

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA  
CURSO DE ESPECIALIZAÇÃO EM ENDODONTIA

KAREN BAREA DE PAULA DUARTE

ANÁLISE DA AÇÃO ANTIMICROBIANA DO HIPOCLORITO DE SÓDIO E CÁLCIO SOBRE  
BIOFILME ORAL FORMADO *IN SITU*

Porto Alegre  
2016

ANÁLISE DA AÇÃO ANTIMICROBIANA DO HIPOCLORITO DE SÓDIO E CÁLCIO SOBRE  
BIOFILME ORAL FORMADO *IN SITU*

Trabalho de Conclusão de Curso  
apresentado ao Curso de Especialização em  
Endodontia da Faculdade de Odontologia  
da Universidade Federal do Rio Grande  
do Sul, como requisito parcial para  
obtenção do título de Especialista em Endodontia.

Orientador: Prof. Dr. Francisco Montagner

Porto Alegre  
2016

### CIP - Catalogação na Publicação

De Paula, Karen  
ANÁLISE DA AÇÃO ANTIMICROBIANA DOS HIPOCLORITOS  
DE SÓDIO E CÁLCIO SOBRE BIOFILME ORAL FORMADO IN  
SITU / Karen De Paula. -- 2016.  
51 f.

Orientador: Francisco Montagner.

Trabalho de conclusão de curso (Especialização) --  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade  
de Odontologia, Especialização em Endodontia, Porto  
Alegre, BR-RS, 2016.

1. Endodontia. 2. Hipoclorito de Cálcio. 3.  
Biofilme. 4. In situ. I. Montagner, Francisco ,  
orient. II. Título.|

### *Dedicação*

*Dedico este trabalho a minha querida avó Alzira Leite Barea (in memoriam) por ter me dado toda força e sabedoria para seguir em cada momento da minha vida.*

## *Agradecimentos*

*Agradeço primeiramente a Deus por ter proporcionado todas as ferramentas para que eu pudesse concluir mais esta etapa na minha educação.*

*Agradeço ao meu amado marido Antônio Junior, por ter vivido junto comigo todos os momentos da especialização, e ter abdicado de alguns sonhos próprios para eu poder concluir esse curso.*

*Aos meus amados pais Agenor e Salete por toda dedicação, empenho e confiança em mim. Sou muito grata por todo amor que recebo de vocês!*

*A minha maior incentivadora em fazer este curso que foi a minha irmã Raquel, por toda confiança e preocupação comigo durante este período.*

*Ao meu querido orientador, por toda ajuda ao longo desses dois anos, tanto na parte clínica, quanto teórica.*

*A toda equipe de professores do curso de especialização da UFRGS, Fabiana Grecca, Francisco Montagner, Marcus Só, Patrícia Kopper, Simone Luisi, Renata Graziottin, Muito obrigada por toda colaboração na minha formação.*

*Em especial agradeço aos dois grandes mestres da Endodontia do Rio Grande do Sul, professor Régis Burmeister dos Santos e João Ferlino Filho, não existem palavras para expressar a gratidão por toda ajuda e incentivo que sempre recebi deles. Sinto-me um bebê aprendendo a engatinhar na Endodontia, mas fica mais fácil quando sei que estou próxima deles. Aos dois o meu eterno agradecimento!*

*A querida Andreia Dill, muito mais que uma funcionária, uma amiga que irei sentir muita falta.*

*A Alessandra Mendes, nova funcionária que vem nos conquistando com o seu jeito meigo e determinado. Muito obrigada pela ajuda!*

*A professora Maria Beatriz, por ter me incentivado a fazer o curso! Muito obrigada!*

*Aos meus colegas de especialização, foi muito bom conviver com cada um de vocês ao longo desses dois anos. Sentirei saudades das nossas conversas nas quintas e sextas feiras!*

*A CAPES, por ter me ajudado a pagar uma boa parte da especialização por meio da minha bolsa do mestrado!*



## RESUMO

De Paula, Karen Barea. **ANÁLISE DA AÇÃO ANTIMICROBIANA DO HIPOCLORITO DE SÓDIO E HIPOCLORITO DE CÁLCIO SOBRE BIOFILME ORAL FORMADO *IN SITU***. 2016 Trabalho de conclusão de curso de Especialização em Endodontia (Especialização) – Faculdade de Odontologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre 2016.

O objetivo do estudo foi avaliar a ação antimicrobiana de hipoclorito de cálcio  $[Ca(OCl)_2]$  em diferentes concentrações (0,5%, 1%, 2,5% e 5%) frente a um biofilme intraoral formado *in situ*, no período de três dias, cultivado por 24 horas em BHI caldo e comparando às mesmas concentrações do NaOCl, por meio da microscopia eletrônica de varredura e microscopia confocal a laser. Foi observada a formação de biofilme após o contato de três dias em meio intraoral. Pela análise das imagens pela microscopia confocal foram observadas células viáveis no grupo controle e nos grupos NaOCl e  $Ca(OCl)_2$  0,5%. Na análise por meio da microscopia eletrônica de varredura foram observados grânulos de cálcio nas concentrações de 0,5%, 1% e 2,5%. Não foram observados biofilmes em todas as concentrações do NaOCl, pela análise da microscopia eletrônica de varredura. Nos grupos do  $Ca(OCl)_2$ , nas concentrações de 0,5% e 1% ocorreu a presença de biofilme formado e estruturado. Concluiu-se que soluções de hipoclorito de cálcio apresentaram ação antimicrobiana frente a um biofilme *in situ*, em concentrações similares às do hipoclorito de sódio empregadas em Endodontia. O efeito antimicrobiano demonstrado pelas soluções é proporcional a sua concentração.

Palavras-chave: Biofilme Dentário – Hipoclorito de Cálcio – Microscopia confocal – Microscopia eletrônica de varredura

## SUMÁRIO

INTRODUÇÃO .....	08
REVISÃO DE LITERATURA .....	10
OBJETIVO .....	22
METODOLOGIA .....	23
RESULTADO .....	31
DISCUSSÃO .....	37
CONCLUSÃO .....	41
REFERÊNCIAS .....	42

## 1. INTRODUÇÃO

Microrganismos e seus produtos são considerados os principais agentes etiológicos das lesões periapicais (SUNDQVIST 1976; KAKEHASHI 1965). É importante aplicar o conceito de biofilme e compreender o potencial patogênico da microbiota do canal radicular. As bactérias causadoras de doenças periapicais são organizadas em estruturas de biofilme, que são comunidades microbianas complexas compostas por um grande número de espécies de bactérias, com diferentes exigências ecológicas e potencial patogênico. O conceito de biofilme se dá pelo crescimento de células microbianas em comunidades dinâmicas em uma superfície sésil, envoltos por uma matriz extracelular (COSTERTON, 1994.) A formação de biofilme tem uma especial importância clínica, pois organismos que são reunidos em comunidade exigem maiores esforços terapêuticos, incluindo as medidas de tratamentos químicos e mecânicos (KAPIL JHAJHARIA, 2015).

Substâncias químicas podem ser empregadas no preparo de canais radiculares como auxiliares da instrumentação e como soluções irrigadoras. São utilizadas com o objetivo de promover a dissolução de tecidos orgânicos vivos ou necrosados, a eliminação ou máxima redução possível de microrganismos, a lubrificação, a quelatação de íons cálcio e a suspensão de detritos oriundos da instrumentação. (SIQUEIRA, 2007).

A ação antimicrobiana do NaOCl está bem descrita na literatura, (SIQUEIRA, 1997; SIQUEIRA 1998). Observa-se que no hipoclorito de sódio, o hidróxido de sódio atua como solvente orgânico e de gordura, formando sabão (reação de saponificação). O hidróxido de sódio neutraliza aminoácidos e degrada ácidos graxos. O ácido hipocloroso, além de solvente orgânico, por liberar cloro nascente, que se combina com o grupo amina das proteínas formando as cloraminas, as quais possuem um efeito antimicrobiano. A reação de cloraminação entre o cloro e o grupamento amina (NH) dos aminoácidos, com a formação de cloraminas interferem no metabolismo celular. O cloro (oxidante forte) apresenta ação antimicrobiana por meio da inibição enzimática bacteriana, a partir de uma oxidação irreversível dos grupos SH (sulfidril) de enzimas bacterianas (ESTRELA, 2002).

O hipoclorito de cálcio é um composto halogenado. Geralmente, encontra-se disponível sobre a forma de um pó branco e decompõe-se rapidamente na água ou quando aquecido (AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY, 2013). Sua utilização está descrita na esterilização industrial e no tratamento e purificação da água (WHITTAKER; MOHLER, 1911).

No estudo de Dutta e Saunders (2012) foi avaliado o potencial de dissolução tecidual de soluções de hipoclorito de sódio e de hipoclorito de cálcio nas concentrações de 5% e 10%. Os autores observaram uma dissolução mais acentuada de tecido muscular bovino para as soluções de hipoclorito de sódio do que para as soluções de hipoclorito de cálcio, no período de 35 minutos.

Conforme De Almeida et al (2014), o hipoclorito de cálcio 2.5% associado a ativação ultrassônica passiva conseguiu eliminar uma maior quantidade de *E. faecalis*, quando comparado com NaOCl 2.5%, associado ou não a ativação ultrassônica passiva. De Paula (2015), observou que as concentrações mais elevadas do hipoclorito de cálcio (2,5% e 5%) apresentaram uma ação antimicrobiana mais intensa e rápida frente ao *E. faecalis* do que as mesmas concentrações no NaOCl.

Até o momento, não existe na literatura estudos que avaliem a capacidade antimicrobiana do hipoclorito de cálcio frente a biofilme formado *in situ* e a sua comparação com substâncias halogenadas utilizadas habitualmente. A partir destas constatações, observa-se a relevância da avaliação e análise destas propriedades para poder utilizar este composto como uma alternativa de substância química auxiliar no preparo dos canais radiculares.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Biofilmes

Costerton et al (1987) afirmaram que o processo de adesão bacteriana se dá pela ligação a uma superfície utilizando matriz de polissacarídeos. A célula, então, entra em processo de divisão, produzindo células irmãs, vinculadas a essa matriz, iniciando o desenvolvimento de microcolônias aderentes. A produção de um biofilme contínuo é uma função de divisão celular dentro de microcolônias e recrutamento de novos microrganismos. Por conseguinte, o biofilme finalmente consiste em células individuais e microcolônias de células, incorporados em um ambiente altamente hidratado, que é a matriz extracelular. O estudo também concluiu que bactérias dentro de biofilmes são geralmente muito mais resistentes a antimicrobianos, do que as células sozinhas.

A fase específica de aderência microbiana ao substrato se dá com a ajuda da formação de adesinas ou com receptores sobre o substrato, (HANDLEY 1995, MIRON 2001). Dunavant e colaboradores (2006) mostraram que poucos estudos avaliaram a eficácia de soluções irrigadoras contra microrganismos crescidos como um biofilme. Por conseguinte, o objetivo do estudo foi quantificar e comparar a eficácia de irrigantes contemporâneos (NaOCl 1% e 6%, BioPure MTAD, Gluconato de Clorexidina 2%, REDTA e SmearClear) atualmente utilizados no tratamento do canal radicular; e a introdução de um novo método *in vitro* para avaliação da eficácia destes irrigantes frente a biofilmes na endodontia. Os resultados revelaram uma relação significativa entre agente teste e percentual de morte celular ( $P < 0,05$ ). Nenhuma diferença estatística foi encontrada entre NaOCl 1% e 6%. Encontrou-se uma diferença significativa entre NaOCl 1% e 6% e todos os outros agentes teste incluindo SmearClear, 2% CHX, REDTA, e Biopure MTAD ( $p < 0,05$ ).

Chávez de Paz (2007) fez um estudo em que propôs uma redefinição para infecções radiculares persistentes. Ao tomar uma perspectiva ecológica, o principal objetivo desta revisão foi apresentar provas de que a natureza das infecções endodônticas persistentes depende da capacidade dos microrganismos de adaptar sua fisiologia às novas condições ambientais estabelecidas pelo tratamento. As alterações no ambiente, tais como um aumento do pH por hidróxido de cálcio ou o efeito de agentes antimicrobianos, são capazes de desencadear uma cascata de modificações genéticas. A base para o entendimento do que acontece em infecções endodônticas sugere que o mais preocupante não é uma espécie individual de microrganismo, e

sim a característica polimicrobiana do biofilme. Na realidade, a maioria dos estudos, que envolvem microbiologia endodôntica refere-se ao agente patogênico como uma bactéria isolada a partir canal radicular, associada ao sintoma. Por esta abordagem, as espécies mais frequentemente encontradas ou recuperadas assumem o papel do principal patógeno endodôntico. A ocorrência frequente de monoculturas de *E. faecalis* levantou suspeita de que esta bactéria pode ser o único microrganismo encontrado em infecções persistentes. Considerando que infecções por mono-espécies raramente acontecem, é possível que para que se encontrem culturas puras de *E. faecalis*, as técnicas utilizadas favoreçam o achado deste microrganismo em relação aos outros que também estão no local em um número reduzido ou em estado dormente. O autor conclui, a partir da constatação de que todos os microrganismos orais são capazes de formar um biofilme e que existem essas comunidades associadas a superfície em canais radiculares, é possível aplicar o "conceito de biofilme" ao tratamento clínico, ou seja, os esforços não devem ser dirigidos a um microrganismo específico, mas a um grupo de organismos bem adaptados, promovendo aumento da resistência a uma variedade de agentes antimicrobianos. Prospectivamente, a aplicação da biologia molecular será inestimável para identificar, por exemplo, expressão de genes por colonizadores em biofilme do canal radicular, e permitir a identificação de genes envolvidos na adaptação dos mesmos. A partir deste conhecimento, poderá se identificar eventos adaptativos que ocorrem na microbiota do canal radicular, enquanto os organismos são expostos ao tratamento canal. Este caminho deve ajudar a encontrar mecanismos que podem bloquear esses processos.

Del Carpio-Perochena e colaboradores (2011), avaliaram a capacidade de dissolução e limpeza do biofilme formado em espécimes de dentina, utilizados por um aparelho intraoral. As substâncias testadas foram: clorexidina 2%, NaOCl 1%, 2,5% e 5,25% nos intervalos de tempo de 5, 15 e 30 minutos. As amostras foram avaliadas por meio de microscopia confocal a laser. Os mais elevados valores de dissolução de biofilme foram encontrados no grupo de NaOCl em 30 minutos e no NaOCl 5,25% de 5 e 15 minutos. Os autores concluíram que o intervalo de 30 minutos de contato com o hipoclorito de sódio independente da concentração apresenta os valores mais elevados para dissolução do biofilme e limpeza da dentina.

Zapata e colaboradores (2013) avaliaram a atividade antimicrobiana do hidróxido de cálcio, clorexidina gel 2% e da pasta triantibiótica (metronidazol, minociclina, e ciprofloxacina) usando um modelo de biofilme *in situ*. Quarenta espécimes de dentina bovinos foram infectados intraoral utilizando um dispositivo ortodôntico removível, a fim de induzir a colonização do biofilme da dentina. Em seguida, as amostras foram tratadas com os medicamentos durante 7 dias. Foram realizadas duas avaliações: imediatamente após a eliminação da medicação e após

a incubação em BHI caldo durante 24 horas. Hidróxido de cálcio e clorexidina gel 2% não apresentaram diferenças estatísticas na avaliação imediata. No entanto, após a aplicação do meio de infusão durante 24 horas, de gel de clorexidina 2% mostrou uma percentagem estatisticamente menor de células vivas em comparação com o hidróxido de cálcio. A pasta triantibiótica mostrou significativamente uma menor percentagem de células vivas em comparação com os grupos de 2% de gel de clorexidina e hidróxido de cálcio na avaliação imediata e secundária (após 24 horas). Os autores concluíram que a pasta triantibiótica foi mais eficaz na morte das bactérias, em comparação com 2% de gel de clorexidina e hidróxido de cálcio.

## 2.2 Substâncias químicas auxiliares

Zehnder (2006), propôs em sua revisão sobre substâncias químicas auxiliares que algumas propriedades são fundamentais, tais como:

- ter um amplo espectro antimicrobiano e alta eficácia frente a microrganismos anaeróbios estritos e facultativos, bem como microrganismos organizados em biofilme.
- dissolver polpa necrótica e seus remanescentes teciduais.
- inativação de endotoxinas.
- Prevenir a formação de smear layer durante a instrumentação ou dissolve-lá após formada.

### 2.2.1 Hipoclorito de Sódio

O efeito antimicrobiano das substâncias químicas auxiliares por muito tempo tem sido estudado. Várias substâncias têm sido propostas em Endodontia. O uso de hipoclorito de sódio em todo o mundo como uma solução de irrigação do canal radicular é principalmente devido a sua eficácia para dissolução pulpar e atividade antimicrobiana. A solução menos concentrada, tal como hipoclorito de sódio a 1%, apresenta compatibilidade biológica aceitável (ESTRELA, 2002)

Brystrom, Sudqvist e Sweden (1983) avaliaram a concentração de 0,5% do hipoclorito de sódio em 15 dentes permanentes monorradiculares. Quando foi utilizado hipoclorito de sódio 0,5% não houve crescimento bacteriano em doze dos quinze canais radiculares estudados. Pode-se assim, comparar quando foi utilizada a solução salina, em que não houve crescimento

de microrganismo em oito dos quinze dentes. Estes resultados sugerem que a solução de hipoclorito de sódio a 0,5% é mais eficaz do que a solução salina como um irrigante do canal radicular.

Existe muita controvérsia sobre qual concentração das soluções de hipocloritos de sódio devem ser usadas na endodontia. Como origem, a solução de Dakin 0,5% foi planejada para tratar feridas por queimadura. Propõe-se, que concentrações mais elevadas devem ser utilizadas, uma vez que seria mais eficiente que a solução em 0,5%. No entanto, observa-se uma maior redução da microbiota intracanal, quando utilizado hipoclorito de sódio a 5% . Na concentração de 5,25%, a solução diminui significativamente o módulo de elasticidade e resistência à flexão de dentina humana comparada a solução salina fisiológica. Provavelmente devido à ação proteolítica do hipoclorito concentrado sobre a matriz de colágeno, presente na dentina (SIM, 2001).

Haapasalo (2010) apresentou uma revisão sobre substâncias irrigadoras em endodontia. É difícil imaginar irrigação bem sucedida do canal radicular sem hipoclorito. Apesar de hipoclorito, sozinho não remover a camada completa de smear layer, e sim a parte orgânica, torna-se necessário para a sua remoção completa pela irrigação posterior com EDTA ou ácido cítrico (CA). Algumas das limitações do Hipoclorito de Sódio incluem gosto desagradável, toxicidade e instabilidade na remoção de smear layer. Sendo assim, o hipoclorito de sódio é a solução de irrigação mais importante, única capaz de dissolver tecido orgânico, incluindo biofilme e a parte orgânica da camada de smear layer. Deve ser utilizado durante a fase de instrumentação. Entretanto, uso de hipoclorito como o enxágüe final seguido de EDTA ou CA pode produzir erosão da dentina na parede do canal.

Wong e Cheung (2014) propuseram determinar o grau de desinfecção nas paredes dentinárias, por duas concentrações de hipoclorito de sódio (0,5 e 3%). Ambas as concentrações de hipoclorito de sódio reduziram a quantidade de bactérias vivas na camada mais superficial (primeiros 0,1 mm) da dentina do canal radicular. Na camada mais profunda (0,1-0,3 mm em túbulos dentinários), a irrigação com 3% resultaram em valores significativamente mais baixos de bactérias viáveis do que 0,5% de hipoclorito ou solução salina

Del Carpio Perochena e colaboradores (2015) investigaram se variação do pH do hipoclorito de sódio (NaOCl) aumentou a sua capacidade antibacteriana e a dissolução de biofilmes polimicrobianos formados *in situ*. Os espécimes foram irrigados com 2,5% de NaOCl

com níveis de pH de 5, 7, e 12 durante 20 min. O grupo controle foi irrigado com água destilada. A viabilidade celular e o volume bacteriano foram medidos pré e pós-irrigação. Cinco áreas das amostras foram escolhidas e analisadas com microscopia confocal de varredura a laser (CLSM). Os resultados mostraram que todas as soluções experimentais foram capazes de diminuir a biomassa microbiana ( $P < 0,05$ ), exceto para o NaOCl a 1% com valor de pH 5. A capacidade antibacteriana do NaOCl foi dependente da concentração e acidificação da solução. A acidificação do NaOCl melhora a sua capacidade antibacteriana, mas o efeito de dissolução do irrigante é diminuída.

### 2.2.3 Hipoclorito de Cálcio

O hipoclorito de cálcio é um composto amplamente utilizado e altamente eficaz contra bactérias, algas, fungos e outros microrganismos nocivos. É usado como um padrão para testes de comparação de outros produtos químicos de higienização. Enquanto o hipoclorito de cálcio é utilizado principalmente em piscinas, SPA, banheiras de água quente, e para tratar o abastecimento de água e esgoto (PPG INDUSTRIES, 1999).

Whittaker e Mohler(1911), propuseram avaliar a esterilização de garrafas de leite, utilizando o hipoclorito de cálcio. O procedimento foi realizado da seguinte forma: o leiteiro selecionado para a investigação foi visitado com aparelhos para fazer a contagem de bactérias antes e após o tratamento. As garrafas de leite usadas nas experiências foram selecionadas a partir das que estavam limpas e prontas para o preenchimento do leite. Uma solução de hipoclorito de cálcio foi adicionada na água utilizada no processo de tratamento. As garrafas ficaram submersas e contagem do número de colônias formadas foi feita em meio Agar padrão, incubada durante 24 horas a 37,5°C. A avaliação realizada nas garrafas, antes do tratamento mostrou um amplo número de microrganismos presentes. Após o tratamento, houve uma diminuição de mais de 99,9% dos microrganismos. A partir destes resultados, os autores

concluíram que houve uma redução significativa de microrganismos, quando garrafas de leite eram mantidas submersas em água com  $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ .

A utilização do Hipoclorito de Cálcio na Odontologia vem sido proposta por Swain e colaboradores (2012), para avaliar o poder de desinfecção e seu efeito sobre gesso pedra Tipo V, em uma avaliação *in vitro*. Foram separados em subgrupos: 10 amostras sem adição de qualquer desinfetante (0% de hipoclorito de cálcio) e outro grupo de 30 amostras depois de adicionar desinfetante, ou seja, cada um dos subgrupos contendo 10 amostras cada com 0,5%, 1,0% e 1,5% de hipoclorito de cálcio. Os autores concluíram, que mesmo dentro das limitações de um estudo *in vitro*, o gesso pedra tipo V com adição de  $\text{Ca}(\text{OCl})_2$ , como desinfetante, tem resistência à compressão e à tração adequada.

Em Endodontia o uso do  $\text{Ca}(\text{OCl})_2$  foi proposta por Dutta e Saunders (2012), em que o objetivo do estudo foi comparar as propriedades de dissolução tecidual de músculo bovino, nas concentrações de 5% e 10% de hipoclorito de cálcio com duas concentrações (1,36% e 4,65%) de hipoclorito de sódio. Foi calculada a percentagem de perda tecidual ao longo do período experimental. A solução Chlorax ( $\text{NaOCl}$  4,65%) apresentou um tempo de dissolução mais rápido, em 45 minutos. Análise dos dados entre os pares de grupos mostrou que após 5 minutos, não houve diferença significativa entre soluções de Chlorax e 10% de  $\text{Ca}(\text{OCl})_2$ . Não houve diferença entre soluções 10% e 5% de  $\text{Ca}(\text{OCl})_2$ . Em um estudo similar ao anterior, Taneja (2014), propôs avaliar a dissolução de polpa dentária humana por diferentes concentrações de dióxido de cloro, hipoclorito de cálcio e hipoclorito de sódio. Os resultados mostraram que a dissolução do tecido aumenta com aumento no período de tempo. Os resultados mostraram  $\text{NaOCl}$  a 5,25% foi o mais eficaz em ambos os intervalos de tempo, seguido por de  $\text{NaOCl}$  2,5%, de  $\text{Ca}(\text{OCl})_2$  10% e  $\text{ClO}_2$  13% em 60 minutos. Menor capacidade de dissolução foi demonstrada por  $\text{Ca}(\text{OCl})_2$  5% e  $\text{ClO}_2$  5% em 30 minutos.

Oliveira e colaboradores (2014) quantificaram a rugosidade do canal radicular após a utilização de hipoclorito de sódio e cálcio por microscopia confocal de varredura a laser (CLSM). Foram montados treze grupos ( $n = 8$ ): solução salina (controle); 1%, 2,5% e 5%  $\text{NaOCl}$ ; 1%, 2,5% e 5% de  $\text{Ca}(\text{OCl})_2$ ; e nos grupos de hipoclorito foram ainda divididos com ou sem EDTA. Não houve diferenças significativas na rugosidade da dentina entre o  $\text{Ca}(\text{OCl})_2$  ou  $\text{NaOCl}$  em todas as concentrações estudadas. A combinação com EDTA forneceu valores de rugosidade semelhantes entre as soluções ( $P > 0,05$ ). Pode-se concluir que o  $\text{Ca}(\text{OCl})_2$  modificou a rugosidade da dentina do canal radicular, com quantificações semelhantes ao  $\text{NaOCl}$ , nas mesmas concentrações e combinações de EDTA usado neste estudo.

A ação antimicrobiana do hipoclorito de cálcio na endodontia não apresenta muitos estudos. Em 2014, de Almeida e colaboradores compararam a eficácia, *in vitro*, de  $\text{Ca}(\text{OCl})_2$  e  $\text{NaOCl}$  associado à irrigação ultrassônica passiva em canais radiculares de dentes bovinos infectados com *E. faecalis*. Todas as raízes foram preparadas utilizando o mesmo protocolo, a fim de remover o tecido pulpar e padronizar o diâmetro do canal. Um dente de cada grupo foi selecionado aleatoriamente e submetido para o controle de esterilização. A preparação da cultura de inóculo foi realizada com a cepa de *E. faecalis* (ATCC 19433). As bactérias foram cultivadas em BHI durante 18-24 horas a 37°C. A cultura de *E. faecalis* foi mantida durante 30 dias a fim de promover o crescimento bacteriano, com o BHI sendo renovado a cada 48 horas. Todos os procedimentos foram realizados sob condições assépticas numa câmara de fluxo laminar. Após o período de incubação, as 60 amostras foram irrigadas com 5 ml de água destilada e distribuídas em seis grupos ( $n = 10$ ), incluindo o grupo controle e 5 grupos de acordo com os procedimentos de descontaminação: Grupo 1: Sem tratamento (NT); nenhum procedimento de descontaminação foi realizada (controle). Grupo 2: água destilada; os canais radiculares foram preenchidos com 2 ml água destilada. Após a instrumentação, a irrigação final foi feita com 5 ml de água destilada e uma lavagem final com 3 ml de EDTA 17%. Grupo 3:  $\text{NaOCl}$ ; o mesmo procedimento realizado no grupo 2. O agente irrigante foi substituído por 2,5%  $\text{NaOCl}$ . Grupo 4:  $\text{Ca}(\text{OCl})_2$ ; o mesmo procedimento realizado nos grupos 2 e 3 foi adotada para este grupo. O agente foi substituído com irrigante 2,5% de  $\text{Ca}(\text{OCl})_2$ . Grupo 5:  $\text{NaOCl}$  + ativação de ultrassônica; Grupo 6:  $\text{Ca}(\text{OCl})_2$  + ativação de ultrassônica. Após a incubação, a contagem do número de unidades formadoras de colônias (UFC) foi realizada nas placas. Os grupos 1 e 2 mostraram a maior média contaminação e foram estatisticamente diferentes de todos os outros grupos ( $P < 0,05$ ). Grupo 6 ( $\text{Ca}(\text{OCl})_2$  + ativação ultrassônica) apresentou a menor média de contaminação. No entanto, não foi estatisticamente significativo quando comparado com os grupos 3 ( $\text{NaOCl}$ ), 4 ( $\text{Ca}(\text{OCl})_2$ ), e 5 ( $\text{NaOCl}$  + ativação ultrassônica) ( $P < 0,05$ ). Como conclusão do trabalho, novos estudos devem ser realizados para analisar outras propriedades desejáveis de  $\text{Ca}(\text{OCl})_2$ , a fim de consolidar esta substância como uma alternativa de irrigante endodôntico.

Carlotto (2015) avaliou a capacidade de dissolução tecidual, tensão superficial, e capacidade de limpeza de soluções  $\text{Ca}(\text{OCl})_2$  e compará-las ao  $\text{NaOCl}$ . A dissolução tecidual foi testada em fragmentos de polpas bovinas divididos em 18 grupos, metade deles utilizando as amostras livremente depositadas em poços de cultura de células e a outra metade utilizando as amostras fixadas em bases de dentina bovina. As soluções testadas foram o  $\text{NaOCl}$  a 0,5%, 1%, 2,5% e 5,25% e o  $\text{Ca}(\text{OCl})_2$  a 0,5%, 1%, 2,5% e 5,25%. A capacidade de dissolução foi

mensurada pela percentagem de perda de peso. A tensão superficial foi mensurada por meio da técnica do anel de platina com um tensiômetro de Du Nouy. Para a análise da capacidade de limpeza foram utilizados 50 dentes monorradiculares humanos, divididos em 5 grupos, que foram preparados com limas tipo K e irrigados. Por meio da microscopia eletrônica de varredura foram analisados os diferentes terços dos canais quanto à remoção de debris e à presença de smear layer. Foram atribuídos escores de 1 a 4 e a frequência destes foi verificada para cada grupo. Os resultados mostraram que quanto à dissolução não houve diferença significativa entre NaOCl e  $\text{Ca}(\text{OCI})_2$  para iguais concentrações. Os valores de tensão superficial das soluções de  $\text{Ca}(\text{OCI})_2$  foram superiores aos do NaOCl. A remoção de debris do grupo do  $\text{Ca}(\text{OCI})_2$  a 5,25% foi inferior ao grupo controle no terço cervical. Quanto à remoção de smear layer, não houve diferença entre os grupos. O autor concluiu que as soluções de hipoclorito de cálcio apresentam capacidade de dissolução tecidual, entretanto não foram capazes de remover a smear layer e debris. Embora as tensões superficiais das soluções de  $\text{Ca}(\text{OCI})_2$  tenham sido superiores às do NaOCl, não se sabe a relevância clínica desse achado.

Blattes (2015) avaliou a citotoxicidade e biocompatibilidade de soluções de hipoclorito de cálcio ( $\text{Ca}(\text{OCI})_2$ ) comparadas a soluções de hipoclorito de sódio (NaOCl) *in vitro* em cultura de fibroblastos 3T3 e *in vivo* em ratos. No ensaio de "scratch",  $\text{Ca}(\text{OCI})_2$  não apresentou diferença estatística em relação ao controle no período de 24h ( $p > 0.05$ ) no ensaio Azul de Trypan. No teste *in vivo*,  $\text{Ca}(\text{OCI})_2$  1% mostrou uma diminuição significativa de neutrófilos entre 2h e 24h ( $p=0.041$ ) e entre 2h e 14d ( $p=0.017$ ). A autora concluiu que o  $\text{Ca}(\text{OCI})_2$  mostrou resultados favoráveis de viabilidade e induziu um baixo nível de resposta inflamatória tecidual, apresentando, assim, citotoxicidade e biocompatibilidade aceitáveis para uma solução irrigadora.

Leonardo (2015) teve como objetivo avaliar e comparar pH e concentração de cloro ativo de soluções de hipoclorito de sódio [NaOCl] e de hipoclorito de cálcio [ $\text{Ca}(\text{OCI})_2$ ] armazenadas sob diferentes condições de temperatura e períodos de tempo. Concluiu-se que soluções de  $\text{Ca}(\text{OCI})_2$  são extremamente alcalinas e tendem a apresentar maior conteúdo de cloro em comparação ao NaOCl. Em relação ao cloro ativo, essas soluções tendem a ser estáveis até 30 dias de armazenamento sob refrigeração ou em temperatura ambiente.

De Paula (2015) avaliou a ação antimicrobiana de hipoclorito de cálcio [ $\text{Ca}(\text{OCI})_2$ ] em diferentes concentrações (0,5%, 1%, 2,5% e 5%) frente ao *Enterococcus faecalis* e comparou com a ação de hipoclorito de sódio (NaOCl) pelos métodos de Difusão em Ágar e de Contato em Meio Líquido. A ampicilina 10  $\mu\text{g}$  e água destilada foram utilizadas como controle positivo e negativo, respectivamente, no método de difusão em Ágar. Observou-se que os maiores halos de inibição foram produzidos pelo  $\text{Ca}(\text{OCI})_2$  5% (17,38 mm  $\pm$ 3,71), sendo inferior ao produzido pela ampicilina

(30,35 mm  $\pm$ 1,64). Soluções de NaOCl e Ca(OCl)<sub>2</sub>, na mesma concentração, não apresentaram diferenças significativas entre si. Os diâmetros dos halos de inibição produzidos por NaOCl ou Ca(OCl)<sub>2</sub> foram proporcionais ao aumento da concentração. O tempo de inibição para o crescimento do *E. faecalis*, em meio líquido, é menor em concentrações mais elevadas de Ca(OCl)<sub>2</sub> e NaOCl. As soluções de NaOCl 2,5%, NaOCl 5% e Ca(OCl)<sub>2</sub> 2,5% e Ca(OCl)<sub>2</sub> 5.0% foram iguais entre si. A dentina e a endotoxina de *E. coli* não interferiram na ação antimicrobiana das soluções de hipoclorito testadas. A soluções de NaOCl 0,5%, 1% e 2,5% e de Ca(OCl)<sub>2</sub> 0,5% quando expostas à albumina, por 2 minutos, apresentaram seu efeito antimicrobiano reduzido. A autora concluiu que soluções de hipoclorito de cálcio apresentaram ação antimicrobiana frente ao *E. faecalis*, em concentrações similares às do hipoclorito de sódio empregadas em Endodontia. O efeito antimicrobiano demonstrado pelas soluções é proporcional a sua concentração, podendo ser modulado pela albumina, em curtos períodos de exposição.

### 3. OBJETIVO GERAL

Analisar o efeito do Hipoclorito de Sódio e Hipoclorito de Cálcio em biofilme dental formado "*in situ*".

#### 3.1. Objetivos Específicos

- Analisar a viabilidade celular microbiana em biofilmes após a exposição às soluções de hipoclorito de cálcio e sódio em diferentes concentrações, por meio de microscopia confocal a laser;
- Avaliar a morfologia do biofilme induzido *in situ* após a exposição às soluções de hipoclorito de cálcio e hipoclorito de sódio, por meio de microscopia eletrônica de varredura.

## 4 METODOLOGIA

Aprovado pela Comissão de Pesquisa da Faculdade de Odontologia da UFRGS e pelo Comitê de Ética da mesma universidade (CAAE 46308515.3.0000.5347).

### 4.1 Local de Realização

A pesquisa foi realizada no Laboratório de Bioquímica e Microbiologia Oral, no Laboratório de Endodontia, e no Centro de Microscopia Eletrônica da UFRGS. Ambos laboratórios apresentam condições adequadas para o manuseio, preparo e armazenamento dos espécimes.

### 4.2 Delineamento Experimental

Foi realizado um estudo transversal, com etapa *in situ*.

### 4.3 Cálculo amostral

Para que fossem analisadas as variáveis selecionadas no estudo, conforme a metodologia proposta e já descrita, o número de amostras que constituiu cada grupo é 5 blocos de dentina para cada substância, conforme descrito por Ordinola-Zapata et al. (2012) e Hoscheidt et al. (2013). A unidade amostral foi “bloco de dentina radicular bovina”, confeccionados a partir de dentes bovinos extraídos.

### 4.4. Seleção dos voluntários

Considerando que:

- são 9 grupos;
- são 5 amostras por grupo;
- isso totaliza 45 amostras para análise.

**Tabela 2.** Grupos experimentais.

GRUPO	SUBSTÂNCIA QUÍMICA AUXILIAR
C1 (controle)	Água destilada
G1	NaOCI 0.5%
G2	NaOCI 1%
G3	NaOCI 2.5%
G4	NaOCI 5,25%
G5	Ca(OCl) <sub>2</sub> 0,5%
G6	Ca(OCl) <sub>2</sub> 1%
G7	Ca(OCl) <sub>2</sub> 2,5%
G8	Ca(OCl) <sub>2</sub> 5,25%

Considerando que são quatro voluntários, para obtenção das 45 amostras são obtidas 11 amostras em aparelhos de 3 voluntários e 12 amostras em um aparelho para um voluntário.

Com a finalidade de otimização da utilização dos aparelhos e também o menor número possível de voluntários, em cada aparelho podem ir no máximo 12 blocos. Sendo assim, 11 blocos são colocados em 3 aparelhos e 12 blocos em um, totalizando assim os 45 blocos, sendo 5 amostras em 9 grupos.

Para a indução do biofilme, dispositivos intra-bucais foram utilizados por 4 voluntários. Foram convidados a participar do estudo alunos de graduação e pós-graduação da Faculdade de Odontologia da UFRGS. O convite foi realizado mediante a exposição de cartaz, após autorização pela Direção da Unidade. Os voluntários foram entrevistados para verificar se preenchiam os critérios de inclusão:

- a) Alunos maiores de 18 anos;
- b) Alunos que não fizeram uso de antibióticos num período mínimo de 3 meses, para não interferir na microbiota da cavidade bucal; e,
- c) Alunos sem comprometimento sistêmico.

Todos os alunos assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) elaborado de acordo com as normas da COMPESQ-ODO e com as normas do CEP-UFRGS.

#### 4.5 Preparo dos blocos de dentina

Os blocos de dentina foram preparados a partir de incisivos bovinos. Esses dentes foram obtidos por doação, mediante assinatura de termo de doação de material biológico. Foram excluídos da amostra os dentes que apresentavam fraturas na superfície externa do esmalte, bem como rachaduras e hipocalcificações. Antes do preparo dos blocos, os dentes foram submetidos à remoção de restos teciduais.

Os blocos de dentina foram preparados com dimensões de 4 x 4 x 2mm. Os dentes foram seccionados 2 mm acima da junção amelo-cementária, para separar as coroas das raízes, por meio do uso de discos de carborundum acoplados em peça reta e motor de baixa rotação. Após, uma das faces proximais das raízes foi fixada em uma placa de acrílico (4 x 4 cm) com cera pegajosa (KERR®), acoplado em cortadeira (ISOMET™ LOW SPEED SAW, BUEHLER®, LAKE BLUFF, IL, USA) sob irrigação constante com água destilada, numa velocidade de giro de 150 rpm, a fim de se obter um bloco o mais plano possível.

Estima-se que cada dente bovino gerou em média 6 blocos de dentina com dimensões de 4 mm x 4 mm x 2 mm. Considerando uma perda de 10% durante o preparo das amostras, foram necessários 8 dentes bovinos.

Os blocos de dentina passaram por um processo de eliminação dos debris dentinários, com imersão por 15 min em solução de hipoclorito de sódio 1% (com trocas a cada 5 minutos), seguido de imersão em EDTA 17% por 5 minutos. O banho de hipoclorito de sódio 1% e de EDTA 17% foi realizado em cuba ultrassônica (PLANATC - CBU100/3LEC 1) (del Carpio Perochena, 2011) . Após esse processo, as amostras foram esterilizadas em autoclave (121°C, 1atm, 15 minutos).

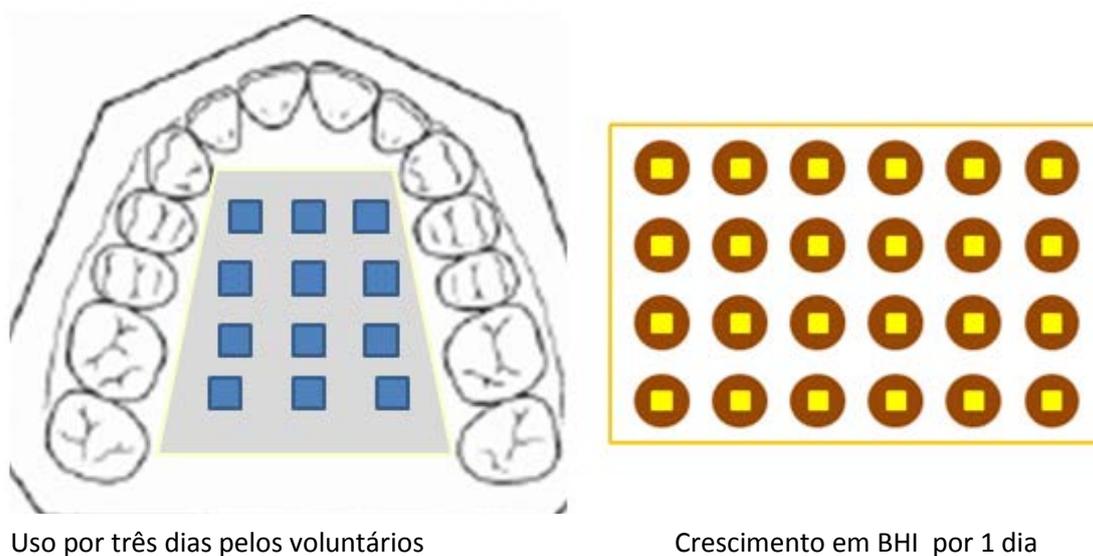
#### 4.6 Preparo dos aparelhos

Os voluntários que aceitaram participar da pesquisa foram encaminhados à Clínica de Especialização em Endodontia. O pesquisador realizou a moldagem da arcada dentária superior, utilizando moldeiras metálicas esterilizadas compatíveis e alginato (Avagel, Brasil). Após a geleificação do alginato, a moldagem foi removida da boca do paciente e receberam desinfecção

com spray de NaOCl 1% durante 10 min (SOUZA et al., 2004). O paciente foi dispensado e convidado a retornar após a confecção do aparelho.

Foi vertido gesso tipo III (Chaves S.A., Maracanaú, Brasil) no molde de alginato para que se obtenha o modelo para a confecção do aparato. Foram confeccionados dispositivos intrabuciais palatinos removíveis, semelhantes a aparelhos ortodônticos (sem grampos de fixação), sobre o modelo de gesso da arcada superior dos voluntários. Estes foram confeccionados com resina acrílica (JET Clássico, Campo Limpo Paulista, Brasil). Foram confeccionadas 11 cavidades, em 3 aparelhos, que receberam 11 blocos de dentina e 12 cavidades em um aparelho, totalizando 45 blocos em 4 aparelhos. Os blocos foram fixados com godiva (Lysanda, São Paulo, Brasil). Os blocos de dentina ficaram voltados para o meio ambiente bucal livre. Após a inserção dos blocos de dentina nas cavidades, estes eram protegidos por uma tela plástica de forma que houvesse 1,0 mm de distância entre a superfície do bloco e a tela plástica para proteção do biofilme que era formado.

Figura 1 – Esquema dos aparelhos e posterior crescimento em BHI.



#### 4.7 Utilização dos aparelhos

A utilização dos aparelhos envolveu 3 dias. Os voluntários compareceram a 3 consultas em cada fase: a primeira para o procedimento de moldagem; a segunda para entrega do

aparelho bem como 1 kit com estojo para armazená-lo, uma escova com cerdas macias (Colgate, São Bernardo do Campo, Brasil), dentífrico fluoretado (Colgate, São Bernardo do Campo, Brasil) e fio dental (Sanifill, Rio de Janeiro, Brasil). Nessa mesma consulta foram informadas instruções de utilização e higienização; e a terceira para remoção dos blocos de dentina para análise. Os voluntários foram instruídos a remover os aparelhos durante as refeições (CURY et al., 1997, 2000). Os voluntários receberam números telefônicos para contato imediato durante o período experimental. No Apêndice 2, encontra-se o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido que foi entregue para cada paciente (adaptado de TENUTA, 2005), bem como instruções para a utilização do aparelho.

#### **4.8 Remoção das amostras do dispositivo intra-bucal**

Após o período de indução do biofilme, os voluntários entregaram os dispositivos intra-bucalis para os pesquisadores. No interior da cabine de fluxo laminar, os pesquisadores removeram os blocos de dentina dos dispositivos com espátulas do tipo Holleback 3S (Golgran, São Caetano do Sul, Brasil) esterilizadas. O excesso de biofilme foi removido com lâminas de bisturi (Solidor, Barueri, Brasil).

#### **4.9 Cultivo Laboratorial do Biofilme**

Após a remoção dos dispositivos, as amostras pertencentes aos grupos experimentais foram incubadas em BHI, durante 24 horas em estufa microbiológica, para posterior análise na microscopia confocal a laser.

#### **4.10 Protocolos de irrigação**

O protocolo de irrigação seguiu o descrito na Tabela 3. Os blocos de dentina foram preenchidos com a substância química auxiliar respectiva, que permaneceu em seu interior pelo período de 1 minuto. Após, as mesmas foram removidas por meio do uso de água destilada estéril e neutralizadas com tiosulfato de sódio 0,5%.

**Tabela 3.** Grupos experimentais e o tempo de contato com a substância química auxiliar.

GRUPO	SUBSTÂNCIA QUÍMICA AUXILIAR	TEMPO
C1 (controle)	água destilada	1 minuto
G1	NaOCI 0.5%	1 minuto
G2	NaOCI 1%	1 minuto
G3	NaOCI 2.5%	1 minuto
G4	NaOCI 5,25%	1 minuto
G5	Ca(OCl) <sub>2</sub> 0,5%	1 minuto
G6	Ca(OCl) <sub>2</sub> 1%	1 minuto
G7	Ca(OCl) <sub>2</sub> 2,5%	1 minuto
G8	Ca(OCl) <sub>2</sub> 5,25%	1 minuto

#### 4.11 Análise do biofilme

##### 4.11.1 Análise da viabilidade microbiana em dentina infectada

###### 4.11.1.1 Processamento para Microscopia Confocal a Laser

As amostras foram transportadas para o Centro de Microscopia Eletrônica da UFRGS. Neste local, as amostras receberam o tratamento com as soluções químicas auxiliares testadas. A obtenção das imagens foi feita por um único pesquisador. Para a determinação da viabilidade bacteriana foi utilizado o Kit de Viabilidade Bacteriana BacLight™ 5 (Molecular Probes, Eugene, OR). O corante SYTO9 (excitação de 480 nm e emissão até 500 6 nm) tem a capacidade de corar todas as bactérias, enquanto que o iodeto de propídio (excitação 7 de 490 nm e emissão de 635 nm) penetrara somente em células bacterianas que estão com algum dano na membrana plasmática. Os corantes foram aplicados nos blocos, na proporção de 1:1 em volume (50µL de cada solução).

A fluorescência da célula foi visualizada usando CLSM (Olympus Europa Holding GmbH, Hamburg, Alemanha). Imagem foi usada para exibir a fluorescência verde e vermelha. Os espécimes foram observados usando um aumento de 60X com um adicional de 3X. Imagens

foram adquiridas por meio do software Olympus FluorView Versão 1.7. Foi feita uma análise descritiva preliminar.

As amostras foram classificadas em escores:

- Escore 1: Dentina limpa ou células microbianas residuais isoladas que cobrem menos de 5% da superfície da dentina.
- Escore 2: Células microbianas residuais isoladas que cobrem entre 5 a 33% da superfície dentinária.
- Escore 3: Estruturas do biofilme e células microbianas podem ser identificadas cobrindo entre 34 a 66% da dentina.
- Escore 4: Estruturas do biofilme e células microbianas podem ser identificadas cobrindo mais dos 2/3 da superfície dentinária (>66%).

#### 4.11.1.2 Análise da morfologia do biofilme

As amostras passaram pelo processo de desidratação, secagem, montagem e metalização conforme o protocolo preconizado pelo Centro de Microscopia Eletrônica da UFRGS (CME-UFRGS).

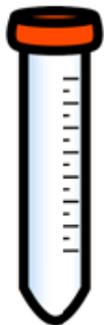
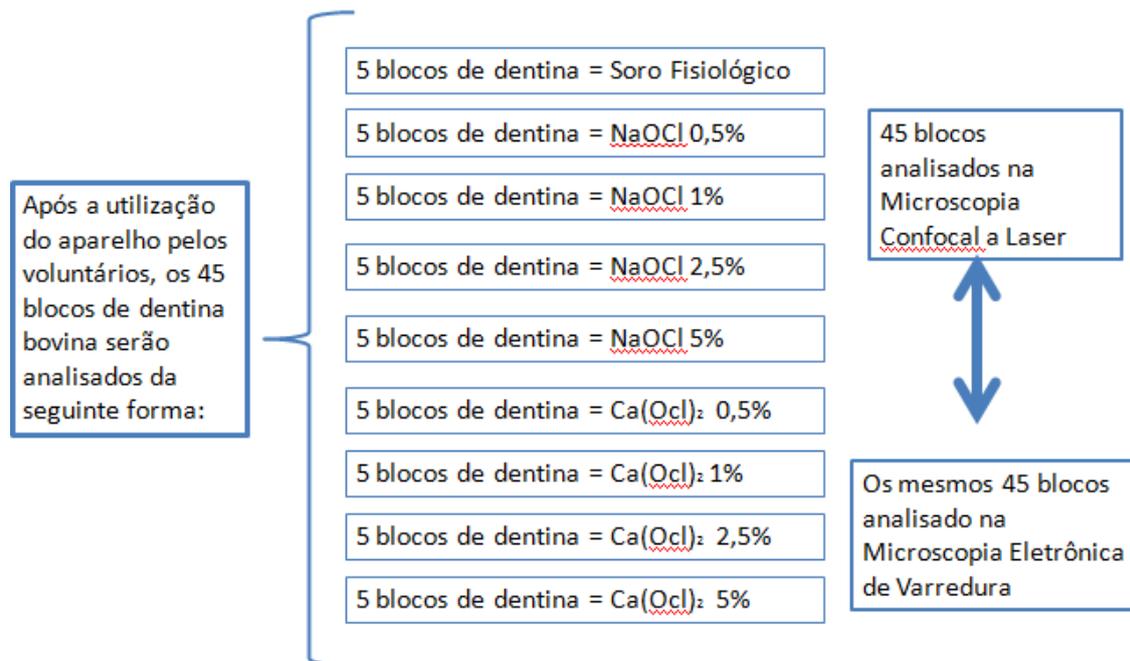
Foi utilizado o microscópio eletrônico de varredura do Centro de Microscopia Eletrônica da UFRGS (CME-UFRGS). Imagens foram capturadas para análise dos achados microscópicos.

Foram determinados a presença de morfotipos celulares compatíveis com cocos, bacilos, formas espiraladas, células fungiformes e presença de matriz extracelular. Também foi feita uma análise descritiva preliminar.

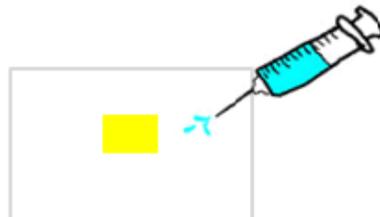
Para a quantificação da estrutura de biofilme formada, foram utilizados escores modificados seguindo as recomendações de Bhuva et. al. (2010):

- Escore 1: Dentina limpa ou células microbianas residuais isoladas que cobrem menos de 5% da superfície da dentina. Ausência de camadas do biofilme.
- Escore 2: Células microbianas residuais isoladas que cobrem entre 5 a 33% da superfície dentinária. Ausência de camadas do biofilme.
- Escore 3: Estruturas do biofilme e células microbianas podem ser identificadas cobrindo entre 34 a 66% da dentina.
- Escore 4: Estruturas do biofilme e células microbianas podem ser identificadas cobrindo mais dos 2/3 da superfície dentinária (>66%).

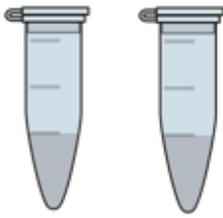
## 4.12 Diagrama



Substância teste



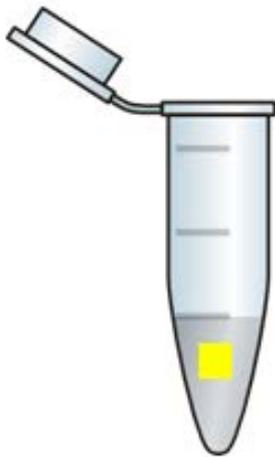
Neutralização com tiosulfato de sódio 0.5%



Kit de Viabilidade Bacteriana BacLightTM 5



Microscópio Confocal FV1000



Desidratação com álcool



MEV JSM 6060

## 5. RESULTADOS

Pode-se observar que após três dias de uso do aparelho intraoral e 24 horas em contato com BHI caldo houve crescimento microbiano, como observado na imagem abaixo..

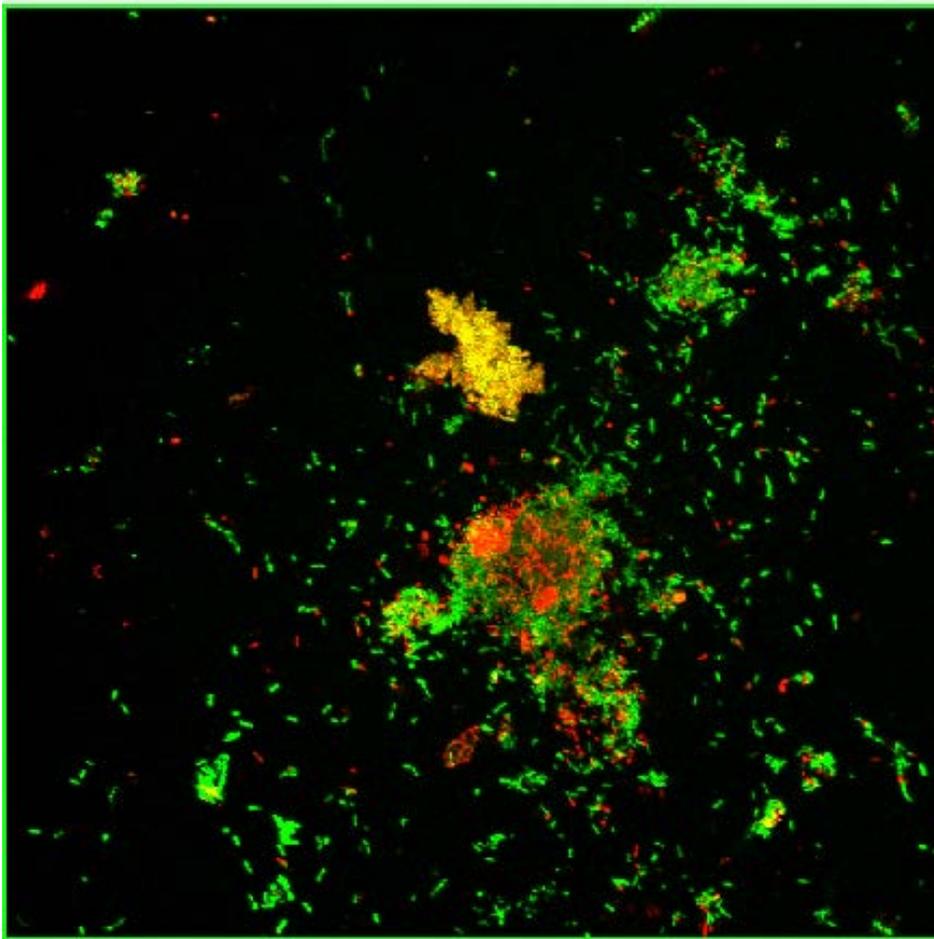
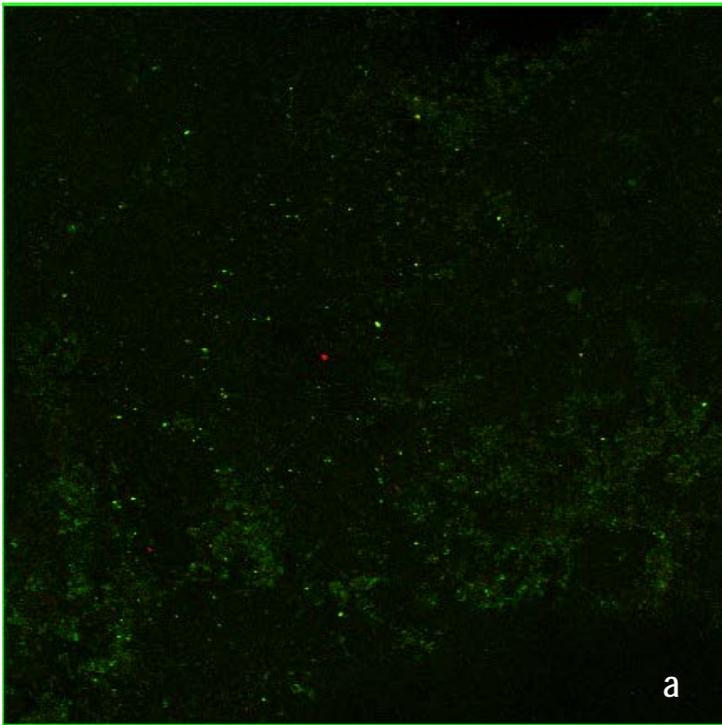


Imagem 1 – Escore 4 - Controle positivo (água destilada esterilizada)

Pode-se observar nas imagens da microscopia confocal a laser, houve pouco biofilme que se manteve sobre a dentina após o contato com as soluções testadas.

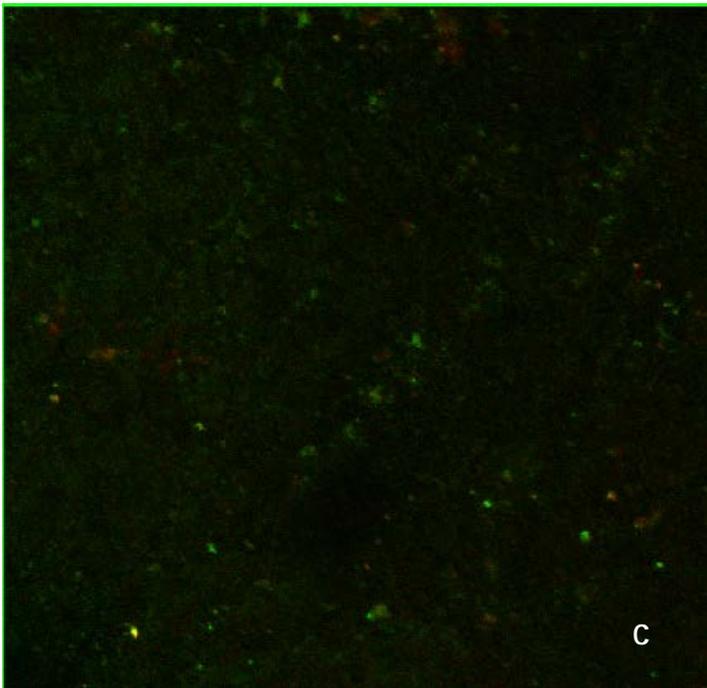
2 – Imagens da microscopia confocal a laser do  $\text{Ca}(\text{OCI})_2$  (a, b, c, d)



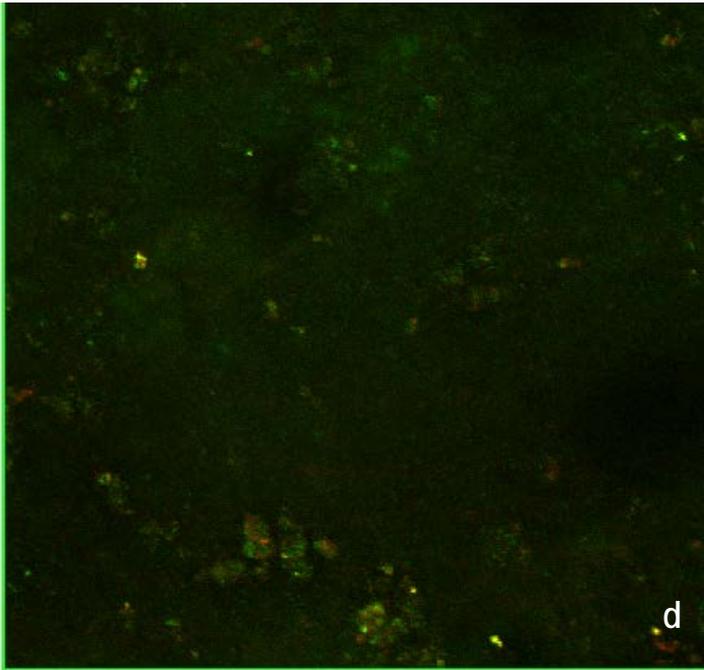
a) Escore 2 - Hipoclorito de cálcio 0,5%



b) Hipoclorito de cálcio 1% (sem escore, pois não se observa biofilme sobre a dentina)

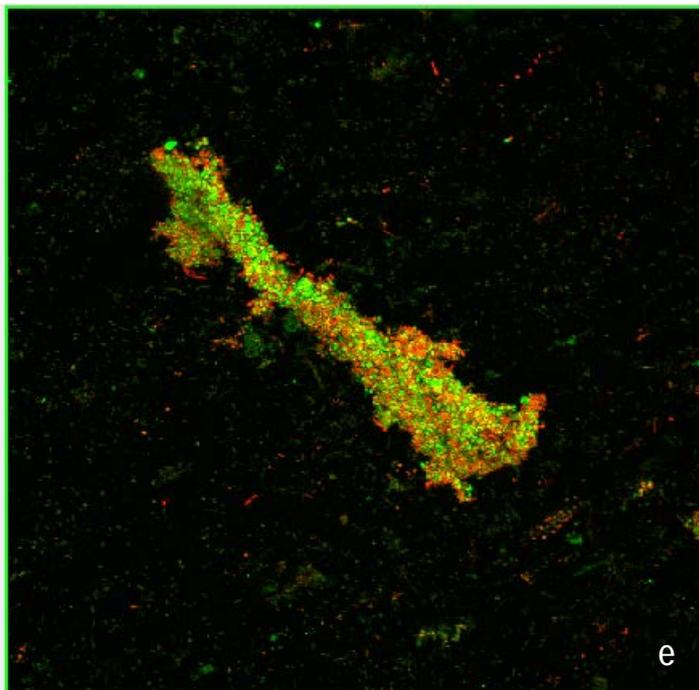


c) Escore 1 - Hipoclorito de cálcio 2,5%

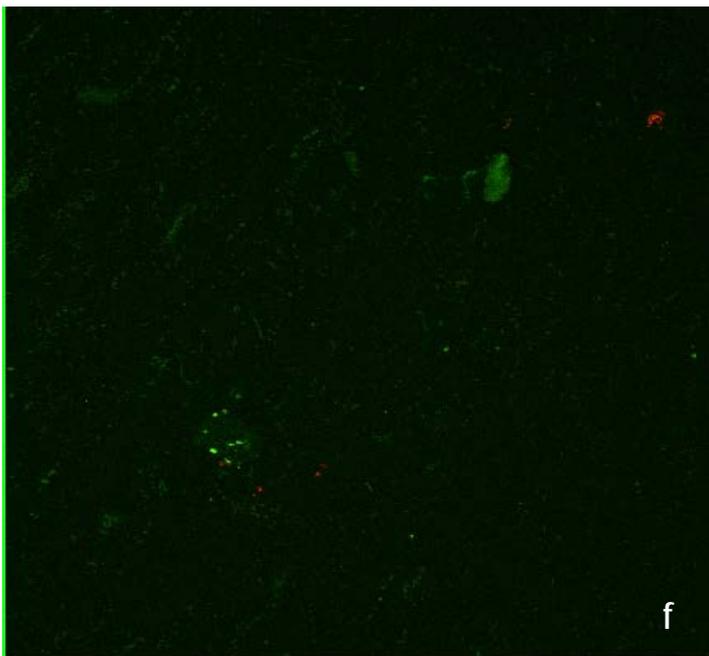


d) Escore 1 -Hipoclorito de cálcio 5%.

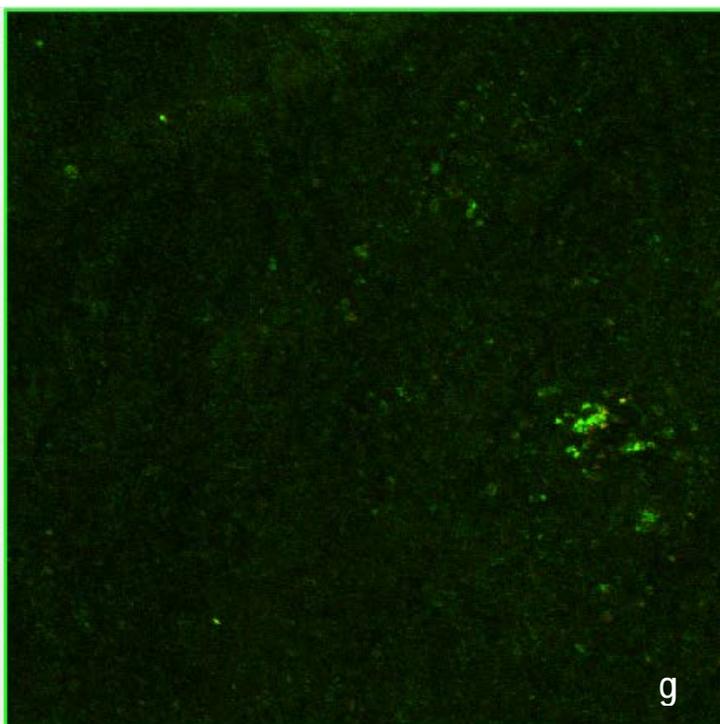
3 – Imagens da microscopia confocal a laser do NaOCl (e, f, g, h)



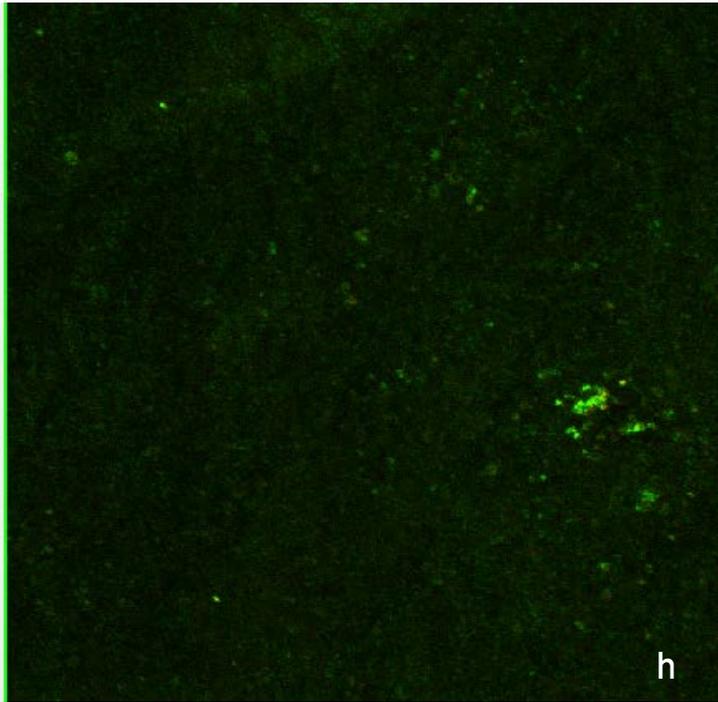
e) Escore 4 - Hipoclorito de sódio 0,5%



f) Escore 1 - Hipoclorito de sódio 1%



g) Escore 1 - Hipoclorito de sódio 2,5%



h) Escore 1 - Hipoclorito de sódio 5%.

Por meio das imagens de microscopia confocal a laser, após o contato de um minuto das amostras com as substâncias químicas testadas, se observa uma pequena presença de biofilme,

### **Análise por microscopia eletrônica de varredura**

Na análise por meio da microscopia eletrônica de varredura pode-se observar a presença de um biofilme estruturado, composto por cocos e bacilos. A imagem mostra, então, que a utilização do aparelho intrabucal, pelo período de três dias foi suficiente para formar um biofilme.

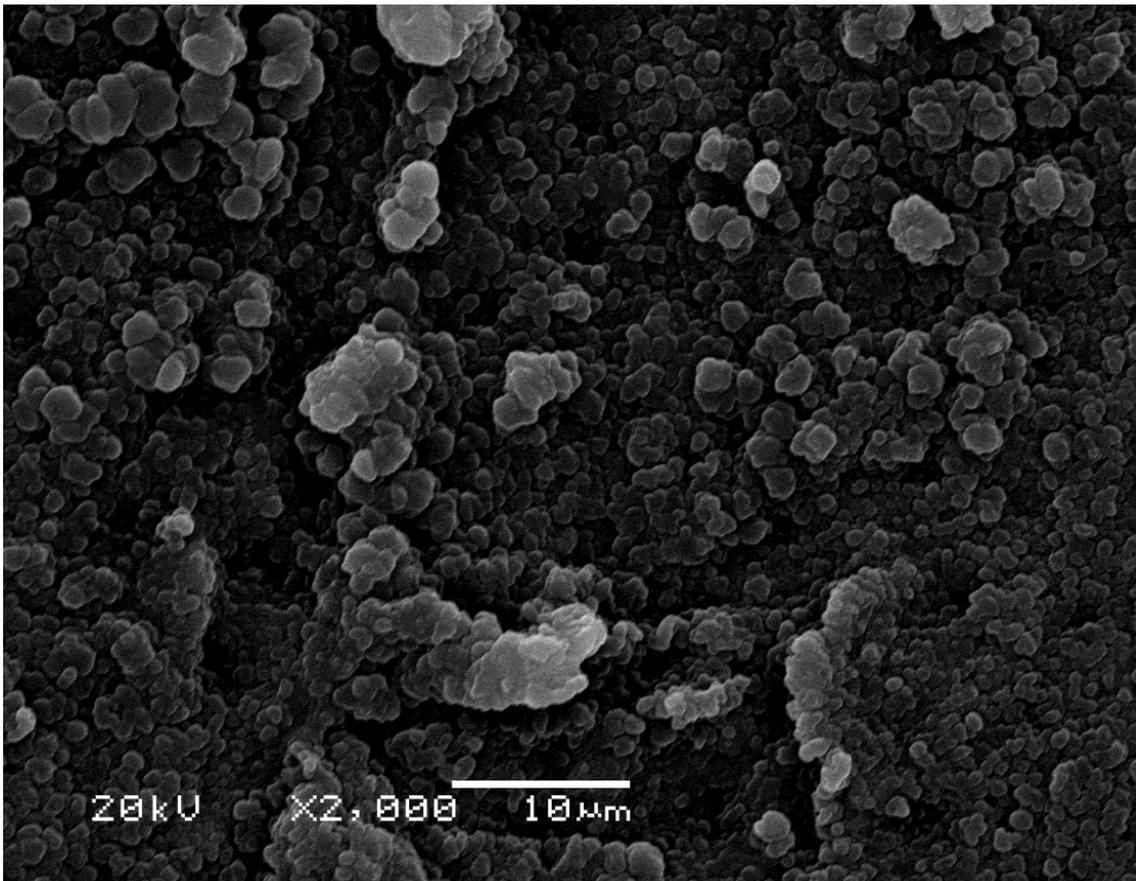
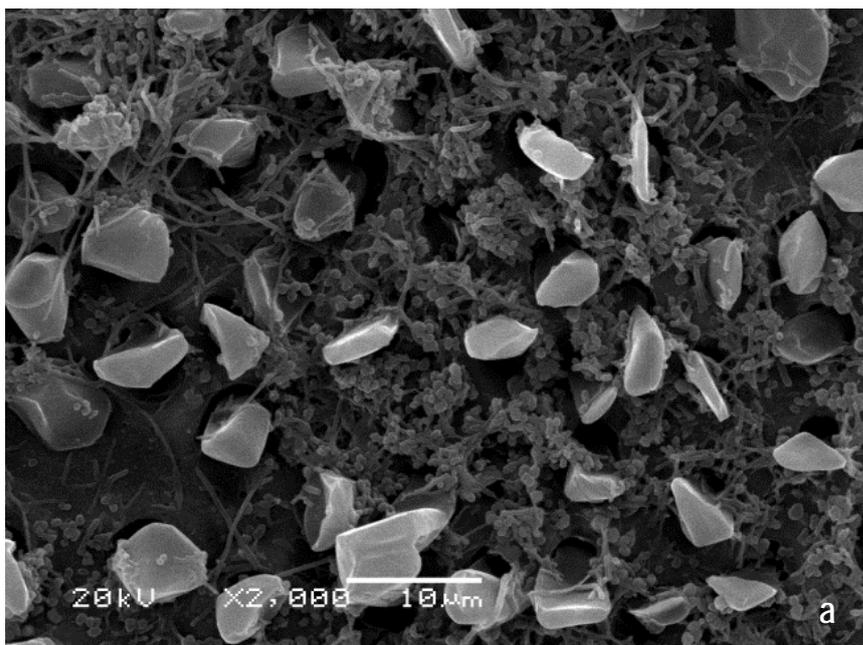
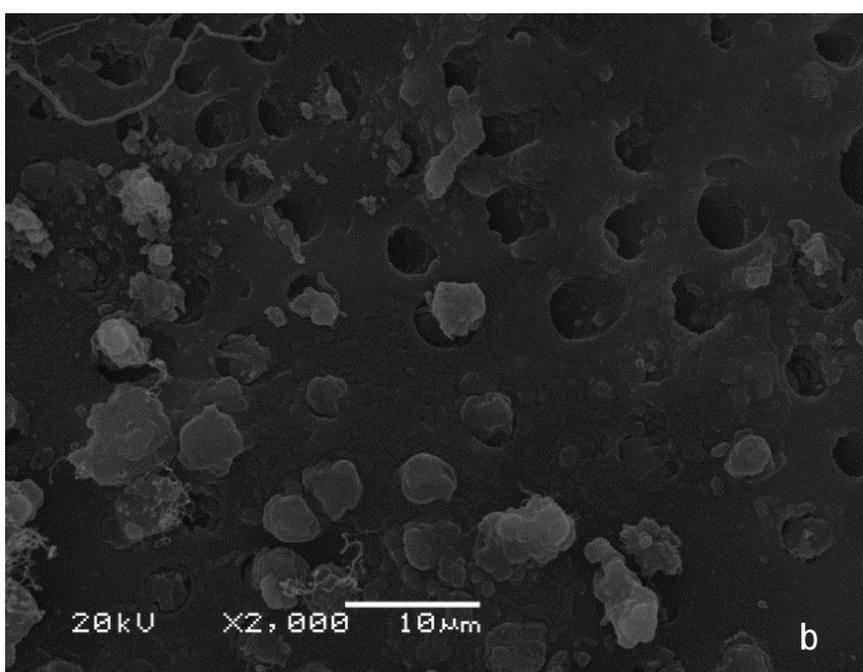


Imagem 4 – Escore 4 - Controle positivo (água destilada esterilizada)

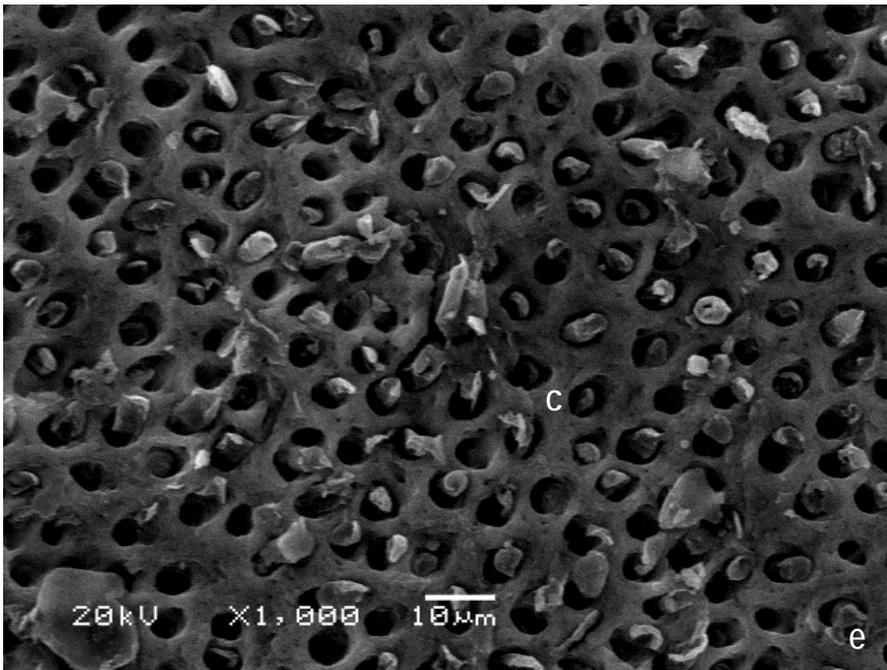
5- Imagens da microscopia eletrônica de varredura do  $\text{Ca}(\text{OCl})_2$  (a, b, c, d)



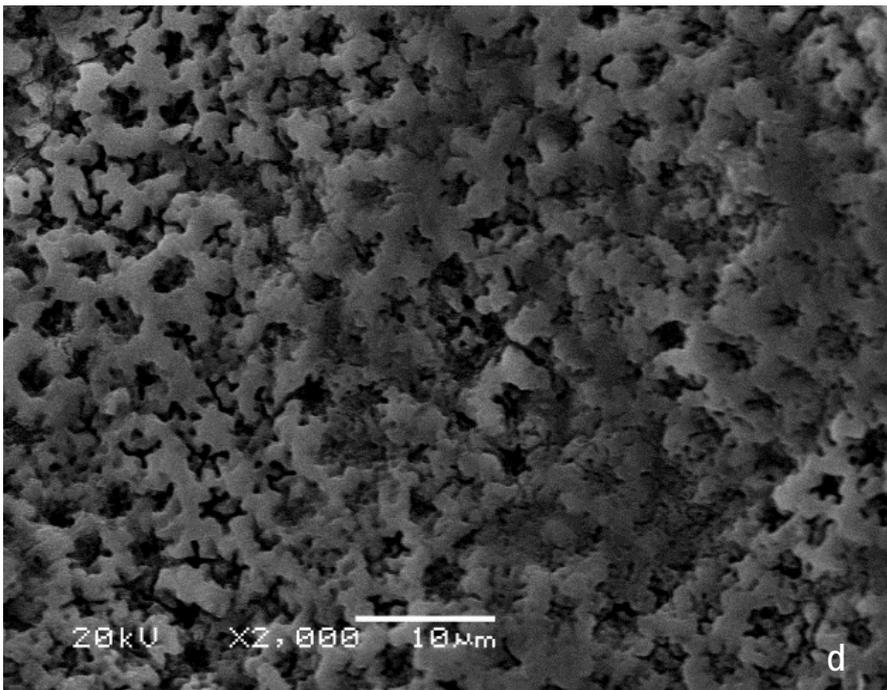
a) Escore 4 - Hipoclorito de cálcio 0,5%



b) Escore 3 - Hipoclorito de cálcio 1%



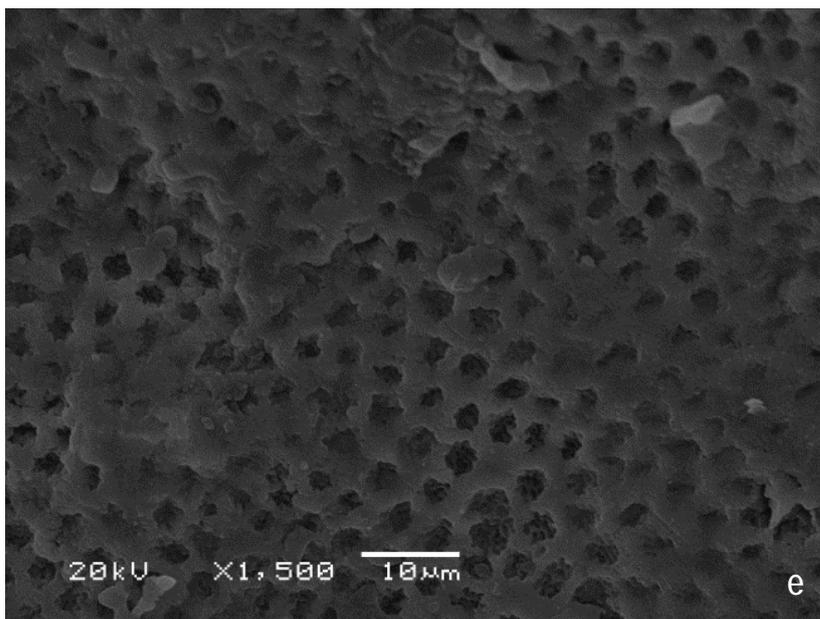
c) Hipoclorito de cálcio 2,5% (ausência de biofilme)



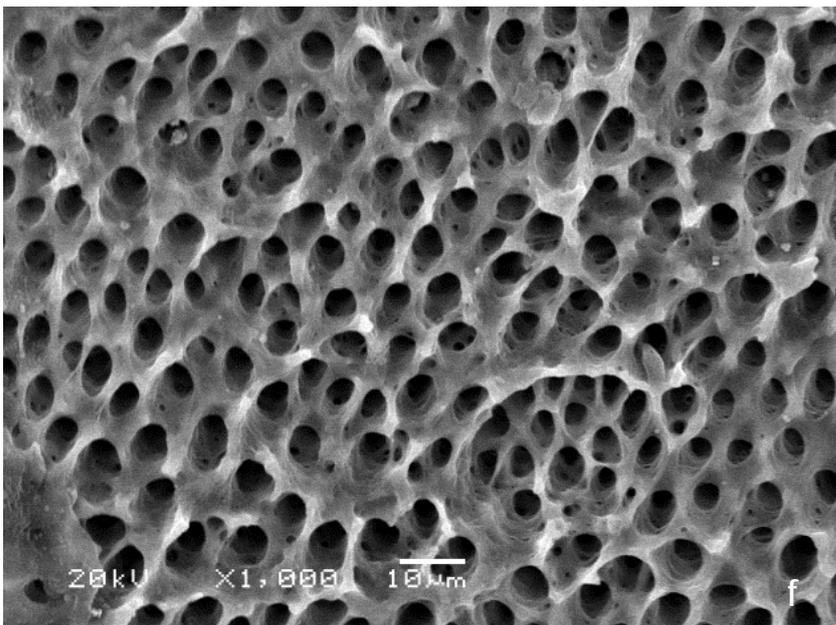
d) Hipoclorito de cálcio 5% (ausência de biofilme)

Nas imagens analisadas foram observados grânulos de  $\text{Ca}(\text{OCI})_2$  que obliteraram os tubulos dentinários. Houve grande concentração de Cálcio, conforme descrito pela análise por EDS.

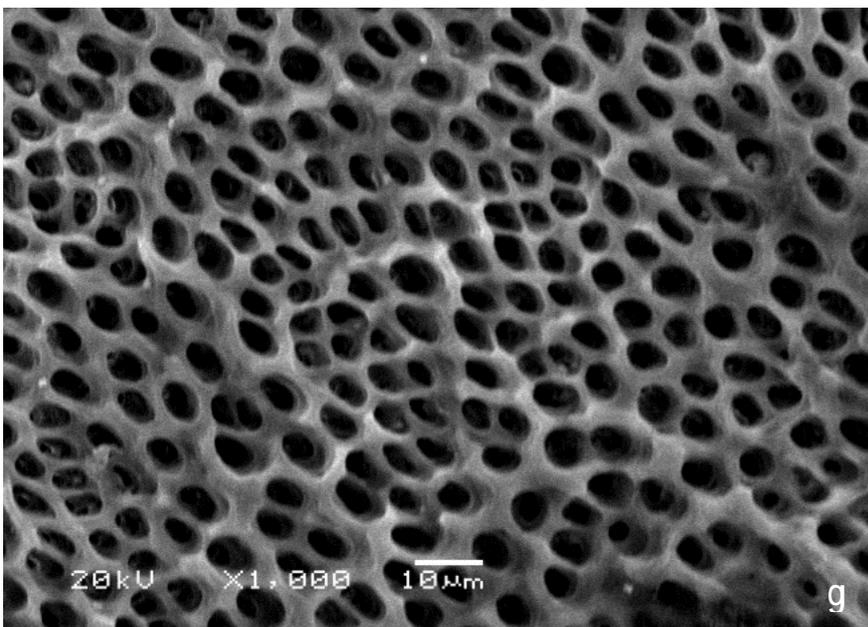
6- Imagens da microscopia eletrônica de varredura do NaOCl (e, f, g, h)



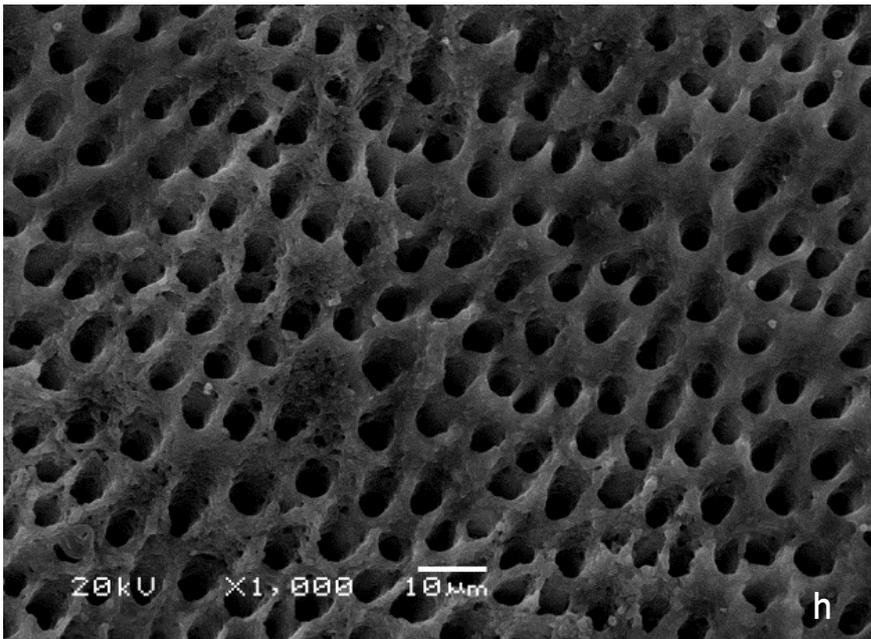
e) Hipoclorito de sódio 0,5%



f) Hipoclorito de sódio 1%



g) - Hipoclorito de sódio 2,5%



h) Hipoclorito de sódio 5%.

Nas imagens do NaOCl não foram observadas a presença de grânulos. No entanto, pode-se notar que a dentina não apresenta biofilme em nenhuma das concentrações.

## 6. DISCUSSÃO

Embora já se tenha extensivamente estudado a ação antimicrobiana e demais propriedades do hipoclorito de sódio (SIQUEIRA, *et al.*, 1997, SIQUEIRA, *et al.*, 1998, GOMES, *et al.*, 2001, ESTRELA, *et al.*, 2002, ZEHNDER M., 2006, MOHAMMADI Z., 2008.) há poucos dados relativos a estas propriedades para soluções de hipoclorito de cálcio, especialmente em concentrações usualmente empregadas em Endodontia aplicadas a um biofilme *in situ*.

Neste estudo, avaliou-se o efeito antimicrobiano de soluções de hipocloritos cálcio a partir do uso de um aparelho intraoral com blocos de dentina para favorecer a formação do biofilme *in situ* e posterior análise por microscopia. Estudos *in vitro* não são capazes de simular de forma exata um biofilme formado na cavidade bucal. Por isso, Koulourides (1974) propôs avaliar modelos de biofilme formados *in situ*. Inicialmente este modelo era utilizado para estudos em cariologia e dentística. Com o passar do tempo esse modelo de estudo foi sendo adaptado para utilização na Endodontia..

A ação antimicrobiana do  $\text{Ca}(\text{OCl})_2$  em um biofilme monoespécie e com células suspensas já tem apresentado estudos iniciais por de Almeida *et al.*, (2014) e de Paula (2015), respectivamente. De Almeida *et al* (2014) sugeriu que a irrigação ultrassônica passiva pode contribuir para uma maior eliminação de células de *E. faecalis*. Observou-se que o hipoclorito de cálcio 2,5% associado à ativação ultrassônica passiva conseguiu eliminar uma maior quantidade de *E. faecalis*, quando comparado ao  $\text{NaOCl}$  2,5%, associado ou não a ativação ultrassônica passiva. De Paula (2015) avaliou a ação antimicrobiana do  $\text{Ca}(\text{OCl})_2$  frente ao *Enterococcus faecalis*, em concentrações similares às do hipoclorito de sódio empregadas em Endodontia. A autora concluiu que: a) quanto maior a concentração da solução de hipoclorito de cálcio, maior a intensidade da ação antimicrobiana e menor o tempo necessário para a inibição do *Enterococcus faecalis*; b) a ação antimicrobiana do  $\text{NaOCl}$  e do  $\text{Ca}(\text{OCl})_2$  nas mesmas concentrações foram similares entre si, tanto na metodologia do disco-difusão quanto no contato direto; d) a dentina e a endotoxina de *E. coli* não exerceram efeito modulador na ação antimicrobiana de soluções de hipoclorito de sódio e hipoclorito de cálcio; e) em períodos curtos de exposição, a albumina exerceu efeito inibitório da ação antimicrobiana em soluções de  $\text{NaOCl}$  0,5%, 20 1% e 2,5% e também para a solução de  $\text{Ca}(\text{OCl})_2$  a 0,5%.

A justificativa da utilização da formação de um biofilme multiespecie se dá pela resistência que essa estrutura apresenta frente às substâncias comumente utilizadas. Ozok et al. (2007) compararam o crescimento e a suscetibilidade de *Fusobacterium nucleatum* e *Peptostreptococcus micros* (uni-espécie e multi-espécie) em contato com NaOCl em dois intervalos de tempo (24 e 96 horas). Em ambos os intervalos de tempo a conformação do biofilme em multi-espécie foi mais resistente ao NaOCl do que o biofilme uni-espécie. No presente estudo, pode-se observar que houve a formação de um biofilme com o uso oral durante o período de três dias e mais um dia de incubação em BHI caldo. No entanto, pode-se notar que na análise por microscopia confocal a laser presença de biofilme, diferente da análise pela MEV. Isso pode ser explicado pelos valores de magnificação utilizado nas diferentes análises. E outra justificativa encontrada é que uma das propriedades do Hipoclorito de Sódio é ser solvente de matéria orgânica (ZEHNDER, 2006). E também, porque as substâncias eram preparadas horas antes da sua utilização, fazendo com que as concentrações usadas estivessem mais próximas das que eram propostas.

A microscopia eletrônica de varredura é um método em que se avalia a capacidade de remoção de *debris* das paredes dos canais radiculares, por diferentes instrumentos e técnicas endodônticas (BEHELLI; ZECCHI ORLANDINI; COLAFRANCESCHI, 1999). E também na avaliação de microrganismos do canal radicular, no interior dos túbulos dentinários, na superfície externa das raízes e na região periapical (MICKEL 2007, RICHARDSON 2009). Nas concentrações do NaOCl de 1%, 2,5% e 5% não foram observados biofilmes ou *debris* na análise por microscopia eletrônica de varredura. No entanto em todas as concentrações do Ca(OCl)<sub>2</sub> foram observados *debris* e grânulos de cálcio, provenientes da própria solução. Clegg et al. (2006) avaliaram a eficácia do NaOCl (1%, 3% e 6%), clorexidina 2% e NaOCl 1% seguido MTAD Biopure na formação de biofilme *in vitro* em dentina apical. A análise por MEV mostrou que o NaOCl 3% e 6% foi capaz de remover completamente o biofilme formado, seguido por NaOCl 1% seguido de MTAD Biopure. Na análise pela microscopia confocal a laser foi observado que não houve viabilidade microbiana nos espécimes expostos ao NaOCl 6%, seguido pela clorexidina 2% e NaOCl 1% seguido pelo MTAD Biopure. Carlotto (2015) encontrou na comparação entre as diferentes soluções, dentro de cada terço, houve diferença significativa apenas no terço cervical, para o qual a solução de Ca(OCl)<sub>2</sub> a 5,25% promoveu remoção de *debris* inferior à solução fisiológica. Nos outros terços não houve diferença significativa ( $P > 0,05$ ) entre as soluções. Uma das justificativas para essa diferença pode ser o valor na qual a magnificação foi empregada. No presente trabalho foi utilizada a magnificação de

1000x a 2000x, um pouco diferente do estudo de Carlotto (2015) em que os valores foram definidos em 200x, para *debris*. Foram observados grânulos de cálcio nas concentrações de 0,5% e 2,5% do  $\text{Ca}(\text{OCl})_2$ , na análise por meio da MEV. Não foram utilizadas substâncias quelantes após o contato dos espécimes com ambos os hipocloritos, isso pode justificar a presença desses grânulos. A ação quelante do ácido etilenodiamino tertracético (EDTA) tem sido relatada na literatura, fazendo com que uma irrigação final com essa solução seja considerada necessária após a instrumentação manual (McCOMB; SMITH, 1975, YAMADA *et al.*, 1983, SEM *et al.*, 1995) ou rotatória (BERTRAND *et al.*, 1999, YAMASHITA *et al.*, 2005), pois proporciona melhor limpeza da superfície dentinária (YAMASHITA *et al.*, 2005). Pelo estudo de Carlotto (2015), em relação à tensão superficial, as soluções de  $\text{Ca}(\text{OCl})_2$  demonstraram valores mais elevados comparados ao NaOCl. As soluções mais concentradas de hipoclorito de cálcio mostraram maiores valores de tensão, isso pode ser uma limitação da substância, tendo em vista que apresenta uma menor capacidade de molhamento em relação ao NaOCl.

A microscopia confocal a laser apresenta algumas vantagens em estudos com microrganismos sobre a MEV. Dentre elas pode-se citar: as amostras para microscopia confocal não precisam de tratamento prévio, pode-se medir a espessura de biofilme antes e depois de aplicado a substância testada, determinar a viabilidade dos microrganismos pelo uso dos corantes específicos (DEL CARPIO-PEROCHENA, 2011). No presente trabalho observou-se que as maiores concentrações de ambos os hipocloritos foram capazes de dissolver o biofilme que havia sido formado. Esses achados foram similares ao de Del Carpio-Perochena (2011) em que a dissolução do biofilme foi proporcional a concentração que era empregada. Suman e colaboradores (2015) avaliaram o efeito do etanol 95% nas propriedades antimicrobianas da clorexidina sobre um biofilme multi-espécies formado *in situ*. Os autores encontraram que o grupo da solução salina apresentou a maior percentagem de células vivas. Esses achados corroboram os achados deste estudo, em que houve uma presença mais evidenciada de células vivas no controle que foi água destilada.

A avaliação da ação antimicrobiana do hipoclorito de Sódio frente a um biofilme de origem multi-espécies já tem sido alvo de estudos, principalmente utilizando microscopia eletrônica de varredura e confocal (ZAPATA, 2013, CARPIO-PEROCHENA, *et al.*, 2015). Os mesmos achados para o hipoclorito de cálcio ainda não estão descritos na literatura, até o presente momento. A partir deste estudo pode-se iniciar uma linha de pesquisa que avalie além das

propriedades já estudadas como dissolução pulpar, remoção de smear layer e debris (CARLOTTO, 2015), teor de cloro ativo (LEONARDO, 2015), viabilidade e resposta inflamatória tecidual (BLATTES, 2015) e ação antimicrobiana em biofilme monoespécie (de ALMEIDA et al., 2014; de PAULA, 2015) estudos clínicos que permitam avaliar se o  $\text{Ca}(\text{OCl})_2$  pode ser utilizado como uma substância química auxiliar.

Avaliados os achados do presente estudo, o efeito antimicrobiano das soluções de hipoclorito de cálcio apresentou resultados similares aos do hipoclorito de sódio que são empregadas clinicamente.

## 7. CONCLUSÃO

Considerando-se os resultados obtidos e as limitações experimentais do presente estudo, pode-se concluir que:

- Que foi determinada a viabilidade celular microbiana em biofilmes após a exposição às soluções de hipoclorito de cálcio em diferentes concentrações, por meio de microscopia confocal a laser.
- a ação antimicrobiana entre soluções de hipoclorito de sódio e hipoclorito de cálcio na concentração de 0,5% apresentou diferença, sendo a do NaOCl um pouco inferior a do  $\text{Ca}(\text{OCI})_2$  pela análise das imagens. As demais concentrações foram similares.
- foi observado, por meio da microscopia eletrônica de varredura, a presença de grânulos do hipoclorito de cálcio obliterando os túbulos dentinários.

## Referências

Bechelli, C.; Zecchi Orlandini, S.; Colafranceschi, M. Scanning electron microscope study on the efficacy of root canal wall debridement of hand versus 2 Lightspeed instrumentation. *Int Endod J.*, Oxford, v. 32, n. 6, p. 484-93, Nov. 1999.

Blattes GBF Migração celular, viabilidade e reação tecidual de soluções irrigadoras a base de hipoclorito de cálcio: estudo *in vitro* e *in vivo*. [Dissertação]. Porto Alegre (RS): Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Odontologia, 2015.

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. *Int Endod J.* 2010; 43 (3): 241-50.

Bystrom A, Sundqvist G. Bacteriologic evaluation of the effect of 0.5 percent sodium hypochlorite in endodontic therapy. *Oral Sug.* 1983 March: 307-12. 39

Calcium Hypochlorite (CaCl<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)/Sodium Hypochlorite (NaOCl) CAS 7778-54-8 3/7681-52-9; UN 1748/1791. ATSDR 2002 April.

Carlotto IB, Avaliação da dissolução pulpar, tensão superficial e limpeza dos canais radiculares com hipoclorito de cálcio: estudo *in vitro* [Dissertação]. Porto Alegre (RS): Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Odontologia, 2015.

Chavez PaRedefining the persistent infection in root canals: possible role of biofilm communities. *J Endod.* 2007 Jun;33(6):652-62.

Clegg MS, Vertucci FJ, Walker C, Belanger M, Britto LR. The effect of exposure to irrigant solutions on apical dentin biofilms in vitro. *J Endod.* 2006 May;32(5):434-7.

Costerton JW et al. Bacterial biofilms in nature and disease. *Ann. Rev. Microbiol.* 1987. 41 :435-64.

Costerton JW et al. Biofilms, the customized microniche. [J Bacteriol.](#) 1994 Apr;176(8):2137-42.

de Almeida AP, Souza MA, Miyagaki DC, Bello YD, Cecchin D, Farina AP. Comparative Evaluation of Calcium Hypochlorite and Sodium Hypochlorite Associated with Passive Ultrasonic Irrigation on Antimicrobial Activity of a Root Canal System Infected with *Enterococcus faecalis*: An In Vitro Study. *J Endod.* 30 2014; Dec;40(12):1953-7.

de Paula KB, Avaliação da ação antimicrobiana do hipoclorito de sódio e hipoclorito de cálcio por meio de diferentes modelos experimentais. [Dissertação]. Porto Alegre (RS): Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Odontologia, 2015.

Del Carpio-Perochena, AE Capacidade de dissolução do hipoclorito de sódio e da clorexidina sobre biofilme oral formado 'in situ' [DISSERTAÇÃO] Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia de Bauru, 2011.

Del Carpio-Perochena AE, Bramante CM, Duarte MA, Cavenago BC, Villas-Boas MH, Graeff MS, Bernardineli N, de Andrade FB, Ordinola-Zapata R. Biofilm dissolution and cleaning ability of different irrigant solutions on intraorally infected dentin. *J Endod.* 2011 Aug;37(8):1134-8.

Del Carpio-Perochena et al. Antibacterial and dissolution ability of sodium hypochlorite in different pHs on multi-species biofilms. *Clin Oral Invest.* Feb 2015

Dunavant TR, Regan JD, Glickman GN, Solomon ES, Honeyman AL. Comparative evaluation of endodontic irrigants against *Enterococcus faecalis* biofilms. *J Endod.* 2006 Jun;32(6):527-31.

Dutta A, Saunders WP. Comparative evaluation of calcium hypochlorite and 33 sodium hypochlorite on Soft-tissue dissolution. *J Endod.* 2012; 38(10): 1395-8.

Estrela CRA et al. Controle microbiano e químico de diferentes soluções de hipoclorito de sódio. *Robrac, São Paulo, v. 11, n. 31, p. 16-21, 2002*

Gomes BPFA, Ferraz CCR, Vianna ME, Berber VB, Teixeira FB, Souza-Filho 15 FJ. *In vitro* antimicrobial activity of several concentrations of sodium 16 hypochlorite and chlorhexidine gluconate in the elimination of *Enterococcus 17 faecalis*. *Int End Journal*, 2001;34: 424–8.

Handley PS, Carter PL, Wyett JE, Hesketh LM. Surface structures (peritrichous fibrils and tufts of fibrils) found on *Streptococcus sanguis* strains may be related to their ability to coaggregate with other oral general .*Infect Immun.* 1985;47:217–27.

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

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

Kapil J, Abhishek P, K Vikram S, Lata KM. Biofilm in endodontics: A review. *J Int Soc Prev Community Dent.* 2015 Jan-Feb; 5(1): 1–12.

Koulourides T, Phantumvanit P, Munksgaard EC, Housch T. An intraoral model used for studies of fluoride incorporation in enamel. *J Oral Pathol.* 1974;3(4):185-96.

Leonardo NG, Efeito da condição de armazenamento sobre o pH e a concentração de cloro ativo de soluções de hipoclorito de cálcio. [Dissertação] Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Odontologia, 2015

Miron J, Ben-Ghedalia D, Morrison M. Invited review: Adhesion mechanisms of rumen cellulolytic bacteria. *J Dairy Sci.* 2001;84:1294–309

Mickel AK, Chogle S, Liddle J, Huffaker K, Jones JJ. The role of apical size determination and enlargement in the reduction of intracanal bacteria. *J Endod.* 2007 Jan;33(1):21-3.

Mohammadi Z. Sodium hypochlorite in endodontics: an update review. *Int Dent* 28 J 2008;58:329-41.

Oliveira *et al.* Quantitative assessment of root canal roughness with calcium-based hypochlorite Irrigants by 3D CLSM. *Brazilian Dental Journal*, Sept 2014, Vol.25(5), 409-415.

Ozok AR, Wu MK, Luppens SB, Wesselink PR. Comparison of growth and susceptibility to sodium hypochlorite of mono- and dual-species biofilms of *Fusobacterium nucleatum* and *Peptostreptococcus (micromonas) micros*. *J Endod.* 2007 Jul;33(7):819-22.

PPG Industries, Inc. One PPG Place Pittsburgh, PA 15272, 1999).

Richardson N, Mordan NJ, Figueiredo JA, Ng YL, Gulabivala K. Microflora in teeth associated with apical periodontitis: a methodological observational study comparing two protocols and three microscopy techniques. *Int Endod J.* 2009 Oct;42(10):908-21.

Sim TPC, Knowles JC, Ng Y-L, Shelton J, Gulabivala K. Effect of sodium hypochlorite on mechanical properties of dentine and tooth surface strain. *Inter Endod J*, 2001; 34: 120–32.

Siqueira JF JR, Machado AG., Silveira RM, Lopes HP, De Uzeda M. Evaluation of the effectiveness of sodium hypochlorite used with three irrigation methods in the elimination of *Enterococcus faecalis* from the root canal, *in vitro*. *Int Endod J* 1997; 30:279–282.

Siqueira JF Jr, Batista MMD, Fraga RC, de Uzeda M. Antibacterial Effects of 24 Endodontic Irrigants on Black-Pigmented Gram-Negative Anaerobes and 25 Facultative Bacteria. *J Endod* 1998 Jun; V24(6): 414-6.

Siqueira JF Jr, Paiva SS, Rocas Reduction in the cultivable bacterial populations in infected root canals by a chlorhexidine-based antimicrobial protocol. *J Endod* 2007 33:541–547

Sundqvist G. Bacteriological studies of necrotic dental pulps [thesis]. Umea (Suecia): University of Umea; 1976.

Swain PK, Nāgaral SC, Kamalapurker PK, Damineni R. 41 Promising role of calcium hypochlorite as a disinfectant: an 42 *in vitro* evaluation regarding its effect on type Vdental stone. *J Contemp Dent 43 Pract.* 2012 Nov 1;13(6):856-66.

Whittaker HA, Mohler BM. The sterilization of milk bottles with calcium hypochlorite. Laboratory Section of the American Public Health Association. Havana, Cuba. 1911 December: 282-7.

Wong DTS, Cheung GSP. Extension of Bactericidal Effect of Sodium Hypochlorite into Dentinal Tubules. *J Endod* 2014;40:825–829.

Zapata, RO. Efeito da irrigação e medicação endodôntica em dentina infectada por biofilmes orais. 2013. 122 f. Tese (Doutorado em Odontologia) – Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, Bauru, 2013.

Zehnder M. Root canal irrigants. J Endod 2006;32:389-98.