, v. 35, n. 9, p. 1303-1309, 2009.
- CASE, P. D.; BIRD, P. S.; KAHLER, W. A.; GEORGE, R.; WALSH, L. J. Treatment of root canal biofilms of *Enterococcus faecalis* with ozone gas and passive ultrasound activation. **J. Endod.**, v. 38, n. 4, p. 523-526, 2012.
- CHANG, Y. C.; HUANG, F. M.; TAI, K. W.; CHOU, M. Y. The effect of sodium hypochlorite and chlorhexidine on cultured human periodontal ligament cells. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, v. 92, n. 4, p. 446-450, 2001.
- COATES, D. A comparison of sodium hypochlorite and sodium dichloroisocyanurate products. **J. Hosp. Infect.**, v. 6, n. 1, p. 31-40, 1985.
- COATES, D. Comparison of sodium hypochlorite and sodium dichloroisocyanurate disinfectants: neutralization by serum. **J. Hosp. Infect.**, v. 11, n. 1, p. 60-67, 1988.
- CUNHA, A. C.; PAIXÃO, F. M. D.; DE SOUZA, M. C. B.; FERREIRA, V. F. Cloreto isocianúrico e cloreto cianúrico: aspectos gerais e aplicações em síntese orgânica. **Química Nova**, v. 29, n. 3, p. 520-527, 2006.
- DA CRUZ CAMPOS, M. I.; CAMPOS, C. N.; VITRAL, R. W. F. O uso de dentes bovinos como substitutos de dentes humanos em pesquisas odontológicas: uma revisão da literatura. **Pesqui Bras Odontopediatria Clin Integr.**, v. 8, n. 1, p. 127-132, 2008.
- DE MEYER, S.; MEIRE, M. A.; COENYE, T.; DE MOOR, R. J. G. Effect of laser-activated irrigation on biofilms in artificial root canals. **Int. Endod. J.**, v. 50, n. 5, p. 472-479, 2017.

DEL CARPIO-PEROCHENA, A. E.; BRAMANTE, C. M.; DUARTE, M. A.; CAVENAGO, B. C.; VILLAS-BOAS, M. H.; GRAEFF, M. S.; ORDINOLA-ZAPATA, R. Biofilm dissolution and cleaning ability of different irrigant solutions on intraorally infected dentin. **J. Endod.**, v. 37, n. 8, p. 1134-1138, 2011.

DISTEL, J. W.; HATTON, J. F.; GILLESPIE, M. J. Biofilm formation in medicated root canals. **J. Endod.**, v. 28, n. 10, p. 689-693, 2002.

DONLAN, R. M. Biofilms: Microbial Life on Surfaces. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 8, n. 9, p. 881 – 890, 2002.

DORNELLES-MORGENTAL, R.; GUERREIRO-TANOMARU, J. M.; DE FARIAJÚNIOR, N. B.; HUNGARO-DUARTE, M. A.; KUGA M. C.; TANOMARU-FILHO, M. Antibacterial efficacy of endodontic irrigating solutions and their combinations in root canals contaminated with *Enterococcus faecalis*. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, v. 112, n. 3, p. 396 – 400, 2011.

ESTEVEVES, D. L. S.; FROES, J. A. V. Soluções Irrigadoras em Endodontia-Revisão de Literatura. **Arq. Bras. Odontol.**, v. 9, n. 2, p. 48-53, 2013.

ESTRELA, C. R.; ESTRELA, C.; CARVALHO, A. L.; GONELLA, A. L. P. F.; PECORA, J. D. Controle microbiano e químico de diferentes soluções de hipoclorito de sódio. **Robrac.**, v. 11, n. 31, p. 16-21, 2002b.

ESTRELA, C.; BAMMANN, L. L.; PIMENTA, F. C.; PÉCOR, J. D. Control of microorganisms in vitro by calcium hydroxide pastes. **Int. Endod. J.**, v. 34, n. 5, p. 341-345, 2001.

ESTRELA, C.; ESTRELA, C. R.; BARBIN, E. L.; SPANÓ, J. C.; MARCHESAN, M. A.; PÉCOR, J. D. Mechanism of Action of sodium hypochlorite. **Braz. Dent. J.**, v. 13, n. 2, p. 113-117, 2002a.

ESTRELA, C.; HOLLAND, R.; ESTRELA, C. R.; ALENCAR, A. H.; SOUSA-NETO, M. D.; PÉCOR, J. D. Characterization of successful root canal treatment. **Braz. Dent. J.**, v. 25, n. 1, p. 3-11, 2014.

ESTRELA, C.; PIMENTA, F. C.; ITO, I. Y.; BAMMANN, L. L. In vitro determination of direct antimicrobial effect of calcium hydroxide. **J. Endod.**, v. 24, n. 1, p. 15-17, 1998.

ESTRELA, C.; PIMENTA, F. C.; ITO, I. Y.; BAMMANN, L. L. Antimicrobial evaluation of calcium hydroxide in infected dentinal tubules. **J. Endod.**, v. 25, n. 6, p. 416-418, 1999.

ESTRELA, C.; SOUSA-NETO, M. D.; ALVES, D. R. S.; ALENCAR, A. H. G.; SANTOS, T. O.; PÉCOR, J. D. A preliminary study of the antibacterial potential of cetylpyridinium chloride in root canals infected by *E. faecalis*. **Braz. Dent. J.**, v. 23, n. 6, p. 645-653, 2012.

- EVANS, M.; DAVIES, J. K.; SUNDQVIST, G.; FIGDOR, D. Mechanisms involved in the resistance of *Enterococcus faecalis* to calcium hydroxide. **Int. Endod. J.**, v. 35, n. 3, p. 221–228, 2002.
- FARAC, R. V.; PIZZOLITTO, A. C.; TANOMARU, J. M. G.; MORGENTAL, R. D.; LIMA, R. K. D. P.; BONETTI-FILHO, I. Ex-vivo effect of intracanal medications based on ozone and calcium hydroxide in root canals contaminated with *Enterococcus faecalis*. **Braz. Dent. J.**, v. 24, n. 2, p. 103-106, 2013.
- FERREIRA, T. G. **Efeito de desinfetantes hospitalares sobre células vegetativas e esporos de ribotipos de Clostridium Difficile isolados exclusivamente no Brasil.** 2012. Dissertação (Mestrado em Ciências Aplicadas a Produtos)- Universidade Federal Fluminense, Niterói, Rio de Janeiro. 2012.
- FERRER-LUQUE, C. M.; BEJARANO, I.; RUIZ-LINARES, M.; BACA, P. Reduction in *Enterococcus faecalis* counts—a comparison between rotary and reciprocating systems. **Int. Endod. J.**, v. 47, n. 4, p. 380-386, 2014.
- GALLANDAT, K.; STACK, D.; STRING, G.; LANTAGNE, D. Residual Maintenance Using Sodium Hypochlorite, Sodium Dichloroisocyanurate, and Chlorine Dioxide in Laboratory Waters of Varying Turbidity. **Water**, v. 11, n. 6, p. 1309, 2019.
- GHANBARI, F.; MORADI, M. Application of peroxymonosulfate and its activation methods for degradation of environmental organic pollutants. **Chem. Eng. J.**, v. 310, p. 41-62, 2017.
- GIARDINO, L.; ESTRELA, C.; MOHAMMADI, Z.; PALAZZI, F. Antibacterial power of sodium hypochlorite combined with surfactants and acetic acid. **Braz. Dent. J.**, v. 25, n. 4, p. 289-294, 2014.
- GOMES, B. P.; PINHEIRO, E. T.; JACINTO, R. C.; ZAIA, A. A.; FERRAZ, C. C.; SOUZA-FILHO, F. J. Microbial analysis of canals of root-filled teeth with periapical lesions using polymerase chain reaction. **J. Endod.**, v. 34, n. 5, p. 537-540, 2008.
- GOMES, B. P.; PINHEIRO, E. T.; SOUSA, E. L.; JACINTO, R. C.; ZAIA, A. A.; FERRAZ, C. C. R.; DE SOUZA-FILHO, F. J. *Enterococcus faecalis* in dental root canals detected by culture and by polymerase chain reaction analysis. **Oral Surg. Oral Radiol. Endod.**, v. 102, n. 2, p. 247–253, 2006.
- GOULART, R. S. **Avaliação da atividade antimicrobiana de nanopartículas de prata associadas ao laser de diodo de 980 nm em biofilme de *Enterococcus faecalis*.** 2019. Dissertação (Mestrado em Odontologia) – Universidade de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, 2019.
- GU, Y.; LU, Q.; WANG, H.; DING, Y.; WANG, P.; NI, L. Root Canal Morphology of Permanent Threerooted Mandibular First Molars—Part I: Pulp Floor and Root Canal System. **J. Endod.**, v. 36, n. 6, p. 990-994, 2010.



- GULABIVALA, K.; PATEL, B.; EVANS, G.; NG, Y. L. Effects of mechanical and chemical procedures on root canal surfaces. **Endodontic Topics**, v. 10, n. 1, p. 103-122, 2005.
- HAAPASALO, M.; ENDAL, U.; ZANDI, H.; COIL, J. M. Eradication of endodontic infection by instrumentation and irrigation solutions. **Endodontic topics**, v. 10, n. 1, p. 77-102, 2005.
- HAAPASALO, M.; QIAN, W.; PORTENIER, I.; WALTIMO, T. Effects of dentin on the antimicrobial properties of endodontic medicaments. **J. Endod.**, v. 33, n. 8, p. 917-925, 2007.
- HAAPASALO, MARKUS; SHEN, Y. A.; RICUCCI, DOMENICO. Reasons for persistent and emerging post-treatment endodontic disease. **Endodontic topics**, v. 18, n. 1, p. 31-50, 2008.
- HELING, I.; ROTSTEIN, I.; DINUR, T.; SZWEC-LEVINE, Y.; STEINBERG, D. Bactericidal and cytotoxic effects of sodium hypochlorite and sodium dichloroisocyanurate solutions in vitro. **J. Endod.**, v. 27, n. 4, p. 278-280, 2001.
- IMFELD, T. Comparison of the mechanical effects of a toothbrush and standard abrasive on human and bovine dentine in vitro. **J. Clin. Dent.**, v. 12, n. 4, p. 92-96, 2001.
- JETT, B. D.; HUYCKE, M. M.; GILMORE, M. S. Virulence of enterococci. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 7, n. 4, p. 462-478, 1994.
- JOHNSON, E. M.; FLANNAGAN, S. E.; SEDGLEY, C. M. Coaggregation interactions between oral and endodontic *Enterococcus faecalis* and bacterial species isolated from persistent apical periodontitis. **J. Endod.**, v. 32, n. 10, p. 946-50, 2006.
- JOSHI, S. G.; PAFF, M.; FRIEDMAN, G.; FRIDMAN, G.; FRIDMAN, A.; BROOKS, A. D. Control of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in planktonic form and biofilms: A biocidal efficacy study of nonthermal dielectric-barrier discharge plasma. **Am. J. Infect. Control**, v. 38, n. 4, p. 293-301, 2010.
- KASIĆ, S.; KNEZOVIĆ, M.; BEADER, N.; GABRIĆ, D.; MALČIĆ, A. I.; BARABA, A. Efficacy of three different lasers on eradication of *Enterococcus faecalis* and *Candida albicans* biofilms in root canal system. **Photomed. Laser Surg.**, v. 35, n. 7, p. 372-377, 2017.
- KAUFMAN, B.; SPANGBERG, L.; BARRY, J.; FOUAD, A. F. *Enterococcus* spp. In endodontically treated teeth with and without periradicular lesions. **J. Endod.**, v. 31, n. 12, p. 851-856, 2005.
- KAWASHIMA, N.; WADACHI, R.; SUDA, H.; YENG, T.; PARASHOS, P. Root canal medicaments. **Int. Dent J.**, v. 59, n. 1, p. 5-11, 2009.
- KAYAOGU, G.; ØRSTAVIK, D. Virulence factors of *Enterococcus faecalis*: relationship to endodontic disease. **Crit. Rev. Oral Biol. Med.**, v. 15, n. 5, p. 308-320, 2004.

KISHEN, A.; HAAPASALO, M. Biofilm models and methods of biofilm assessment. **Endodontic Topic**, v. 22, n. 1, p. 58-78, 2010.

KUMAR, J. A.; CADNUM, J. L.; JENCSON, A. L.; DONSKEY, C. J. Are reduced concentrations of chlorine-based disinfectants effective against *Candida auris*?. **Am. J Infect. Control.**, v. 48, p. 448-450, 2019.

KUNANUSONT, N.; PUNYADARSANIYA, D.; JANTAFONG, T.; POJPRASATH, T.; TAKEHARA, K.; RUENPHET, S. Bactericidal efficacy of potassium peroxymonosulfate under various concentrations, organic material conditions, exposure timing and its application on various surface carriers. **J. Vet. Med. Sci.**, p. 19-0562, 2020.

LACERDA, M. F. L. S.; COUTINHO, T. M.; BARROCAS, D.; RODRIGUES, J. T.; VIDAL, F. Infecção secundária e persistente e sua relação com o fracasso do tratamento endodôntico. **Rev. Bras. Odontol.**, v. 73, n. 3, p. 212, 2016.

LEE, S. H.; BAEK, D. H. Antibacterial and neutralizing effect of human  $\beta$ -defensins on *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecalis* lipoteichoic acid. **J. Endod.**, v. 38, n. 3, p. 351-356, 2012.

LEONI, G. B.; VERSIANI, M. A.; PÉCORA, J. D.; SOUSA-NETO, M. D. Micro-computed tomographic analysis of the root canal morphology of mandibular incisors. **J. Endod.**, v. 40, n. 5, p.710-716, 2014.

LEONI, G. B.; VERSIANI, M. A.; SILVA-SOUSA, Y. T.; BRUNIERA, J. F. B.; PÉCORA, J. D.; SOUSA-NETO, M. D. D. Ex vivo evaluation of four final irrigation protocols on the removal of hard-tissue debris from the mesial root canal system of mandibular first molars. **Int. Endod. J.**, v. 50, n. 4, p. 398-406, 2017.

LOPES, H. P.; SIQUEIRA, JR. **Endodontia: biologia e técnica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010.

LOVE, R. M. *Enterococcus faecalis*—a mechanism for its role in endodontic failure. **Int. Endod. J.**, v. 34, n. 5, p. 399-405, 2001.

MARTIN, H.; SPRING, S. Quantitative bactericidal effectiveness of na old and new endodontic irrigant. **J. Endod.**, v. 1, n. 5, p. 164-167, 1975.

MOHAMMADI, Z.; JAFARZADEH, H.; SHALAVI, S. Unusual Root Canal Irrigation Solutions. **J. Contemp. Dent. Pract.**, v. 18, n. 5, p. 415-420, 2017.

MONROE, D. Looking for chinks in the armor of bacterial biofilms. **PLoS biology**, v. 5, n. 11, p. 2458-2461, 2007.

MOSLEHIFARD, E.; LOTFIPOUR, F.; ANARAKI, M. R.; SHAFEE, E.; TAMJID-SHABESTARI, S.; GHAFFARI, T. Efficacy of disinfection of dental stone casts: virkon versus sodium hypochlorite. **J. Dent. (Shiraz)**, v. 12, n. 3, p. 206, 2015.

- NAIR, P. N.; HENRY, S.; CANO, V.; VERA, J. Microbial status of apical root canal system of human mandibular first molars with primary apical periodontitis after “onevisit” endodontic treatment. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, v. 99, n. 2, p. 231-252, 2005.
- NERY, M. J.; CINTRA, L. T. A.; GOMES-FILHO, J. E.; DEZAN-JUNIOR, E.; OTOBONI-FILHO, J. A.; SIVIERI-ARAUJO, G.; SALZEDAS, L. M. P. Estudo longitudinal do sucesso clínico-radiográfico de dentes tratados com medicação intracanal de hidróxido de cálcio. **Rev. Odontol. UNESP**, v. 41, n. 6, p. 396-401, 2012.
- NAKAMICHI, I.; IWAKU, M.; FUSAYAMA, T. Bovine teeth as possible substitutes in the adhesion test. **J. Dent. Res.**, v. 62, n. 10, p. 1076-1081, 1983.
- OLIVEIRA, J. S.; RAUCCI NETO, W.; FARIA, N. S. D.; FERNANDES, F. S.; MIRANDA, C. E. S.; RACHED-JUNIOR, F. J. A. Quantitative assessment of root canal roughness with calcium-based hypochlorite irrigants by 3D CLSM. **Braz. Dent. J.**, v. 25, n. 5, p. 409-415, 2014.
- ØRSTAVIK, D.; HAAPASALO, M. Disinfection by endodontic irrigants and dressings of experimentally infected dentinal tubules. **Dent. Traumat.**, v. 6, n. 4, p. 142-149, 1990.
- ÖTER, B.; TOPÇUOĞLU, N.; TANK, M.K.; ÇEHRELI, S.B. Evaluation of Antibacterial Efficiency of Different Root Canal Disinfection Techniques in Primary Teeth. **Photomed Laser Surg.**, v. 36, n. 4, p. 179-184, 2018.
- PAN, J.; SUN, K.; LIANG, Y.; SUN, P.; YANG, X.; WANG, J.; BECKER, K. H. **J. Endod.**, v. 39, n. 1, p. 105-110, 2013.
- PAQUÉ, F.; GANAHL, D.; PETERS, O. A. Effects of root canal preparation on apical geometry assessed by micro-computed tomography. **J. Endod.**, v. 35, n. 7, p. 1056-1059, 2009.
- PÉCORÁ, J. D.; ESTRELA, C.; BUENO, M. R.; PORTO, O. C.; ALENCAR, A. H.; SOUSA-NETO, M. D.; ESTRELA, C. R. Detection of root canal isthmus in molars by map-reading dynamic using CBCT images. **Braz. Dent. J.**, v. 24, n. 6, p. 569-574, 2013.
- PÉCORÁ, J. D.; SOUZA NETO, M. D. D.; ESTRELA, C. Soluções auxiliares do preparo do canal radicular. In: **Endodontia: princípios biológicos e mecânicos**, p. 551-69, 1999;
- PERCIVAL, S. L.; MALIC, S.; CRUZ, H.; WILLIAMS, D. W. Introduction to biofilms. **Biofilms and veterinary medicine**. Springer, Berlin, Heidelberg, v.6, p. 41-68, 2011.
- PITONDO-SILVA, A.; GONÇALVES, G. B.; STEHLING, E. G. Heavy metal resistance and virulence profile in *Pseudomonas aeruginosa* isolated from Brazilian soils. **Apmis**, v. 124, n. 8, p. 681-688, 2016.

- PLADISAI, P.; AMPORNARAMVETH, R. S.; CHIVATXARANUKUL, P. Effectiveness of Different Disinfection Protocols on the Reduction of Bacteria in *Enterococcus faecalis* Biofilm in Teeth with Large Root Canals. **J. Endod.**, v. 42, n. 3, p. 460–464, 2016.
- PORTELA, C. A.; SMART, K. F.; TUMANOV, S.; COOK, G. M.; VILLAS-BÔAS, S. G. **J. Bact.**, v. 196, n. 11, p. 2012-2022, 2014.
- PORTENIER, I.; WALTIMO, T. M.; HAAPASALO, M. *Enterococcus faecalis*—the root canal survivor and ‘star’ in post-treatment disease. **Endodontic topics**, v. 6, n. 1, p. 135-159, 2003.
- PRETEL, H.; BEZZON, F.; FALEIROS, F. B. C.; DAMETTO, F. R.; VAZ, L. G. Comparação entre soluções irrigadoras na endodontia: clorexidina x hipoclorito de sódio. **RGO**, v. 59, p. 127-132, 2011.
- REEVES, G. W.; FITCHIE, J. G.; HEMBREE, J. H.; PUCKETT, A. D. Microleakage of new dentin bonding systems using human and bovine teeth. **Operative dentistry**, v. 20, n. 6, p. 230-230, 1995.
- REIS, A. F.; GIANNINI, M.; KAVAGUCHI, A.; SOARES, C. J.; LINE, S. R. Comparison of microtensile bond strength to enamel and dentin of human, bovine, and porcine teeth. **J. Adhes Dent.**, v.6, n. 2, p. 117-121, 2004.
- RICHARDS, M. J.; EDWARDS, J. R.; CULVER, D. H.; GAYNES, R. P. Nosocomial infections in combined medicalsurgical intensive care units in the United States. **Infect. Control. Hosp. Epidemiol.**, v. 21, n. 8, p. 510–515, 2000.
- RING, K. C.; MURRAY, P. E.; NAMEROW, K. N. The Comparison of the Effect of Endodontic Irrigation on Cell Adherence to Root Canal Dentin. **J. Endod.**, v. 34, n. 12, p. 1474–9, 2008.
- RÔÇAS, I. N.; PROVENZANO, J. C.; NEVES, M. A.; SIQUEIRA JR, J. F. Disinfecting effects of rotary instrumentation with either 2.5% sodium hypochlorite or 2% chlorhexidine as the main irrigant: a randomized clinical study. **J. Endod.**, v. 42, n. 6, p. 943-947, 2016.
- RÔÇAS, I. N.; SIQUEIRA JR, J. F.; SANTOS, K. R. N. Association of *Enterococcus faecalis* with different forms of periradicular diseases. **J. Endod.**, v. 30, n. 5, p. 315-320, 2004.
- ROSSI-FEDELE, G.; DOĞRAMACI, E. J.; GUASTALLI, A. R.; STEIER, L.; DE FIGUEIREDO, J. A. P. Antagonistic interactions between sodium hypochlorite, chlorhexidine, EDTA, and citric acid. **J. Endod.**, v. 38, n. 4, p. 426-431, 2012.
- SALAS, M. M.; DE LA CASA, M. L.; DE LOS ÁNGELES BULACIO, M.; MANLLA, A. M.; LÓPEZ, M. E. Contenido químico de soluciones después de la irrigación del conducto radicular dentario. **Acta Bioquím. Clín. Latinoam.**, v. 46, n. 4, p. 613-623, 2012.
- SANTOS, R. P.; ARRUDA, T. T.; CARVALHO, C. B.; CARNEIRO, V. A.; BRAGA, L. Q.; TEIXEIRA, E. H.; BEZERRA, G. A. Correlation between *Enterococcus faecalis* biofilms

development stage and quantitative surface roughness using atomic force microscopy. **Microsc. Microanal.**, v. 14, n. 2, p. 150-158, 2008.

SASANAKUL, P.; AMPORNARAMVETH, R. S.; CHIVATXARANUKUL, P. Influence of adjuncts to irrigation in the disinfection of large root canals. **J. Endod.**, v. 45, n. 3, p. 332-337, 2019.

SATHORN, C.; PARASHOS, P.; MESSER, H. Antibacterial efficacy of calcium hydroxide intracanal dressing: a systematic review and meta-analysis. **Int. Endod. J.**, v. 40, n. 1, p. 2-10, 2007.

SCELZA, M. Z.; LINHARES, A. B.; DA SILVA, L. E.; GRANJEIRO, J. M.; ALVES, G. G. A multiparametric assay to compare the cytotoxicity of endodontic sealers with primary human osteoblasts. **Int. Endod. J.**, v. 45, n. 1, p. 12-18, 2012.

SEDGLEY, C. M.; MOLANDER, A.; FLANNAGAN, S. E.; NAGEL, A. C.; APPELBE, O. K.; CLEWELL, D. B.; DAHLÉN, G. Virulence, phenotype and genotype characteristics of endodontic Enterococcus spp. **Oral Microbiol. Immunol.**, v. 20, n. 1, p. 10-19, 2005.

SEDLACEK, M. J.; WALKER, C. Antibiotic resistance in an in vitro subgingival biofilm model. **Oral Microbiol. Immunol.**, v. 22, n. 5, p. 333-339, 2007.

SHEN, Y.; STOJICIC, S.; HAAPASALO, M. Antimicrobial efficacy of chlorhexidine against bacteria in biofilms at different stages of development. **J. Endod.**, v. 37, n. 5, p. 657-661, 2011.

SILVA, E. J.; MONTEIRO, M. R.; BELLADONNA, F. G. Postoperative pain after foraminal instrumentation with a reciprocating system and different irrigating solutions. **Braz. Dent. J.**, v. 26, n. 3, p. 216-221, 2015.

SILVA, E. J. N. L.; CARVALHO, N. K.; PRADO, M. C.; SENNA, P. M.; SOUZA, E. M.; DE-DEUS, G. Bovine teeth can reliably substitute human dentine in an intra-tooth push-out bond strength model?. **Int. Endod. J.**, v. 52, n. 7, p. 1063-1069, 2019.

SIQUEIRA JR, J. F.; LOPES, H. P. Medicação intracanal. **Lopes HP, Siqueira JR JF. Endodontia: biologia e técnica**, v. 2, p. 581-618, 2004.

SIQUEIRA JR, J. F.; RÔÇAS, I. N. Polymerase chain reaction–based analysis of microorganisms associated with failed endodontic treatment. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, v. 97, n. 1, p. 85-94, 2004.

SIQUEIRA JR, J. F.; RÔÇAS, I. N. Present status and future directions in endodontic microbiology. **Endodontic topics**, v. 30, n. 1, p. 3-22, 2014.

SJÖGREN, U.; FIGDOR, D.; PERSSON, S.; SUNDQVIST, G. Influence of infection at the time of root filling on the outcome of endodontic treatment of teeth with apical periodontitis. **Int. Endod. J.**, v. 30, n. 5, p. 297-306, 1997.

- SONTHIPET, S.; RUENPHET, S.; TAKEHARA, K. Bactericidal and virucidal efficacies of potassium monopersulfate and its application for inactivating avian influenza virus on virus-spiked clothes. **J. Vet. Med. Sci.**, p. 17-0599, 2018.
- SOUSA-NETO, M. D. D; SILVA-SOUSA, Y. C.; MAZZI-CHAVES, J. F.; CARVALHO, K. K. T.; BARBOSA, A. F. S.; VERSIANI, M. A.;LEONI, G. B. Root canal preparation using micro-computed tomography analysis: a literature review. **Brazilian oral research**, v. 32, p. 20-43, 2018.
- SOUZA, L. C.; BRITO, P. R.; DE OLIVEIRA, J. C.; ALVES, F. R.; MOREIRA, E. J.; SAMPAIO-FILHO, H. R.; ROCAS, I. N.; SIQUEIRA, J. F. Photodynamic therapy with two different photosensitizers as a supplement to instrumentation/irrigation procedures in promoting intracanal reduction of enterococcus faecalis. **J. Endod.**, v. 36, n. 2, p. 292-296, 2010.
- SOUZA, R. E.; SOUZA, E. A.; MORAES, I. G. Avaliação da remoção de debris após irrigação com EDTA 17% e EGTA 1% associados ao hipoclorito de sódio 1%—análise histológica. **Rev. Odonto Ciênc.**, v. 20, n. 47, p. 11-17, 2005.
- STABHOLZ, A.; ZELTSER, R.; SELA, M.; PERETZ, B.; MOSHONOV, J.; ZISKIND, D. The use of lasers in dentistry: principles of operation and clinical applications. **Compendium (Jamesburg)**, v. 24, n. 12, p. 935-948, 2003.
- STUART, C. H.; SCHWARTZ, S. A.; BEESON, T. J.; OWATZ, C. B. Enterococcus faecalis: Its role in root canal treatment failure and current concepts in retreatment. **J. Endod.**, v. 32, n. 2, p. 93-98, 2006.
- SUNDE, P. T.; OLSEN, I.; DEBELIAN, G. J.; TRONSTAD, L. Microbiota of periapical lesions refractory to endodontic therapy. **J. Endod.**, v. 28, n. 4, p. 304–310, 2002.
- SUNDQVIST, G.; FIGDOR, D.; PERSSON, S.; SJÖGREN, U. Microbiologic analysis of teeth with failed endodontic treatment and the outcome of conservative retreatment. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, v. 85, n. 1, p. 86-93, 1998.
- SVENSÄTER, G.; BERGENHOLTZ, G. Biofilms in endodontic infections. **Endodontic topics**, v. 9, n. 1, p. 27-36, 2004.
- TIANFENG, D. U.; ZHEJUN WANG.; YA SHEN.; JINGZHI, M. A.; YINGGUANG C. A.O.; MARKUS HAAPASALO. Effect of Long-term Exposure to Endodontic Disinfecting Solutions on Young and Old Enterococcus faecalis. **J. Endod.**, v. 40, n. 4, p. 509-514, 2014.
- TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 10. ed. Porto Alegre, RS: Artmed, 2012. XXVIII, 174 p. Cap. 6.
- TREVINO, E. G.; PATWARDHAND, A. N.; HENRY, M. A. Effects of irrigants on the survival of human stem cells of the apical papilla in a platelet-rich plasma scaffold in human root tips. **J. Endod.**, v. 37, n. 8, p. 1109-15, 2011.

VALERA, M. C.; SILVA, K. C. G.; MAEKAWA, L. E.; CARVALHO, C. A. T.; KOGAITO, C. Y.; CAMARGO, C. H. R.; LIMA, R. S. Antimicrobial activity of sodium hypochlorite associated with intracanal medication for *Candida albicans* and *Enterococcus faecalis* inoculated in root canals. **J. Appl. Oral Sci.**, v. 17, n. 6, p. 555-559, 2009.

VERSIANI, M. A.; ORDINOLA-ZAPATA, R.; KELES, A.; ALCIN, H.; BRAMANTE, C. M.; PÉCOR, J. D.; SOUSA-NETO, M. D. Middle mesial canals in mandibular first molars: A micro-CT study in different populations. **Arch. Oral Biol.**, v. 61, n. 1, p.130-137, 2016.

VERSIANI, M. A.; PECORA, J. D.; SOUSA-NETO, M. D. Microcomputed tomography analysis of the root canal morphology of single-rooted mandibular canines. **Int. Endod. J.**, v.46, n. 2, p. 800-807, 2013.

WENNBERG, A. Biological evaluation of root canal antiseptics using in vitro and in vivo methods. **Eur. J. Oral Sci.**, v. 88, n. 1, p. 46-52, 1980.

WILLIAMSON, A. E.; CARDON, J. W.; DRAKE, D. R. Antimicrobial susceptibility of monoculture biofilms of a clinical isolate of *Enterococcus faecalis*. **J. Endod.**, v. 35, n. 1, p. 95-97, 2009.

YANG, G.; YUAN, G.; YUN, X.; ZHOU, X.; LIU, B.; WU, H. Effects of Two nickel-titanium instrument systems, Mtwo versus ProTaper universal, on root canal geometry assessed by micro-computed tomography. **J. Endod.**, v. 37, n. 10, p. 1412-1416, 2011.

YASSEN, G. H.; PLATT, J. A.; HARA, A. T. Bovine teeth as substitute for human teeth in dental research: a review of literature. **J. Oral Sci.**, v. 53, n. 3, p. 273-282, 2011.

ZEHNDER, M. Root Canal Irrigants. **J. Endod.**, v. 32, n. 5, p. 389-398, 2006.

ZENG, F; CAO, S.; JIN, W.; ZHOU, X.; DING, W.; TU, R.; DING, F. Inactivation of chlorine-resistant bacterial spores in drinking water using UV irradiation, UV/Hydrogen peroxide and UV/Peroxymonosulfate: Efficiency and mechanism. **J. Clean Prod.**, v. 243, p. 118666, 2020.