

Trabalho de Conclusão de Curso

Atividade antibiofilme da solução de nanopartículas de óxido de zinco

Morgana Thays Orsi



**Universidade Federal de Santa Catarina
Curso de Graduação em Odontologia**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
DEPARTAMENTO DE ODONTOLOGIA

Morgana Thays Orsi

ATIVIDADE ANTIBIOFILME DA SOLUÇÃO DE
NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE ZINCO

Trabalho apresentado à Universidade Federal de Santa Catarina, como
requisito para a conclusão do Curso de Graduação em Odontologia

Orientador: Prof. Dr. Wilson Tadeu Felipe

Co-orientadora: Ms. Josiane de Almeida

Florianópolis

2014

Morgana Thays Orsi

**ATIVIDADE ANTIBIOFILME DA SOLUÇÃO DE
NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE ZINCO**

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi julgado adequado para obtenção do título de cirurgião-dentista e aprovado em sua forma final pelo Departamento de Odontologia da Universidade Federal de Santa Catarina.

Florianópolis, 12 de Novembro de 2014.

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Wilson Tadeu Felipe

Orientador

Universidade Federal de Santa Catarina

Profa. Dra. Mara Cristina Santos Felipe

Membro

Universidade Federal de Santa Catarina

Profa. Dra. Andrea de Lima Pimenta

Membro

Universidade Federal de Santa Catarina

Dedico este trabalho aos meus pais e à minha família, pela confiança e paciência que sempre tiveram no decorrer destes cinco anos de faculdade. Aos meus professores e amigos de turma que compartilharam comigo esta maravilhosa experiência. Enfim, àqueles que torceram por mim e souberam entender os motivos de não poder estar sempre presente.

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, pelo dom da vida, a saúde e, principalmente, a perseverança. Por ter concedido a mim mais esta vitória e ter me carregado no colo nos momentos mais difíceis. Por me fazer compreender que tudo tem o seu tempo. Obrigada porque este é o tempo de colher os frutos desta longa jornada.

Aos meus queridos pais, **Elizete e Onias**, por terem me ensinado a lutar pelos meus ideais, com persistência, confiança e coragem. Por acreditarem em meu potencial e minha capacidade. Por terem aceitado a distância, sendo ao mesmo tempo tão presentes. Pelo amor, força e dedicação que sempre transmitiram a mim e aos meus irmãos. Obrigada pelo exemplo de vida e família.

Aos meus queridos irmãos, **Rossiny e Markony**, por preencherem minha vida com tanta alegria. Juntos, fazemos da nossa família o lugar para onde sempre queremos voltar. Obrigada pelo amor e carinho de vocês. Contem sempre comigo.

Ao meu amado namorado, meu porto seguro, meu companheiro de vida incondicional, **João Lucas**. Obrigada por sua parceria, pela paciência nos momentos difíceis, pela maneira tranqüila de cuidar de mim. Teu incentivo diário foi essencial para que este trabalho chegasse ao fim. Obrigada por me fazer tão feliz. Te amo muito, sempre e cada vez mais.

À **Universidade Federal de Santa Catarina**, por ter me proporcionado uma bela formação profissional e aos **professores do curso de Odontologia**, que me acompanharam e, com muita paciência, me ajudaram a construir uma base sólida de conhecimento.

Ao Prof. Dr. **Wilson Tadeu Felipe**, pelo grande privilégio de ter sido sua orientada e por toda confiança em mim depositada. Seu amor e fidelidade à Endodontia o tornam um ícone reconhecido por todos.

*À Ms. **Josiane de Almeida**, que me aceitou como aluna co-orientada. Obrigada pela forma como soube me guiar durante a realização deste trabalho, mesmo nos momentos em que tudo parecia tão difícil. Por acreditar em mim e por transmitir conhecimento com tanto entusiasmo. Pelas palavras amigas e pelo crescimento que você me proporcionou durante o nosso convívio. Sua competência e dedicação a tudo que faz a torna inesquecível.*

*À Profa. Dra. **Mara Cristina Santos Felipe**, pela gentileza e delicadeza que sempre teve durante o curso.*

*À Profa. Dra. **Andrea de Lima Pimenta** por disponibilizar o laboratório de microbiologia possibilitando a realização desta pesquisa.*

*À Ms. **Bruna Casagrande Cechella**, pelo empenho, dedicação, ajuda e disponibilidade na realização deste trabalho.*

*À minha colega e parceira de pesquisa, **Gabriela Vieira dos Santos**, agradeço pelo apoio em tantas horas compartilhadas para a realização desta pesquisa. Por dividir as angústias, as dúvidas e as vitórias e por estar sempre ali, pronta, caso fosse necessário.*

*À minha querida dupla **Carolina de Miranda Meurer**, pela parceria nas clínicas da faculdade, por oferecer um ombro amigo nas horas que precisei desabafar, pelas risadas, comemorações e vitórias que juntas alcançamos.*

Enfim, agradeço àqueles que, embora não citados, contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste sonho.

Muito obrigada!

“Determinação, coragem e autoconfiança são fatores decisivos para o sucesso. Não importa quais os obstáculos e dificuldades, se estamos possuídos de uma inabalável determinação, conseguiremos superá-los. Independentemente das circunstâncias, devemos ser sempre humildes, recatados e despidos de orgulho.”

(Dalai Lama)

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar a efetividade da solução de hipoclorito de sódio (NaOCl) 1%, digluconato de clorexidina (CHX) 2% e de nanopartículas de óxido zinco (Np ZnO) 26% contra um biofilme de *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*) (ATCC 29212) estabelecido no canal radicular. Foram utilizados 42 segmentos radiculares de 12 mm de comprimento a partir de dentes humanos unirradiculados hígidos. Os canais foram modelados pela técnica escalonada sob irrigação constante com NaOCl 1% e, em seguida, os segmentos radiculares foram esterilizados. Após, 100 µL de uma suspensão de *E. faecalis* foram inseridos nos canais, sendo renovados diariamente por 7 dias. Uma análise por meio de microscopia eletrônica de varredura em 2 segmentos radiculares confirmou a presença do biofilme. Os 40 segmentos radiculares remanescentes foram divididos aleatoriamente em 4 grupos (n=10), de acordo com a solução irrigadora empregada: G1) solução salina 0,85% (controle); G2) NaOCl 1%; G3) CHX 2%; e G4) solução de Np ZnO 26%. Concluída a irrigação, foram coletadas as bactérias remanescentes do interior dos canais com cones estéreis de papel absorvente. A partir de diluições da suspensão bacteriana, alíquotas de 100 µL foram plaqueadas em Agar Mueller-Hinton e as placas incubadas a 37°C por 48 h. O conjunto de dados, representados pelos valores médios de unidades formadoras de colônias (UFC) para cada grupo, foi analisado estatisticamente pelos testes Kruskal-Wallis e Tukey ($p < 0,05$). A efetividade das soluções de CHX 2%, NaOCl 1% e Np ZnO 26% contra o biofilme intracanal de *E. faecalis* foi semelhante e significativamente superior à da solução salina 0,85%.

Palavras-chave: Biofilme, desinfecção, *Enterococcus faecalis*.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the effectiveness of sodium hypochlorite (NaOCl), chlorhexidine digluconate (CHX) and a zinc oxide nanoparticles (Np ZnO) solutions against *E. faecalis* biofilm (ATCC 29212) established in the root canal. To perform the experiment, 42 root segments with 12mm-length were prepared from high single rooted human teeth. The root canals were prepared by step back technique under 1% NaOCl irrigation, and then sterilized. After that, the root canals were inoculated with 100 μ L-aliquot of *E. faecalis* suspension, which was renewed daily for 7 days. Analysis of two root segments by scanning electron microscopy confirmed the presence of biofilm. The other 40 segments were randomly divided into 4 groups, and irrigated with 3 different solutions: G1) 0.85% saline solution (control group); G2) 1% NaOCl; G3) 2% CHX; and G4) 26% Np ZnO solution. After completing the irrigation protocol, collection of remaining bacteria was performed using sterile absorbent paper tips. Aliquots of serial dilutions prepared from the bacteria collected from the infected paper tips were plated in Muller-Hinton agar from dilutions of bacterial suspensions, and plates were incubated at 37° C for 48 h. Results of the mean values of colony forming units (CFU) of each group were presented and statistically analyzed by Kruskal-Wallis and Tukey tests ($p < 0.05$). The effectiveness of 2% CHX, 1% NaOCl and 26% Np ZnO solutions against *E. faecalis* biofilm was similar, and significantly higher than 0.85% saline.

Keywords: Biofilm, disinfection, *Enterococcus faecalis*.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Fotomicrografia evidenciando a presença do biofilme sobre a superfície dentinária do canal radicular após o período de incubação com *E. faecalis* (3.000x).....39
- Figura 2 – Fotomicrografia de uma amostra do G1 mostrando a presença de um denso biofilme na superfície do canal radicular após irrigação com solução salina 0,85% (4.000x).....41
- Figura 3 – Fotomicrografia de uma amostra do G2 mostrando a superfície dentinária após irrigação com NaOCl 1%: presença de biofilme parcialmente estruturado (3.000x).....42
- Figura 4 – Fotomicrografia de uma amostra do G3 mostrando a superfície dentinária após irrigação com CHX 2%: presença de biofilme parcialmente estruturado (3.000x).....42
- Figura 5 – Fotomicrografia de uma amostra do G4 mostrando a superfície dentinária após irrigação com Np ZnO 26%: presença de pequenos aglomerados bacterianos (3.000x).....43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Valores das médias, medianas e desvios padrão observados após o uso das diferentes soluções.....	40
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Al₂O₃ – óxido de alumínio

BHI – Brain Heart Infusion

C. albicans – *Candida albicans*

CFU – colony forming units

CHX – digluconato de clorexidina

CLSM – microscopia eletrônica confocal de varredura

CS – quitosana

DP – desvio-padrão

E. faecalis – *Enterococcus faecalis*

EDTA – ácido etilendiamino tetra-acético

et al. – e colaboradores

G1 – grupo 1

G2 – grupo 2

G3 – grupo 3

G4 – grupo 4

G5 – grupo 5

HClO – ácido hipocloroso

kW – quilowatt

MEV – microscopia eletrônica de varredura

min – minuto

mg - miligrama

mL – mililitros

mm – milímetros

mmol/L – milimol por litro

n – número de amostras

NaOCl – hipoclorito de sódio

nm – nanômetros

Np – nanopartículas

Np ZnO – nanopartículas de óxido de zinco

PBS – tampão fosfato salino

PDT – terapia fotodinâmica

ppm – parte por milhão

QMIX – ácido poliaminocarboxílico e surfactante

rpm – rotações por minuto

SiO₂ – dióxido de silício

UFC – unidade formadora de colônia

ZnO – óxido de zinco

Zn²⁺ – zinco

LISTA DE SÍMBOLOS

% – porcentagem

μL – microlitro

$^{\circ}\text{C}$ – graus Celsius

< – menor

> – maior

– número

\AA – angström

x – vezes

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	15
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	18
2.1 <i>Hipoclorito de sódio.....</i>	18
2.2 <i>Digluconato de clorexidina.....</i>	20
2.2 <i>Nanopartículas de óxido de zinco.....</i>	23
3.OBJETIVOS.....	25
3.1 <i>Objetivo geral.....</i>	25
3.2 <i>Objetivos específicos.....</i>	25
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	26
4.1 <i>Preparo dos espécimes.....</i>	26
4.2 <i>Formação do biofilme.....</i>	26
4.3 <i>Confirmação da formação do biofilme.....</i>	27
4.4 <i>Grupos experimentais e soluções irrigadoras.....</i>	27
4.5 <i>Contagem de UFC.....</i>	27
4.6 <i>Avaliação da presença do biofilme.....</i>	28
4.7 <i>Análise estatística.....</i>	28
5. RESULTADOS.....	29
6. DISCUSSÃO.....	34
7. CONCLUSÃO.....	37
8. REFERÊNCIAS.....	38
ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal de Santa Catarina, sob o número 359.070.....	50
APÊNDICE A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	53

1. INTRODUÇÃO

Uma das principais causas do insucesso do tratamento endodôntico é a infecção persistente no sistema de canais radiculares (PORTENIER, WALTIMO e HAAPASALO, 2003; DE PAZ, 2007; ALVES *et al.*, 2013). Nestes casos, a microbiota caracteriza-se como uma monoinfecção com predomínio de micro-organismos Gram positivos e com aproximadamente igual proporção de anaeróbios facultativos e obrigatórios (FIGDOR e SUNDQVIST, 2007).

O *Enterococcus faecalis* é um micro-organismo Gram positivo, anaeróbio facultativo e a principal espécie bacteriana correlacionada ao fracasso do tratamento endodôntico, sendo isolado na maioria dos canais (22% a 77%) com necessidade de retratamento endodôntico (MOLLER, 1996; MOLANDER *et al.*, 1998; SUNDQVIST *et al.*, 1998; PECIULIENE *et al.* 2000; HANCOCK *et al.*, 2001; PINHEIRO *et al.*, 2003; SIQUEIRA e RÔÇAS, 2004; FOUAD *et al.*, 2005; GOMES *et al.*, 2008).

Além da complexidade anatômica, a dificuldade de eliminação do *E. faecalis* também está relacionada a fatores como sua alta resistência às substâncias químicas utilizadas durante a terapia endodôntica (PORTENIER, WALTIMO e HAAPASALO, 2003) e sua capacidade de sobreviver de forma isolada, sem a necessidade de suporte de outras bactérias (KAYAOGLU, ERTEN e ØRSTAVIK, 2008). Além disso, o *E. faecalis* possui a habilidade de penetrar nos túbulos dentinários, se aderir fortemente às paredes de dentina (SEDGLEY, LENNAN e APPELBE 2005; CHIVATXARANUKUL, DASHPER e MESSER, 2008) e principalmente, se organizar na forma de biofilme (LOVE, 2001; RADCLIFFE *et al.*, 2004).

O biofilme microbiano pode ser definido como uma população de micro-organismos embebida em seus próprios produtos extracelulares, os quais formam uma matriz que confere estabilidade mecânica ao biofilme, ao mesmo tempo em que impede o contato direto dos agentes antissépticos com os micro-organismos (SVENSÄTER e BERGENHOLTZ, 2004; ARIAS-MOLIZ *et al.*, 2010). Além disso, os micro-organismos presentes no biofilme apresentam maior resistência aos agentes antimicrobianos (CLEGG *et al.*, 2006) e às células de defesa do hospedeiro quando comparados aos micro-organismos planctônicos (DE PAZ, 2007).

Na tentativa de aumentar o nível de desinfecção do sistema de canais e, conseqüentemente, o índice de sucesso dos tratamentos endodônticos, diversas substâncias químicas têm sido propostas como auxiliares do preparo mecânico. Merecem destaque o hipoclorito de sódio (NaOCl) de 1% a 6% (DUNAVANT *et al.*, 2006, WILLIAMSON,

CARDON e DRAKE 2009; BHUVA *et al.*, 2010; DE PAZ, BERGENOLTZ e SVENSATER, 2010; OZDEMIR *et al.*, 2010; PRABHAKAR *et al.*, 2010; BACA *et al.*, 2011; DAGNA *et al.*, 2011; STOJICIC *et al.*, 2011; CASE *et al.*, 2012; RAHIMI *et al.*, 2012; MEIRE *et al.*, 2012), as substâncias tensoativas (BARBIN, 1999), os quelantes, como o ácido etileno diaminotetracético (EDTA) (ÇALT e SERPER, 2000), os peróxidos (HELING e CHANDLER, 1998), o digluconato de clorexidina (CHX) (LIMA, FAVA e SIQUEIRA JR, 2001) e algumas associações (ESTRELA, 2000).

O NaOCl é um efetivo agente antimicrobiano, solvente de matéria orgânica, com baixa tensão superficial e ação desodorizante (SIQUEIRA JR *et al.*, 1997). Em suas diversas concentrações, o NaOCl tem demonstrado maior poder de eliminação do biofilme de *E. faecalis* quando comparado a outras soluções irrigadoras (DE PAZ, BERGENOLTZ e SVENSATER, 2010; CASE *et al.*, 2012). Contudo, esse produto não é 100% efetivo. Mesmo após a realização do tratamento endodôntico convencional sob irrigação com NaOCl e aplicação de hidróxido de cálcio como medicação intracanal, micro-organismos e biofilmes viáveis ainda podem ser detectados na complexidade do sistema de canais radiculares (NAIR *et al.*, 2005; RICUCCI e SIQUEIRA, 2010).

A CHX é um composto halogenado, aplicado em endodontia como solução irrigadora ou medicação intracanal, na forma de solução aquosa ou gel, nas concentrações de 0,2 a 2% (ZERELLA, FOUAD e SPANGBERG, 2005). Possui um espectro antimicrobiano amplo e de longa duração, principalmente contra o *E. faecalis* (GOMES *et al.*, 2001). A ação antimicrobiana prolongada é decorrente da propriedade de substantividade que a CHX apresenta, ou seja, sua capacidade de adsorção à dentina e subsequente liberação no meio, na sua forma ativa (ZEHNDER, 2006). Apesar de ser uma alternativa ao uso do NaOCl, a CHX não é capaz de erradicar as bactérias do canal radicular (SIQUEIRA, RÔÇAS e LOPES, 2010).

Portanto, fica evidente a necessidade de desenvolvimento de soluções irrigadoras capazes de promover a completa desinfecção e eliminação do biofilme presente em canais infectados.

É de conhecimento que os metais apresentam propriedades bactericidas e bacteriostáticas (PHAN *et al.*, 2004). Há muitos anos, o zinco (Zn^{2+}) tem sido utilizado como principal constituinte dos cimentos endodônticos, os quais demonstram resultados positivos em relação ao efeito antimicrobiano (KISHEN *et al.*, 2008). O uso de nanopartículas de óxido de zinco (Np ZnO), na forma de solução, também tem proporcionado excelente resultado quanto à eliminação e a desagregação da estrutura do biofilme intracanal de *E. faecalis*

(SHRESTHA, ZHILONG e GEE, 2010). Devido ao seu pequeno tamanho, as nanopartículas apresentam uma maior superfície de contato em comparação a outras formulações. Logo, existe uma maior atração eletrostática e ligação à membrana celular bacteriana (JUNG *et al.*, 1999; RABEA *et al.*, 2003; SONDI e SALOPEK-SONDI, 2004; KISHEN *et al.*, 2008), com subsequente aumento da permeabilidade, mudanças estruturais no interior da célula e, por conseguinte, a lise bacteriana (PERCIVAL, BOWLER e DOLMAN, 2007).

Tendo em vista o potencial antimicrobiano, as Np ZnO parecem aptas a contribuir para uma melhor desinfecção do sistema de canais radiculares (HERNÁNDEZ-SIERRA, 2008). Contudo, sua efetividade contra um biofilme estabelecido no canal radicular ainda é desconhecida. Diante do exposto, seguem os objetivos do trabalho.

2. REVISÃO DE LITERATURA

Diversas soluções irrigadoras têm sido utilizadas durante o preparo dos canais radiculares na tentativa de promover a completa desinfecção e eliminação do biofilme. A presente revisão apresenta os trabalhos mais relevantes que investigaram a efetividade das soluções de NaOCl, CHX e Np ZnO contra o biofilme microbiano.

2.1 Hipoclorito de sódio

O NaOCl possui ação antimicrobiana contra um amplo espectro de micro-organismos, dentre eles bactérias, fungos e vírus (ZEHNDER, 2006). Seu efeito bactericida ocorre devido à ação oxidativa do ácido hipocloroso (HClO) não dissociado sobre os grupos sulfidril da enzimas bacterianas, com conseqüente interferência nas funções metabólicas, o que leva à morte bacteriana (SEET *et al.*, 2012).

Oliveira *et al.* (2007) compararam, *in vitro*, a atividade antimicrobiana do NaOCl 1,5% e 5,25%, e do gel de CHX 2% contra um biofilme de *E. faecalis*. Oitenta pré-molares inferiores unirradiculados foram instrumentados até a lima Ni-Ti #25, autoclavados e incubados por 7 dias com uma cultura de *E. faecalis*. Em seguida, os dentes foram divididos aleatoriamente em 3 grupos (n=20), de acordo com a solução irrigadora empregada no preparo do canal radicular: G1) gel de CHX 2%; G2) NaOCl 1,5% e G3) NaOCl 5,25%. Os grupos-controle (n=10) foram irrigados com as seguintes soluções: G4) água (grupo-controle 1); e G5) gel natrosol (grupo-controle 2). A ação antimicrobiana das soluções irrigadoras foi avaliada em 3 diferentes períodos: S1-inicial (antes do preparo do canal radicular); S2-pós-tratamento (imediatamente após o preparo do canal radicular); e S3-final (7 dias após o preparo do canal radicular). Após a realização do protocolo de irrigação em cada período experimental, os canais foram irrigados com 3 mL de solução salina estéril e secos com cones de papel absorvente, os quais foram subsequentemente inseridos em frascos contendo 1 mL de caldo Brain Heart Infusion (BHI) estéril. Os frascos foram agitados em um misturador mecânico por 1 minuto e 10 diluições em série foram realizadas. Alíquotas de 50 µl foram plaqueadas em Agar sangue em triplicata, e as placas incubadas aerobicamente a 37°C durante 48 h. Após este período, foi feita a contagem de UFC. O gel de CHX 2% e o NaOCl 5,25% reduziram significativamente o número de UFC viáveis imediatamente e 7 dias após o preparo do canal radicular (períodos S2 e S3, respectivamente). Já o NaOCl 1,5% erradicou o biofilme apenas imediatamente após o preparo do canal radicular (período S2). Após 7 dias,

houve um aumento considerável no número de UFC viáveis, sem diferença estatística quando comparado aos grupos-controle. Os autores concluíram que o NaOCl 5,25% e a CHX 2% possuem um excelente potencial na redução do biofilme de *E. faecalis*.

Arias-Moliz *et al.* (2009) avaliaram a concentração mínima de NaOCl, CHX e dos ácidos Etilenodiamino Tetra-acético (EDTA), cítrico e fosfórico para a eliminação de um biofilme de 24 h de *E. faecalis* após 1, 5 e 10 min de exposição às soluções. O inóculo de *E. faecalis* foi inserido em uma microplaca de 96 poços e incubado por 24h. Em seguida, o biofilme de *E. faecalis* foi exposto a 5 soluções irrigadoras, em 10 diferentes concentrações, a partir da concentração inicial (n=30): G1) NaOCl 0,1%; G2) CHX 4%; G3) EDTA 17%; G4) ácido cítrico 25%; e G5) ácido fosfórico 5%. Após o contato das soluções irrigadoras com o biofilme, alíquotas de 10µl foram plaqueadas em Agar BHI e as placas incubadas a 37°C por 24 h. Em seguida, foi realizada a contagem de UFC. O NaOCl 0,00625% foi a solução mais efetiva, sendo capaz de eliminar o biofilme de *E. faecalis* após 1 minuto. A CHX 2% erradicou o biofilme após 5 min. O EDTA e as soluções de ácido cítrico e fosfórico não foram eficientes na eliminação do biofilme em nenhuma das concentrações ou períodos testados.

De Paz, Bergenoltz e Svensater (2010) avaliaram, *ex vivo*, o efeito antimicrobiano das soluções de CHX 2,5%, EDTA (50mmol/L) e NaOCl 1% contra biofilmes isolados de 24 h de *E. faecalis*, *Lactobacillus paracasei* e *Streptococcus gordonii* presentes no canal radicular de dentes humanos. Os biofilmes foram expostos por 5 min às diferentes soluções e, então, caracterizados por meio de marcadores fluorescentes direcionados à integridade da membrana celular e à atividade metabólica bacteriana. O NaOCl 1% afetou a integridade das membranas celulares de todos os micro-organismos e removeu a maioria dos biofilmes, apresentando atividade antimicrobiana superior à das outras soluções testadas.

Em 2014, Zand *et al.* avaliaram a capacidade antimicrobiana do NaOCl 1%, NaOCl 2,5% e da terapia fotodinâmica (PDT) contra biofilmes de *E. faecalis* em diferentes estágios de maturação. A partir de 120 incisivos centrais superiores foram obtidos segmentos radiculares de aproximadamente 12 mm de comprimento. Os canais foram preparados no sentido coroa-ápice com brocas Gates-Glidden #4 a #1 e instrumentados até a lima K-file #60, sob irrigação com soro fisiológico. Em seguida, os canais foram irrigados por 3 min com NaOCl 5,25% e por mais 3 min com EDTA 17%, seguido por uma irrigação final com tampão fosfato salino (PBS). Ao final, os segmentos radiculares foram esterilizados e os canais inoculados com uma cultura de *E. faecalis*. Após 4, 6 e 8 semanas, os segmentos radiculares foram divididos em 4 grupos de acordo com a solução irrigadora utilizada (n=10): G1) PBS por 10 min; G2) PDT; G3) NaOCl 1% por 10 min; e G4) NaOCl 2,5% por 10 min.

Concluído o protocolo de irrigação, discos de dentina foram obtidos a partir dos segmentos radiculares, imersos em 2 mL de soro fisiológico e agitados em vortex. Em seguida, foram realizadas diluições sucessivas de cada suspensão e alíquotas de 10µL foram plaqueadas em Agar Mueller-Hinton. As placas foram incubadas a 37°C por 48 h e o biofilme de 3 segmentos radiculares de cada grupo foram observados por meio de MEV. A PDT e o NaOCl 2,5% eliminaram completamente o biofilme nos seus 3 estágios de maturação, enquanto que o NaOCl 1% eliminou 81% do biofilme de 4 semanas, 85% do biofilme de 6 semanas e 78% do biofilme de 8 semanas.

Apesar de sua reconhecida ação antibacteriana e elevado poder de dissolução de matéria orgânica, o NaOCl apresenta algumas características indesejáveis, como a alta citotoxicidade aos tecidos periapicais (PASHLEY *et al.*, 1985; JEANSONNE e WHITE, 1994; KURUVILLA *et al.*, 1998;), o odor e o gosto desagradáveis (ALVES *et al.*, 2013) e o efeito de promover alterações na adesividade de materiais restauradores (FOUAD, 2011).

2.2 Digluconato de clorexidina

A CHX é um excelente agente antimicrobiano (LEONARDO *et al.*, 1999), utilizada em diferentes concentrações e em diferentes produtos, como antissépticos bucais, dentifrícios, gomas de mascar, entre outros. Em altas concentrações apresenta forte efeito bactericida, pois é capaz de romper a parede celular e provocar a coagulação dos constituintes intracelulares (ROLLA e MELSEN, 1975).

O emprego da CHX em Endodontia como solução irrigadora tem sido indicado não somente pelo seu efeito bactericida, como também pelas propriedades de biocompatibilidade (JEANSONNE e WHITE, 1994; WHITE, HAYS e JANER, 1997; FERRAZ *et al.*, 2001; TANOMARU FILHO, LEONARDO e SILVA, 2002; GOMES FILHO *et al.*, 2008) e substantividade (DELANY *et al.*, 1982; WHITE, HAYS e JANER 1997; LEONARDO *et al.*, 1999; FERRAZ *et al.*, 2001; GOMES *et al.*, 2001; LIN, MICKEL e CHOGLÉ, 2003; OKINO *et al.*, 2004; SIQUEIRA e RÔÇAS, 2007).

Em 2001, Ferraz *et al.* avaliaram a capacidade antimicrobiana e a limpeza (remoção de debris das paredes do canal radicular) promovida pela CHX 2% gel e líquida e pelo NaOCl 5,25%. Setenta dentes unirradiculados tiveram seus canais alargados com limas Hedstroem #35. Após, foram imersos por 10 min em EDTA 17%, seguido por 10 min em NaOCl 5,25%, e então esterilizados. Em seguida, os canais foram inoculados com uma cultura de *E. faecalis* e os dentes incubados por 48h. Posteriormente, foram divididos em 5 grupos de acordo com a

solução irrigadora empregada (n=14): G1) CHX 2% gel; G2) CHX 2% líquida; G3) NaOCl 5,25%; G4) água (grupo-controle 1); e G5) gel de natrozol (grupo-controle 2). Após a irrigação com 3 mL da solução irrigadora, os canais radiculares foram secos com cones estéreis de papel absorvente, os quais foram inseridos em frascos contendo 5 mL de caldo BHI estéril. Os frascos foram agitados e incubados a 37°C por 2 dias. A ocorrência de turbidez nos frascos foi indicativa da presença de bactérias remanescentes no canal radicular. Cinco dentes de cada grupo foram observados por meio de MEV para verificação do nível de limpeza das paredes do canal radicular. Não houve diferença significativa entre as soluções em relação à capacidade antimicrobiana. Porém, o nível de limpeza proporcionado pela CHX 2% gel foi superior ao da CHX 2% líquida e do NaOCl 5,25%.

Zamany, Safavi e Spangberg (2003) investigaram, *in vivo*, se a adição de CHX 2% a um protocolo de tratamento endodôntico convencional aumentaria o nível de desinfecção do sistema de canais radiculares. Vinte e quatro dentes com polpas necrosadas e lesões periapicais foram tratados endodonticamente sob irrigação com NaOCl 1%. Metade dos dentes recebeu CHX 2% como solução irrigadora adicional. Após a irrigação, amostras foram coletadas do canal radicular com cones estéreis de papel absorvente. Os cones foram transferidos para tubos contendo meio de Tioglicolato de Sódio e incubados a 37°C, por até 4 semanas. Os tubos foram constantemente observados a fim de determinar a presença de contaminação através da turbidez. Foi evidenciada presença bacteriana em 7 dos 12 canais irrigados somente com NaOCl 1%, e em apenas 1 dos 12 canais que receberam CHX 2% como irrigante adicional. Os resultados demonstraram que a adição de CHX 2% ao protocolo convencional de irrigação melhorou a taxa de desinfecção dos canais radiculares. No entanto, a desinfecção total do sistema de canais radiculares não foi atingida.

Tanomaru Filho *et al.* (2006) avaliaram, *in vivo*, o efeito antimicrobiano da CHX 2% gel e líquida e do NaOCl 2,5% como soluções irrigadoras. Inicialmente, foram induzidas lesões no periápice de 78 pré-molares de cães. Em seguida, os dentes foram divididos em 3 grupos conforme a solução irrigadora utilizada no preparo biomecânico dos canais (n=20): G1) NaOCl 2,5%; G2) CHX 2%, e G3) solução salina. No grupo 4 (grupo-controle, n=18) não foram realizados o preparo biomecânico e a irrigação dos canais. Amostras do conteúdo do canal radicular foram coletadas com 2 cones estéreis de papel absorvente antes e 30 dias após a irrigação. Os cones foram inseridos em tubos contendo meio de transporte líquido. Em seguida, os tubos foram agitados em vortex e, após 10 diluições em série, um volume de 50 µL de cada diluição foi plaqueado em meio Agar. Após, as placas foram incubadas a 37°C por 24 a 48 h para posterior contagem de UFC. Os resultados demonstraram que o gel de CHX

2% foi mais efetivo do que o NaOCl 2,5% na redução do número de micro-organismos nos canais radiculares.

Wang *et al.* (2007) analisaram, *in vivo*, a eficiência do gel de CHX 2% na redução bacteriana intracanal. Foram avaliados 43 dentes com pericementite apical. Amostras do conteúdo dos canais radiculares foram coletadas com cones de papel absorvente estéreis em 3 diferentes períodos: S1 - antes da instrumentação; S2 - após o preparo dos canais radiculares e irrigação com gel de CHX 2%; e S3 - após 2 semanas de medicação intracanal de gel de CHX 2% associado à pasta de hidróxido de cálcio. Os cones de papel absorvente foram imersos em 1 mL de soro fisiológico e agitados em vortex. Em seguida, foram realizadas diluições sucessivas de cada suspensão e alíquotas de 10 µL foram plaqueadas em meio Agar. As placas foram incubadas a 37°C por 7 dias para posterior contagem de UFC. Os resultados indicaram que a irrigação com gel de CHX 2% (S2) foi eficaz na desinfecção dos canais radiculares, reduzindo 89,7% das UFC viáveis quando comparado ao período S1. Quando o gel de CHX 2% foi utilizado como medicação intracanal associado à pasta de hidróxido de cálcio (S3) houve uma redução de 91,7% das UFC viáveis.

Em 2012, Wang, Shen e Haapasalo avaliaram, *ex vivo*, o efeito antibacteriano das soluções de NaOCl 2% e 6%, CHX 2% e ácido poliaminocarboxílico e surfactante (QMIX) sobre biofilmes novos e maduros de *E. faecalis* formados nos túbulos dentinários. Vinte dentes unirradiculados foram seccionados de forma a se obter 40 semicilindros de dentina. Primeiramente, os espécimes de dentina foram contaminados por meio do método de centrifugação com uma suspensão de *E. faecalis*. Em seguida, metade dos espécimes foi incubado a 37°C por 1 dia e a outra metade, por 3 semanas. Após o período de incubação, os espécimes de dentina foram expostos às soluções irrigadoras por 1 e 3 min. Em seguida, as bactérias remanescentes nos túbulos dentinários foram coradas com corante fluorescente indicador de viabilidade celular LIVE/DEAD, para posterior análise por meio de microscopia eletrônica confocal de varredura (CLSM). A CHX 2% mostrou atividade de desinfecção similar a do NaOCl 2% sobre os biofilmes novos e maduros -13 a 24% de eliminação do biofilme, contra 26 a 54% de redução do biofilme promovida pelo NaOCl 6% e QMiX.

Apesar de desempenhar importante papel durante o preparo dos canais radiculares em razão de sua ação antimicrobiana e da sua propriedade de substantividade, a CHX possui um grande inconveniente: a incapacidade de dissolver matéria orgânica (VIVAQUA-GOMES *et al.*, 2002), mesmo se utilizada na forma de gel (VIVACQUA-GOMES *et al.*, 2002, VIANNA *et al.*, 2004).

2.3 Nanopartículas de óxido de zinco

As Np ZnO apresentam excelente atividade antimicrobiana (PADMAVATHY e VIJAYARAGHAVAN, 2008). Atuam principalmente contra bactérias gram positivas (OPREA *et al.*, 2014), devido à interação química e física com compostos específicos presentes na parede celular bacteriana (ZHANG *et al.*, 2010).

O mecanismo pelo qual as Np ZnO desenvolvem sua atividade antimicrobiana ainda é motivo de investigação (JIANG, MASHAYEKHI e XING, 2009; AMORNPITOKSUK *et al.*, 2011). É sabido que esta atividade é influenciada pelo pequeno tamanho da partícula (JUNG *et al.*, 1999; RABEA *et al.*, 2003; SONDI e SALOPEK-SONDI, 2004; KISHEN *et al.*, 2008) e culmina com a morte celular da bactéria (YAMAMOTO, SAWAI e SASAMOTO, 2000; NOWACK e BUCHELI, 2007; RASMUSSEN *et al.*, 2010).

Na Odontologia, mais especificamente em Endodontia, ainda são poucos os estudos envolvendo Np ZnO.

Kishen *et al.* (2008) avaliaram a capacidade antimicrobiana de um cimento endodôntico à base de óxido de zinco e eugenol misturado a três tipos de nanopartículas: Np ZnO, Np de quitosana (CS), uma mistura de Np ZnO e de CS, e Np ZnO com revestimento de várias camadas de CS. Doze cones de papel absorvente foram imersos, por 10 min, em uma cultura de *E. faecalis* de 8 h. Depois, esses cones foram mantidos, por 30 min, em contato direto com o cimento endodôntico à base de óxido de zinco e eugenol misturado aos diferentes tipos de nanopartículas (n=4). Em seguida, os cones de papel absorvente foram transferidos para frascos contendo 2 mL de tampão fosfato-salino. Para promover a remoção das bactérias remanescentes aderentes aos cones de papel, os frascos foram agitados em vortex durante 30 segundos, seguido por ultrassom durante 7 min. Após a realização de diluições em série da solução contida nos frascos, alíquotas de 100 µL foram plaqueadas para determinação do número de UFC viáveis. Cones de papel absorvente sem contato com o cimento endodôntico foram utilizados como grupo-controle positivo, e cones de papel em contato apenas com os cimentos endodônticos como grupo-controle negativo. Com a adição de Np ZnO e Np CS ao cimento endodôntico, o número de células bacterianas viáveis aderidas aos cones de papel absorvente diminuiu em comparação ao grupo-controle positivo. Além disso, a adição da mistura de Np ZnO e CS ao cimento não resultou em maior capacidade antimicrobiana comparada à adição de Np ZnO. Os autores concluíram que a adição de Np ZnO e Np CS melhora a eficácia antibacteriana do cimento endodôntico à base de óxido de zinco e eugenol.

Jiang, Mashayekhi e Xing (2009) investigaram o efeito antimicrobiano promovido por diferentes tipos de nanopartículas adicionadas às suspensões de *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas fluorescens* por 1 dia. Oito grupos foram formados, para cada espécie bacteriana, de acordo com o tipo de nanopartícula adicionada: Np de óxido de alumínio (Al_2O_3), Np de dióxido de silício (SiO_2), Np ZnO, Al_2O_3 , SiO_2 , ZnO, Zn^{2+} e grupo-controle positivo – somente a suspensão bacteriana. Após a adição de 100 μL de cada nanopartícula às suspensões bacterianas, os tubos foram agitados em vortex e incubados, no escuro, sob agitação constante, a 30°C durante 2 h. Placas contendo meio Agar foram semeadas com alíquotas provenientes de cada tubo e incubadas por 24 h para posterior contagem de UFC. Os autores observaram que as Np ZnO foram mais eficazes em reduzir a viabilidade das espécies bacterianas do que as outras nanopartículas.

Shrestha, Zhilong e Gee (2010) testaram, *in vitro*, a eficácia de Np CS e Np ZnO contra o *E. faecalis*, na forma de biofilme (7 dias) e planctônica. Concentrações de 2, 5, 10 e 20 mg/mL de ambas as nanopartículas foram testadas. Células bacterianas foram cultivadas em poços de microplacas e submetidas aos dois tipos de nanopartículas e água deionizada estéril (controle). Após a adição das soluções aos poços contendo o biofilme ou bactérias planctônicas, as placas foram incubadas a 37°C e agitação constante de 100 rpm, por 12 h. Em seguida, foram realizadas diluições em série de cada solução. Cem microlitros de cada amostra foram plaqueados em meio Agar, e as placas incubadas por 24 h a 37°C, para posterior determinação do número de UFC. A viabilidade do biofilme após o tratamento com nanopartículas foi avaliado por meio de microscopia confocal. Os autores observaram que tanto Np CS quanto Np ZnO, em todas as concentrações, exceto 2 mg/mL, foram capazes de eliminar totalmente as bactérias na forma planctônica e reduzir significativamente a espessura do biofilme. As Np ZnO 20 mg/mL conseguiram erradicar o biofilme de *E. faecalis*.

Com base no exposto, fica evidente a necessidade de mais pesquisas envolvendo Np ZnO, principalmente para uso em Endodontia, na forma de solução irrigadora, uma vez que seu potencial antimicrobiano parece promissor.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar, *ex vivo*, a efetividade das soluções de hipoclorito de sódio, digluconato de clorexidina e de nanopartículas de óxido de zinco contra o biofilme de *E. faecalis* estabelecido na superfície do canal radicular.

3.2 Objetivos Específicos

2.2.1 Avaliar e comparar, por meio de contagem de unidades formadoras de colônias, a efetividade das soluções de hipoclorito de sódio 1%, digluconato de clorexidina 2%, nanopartículas de óxido de zinco 26% e solução salina 0,85% contra o biofilme de *E. faecalis* estabelecido na superfície do canal radicular.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Preparo dos espécimes

O projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal de Santa Catarina, sob o parecer de número 359.070 (ANEXO A).

Para a realização deste estudo, foram selecionados 42 dentes humanos unirradiculados, com canais únicos e retos, extraídos por razões alheias a esta pesquisa e doados pelos pacientes através do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (APÊNDICE A). Todos os dentes foram armazenados em solução de formol 10% até o início do experimento.

As coroas de todos os dentes foram removidas, de forma a se obter segmentos radiculares de aproximadamente 12 mm de comprimento. Com o auxílio de uma lima K #10 (Dentsply Maillefer, Ballaiques, Switzerland), foi estabelecida a patência apical. Todos os canais foram limpos e modelados, no sentido coroa-ápice, por meio de brocas Gates-Glidden #3 e #2, seguido de limas FF (Dentsply Maillefer). O stop apical (1 mm aquém do forame apical = comprimento de trabalho) foi confeccionado com limas Flexofile #35. Um reservatório de 3 mm de profundidade foi confeccionado na porção cervical do canal com broca Gates-Glidden #4. Durante o preparo foi realizada uma irrigação com NaOCl 1% a cada troca de instrumento. Uma irrigação final foi realizada com EDTA 17% por 3 min e NaOCl 1% por 3 min.

Com exceção da porção cervical e entrada do canal, a superfície externa de todos os segmentos, incluindo o forame apical, foi impermeabilizada com duas camadas de adesivo epóxi (Araldite de presa rápida, Ciba-Geigy AS, Taboão da Serra, SP, Brasil). Os segmentos radiculares foram individualmente montados e fixados em dispositivos de vidro específicos e, em seguida, esterilizados com gás de óxido de etileno (ACECIL, Central de Esterilização Com. Ind. Ltda., Campinas, SP, Brasil).

4.2 Formação do biofilme

O inóculo foi preparado a partir de uma única colônia de *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) em caldo TSB. A formação do biofilme no interior dos canais foi realizada sob condições assépticas. Alíquotas de 0,2 mL do inóculo de *E. faecalis* foram introduzidas nos canais radiculares com o auxílio de seringas e agulhas estéreis, sendo renovadas,

diariamente, durante 7 dias. Os dispositivos contendo os segmentos radiculares foram incubados a 37°C durante o período experimental.

4.3 Confirmação da formação do biofilme

Para confirmar a formação de biofilme, 2 segmentos radiculares foram preparados para análise em MEV. Os segmentos foram fixados em glutaraldeído 2,5% tamponado com cacodilato 0,2 M durante 12 h a 4°C, seccionados longitudinalmente, lavados em tampão cacodilato 0,2 M durante 1 h com duas trocas, desidratados (em concentrações ascendentes de álcool etílico - 25%, 50%, 75% e 95% por 20 min cada, e 100% por 1 h), montados em stubs, recobertos com ouro (300Å), e observados por meio de MEV, operando a 10 kW, nos aumentos de 1.000x, 2.000x e 3.000x.

4.4 Grupos experimentais e soluções irrigadoras

Os segmentos radiculares foram divididos aleatoriamente em 4 grupos experimentais (n=10), de acordo com a solução irrigadora empregada: G1) solução salina 0,85% (controle positivo); G2) NaOCl 1%; G3) CHX 2% G4) solução de Np ZnO 26%. Em cada segmento radicular foi realizada uma irrigação com auxílio de seringa e agulha estéreis. A agulha, calibrada em 10 mm, foi introduzida no espaço do canal radicular com movimentos de vai e vem e 5 mL da solução foram injetados durante 5 min (1mL/min).

4.5 Contagem de UFC

Imediatamente após a irrigação, 3 cones de papel absorvente calibre #35 foram inseridos consecutivamente no interior do canal radicular de todos os segmentos e mantidos por 1 min. Em seguida, os cones foram transferidos para um tubo Eppendorf estéril contendo 1 mL de solução salina. O tubo foi submetido à vibração em vortex por 30 s a fim de promover a remoção das bactérias e agregados bacterianos aderidos aos cones de papel. A partir dessa suspensão bacteriana inicial foram feitas diluições decimais sucessivas. Uma alíquota de 100 µL foi removida dos tubos correspondentes às diluições de 100x e 1.000x, pipetadas e plaqueadas em triplicata em Agar Mueller Hinton. As placas foram incubadas a 37°C por 48 h e, após este período, as UFC foram contadas.

4.6 Avaliação da presença do biofilme

De forma similar aos procedimentos descritos no item 4.3, 3 segmentos radiculares de cada grupo foram preparados e observados sob MEV.

4.7 Análise estatística

O conjunto de dados, representados pelos valores médios de UFC para cada grupo, foi analisado estatisticamente pelos testes Kruskal-Wallis e Tukey *post hoc* em um nível de significância de 5%.

5. RESULTADOS

A análise realizada, por meio de MEV, após o período de incubação de 7 dias, confirmou a presença de biofilme no interior do canal radicular (Figura 1).

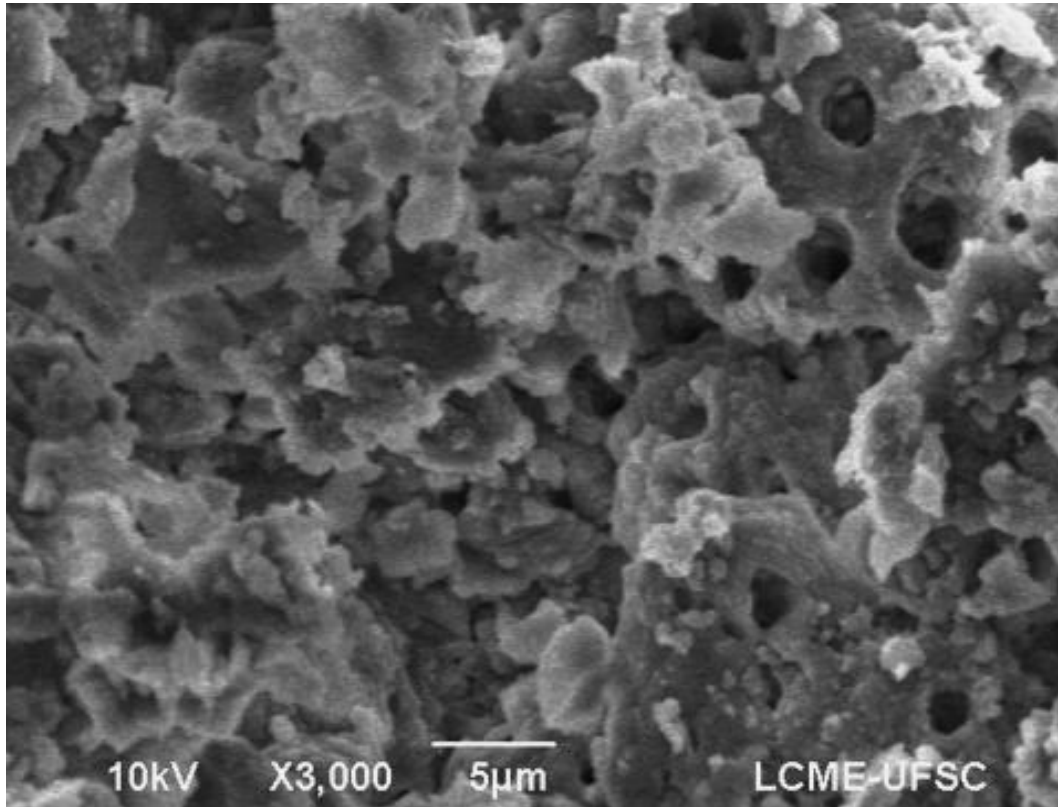


Figura 1 - Fotomicrografia de uma amostra do G1 evidenciando a presença do biofilme sobre a superfície dentinária do canal radicular após o período de incubação de 7 dias com *E. faecalis* (3.000x).

Os dados referentes aos resultados da contagem de UFC (média, mediana e desvio padrão) após o uso de cada solução estão expressos na Tabela 1 e Gráfico 1.

Tabela 1 Valores das médias, mediana e desvio padrão observados após o uso das diferentes soluções.

<i>Grupos</i>	<i>Solução</i>	<i>Média*</i> (UFC/mL)	<i>Mediana</i> (UFC/mL)	<i>DP</i> (UFC/mL)
1	Salina	$1,03 \times 10^4$ ^A	$7,7 \times 10^3$	1×10^4
2	NaOCl 1%	6×10^2 ^B	$1,5 \times 10^2$	$8,9 \times 10^2$
3	CHX 2%	$7,2 \times 10^2$ ^B	$3,5 \times 10^2$	$13,9 \times 10^2$
4	Np ZnO 26%	$4,1 \times 10^2$ ^B	1×10^2	$6,07 \times 10^2$

* Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si ($p > 0,05$).

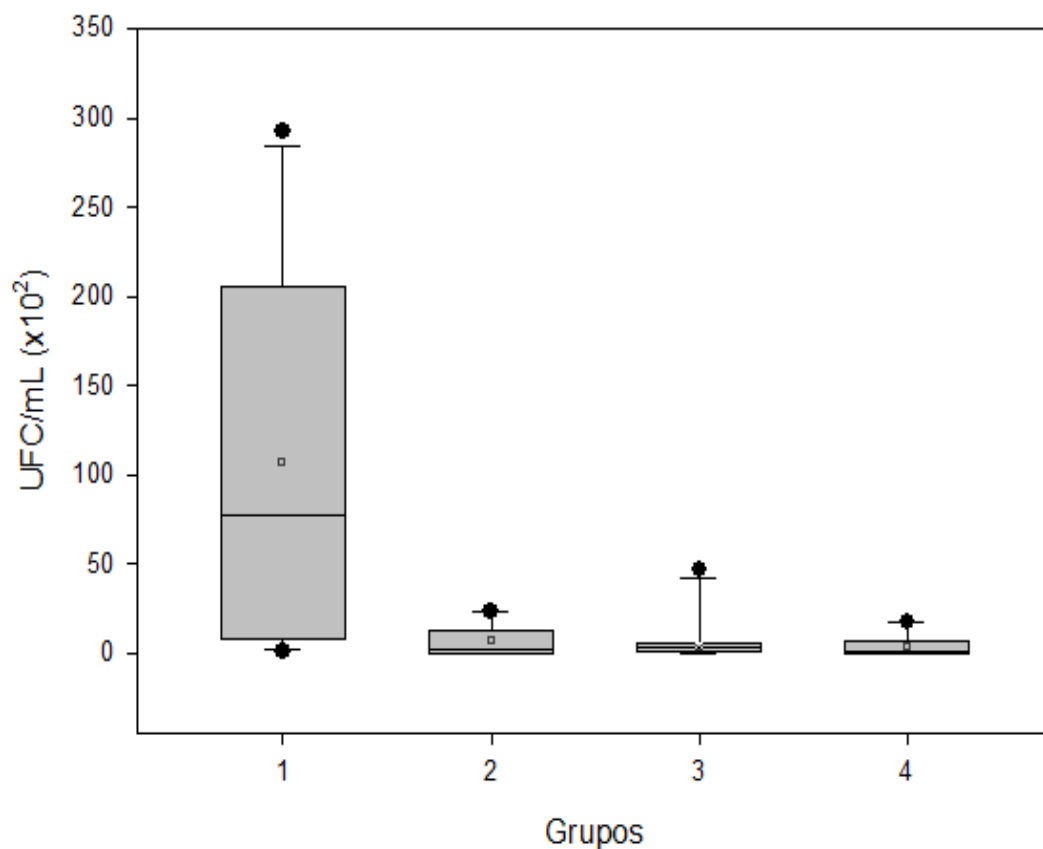


Gráfico 1 Box plot do número de UFC para cada grupo, ilustrando os valores médios, mínimos e máximos de UFC, mediana e desvio padrão.

As soluções de NaOCl 1%, CHX 2% e Np ZnO 26% apresentaram efetividade contra o biofilme de *E. faecalis* significativamente superior à da solução salina (Tukey *post hoc*, $p < 0,05$ – Tabela 1).

A irrigação com NaOCl 1% e CHX 2% foram capazes de reduzir em 94,17% e 93,20%, respectivamente, as UFC viáveis, quando comparada à irrigação com solução salina.

O uso da solução de Np ZnO 26% promoveu o maior grau de desinfecção, reduzindo 96,11% das UFC viáveis quando comparada à solução salina.

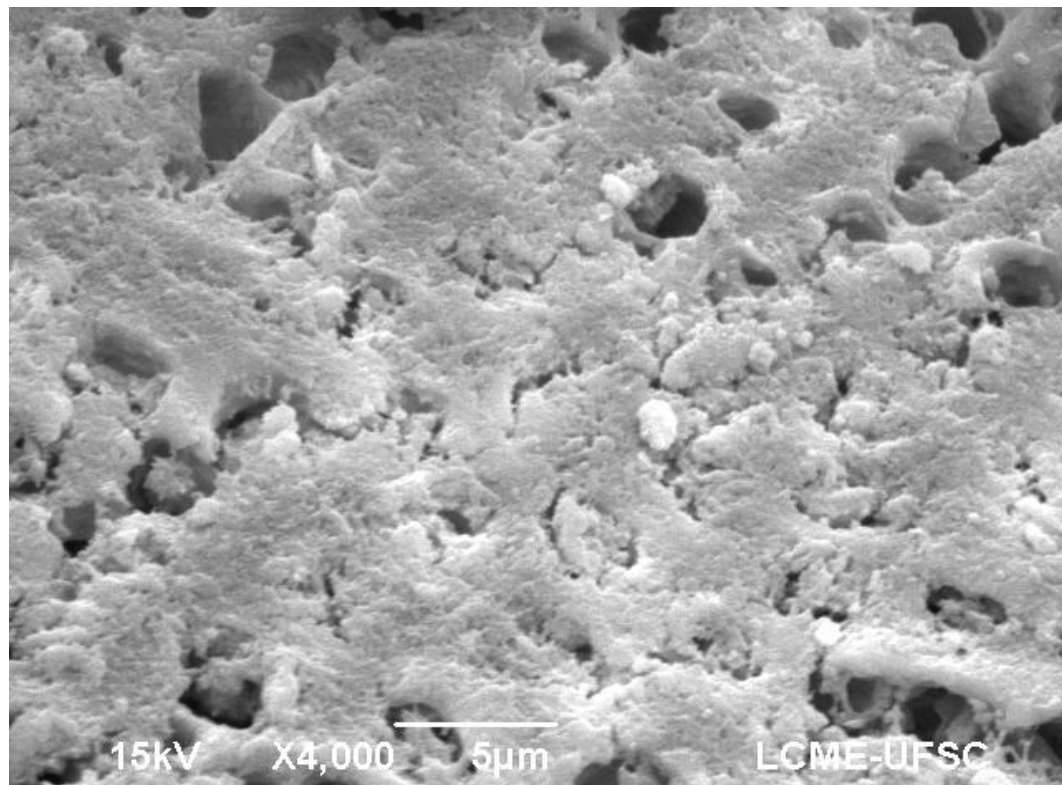


Figura 2 - Fotomicrografia mostrando a presença de um denso biofilme na superfície do canal radicular após irrigação com solução salina 0,85% (4.000x).

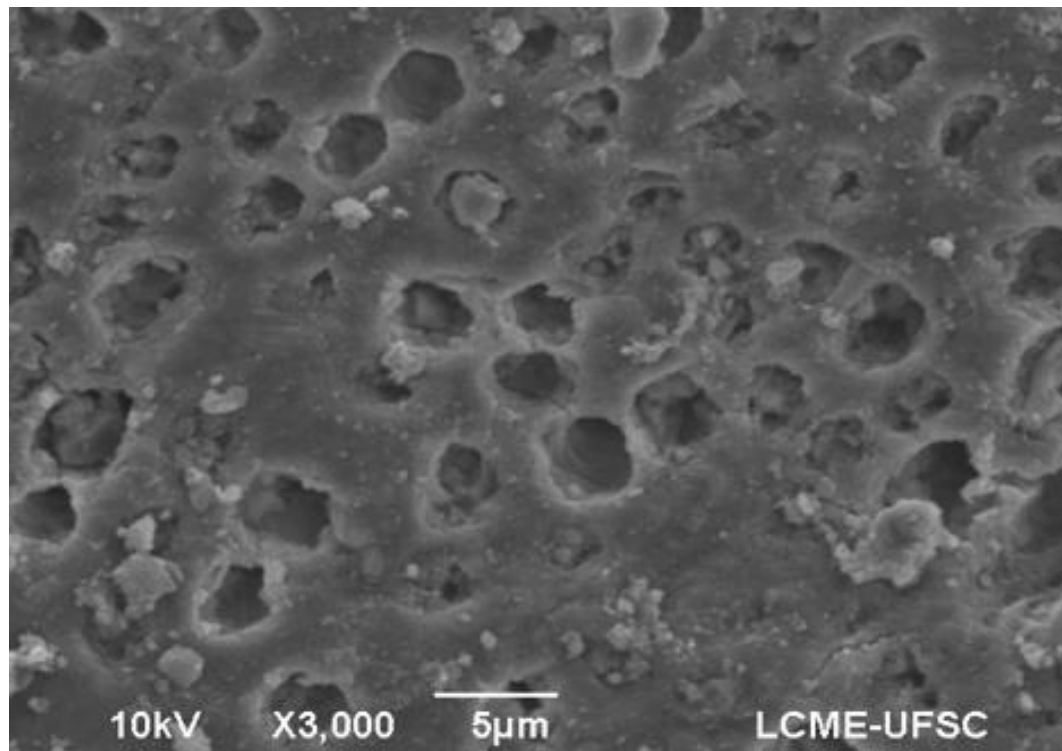


Figura 2 - Fotomicrografia de uma amostra do G2 mostrando a superfície dentinária após irrigação com NaOCl 1%: presença de biofilme parcialmente estruturado (3.000x).

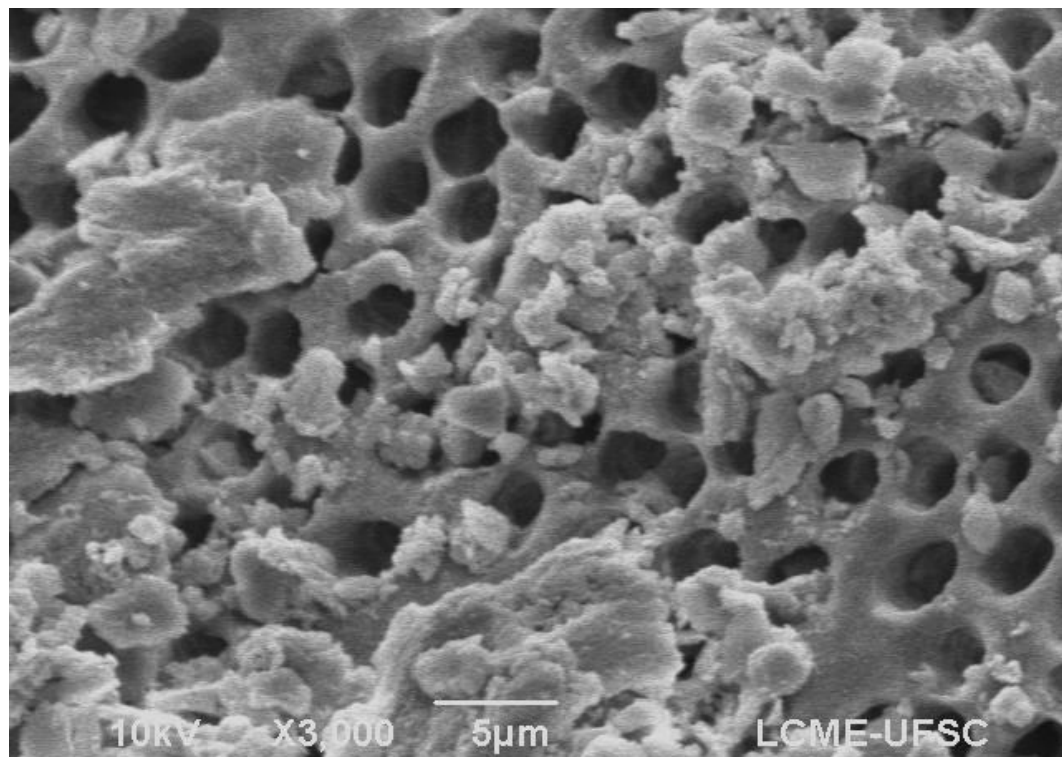


Figura 3 - Fotomicrografia de uma amostra do G3 mostrando a superfície dentinária após irrigação com CHX 2%: presença de biofilme parcialmente estruturado (3.000x).

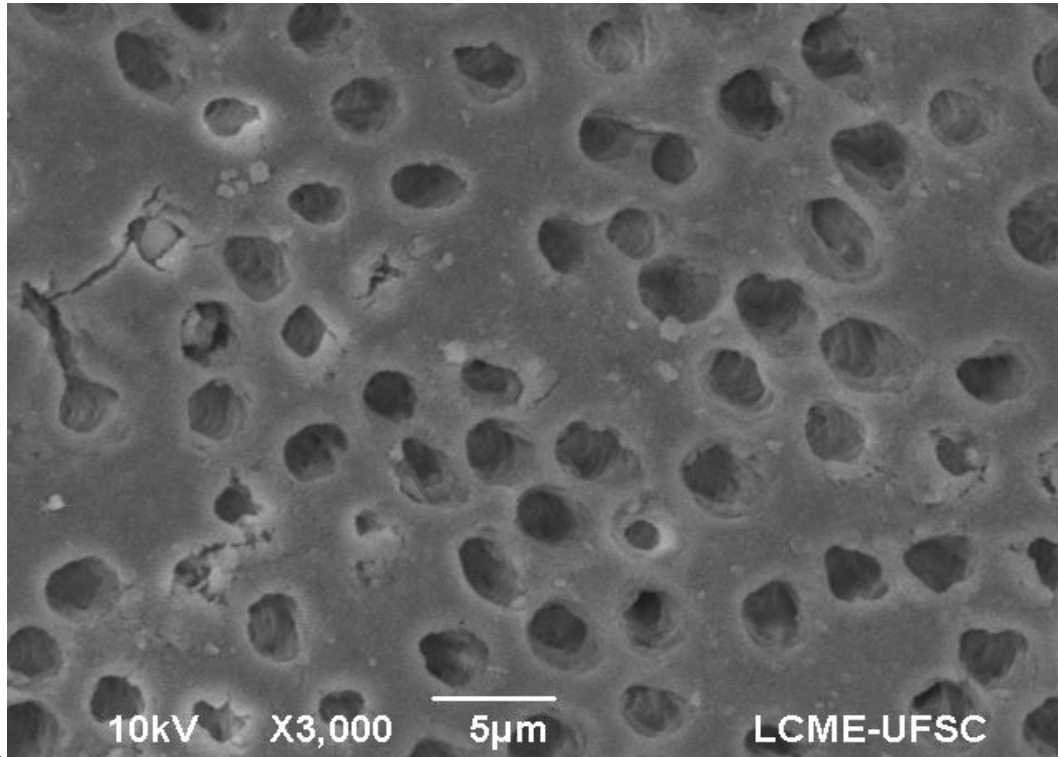


Figura 5 - Fotomicrografia de uma amostra do G4 mostrando a superfície dentinária após irrigação com Np ZnO 26%: presença de pequenos aglomerados bacterianos (3.000x).

6. DISCUSSÃO

Além da instrumentação, a desinfecção do sistema de canais radiculares está diretamente relacionada à capacidade antimicrobiana das soluções irrigadoras, as quais assumem importância fundamental no prognóstico do tratamento endodôntico (PORTENIER, WALTIMO e HAAPASALO, 2003).

Diversas metodologias têm sido empregadas para a avaliação da capacidade antimicrobiana das soluções irrigadoras utilizadas durante o tratamento endodôntico (ABDULLAH *et al.*, 2005; SOUKOS *et al.*, 2006; CHAI *et al.*, 2007; LIM *et al.*, 2009; ATHANASSIADIS *et al.*, 2010; STOJICIC *et al.*, 2011; RAHIMI *et al.*, 2012; SEET *et al.*, 2012; PAN *et al.*, 2013), com destaque para o método de espalhamento em superfície e contagem de UFC (BERGMANS *et al.*, 2007; HOCKETT *et al.*, 2008; LIU *et al.*, 2009; OZDEMIR *et al.*, 2010; PRABHAKAR *et al.*, 2010; CASE *et al.*, 2012; HALFORD *et al.*, 2012; MEIRE *et al.*, 2012; RAHIMI *et al.*, 2012; CHEN *et al.*, 2013; NEEKALANTAN *et al.*, 2013). Para suprir a necessidade de visualização da arquitetura do biofilme, uma das metodologias mais rotineiramente empregada é a análise por meio de MEV (HOCKETT *et al.*, 2008; SOMAYAJI *et al.*, 2010; SOARES *et al.*, 2010; OZDEMIR *et al.*, 2010; BHUVA *et al.*, 2010; GRUNDLING *et al.*, 2011; SEET *et al.*, 2012; BAO *et al.*, 2012; PAN *et al.*, 2013.)

No presente estudo, solução salina 0,85% foi utilizada para a irrigação dos canais radiculares do grupo controle, uma vez que não apresenta atividade antimicrobiana e capacidade de dissolução de matéria orgânica (SOARES *et al.*, 2010; BAO *et al.*, 2012; XIE *et al.*, 2012). Outros estudos também utilizaram a solução salina como irrigante no grupo controle (PAPPEN *et al.*, 2010; SOARES *et al.*, 2010; DAGNA *et al.*, 2011; CASE *et al.*, 2012; TIRALI, BODUR e ECE, 2012; XIE *et al.*, 2012; ALVES *et al.*, 2013; GUERREIRO-TANOMARU *et al.*, 2014).

A solução de NaOCl 1% promoveu uma redução de 94,17% das UFC viáveis, valor intermediário aos apresentados pelas soluções de Np ZnO 26% e CHX 2%. Estudos recentes demonstraram resultados semelhantes, com reduções de 93,5% (CASE *et al.*, 2012) e 91% (DE PAZ, BERGENOLTZ e SVENSATER, 2010) no número de UFC viáveis após irrigação dos canais com NaOCl 1%.

Apesar de significativamente superior à solução salina, a solução de NaOCl 1% não foi 100% eficaz contra o biofilme de *E. faecalis*. Segundo Case *et al.* (2012), a eficiência reduzida do NaOCl, quando utilizado como única manobra de desinfecção, pode estar

relacionada a diversos fatores, dentre eles a presença estruturada e organizada do biofilme de *E. faecalis*, que confere aos micro-organismos maior resistência frente aos agentes químicos.

Outra possível explicação para a ação antimicrobiana limitada do NaOCl 1% pode estar relacionada à concentração da solução. O efeito antimicrobiano do NaOCl ocorre devido à inibição enzimática bacteriana provocada pela liberação de HClO (OLIVEIRA *et al.*, 2007). Uma vez que a concentração de HClO liberado é diretamente proporcional à concentração da solução, o uso de NaOCl em baixas concentrações, como 1%, compromete sua eficácia antimicrobiana (VIANNA *et al.*, 2004).

A solução de CHX 2%, apesar de ter se mostrado efetiva contra o biofilme de *E. faecalis*, não foi capaz de eliminar a totalidade de UFCs viáveis. Este achado reforça resultados de estudos prévios (CLEGG *et al.*, 2006; DUNAVANT *et al.*, 2006; VAN DER WAAL *et al.*, 2012). É sabido que a ação antimicrobiana desempenhada pela solução de CHX 2% está relacionada à ligação eletrostática entre as suas moléculas catiônicas e a carga negativa da parede celular bacteriana, o que causa alterações no equilíbrio osmótico e perda de componentes intracelulares (DELANY *et al.*, 1982). No entanto, frente ao biofilme, a CHX apresenta penetração limitada e seu maior efeito antimicrobiano ocorre apenas nas camadas mais externas (ZAURA-ARITE, VAN MARLE e TEN CATE, 2001).

No presente estudo, a solução irrigadora de Np ZnO 26% promoveu a maior redução das UFC viáveis. Este resultado pode estar relacionado ao pequeno tamanho das partículas de ZnO (8-20 nm), uma vez que seu efeito antimicrobiano é dependente da superfície de contato (YAMAMOTO, SAWAI e SASAMOTO, 2000; NOWACK e BUCHELI, 2007; JONES *et al.*, 2008). Quanto menor for o tamanho da partícula, maior será o contato com os micro-organismos e maior a eficácia bactericida (PADMAVATHY e VIJAYARAGHAVAN, 2008). As Np ZnO se ligam à membrana celular e penetram na bactéria (JANG *et al.*, 2003), induzindo a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) (PADMAVATHY e VIJAYARAGHAVAN, 2008; RASMUSSEN *et al.*, 2010). As ROS inibem o transporte de nutrientes e o metabolismo de açúcares das bactérias, através da inativação de sistemas enzimáticos essenciais (DEVULAPALLE e MOOSER, 1994; SUNADA, WATANABE E HASHIMOTO, 2003), levando à morte celular (YAMAMOTO, SAWAI e SASAMOTO 2000; NOWACK e BUCHELI, 2007; RASMUSSEN *et al.*, 2010).

Por se tratar de uma solução experimental em Endodontia, a discussão dos resultados relacionados às Np ZnO torna-se limitada e não pode ser conduzida de maneira aprofundada.

Contudo, diante dos resultados obtidos, abre-se a perspectiva de uso das Np ZnO como solução irrigadora. Ainda assim, outros experimentos são necessários a fim de avaliar suas propriedades biológicas e a efetividade das nanopartículas contra um biofilme multiespécies.

7. CONCLUSÃO

Com base na metodologia aplicada e nos resultados obtidos, foi possível concluir que as soluções de NaOCl 1%, CHX 2% e Np ZnO 26% apresentam excelente efetividade contra o biofilme de *E. faecalis* estabelecido no canal radicular.

8. REFERÊNCIAS

Abdullah, M.; Ng, Y.L.; Gulabivala, K.; Moles, D.R.; Spratt, D.A. Susceptibilities of two *Enterococcus faecalis* phenotypes to root canal medications. **Journal of Endodontics**, v. 31, p. 30-36, 2005.

Alves, F.R.F.; Silva, M.G.; Rôças, I.N.; Siqueira Jr, J.F. Biofilm biomass disruption by natural substances with potential for endodontic use. **Brazilian Oral Research**, v. 27, n. 1, p. 20-25, 2013.

Amornpitoksuk, P.; Suwanboon, S.; Sangkanu, S.; Sukhoom, A.; Wudtipan, J.; Srijan, K.; *et al.* Synthesis, photocatalytic and antibacterial activities of ZnO particles modified by diblock copolymer. **Pó Technology**, v. 212, p. 432-438, 2011.

Arias-Moliz, M.T.; Ferrer-Luque, C.M.; Espigares-Garcia, M.; Baca, P. *Enterococcus faecalis* biofilms eradication by root canal irrigants. **Journal of Endodontics**, v. 35, p. 711-715, 2009.

Arias-Moliz, M.T.; Ferrer-Luque, M.C.; González-Rodríguez, M.P.; Valderrama, M.J.; Baca, P. Eradication of *Enterococcus faecalis* biofilms by cetrimide and chlorhexidine. **Journal of Endodontics**, v. 36, p. 87-90, 2010.

Athanassiadis, B.; Abbott, P.V.; George, N.; Walsh LJ. An in vitro study of the antimicrobial activity of some endodontic medicaments against *Enterococcus faecalis* biofilms. **Australian Dental Journal**, v. 55, p. 150-155, 2010.

Baca, P.; Junco, P.; Arias-Moliz, M.T.; González-Rodríguez, M.P.; Ferrer-Luque, C.M. Residual and antimicrobial activity of final irrigation protocols on *Enterococcus faecalis* biofilm in dentin. **Journal of Endodontics**, v. 37, p. 363-366, 2011.

Bao, X.D.; Yao, N.; Guo, H.J.; Zhang, C.F.; Yue, L. Desinfection effects of MTAD on apical isthmus of the root canal system: a scanning electron microscopic evaluation. **Beijing Da Xue Xue Bao**, v. 18, p. 34-38, 2012.

Barbin, E.L. **Estudo *in vitro* do efeito da adição de lauril dietilenoglicol éter sulfato de sódio nas soluções de hipoclorito de sódio sobre suas propriedades físico-químicas anteriores e posteriores à dissolução do tecido pulpar bovino.** Ribeirão Preto. Dissertação - Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. 1999, 108p.

Bergmans, L.; Moisiadis, P.; Huybrechts, B.; Meerbeek, V.; Quirynen, M.; Lambrechts, P. Effect of photo-activated disinfection on endodontic pathogens ex vivo. **International Endodontic Journal**, v. 41, p. 227-239, 2007.

Bhuva, B.; Patel, S.; Wilson, R.; Niazi, S.; Beighton, D.; Mannocci, F. The effectiveness of passive ultrasonic irrigation on intraradicular *Enterococcus faecalis* biofilms in extracted single-rooted human teeth. **International Endodontic Journal**, v. 43, p. 241-250, 2010.

Case, P.D.; Bird, P.S.; Kahler, W.A.; George, R.; Walsh, L.F.; Treatment of root canal biofilms of *Enterococcus faecalis* with ozone gas and passive ultrasound activation. **Journal of Endodontics**, v. 38, p. 523-526, 2012.

Çalt, S.; Serper, A. Smear layer removal by EGTA. **Journal of Endodontics**, v. 26, n. 8, p. 459-461, 2000.

Chai, W.L.; Hamimah, H.; Cheng, S.C.; Sallam, A.A.; Abdullah, M. Susceptibility of *Enterococcus faecalis* biofilm to antibiotics and calcium hydroxide. **Journal of Oral Science**, v. 49, p. 161-166, 2007.

Chen, X.; Li, P.; Wang, X.; Gu, M.; Zhao, C.; Sloan, A.J.; *et al.* Ex vivo antimicrobial efficacy of Strong acid electrolytic water against *Enterococcus faecalis* biofilm. **International Endodontic Journal**, v. 46, p. 938-46, 2013.

Chivatxaranukul, P.; Dashper, S.G.; Messer, H.H. Dentinal tubule invasion and adherence by *Enterococcus faecalis*. **International Endodontic Journal**, v. 41, p. 873-882, 2008.

Clegg, M.S.; Vertucci, F.J.; Walker, C.; Belanger, M.; Britto, L.R. The effect of exposure to irrigant solutions on apical dentin biofilms in vitro. **Journal of Endodontics**, v. 32, p. 434-437, 2006.

Dagna, A.; Arciola, C.R.; Floridini, F.; Seribante, A.; Saino, E.; Visai, L.; *et al.* In vitro evaluation of antimicrobial efficacy of endodontic irrigants. **International Journal of Artificial Organs**, v. 34, p. 914-919, 2011.

De Paz, L.E. Redefining the persistent infection in root canals: possible role of biofilm communities. **Journal of Endodontics**, v. 33, p. 652-662, 2007.

De Paz, L.E.; Bergenholtz, G.; Svensater, G. The effects of antimicrobials on endodontic biofilms bacteria. **Journal of Endodontics**, v. 36, p. 70-77, 2010.

Delany, G.M.; Patterson, S.S.; Miller, M.S.; Newton, C.W. The effect of chlorhexidine gluconate irrigation on the root canal flora of freshly extracted necrotic teeth. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology**, v. 53, p. 18-23, 1982.

Devulapalle, K.S.; Mooser, G. Subsite specificity of the active site of glucosyl transferases from *Streptococcus sobrinus*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 269 p. 67–71, 1994.

Dunavant, T.R.; Regan, J.D.; Glickman, G.N.; Solomon, E.S.; Honeyman, A.L. Comparative evaluation of endodontic irrigants against *Enterococcus faecalis* biofilm. **Journal of Endodontics**, v. 32, p. 527-531, 2006.

Estrela, C.; Estrela, C.R.A.; Barbin, E.L.; Spanó, J.C.; Marchesan, M.A.; Pécora, J.D. Mechanism of Action of Sodium Hypochlorite. **Brazilian Dental Journal**, v. 13, n. 2, p. 113-117, 2000.

Ferraz, C.C.R.; Gomes, B.P.F.; Zaia, A.A.; Teixeira, F.B.; Souza-Filho, F.J. In vitro assessment of the antimicrobial action and the mechanical ability of chlorhexidine gel as an endodontic irrigant. **Journal of Endodontics**, v. 27, p. 452-455, 2001.

Figdor, D.; Sundqvist, G. A big role for the very small understanding the endodontic microbial flora. **Australian Dental Journal Supplement**, v. 52, p. 38-51, 2007.

Fouad, A.F.; Zerella, J.; Barry, J.; Sapanhberg, L.S. Molecular detection of *Enterococcus faecalis* species in root canals of therapy-resistant endodontic infections. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology**, v. 99, p. 112-118, 2005.

Fouad, A.F. The microbial challenge to pulp regeneration. **Advances in Dental Research**, v. 23, n. 3, p. 285-289, 2011.

Gomes, B.P.F.A.; Ferraz, C.C.R.; Vianna, M.E.; Berber, V.B.; Teixeira, F.B.; Souza-Filho, F.J. In vitro antimicrobial activity of several concentrations of sodium hypochlorite and chlorhexidine gluconate in the elimination of *Enterococcus faecalis*. **International Endodontic Journal**, v. 34, p. 424-428, 2001.

Gomes, B.P.F.A.; Pinheiro, E.T.; Jacinto, R.C.; Zaia, A.A.; Ferraz, C.C.R.; Souza-Filho, F.J. Microbial analysis of canals of root-filled teeth with periapical lesions using polymerase chain reaction. **Journal of Endodontics**, v. 34, n. 5, p. 537-40, 2008.

Gründling, G.L.; Zechin, J.G.; Jardim, W.M.; de Oliveira, S.D.; de Figueiredo, J.A. Effect of ultrasonics on *Enterococcus faecalis* biofilm in a bovine tooth model. **Journal of Endodontics**, v. 37, p. 1128-1133, 2011.

Guerreiro-Tanomaru, J.M.; Nascimento, C.A.; Faria-Júnior, N.B.; Graeff, M.S.Z.; Watanabe, E.; Tonomaru-Filho, M. Antibiofilm activity of irrigating solutions associated with cetrimide. Confocal laser scanning microscopy. **International Endodontic Journal**, v. 46 p. 1-6, 2014.

Halford, A.; Ohl, C.D.; Azarpazhooh, A.; Barsani, B.; Friedman, S.; Kishen, A. Synergistic effect of microbubble emulsion and sonic or ultrasonic agitation on endodontic biofilm in vitro. **Journal of Endodontics**, v. 38, p. 1530-1534, 2012.

Hancock, H.; Sigurdsson, A.; Trope, M.; Moiseiwitsch, J. Bacteria isolated after unsuccessful endodontic treatment in a North American population. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology**, v. 91, p. 579-586, 2001.

Heling, I.; Chandler, N.P. Antimicrobial effect of irrigant contamination within dentinal tubules. **International Endodontic Journal**, v. 31, n. 1, p. 8-14, 1998.

Hernández-Sierra, J.F. The antimicrobial sensitivity of *Streptococcus mutans* to nanoparticles of silver, zinc oxide, and gold, **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 4, p. 237-240, 2008.

Hockett, J.L.; Dommisch, J.K.; Johnson, J.D.; Cohenca, N. Antimicrobial efficacy of two irrigation techniques in tapered and nontapered canal preparations: an in vitro study. **Journal of Endodontics**, v. 34, n. 11, p. 1374-1377, 2008.

Jang, H.; Pell, L.E.; Korgel, B.A.; English, D.S. Photoluminescence quenching of silicon nanoparticles in phospholipid vesicle bilayers. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, v. 158, p. 111-117, 2003.

Jeansonne, M.J.; White, R.R. A comparison of 2.0% chlorhexidine gluconate and 5.25% sodium hypochlorite as antimicrobial endodontic irrigants. **Journal of Endodontics**, v. 20, p. 276-278, 1994.

Jiang, W.; Mashayekhi, H.; Xing, B. Bacterial toxicity comparison between nano and micro-scaled oxide particles. **Environmental Pollution**, v. 157, n. 5, p. 1619-1625, 2009.

Jones, N.; Ray, B.; Ranjit, K.T.; Manna, A.C. Antibacterial activity of ZnO nanoparticle suspensions on a broad spectrum of microorganisms. **FEMS Microbiology Letters**, v. 279, n. 1, p. 71-76, 2008.

Jung, B.O.; Kim, C.H.; Choi, K.S.; Lee, Y.M.; Kim, J.J. Preparation of amphiphilic Chitosan and their antimicrobial activities. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 72, n. 1713–1719, 1999.

Kayaoglu, G.; Erten, H.; Ørstavik, D. Possible role of the adhesin ace and collagen adherence in conveying resistance to disinfectants on *Enterococcus faecalis*. **Oral Microbiology Immunology**, v. 32, p. 449-454, 2008.

Kishen, A.; Shi, Z.; Shrestha, A.; Neoh, K.G. An investigation on the antibacterial and antibiofilm efficacy of cationic nanoparticulates for root canal disinfection. **Journal of Endodontics**, v. 12, p. 1515-1520, 2008.

Leonardo, M.R.; Tanomaru Filho, M.; Silva, L.A.B.; Nelson Filho, P.; Bonifacio, K.C.; Ito, I.Y. In vivo antimicrobial activity of 2% chlorhexidine used as a root canal irrigating solution. **Journal of Endodontics**, v. 25, p. 167-171, 1999.

Lima, K.C.; Fava, L.R.G.; Siqueira Jr., J.F. Susceptibilities of *Enterococcus faecalis* Biofilms to Some Antimicrobial Medications. **Journal of Endodontics**, v. 27, n. 10, p. 616-19, 2001.

Lin, Y.; Mickel, A.K.; Chogle, S. effectiveness of selected materials against *Enterococcus faecalis*: part 3. The antibacterial effect of calcium hydroxide and chlorhexidine on *Enterococcus faecalis*. **Journal of Endodontics**, v. 29, n. 9, p. 565-566, 2003.

Lim, Z.; Cheng, J.L.; Lim, T.W.; Teo, E.G.; Wong, J.; George, S. Light activated disinfection: an alternative endodontic disinfection strategy. **Australian Dental Journal**, v. 54, p. 108-114, 2009.

Liu, Y.; He, L.; Mustapha, A.; Li, H.; Hu, Z.Q.; Lin, M. Antibacterial activities of zinc oxide nanoparticles against *Escherichia coli* O157:H7. **Journal of Applied Microbiology**, v. 107, n. 4, p. 1193-1201, 2009.

Love, R.M. *Enterococcus faecalis*: a mechanism for its role in endodontic failure. **International Endodontic Journal**, v. 34, p. 399-405, 2001.

Meire, M.A.; Coenye, T.; Nelis, H.J.; De Moor, R.J.G. Evaluation of Nd:YAG irradiation, antibacterial photodynamic therapy and sodium hypochlorite treatment on *Enterococcus faecalis* biofilms. **International Endodontic Journal**, v. 45, p. 482-491, 2012.

Molander, A.; Reit, C.; Dahlén, G.; Kvist, T. Microbiological status of root filled teeth with apical periodontitis. **International Endodontic Journal**, v. 31, p. 1-7, 1998.

Moller Jr, Å. Microbiological examination of root canals and periapical tissues of human teeth. **Goteborg, Sweden: University of Goteborg**. 1996.

Nair, P.N.R.; Henry, S.; Cano, V.; Vera, J. Microbial status of apical root canal system of human mandibular first molars with primary apical periodontitis after 'one-visit' endodontic treatment. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology**, v. 99, p. 231-252, 2005.

Neelakantan, P.; Subbarao, C.; Sharma, S.; Subbarao, C.V.; Garcia-Godoy, F.; Gutmann, J.L. Effectiveness of curcumin against *Enterococcus faecalis* biofilm. **Acta Odontologica Scandinavica**, v. 71, n. 6, p. 1453-1457, 2013.

Nowack, B.; Bucheli, T.D. Occurrence, behavior and effects of nanoparticles in the environment. **Environmental Pollution**, v. 150, p. 5-22, 2007.

Okino, L.A.; Siqueira, E.L.; Santos, M.; Bombana, A.C.; Figueiredo, J.A. Dissolution of pulp tissue by aqueous solution of chlorhexidine digluconate and chlorhexidine digluconate gel. **International Endodontic Journal**, v. 37, n. 1, p. 38-41, 2004.

Oliveira, D.P.; Barbizam, J.V.B.; Trope, M.; Teixeira, F.B. In vitro antibacterial efficacy of endodontic irrigants against *Enterococcus faecalis*. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology**, v. 103, p. 702-706, 2007.

Oprea, O.; Andronescu, E.; Fikai, D.; Fikai, A.; Faik, N. ZnO Applications and Challenges. **Current Organic Chemistry**, v. 18, n. 2, p. 192-203, 2014.

Ozdemir, H.O.; Buzoglu, H.D.; Calt, S.; Stabholz, A.; Steinberd, D. Effect of ethylenediaminetetraacetic acid and sodium hypochlorite irrigation on *Enterococcus faecalis* biofilm colonization in young and old human root canal dentin: in vitro study. **Journal of Endodontics**, v. 36, p. 842-846, 2010.

Padmavathy, N.; Vijayaraghavan, R. Enhanced Bioactivity of ZnO Nanoparticles - an Antimicrobial Study. **In Science and Technology of Advanced Materials**, v. 9, n. 35, p. 4-11, 2008.

Pan, J.; Sun, K.; Liang, Y.; Sun, P.; Yang, X.; Wang, J.; *et al.* Cold plasma therapy of a tooth root canal infected with *Enterococcus faecalis* biofilms in vitro. **Journal of Endodontics**, v. 39, p. 105-110, 2013.

Pappen, F.G.; Qian, W.; Aleksejuniene, J.; Leonardo, T.; Leonardo, M.R.; Haapasalo, M. Inhibition of sodium hypochlorite antimicrobial activity in the presence of bovine serum albumin. **Journal of Endodontics**, v. 36, p. 268-271, 2010.

Pashley, E.L.; Birdsong, N.L.; Bowman, K.; Pashley, D.H. Cytotoxic effects of NaOCl on vital tissue. **Journal of Endodontics**, v. 11, p. 525-528, 1985.

Peciuliene, V.; Baciuniene, I.; Eriksen, H.; Haapasalo, M. Isolation of *Enterococcus faecalis* in previously root filled canals in a Lithuanian population. **Journal of Endodontics**, v. 26, p. 593-595, 2000.

Percival, S.L.; Bowler, P.G.; Dolman, J. Antimicrobial activity of silver-containing dressings on wound microorganisms using an in vitro biofilm model. **International Wound Journal**, v. 4, p. 186-191, 2007.

Phan, T.N.; Buckner, T.; Sheng, J.; Baldeck, J.D.; Marquis, R.E. Physiologic actions of zinc related to inhibition of acid and alkali production by oral streptococci in suspensions and biofilms. **Oral Microbial Immunology**, v. 19, p. 31-38, 2004.

Pinheiro, E.T.; Gomes, B.P.F.A.; Ferraz, C.C.R.; Sousa, E.L.R.; Teixeira, F.B.; Souza-Filho, F.J. Microorganisms from canals of root filled teeth with periapical lesions. **International Endodontic Journal**, v. 36, p. 1-11, 2003.

Portenier, I., Waltimo, T.M.T.; Haapasalo, M. *Enterococcus faecalis* – the root canal survivor and ‘star’ in post-treatment disease. **Endodontics Topics**, v. 6, p. 135-159, 2003.

Prabhakar, J.; Senthilkumar, M.; Priya, M.S.; Mahalakshmi, K.; Sehgal, P.K.; Sukumaran, V.G. Evaluation of antimicrobial efficacy of herbal alternatives (triphala and green tea

polyphenols), MTAD, and 5% sodium hypochlorite against *Enterococcus faecalis* biofilm formed on tooth substrate: an in vitro study. **Journal of Endodontics**, v. 36, p. 83-86, 2010.

Rabea, E.I.; Badawy, M.E.T.; Stevens, C.V.; Smagghe, M.; Steurbaut, W. Chitosan as antimicrobial agent: applications and mode of action. **Biomacromolecules**, v. 4, p. 1457-1465, 2003.

Radcliffe, C.E.; Potouridou, L.; Quereshi, R.; Habahbeh, N.; Qualtrough, A.; Worthington, H.; *et al.* Antimicrobial activity of varying concentrations of sodium hypochlorite on the endodontic microorganisms *Actinomyces israelii*, *A. Naeslundii*, *Candida albicans* and *Enterococcus faecalis*. **International Endodontic Journal**, v. 37, p. 438-446, 2004.

Rahimi, S.; Shahi, S.; Gholizadeh, S.; Shakouie, S.; Rikhtegaran, S.; Soroush, B.M.H.; *et al.* Bactericidal effects of Nd:YAG laser irrigation and sodium hypochlorite solution of *Enterococcus faecalis* biofilm. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 30, p. 637-641, 2012.

Rasmussen, J.W.; Martinez, E.; Louka, P.; Wingett, D.G. Zinc Oxide Nanoparticles for Selective Destruction of tumor cells and potential for drug delivery applications. **Expert opinion on drug delivery**, v. 9, p. 1063-1077, 2010.

Ricucci, D.; Siqueira Jr, J.F. Biofilms and apical periodontitis study of prevalence and association with clinical histopathologic findings. **Journal of Endodontics**, v. 36, p. 1277-1288, 2010.

Rolla, G.; Melsen, B. On the mechanism of the plaque inhibition by chlorhexidine. **Journal of Dental Research**, v. 54, p. 57-62, 1975.

Sedgley, C.M.; Lennan, S.L.; Appelbe, O.K. Survival of *Enterococcus faecalis* in root canals ex vivo. **International Endodontic Journal**, v. 38, p. 735-742, 2005.

Seet, A.N.; Zilm, P.S.; Gully, N.J.; Cathro, P.R. Qualitative comparison of sonic or laser energisation of 4% sodium hypochlorite on an *Enterococcus faecalis* biofilm grown in vitro. **Australian Endodontic Journal**, v. 38, p. 100-106, 2012.

Shrestha, A.; Zhilong, S.; Gee, N.K. Nanoparticulates for antibiofilm treatment and effect of aging on its antibacterial activity. **Journal of Endodontics**, v. 36, n. 6, p. 1030-1035, 2010.

Siqueira Jr, J.F.; Machado, A.G.; Silveira, R.M.; Lopes, H.P.; Uzeda, M. Evaluation of the effectiveness of sodium hypochlorite used with three irrigation methods in the elimination

of *Enterococcus faecalis* from root canal, in vitro. **International Endodontic Journal**, v. 30, p. 279-282, 1997.

Siqueira Jr, J.F.; Rôças I.N. Polymerase chain reaction-based analysis of microorganisms associated with failed endodontic treatment. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology**, v. 97, p. 85-94, 2004.

Siqueira Jr, J.F.; Rôças, I.N. Bacteriologic investigation of the effects of sodium hypochlorite and chlorhexidine during the endodontic treatment of teeth with apical periodontitis. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology**, v. 104, n. 1, p. 122-130, 2007.

Siqueira Jr, JF, Rôças IN, Lopes HP. **Endodontia: biologia e técnica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010. p. 103-146.

Soares, J.A.; Roque de Carvalho, M.A.; Cunha, S.M.; Mendonça, R.M.; Ribeiro-Sobrinho, A.P.; Brito-Júnior, M.; *et al.* Effectiveness of chemomechanical preparation with alternating use of sodium hypochlorite and EDTA in eliminating intracanal *Enterococcus faecalis* biofilm. **Journal of Endodontics**, v. 36, p. 894-898, 2010.

Somayaji, K.; Acharya, S.R.; Bairy, I.; Prakash, P.Y.; Rao, M.S.; Ballal, N.V. In vitro scanning electron microscopic study on the effect of doxycycline and vancomycin on enterococcal induced biofilm. **Iran Endodontic Journal**, v. 5, p. 53-58, 2010.

Sondi, I.; Salopek-Sondi, B. Silver nanoparticles and antimicrobial agent: a case study on *E. coli* as model for Gram-negative bacteria. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 275, p. 177-182, 2004.

Soukos, N.S.; Chen, P.S.Y.; Morris, J.T.; Ruggiero, K.; Abernethy, A.D.; Som, S.; *et al.* Photodynamic therapy for endodontic disinfection. **Journal of Endodontics**, v. 32, n. 10, p. 979-984, 2006.

Stojicic, S.; Shen, Y.; Qian, W.; Johnson, B.; Haapasalo, M. Antibacterial and smear layer removal ability of a novel irrigant, QMiX. **International Endodontic Journal**, v. 45, p. 363-371, 2011.

Sunada, K.; Watanabe, T.; Hashimoto, K. Bactericidal activity of copper-deposited TiO₂ thin film under weak UV light illumination. **Environmental Science Technology**, v. 37, p. 4785-4789, 2003.

Sundqvist, G.; Frigdor, D.; Persson, S.; Sjogren, U. Microbiologic analysis of teeth with failed endodontic treatment and the outcome of conservative re-treatment. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology**, v. 85, p. 86-93, 1998.

Svensäter, G.; Bergenholtz, G. Biofilms in endodontic infections. **Endodontic Topics**, v. 9, p. 27-36, 2004.

Tanomaru Filho, M.; Leonardo, M.R.; Silva, L.A.B. Effect of irrigating solution and calcium hydroxideroot canal dressing on the repair of apical and periapical tissues of teeth with periapical lesions. **Journal of Endodontics**, v. 28, n. 4, p. 295-299, 2002.

Tanomaru Filho, M.; Leonardo, M.R.; Silva, L.A.B.; Anibal, F.F.; Faccioli, L.H. Inflammatory response to different irrigant solutions. **International Endodontic Journal**, v. 26, n. 9, p. 735-738, 2006.

Tirali, R.E.; Bodur, H.; Ece, G. In vitro antimicrobial activity of sodium hypochlorite, chlorhexidine gluconate and octeinidine dihydrochloride in elimination of microorganisms within dentinal tubules of primary and permanent teeth. **Oral Medicine, Oral Pathology and Bucal Surgery**, v. 17, p. 517-522, 2012.

Van der Waal, S.V.; Jiang, L.M.; de Soet, J.J.; Van der Sluis, L.W.; Wesselink, P.R.; Crielaard, W. Sodium chloride and potassium sorbate: a synergistic combination against *Enterococcus faecalis* biofilms: an in vitro study. **European Journal of Oral Sciences**, v. 120, p. 452-457, 2012.

Vianna, M.E.; Gomes, B.P.; Berber, V.B.; Zaia, A.A.; Ferraz, C.C.; De Souza-Filho, F.J. In vitro evaluation of the antimicrobial activity of chlorhexidine and sodium hypochlorite. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology**, v. 97, n. 1, p. 79-84, 2004.

Vivacqua-Gomes, N.; Ferraz, C.C.; Gomes, B.P.; Zaia, A.A.; Teixeira, F.B.; Souza-Filho, F.J. Influence of irrigants on the coronal microleakage of laterally condensed gutta-percha root fillings. **International Endodontic Journal**, v. 35, n. 9, p. 791-795, 2002.

Wang, C.S.; Arnold, R.R.; Trope, M.; Teixeira, F.B. Clinical efficiency of 2% chlorhexidine gel in reducing intracanal bacteria. **Journal of Endodontics**, v. 33, n. 11, p. 1283-1289, 2007.

Wang, Z.; Shen, T.; Haapasalo, M. Effectiveness of endodontic disinfecting solutions against young and old *Enterococcus faecalis* biofilms in dentin canals. **Journal of Endodontics**, v. 38, p. 1376-1379, 2012.

White, R.R.; Hays, G.L.; Janer, L.R. Residual antimicrobial activity after canal irrigation with chlorhexidine. **Journal of Endodontics**, v. 23, n. 4, p. 229-231, 1997.

Williamson, A.E.; Cardon, J.W.; Drake, D.R. Antimicrobial susceptibility of monoculture biofilms of a clinical isolate of *Enterococcus faecalis*. **Journal of Endodontics**, v. 35, p. 95-97, 2009.

Xie, Q.; Johnson, B.R.; Wenckus, C.S.; Fayad, M.I.; Wu, C.D. Efficacy of berberine, an antimicrobial plant alkaloid, as an endodontic irrigant against a mixed-culture biofilm in an in vitro tooth model. **Journal of Endodontics**, v. 38, p. 1114-1117, 2012.

Yamamoto, O.; Sawai, J.; Sasamoto, T. Change in antibacterial characteristics with doping amount of ZnO in MgO–ZnO solid solution, **International Journal of Inorganic Materials**, v. 2, p. 451-454, 2000.

Zamany, A.; Safavi, K.; Spangberg, L.S. The effect of chlorhexidine as an endodontic disinfectant. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology**, v. 96, n. 5, p. 578-812003.

Zand, V.; Milani, A.S.; Amini, M.; Barhaghi, M.H.S.; Lotfi, M.; Rikhtegaran, S.; *et al.* Antimicrobial efficacy of photodynamic therapy and sodium hypochlorite of monoculture biofilms of *Enterococcus faecalis* at different stages of development. **Photomedicine Laser Surgery**, v. 32, p. 245-251, 2014.

Zaura-Arite, E.; Van Marle, J.; Ten Cate, J.M. Confocal microscopy study of undisturbed and chlorhexidin-treated dental biofilm. **Journal of Dentistry Research**, v. 80, p. 1436-1440, 2001.

Zehnder, M. Root canal irrigants. **Journal of Endodontics**, v. 32, p. 389-398, 2006.

Zerella, J.A.; Fouad, A.F.; Spångberg, L.S. Effectiveness of a calcium hydroxide and chlorhexidine digluconate mixture as disinfectant during retreatment of failed endodontic

cases. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology**, v. 100, p. 756-761, 2005.

Zhang, L.; Jiang, Y.; Ding, Y.; Daskalakis, N.; Jeuken, L.; Povey, M.; O'Neill, A.J.; *et al.* Mechanistic investigation into antibacterial behaviour of suspensions of ZnO nanoparticles against *E. coli*. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 12, p. 625-636, 2010.

**ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da
Universidade Federal de Santa Catarina, sob o número 359.070**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
SANTA CATARINA - UFSC



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Efeito antimicrobiano de diferentes soluções irrigadoras sobre o biofilme do canal

Pesquisador: WILSON TADEU FELIPPE

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 20001313.0.0000.0121

Instituição Proponente: UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 359.070

Data da Relatoria: 12/08/2013

Apresentação do Projeto:

Trata-se de um estudo vinculado a um projeto de doutorado do Programa de pós-graduação em endodontia da UFSC. O presente estudo caracteriza-se como laboratorial ao examinar em dentes humanos ex vivo a capacidade antimicrobiana de diferentes soluções irrigadoras, com e sem ativação ultrassônica, contra o biofilme de *E. faecalis* estabelecido no canal radicular.

Objetivo da Pesquisa:

Avaliar, ex vivo, a capacidade antimicrobiana das soluções de hipoclorito de sódio 1% e 5%, nanopartículas de prata 1%, nanopartículas de óxido de zinco e clorexidina 2%, com e sem ativação ultrassônica, contra o biofilme de *E. faecalis* estabelecido no canal radicular. Avaliar, por meio de contagem de unidades formadoras de colônias (UFCs), a capacidade antimicrobiana das soluções-teste, com e sem ativação ultrassônica, contra o biofilme de *E. faecalis* estabelecido na superfície do canal radicular. Analisar, se presente, por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV), a arquitetura do biofilme de *E. faecalis* na superfície do canal radicular, após a irrigação com as soluções-teste.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

os pesquisadores apontam como benefícios que "A utilização de dentes extraídos é necessária para simular ex vivo uma situação o mais semelhante possível da realidade clínica. Uma vez

Endereço: Campus Universitário Reitor João David Ferreira Lima
Bairro: Trindade **CEP:** 88.040-900
UF: SC **Município:** FLORIANOPOLIS
Telefone: (48)3721-9206 **Fax:** (48)3721-9696 **E-mail:** cep@reitoria.ufsc.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
SANTA CATARINA - UFSC



Continuação do Parecer: 359.070

confirmada a efetividade das soluções irrigadoras e dos métodos de irrigação propostos, os resultados da pesquisa serão divulgados através de publicações, congressos e cursos, de modo que a classe odontológica/endodôntica seja informada e a pratique de forma a beneficiar a sociedade em geral." os pesquisadores afirmam que o presente estudo não traz riscos aos sujeitos dos quais os dentes serão extraídos pois estes serão os doadores dos dentes extraídos por indicação clínica não relacionado ao presente estudo. os pesquisadores informam que os riscos relacionados a extração são os inerentes ao procedimento clínico.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa está bem fundamentada com uma revisão acerca da utilização das soluções a serem utilizadas no procedimento. Como os dentes serão analisados ex vivo, a partir da doação voluntária dos pacientes da clínica odontológica que tem indicação clínica de remoção dos dentes a serem analisados conforme os critérios presentes no projeto original. De igual forma os doadores dos dentes assinarão um termo de doação e serão assistidos no procedimento pelos profissionais da clínica odontológica.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Apresenta o TCLE com o termo de doação adequado aos sujeitos explicitando os detalhes da pesquisa.

Recomendações:

sem recomendações.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

aprovado

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Endereço: Campus Universitário Reitor João David Ferreira Lima
Bairro: Trindade **CEP:** 88.040-900
UF: SC **Município:** FLORIANOPOLIS
Telefone: (48)3721-9206 **Fax:** (48)3721-9696 **E-mail:** cep@reitoria.ufsc.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
SANTA CATARINA - UFSC



Continuação do Parecer: 359.070

FLORIANOPOLIS, 13 de Agosto de 2013

Assinador por:
Washington Portela de Souza
(Coordenador)

Endereço: Campus Universitário Reitor João David Ferreira Lima
Bairro: Trindade **CEP:** 88.040-900
UF: SC **Município:** FLORIANOPOLIS
Telefone: (48)3721-9206 **Fax:** (48)3721-9696 **E-mail:** cep@reitoria.ufsc.br

APÊNDICE A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE CURSO: ODONTOLOGIA

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Eu, Morgana Thays Orsi, aluna do curso de Odontologia da UFSC, juntamente com meu orientador Prof. Dr. Wilson Tadeu Felipe, desenvolveremos a pesquisa **“Atividade antibiofilme da solução de nanopartículas de óxido de zinco”**, com o objetivo de avaliar diferentes soluções quanto à capacidade de matar bactérias dentro do canal do dente, para que possamos identificar a solução mais efetiva e assim obtermos maior chance de sucesso do tratamento. O seu dente será extraído porque não existem formas de tratamento para recuperá-lo, portanto, por um motivo alheio a esta pesquisa. Os riscos e/ou desconforto são aqueles associados aos procedimentos de extração. A pesquisa em si não oferecerá nenhum tipo de riscos e/ou desconforto.

Imediatamente após a realização do procedimento de extração pelo cirurgião-dentista, os dentes serão armazenados em solução adequada (solução de formol 10%) até o início do estudo. Todos os procedimentos descritos a seguir serão realizados no laboratório de Endodontia, da Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC, Campus Trindade. Os dentes serão processados para a pesquisa - o espaço do canal radicular de cada dente será alargado. Em seguida serão colocadas bactérias dentro do canal. Depois de 24h todos os canais serão lavados com as soluções-teste. Após, será realizada uma análise para ver qual solução matou mais bactérias. Os remanescentes dos dentes utilizados no estudo serão armazenados em recipientes adequados e identificados (Biorrepositório).

Para esclarecer qualquer dúvida em relação a essa pesquisa você poderá entrar em contato comigo (Morgana) pelo telefone: (48) 9132-8990, residente na Rua Cônego Bernardo, 100, Florianópolis - SC ou com o pesquisador principal (Dr. Wilson Felipe): (48) 9982-8300, residente na Rua Presidente Coutinho, 179,

Florianópolis - SC. Se você concordar em doar o seu dente, garantimos que ele será utilizado somente neste trabalho, e que não haverá ligação/identificação entre o dente doado e o paciente. Garantimos também que, se for o caso, a sua desistência na doação do dente não implicará em nenhum tipo de prejuízo. Informamos que seu dente não será utilizado em nenhum outro tipo de pesquisa biológica.

Assinatura da pesquisadora

Assinatura do orientador

Eu _____,
RG _____ declaro que entendi o que me foi explicado,
compreendi a necessidade da pesquisa “**Atividade antibiofilme da solução de nanopartículas de óxido de zinco**”, e concordo que meu dente, extraído por motivos alheios a esta pesquisa, seja utilizado na realização da mesma.

Assinatura do doador

Florianópolis, ____ de _____ de 2013.