

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA - NÍVEL MESTRADO  
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO CLÍNICA ODONTOLÓGICA - ENDODONTIA

KELLYN ROCCA SOUZA

**EROSÃO DE TÚBULOS DENTINÁRIOS FRENTE AO USO DE ÁGUA  
ELETROLISADA COM ÁCIDO HIPOCLOROSO E HIPOCLORITO DE SÓDIO 2,5%,  
ASSOCIADAS OU NÃO AO GERMINATOR.**

PORTO ALEGRE  
2022  
KELLYN ROCCA SOUZA

**EROSÃO DE TÚBULOS DENTINÁRIOS FRENTE AO USO DE ÁGUA  
ELETROLISADA COM ÁCIDO HIPOCLOROSO E HIPOCLORITO DE SÓDIO 2,5%,  
ASSOCIADAS OU NÃO AO GERMINATOR.**

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

Linha de Pesquisa: Biomateriais e Técnicas Terapêuticas em Odontologia.

Orientador: Prof. Dr. José Antônio Poli de Figueiredo

Porto Alegre  
2022

## CIP – Catalogação na Publicação

Souza, Kellyn Rocca  
EROSÃO DE TÚBULOS DENTINÁRIOS FRENTE AO USO DE ÁGUA  
ELETROLISADA COM ÁCIDO HIPOCLOROSO E HIPOCLORITO DE  
SÓDIO 2,5%, ASSOCIADAS OU NÃO A UMA FONTE LUMINOSA. /  
Kellyn Rocca Souza. -- 2022.  
66 f.  
Orientador: José Antônio Poli de Figueiredo.

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

1. Erosão. 2. Endodontia. 3. Microscopia Eletrônica  
de Varredura. I. Poli de Figueiredo, José Antônio,  
orient. II. Título.

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

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus, que nos possibilita o privilégio de viver. Aquele que em silêncio conforta meu coração e meus anseios. A Ele tudo entrego e confio, sabendo que, enquanto me mantiver seguindo no caminho do bem e do justo, estarei protegida sob a minha fé.

Aos meus pais, Luis Renato da Rosa Souza e Janete Rocca Souza, meus eternos protetores. À minha dinda, Jane Santos, minha mãe-amiga. Ao meu irmão, Dyllan Rocca Souza. Obrigada por me transmitirem força e incentivo todas as vezes que o cansaço se fez presente. Eu não estaria aqui se não fosse por vocês. Obrigada pai, mãe e dinda por aquele apoio carinhoso, que esquenta o coração que conforta e recarrega as energias. Por acreditarem em cada sonho meu, por terem se dedicado tanto quanto eu na minha educação e no meu aprendizado, por sempre me guiarem nesse caminho, por me ensinarem o valor de cada conquista. Ao meu irmão, agradeço as conversas e puxões de orelha, por ter me mostrado que é importante saber apreciar o processo. Me fez respirar e colocar os pés no chão. Às tuas palavras, talvez um pouco frias e duras, mas necessárias naquele momento. Me fez desacelerar, dividir meu tempo para que tudo ficasse mais calmo e tranquilo de ser vivido.

Ao meu namorado, Gustavo Valvassori do Nascimento, que enxerga em mim o que muitas vezes eu não consigo ver. Agradeço por vir comigo em mais uma, por acreditar nos meus sonhos e por ser suporte em todo esse processo. Por ter ficado, literalmente, do meu lado em tantos momentos de cansaço; sempre com uma palavra de incentivo me motivando a ir “mais um pouquinho”. Obrigada por ser meu melhor amigo e por, mesmo no momento mais pesado, conseguir tirar o sorriso mais sincero que eu poderia dar. Percorremos um caminho para ficarmos de mãos dadas, que Deus sempre abençoe nossa trajetória e nossos sonhos.

Mariana, Zoneide e Adauto obrigada pelo apoio, por terem embarcado no meio do caminho e, mesmo assim, acreditaram tanto em mim. Obrigada por serem morada. Filipe, obrigada por me ensinar tanto em tão pouco tempo, por ser exemplo pra mim e por ter um coração enorme.

Ao Prof. Dr. José Antônio Poli de Figueiredo pela orientação ao longo desses dois

anos. Em meio a pandemia e ao distanciamento, proporcionou a melhor experiência possível para que eu me sentisse amparada e com suporte necessário para realizar todas as atividades possíveis. Me escolheu e acreditou em cada passo que eu dei. Obrigada por ser exemplo de profissional, sempre humilde e acessível. Obrigada por ter me tranquilizado tantas e tantas vezes, repetindo o quanto fosse necessário: “calma Kellyn vai dar tudo certo”.

Obrigada Professora Dra. Silvia Dias de Oliveira, Vanessa, Maila e Ingrid do Laboratório de Imunologia e Microbiologia da Escola de Ciências da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Agradeço de coração os ensinamentos, a paciência e todas as boas risadas.

À Jordana Koch, me faltam palavras para conseguir escrever um agradecimento para essa menina-mulher. Veio de longe, cruzou meu caminho e segurou na minha mão para não soltar mais. Tão jovem, mas tão à frente do seu tempo; em muitos momentos me consolou e me tranquilizou. Obrigada por me motivar e não me deixar desistir, obrigada por me trazer a paz que eu não conseguia encontrar em outros abraços. Amiga, tu foi meu maior presente dessa experiência toda, obrigada por me permitir fazer parte dos teus sonhos e da tua vida.

Obrigada também às amigas construídas ao longo do mestrado. Marieli Chitolina Pradebon, obrigada por ter um coração tão imenso que nos conforta. Obrigada por todo o apoio, pelas palavras de incentivo e pela companhia leve, fez-se presente em todos os momentos! Isadora Basso, é impossível não se sentir bem e sorrir na tua presença. Amiga maravilhosa, obrigada por todo suporte! Consigo ouvir a tua vozinha repetindo inúmeras vezes “gurias calma, vai dar tudo certo”. Matheus Reolon, obrigada por cada risada, conversa e por todo o apoio. Nosso trio endodôntico, não seria o mesmo se tu não estivesse nele. Lívia Alvariza e Thaís Marchand, obrigada pela parceria e pelo auxílio nos trabalhos e laboratório.

Meninas da Clínica Dedordi de Charqueadas (Gabriela do Amaral, Luciane Lopes, Alana Francisco Candido, Queli Garbin) obrigada por todo incentivo, por todas as conversas e risadas. Mesmo percorrendo toda a semana 120km, vocês tornam isso tudo mais leve e prazeroso de se viver. Que possamos continuar desfrutando de conversas profundas na nossa mesinha branca. Obrigada Alana pela ajuda com as

imagens, ficaram ótimas!

Aos professores da pós-graduação da Universidade Federal do Rio Grande do Sul da área de Endodontia, obrigada por todo o aprendizado ao longo desses dois anos. Obrigada aos que me inspiram desde a graduação e me motivaram de alguma forma a seguir esse caminho.

Ao programa de Pós-Graduação em Odontologia da UFRGS e à Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) agradeço a oportunidade de fazer parte dessa experiência que me forneceu o aprendizado necessário para continuar trilhando o meu caminho profissional e ir atrás dos meus sonhos.

*Mantenha seus pensamentos positivos, pois seus pensamentos se tornam suas palavras. Mantenha suas palavras positivas, pois suas palavras se tornam os seus comportamentos. Mantenha seus comportamentos positivos, pois seus comportamentos se tornam os seus hábitos. Mantenha seus hábitos positivos, pois seus hábitos se tornam os seus valores. Mantenha seus valores positivos, pois seus valores se tornam o seu destino.*

- Mahatma Gandhi

## RESUMO

O *Enterococcus faecalis*, principal microrganismo presente nas infecções endodônticas secundárias, possui a habilidade de sobreviver em condições desfavoráveis. Dessa forma, o potencial antimicrobiano de soluções irrigadoras associadas ou não a novas terapêuticas vem sendo estudado. Entretanto, não se sabe muito sobre o impacto dessas técnicas na superfície dentinária do canal radicular. Esta pesquisa objetivou comparar os possíveis efeitos na estrutura dentinária da Água Eletrolisada com ácido hipocloroso (AE) associada à uma fonte luminosa (Germinator) ao irrigante mais comumente utilizado – hipoclorito de sódio 2,5%. Foram utilizados 56 dentes bovinos, onde se avaliou o potencial erosivo através de imagens (5.000x e 10.000x de magnificação) adquiridas com Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). Os grupos testados foram: controle negativo para fins de comparação (G1); controle positivo (G2); AE (G3), AE + Germinator (G4), hipoclorito de sódio 2,5% (G5), hipoclorito de sódio 2,5% + Germinator (G6), Germinator (G7). Os dados foram analisados através dos testes de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney, com nível de significância de 1%. Os resultados mostraram que o hipoclorito de sódio 2,5%, associado ou não ao Germinator, foi o único irrigante que causou erosão na superfície do canal radicular, bem como, modificações no contorno dos túbulos dentinários ( $p < 0.001$ ). Foi possível concluir que o hipoclorito de sódio 2,5% causou erosão na superfície do canal radicular, bem como, alterações no contorno dos túbulos dentinários. Ainda, Água Eletrolisada com ácido hipocloroso, com relação ao seu potencial erosivo, seria uma opção segura para uso na Endodontia.

Palavras-Chave: Erosão; Endodontia; Microscopia Eletrônica de Varredura.

## **ABSTRACT**

*Enterococcus faecalis*, the main microorganism present in secondary endodontic infections, has the ability to survive in unfavorable conditions. Thus, the antimicrobial potential of irrigating solutions associated or not with new therapies has been studied. However, not much is known about the impact of these techniques on the dentin surface of the root canal. This research aimed to compare the possible effects on the dentin structure of Electrolyzed Water with hypochlorous acid (AE) associated with a light source (Germinator) to the most commonly used irrigant – 2.5% sodium hypochlorite. Fifty-six bovine teeth were used, where the erosive potential was evaluated through images (5,000x and 10,000x magnification) acquired with Scanning Electron Microscopy (SEM). The groups tested were: negative control for comparison purposes (G1); positive control (G2); AE (G3), AE + Germinator (G4), sodium hypochlorite 2.5% (G5), sodium hypochlorite 2.5% + Germinator (G6), Germinator (G7). Data were analyzed using the Kruskal-Wallis and Mann-Whitney tests, with a significance level of 1%. The results showed that 2.5% sodium hypochlorite, associated or not with Germinator, was the only irrigant that caused erosion on the surface of the root canal, as well as changes in the contour of the dentinal tubules ( $p < 0.001$ ). It was possible to conclude that 2.5% sodium hypochlorite caused erosion on the root canal surface, as well as alterations in the contour of the dentinal tubules. Also, electrolyzed water with hypochlorous acid, with regard to its erosive potential, would be a safe option for use in Endodontics.

**Keywords:** Erosion; Endodontics; Scanning Electron Microscopy.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

|             |   |    |
|-------------|---|----|
| Figura 1 -  | Incisivos bovinos maduros após a extração e armazenagem.....  | 28 |
| Figura 2 -  | Remoção da coroa abaixo da junção amelocementária.....  | 30 |
| Figura 3 -  | Incisivo bovino após confecção dos sulcos longitudinais.....  | 30 |
| Figura 4 -  | Incisivos bovinos com cera utilidade fixada no ápice radicular.....   | 31 |
| Figura 5 -  | Organização da mesa de materiais utilizados para o protocolo de irrigação.....  | 32 |
| Figura 6 -  | Dentes posicionados em microtubos com Fita Micropore.....   | 33 |
| Figura 7 -  | Microtubos posicionados nas caixas e prontos para esterilização....   | 33 |
| Figura 8 -  | Tubos contendo caldo BHI após teste de esterilidade.....  | 34 |
| Figura 9 -  | Adição da cultura de <i>E. faecalis</i> no interior do canal radicular pelo orifício central.....   | 35 |
| Figura 10 - | Troca do meio de cultivo em capela de fluxo laminar.....  | 36 |
| Figura 11 - | Troca de meio de cultivo pelo orifício lateral do microtubo.....  | 37 |
| Figura 12 - | Capela de fluxo laminar pronta para aplicação dos protocolos de tratamento.....   | 38 |
| Figura 13 - | Equipamento Dentaqua Dw-8.....  | 39 |
| Figura 14 - | <b>(A)</b> Germinator e Power Pack. <b>(B)</b> Germinator posicionado sobre a região cervical das amostras.....   | 40 |
| Figura 15 - | Clivagem dos dentes no protótipo de madeira.....  | 41 |
| Figura 16 - | Hemiseções prontas para análise em MEV.....   | 41 |
| Figura 17 - | Amostras para análise em MEV.....   | 42 |
| Gráfico 1 - | Média do potencial erosivo das amostras de cada grupo analisado.  | 44 |
| Tabela 1 -  | Erosão da superfície dentinária, por zona radicular e grupo de tratamento.....  | 45 |
| Figura 18 - | Imagem da zona A de uma amostra do grupo controle negativo (G1) no aumento de 10.000x. Sem áreas de erosão dentinária. Contorno dos túbulos inalterado..... | 45 |
| Figura 19 - | Imagens da zona A no aumento de 10.000x do grupo G3 <b>(A)</b> e G7 <b>(B)</b> .....  | 46 |
| Figura 20 - | Imagem da zona B no aumento de 10.000x do grupo G4.....   | 47 |

|             |  |    |
|-------------|--|----|
| Figura 21 - | Imagens da zona A no aumento de 10.000x do grupo G5 <b>(A)</b> e G6 <b>(B)</b> ..... | 47 |
| Tabela 2 -  | Comparação entre grupos do potencial erosivo.....                                    | 48 |

## SUMÁRIO

|   |           |
|---|-----------|
| <b>1 INTRODUÇÃO.....</b>                              | <b>12</b> |
| 1.1 Tratamento Endodôntico.....                       | 13        |
| 1.2 Soluções Irrigadoras (Hipoclorito de Sódio).....  | 14        |
| 1.3 Biofilme.....                                     | 19        |
| 1.4 Enterococcus faecalis.....                        | 20        |
| 1.5 Germinator.....                                   | 23        |
| 1.6 Água Eletroquimicamente Ativada.....              | 25        |
| <b>2 OBJETIVOS.....</b>                               | <b>27</b> |
| 2.1 Objetivos geral.....                              | 27        |
| 2.2 Objetivos Específicos.....                        | 27        |
| <b>3 METODOLOGIA.....</b>                             | <b>28</b> |
| 3.1 Seleção e Preparo das Amostras.....               | 28        |
| 3.2 Análise Estatística.....                          | 29        |
| 3.3 Limpeza e Esterilização dos dentes.....           | 29        |
| 3.4 Preparo da Cultura.....                           | 34        |
| 3.5 Inoculação das Amostras.....                      | 35        |
| 3.6 Classificação dos Grupos de Tratamento.....       | 37        |
| 3.7 Tratamentos Aplicados nos Grupos.....             | 38        |
| 3.8 Água Eletrolisada (AE) com Ácido Hipocloroso..... | 39        |
| 3.9 Germinator.....                                   | 39        |
| 3.10 Microscopia Eletrônica de Varredura.....         | 40        |
| <b>4 RESULTADOS.....</b>                              | <b>44</b> |
| <b>5 DISCUSSÃO.....</b>                               | <b>49</b> |
| <b>6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>                    | <b>59</b> |
| <b>REFERÊNCIAS.....</b>                               | <b>60</b> |

## 1 INTRODUÇÃO

Um tratamento endodôntico de excelência vai além de utilizar bons equipamentos e realizar os procedimentos técnicos de forma adequada. Não se resume em seguir protocolos, mas sim em compreender os fatores etiológicos das doenças endodônticas de forma abrangente, conhecer as técnicas de diagnóstico pulpar e periapical e interpretar as respostas obtidas através da anamnese e exame clínico. Seguir esse caminho, aproxima o profissional de um diagnóstico seguro e acurado (SIQUEIRA; RICUCCI, 2010).

Alghamdi e Shakir (2020), afirmam que, bactérias e seus produtos são fatores que causam inflamação pulpar e perirradicular, sendo a sua eliminação imprescindível para o sucesso do tratamento. Os autores ainda relatam que, com o diagnóstico estabelecido e a conduta clínica planejada, o cirurgião-dentista tem a capacidade de lidar com duas situações patológicas: alteração do tecido pulpar por meio de um processo inflamatório irreversível ou através de um processo infeccioso caracterizado por necrose pulpar. Conseqüentemente, Siqueira e Roças (2009) complementam que, nesses casos, pode-se também encontrar perda óssea periapical.

O percentual de sucesso pós-tratamento endodôntico oscila de acordo com a situação clínica inicial do paciente e com os métodos utilizados pelo profissional no transcorrer do tratamento, podendo variar entre 86% e 98%. Se o canal radicular se encontrar livre de infecção, o objetivo do tratamento passa a ser a assepsia do meio, prevenindo que uma possível infecção entre em contato com a porção apical do canal. Sendo assim, há um aumento nas taxas de reparo e na previsibilidade de sucesso da terapêutica (PRADA et al., 2019; ZEHNDER, 2006).

Prada et al. (2019) também relatam que, a partir do momento em que a polpa entra em processo de necrose, seja pela evolução de lesão cáries, doença periodontal ou trauma, a possibilidade de existir infecção no interior dos canais aumenta progressivamente. Nesses casos, o desenvolvimento de um ambiente propício para colonização e multiplicação de bactérias é viabilizado por

uma temperatura adequada, pela inexistência de nutrientes e por uma baixa quantidade de células de defesa capazes de combater os microrganismos.

Zehnder (2006) expõe que casos de necrose pulpar apresentam microrganismos que com o tempo tendem a ocupar o sistema de canais radiculares, alojando-se no interior dos túbulos dentinários, deltas apicais, ramificações e istmos. A essa disseminação, soma-se também a liberação de produtos tóxicos bacterianos que causam injúrias aos tecidos perirradiculares, iniciando um processo de recrutamento de células de defesa para a região.

O autor ainda afirma que, enquanto não houver a remoção desses microrganismos através do tratamento endodôntico, o ligamento periodontal segue sendo agredido. Na sequência, devido à contínua quimiotaxia de células de defesa para essa área, a mesma acaba se tornando incapaz de comportar todos esses elementos. Sendo assim, os osteoclastos são recrutados. Essas células atuam reabsorvendo tecido ósseo local, criando um espaço para comportar mais células do sistema imune, formando a lesão periapical (ZEHNDER, 2006).

Entende-se também que, quanto maior for essa lesão periapical, maior será a carga microbiana presente no sistema de canais radiculares. Dessa forma, algumas situações clínicas como: dentes com periodontite apical assintomática ou retratados endodonticamente, se contrastados com casos de necrose ou vitalidade pulpar, apresentarão diferentes prevalências de sucesso, devido ao maior ou menor grau de infecção. Portanto, quando estabelecido um diagnóstico utilizando todas as ferramentas disponíveis (anamnese, exame físico, testes de sensibilidade pulpar e interpretação de exames de imagem e complementares), tem-se respaldo para planejar as etapas operatórias e escolher as técnicas mais adequadas, objetivando o sucesso da terapia endodôntica (SIQUEIRA; RICUCCI, 2010).

## **1.1 Tratamento Endodôntico**

Durante o tratamento endodôntico, Siqueira & Roças (2009) apontam que o biofilme precisa sofrer um processo de desorganização através de meios

mecânicos (instrumentos endodônticos), dando início ao processo de desinfecção do canal radicular. Essa etapa, também conhecida por desbridamento, tem por objetivo promover a redução da carga bacteriana e o aumento da suscetibilidade das bactérias à ação química dos agentes antimicrobianos.

Santos et al. (2012) e Lucena et al. (2021) acrescentam que a terapia endodôntica consiste na combinação de um preparo químico-mecânico (irrigação e instrumentação) com o selamento desse sistema de canais radiculares através da obturação em todo o seu comprimento. A associação de instrumentos endodônticos com soluções irrigadoras para a remoção de microrganismos e matéria orgânica, faz parte das etapas do tratamento. Em casos específicos, complementa-se com a medicação intracanal.

Ainda, conforme Jhajharia et al. (2015), o biofilme é rompido e a carga microbiana é reduzida através da instrumentação mecânica, irrigação com soluções tecido-líticas e microbicidas e com o uso de medicamentos antimicrobianos no canal radicular. Consoante Gabardo et al. (2009), os irrigantes têm por objetivo sanificar, desinfetar e lubrificar os condutos radiculares durante o preparo químico-mecânico. Selecionar a solução irrigadora mais eficiente vai depender do seu efeito na microbiota de canais radiculares e a sua ação sobre os tecidos periapicais. O desafio se encontra em alcançar o maior potencial antimicrobiano com uma concentração segura.

## **1.2 Soluções irrigadoras (Hipoclorito de Sódio)**

Retamozo (2010) e Janani et al. (2017), apresentam em seus estudos as qualidades desejáveis de uma solução irrigadora que reúna as principais necessidades dos profissionais: habilidade de dissolução da matéria orgânica; capacidade de remover *smear layer*; baixa toxicidade; efeito bactericida e bacteriostático; facilitar a ação dos instrumentos. Diferentes soluções têm sido analisadas com relação ao potencial de desinfecção: compostos halogenados (hipoclorito de sódio/NaOCl), agentes quelantes (EDTA, ácido cítrico), clorexidina, detergentes (aniônicos, catiônicos), água ozonizada e vinagre de maçã.

Os autores ainda citam que, o hipoclorito de sódio é a solução mais comumente escolhida pelos endodontistas, pois dispõe da maioria das propriedades citadas anteriormente. Entretanto, é incapaz de remover a *smear layer*; contudo, irrigações com soluções quelantes têm sido indicadas como adjuvantes no tratamento de canal radicular, com a intenção de remover essa camada de matéria inorgânica (RETAMOZO, 2010; JANANI et al., 2017).

Inicialmente, o hipoclorito de sódio foi recomendado por Labarraque (1777-1850), com objetivo de prevenir a febre puerperal. No século XIX, estudos laboratoriais realizados por Koch e Pasteur aumentaram a aceitação da solução como desinfetante. Durante a Primeira Guerra Mundial, com base nos estudos de Dakin sobre o uso de diferentes soluções em tecido infectado, o NaOCl tamponado a 0,5% foi utilizado para irrigar feridas. Pelo seu alto potencial de dissolução de tecidos necróticos, o mesmo foi introduzido na Endodontia em 1920 (ZEHNDER, 2006).

Conforme Renovato et al. (2017), o hipoclorito de sódio é um solvente com pH maior que 11. Possui a habilidade de dissolver os componentes orgânicos e tecidos necróticos. Seu espectro antimicrobiano é abrangente, agindo contra bactérias, bacteriófagos, esporos, leveduras e vírus. Em altas concentrações, consegue agir sob a *E. faecalis*. Entretanto, Janani et al. (2017) evidenciam que, conforme sua concentração, o NaOCl pode exibir algum nível de toxicidade. Se altas concentrações do irrigante forem injetadas na região do periápice, essa extrusão pode levar à necrose tecidual ou a reações alérgicas.

A ação do hipoclorito de sódio no interior do canal radicular se dá através da degradação de aminoácidos e da hidrólise ao produzir cloro. Para um melhor entendimento do processo, os autores verificam as reações químicas que ocorrem entre tecido orgânico e o NaOCl. O irrigante funciona como um solvente ao degradar ácidos graxos, transformando os mesmos em sais e glicerol; essa reação tem por objetivo diminuir a tensão superficial da solução residual, dissolvendo matéria orgânica (reação de saponificação) (ESTRELA et al., 2002).

Estrela et al. (2002) descrevem também a segunda reação que ocorre no processo de descontaminação: reação de neutralização. O hipoclorito de

sódio neutralizará aminoácidos, formando sal e água. Com a saída dos íons hidroxila, o pH diminui. O ácido hipocloroso, presente na solução de NaOCl, quando em contato com tecidos orgânicos, age como um solvente. Então, cloro será liberado e, ao ser combinado com o grupo amino da proteína, formará as cloraminas (reação de cloraminação).

Entendendo melhor o mecanismo antimicrobiano das reações, os autores explicam que a reação de cloraminação vai interferir no metabolismo celular ao oxidar e inibir enzimas bacterianas, trocando hidrogênio pelo cloro. Essas enzimas estão presentes na membrana citoplasmática das células, sendo responsáveis por funções essenciais: metabolismo, divisão e crescimento celular, formação da parede celular, biossíntese de lipídios, transporte de elétrons e fosforilação oxidativa. Sendo assim, o pH elevado da solução modifica a integridade da membrana citoplasmática e interfere no transporte de nutrientes das células bacterianas (ESTRELA et al., 2002).

Outras duas propriedades do hipoclorito de sódio vêm sendo discutidas entre Retamozo (2010) e Janani et al. (2017): a necessidade de estar em contato direto e durante um período mínimo de tempo para alcançar os efeitos desejados. Haapasalo et al. (2007) acrescentam que é indispensável o contato entre os agentes desinfetantes e as células microbianas, objetivando a morte desses microrganismos. Após o início dessa interação, o produto químico desinfetante passará pelo processo gradual de inativação e, em cada região do sistema de canais radiculares, isso se dá por diferentes causas. No canal principal a solução pode ser desafiada pelas diversas camadas dos biofilmes, da mesma forma que, uma variedade de outros componentes orgânicos ali presentes vão interagir com o irrigante utilizado podendo afetar o potencial antibacteriano do mesmo.

Haapasalo et al. (2007) seguem afirmando que, nos túbulos dentinários, pode-se encontrar fatores de diluição, dificultando a completa limpeza da dentina infectada pela solução irrigadora. Ainda, algumas espécies microbianas conseguem invadir em profundidade a dentina, sendo os cocos gram-positivos facultativos (enterococos e estreptococos) os mais hábeis invasores. Santos et al. (2012) e Retamozo (2010) avaliaram a capacidade de difusão do NaOCl no

interior dos túbulos, atingindo uma profundidade de 200-300µm. Porém, a *E. faecalis* consegue alcançar profundidades maiores. À vista disso, o contato direto entre solução e microrganismo fica impossibilitado, resultando na persistência bacteriana mesmo após instrumentação e irrigação dos canais.

Outro questionamento levantado pelos autores é sobre o tempo mínimo de contato entre irrigantes e microrganismos. O estudo de Retamozo (2010) mostrou que a irrigação com NaOCl 5,25% durante 40 minutos, foi o único processo capaz de eliminar completamente as bactérias. Entretanto, concentrações altas de hipoclorito de sódio não são recomendadas para uso, em virtude dos níveis elevados de toxicidade. Os autores também evidenciaram que NaOCl 1,3% ou 2,5% são ineficazes em um período menor que 40 minutos, resultando em bactérias residuais no interior do elemento dentário.

Rutala & Weber (1997) afirmam que não existe um consenso sobre a concentração ideal de hipoclorito de sódio para uso. O objetivo maior seria uma concentração apta a destruir os microrganismos e neutralizar os seus produtos sem causar danos aos tecidos adjacentes. De acordo com o estudo de Spangberg, Engstrom e Langeland (1973), a concentração de 5,25% de NaOCl, apesar de ter sido forte o suficiente para eliminar cepas bacterianas no interior do canal radicular, apresentou alta toxicidade para ser usada na rotina endodôntica.

Zehnder (2006) acresce que, o potencial antimicrobiano do NaOCl e sua capacidade de dissolução de tecido, estão diretamente relacionados com a concentração, porém sua toxicidade também. O estudo ainda disserta sobre o uso do hipoclorito 5,25% por parte da maioria dos profissionais americanos. Porém, fortes irritações foram vistas nos tecidos periapicais ou na mucosa dos pacientes que passaram por procedimentos endodônticos, nos quais houveram vazamento da solução, nessa concentração, através do dique de borracha.

Entre os profissionais não existe um consenso acerca da solução irrigadora ideal. Essa seleção leva em consideração o potencial antimicrobiano dos irrigantes e sua possível ação sobre os tecidos periapicais. De todos os irrigantes disponíveis, Zehnder (2006) afirma que o hipoclorito de sódio segue

sendo “padrão ouro” e o mais utilizado. Mareending et al. (2007) elucidam que o NaOCl é um agente oxidante não específico, podendo desproteíntizar tecidos duros em aplicações biomédicas. Os autores ainda afirmam que um dos efeitos colaterais dessa solução não recebeu sua devida importância dentro da literatura endodôntica: o impacto na matriz dentinária.

Consoante Renovato et al. (2017), dos 22% de material orgânico da dentina, o colágeno do tipo I é o seu principal constituinte. Esse colágeno tem atuação direta nas propriedades mecânicas da dentina. O mesmo pode sofrer a ação solvente do NaOCl, visto que essa solução a 5% consegue degradar em torno de 14% do peso seco de amostras de dentina em um período de 24 horas. Em estudo, Guerisolli et al. (1998) avaliaram a perda de estrutura dentinária quando em contato com diferentes concentrações de NaOCl; os resultados mostraram que não houve diferença entre as concentrações na degradação do colágeno em dentina mineralizada. Entretanto, em dentina desmineralizada, a diferença de concentração foi estatisticamente significativa: maior concentração, maior perda de estrutura.

Conforme Mareending et al. (2007), o hipoclorito de sódio tem a habilidade de fragmentar longas cadeias peptídicas e clorar grupos terminais de proteínas, afetando as propriedades mecânicas da dentina ao degradar seus componentes orgânicos. Nesse contexto, foi visto que uma superfície dentinária exposta ao NaOCl a 5% tem sua matriz de dentina periférica severamente alterada. O estudo de Grigoratos, Knowles e Gulabivala (2001), mostrou que expor a dentina durante duas horas à uma concentração de 3%, diminui significativamente seu módulo de elasticidade e sua resistência à flexão em comparação com soro fisiológico. Além disso, os autores puderam observar linhas de fratura nessa dentina.

Novamente, Zehnder (2006) apontou que, uma solução de hipoclorito de sódio 5,25% diminui significativamente o módulo de elasticidade e a resistência à flexão da dentina, se comparado com uma solução de NaOCl 0,5%. Seguindo na mesma linha, Nakamura et al. (1985) reportam que as concentrações 2,6% e 5,2%, quando utilizadas a 37°C, dissolveram 40% do colágeno após quatro

minutos, 45% após oito minutos e 50% após 12 minutos. No mesmo estudo, foi visto que a solução com concentração de 5%, a 4°C, dissolveu 45% de colágeno após 10 minutos.

Em uma revisão de literatura os autores discorrem sobre as mudanças na dureza do dente após o uso de hipoclorito de sódio durante o tratamento endodôntico. O uso do irrigante seria um fator cumulativo, podendo predispor o dente a fraturas, devido a sobrecargas durante a mastigação. Sobre a diminuição da resistência à flexão, o resultado seria uma menor capacidade do dente de suportar as deformações na presença de algum tipo de força. Dessa forma, após a utilização de NaOCl, menos esforços seriam necessários para que as ligações coesivas dentro da dentina se rompessem. Esses resultados foram vistos após irrigação com concentrações de 2.5%, 3%, 5%, 5.25% e 9% em um período entre 24 minutos a 2 horas (PASCON et al., 2009).

### **1.3 Biofilme**

As mudanças nas propriedades físico-químicas da dentina não só prejudicam a resistência do elemento dentário, como também podem criar espaços propícios para as bactérias residuais se alojarem. De acordo com Siqueira & Ricucci (2010), temos o biofilme como o principal mediador da infecção endodôntica, nas quais as bactérias são as principais causadoras da inflamação pulpar e periapical. Prada et al. (2019) reforçam ainda que, no interior do canal radicular, as bactérias podem estar isoladas como células planctônicas, suspensas em líquido ou na forma de agregados aderidos às paredes dentinárias, formando diversas camadas de biofilme.

Chakraborty & Kumar (2019) retificaram que os biofilmes são uma comunidade bacteriana tridimensional cercada por uma matriz extracelular de substâncias poliméricas que protegem as células de antimicrobianos e componentes imunológicos. Jhajharia et al. (2015) acrescentam que essa matriz é composta em 85% por proteínas, polissacarídeos e ácidos nucleicos. Enquanto que estruturas celulares compõem os 15% restantes. A mesma, age como uma barreira física, criando um ambiente favorável para sobrevivência. Ela aumenta a patogenicidade; a proteção contra microrganismos e/ou agentes

antimicrobianos; a área para crescimento e a eficiência metabólica. Da mesma forma que diminui o estresse causado pelo ambiente e pela defesa do hospedeiro.

O biofilme pode ser encontrado em diversas áreas do complexo sistema de canais radiculares. Estudos *in situ* observaram biofilmes sésses recobrendo as paredes dentinárias desse sistema em infecções primárias e secundárias. Foi revelada também, a presença de biofilme em ramificações apicais, canais laterais e istmos que realizam a conexão com o canal principal. Acrescenta-se ainda que, biofilmes aderidos na superfície apical da raiz (biofilme extrarradicular) têm sido considerados como uma possível causa de periodontite apical pós-tratamento. Além disso, essas regiões dificultam o contato entre os instrumentos e/ou agentes químicos com as bactérias (RICUCCI et al., 2010; PRADA et al., 2019).

Prada et al. (2019) ainda afirmam que, após os procedimentos de desinfecção endodôntica, o remanescente bacteriano (mesmo com substrato reduzido) consegue sobreviver nessas áreas de difícil acesso aos instrumentos e irrigantes endodônticos e em regiões rugosas de erosão causadas pelo hipoclorito de sódio. Para isso, as bactérias devem possuir características que as tornem hábeis para se adaptarem a um ambiente pobre em nutrientes. Para tanto, algumas espécies podem estar envolvidas no insucesso do tratamento endodôntico, sendo a *Enterococcus faecalis* a mais prevalente: Pinheiro et al. (2003) mostraram a presença de 45,8% de *E. faecalis*, mesmo após endodontia finalizada; Sedgley et al. (2006), descobriram que é mais frequente a presença da *E. faecalis* em infecções secundárias (89,6%) do que em primárias (67,5%).

#### **1.4 *Enterococcus Faecalis***

De acordo com Alghamdi & Shakir (2020), as bactérias e os seus subprodutos são fatores que originam inflamações pulpares e perirradiculares, dessa forma, sua eliminação do sistema de canais radiculares durante o tratamento endodôntico é essencial para o sucesso da terapia. Ainda que uma adequada instrumentação e irrigação possa diminuir a carga microbiana, a *Enterococcus faecalis* nem sempre é removida por completo do canal radicular,

abrigando-se em locais propícios para sua sobrevivência.

Essa bactéria é um coccus gram-positivo anaeróbio facultativo que normalmente habita a cavidade oral e trato gastrointestinal. Outrossim, é um indicador biológico amplamente utilizado nos estudos científicos, por mostrar alta resistência aos agentes antimicrobianos. Ela consegue sobreviver a ambientes desfavoráveis com baixa disponibilidade de nutrientes e oxigênio, pH alcalino em torno de 11.5 e alta variabilidade de temperatura (ALGHAMDI; SHAKIR, 2020).

Del Fabbro et al. (2013) mostram que a *E. faecalis* consegue estabelecer uma infecção extrarradicular de forma direta ao secretar toxinas na região do periápice, ou indireta ao induzir uma reação inflamatória. Os autores dissertam acerca da capacidade dessa bactéria de ganhar e transferir elementos extracromossômicos e codificar traços de virulência, constatando que é possível colonizar o meio com maior facilidade, competir com outras bactérias, crescer como biofilme, resistir a mecanismos de defesa do hospedeiro e produzir mudanças patológicas.

Na forma de biofilme, é capaz de induzir a precipitação de hidroxiapatita formando uma calcificação favorável para resistir aos processos de cicatrização após tratamento endodôntico. Seguindo, a *E. faecalis* tem a habilidade de utilizar os fluidos do ligamento periodontal como fonte nutricional e formar biofilmes nas paredes dentinárias, protegendo-se da resistência do hospedeiro e agentes desinfetantes. Ademais, consegue penetrar profundamente nos túbulos dentinários e se fixar nas fibras colágenas (ALGHAMDI; SHAKIR, 2020).

Segundo Kayaoglu & Orstavik (2004), a *E. faecalis* é resistente aos efeitos antimicrobianos do hidróxido de cálcio, possivelmente pelo fato de possuir um efetivo mecanismo de bomba de prótons que mantém os níveis de pH citoplasmáticos ideais. Os autores discutem também que os principais fatores de virulência são as substâncias de agregação, adesinas bacterianas de superfície, ferormônios sexuais, produção de superóxidos extracelulares e duas enzimas líticas (hialuronidase e gelatinase).

Seguindo, Siqueira & Rôças (2008) têm revelado que, o preparo

químico-mecânico utilizando hipoclorito de sódio em diferentes concentrações não é suficiente para, previsivelmente, tornar os canais radiculares livres de bactérias cultiváveis (40-60% dos canais permanecem com bactérias no seu interior). Além do mais, Janani et al. (2017) apontam que a *E. faecalis* é um dos fatores etiológicos das falhas endodônticas, sendo capaz de formar biofilmes intra e extrarradiculares dificultando a sua remoção por completo. Gabardo et al. (2009) também confirmam que o insucesso do tratamento endodôntico está relacionado com a impossibilidade de esterilizar por completo o sistema de canais radiculares.

Outras estratégias abordadas no mesmo estudo são: a capacidade de aderir às paredes do canal e formar comunidades organizadas em biofilmes; importante para resistir e persistir aos procedimentos antimicrobianos. Elas também conseguem escapar da ação dos instrumentos e dos irrigantes ao se localizarem em ramificações, istmos, interior de túbulos dentinários e outras irregularidades (SIQUEIRA; RÔÇAS, 2008).

Nair et al. (2005) mostram que 88% das raízes mesiais de molares inferiores apresentaram infecção residual, após tratamento endodôntico finalizado em uma consulta. Gabardo et al. (2009) e Haapasalo & Orstavik (1987) explicam que, a manutenção do fator microbiológico ocorre devido à capacidade da contaminação se dar através do esmalte ou do cimento, com a penetração das bactérias ao longo dos túbulos dentinários. O estudo de Siqueira Jr. (2001), também mostrou que istmos, ramificações ou túbulos dentinários podem não ser afetados pelos procedimentos realizados durante a endodontia. Portanto, essas regiões permanecem com uma reserva de nutrientes disponível para as bactérias.

Jhajharia et al. (2015) e Haapasalo & Orstavik (1987) apontam que, essas mesmas zonas exercerão a função de proteção para as bactérias durante a instrumentação do canal radicular. Pois de acordo com os autores, esses microrganismos possuem a capacidade de penetração nos túbulos dentinários à uma profundidade que varia entre 300-400µm após três semanas de incubação, podendo alcançar valores entre 500 e 800µm. Siqueira Jr. (2001) acrescenta que

um outro possível déficit dos tratamentos endodônticos é a inacessibilidade das limas nos tecidos perirradiculares. Explicando-se a permanência de microrganismos nesses locais.

Seguindo, Renovato et al. (2017) afirmam que eliminar microrganismos dos canais radiculares tem sido um desafio para a Endodontia. Inúmeras medidas vêm sendo estudadas para reduzir a quantidade de infecção do canal radicular: diversas técnicas de instrumentação, novos protocolos de irrigação e medicação intracanal. Como visto anteriormente, apenas a instrumentação mecânica não promove uma remoção completa dos microrganismos, para mais, os remanescentes pulparem podem impedir os efeitos antimicrobianos dos irrigantes endodônticos e medicamentos.

Com o passar do tempo, os microrganismos têm desenvolvido mecanismos de resistência às técnicas do preparo químico-mecânico, à medicação intracanal e à medicação sistêmica, permanecendo no canal mesmo após a finalização do tratamento. Sendo assim, uma maior atenção vem sendo direcionada para novos procedimentos que complementem as técnicas endodônticas convencionais e realizem o controle dessa infecção (GABARDO et al., 2009; FIGUEIREDO JR. et al., 2021).

## **1.5 Germinator**

Amaral et al. (2010) afirmam que nos últimos anos, a Endodontia evoluiu significativamente com o desenvolvimento de novas tecnologias, objetivando facilitar a rotina clínica e diminuir o tempo de consulta. Fontes luminosas vêm sendo estudadas como coadjuvante ao tratamento endodôntico convencional. No estudo de Saydjari, Kuypers e Gutknecht (2016), é possível entender que lasers odontológicos podem diminuir a carga bacteriana do sistema de canais radiculares. O desenvolvimento do laser ocorreu na década de 50, sendo utilizado primeiramente no campo da oftalmologia e dermatologia. Na Endodontia, foi utilizado pela primeira vez em 1971, com o objetivo de selar o forame apical.

Existem diversos tipos de lasers disponíveis para uso odontológico, variando o seu comprimento de onda de acordo com o seu propósito. Especificamente na Endodontia, possuem um menor comprimento de onda (630-800nm), sendo a Terapia Fotodinâmica (PDT) a mais conhecida e utilizada. Na PDT é utilizado o laser, sendo o mesmo uma fonte de luz colimada que age de forma local e pontual. É de fácil e rápida aplicação, não desenvolve resistência microbiana e tem seu efeito antimicrobiano se utilizado conjuntamente a um fotossensibilizador (corante azul) (PLOTINO; GRANDE; MERCADE, 2018; AMARAL et al., 2010; JANANI et al., 2017).

Souza et al. (2021), testaram um novo dispositivo de desinfecção ("Germinator"™ por Designs For Vision, Bohemia, NY, EUA) com duas soluções: peróxido de hidrogênio e clorexidina (CHX). Seu objetivo seria reduzir a concentração e o tempo de aplicação dessas soluções, diminuindo, dessa forma, os possíveis efeitos negativos nos tecidos bucais devido às suas toxicidades. Esse protótipo para desinfecção oral permite a fotocatalise através de quatro LEDs com comprimento de onda de 405nm. O LED é uma fonte de luz não colimada que tem sua ação de forma difusa, dessa maneira, sua emissão se propaga pelo tecido.

Souza et al. (2021) utilizaram esse dispositivo para avaliar a influência da radiação não ionizante como foto-catalisador ativo. Como resultado mais relevante, foi visto que a fonte de luz azul, associada ou não a alguma solução, potencializa a descontaminação intra-oral. Especificamente, o Germinator aumentou a capacidade de desinfecção do peróxido de hidrogênio em concentrações de 3% e 1,5%; ainda, mais do que duplicou a eficácia bactericida da clorexidina. O tempo de aplicação da fonte luminosa na pesquisa foi de 3 minutos, sendo o suficiente para potencializar o efeito das soluções, garantindo uma ação antimicrobiana eficaz.

A reação que ocorre entre as soluções estudadas e a fonte luminosa é a fotólise. Fotólise é o processo de degradação de moléculas orgânicas através da radiação luminosa. Esse processo abrange radicais livres, os mesmos vão causar o rompimento de ligações químicas de uma molécula, resultando na

formação de íons. Outras pesquisas também verificaram o potencial antimicrobiano dessa reação na presença do peróxido de hidrogênio. A desinfecção ocorre através do radical hidroxila gerado pela fotólise, oxidando os componentes celulares dos microrganismos como a membrana celular, ácido nucléico, entre outros. Esse efeito bactericida gerado, está diretamente associado com tempo de irradiação e potência da luz utilizada (comprimento de onda e densidade de energia) (SHIRATO et al., 2012; IKAI et al., 2010).

Shirato et al. (2012) acrescentam outro fator importante: a concentração da solução testada. Foi visto anteriormente que, quanto maior a concentração, maior será o efeito oxidativo sob as células. Entretanto, altas concentrações de determinadas substâncias podem causar efeitos adversos no hospedeiro. Sendo assim, ao associarmos uma fonte de luz com as soluções irrigadoras utilizadas no tratamento endodôntico, pode-se ser possível a utilização de concentrações menores e mais seguras. Diminui-se, dessa forma, os possíveis danos aos tecidos do hospedeiro.

Já se sabe que os microrganismos podem se tornar suscetíveis quando expostos a uma fonte luminosa que potencialize a desinfecção. Porém os efeitos dessas novas tecnologias na estrutura dentária devem ser investigados, visando identificar a possibilidade de haver possíveis danos e/ou alterações morfológicas nos túbulos dentinários e na permeabilidade dentinária. Essa investigação se faz importante pois, na presença de modificações negativas nessa estrutura, a capacidade de vedação dos cimentos obturadores pode ser prejudicada, resultando em reinfecções. Ainda, a manutenção e previsibilidade do dente em função pode ser diminuída, resultado da fragilidade da estrutura dentária causada ou não por estes novos dispositivos (LACERDA et al., 2016).

## **1.6 Água Eletroquimicamente Ativada (AE)**

Como visto em outros estudos, já está bem documentado que a *E. faecalis* tem o potencial de sobreviver no sistema de canais radiculares já tratados endodonticamente por longos períodos. Essa bactéria consegue se manter mesmo sem a disponibilidade de nutrientes adicionais ou o suporte metabólico de outras bactérias, podendo provocar uma resposta inflamatória

periapical no hospedeiro. À vista disso, novas técnicas vêm sendo desenvolvidas para melhorar a desinfecção dos canais radiculares (CHEN et al., 2013).

A respeito das soluções irrigadoras utilizadas, o hipoclorito de sódio é considerada a substância de primeira escolha, uma vez que mostra os melhores resultados no processo de desinfecção e possui propriedades antibacterianas consideravelmente importantes. Atualmente, está sendo utilizada, em processos de desinfecção médica e industrial, uma solução denominada água com potencial oxidativo ou água eletroquimicamente ativada (FONSECA et al., 2009).

De acordo com Fonseca et al. (2009) e Hata et al. (2001), essa solução de natureza eletrolítica tem pH variando entre 2.3 e 2.7 e um potencial de oxi-redução (REDOX) maior que 1100mV. Chen et al. (2013) e Hata et al. (2001) explicam que a água com potencial oxidativo é gerada eletroquimicamente através do uso de dispositivos nos quais o ânodo e o cátodo são separados por uma membrana, formando dois compartimentos. A eletrólise de uma solução aquosa de cloreto de sódio tem por objetivo produzir água eletrolisada ácida e oxidativa (baixo pH e alto potencial de oxi-redução) na câmara anódica de uma célula eletroquímica. No compartimento do lado do cátodo, é produzida uma água eletrolisada alcalina e redutora (pH maior que 11 e potencial de oxi-redução de -800mV).

A solução de cloreto de sódio que reage na superfície do ânodo, vai gerar cloro, oxigênio e outros oxidantes reativos que são liberados no fluido. Essa água eletrolítica exibe notável atividade antimicrobiana contra bactérias e vírus. Sua aplicabilidade clínica como irrigante se dá de forma segura, pois ao reagir com substâncias fotossensíveis e/ou orgânicas seu potencial de oxi-redução diminui rapidamente. Ainda, essa solução tem efeito semelhante ao EDTA 15% no que diz respeito à permeabilidade dos túbulos dentinários (HATA et al., 2001).

De acordo com Fonseca et al. (2009), a água eletrolítica tem capacidade de atuar contra a *E. faecalis*, já que bactérias anaeróbias facultativas crescem adequadamente em ambientes alcalinos com potencial de oxi-redução em torno de 300mV. Um potencial de oxi-redução elevado afasta os elétrons da membrana celular, a mesma acaba por se desestabilizar e romper resultando na morte da

célula bacteriana. Os autores também afirmam que a água eletrolisada se apresenta eficaz na remoção de matéria orgânica e inorgânica, podendo ser utilizada para desinfecção de canais radiculares.

Gulabivala et al. (2004) ratificam que, atualmente, existe a necessidade de uma solução irrigadora que possua propriedades antibacterianas, mas que atue brandamente sobre os tecidos vitais realizando o desbridamento da superfície dentinária sem enfraquecer sua estrutura, como foi visto nos estudos com o hipoclorito de sódio. Os autores ainda sugerem que a solução ácida produzida na câmara anódica poderia ser útil para a remoção de detritos e de *smear layer*. Enquanto a solução produzida no lado do cátodo, poderia atuar como detergente sendo considerada biocompatível. A toxicidade reduzida dessas soluções e o baixo impacto nas propriedades físico-químicas da dentina, podem ser vistas como características vantajosas com relação aos tratamentos endodônticos.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

Avaliar *in vitro* os possíveis efeitos na estrutura dentinária de novas tecnologias utilizadas para a desinfecção do sistema de canais radiculares durante o tratamento endodôntico.

## **2. 2 Objetivos Específicos**

Comparar, através da análise de imagens obtidas com Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), as possíveis mudanças no contorno dos túbulos dentinários e na superfície do canal radicular de dentes bovinos, após irrigação com uma solução com potencial oxidativo (Água Eletrolisada Ativada com ácido hipocloroso/AE) e hipoclorito de sódio 2,5% associadas, ou não, ao Germinator.

## **3 METODOLOGIA**

Dissertação de Mestrado desenvolvida para o uso de uma fonte de luz azul

com baixo comprimento de onda como estratégia antimicrobiana contra o biofilme de *Enterococcus faecalis*. A mesma foi encaminhada à Comissão de Pesquisa do Instituto de Ciências da Saúde (ICBS) (COMPESQ) sob número 34070. (Anexo 1)

### 3.1 Seleção e Preparo das Amostras

Para o presente estudo 56 incisivos inferiores bovinos, unirradiculares e maduros foram selecionados após a extração com alavancas e fórceps. Os mesmos, foram armazenados em água destilada até serem utilizados (Figura 1).

**Figura 1:** incisivos bovinos maduros após a extração e armazenagem.



**Fonte:** Kellyn Rocca Souza, 2021.

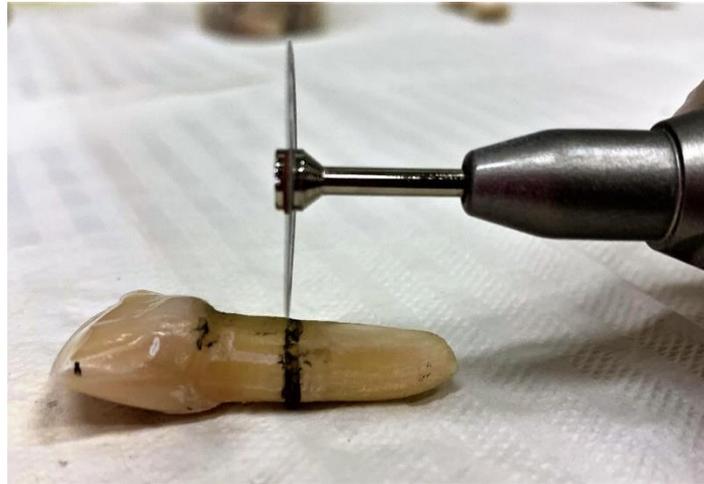
Os critérios para que os dentes selecionados fossem incluídos no estudo foram: canais predominantemente retos que apresentassem diâmetros semelhantes e ideais para a realização do trabalho e formação completa do ápice radicular. Os critérios de exclusão foram dentes decíduos, dentes com desenvolvimento incompleto, qualquer tipo de fratura ou dilacerações apicais.

### 3.2 Limpeza e Esterilização dos Dentes

Após a seleção das amostras, a limpeza da superfície externa dos dentes foi realizada através de raspagem radicular. O ligamento periodontal remanescente aderido às raízes foi removido com cureta periodontal do tipo *Gracey* nº 1/2, 3/4 e 5/6 (*Neumar Instrumentos Cirúrgicos Ltda* - Brasil) e lâmina de bisturi nº 12. Após a raspagem radicular, as amostras foram lavadas em água corrente durante um minuto e a secagem foi realizada em temperatura ambiente.

A coroa dos dentes foi removida abaixo da junção amelocementária de forma perpendicular ao longo eixo do dente com o auxílio de um disco diamantado (*KG Sorensen Indústria e Comércio Ltda.*, Barueri, São Paulo, Brasil) acoplado à peça reta de mão (*Kavo Kerr*), dessa forma, todas as raízes mantiveram o mesmo comprimento de 16mm (Figura 2).

**Figura 2:** remoção da coroa abaixo da junção amelocementária.



**Fonte:** Kellyn Rocca Souza, 2021.

Ainda, com o auxílio de peça reta de mão, foram realizados sulcos no sentido longitudinal das faces vestibular e lingual das amostras, com profundidade suficiente para que no fim do experimento pudessem ser clivadas com maior facilidade em duas hemisseções, porém tendo o cuidado para que o interior do canal radicular não fosse atingido. Os mesmos discos diamantados dupla face foram utilizados para a confecção dos sulcos (*KG Sorensen Indústria e Comércio Ltda.*, Barueri, São Paulo, Brasil) (Figura 3). As amostras foram clivadas para que, posteriormente, fossem analisadas através da Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).

**Figura 3:** incisivo bovino após confecção dos sulcos longitudinais.



**Fonte:** Kellyn Rocca Souza, 2021.

Para a exploração e desobstrução dos canais radiculares, limas manuais do tipo K (Dentsply Sirona Maillefer, Catanduva, São Paulo - SP) de 21mm e calibradas em 16mm foram utilizadas. Para canais mais calibrosos, foram selecionadas limas tipo K de calibre 20, enquanto nos canais de menor calibre, utilizou-se as limas tipo K #10.

Finalizada a exploração dos canais radiculares, uma pequena quantidade de cera utilidade New Max U (Technew Comércio e Indústria Ltda, Quintino Bocaiuva, RJ, Brasil) foi fixada na região correspondente ao ápice proporcionando um vedamento apical (Figura 4). Este bloqueio apical, permitiu que fosse possível realizar o protocolo de irrigação dos dentes. As amostras foram acopladas em um torno de bancada de forma que as faces sulcadas ficassem perpendicularmente presas aos dentes da morsa e sob a mesma, foi disposto um recipiente para coleta dos resíduos (água, soluções, resíduos orgânicos).

**Figura 4:** incisivos bovinos com cera utilidade fixada no ápice radicular.



**Fonte:** Kellyn Rocca Souza, 2021.

Todos os dentes receberam um protocolo de irrigação adaptado para a desinfecção dos canais radiculares, sem que causasse alterações na superfície: protocolo de Grundling et al. (2011). Insertos ultrassônicos Helse E1 Irrisonic (Helse, Santa Rosa de Viterbo, SP, Brasil) foram utilizados para a ativação das amostras. O inserto foi posicionado a 3mm do comprimento de trabalho (16mm) e acionados com potência correspondente a um terço do equipamento (SybronEndo, São Paulo, Brasil).

O protocolo de Grundling et al. (2011) utilizado para a limpeza das amostras foi composto por uma irrigação inicial com água destilada (Asfer, São Caetano do Sul, São Paulo, São Paulo, Brasil) e ativação por um tempo de três segundos. Após, a irrigação foi realizada com hipoclorito de sódio 2,5% (Soda Clorada Asfer 2,5%, Dental Marc, Caxias do Sul, Rio Grande do Sul, Brasil) e novamente ativada por três segundos. Seguiu-se, utilizando EDTA trissódico a 17% (Iodontec Indústria e Comércio de Produtos Odontológicos Ltda, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil) e ativação por três segundos. O protocolo foi repetido por três vezes (Figura 5). Para a lavagem final, foi utilizada água destilada. A secagem dos dentes foi realizada em temperatura ambiente.

**Figura 5:** organização da mesa de materiais utilizados para o protocolo de irrigação.



Fonte: Kellyn Rocca Souza, 2021.

Em seguida, os dentes descoronados foram posicionados em microtubos de 1,5ml (Kasvi, São José dos Pinhais, Paraná, Brasil) com a porção cervical para

cima, objetivando minimizar os riscos de contaminação e facilitar as trocas do meio de cultura. O preparo dos tubos para receber as amostras foi realizado da seguinte maneira: um pequeno orifício foi realizado no centro das tampas dos microtubos com auxílio de um instrumento aquecido em chama. Nesse orifício, os dentes foram posicionados e, posteriormente, tiras de Fita Micropore Nexcare (3M, Sumaré, São Paulo, Brasil) foram utilizadas ao redor da tampa para fixar de forma adequada o dente e também diminuir as chances de uma possível contaminação. Ao lado do orifício central, foram confeccionados mais dois orifícios laterais de menor tamanho com agulha descartável para irrigação (Injex 21G, Ourinhos, São Paulo, Brasil), esses orifícios foram utilizados para as trocas do meio de cultura (Figura 6).

**Figura 6:** dentes posicionados em microtubos com Fita Micropore.



**Fonte:** Kellyn Rocca Souza, 2021.

O conjunto microtubo/dente foi posicionado em caixas de polipropileno (Heathrow Scientific, Vernon hills, Illinois, EUA), as mesmas foram individualmente embaladas em papel grau para autoclave (Hospflex, Sorocaba, São Paulo, Brasil), em seguida, esterilizadas em autoclave vertical (Laboratório de Imunologia e Microbiologia da Escola de Ciências da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul) (Figura 7). O tempo de esterilização das amostras ocorreu em um ciclo de 15 minutos à temperatura de 120°C.

**Figura 7:** microtubos posicionados nas caixas e prontos para esterilização.



**Fonte:** Kellyn Rocca Souza, 2021.

Antes da inoculação das amostras, as mesmas passaram por um teste de esterilidade utilizando cones de papel estéreis (Pontas de papel absorventes 15-40 e 45-80, Diadent/TDK, Dental Web, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil). Essas pontas foram introduzidas no interior do canal radicular e, logo após, foram transferidas para um tubo contendo 3ml de BHI (Figura 8). Esses tubos foram incubados a uma temperatura de 37°C por um período de 24 horas. O teste de esterilidade foi realizado em todas as amostras. Nenhum tipo de crescimento bacteriano foi detectado no caldo dos tubos após o teste de esterilidade, sendo assim as amostras passaram para a etapa de inoculação da bactéria.

**Figura 8:** tubos contendo caldo BHI após teste de esterilidade.



**Fonte:** Kellyn Rocca Souza, 2021.

### 3.3 Preparo da Cultura

O *Enterococcus faecalis* foi a cepa bacteriana selecionada para a realização

deste trabalho (ATCC 29212). O preparo do inóculo foi realizado a partir de estoque -20, cultivado em uma alíquota de 200ul em 3ml de caldo BHI e incubado por um período de 24 horas no Laboratório de Imunologia e Microbiologia da Escola de Ciências da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Em seguida, uma alíquota de 200ul foi retirada e cultivada novamente em um novo caldo BHI de 3ml sendo incubada novamente por 24 horas.

As estirpes de *E. faecalis* foram cultivadas em um caldo de infusão de cérebro e coração (BHI) por 24 horas posicionado em shaker. Posteriormente, foi realizado teste de coloração Gram verificando se havia contaminação. Após a confirmação do teste para contaminação negativa, o cultivo foi mantido em estufa a 37°C até seu uso. Os *E. faecalis* foram cultivados no Laboratório de Imunologia e Microbiologia da Escola de Ciências da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUC-RS) em meio BHI contendo 1% de tripticase (BBL, Cockeysville, MD), 1% de proteose peptone (Difco, Detroit, MI), 0,5% de extrato de levedura (Difco, Detroit, MI), 0,5% de cloreto de sódio, 5mg/mg de hemina e 0,5% mg/ml de vitamina K suplementado com 0,2% de glicose a 37°C durante 24 horas (TAKAHASHI, et al. 1997).

### **3.4 Inoculação das Amostras**

Nos microtubos, a cultura de *Enterococcus faecalis* foi adicionada de forma igualitária dentro do canal de cada amostra (quantidade correspondente a 100ul do inóculo inicial) através do orifício central havendo dessa forma possibilidade para o desenvolvimento de biofilme (Figura 9). Ainda, foi acrescentado caldo BHI através dos orifícios laterais até que toda a extensão do dente ficasse submersa. No grupo controle negativo, foi introduzido apenas o caldo de BHI sem a presença de *E. faecalis*. As caixas com os microtubos dentro foram envoltas com plástico filme e levadas à incubação em estufa a 37°C até a nova troca de meio.

**Figura 9:** adição da cultura de *E. faecalis* no interior do canal radicular pelo orifício central.



**Fonte:** Kellyn Rocca Souza, 2021.

A cada 48 horas, a troca do meio de cultivo foi realizada com o auxílio de agulhas descartáveis para irrigação e seringas descartáveis luer lock de 5ml (Injex, Ourinhos, São Paulo, Brasil). Primeiramente foi realizado o preparo do local de trabalho (capela de fluxo laminar): descontaminação com álcool 70% da superfície da capela e luz ultravioleta (germicida) acionada por um período de 15 minutos. Pretendeu-se criar uma área o mais estéril possível para o manuseio dos materiais biológicos, evitando a contaminação das amostras e garantindo a segurança no momento da manipulação das mesmas (Figura 10).

**Figura 10:** troca do meio de cultivo em capela de fluxo laminar.



**Fonte:** Kellyn Rocca Souza, 2021.

Como cada grupo (caixa) possuía 8 amostras, durante a troca de meio, a

cada 4 amostras a agulha e a seringa eram substituídas com o propósito de diminuir as chances de contaminação. Totalizando assim, duas agulhas e duas seringas por grupo (caixa). A maior quantidade de caldo BHI possível (em média 2/3) foi removida através dos orifícios laterais confeccionados nas tampas dos microtubos, e descartada; um novo meio de cultura foi inserido pelo mesmo local (Figura 11). As amostras em seguida foram novamente embaladas em plástico filme e levadas à estufa na mesma temperatura de 37°C por mais 48 horas, até a próxima troca por um período de 7 dias. A renovação do meio era sempre realizada na segunda, quarta e sexta-feira (figura 11).

**Figura 11:** troca de meio de cultivo pelo orifício lateral do microtubo.



Fonte: Kellyn Rocca Souza, 2021.

Durante cada troca de meio, uma gota do material de cada grupo foi coletada do interior do microtubo e disposta em uma placa de ágar sangue. As 7 placas foram levadas à estufa a 37°C por um período de 48 horas, após esse período, foi realizada uma avaliação visual, coleta e análise de Gram. Para a análise das placas de ágar sangue, foram coletadas amostras com auxílio de uma alça aquecida e estéril, posteriormente, foram depositadas em lâminas de vidro, coradas com a técnica de Gram e analisadas em microscópio (objetiva de 100x). Essa análise objetivou verificar se houve o crescimento de bactérias do tipo estreptococos ausentes de contaminação.

### **3.5 Classificação dos Grupos de Tratamento**

As amostras foram numeradas de 1 a 56 e divididas de forma randomizada em 7 grupos, totalizando 8 amostras por grupo:

**GRUPO 1:** controle negativo - para fins de comprovação de ausência de áreas erosivas, modificações nos túbulos dentinários e crescimento bacteriano, as amostras não foram inoculadas e não receberam nenhum tipo de tratamento;

**GRUPO 2:** controle positivo - *E. faecalis* + BHI. Não receberam nenhum tipo de tratamento;

**GRUPO 3:** *E. faecalis* + BHI + AE;

**GRUPO 4:** *E. faecalis* + BHI + AE + Germinator;

**GRUPO 5:** *E. faecalis* + BHI + NaOCl 2,5%;

**GRUPO 6:** *E. faecalis* + BHI + NaOCl 2,5% + Germinator;

**GRUPO 7:** *E. faecalis* + BHI + Germinator.

Todos os grupos foram, após a realização dos procedimentos, analisados através de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).

### **3.6 Tratamentos Aplicados nos Grupos**

Após o período de cultivo de 7 dias, as amostras foram removidas dos microtubos com o auxílio de uma pinça mosquito (Golgran, São Caetano do Sul, São Paulo, Brasil) (figura 12). Novamente, cera utilidade foi fixada no ápice de cada raiz (vedamento apical) e, as mesmas, foram acopladas no torno de bancada.

**Figura 12:** capela de fluxo laminar pronta para a aplicação dos protocolos de tratamento.



**Fonte:** Kellyn Rocca Souza, 2021.

O protocolo de irrigação foi realizado da mesma forma nas amostras dos grupos G3, G4, G5 e G6: 3 ciclos de irrigação com a solução pertencente a cada grupo; sendo que cada ciclo tinha a duração de 3 segundos. A agulha irrigadora foi inserida 3mm aquém do comprimento de trabalho. Durante a irrigação, foi realizado movimento de vai e vem. Durante o protocolo de irrigação, o canal ficou inundado com a solução pertencente ao seu grupo de tratamento, sendo o tempo de contato entre a solução irrigadora e o canal radicular de um minuto e meio.

As amostras pertencentes ao Grupo 3 receberam um protocolo de desinfecção com Água Eletrolisada com Ácido Hipocloroso (Dentaqua, São Francisco, Estados Unidos). As amostras do Grupo 4 receberam o mesmo protocolo de irrigação com a mesma solução do Grupo 3, porém acrescido da aplicação de uma fonte luminosa de comprimento de onda de 405nm ("Germinator"), antes e após a irrigação, durante três minutos, totalizando seis minutos com o dispositivo acionado sobre as amostras.

As amostras do Grupo 5 receberam irrigação com Hipoclorito de Sódio 2,5% e as amostras do Grupo 6 também foram irrigadas com a mesma solução no mesmo período de tempo, entretanto receberam a aplicação do Germinator, antes e após a irrigação, por três minutos. As amostras do Grupo 7 receberam a aplicação de luz durante 3 minutos, foram preenchidas com água destilada e, novamente, uma nova aplicação com a fonte luminosa foi realizada no mesmo

período de tempo.

### 3.7 Água Eletrolisada (AE) com Ácido Hipocloroso

A Água Eletrolisada com Ácido Hipocloroso utilizada no presente estudo foi obtida através do equipamento Dentaqua Dw-8 (figura 13). Este equipamento foi fornecido pela empresa Dentaqua, situada em São Francisco, EUA, para a realização do experimento. Os procedimentos foram realizados no laboratório de Imunologia e Microbiologia da Escola de Ciências da PUC-RS.

**Figura 13:** equipamento Dentaqua Dw-8.



**Fonte:** Kellyn Rocca Souza, 2021.

A formulação do ácido hipocloroso foi manipulada conforme as instruções do fabricante, sendo descrita como “brine”. Essa solução é composta por 450ml de água deionizada, 50ml de cloreto de sódio e 25ml de ácido clorídrico 9%. O equipamento foi operado conforme as indicações do fabricante, descritas no manual de uso.

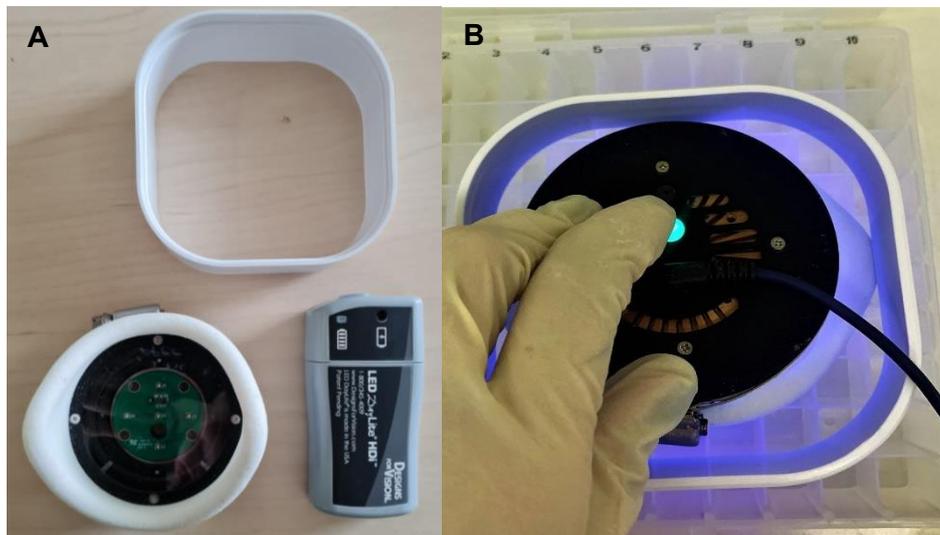
### 3.8 Germinator

A fonte de luz utilizada no estudo foi adquirida através de um dispositivo protótipo chamado de “Germinator” (“Germinator” by Desing For Vision, Bohemia, Nova York, EUA). Por intermédio dos 4 LEDs presentes no dispositivo, foi possível realizar uma reação de fotocatalise com comprimento de onda de 405nm.

Esse aparelho de desinfecção é composto pelo protótipo do protetor bucal e o Power Pack (figura 14A). Uma extremidade do cabo conector é conectada ao micro-USB e a outra extremidade no conector USB da fonte de alimentação. O botão power deve ser pressionado para ligar o aparelho, o mesmo deve estar configurado da seguinte maneira: alta potência (400mA), emitindo luz LED.

O protótipo, ao ser utilizado, foi posicionado sobre os dentes que estavam com a porção cervical voltada para cima (figura 14B). A irradiação luminosa ocorreu durante 3 minutos, após, o protótipo foi desligado, concluindo o protocolo de descontaminação de acordo com cada grupo.

**Figura 14:** (A) Germinator e Power Pack. (B) Germinator posicionado sobre a região cervical das amostras.

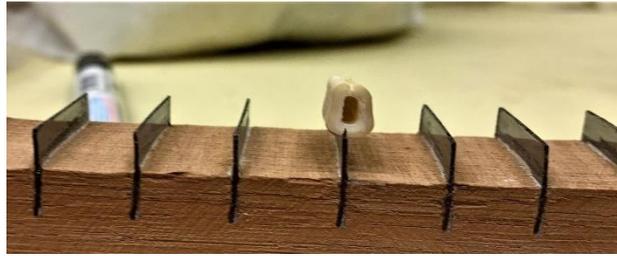


Fonte: Kellyn Rocca Souza, 2021.

### 3.9 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Após a clivagem dos dentes executada através de um protótipo de madeira (figura 15), realizou-se a análise em Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). As amostras permaneceram por 7 dias em solução de glutaraldeído a 2,5% (Glicolabor – Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil). Através da imersão em soluções de acetona em concentrações de 10, 30, 50, 70, 90 até 100% foram desidratadas e secas usando uma ponta de papel (Pontas de papel absorventes 15-40 e 45-80, Diadent/TDK, Dental Web, Porto Alegre- RS), em uma superfície com a porção do canal voltada para cima.

**Figura 15:** clivagem dos dentes no protótipo de madeira.



**Fonte:** Kellyn Rocca Souza, 2021.

A Microscopia Eletrônica de Varredura foi realizada no Centro de Microscopia e Microanálises da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUC – RS) (figuras 16 e 17). As amostras foram cobertas com aproximadamente 30nm de espessura de liga ouro/paládio (Emitech K650 Sputter Coater, London, England), em máquina Sputter Coater BAL-TEC SCD 005 (BAL-TEC AG, Liechtenstein, Alemanha), a um nível de vácuo de aproximadamente  $5 \times 10^{-2}$  mbar.

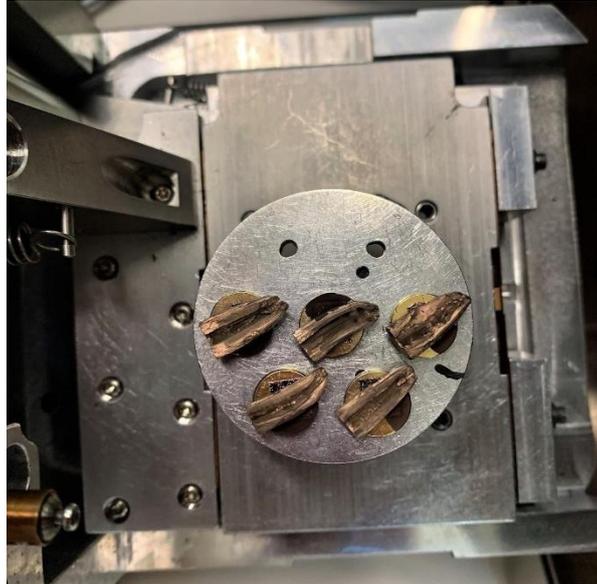
**Figura 16:** hemisecções prontas para análise em MEV.



**Fonte:** Kellyn Rocca Souza, 2021.

As observações em Microscopia Eletrônica de Varredura (XL 30; Philips, Eindhoven, Netherlands) foram realizadas com magnificação de 500x, 5.000x, 10.000x e 20.000x. Para avaliação foram utilizadas as magnificações de 5.000x e 10.000x por apresentarem uma melhor visualização da superfície do canal radicular. As regiões de avaliação foram padronizadas: entre terço cervical e médio (zona A) e terço médio e apical (zona B). O objetivo foi analisar o canal principal e os túbulos dentinários, sendo realizada uma análise observacional descritiva por um pesquisador experiente e cego com relação aos grupos de tratamento.

**Figura 17:** amostras para análise em MEV.



**Fonte:** Kellyn Rocca Souza, 2021.

Após a clivagem dos dentes, as amostras foram fixadas no glutaraldeído à 2,5% durante 7 dias. A utilização do glutaraldeído, justifica-se pelas suas propriedades de penetração e por precipitar imediatamente as substâncias proteicas da célula. Sendo assim, é possível uma preservação adequada da estrutura dentinária. É indicado como fixador para microscopia eletrônica, podendo ser recomendado para boa parte dos tecidos animais e vegetais. Quando o objetivo é aumentar a rigidez do espécime, o tempo de ação do fixador pode variar de algumas horas a vários dias (DE CASTRO, 2002).

Após os sete dias de fixação, as amostras de cada grupo foram para análise em Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). A microscopia eletrônica se mostra como uma importante ferramenta na investigação da microestrutura de diversos tipos de superfície. A região analisada é irradiada por um fino feixe de elétrons sob condições de vácuo, como resultado inúmeras radiações são emitidas. Elétrons secundários e retroespalhados, vão gerar informações a respeito do relevo da superfície em alta resolução e sobre a composição química respectivamente. Já os sinais de raios- X específicos dos elementos que os geraram, vão apresentar informações qualitativas e quantitativas da composição elementar da amostra analisada. A imagem gerada irá representar em tons de cinza o mapeamento e a contagem de elétrons emitidos pelo material analisado (DUARTE et al., 2003; SOARES; SARON, 2010).

A cobertura com a liga ouro/paládio aplicada nas amostras consiste na metalização das mesmas, ou seja, realiza-se uma precipitação de uma película micrométrica de material condutor (no caso, o ouro) possibilitando a condução da corrente elétrica. A magnificação obtida com as imagens geradas pela microscopia eletrônica de varredura, proporcionou uma observação mais detalhada da superfície do canal radicular. Além disso, com a MEV, tem-se uma facilidade no preparo das amostras, rapidez na aquisição de dados e, por não ser um método destrutivo, as mesmas podem ser arquivadas para estudos posteriores ou direcionadas para outras análises se necessário (DUARTE et al., 2003).

As observações em MEV foram analisadas em duas regiões do canal radicular: entre terços cervical e médio e entre terços médio e apical. As imagens mais representativas dessas regiões foram salvas e analisadas. Objetivou-se verificar as mudanças na estrutura dentinária após o tratamento aplicado, sendo possível comparar a presença ou não de erosão em cada grupo testado.

### **3.10 Análise Estatística**

As médias atribuídas às alterações morfológicas da superfície do canal radicular dos grupos tratados foram avaliados pelo teste de Kruskal-Wallis, seguido por post-hoc de Mann Whitney. Ainda foi realizada uma comparação entre os grupos tratados, os dados relativos a essa comparação foram submetidos ao teste de Mann-Whitney. O mesmo teste também serviu para avaliar a comparação entre regiões de uma mesma amostra: comparou-se a região entre terço cervical e médio (zona A) com a região entre terço médio e apical (zona B).

Todos os testes foram realizados no Software SPSS (versão 21.0, IBM Corp, Somers, NY) a um nível de significância de 1%.