

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

FERNANDA HOFFMANN BUSANELLO

Análise do comportamento de um biofilme dual-espécie frente à ação do hipoclorito de sódio 2% e avaliação da influência de sua estrutura na ação química do hipoclorito de sódio, da clorexidina e do EDTA: um estudo *in vitro*.

Porto Alegre

2017

FERNANDA HOFFMANN BUSANELLO

Análise do comportamento de um biofilme dual-espécie frente a ação do hipoclorito de sódio 2% e avaliação da influência de sua estrutura na ação química do hipoclorito de sódio, da clorexidina e do EDTA: um estudo *in vitro*.

Linha de Pesquisa:

Biomateriais e Técnicas Terapêuticas em Odontologia

Tese apresentada ao Programa de Pós Graduação em Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito obrigatório para a obtenção do título de Doutora em Odontologia, área de concentração Clínica Odontológica – Endodontia.

Orientador: Prof. Dr. Marcus Vinícius Reis Só

Porto Alegre

2017

CIP - Catalogação na Publicação

Hoffmann Busanello, Fernanda

Análise do comportamento de um biofilme dual-espécie frente à ação do hipoclorito de sódio 2% e avaliação da influência de sua estrutura na ação química do hipoclorito de sódio, da clorexidina e do EDTA: um estudo in vitro. / Fernanda Hoffmann Busanello. -- 2017.

73 f.

Orientador: Marcus Vinícius Reis Só.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Odontologia, Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Porto Alegre, BR-RS, 2017.

1. Endodontia. 2. Soluções Irrigadoras. 3. Biofilmes. 4. Viscoelasticidade. I. Reis Só, Marcus Vinícius, orient. II. Título.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Narciso Francisco Busanello e Rosita Maria Hoffmann Busanello, pelo exemplo familiar, pelo apoio incondicional, pelo incentivo à minha formação profissional e serem tão presentes na minha vida.

Ao meu marido, Heraldo Luis Dias da Silveira, pelo amor, pelo exemplo de dedicação e empenho, por compartilhar desde as mais simples tarefas diárias até as mais complexas discussões acadêmicas.

Ao meu irmão, Márcio Hoffmann Busanello, pelo companheirismo, pela amizade, por compartilhar as experiências profissionais e compreender minha ausência na prática clínica.

AGRADECIMENTOS

Ao meu grande mestre, professor orientador Dr. Marcus Vinícius Reis Só, pela honra de poder integrar seu grupo de pesquisa. Primeiramente, pela confiança em receber-me como orientada e pela amizade estabelecida. Pelo constante incentivo e por não medir esforços para possibilitar a experiência do Estágio de Doutorado Sanduíche no exterior. Pela constante orientação e dedicação, mesmo que, durante um longo período, à distância. Pelas opiniões justas e sinceras, que nortearam esta caminhada e o desenvolvimento das minhas habilidades docentes. Por compartilhar constantemente todo seu conhecimento, pelo incentivo ao aprendizado e pela convivência alegre que acompanha toda esta trajetória.

Ao co-orientador Dr. Luc van der Sluis pela excelente recepção na cidade de Groningen e orientação durante o estágio de doutorado sanduíche. Por possibilitar a experiência imensurável de desenvolver esta tese em um ambiente acadêmico diferente, pela oportunidade aprimorar meus conhecimentos clínicos na área de Endodontia e desenvolver habilidades científico-metodológicas.

Ao Conselho Nacional Científico e Tecnológico (CNPq) - Ministério de Ciência e Tecnologia pela concessão da bolsa de doutorado sanduíche no exterior.

À University Medical Center Groningen, pelo estabelecimento da parceria institucional com a Faculdade de Odontologia UFRGS. Pela disponibilidade de uma imensa estrutura, composta por clínicas odontológicas, ambulatórios, laboratórios compostos pelos os mais modernos equipamentos utilizados em pesquisa.

Aos professores Dr. Régis Burmeister dos Santos e Dr^a. Patrícia Maria Poli Kopper Morá pelas excelentes contribuições na etapa de defesa do projeto de tese, auxiliando no elencamento de questões primordiais para o desenvolvimento das metodologias propostas.

Aos professores Dr. Francisco Montagner e Dr. Fernando Branco Barletta pelo prestígio da composição de banca da prova de qualificação deste curso, pela troca de experiências e pela oportunidade de aprendizado.

Aos professores da Radiologia Odontológica, Dr^a Heloísa Emília Dias da Silveira, Dr^a Mariana Boessio Vizzotto e Dr^a Nádia Assein Arús, pelo constante apoio e companheirismo.

Ao colega René J.B. Dijkstra, pela amizade, pela convivência harmônica e pelo intenso auxílio e contribuição laboratorial nas etapas metodológicas de desenvolvimento desta tese. Pelo constante e incontestável apoio durante a minha estadia na cidade de Groningen.

Ao professor Dr. Prashant K. Sharma, pelas incansáveis explicações que facilitaram o meu entendimento sobre o Teste de Resistência à Baixa Compressão por ele idealizado e utilizado para análise de biofilmes nesta tese, desde a execução dos testes à interpretação de resultados obtidos.

Aos queridos colegas Rafael Pillar e Xenos Petridis, também alunos de doutorado com quem compartilhei experiências incríveis durante o estágio de doutorado sanduíche. Pelo cooperativismo e auxílio mútuo nas constantes e cansativas tarefas laboratoriais, intensa parceria.

Aos colegas e professores de Endodontia da Faculdade de Odontologia UFRGS pelo convívio, troca de experiências e constante aprendizado.

Muito Obrigada!

RESUMO

Este estudo teve dois objetivos principais. Primeiro, investigar a influência da estrutura do biofilme no efeito antimicrobiano de três irrigantes endodônticos: hipoclorito de sódio (NaOCl) 2%, clorexidina (CHX) 2% e ácido etilenodiamino tetracético (EDTA) 17%. Segundo, avaliar o efeito químico de NaOCl 2% sob diferentes tempos e volumes, aplicados em um biofilme padronizado com uma superfície de contato realista. Na primeira parte do estudo, *S. oralis* J22 e *A. naeslundii* T14V-J1 foram cultivados em discos de hidroxiapatita revestidos com saliva, em três diferentes condições de crescimento: biofilmes com crescimento estático em ambientes confinados durante dez dias (10SB) e quatro dias (4SB) (biofilmes ricos em água) e biofilmes crescidos por compactação durante quatro dias (CDFFB) (biofilmes ricos em células). NaOCl 2%, CHX 2% e EDTA 17% e tampão adesivo (controle) foram aplicados com volume de 20 µl durante 60 segundos. As espécimes foram analisadas previamente por Tomografia de Coerência Óptica e, após a aplicação de antimicrobianos, avaliados por meio do Teste de Resistência à Baixa Compressão, Tomografia de Coerência Óptica, e Microscopia Confocal a Laser. Na segunda parte da investigação, *S. oralis* J22 e *A. naeslundii* T14V-J1 foram crescidos por compactação durante quatro dias em discos de hidroxiapatita revestidos com saliva (biofilmes ricos em células). As amostras foram analisadas previamente por Tomografia de Coerência Óptica. NaOCl 2% foi aplicado sobre a superfície dos biofilmes em quantidades de 20 µl e 40 µl durante os períodos de 60, 120 e 300 segundos e um tampão adesivo foi aplicado em quantidade de 20 µl por 60 segundos (controle). Após a aplicação das soluções, biofilmes foram avaliados por meio do Teste de Resistência à Baixa Compressão, Tomografia de Coerência Óptica, e Microscopia Confocal a Laser. Os resultados do estudo mostraram uma maior redução de altura da camada rígida de biofilme com a aplicação do NaOCl 2% em 4SB e 10SB do que CDFFB ($p = .028 / .016$) Biofilmes desafiados com CHX apresentaram contração estrutural, com maior intensidade em CDFFB ($p=0,05$) e maior quantidade de substâncias poliméricas extracelulares ($p=0,03$). Após a aplicação de EDTA 17%, os biofilmes de CDFF mostraram uma redução de altura ($p = 0,022$). Com relação aos diferentes volumes e períodos de tempos de aplicação de NaOCl 2%, observou-se que, com 20µl, não houve diferença significativa entre 60 e

120 segundos ($p = 0,086$). Após 300 segundos, dissolveu-se uma espessura maior de camada rígida da estrutura do biofilme em comparação com 120 segundos ($p = 0,017$). Ao se aplicar 40 μ l, observou-se que a altura da camada rígida do biofilme foi significativamente reduzida após 120 ($p = 0,028$) e 300 ($p = 0,013$) segundos em comparação com 60 segundos e a camada de superficial do biofilme remanescente foi significativamente maior após 300 s em comparação com 60 segundos ($p = 0,013$). A partir desse estudo, pode-se concluir que a Tomografia de Coerência Óptica apresenta-se como um método interessante, não invasivo, em tempo real, que permite avaliar a estrutura dos biofilmes antes e após a aplicação de soluções antimicrobianas. A estrutura do biofilme exerce uma influência sobre o efeito de diferentes antimicrobianos, os quais podem apresentar um efeito sobre o biofilme remanescente. Ainda, os aspectos do tempo de aplicação e do volume de irrigante devem ser levados em consideração na elaboração de estratégias efetivas para dissolver e interromper a estrutura do biofilme e / ou influenciar a estrutura do biofilme remanescente.

Palavras-chave: biofilmes, soluções irrigadoras, visco-elasticidade, tomografia por coerência óptica.

ABSTRACT

This study had two main objectives. First, to investigate the influence of the biofilm structure on the antibiofilm effect of three endodontic irrigants: 2% sodium hypochlorite (NaOCl), 2% chlorhexidine (CHX) and ethylenediaminetetraacetic acid 17% (EDTA). Second, to evaluate the chemical effect of 2% NaOCl under different times and volumes, applied on a standardized biofilm with a realistic contact surface. In the first part of the study, *S. oralis* J22 and *A. naeslundii* T14V-J1 were cultured on saliva-coated hydroxyapatite discs under three different growth conditions: static growth biofilms in confined environments for 10 days (10SB) and four days (water-rich biofilms) and biofilms grown under compression for four day (CDFFB) (cell-rich biofilms). 2% NaOCl, 2% CHX and 17% EDTA and adhesion buffer (control) were applied with a volume of 20 μ l for 60 seconds. The specimens were previously analyzed by Optical Coherence Tomography and, after the application of antimicrobials, evaluated by the Low-load Compression Tester, Optical Coherence Tomography, and Confocal Laser Scanning Microscopy. In the second part of the investigation, *S. oralis* J22 and *A. naeslundii* T14V-J1 were grown by compaction for four days on saliva-coated hydroxyapatite discs (cell-rich biofilms). The samples were previously analyzed by Optical Coherence Tomography. 2% NaOCl was applied on the surface of the biofilms with amounts of 20 μ l and 40 μ l during the 60, 120 and 300 second periods and an adhesive buffer was applied in amount of 20 μ l for 60 seconds (control). After application of the solutions, biofilms were evaluated through the Low Compression Resistance Test, Optical Coherence Tomography, and Laser Confocal Microscopy. The results of the study showed a greater reduction of height of the rigid layer of biofilm with the application of 2% NaOCl in 4SB and 10SB than CDFFB ($p = .028 / .016$) Biofilms challenged with CHX presented structural contraction, with greater intensity in CDFFB ($p = 0.05$) and higher amount of extracellular polymer substances ($p = 0.03$). After application of 17% EDTA, CDFF biofilms showed a decrease in height ($p = 0.022$). Regarding the different volumes and periods of application time of 2% NaOCl, it was observed that, with 20 μ l, there was no significant difference between 60 and 120 seconds ($p = 0.086$). After 300 seconds, a greater thickness of rigid layer of the biofilm structure was dissolved compared to 120 seconds ($p = 0.017$). When applying 40 μ l, it was observed that the height of the rigid layer of the biofilm was significantly reduced after 120 ($p = 0.028$)

and 300 ($p = 0.013$) seconds compared to 60 seconds and the remaining biofilm surface layer was significantly larger After 300 s compared to 60 seconds ($p = 0.013$). From this study, it can be concluded that Optical Coherence Tomography presents as an interesting, non-invasive, real-time method that allows the biofilms structure evaluation before and after the application of antimicrobial solutions. The biofilm structure exerts an influence on the effect of different antimicrobials, which may have an effect on the remaining biofilm. In addition, aspects of application time and irrigant volume should be taken into account when devising effective strategies to dissolve and disrupt the biofilm structure and / or influence the structure of the remaining biofilm.

Keywords: biofilms, irrigant solutions, visco-elastic, optical coherence tomography.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CDFF – *Constant-depth Film Fermentor*

CHX – Clorexidina

EDTA – Ácido etilenodiamino tetracético

HA – Hidroxiapatita

IC – Irrigação Convencional

LLCT – *Low-Load Compression Tester*

MCL – Microscopia Confocal a Laser

mm – milímetro

NaOCl – Hipoclorito de Sódio

PEC – Polímeros Extracelulares

PIPS – *photon initiated photoacoustic streaming*

PPCF – *Parallel-Plate Flow Chamber*

s – segundo

TCO – Tomografia de Coerência Óptica

UMCG – *University Medical Center Groningen*

µm – micrômetro

µl – microlitro

% – por cento

SUMÁRIO

1 APRESENTAÇÃO	11
2 REVISÃO DE LITERATURA	13
2.1 BIOFILMES BACTERIANOS.....	13
2.1.1 Quem são e qual a sua composição química?.....	13
2.1.2 Crescimento do Biofilme.....	14
2.1.3 Propriedades Viscoelásticas.....	14
2.2 BIOFILMES ENDODÔNTICOS.....	16
2.3 REMOÇÃO DO BIOFILME ENDODÔNTICO.....	17
2.3.1 O papel das substâncias químicas.....	17
2.3.2 A importância dos meios físicos.....	18
2.4 MODELOS DE CRESCIMENTO DE BIOFILME.....	21
2.5 MÉTODOS DE ANÁLISE DE BIOFILME.....	23
3 OBJETIVOS	26
3.1 OBJETIVOS GERAIS.....	26
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	26
4 ARTIGOS CIENTÍFICOS	27
4.1 ARTIGO 1 Novel visualisation method shows dual-species biofilm structure dictates its disruption	27
4.2 ARTIGO 2 The effect of time and volume on the chemical efficiency and efficacy of a 2% sodium hypochlorite solution on a dual-species biofilm	46
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	63
REFERÊNCIAS	66

1 APRESENTAÇÃO

A presente tese representa o início da relação de cooperação estabelecida entre a Faculdade de Odontologia UFRGS e o Centro de Odontologia e Higiene Oral – *University Medical Center Groningen UMCG – Rijksuniversiteit*. Durante o estágio de Doutorado Sanduíche realizado na UMCG foi possível realizar todas as etapas metodológicas dos artigos propostos.

Esta tese será apresentada nas seguintes sessões:

- a) Revisão de literatura, abordando antecedentes e justificativas que embasam o desenvolvimento desta tese. Inicialmente, serão apresentados conceitos sobre biofilmes, aspectos relacionados à composição e ao desenvolvimento, mecanismos adaptativos e resistência antimicrobiana. Por conseguinte, características particulares de biofilmes endodônticos e as estratégias químicas e físicas utilizadas para sua remoção, abordando as propriedades das soluções irrigadoras comumente utilizadas em tratamentos endodônticos. Por fim, serão descritos modelos de crescimentos de biofilme, enfatizando os atributos do modelo utilizado nesta tese, bem como os equipamentos e técnicas utilizados para a análise dos biofilmes.
- b) Artigo 1: Manuscrito formatado para submissão no *Journal of Dental Research*, apresenta a influência da estrutura de diferentes biofilmes crescidos com as mesmas espécies bacterianas na ação do hipoclorito de sódio (NaOCl), da clorexidina (CHX) e do ácido etilenodiamino tetracético (EDTA). Além disso, é apresentada uma nova metodologia óptica para análise de biofilmes, a Tomografia de Coerência Óptica (TCO).
- c) Artigo 2: Manuscrito formatado para submissão no *International Endodontic Journal*, avalia a eficácia e a eficiência do NaOCl 2% aplicado em diferentes volumes e períodos de tempo sobre a superfície de biofilmes dual-espécies em espaços confinados.

- d) Considerações finais: apresenta uma reflexão sobre os objetivos traçados, as metodologias utilizadas para o desenvolvimento desta tese, além de algumas considerações adicionais acerca das limitações e futuras perspectivas traçadas com base nos resultados obtidos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 BIOFILMES BACTERIANOS

2.1.1 Quem são e qual a sua composição química?

A compreensão da ocorrência de infecções endodônticas persistentes tem sido um desafio na Odontologia. Desde a década de 90, estudos têm mostrado diferenças fisiológicas entre bactérias planctônicas e comunidades microbianas conhecidas como biofilmes, (STEWART; FRANKLIN 2008) características essas que resultam no desenvolvimento de mecanismos adaptativos que conferem maior resistência em ambientes controlados, com limitações de nutrientes ou frente a ações antimicrobianas (DU et al., 2014; WANG et al., 2014).

Para Nair (2014), o termo 'biofilme' foi utilizado pela primeira vez por Poul Harremoes, um físico dinamarquês, em um artigo sobre cinética de difusão de fluidos para biofiltros viscosos que ele chamou 'biofilmes'. Reconhecendo o cerne do problema, ele escreveu '... little attention has been given to . . . the fact that organisms are gathered in flocks into which the substrate has to diffuse. This phenomenon is of particular significance for attached biofilms' (Harremoes, 1977 apud Nair, 2014).

Os biofilmes são comunidades de células microbianas envoltos em uma matriz polimérica auto-produzida e aderidos a uma superfície estruturada inerte ou vital (COSTERTON et al., 1999). O modo de crescimento protegido e estruturalmente organizado permite a sobrevivência em ambientes hostis. A facilidade de difusão nutricional é garantida por meio dos canais formados pela matriz de polímeros extracelulares (PEC): proteínas, glicoproteínas, glicolipídeos, polissacarídeos e DNA extracelular (eDNA), os quais formam uma estrutura altamente hidratada que mantém as células do biofilme unidas e protegidas contra estresses químicos e mecânicos (FLEMMING; NEU;WOZNIAK, 2007; FLEMMING; WINGENDER, 2010).

Em muitos biofilmes bacterianos, o percentual de PEC pode corresponder a 90 por cento (%), enquanto a massa bacteriana representa menos de 10% da estrutura total. Devido à sua arquitetura expressiva, a PEC apresenta inúmeras

funções, como adesão superficial (DAS et al., 2010), agregação bacteriana, coesão, difusão de íons orgânicos e inorgânicos e absorção de água, que possibilitam a organização de diferentes espécies bacterianas em nichos específicos conforme a necessidade energética, condição de aerobiose e expressão genética (FLEMMING; WINGENDER, 2010; FLEMMING et al., 2016).

Das et al. (2010), mostraram que a presença de eDNA na superfície celular bacteriana possibilita a agregação e adesão superficial devido ao envolvimento de interações ácido-base. Já na revisão de literatura, Das, Sehar e Manefield (2013) abordaram a importância do eDNA na integridade da matriz de PEC devido ao seu comportamento químico que resulta na interação com os demais polímeros.

2.1.2 Crescimento do Biofilme

O crescimento do biofilme é um processo dinâmico e cíclico, regulado por condições externas, que produzem alterações genéticas nos microrganismos durante sua maturação. Alguns microrganismos se desprendem da matriz colonizando novas superfícies seja por alterações nutricionais, sinais genéticos, fluxo ambiental do biofilme ou desprendimento de células filhas (DONLAN, 2002). A espessura do biofilme varia desde uma monocamada até espessas camadas celulares que alcançam um tamanho de dimensões macroscópicas (WIMPENNY et al., 2000). O biofilme desenvolve-se em meio líquido-sólido. A velocidade do líquido que o atravessa determinará o desenvolvimento, o transporte de resíduos e nutrientes e o desprendimento de bactérias (COSTERTON et al., 1987).

Em um estudo recente, Berleman et al. (2016) mostraram, por meio de microscopia eletrônica de transmissão e microscopia eletrônica de varredura que a estrutura de PEC composta por microcanais pode promover o alinhamento das células e movimentos direcionais, guiando o movimento celular e permitindo ao biofilme um modo de crescimento semelhante a um organismo multicelular.

2.1.3 Propriedades Viscoelásticas

De modo geral, biofilmes aderem a superfícies rígidas e, ao mesmo tempo, possuem flexibilidade suficiente para fluir e mover-se sobre tais superfícies. Em 2002, Klapper et al. desenvolveram um estudo para descrever as propriedades

viscoelásticas dos biofilmes bacterianos. Diferentes cepas de *P. aeruginosa* foram cultivadas em células fluídicas durante 7 a 10 dias e analisadas por meio de uma câmera fotográfica de alta resolução. Curvas de estresse e tensão foram obtidas por meio do registro de imagens durante a exposição dos biofilmes a diferentes fluxos de meio de cultura. Os testes de cisalhamento mostraram que, sob fluxo contínuo, os biofilmes apresentavam comportamento elástico e, ao expor o biofilme a um fluxo de solução três vezes maior, mostrou comportamento viscoso e elástico. Os autores descreveram a resposta da matriz de PEC ao estresse exibindo: tensão elástica devido a uma combinação de emaranhamento de polímero, entropia e forças fracas de ligação de hidrogênio; amortecimento viscoso devido à fricção polimérica e ruptura da ligação de hidrogênio; e alinhamento de polímeros na direção da tensão de cisalhamento.

A relação entre as propriedades viscoelásticas de um biofilme oral *in-vivo* e biofilmes de duas espécies *in vitro* foram estabelecidas por He et al. (2013). Biofilmes orais foram cultivados em um dispositivo intra-oral durante duas semanas, enquanto biofilmes *in vitro* de *S.oralis* J22 e *A. naeslundii* T14V-J1 foram cultivados separadamente por meio de dois métodos: *Parallel Plate Flow Chamber* (PPCF) e *Constant-depth Film Fermentor* (CDFF). Os testes de resistência à baixa compressão evidenciaram, por meio do percentual de relaxamento ao stress, que camadas mais superficiais do biofilme *in vivo* podem ser comparadas ao biofilme crescido por PPCF, devido à menor densidade e maior elasticidade, característicos deste método de cultivo e de biofilmes recentes. Porém, camadas mais profundas do mesmo biofilme *in vivo* mostraram-se mais semelhantes aos biofilmes cultivados por CDFF, devido à maior densidade celular, característica dos biofilmes mais envelhecidos.

Estudos mais recentes tem mostrado que o PEC fornece ao biofilme características viscoelásticas, o que pode resultar em um aumento na resistência mecânica e, conseqüentemente, maior dificuldade de remoção frente a procedimentos de limpeza que visam sua remoção, o que propiciam ao biofilme a capacidade de se deformar e se adaptar frente a estresse mecânico. Sob baixo estresse, o biofilme pode deformar elasticamente, enquanto sob estresse elevado, o biofilme pode fluir viscosamente (KÖRSTGENS et al., 2001; FLEMMING et al., 2007; MOHAMMADI et al., 2013).

2.2 BIOFILMES ENDODÔNTICOS

A capacidade dos organismos em formar biofilme pode ser visto como o mecanismo adaptativo mais importante utilizado por bactérias para sobreviver às mudanças ambientais resultantes dos protocolos de tratamentos endodônticos (CHAVEZ DE PAZ, 2007). Muitos microrganismos intracanaís são sensíveis aos protocolos padrão de tratamento, entretanto algumas bactérias podem sobreviver e a sua presença durante a obturação dos canais radiculares apresenta um fator de risco para posterior periodontite apical (CHAVEZ DE PAZ et al., 2004; NAIR et al., 2005).

O objetivo do tratamento endodôntico visa eliminar ou reduzir substancialmente a população microbiana no interior do sistema de canais radiculares e evitar a reinfecção através da obturação do canal radicular (NAIR et al., 2005). Em canais radiculares infectados, os microrganismos, em forma de biofilme, estão presentes em diferentes áreas do sistema de canais radiculares, incluindo istmos, canais laterais, acessórios, outras anastomoses e delta apical (VERA et al., 2012), podendo ser encontrados em diferentes profundidades de até 300 micrômetros (μm) dentro dos túbulos dentinários, a partir da parede do canal (HORIBA et al., 1990). Devido a este sistema altamente complexo, os procedimentos de limpeza química e mecânica ficam severamente prejudicados (RICUCCI et al., 2013; ESTRELA et al., 2015; VERSIANI et al., 2016).

A complexidade anatômica do sistema de canais radiculares é um importante fator limitante à realização de uma adequada desinfecção. Em canais radiculares infectados e com periodontite apical, bactérias podem estar localizadas não somente na luz do canal principal, mas nos túbulos dentinários, istmos, canais laterais e ramificações apicais. Nestas áreas, elas estão protegidas dos efeitos químicos e mecânicos do tratamento do canal radicular, sendo fisicamente impossível os instrumentos alcançarem estas áreas, ao mesmo tempo em que a ação antibacteriana das substâncias químicas, devido ao pequeno período de tempo em que atuam, são insuficientes para se difundir e alcançar concentrações efetivas para eliminar as bactérias localizadas nas complexidades anatômicas (SIQUEIRA Jr, 2001; VERA et al., 2012).

A abordagem histobacteriológica tem demonstrado a presença de bactérias residuais em áreas distantes do canal principal, como istmos, canais laterais,

acessórios e deltas apicais. Os microrganismos que permanecem em uma região mais apical do sistema de canais podem manter uma infecção por um longo tempo. Eles estão em contato direto com os tecidos perirradiculares, os quais atuam como fontes de nutrientes (VERA et al., 2012).

Análises de dentes com periodontite apical pós-tratamento revelaram biofilmes associados com muitos casos, especialmente naquelas áreas inacessíveis ao tratamento (RICUCCI; SIQUEIRA Jr., 2010; RICUCCI et al., 2009). Isto representa uma evidência indireta de que o biofilme bacteriano, que não foi afetado pela ação química do irrigante e mecânica do instrumento, poderá prejudicar o resultado do tratamento endodôntico, e por isso esforços deveriam ser direcionados na tentativa de melhorar a desinfecção de áreas de complexidade anatômica.

Entender o comportamento do biofilme com relação à viscosidade fluida e ação química e mecânica de soluções irrigadoras é fundamental para aperfeiçoar as estratégias de remoção do biofilme durante a irrigação dos canais radiculares, priorizando a ação química que possa promover alterações estruturais à matriz de PEC.

2.3 REMOÇÃO DO BIOFILME ENDODÔNTICO

2.3.1 O papel das substâncias químicas

A escolha da substância irrigadora é revestida de grande importância devido ao seu efeito químico. Os efeitos químicos mais importantes do irrigante do canal radicular são o efeito de dissolução do tecido, ação antimicrobiana e ação antibiofilme. Estes efeitos podem enfraquecer as forças de coesão entre a matriz polimérica e células bacterianas, promovendo a ruptura do biofilme (WANG et al., 2012; TANOMARU et al., 2016).

O NaOCl é amplamente utilizado para irrigar o canal radicular em procedimentos endodônticos devido sua ação antimicrobiana (VIANA et al., 2006), capacidade de reduzir a carga de endotoxina (GOMES et al., 2009) e a capacidade de dissolver o tecido orgânico (NAENNI et al., 2004, STOJICIC et al., 2010). Tais propriedades do NaOCl baseiam-se na concentração da solução, temperatura e pH (STOJICIC et al., 2010; GUASTALLI et al., 2015).

A CHX tem sido recomendada como substância química auxiliar em Endodontia devido a sua biocompatibilidade, especialmente nos casos de ápices abertos (JEANSONNE; WHITE, 1994) ou em pacientes alérgicos ao hipoclorito de sódio (TANOMARU FILHO et al., 2002). Ela é principalmente usada em sua forma líquida, mas também tem sido investigada na forma de gel (FERRAZ et al., 2001; GOMES et al., 2001; OKINO et al., 2004). A ação desta substância na membrana citoplasmática da célula bacteriana danifica a dupla camada fosfolipídica, afetando a integridade e promovendo a morte da célula bacteriana. Apesar das vantagens, sua atividade é pH dependente e reduzida na presença de matéria orgânica (MC DONNEL; RUSSELL, 1999).

Para se obter efetiva limpeza e desinfecção do sistema de canais radiculares, tem sido preconizada durante o preparo químico-mecânico a utilização de soluções solventes de matéria orgânica associadas a agentes quelantes que são substâncias solventes de matéria inorgânica (HAAPASALO et al., 2010). O EDTA tem sido o agente quelante mais estudado ao longo dos anos, principalmente devido a sua afinidade pelos íons cálcio (GARBEROGLIO; BECCE, 1994). É um ácido orgânico fraco com ação quelante que atua nos componentes inorgânicos da dentina radicular, causando descalcificação da matriz de dentina peri e intertubular (HÜLSMANN; HECKENDOR; LENNON, 2003; MELLO et al., 2010). O EDTA utilizado isoladamente não tem atividade antimicrobiana (ARIAS-MOLIZ et al., 2008; HAAPASALO et al., 2010).

Os agentes antimicrobianos têm sido desenvolvidos para otimizar sua ação contra o rápido crescimento e disseminação da população bacteriana (MOHAMMADI et al., 2014). Porém, comunidades microbianas em biofilmes são dificilmente erradicadas com agentes antimicrobianos, enquanto os biofilmes maduros são notoriamente mais resistentes (GILBERT et al., 1997; ATHANASSIADIS et al., 2007; DUNAVANT, et al., 2006).

2.3.2 A importância dos meios físicos

O uso da irrigação convencional (IC) tem sido amplamente aceita e difundida para dispersão da solução irrigadora no canal radicular (DUTNER, et al., 2012) A técnica de Pressão Positiva consiste em utilização de seringa e agulha ou cânula com diferentes calibres, de forma passiva ou com agitação, permitindo o controle da

profundidade de inserção da cânula e quantidade de solução irrigadora aplicada. A fim de aprimorar a capacidade de turbilhamento, sugere-se que a cânula seja introduzida o mais próximo do comprimento de trabalho quanto possível, além de se ampliar o diâmetro apical e introduzir cânulas de menor calibre (GU, et al., 2009). Estas estratégias, porém, podem resultar em maior risco de extravasamento das soluções irrigadoras para os tecidos periodontais, e, conseqüentemente, danos teciduais e dor pós-operatória (HÜLSMANN; HAN, 2000).

Diversas técnicas e dispositivos tem sido desenvolvidos a fim a aprimorar a ação química das soluções irrigadoras por meio da ação física de agitação destas soluções. A utilização da Ativação Ultrassônica Passiva (IUP) associada à inserção do NaOCl 2% potencializa a remoção de *debris* dentinários. A energia propagada pelo efeito cavitacional propicia a formação de bolhas e liberação de cloro ativo, reduzindo o volume de solução irrigadora necessária para promover a mesma ação de dissolução (CUNNINGHAM; BALEKJIAN, 1980; VAN DER SLUIS et al., 2006).

A AUP também pode ser associada à IC para a remoção de medicações intracanaais. Ao avaliar a remoção da pasta de hidróxido de cálcio de canais previamente preparados utilizando a irrigação convencional e complementada por protocolos de ativação ultrassônica durante 1, 2 ou 3 minutos, imagens obtidas por Microscopia Eletrônica de Varredura mostraram resultados semelhantes entre os grupos: nenhum protocolo proposto possibilitou a remoção completa do medicamento (BUSANELLO et al., 2015). Já Vivian et al. (2016) mostraram que, ao posicionar a ponta do inserto ultrassônico na porção apical do conduto, ou movimentando-o durante o protocolo de IUP promove-se uma limpeza mais efetiva com maior remoção de *debris*.

Métodos de irrigação por pressão negativa também propiciam melhor limpeza de canais radiculares (KUNGWANI; PRASAD; KHIYANI, 2014). O sistema EndoVac é composto por cânulas que promovem a aspiração da solução irrigadora no canal radicular de forma oposta ao que se executa na técnica de pressão positiva: a solução é introduzida na câmara pulpar, percorre a extensão do conduto e é aspirada pela micro-cânula na porção apical, desde que preparado a um diâmetro ISO igual ou superior a 35 (NIELSEN; BAUMGARTNER, 2007). Além disso, sua utilização previne a extrusão de *debris* na porção apical. (MITCHELL; YANG; BAUMGARTNER, 2010).

Kungwani, Prasad e Khiyani (2014) avaliaram a remoção de *debris* de canais radiculares de dentes extraídos comparando a utilização do EndoVac com IC de pressão positiva associados a NaOCl 3% e EDTA 17%. Os resultados mostraram que, apesar de não haver diferença na eficácia de ambas as técnicas para remoção de *debris* a 3mm do comprimento de trabalho, na porção mais apical do conduto (1mm do comprimento de trabalho), a irrigação por meio do EndoVac apresentou uma quantidade estatisticamente inferior de *debris*. Já Versiani et al. (2016) destacaram que, apesar de não haver diferença estatisticamente significativa entre as mesmas técnicas, a irrigação por pressão negativa resultou em maior remoção de *debris* no terço apical.

Estudos mais recentes têm abordado a utilização da PIPS (*photon initiated photoacoustic streaming*) em procedimentos de irrigação e sua interação com as soluções irrigadoras. Nesta técnica, o efeito cavitacional é provocado pela implosão de bolhas decorrentes da transformação do NaOCl em vapor por meio da interação com *laser* (de MOOR et al., 2010).

Ao comparar o uso de PIPS, AUP e IC para remoção de pasta de hidróxido de cálcio em molares inferiores com anatomias complexas, Lloyd e al. (2016) observaram que, quando realizada por meio de PIPS, a remoção da medicação no terço apical foi significativamente mais elevada. Porém, Nascher et al. (2016) ao utilizar diferentes protocolos de irrigação com NaOCl em diferentes concentrações associados ao uso de PIPS não encontrou diferença estatisticamente significativa na remoção de *smear-layer*.

2.4 MODELOS DE CRESCIMENTO DE BIOFILME

Kinniment et al. (1996) sugeriram alguns critérios para a escolha do modelo ideal para crescimento de biofilmes: deve ser esterilizável e permitir remoção asséptica de amostras que devem ser discretas, representativa e reproduzíveis quanto possível; capacidade de utilizar qualquer substrato e produzir um grande número de biofilmes separadamente, suficientes para permitir a reprodutibilidade estatística de resultados a serem avaliados; deve ser possível a remoção da amostra juntamente com o substrato, sem perturbação do biofilme.

Em endodontia, muitos estudos são desenvolvidos a fim de avaliar estratégias para remoção de biofilmes intracanais. Para tanto, diversos modelos de cultivo de biofilmes semelhantes ao princípio de microplacas tem sido utilizados. A multiplicidade de vantagens oferecidas por estes sistemas simples explica o seu uso generalizado. Os ensaios baseados em microplacas são bastante baratos, uma vez que são necessários apenas pequenos volumes de reagentes. Vários estágios do desenvolvimento do biofilme podem ser facilmente realizados em sistemas de microtitulação. O modelo, porém, permite a variação de parâmetros, podendo resultar no desenvolvimento de amostras não idênticas ou gerar vieses metodológicos, influenciados pela calibragem do pesquisador (COENYE; NELIS, 2010)

Em 2013, Guerreiro-Tanamoru et al. avaliaram a influência de diferentes substratos (hidroxiapatita, dentina humana, dentina bovina, gutapercha e osso bovino) no cultivo de biofilmes compostos por *E. faecalis* durante 14 e 21 dias, e constataram que tipo de substrato influencia nas características do biofilme, sendo que a superfície de hidroxiapatita fornece as melhores condições para desenvolvimento do biofilme.

Du et al. (2014) utilizaram blocos de dentina de raízes seccionadas cujos canais foram previamente preparados e uma suspensão de *E. faecalis* foi introduzida na superfície dos túbulos dentinários por centrifugação. Biofilmes cresceram durante três semanas, com trocas de meio de cultura a cada sete dias. Afkhami et al. (2017) cultivaram biofilmes de *E. faecalis* durante quatro semanas. Para tanto, dentes monorradiculares foram decoronados e previamente preparados e o meio de cultura era parcialmente recolocado a cada dois dias. Já Guerreiro-Tanamoru et al. (2014) utilizaram blocos de dentina bovinos e cultivaram estaticamente *E. faecalis* durante 14 dias, com trocas de meio de cultura a cada dois dias. Ainda com cultivo de biofilmes estáticos, Tawakoli et al. (2017) utilizaram discos de hidroxiapatita em placa de cultura de células para formar um biofilme composto por três espécies: *S. oralis*, *A. naeslundii* e *S. mutans* durante sete dias.

Em 2014, Gonzalez et al. desenvolveram um sistema com fluxo contínuo de gotejamento. Inócuos de *E. faecalis* extraídos de raízes infectadas e com lesões apicais foram cultivadas a fim de formar uma suspensão bacteriana em meio de cultura. Raízes preparadas e seccionadas nas porções apicais e coronárias foram introduzidas ao modelo, de modo que a suspensão bacteriana fosse constantemente

gotejada na porção coronária do conduto radicular, percorrendo sua extensão, enquanto o resíduo era imediatamente despejado em um compartimento inferior, de modo a favorecer o crescimento do biofilme no interior do canal radicular.

Com o objetivo de avaliar a difusão de soluções antimicrobianas, Van der Waal et al. (2016) desenvolveram uma metodologia para crescimento de biofilmes multi-espécies utilizando o princípio de placas paralelas. O modelo é composto por canais de alimentação e canais de desenvolvimento, onde ocorre o crescimento dos biofilmes. Além disso, os medicamentos testados são transportados por difusão, preservando a integridade física e adesão do biofilme. Modelos semelhantes utilizando o princípio de placas paralelas tem sido utilizado para avaliar biofilmes orais. (ZHAO, et al., 2014; HE, et al., 2014).

Adaptado por Hope e Wilson (2006), o CDFP – *Constant depth film fermentor* (PETERS; WIMPENNY, 1988) tem sido utilizado para estudos em biofilmes orais (ZAURA et al., 2011; MADHWANI; MCBAIN, 2011; HE et al., 2013, SOUSA et al., 2016) . O modelo foi desenvolvido a fim de se obter amostras de biofilmes cultivadas com suprimento contínuo de nutrientes, possibilidade de escolha do substrato e profundidade constante dos biofilmes formados. Em um sistema fechado e passível de controle de aerobiose, os biofilmes se desenvolvem sob constante compactação, o que resulta em um envelhecimento rápido e obtenção amostras uniformes. A limitação da profundidade de forma predeterminada por remoção mecânica do excesso de biofilme mimetiza o movimento fisiológico da língua sobre os dentes (PRATTEN, 2007).

O CDFP é composto por uma mesa rotatória contendo 15 suportes e acoplada a um motor elétrico. Cada suporte permite a inserção de 5 discos contendo 5 milímetros (mm) de diâmetro, cujos substratos (inicialmente compostos por politetrafluoretileno) são rebaixados a uma profundidade uniforme. O meio de cultura é gotejado e espalhado sobre a mesa por espátulas fixas, removendo o excesso de material celular e mantendo os biofilmes com espessura constante. O modelo é mantido a 37 graus por um sistema de aquecimento e bombeamento de água pelas paredes circundantes do CDFP compostas por vidros que formam “rios laterais”. (PETERS; WIMPENNY, 1988).

Para o crescimento de placa bacteriana, discos de hidroxiapatita (HA) foram rebaixados a 100 µm cobertos por saliva para simular a superfície dentária. Placa subgingival foi coletada de indivíduos em tratamento periodontal e resuspendido em

caldo BHI- *Brain-Heart infusion* (HOPE; WILSON, 2006). Já Madhwani e Mcbain (2011) equiparam o modelo com discos de HA rebaixados a 200µm cobertos por saliva artificial e inoculados com 200 microlitros (µl) de saliva humana fresca para crescimento em condição de anaerobiose, com suprimento de uma mistura gasosa composta por 80% N₂, 10% CO₂ e 10% H₂.

Souza et al. (2016) descreveram uma metodologia de crescimento de biofilme por CDFE que reproduz a evolução de condições microbiológicas compatíveis com saúde peri-implantar, mucosite e peri-implantite. Para tanto, discos de titânio foram rebaixados a 600µm e inoculados com saliva reconstituída multi-espécie. Foi desenvolvido um meio de cultura com propriedades semelhantes ao fluido peri-implantar, sendo que a velocidade de suplementação e condição de aerobiose foi determinada conforme o período de crescimento e condição microbiológica desejada.

2.5 MÉTODOS DE ANÁLISE DE BIOFILME

Diversos estudos tem utilizado Microscopia Confocal a Laser (MCL) para análise de biofilmes *in vitro*. Zapata et al. (2008) mostraram que é possível distinguir viabilidade bacteriana em túbulos dentinários infectados por *E. faecalis*. Por meio do corante acridina laranja evidenciou-se a atividade metabólica, enquanto o diacetato de fluoresceína e o iodeto de propídio diferenciam microrganismos vivos e mortos.

Um modelo não invasivo de infecção de túbulos dentinários foi estabelecido por Ma et al. (2011). Após centrifugar uma suspensão de *E. faecalis* nos túbulos dentinários de blocos de dentina, utilizaram as colorações Syto 9 e iodeto de propídio para avaliar o efeito de soluções antimicrobianas por meio da mensuração de células vivas/mortas no interior de túbulos dentinários. Já van der Waal et al. (2016) mostraram que, após a difusão de NaOCl em um biofilme multi-espécie, houve um aumento na intensidade da fluorescência vermelha, resultante da coloração por iodeto de propídio.

Com o intuito de avaliar o efeito de soluções irrigadoras sobre a matriz de PEC, biofilmes tri-espécies foram corados com Concavalina A e Syto 59. Não houve diferença no volume de PEC após a ação de CHX 2%, enquanto o volume de bactérias foi significativamente reduzido. A ação de EDTA 17% resultou em redução

do volume de PEC, enquanto biofilmes foram praticamente dissolvidos após 1 min de exposição ao NaOCl 5% (TAWAKOLI et al., 2017).

A análise da produção de PEC e sua conformação em biofilmes também é propiciada pela coloração e fixação do biofilme com calcoflúor branco. Ao avaliar a posição da maior densidade celular e maior concentração de PEC em biofilmes de *P. aeruginosas* corados com Syto 9 e calcoflúor branco, constatou-se que a distribuição da matriz de PEC é alterada após submeter o biofilme a forças compressivas. Frente ao stress aplicado, PEC e bactérias tentam encontrar novas posições estáveis, a fim de aliviar o biofilme do stress aplicado (PETERSON et al., 2014).

Além de avaliar a viabilidade celular, outros estudos têm buscado explicar o comportamento viscoelástico de biofilmes frente a estresses químicos e mecânicos. Por meio do uso de um reômetro é possível analisar a visco-elasticidade e as forças de coesão de biofilmes mimetizados por hidrogel utilizados em modelos de canais radiculares. Da mesma forma, a remoção do hidrogel de istmos e canais laterais por meios físicos e químicos podem ser visualizados com uma câmera fotográfica de alta resolução associada a um microscópio de bancada, que permite a gravação de 50 a 300 *frames* por segundo (MACEDO et al. 2014). Já o LLCT – *low load compression tester* – permite mensurar a espessura do biofilme e aplicar um determinado percentual de compressão às espécimes, apresentando o percentual de relaxamento ao stress (PARAMONOVA et al., 2007, PARAMONOVA et al., 2009)

O comportamento do biofilme resulta em uma curva de relaxamento ao estresse, que representa a resposta à deformação induzida pela expressão de componentes denominados rápidos, intermediários e lentos. Esses componentes foram identificados como a saída de água, PEC e reorganização de bactérias, respectivamente (HE, et al., 2013). Em biofilmes orais *in vitro* dual-espécies, porções não removidas pela ação mecânica da escovação apresentaram diferentes expressões dos componentes rápido e lento, ou seja, maior deslocamento de componente aquoso e células bacterianas. A desorganização do biofilme também resultou em maior penetração de soluções de CHX, favorecendo a ação química da substância (HE, et al., 2014).

A avaliação de biofilmes em nível celular também pode ser feita por meio da Tomografia de Coerência Óptica (TCO). Dados obtidos por TCO revelaram imagens em escala de tons de cinza obtidas por feixes de luz retrodifundidos por meio de um

interferômetro. O modelo desenvolvido por Huang et al. (1991) permitiu a obtenção de imagens com qualidade micrométrica e em profundidade milimétrica, e tem sido amplamente utilizada para estudos e diagnósticos em dermatologia e oftalmologia (FRIIS; THEMSTRUP; JEMEC, 2017; HOOD, 2016; TERASHIMA; KANEDA; SUZUKI, 2012).

Existem algumas vantagens da utilização da TCO para diagnóstico clínico. A técnica dispensa o uso de colorações ou fixações, o que resulta em maior aceitação por pacientes, minimizando o risco de alergias e reações adversas. Além disso, permite a obtenção de dados qualitativos e quantitativos e, devido à sua característica não invasiva, tecidos e estruturas podem ser avaliados diversas vezes, sem que haja interferência do método de análise sobre a estrutura em questão (JAFFE; CAPRIOLI, 2004). Tais benefícios também podem ser obtidos em estudos laboratoriais, possibilitando a análise de estruturas em diversos momentos. Seelinger et al. (2017) avaliaram superfícies dentárias antes da colagem de braquetes ortodônticos e após sua remoção, a fim de avaliar danos superficiais em esmalte e a permanência de resinas após a descolagem.

A avaliação tridimensional e em tempo real da estrutura de biofilmes foi descrita por Xi et al. (2006). Um biofilme de *P. aeruginosa* foi cultivado em uma célula fluídica com dimensões de 1mm x 1mm, de modo que fosse possível visualizar toda estrutura de biofilme formada durante todo período de crescimento. Aquisições por TCO comparadas com imagens obtidas por meio de MCL mostraram que ambas metodologias evidenciam características semelhantes aos biofilmes desenvolvidos, mas a TCO permite a visualização das estruturas em maior profundidade.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVOS GERAIS

Avaliar o comportamento de biofilmes frente à ação química de soluções irrigadoras normalmente utilizadas para a irrigação de canais radiculares em tratamentos endodônticos.

Apresentar uma nova metodologia não invasiva para visualizar a estrutura de biofilmes *in-vitro*.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar a influência da estrutura de biofilmes dual-espécies crescidos por diferentes metodologias na ação química do hipoclorito de sódio 2%, EDTA 17% e CHX 2%.

Descrever a utilização da Tomografia de Coerência Óptica para visualizar biofilmes *in-vitro*, comparando os dados obtidos por meio dessa metodologia com resultados de Microscopia Confocal a Laser e Teste de Resistência à Baixa Compressão.

Avaliar a efetividade e a eficácia do NaOCl 2% quando aplicado em diferentes volumes e períodos de tempo sob um biofilme dual-espécie em ambiente confinado, mimetizando o contato solução-biofilme em locais restritos do canal radicular.

4 ARTIGOS CIENTÍFICOS

4.1 ARTIGO 1

Busanello FH, Petridis X, Dijkstra RJB, Pillar R, Sharma PK, Só MVR, van der Sluis LWM. Novel visualisation method shows dual-species biofilm structure dictates its disruption.

Formatado para submissão no *Journal of Dental Research*

Novel visualisation method shows dual-species biofilm structure dictates its disruption.

F.H. Busanello¹, X. Petridis², R.J.B. Dijkstra², R. Pillar³, P.K. Sharma⁴, M.V.R. Só¹ & L.W.M. van der Sluis²

¹ *Department of Restorative Dentistry, Rio Grande do Sul Federal University, Porto Alegre, RS, Brazil*

² *Department for Dentistry and Oral Hygiene, University Medical Center Groningen, University of Groningen, Groningen, the Netherlands*

³ *Department of Stomatology, Santa Maria Federal University, Santa Maria, RS, Brazil*

⁴ *Department of Biomedical Engineering, W.J. Kolff Institute, University Medical Center Groningen, the Netherlands.*

Abstract word count: 267

Total word count: 3.428

Total number of tables/figures: 5

Number of references: 30

KEY WORDS: biofilm contraction, chlorhexidine, endodontic, optical coherence tomography, sodium hypochlorite, visco-elastic

Correspondence: L.W.M. van der Sluis, Center for Dentistry and Oral Hygiene , University Medical Center Groningen, Groningen, the Netherlands (Tel.: + 3150 363 2654; e-mail: l.w.m.van.der.sluis@umcg.nl).

Novel visualisation method shows biofilm structure dictates its disruption.

ABSTRACT

Mostly, when the effect of an antimicrobial is tested on a biofilm, the structure of the biofilm is not taken into consideration. This in vitro study investigated whether the structure of the biofilm influences the antibiofilm effect of three endodontic irrigants: 2% sodium hypochlorite, 2% chlorhexidine and 17% EDTA. Low Load Compression Testing, enabling a viscoelastic analysis of the biofilm, Optical Coherence Tomography, visualising the structure of the biofilm and Confocal Laser Scanning Microscopy were used to evaluate the biofilm before and after contact with the antimicrobials. *S. oralis* J22 and *A. naeslundii* T14V-J1 were grown together under three different growth conditions resulting in one ten days grown biofilm and two four days grown biofilms of which one was had a cell rich and the other a water rich structure. The three different biofilms were evaluated after application of antimicrobials using the above mentioned methodologies. The results showed that the structure of the biofilm indeed has an influence on the effect of different antimicrobials. Sodium hypochlorite was in chemical removal the most effective antimicrobial tested and very effective on water rich biofilms. Biofilms treated with chlorhexidine showed contraction, more pronounced for the cell rich biofilms. More matrix material (extracellular polymeric substance) was visible on the Confocal Laser Scanning Microscopy images after application of chlorhexidine. EDTA did only result in significant chemical dissolution of a cell rich biofilm and caused little structural effect on the biofilm. The antimicrobials can have an effect on the remaining biofilm. Optical Coherence Tomography seems to be an interesting non-invasive 'real time' method to evaluate the structure of biofilms before and after application of antimicrobials.

INTRODUCTION

Complete bacterial eradication from the root canal system is impossible due to anatomical considerations and the biofilm mode of microbial intra-radicular colonization (Nair et al. 2005). Therefore, realization of the effect of the most widely used endodontic antimicrobials on biofilm removal as well as on the structure of the remaining biofilm becomes an issue of utmost importance. Knowing more about the structural configuration of the remaining biofilm could aid both in determining its virulence and its re-formation capacity as well as in developing more effective removal regimes (Busscher et al. 2010, Ohsumi et al. 2015).

In most biofilms, the structural composition is primarily dictated by the water-abundant matrix of extracellular polymeric substances (EPS) and secondarily by the microorganisms accounting only for around 10% of the biofilm dry mass (Flemming & Wingender, 2010). This matrix provides also the biofilm with viscoelastic properties, facilitates nutrition and acts as protection from chemical and mechanical attacks imposed by cleaning procedures and disinfectants (Chavez de Paz 2010, Stewart & Franklin 2008). Viscoelastic properties facilitate biofilm's ability to deform and adapt under mechanical and chemical stresses therefore influence biofilm removal and is acknowledged as a virulence factor (Korstgens et al. 2001, Klapper et al. 2002, Peterson et al. 2015).

Although deeper insight on the behaviour of the biofilm matrix upon mechanical and chemical stress is of paramount importance (Koo et al. 2013), the effect of antimicrobials is mostly tested on known-species biofilms with unknown matrix structural composition. Recently, an association between penetration of disinfecting solutions and matrix structural arrangement has been demonstrated (He et al. 2013). In this study, two new methods are described to assess the biofilm matrix behaviour 'real-time' after applying various anti-biofilm treatments without staining or adding fixatives to the biofilm, that is the Low Load Compression Testing (LLCT) (direct mechanical approach) and the Optical Coherence Tomography (OCT) (non-invasive imaging method). The former captures the viscoelastic behaviour of biofilms via stress relaxation measurements (Peterson et al. 2013) and the latter illustrates the structure of the biofilm offering the additional advantage of multiple assessments on the same biofilm sample. In order to explore the influence of the structural matrix components of the biofilm during a chemical attack, dual-species biofilms comprised

of the same bacterial species but with different matrix composition were used. With this study we aimed to:

- a) perform a matrix structural composition analysis of dual-species biofilms consisted of an early coloniser (*S. oralis* J22) and an early adaptor (*A. naeslundii* T14V-J1) with 3 different matrix structures,
- b) to evaluate the influence of the different matrix structural components of the biofilm on the chemical effect of commonly used endodontic irrigation solutions,
- c) to assess the effect of the endodontic irrigation solutions on the biofilm mass reduction and on the structure of the remaining biofilm.

The outcome measures were:

- a) percentage dead/live bacteria and EPS by Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM),
- b) structure of biofilm differentiating between a soft/coherent ('washy') or rigid/coherent ('rigid') layer by OCT,
- c) height of the biofilm washy and rigid layer before and after exposure to the antimicrobials by 2D OCT scans and videos,
- d) viscoelastic properties of the biofilm expressed by the percentage of stress relaxation in the biofilm related to a certain time interval using LLCT.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains and growth conditions

The clinical isolates *S. oralis* J22 and *A. naeslundii* T14V-J1 were grown and the lyophilized saliva was obtained from at least 20 healthy volunteers of both genders as described previously by He et al. 2013.

Biofilm formation in Constant Depth Film Fermenter (CDFF)

The CDFF (Hope & Wilson, 2006) was equipped with 15 sample holders and each sample holder with 5 saliva-coated hydroxyapatite (HA) discs, recessed to a depth of 250 μm .

The sample holders were immersed in 50ml of dual-species bacteria suspension diluted in adhesion buffer with concentration of 6×10^8 bacteria/mL for *S. oralis* J22, and 2×10^8 bacteria/mL for *A. naeslundii* T14V-J1 for 30 min to allow bacteria to

adhere to the HA surface. Then, the sample holders were introduced to the CDFD device and biofilms were grown for 96 h at 37°C under continuous supply of modified BHI with a flow rate of 45mL/h.

Static Biofilm formation in confined space

HA discs (5mm diameter x 1mm thick) were made with a cylinder bench drill type KSD-8 (King, Montreal, Canada) and sliced with a diamond blade (Buehler Diamond Cut-Off Wheels 114243; Buehler, Lake Bluff, IL, USA).

CDFD holders with 5 sterile saliva-coated HA disks were immersed in a volumetric jar with 20 ml of dual-species bacteria suspension diluted in adhesion buffer with concentration of 3×10^8 bacteria/mL for *S. oralis* J22, and 1×10^8 bacteria/mL for *A. naeslundii* T14V-J1 for 30 min to allow bacterial adhesion to the HA surface.

Bacterial suspension was removed and 20ml of modified BHI was added and refreshed each 24h until 4 and 10-day grown biofilms were obtained.

Optical Coherence Tomography (OCT)

Thickness and behaviour of biofilms were analyzed with OCT scans. The biofilms were kept in a volumetric jar with adhesion buffer. Real time 2D cross-sections were acquired with an OCT scanner (Thorlabs, Newton, New Jersey, USA) using the FOV size of 45mm and refraction index of 1,33 and processed with ThorImage OCT software (Thorlabs, Newton, New Jersey, USA), before and after chemical challenge. OCT data comprise greyscale images representing a cross-section of a sample biofilm, measured based on low-coherence interferometry. Light scattering can be identified and measured accordingly, resulting in the identification of differently structured layers in the biofilm. A reduction of light penetration correlates to the distance of the surface (law of Lambert-Beer). Differences in biofilm structure can thus be visualised by differences in the greyscale.

To increase the reproducibility of the image analysis, ImageJ (Fiji) was used to calculate the distance in every column of pixels between the substrate and top of the biofilm. To improve the accuracy of the data, Otsu's method was selected to manage different thresholds in one image (Otsu 1979, Sezgin & Sankur 2004) resulting in the identification of different layers in the biofilm. The images were analysed in a 3-level Otsu threshold, creating 3 images corresponding to 3 layers in grey-level, linked to different layers of coherency in the biofilm, a) background, b) soft/coherent top layer

of the biofilm ('washy'), c) rigid/coherent layer ('rigid'). Validation by passaging the biofilm through an air-liquid interface (Gómez-Suárez et al. 2001), inducing high shear stress on biofilm (comparable to high flow rate irrigation (5ml/min), OCT images showed only a 'rigid' layer remaining on the substrate.

Biofilm behaviour 'real time' during contact with the medicaments was registered by OCT video.

Application of the medicament

Twenty samples of each type of biofilm were used, divided into 4 groups according to the medicament applied. Biofilms were challenged with either adhesion buffer (control), 2% NaOCl, 17% EDTA or 2% CHX, by applying 20uL medicament for 60s on the biofilm. Subsequently, samples were gently rinsed with adhesion buffer to neutralize the medicament used and removed from their holders for analysis. 2% NaOCl was neutralized with 4,23% $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (Sigma-Aldrich, St Louis, USA).

Low load compression testing (LLCT)

The thickness and the viscoelastic properties of the biofilms were measured with a low load compression tester (LLCT) (Paramonova et al. 2007, He et al. 2013). Briefly, the biofilms were compressed to a deformation of 20% in 1s which was held constant for 100s. The relaxation was monitored over time and normalized over the cross-sectional area of the plunger to calculate the induced stress. The percentage change in induced stress occurring within 100s from its initial value was termed the percentage stress relaxation. Measured relaxation curves for each biofilm were modelled using a generalized Maxwell model (He et al. 2013), in which $E(t)$ is the total stress expressed as the sum of four Maxwell elements with a spring constant E_i , and characteristic decay time, τ_i . Relative importance of each element, based on the value of its spring constant E_i , was expressed as the percentage of its spring constant to the sum of the spring constants of all elements at its unique decay time (τ, s).

Samples were submerged in buffer during measurements and due to the sensitivity of the weigh and to duration of the measurements (100s), the evaporation of the water was corrected.

Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM)

Biofilms were stained with live/dead stain (BacLight™, Invitrogen, Breda, The Netherlands) (1:3 ratio) for 20 min and with calcofluor white to stain the EPS (20 μ L/mL, 3.8 mM) for 10 min. After dye removal, biofilms were submerged in 15 mL adhesion buffer and kept protected from light until imaging.

A CLSM (Leica TCSSP2, Leica Microsystems GmbH, Heidelberg, Germany) was used to record a stack of images from two different randomly selected locations on each biofilm with a 8x40 water objective lens, with 1024x1024 pixels.

The ratio of red (disturbed bacterial cell wall integrity), green (intact bacterial cell wall), blue (EPS), and biovolume were analyzed with COMSTAT software (Heydorn et al. 2000, Vorregaard 2008). Penetration depth of the stain was $\pm 60 \mu\text{m}$; thus, only the top layer of the biofilm could be evaluated.

Statistical Analysis

Statistical analysis was performed in IBM SPSS Statistics (version 23). Differences in biofilm thickness, CLSM data and percentage of and viscoelasticity were evaluated after testing for normal distribution of the data. Data did not have a normal distribution and the Kruskal Wallis and Mann-Whitney U tests were used to determine statistical significance. The level of significance was set at $P < .05$.

RESULTS

All results are listed in Table: 1 and Figure 1-4. The most important findings are described below.

The following abbreviations are used:

- 4 days statically grown biofilm (4SB)
- 10 days statically grown biofilm (10SB)
- 4 days CDFE grown biofilm (CDFEB)

Matrix structural composition of the biofilms (Table 1, Figure 3)

LLCT

Results from LLCT showed 4 unique decay times (τ_i , s) based on the frequency for all sample groups measured, τ_1 : $0,01 < 0,5$ s, τ_2 : $0,5 < 3$ s, τ_3 : $3 < 100$ s, and τ_4 : > 100 s (Fig 1). Separating these groups based on their τ -values resulted in 4 spring constants (E1, E2, E3 and E4), which together make up the E_{total} for the biofilm related to the relaxation (R) of the biofilm. Three components (spring constants) were

identified in earlier publications and water in the biofilm was related to the fast component, EPS material to the intermediate component and bacteria to the slow component (He et al. 2013, Peterson et al. 2013). In this study, 2 fast components could be identified and therefore a division of the fast component in line with the description of hydrogels (Pasqui et al. 2012) is suggested as follows:

E1: fast moving or “free water”, physically hampered by the EPS chains with no real cohesive or adhesive force.

E2: relatively fast moving water or “bound water”: attached to polymer chain by hydration of polar functional groups (hydrogen bonds) or ion or ion groups (electrostriction) (cohesive or adhesive force).

E3: EPS related material.

E4: bacterial cells.

Height measurement using LLCT resulted in a slight underestimation compared to the OCT.

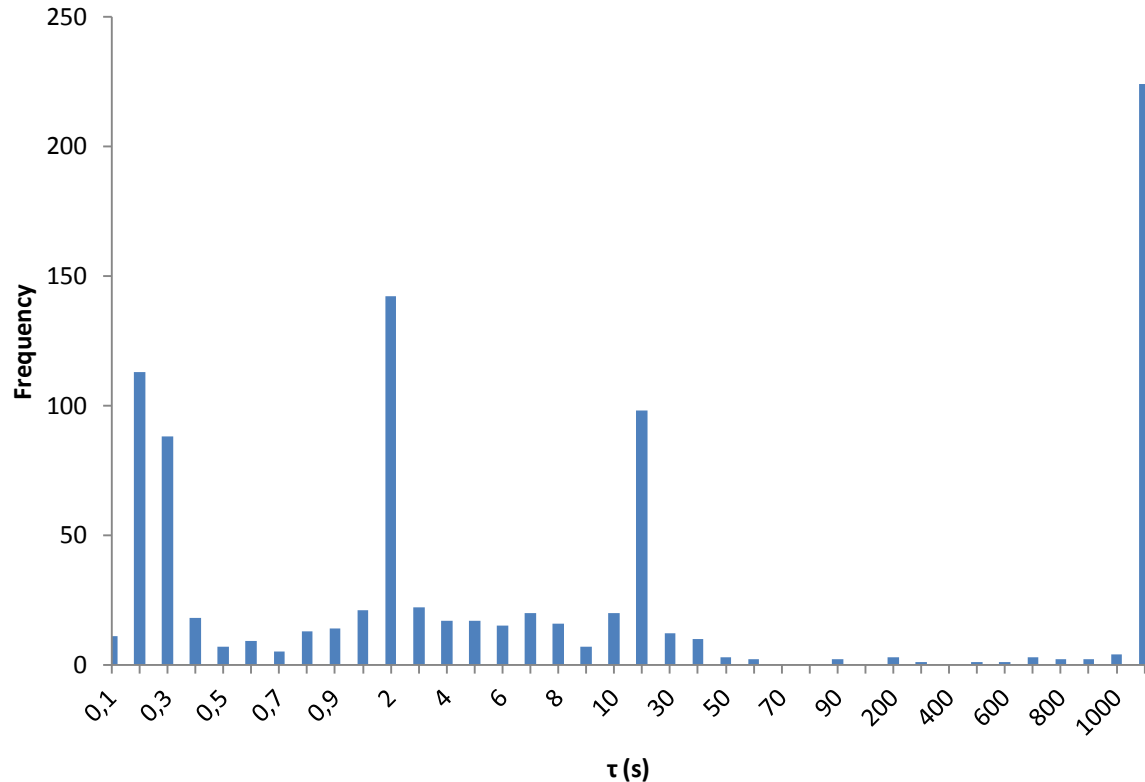


Figure 1. Frequency plot for all τ -values measured for all samples, showing the distribution and identification of the 4 different groups (τ_1 : $0,01 < 0,5$ s, τ_2 : $0,5 < 3$ s, τ_3 : $3 < 100$ s, and τ_4 : > 100 s).

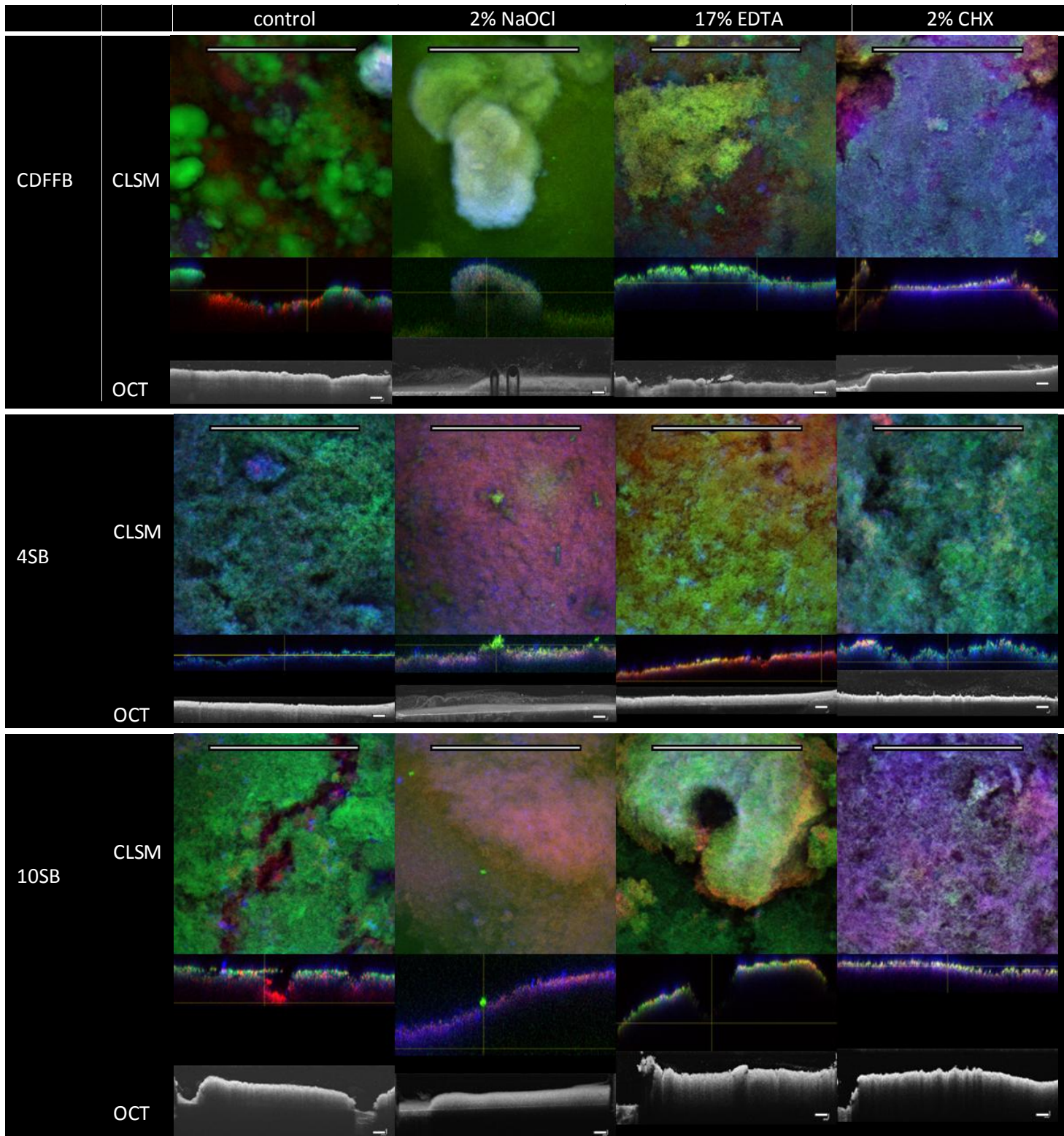


Figure2. The effect of buffer, 2% NaOCl, 17% EDTA and 2% CHX on *S. oralis* – *A. naeslundii* biofilms cultured during 4 days in the CDFF (CDFFB) or statically (4SB) and 10 days statically (10SB), imaged by CLSM and OCT. Scale bars represent 250 μm in length for both the CLSM and OCT images.

Table 1. Influences on the biofilm after statically or CDFFB growth and medicament challenges captured with LLCT (physical properties), CLSM (biovolume analysis) and OCT (non-invasive tomography).

			CDFFB	4SB	10SB
Control	LLCT	Thickness (μm)	234 \pm 50	191 \pm 86	464 \pm 186
		Relaxation (%)	69,7 \pm 8,5	~ 94,7 \pm 1,4 *	85,1 \pm 13,7
		influence E1 (%)	46,1 \pm 9,0	~ 65,2 \pm 7,7 *"	37,7 \pm 7,3 ~
		influence E2 (%)	20,4 \pm 7,4	" 23,5 \pm 3,8 "	32,9 \pm 4,8 *~
		influence E3 (%)	4,0 \pm 1,4	" 5,9 \pm 3,8 "	14,6 \pm 6,4 *~
	CLSM	influence E4 (%)	29,6 \pm 8,3	~ 5,4 \pm 1,2 *	14,8 \pm 13,3
		Live (%)	41,3 \pm 10,8	37,7 \pm 15,9	34,9 \pm 11,0
		Dead (%)	41,7 \pm 10,8	~" 15,8 \pm 16,1 *	20,9 \pm 12,1 *
		EPS (%)	17,0 \pm 15,5	~" 46,6 \pm 11,3 *	44,2 \pm 19,1 *
		OCT	Pre - Thickness (μm)	253 \pm 19	272 \pm 81
	Pre - Thickness Washy (μm)		0 \pm 10	1 \pm 14	0 \pm 10
	Post - Thickness (μm)		235 \pm 23	184 \pm 62	364 \pm 121
	Reduction (μm)		18 \pm 30	~" 88 \pm 36 *	111 \pm 82 *
	Reduction (%)		7 \pm 12	~" 32 \pm 11 *	21 \pm 9 *
	2% NaOCl	LLCT	Post - Thickness Washy (μm)	12 \pm 15	42 \pm 67
Thickness (μm)			202 \pm 17	124 \pm 69	243 \pm 34
Relaxation (%)			39,3 \pm 7,7	^{CX} 44,4 \pm 35,7	94,0 \pm 3,0 ^{CEx}
influence E1 (%)			23,3 \pm 7,5	^{CX} 20,0 \pm 23,3 ^{CX}	54,4 \pm 11,2 ^{CE}
influence E2 (%)			13,0 \pm 9,1	13,2 \pm 11,1	28,5 \pm 6,1
CLSM		influence E3 (%)	4,3 \pm 2,7	^E 19,2 \pm 14,9 ^X	10,9 \pm 4,8
		influence E4 (%)	59,4 \pm 11,0	^{CX} 47,6 \pm 33,4	6,2 \pm 2,7 ^{EX}
		Live (%)	53,1 \pm 36,5	31,5 \pm 7,5 ^X	16,3 \pm 14,7 ^C
		Dead (%)	20,6 \pm 29,7	^C 33,3 \pm 9,9	20,8 \pm 12,4
		EPS (%)	26,3 \pm 29,6	^X 35,2 \pm 17,1	63,0 \pm 23,0 ^C
OCT		Pre - Thickness (μm)	279 \pm 63	288 \pm 82	650 \pm 90
		Pre - Thickness Washy (μm)	6 \pm 6	0 \pm 5	0 \pm 34
		Post - Thickness (μm)	253 \pm 108	98 \pm 50	243 \pm 69
		Reduction (μm)	26 \pm 114	190 \pm 75	406 \pm 47 ^{CEx}
		Reduction (%)	8 \pm 43	~* 66 \pm 20 *	81 \pm 12 *
17% EDTA	LLCT	Post - Thickness Washy (μm)	49 \pm 15	^C 156 \pm 83 ^{CX}	22 \pm 11 ^{CEx}
		Thickness (μm)	251 \pm 107	114 \pm 57	382 \pm 121
		Relaxation (%)	54,9 \pm 17,9	^O 82,7 \pm 12,8	76,2 \pm 15,2 ^O
		influence E1 (%)	28,8 \pm 13,8	^{Ox} 47,9 \pm 19,6	38,6 \pm 6,2 ^O
		influence E2 (%)	13,5 \pm 9,7	32,5 \pm 19,8	25,6 \pm 10,6
	CLSM	influence E3 (%)	11,6 \pm 6,9	^{CO} 7,3 \pm 9,6	12,7 \pm 3,7
		influence E4 (%)	46,1 \pm 18,1	12,3 \pm 9,5	23,1 \pm 14,3 ^O
		Live (%)	62,8 \pm 20,8	^{CX} 34,2 \pm 16,8	30,9 \pm 21,3
		Dead (%)	20,8 \pm 15,1	^C 44,1 \pm 17,9 ^C	20,4 \pm 21,3
		EPS (%)	16,4 \pm 18,0	^X 21,8 \pm 17,2 ^C	48,7 \pm 8,3
	OCT	Pre - Thickness (μm)	138 \pm 104	195 \pm 39	673 \pm 259
		Pre - Thickness Washy (μm)	64 \pm 98	9 \pm 10	0 \pm 43
		Post - Thickness (μm)	140 \pm 92	161 \pm 37	499 \pm 194
		Reduction (μm)	74 \pm 78	^C 34 \pm 40 ^O	174 \pm 86 ^O
		Reduction (%)	37 \pm 39	15 \pm 17	27 \pm 6
2% CHX	LLCT	Post - Thickness Washy (μm)	54 \pm 68	86 \pm 18	0 \pm 18 ^O
		Thickness (μm)	262 \pm 41	143 \pm 56	449 \pm 77
		Relaxation (%)	70,7 \pm 16,1	^O 87,1 \pm 7,2 ^C	89,2 \pm 1,7 ^O
		influence E1 (%)	47,4 \pm 14,1	^{OE} 66,3 \pm 22,5 ^O	43,2 \pm 4,4
		influence E2 (%)	18,3 \pm 6,2	18,8 \pm 17,8	33,3 \pm 2,0
	CLSM	influence E3 (%)	5,9 \pm 3,8	2,7 \pm 2,1 ^O	12,6 \pm 2,5
		influence E4 (%)	28,4 \pm 15,3	^O 12,1 \pm 6,4 ^C	10,9 \pm 2,0 ^O
		Live (%)	37,2 \pm 11,7	^E 23,7 \pm 6,7 ^O	26,5 \pm 8,6
		Dead (%)	17,5 \pm 13,5	^C 33,7 \pm 8,4	27,2 \pm 7,7
		EPS (%)	45,4 \pm 8,0	^{COE} 42,7 \pm 7,9	46,3 \pm 5,8
	OCT	Pre - Thickness (μm)	309 \pm 92	204 \pm 44	869 \pm 64
		Pre - Thickness Washy (μm)	6 \pm 5	15 \pm 19	0 \pm 11
		Post - Thickness (μm)	252 \pm 92	148 \pm 38	652 \pm 24
		Reduction (μm)	57 \pm 50	56 \pm 47 ^O	217 \pm 59 ^O
		Reduction (%)	18 \pm 15	23 \pm 20	27 \pm 6
		Post - Thickness Washy (μm)	74 \pm 90	41 \pm 79 ^{OE}	0 \pm 4 ^O
Mann-Whitney U-test P-values > 0,05:			CDFFB *	Control ^C	
			4SB ~	NaOCl ^O	
			10SB "	EDTA ^E	
				CHX ^X	

The three different matrix structural compositions of the biofilms were confirmed by the analysis. The LLCT data revealed that the relative importance of the influence of the free water (E1) was significantly higher in the 4SB compared to the 10SB and the CDFFB ($p=.009/p=.0018$ respectively). On the other hand, the relative importance of the influence of the bacterial cells (E4) was higher in the CDFFB compared to the 4SB ($p=.006$) and almost compared to the 10SB ($p=.06$), which was also confirmed by the CLSM results ($p=.005$ for both 4SB and 10SB). The relative importance of the influence of bound water (E2) and EPS (E3) is significantly higher in the ‘older’ 10SB compared to the ‘younger’ 4SB and the CDFFB ($p=.016/p=.028$ and $p=.018$ and $p=.006$ respectively).

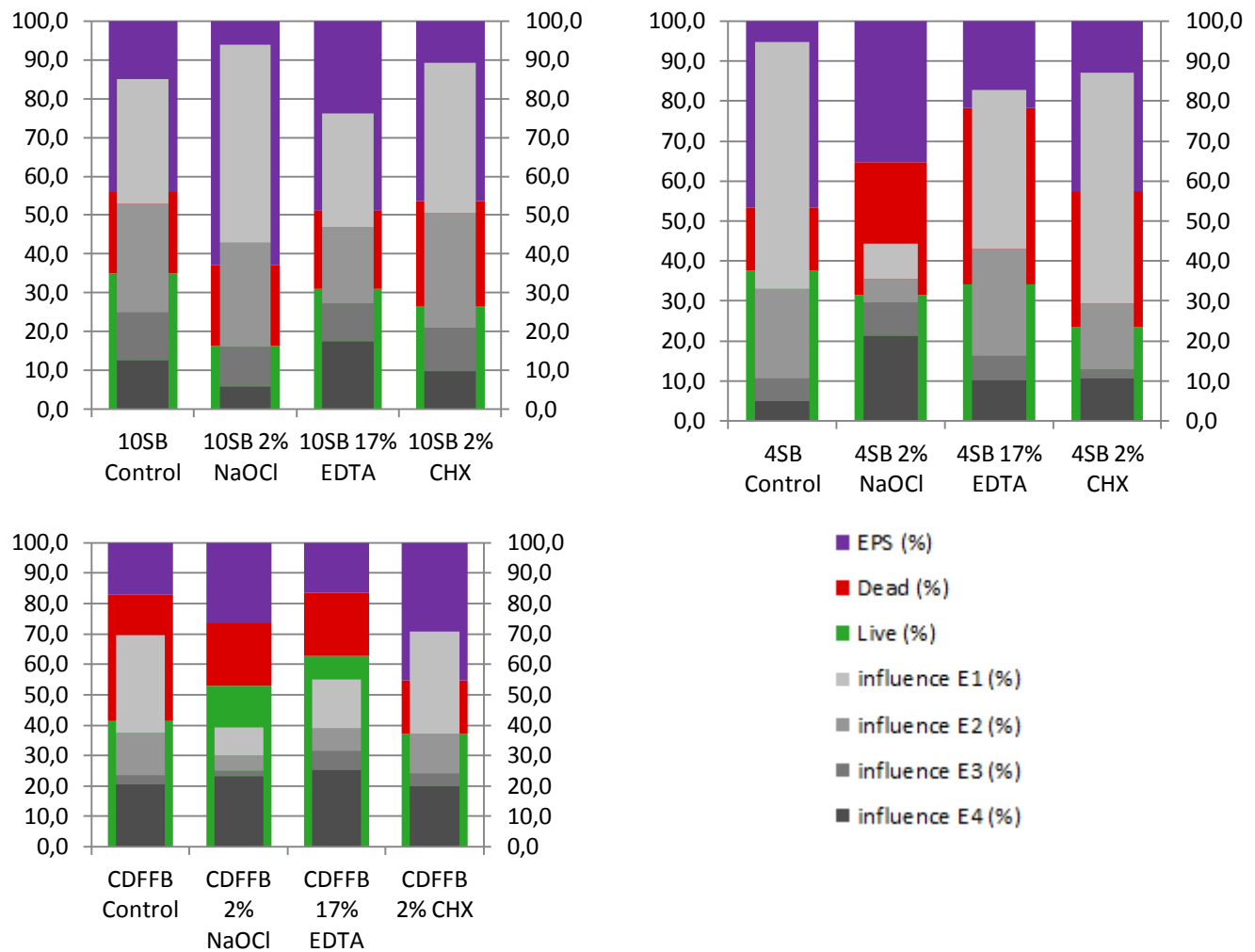


Figure 3. Representation of the relaxation subdivided according to the percentage influence of the four different E's. Backdrop shows the distribution % live (green), % dead (red) and % EPS (purple) of the remaining biofilm.

R was higher in 4SB than CDFFB showing an inverse correlation with the E4, the higher the R the lower the E4 ($p = .004/p=.004$ respectively).

Chemical effect NaOCl (Table 1, Fig.2-4)

Height reduction of the rigid biofilm layer was for NaOCl the most pronounced of all the medicaments tested and higher in 4SB and 10SB than CDFFB ($p=.028/.016$) with a particularly pronounced washy layer in the 4SB. For CDFFB, although the rigid layer was almost unchanged, the washy layer was significantly higher and R and E1 were lower ($p=.006$) and the E4 higher ($p=.006$).

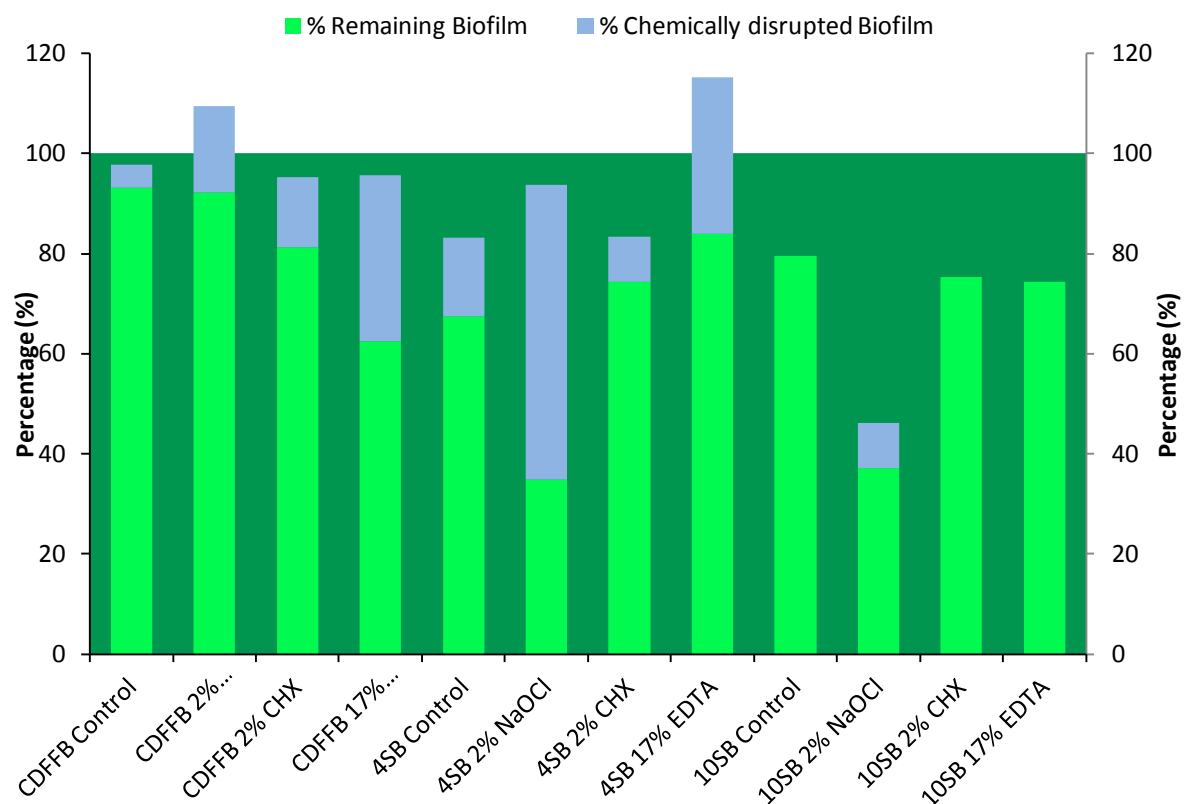


Figure 4. The percentage remaining biofilm (blue: washy layer, green: rigid layer) for the different types of biofilm (CDFFB, 4SB and 10SB) after application of control and medicaments (Control, 2% NaOCl, 2% CHX or 17% EDTA). Backdrop represents the original biofilm at 100% thickness.

Chemical effect CHX (Table 1, Fig.2-4)

Height reduction due to contraction of the biofilm was almost significantly higher for CDFFB ($p=.05$). In the top layer of the remaining biofilm after CHX application especially for CDFFB, EPS was more present ($p=.003$) and had a denser appearance in OCT images. For 4SB the relaxation was lower ($p=.006$) en E4 was higher ($p=.006$).

OCT 'real time' video showed contraction of the biofilm after application of CHX.

Chemical effect EDTA (Table 1, Fig.1-4)

CDFFB biofilms showed a significant height reduction of the rigid biofilm layer ($p=.022$) and some small structural differences, but no significant change in washy layer thickness.

DISCUSSION

A differentiation between high-density bacterial cell biofilms and water-rich biofilms could be made using LLCT. In earlier publications the fast spring constant was associated with $\tau < 3$ s. In this study, 4 spring constants were disclosed of which the first 2 fitted in the fast range $\tau_1: 0,01 < 0,5$ s and $\tau_2: 0,5 < 3$ s ; therefore two fast Maxwell elements were defined. Taking into consideration the structural similarities regarding viscoelasticity between biofilms and hydrogels, the 2 fast components were explained by different water binding possibilities in the biofilm: physically entrapped in or bound to the EPS structure (Pasqui et al. 2012). Hydrophilic polysaccharide chains and possibly proteins maintain the highly hydrated microenvironment around the biofilm by absorption of water into the biofilm (Flemming & Wingender 2010). Younger biofilms tend to have a more 'fluffy', less dense structure with higher diffusion coefficients than older or CDFF grown biofilms (Laspidou & Rittmann 2004, Renslow et al. 2010). Therefore, in 4SB, the relative importance of the E1 component was higher than in CDFFB and 10SB. Furthermore, the importance of the E4 component was higher in the CDFFB, which was in line with the CLSM data showing more dead cells in the top layer of CDFFB. These observations are in accordance with the mode of biofilm growth in the CDFF system, where the continuous compaction by the polytetrafluoroethylene scrapers after biofilms have formed and reached the pre-determined height (steady-state biofilm) could account for the dense bacterial cell arrangement within the biofilm as well as for the death in the upper layer of the biofilm (Hope & Wilson 2006, He et al. 2013). In 10SB, the E2 and E3 components were significantly higher than in the other biofilms, indicating both the presence of more viscous water molecules bound to the EPS structure as well as more viscous EPS material.

Resistant spots with a higher cell density (Beer et al. 1994) and stratification of the biofilm resulting in a fluffier layer at the top and a more compact layer at the bottom of the biofilm (Derlon et al. 2008) have been described in the literature. The biofilms used in this study mimicked the structure of the different layers of the biofilm, with the

CDFB grown biofilm representing the viscoelastic properties of the basal cell dense layer of an oral biofilm (He et al. 2013) and the 4 day static grown biofilm representing the fluffier structured top layer.

OCT

OCT seems to be a reliable method to measure biofilm thickness and structure. A clear distinction between a soft (washy) and rigid layered biofilm could be made and was validated in this study. The washy layer showed in general a tendency to increase in comparison to the control, representing a chemical effect of the biofilm other than dissolution. Also, the possibility of real-time imaging is a promising tool. For the first time the contraction of the biofilm during CHX application (Hope & Wilson 2004, Shen et al. 2016) was clearly visualised. More information on the structure or viscosity is captured in the OCT data but more research is needed to clarify the images.

Evaluation of the antimicrobials

NaOCl

The effect of NaOCl depends on the structure of the biofilm. NaOCl dissolved the same percentage of biofilm mass (rigid layer) from 4SB and 10SB, with the bio-removal effect being significantly more pronounced compared to cell-rich CDFB (66%, 81% and 8% respectively). Although NaOCl did not affect the height of CDFB, the structure did significantly change resulting in a biofilm with lower relaxation and less water.

NaOCl removes more biofilm mass than CHX and EDTA, which is in line with earlier publications (Chavez de Paz et al. 2010, Ordinola-Zapata et al. 2012, Tawakoli et al. 2015).

CHX 2%

CHX is more effective on a bacterial cell rich biofilm. This is in agreement with the conclusion of He et al. (2013), who concluded that a 0.2% CHX solution was less effective when the importance of the E1/E2 component was higher and the E4 lower. The results are also in line with the CLSM observation, according to which only in the remaining CDFB the percentage of dead cells was lower, thereby indicating more pronounced effect of CHX in cell rich biofilms.

Reduction of the height of the biofilm was not caused by chemical dissolution of the biofilm but by contraction of the biofilm which has already been shown (Hope and Wilson 2004, Shen et al. 2016). Whether the biofilm contraction is related to biofilm stiffening demonstrated after 0.2% CHX treatment has to be elucidated (Brindle et al. 2011).

EDTA

The rigid layer of the CDFFB was significantly reduced in height ($p=.022$). Furthermore, the remaining biofilm of CDFFB and 4SB showed some structural changes. The former contained a higher washy layer, a higher percentage of E3 and less dead cells in the remaining biofilm than its control ($p=.042, .01, .013$) and the latter more dead cells and EPS in the top layer ($p= .014, .014$) and a tendency to an increase in the rigid and washy layer.

Finally, the reported underestimation of biofilm thickness measured by LLCT is probably due to the intrinsic characteristics of the LLCT method, whereby the application of load is needed for the mechanical detection of the biofilm.

CONCLUSION

The structure of the biofilm has an influence on the effect of different antimicrobials. There was a significant difference in their chemical effect between high-density bacterial cell and water-rich biofilms. Also the working mechanisms of the chemical effect on the biofilm of the tested antimicrobial was different. The antimicrobials can have an effect on the remaining biofilm. OCT seems to be an interesting method to evaluate the structure of biofilms.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank the Scientific and Technological National Council (CNPq), Ministry of Science & Technology Brazil, that funded the doctoral scholarship for the first author.

REFERENCES

De Beer D, Srinivasan R, Stewart PS. 1994. Direct measurement of chlorine penetration into biofilms during disinfection. *Appl Environ Microbiol.* 60(12):4339-4344.

Brindle ER, Miller DA, Stewart PhS. 2011. Hydrodynamic Deformation and Removal of *Staphylococcus epidermidis* Biofilms Treated With Urea, Chlorhexidine, Iron Chloride, or DispersinB. *Biotechnol Bioeng.* 108(12):2968-2977.

Busscher HJ, Jager D, Finger G, Schaefer N, van der Mei HC. 2010. Energy transfer, volumetric expansion, and removal of oral biofilms by non-contact brushing. *Eur J Oral Sci.* 118(2):177-182.

Chávez de Paz LE, Bergenholtz G, Svensäter G. 2010. The effects of antimicrobials on endodontic biofilm bacteria. *J Endod* 36(1):70-77.

Derlon N, Masse A, Escaudie R, Bernet N, Paul E. 2008. Stratification in the cohesion of biofilms grown under various environmental conditions. *Water Res.* 42(8-9):2102-2110.

Flemming HC, Wingender J. The biofilm matrix. 2010. *Nat Rev Microbiol.* 8(9): 623-633.

Gómez-Suárez C, Busscher HJ, van der Mei HC. 2001. Analysis of bacterial detachment from substratum surfaces by the passage of air-liquid interfaces. *Appl Environ Microbiol.* 67(6):2531-7.

He Y, Peterson BW, Jongsma MA, Ren Y, Sharma PK, Busscher HJ, Van der Mei HC. 2013. Stress relaxation analysis facilitates a quantitative approach towards antimicrobial penetration into biofilms. *PLoS One.* [accessed 2017 feb 16]; 8(5):e63750.
<http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0063750>. doi: 10.1371/journal.pone.0063750.

Heydorn A1, Nielsen AT, Hentzer M, Sternberg C, Givskov M, Ersbøll BK, Molin S. 2000. Quantification of biofilm structures by the novel computer program COMSTAT. *Microbiology.* 146(Pt 10):2395-2407.

Hope CK, Wilson M. 2004. Analysis of the Effects of Chlorhexidine on Oral Biofilm Vitality and Structure Based on Viability Profiling and an Indicator of Membrane Integrity. *Antimicrob Agents Chemother.* 48(5):1461–1468.

Hope CK, Wilson M. 2006. Biofilm structure and cell vitality in a laboratory model of subgingival plaque. *J Microbiol Methods.* 66(3):390–398.

Klapper I, Rupp CJ, Cargo R, Purvedorj B, Stoodley P. 2002. Viscoelastic fluid description of bacterial biofilm material properties. *Biotechnol Bioeng.* 80(3):289-296.

Koo H, Falsetta ML, Klein MI. 2013. The Exopolysaccharide Matrix: A Virulence Determinant of Cariogenic Biofilm. *J Dent Res.* 92(12):1065-1073.

Körstgens V, Flemming H-C, Wingender J, Borchard W. 2001. Uniaxial compression measurement device for investigation of the mechanical stability of biofilms. *J Microbiol Meth* 46(1): 9-17.

Lapidou CS, Rittmann BE. 2004. Evaluating trends in biofilm density using the UMCCA model. *Water Res.* 38(14-15):3362-3372.

Nair PN, Henry S, Vera J. 2005. Microbial status of apical root canal system of human mandibular first molars with primary apical periodontitis after "one-visit" endodontic treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Path Oral Radiol Endod.* 99(2):231-252.

Ohsumi T, Takenaka S, Wakamatsu R, Sakaue Y, Narisawa N, Senpuku H, Ohshima H, Terao Y, Okiji T. 2015. Residual structure of *Streptococcus mutans* biofilm following complete disinfection favors secondary bacterial adhesion and biofilm re-development. *PLoS One.* [accessed 2017 feb 16]; 10(1):e0116647. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4312048/pdf/pone.0116647.pdf>. doi: 10.1371/journal.pone.0116647.

Ordinola-Zapata R, Bramante CM, Cavenago B, Graeff MS, Gomes de Moraes I, Marciano M, Duarte MA. 2012. Antimicrobial effect of endodontic solutions used as final irrigants on a dentine biofilm model. *Int Endod J.* 45(2):162-168.

Otsu N. 1979. "A threshold selection method from gray-level histograms. *IEEE Trans Sys Man Cyber.* 9(1):62-66.

Paramonova E, de Jong ED, Krom BP, Van der Mei HC, Busscher HJ, Sharma PK. 2007. Low-load compression testing: a novel way of measuring biofilm thickness. *Appl Environ Microbiol.* 73(21):7023-7028.

Pasqui D, de Cagna M, Barbucci R. 2012. Polysaccharide-Based Hydrogels: The Key Role of Water in Affecting Mechanical Properties. *Polymers* 4(3):1517-1534.

Peterson BW, van der Mei HC, Sjollem J, Busscher HJ, Sharma PK. 2013. A Distinguishable Role of eDNA in the Viscoelastic Relaxation of Biofilms. *MBio.* [accessed 2017 feb 16]; 4(5):e00497-00513. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3812712/>. doi: 10.1128/mBio.00497-13.

Peterson BW, He Y, Ren Y, Zerdoum A, Libera MR, Sharma PK, van Winkelhoff A-J, Neut D, Stoodley P, van der Mei HC, Busscher HJ. 2015. Viscoelasticity of biofilms and their recalcitrance to mechanical and chemical challenges. *FEMS Microbiol Rev.* 39(2):234-245.

Renslow RS, Majors PD, McLean JS, Fredrickson JK, Ahmed B, Beyenal H. 2010. In Situ Effective Diffusion Coefficient Profiles in Live Biofilms Using Pulsed-Field Gradient Nuclear Magnetic Resonance. *Biotechnol Bioeng.* 106(6):928-37.

Shen Y, Zhao J, de la Fuente-Núñez C, Wang Z, Hancock RIW, Roberts CR, Ma J, Li J, Haapasalo M, Wang Q. 2016. Experimental and Theoretical Investigation of

Multispecies Oral Biofilm Resistance to Chlorhexidine Treatment. Scientific Report. [accessed 2017 feb 16]; 6:27537.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4914838/pdf/srep27537.pdf>. doi: 10.1038/srep27537.

Sezgin M, Sankur B. 2004. Survey over image thresholding techniques and quantitative performance evaluation. *J Electron Imaging*. 13(1):146–165.

Stewart PS, Franklin MJ. 2008. Physiological heterogeneity in biofilms. *Nature Rev Microbiol*. 6:199-210.

Tawakoli PN, Ragnarsson KT, Rechenberg DK, Mohn D, Zehnder M. 2015. Effects of endodontic irrigants on biofilm matrix polysaccharides. *Int Endod J*. 50(2):153-160.

Vorregaard, M. 2008. Comstat2 - a modern 3D image analysis environment for biofilms, in *Informatics and Mathematical Modelling* [dissertation]. [Kongens Lyngby (Denmark)]: Technical University of Denmark.

4.2 ARTIGO 2

**Busanello FH, Petridis X, Dijkstra RJB, Pillar R, Só MVR, van der Sluis LWM.
The effect of time and volume on the chemical efficiency and efficacy of a 2%
sodium hypochlorite solution on a biofilm.**

Formatado para submissão no *International Endodontic Journal*

The effect of time and volume on the chemical efficiency and efficacy of a 2% sodium hypochlorite solution on a biofilm.

Running title: NaOCl time and volume on a biofilm

F.H. Busanello¹, X. Petridis², R.J.B. Dijkstra², R. Pillar³, M.V.R. Só¹ & L.W.M. van der Sluis²

¹ *Department of Restorative Dentistry, Rio Grande do Sul Federal University, Porto Alegre, RS, Brazil*

² *Department for Dentistry and Oral Hygiene, University Medical Center Groningen, University of Groningen, Groningen, the Netherlands*

³ *Department of Stomatology, Santa Maria Federal University, Santa Maria, RS, Brazil*

Keywords: biofilms, endodontic, sodium hypochlorite, root canal irrigant, optical coherence tomography, visco-elastic

Correspondence: L.W.M. van der Sluis, Center for Dentistry and Oral Hygiene , University Medical Center Groningen, Groningen, the Netherlands (Tel.: + 3150 363 2654; e-mail: l.w.m.van.der.sluis@umcg.nl).

The effect of time and volume on the chemical efficiency and efficacy of a 2% sodium hypochlorite solution on a biofilm.

Abstract

Aim To investigate the influence of application time and volume on the chemical efficiency and efficacy of a 2% sodium hypochlorite solution against a standardized dual-species biofilm using a realistic contact surface area between the biofilm substrate and a 2% NaOCl solution.

Methodology A standardized biofilm grown on saliva coated hydroxyapatite (HA) discs in standardized sample holders was brought in contact with different volumes of a 2% sodium hypochlorite solution for different time intervals. The effect on the biofilm was evaluated using Low Load Compression Testing (testing of visco-elastic properties), Optical Coherence Tomography (evaluating the height and structure of the biofilm) and Confocal Laser Scanning Microscopy (testing the amount biofilm matrix and the status of the microorganisms).

Results Increasing the application time improves the chemical efficacy, whereas increasing the applied volume increases the chemical efficiency of a 2% sodium hypochlorite solution against standardized biofilms grown in confined spaces. Increasing the volume will dissolve biofilm significantly faster in areas which are difficult to reach.

Conclusions The aspects of application time and irrigant volume should be taken into account in devising effective strategies for dissolving and disrupting the biofilm structure and/or influencing the biofilm structure of the remaining biofilm.

Introduction

Sodium hypochlorite (NaOCl) is widely used as root canal irrigant (Dutner et al. 2012). It dissolves organic tissue and has an antimicrobial and antibiofilm effect (Sirtes et al. 2005, Chávez de Paz et al. 2010, Tawakoli et al. 2015). The chemical effects of a NaOCl solution during root canal irrigation are regulated by convection (flow of an irrigant) and diffusion. The reaction rate (chemical efficiency) and/or tissue dissolution (chemical efficacy) of NaOCl are significantly influenced by the concentration, exposure time, laser/ultrasonic energy (Macedo et al. 2010, 2014a), the contact area between the substrate and the irrigant (Rosenfeld et al. 1978, Moorer and Wesselink 1982), pH (Jungbluth et al. 2011, Macedo et al. 2014b), temperature (Sirtes et al. 2005), interaction with other chemicals (Shiozawa 2000, Zehnder *et al.* 2002, 2005) and volume.

Among these factors, the irrigant exposure time, the volume and the contact area between the irrigant solution and the targeted substrate often go unnoticed in the methodological design of the majority of the experimental studies. Indeed, the effect of the volume of a NaOCl solution on its chemical efficacy or efficiency during diffusion is currently not known. Also, the spatial constraints posed by the root canal system arguably limit the contact area thereby hampering the chemical effect of NaOCl (Macedo et al. 2014a,b). In this study the effect of application time and volume during diffusion in combination with a realistic contact surface between the NaOCl solution and the biofilm substrate have been taken into account.

Due to the complex anatomy of the root canal system and the recalcitrance of the biofilm, complete removal of biofilm during chemo-mechanical treatment is not possible (Nair et al., 2005, Ricucci & Siqueira 2008, 2010). However, the chemical efficiency and efficacy of a NaOCl solution on a biofilm will affect the amount of biofilm structure removed, the amount of living or dead bacteria present in the biofilm and the structure of the remaining biofilm as this is reflected on its visco-elastic properties. Visco-elastic properties can also be seen as a virulence factor (Peterson et al. 2015). All these aspects could possibly influence the virulence of the remaining biofilm and were evaluated in this study by Optical Coherence Tomography (OCT), a non-invasive imaging method illustrating the structure of the biofilm, Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM) and Low Load Compression Testing (LLCT), an indirect mechanical approach capturing the visco-elastic behaviour of biofilms via stress relaxation measurements (Peterson et al. 2013). Furthermore, it has been

knowledge of the behaviour or influence of the biofilmmatrix on mechanical and chemical stresses is important (Koo et al. 2013). OCT and LLCT can contribute to the investigation of the behaviour or influence of the matrix of the biofilm by providing qualitative and quantitative measurements of the effect of NaOCl on the removed and remaining biofilm matrix.

The aim of this study was to evaluate the influence of application time and volume on the chemical efficiency and efficacy of a 2% NaOCl solution against a standardized dual-species biofilm using a realistic contact surface area between the biofilm substrate and a 2% NaOCl solution. Qualitative and quantitative measurements were taken with the aid of Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM), Optical Coherence Tomography (OCT) and Low Load Compression Testing (LLCT) and the measured outcomes were:

- percentage dead/live bacteria and EPS by Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM),
- structure of biofilm differentiating between a soft/coherent (*'washy'*) or rigid/coherent (*'rigid'*) layer by OCT,
- height of the biofilm washy and rigid layer before and after exposure to the antimicrobials by 2D OCT scans and videos,
- viscoelastic properties of the biofilm expressed by the percentage of stress relaxation in the biofilm related to a certain time interval using LLCT.

The null hypothesis was that application time and volume of NaOCl irrigation do not have any influence on the chemical effect of NaOCl.

Method and Materials

Bacterial strains and growth conditions

The clinical isolates *S. oralis* J22 and *A. naeslundii* T14V-J1 were grown as described previously by He et al. 2013. Briefly, the bacteria were streaked on blood agar plates and a single colony was used to inoculate 10 mL modified Brain Heart Infusion broth (37.0 g/L BHI, 1.0 g/L yeast extract, 0.02 g/L NaOH, 0.001 g/L Vitamin K1, 5 mg/L L-cysteine-HCl, pH 7.3) (BHI, Oxoid Ltd., Basingstoke, Hampshire, UK). Subsequently, *S. oralis* J22 were cultured at 37°C for 24 h in ambient air and *A. naeslundii* T14V-J1 at 37°C for 48h in an anaerobic chamber (pre-cultures).

Pre-cultures were used to inoculate 50 mL modified BHI (1:20 dilution) and grown for 16 h (main cultures). Bacteria were harvested by centrifugal force (6350 xg) and

washed twice in sterile adhesion buffer (0.147 g/L CaCl₂, 0.174 g/L K₂HPO₄, 0.136 g/L KH₂PO₄, 3.728 g/L KCl, pH 6.8). The bacterial pellets were suspended in 10ml sterile adhesion buffer and sonicated intermittently in ice-water for 3 × 10 s at 30 W (Vibra cell model 375, Sonics and Materials Inc., Newtown, CT, USA) to break bacterial chains. Bacteria were counted in a Bürker-Türk counting chamber (Marienfeld-Superior, Germany) to determine the concentration and diluted in sterile adhesion buffer.

Freeze dried whole saliva from at least 20 healthy volunteers of both genders was dissolved in 30 ml adhesion buffer (1.5 g/L), stirred for 2 h and centrifuged at 10.000 rpm, 10°C for 5 min and the discs used for biofilm growth were exposed to the reconstituted saliva for 14 hrs at 4°C under static condition. All volunteers gave their informed consent to saliva donation, in agreement with the guidelines set out by the Medical Ethical Committee at UMG, Groningen, The Netherlands (letter 06-02-2009).

Biofilm formation in CDFF

The CDFF (Hope & Wilson, 2006) was equipped with 15 sample holders and each sample holder included 5 saliva coated hydroxyapatite (HA) discs, recessed to a depth of 250 µm.

Two hundred ml of dual-species bacteria suspension diluted in adhesion buffer with concentration of 6 × 10⁸ bacteria/mL for *S. oralis* J22, and 2 × 10⁸ bacteria/mL for *A. naeslundii* T14V-J1 was introduced in the CDFF over 1 h, while the CDFF table with the holders was in constant slow rotation. Subsequently, the rotation was stopped for 30 min to allow bacteria to adhere to HA surface. Then, rotation was resumed and the biofilms were grown for 96 h at 37°C under continuous supply of modified BHI with a rate of 45 mL/h.

Application of the NaOCl solution

Five biofilms were challenged with 2% NaOCl (Sigma-Aldrich, The Netherlands) using 20 or 40 µl and an application time of 60, 120 or 300s. After the challenge, the remaining NaOCl was neutralised using a sodium 4,23% thiosulfate solution (Na₂S₂O₃, Sigma-Aldrich, The Netherlands). To ensure the proper concentration/dilution of the NaOCl, a titration assay was performed before every experiment.

Convection control

Challenging five biofilm with 20 or 40ul of adhesion buffer for 60s. created a baseline influence of the chemical influence of adhesion buffer and the convection created during the application procedure.

Low load compression testing (LLCT)

The thickness and the visco-elastic properties of the biofilms were measured with a low load compression tester (LLCT) (Paramonova et al. 2007, He et al. 2013). Briefly, the biofilms were compressed to a deformation of 20% within 1 s, after which compression was held constant for 100 s. The relaxation was monitored over time and normalized over the cross-sectional area of the plunger to calculate the induced stress. The percentage change in induced stress occurring within 100 s from its initial value was termed the percentage stress relaxation. Measured relaxation curves for each biofilm were modelled using a generalized Maxwell model (He et al. 2013), in which $E(t)$ is the total stress expressed as the sum of four Maxwell elements with a spring constant E_i , and characteristic decay time, τ_i . Relative importance of each element, based on the value of its spring constant E_i , was expressed as the percentage of its spring constant to the sum of the spring constants of all elements at its unique decay time (τ , s).

Samples were submerged in buffer during measurements and due to the sensitivity of the weigh and the duration of the measurements (100 s), the evaporation of the water was corrected.

Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM)

Biofilms were stained with live/dead stain (BacLight™, Invitrogen, Breda, The Netherlands) in a proportion of 1/3 for 20 min and with calcofluor white to stain the EPS (20 μ L/mL, 3.8 mM) for 10 min. After removal of the staining, biofilms were submerged in 15 mL adhesion buffer and kept protected from light until imaging.

A CLSM (Leica TCSSP2, Leica Microsystems GmbH, Heidelberg, Germany) was used to record a stack of images from two different randomly selected locations on each biofilm with an 8x40 water objective lens, with 1024x1024 pixels.

The ratio of red (dead bacteria), green (live bacteria), blue (EPS), and the biovolume were analyzed with COMSTAT software (Heydorn et al. 2000, Vorregaard 2008).

Optical Coherence Tomography (OCT)

Thickness and behaviour of biofilms were analyzed with OCT scans. The biofilms were analyzed in real time 2D cross-sections submerged in adhesion buffer with an OCT equipment (Thorlabs, Newton, New Jersey, USA) using the FOV size of 45mm, refraction index of 1,33 and processed with ThorImage OCT software (Thorlabs, Newton, New Jersey, USA).

OCT data comprise greyscale images representing a cross-section of a sample biofilm, measured based on low-coherence interferometry. Light scattering can be identified and measured accordingly, resulting in the identification of differently structured layers in the biofilm. A reduction of light penetration correlates to the distance of the surface (law of Lambert-Beer). Differences in biofilm structure can thus be visualised by differences in the greyscale.

To increase the reproducibility of the image analysis, ImageJ (Fiji) was used to calculate the distance in every column of pixels between the substrate and top of the biofilm. To improve the accuracy of the data, Otsu's method was selected to manage different thresholds in one image (Otsu 1979, Sezgin & Sankur 2004) resulting in the identification of different layers in the biofilm. The images were analysed in a 3-level Otsu threshold, creating 3 images corresponding to 3 layers in grey-level, linked to different layers of coherency in the biofilm, a) background, b) soft/coherent top layer of the biofilm ('washy'), c) rigid/coherent layer ('rigid'). Validation by passing the biofilm through an air-liquid interface (Gómez-Suárez et al. 2001), inducing high shear stress on biofilm (comparable to high flow rate irrigation (5ml/min), OCT images showed only a 'rigid' layer remaining on the substrate.

Statistical Analysis

Statistical analysis was performed in IBM SPSS Statistics (version 23). Differences in biofilm thickness, CLSM data and percentage of and viscoelasticity were evaluated after testing for normal distribution of the data. Data did not have a normal distribution and the Kruskal Wallis and Mann-Whitney U test were used to determine statistical significance. The level of significance was set at $P < .05$.

Results

The results are presented in Table 1 and Figure 2 and 3. The most important findings are described below.

Effect of administration of 20 μ l NaOCl during 60 and 120 seconds on visco-elastic properties compared to the control

In comparison to the control (administration of 60 seconds of buffer) after 60 seconds administration of NaOCl solution the relaxation and the E1 were significant lower ($p=.006$ for both) and the E4 significant higher ($p=.006$) than the control. After 120 seconds of NaOCl administration the E1 is almost significant lower ($p=.068$) and the E3 significant higher than the control ($p=.017$).

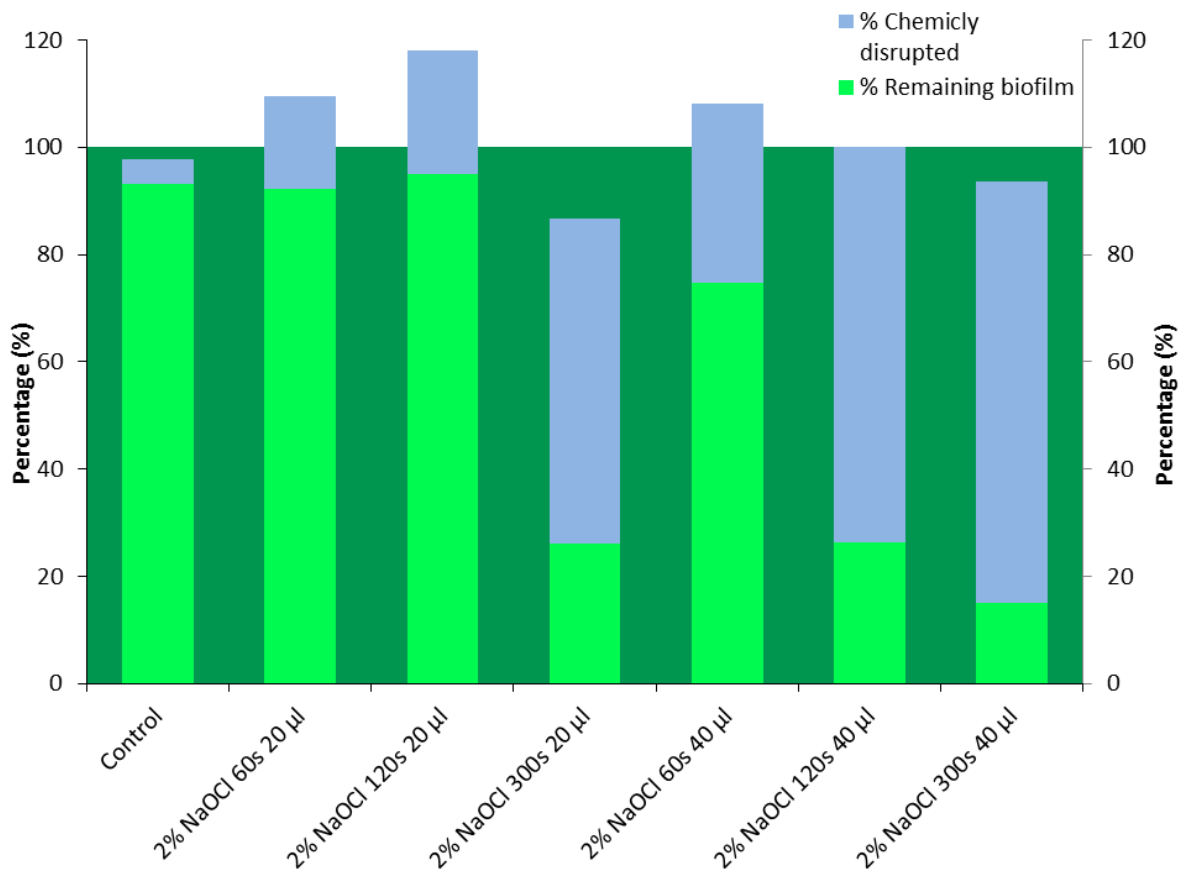


Figure 1 The percentage remaining biofilm and its corresponding percentage of chemical disruption for the different incubation times (60, 120 and 300s) and volumes applied (20 or 40 μ l). Backdrop represents the original biofilm at 100% thickness.

Effect of application time upon 20µl NaOCl administration (Table 1, Figure 1-3)

After 300 seconds significantly more rigid layer of the biofilm structure was dissolved compared to 120 seconds ($p = .017$). No significant difference could be seen between 60 and 120 seconds ($p=.086$). There was a tendency for the washy layer to increase in size.

Effect of application time upon 40µl NaOCl administration (Table 1, Figure 1-3)

The height of the rigid layer of the biofilm was significantly reduced after 120 ($p=.028$) and 300 ($p=.013$) seconds compared to 60 seconds and the washy layer of the remaining biofilm was significantly higher after 300s compared to 60 seconds ($p=.013$).

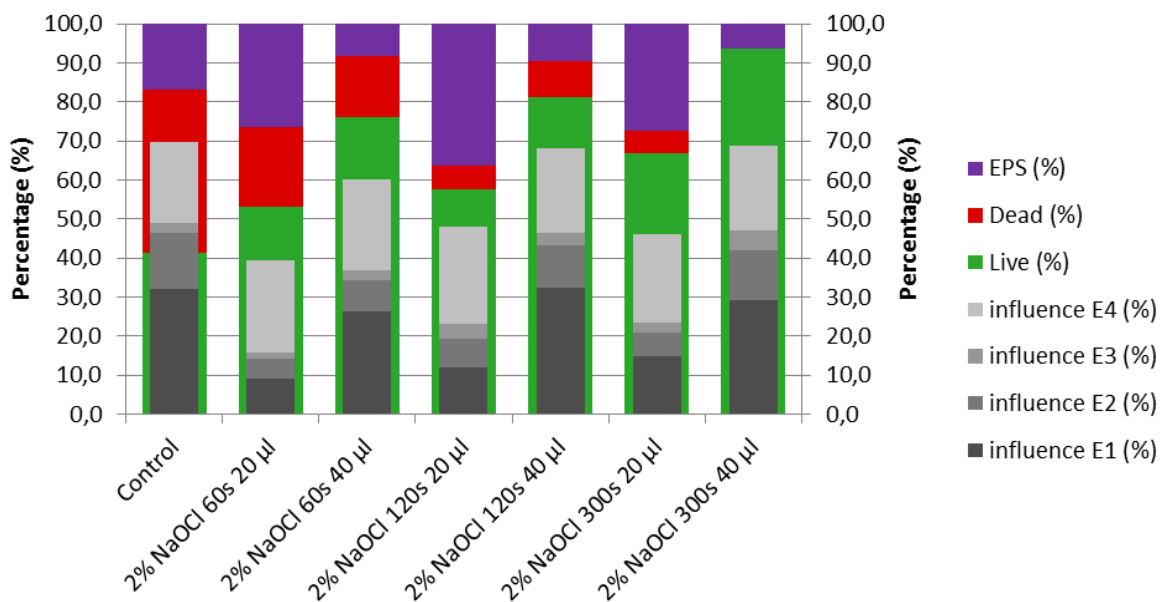


Figure 2 Representation of the relaxation subdivided according to the percentage influence of the four different E's (Dark to light grey, E1, E2, E3 and E4). Backdrop shows the distribution %live (green), %dead (red) and %EPS (purple) of the remaining biofilm.

In the remaining biofilm, the percentage of dead bacteria was lower ($p= .011$) and of live bacteria was higher ($p= .022$) after 300 seconds in comparison with 120 seconds.

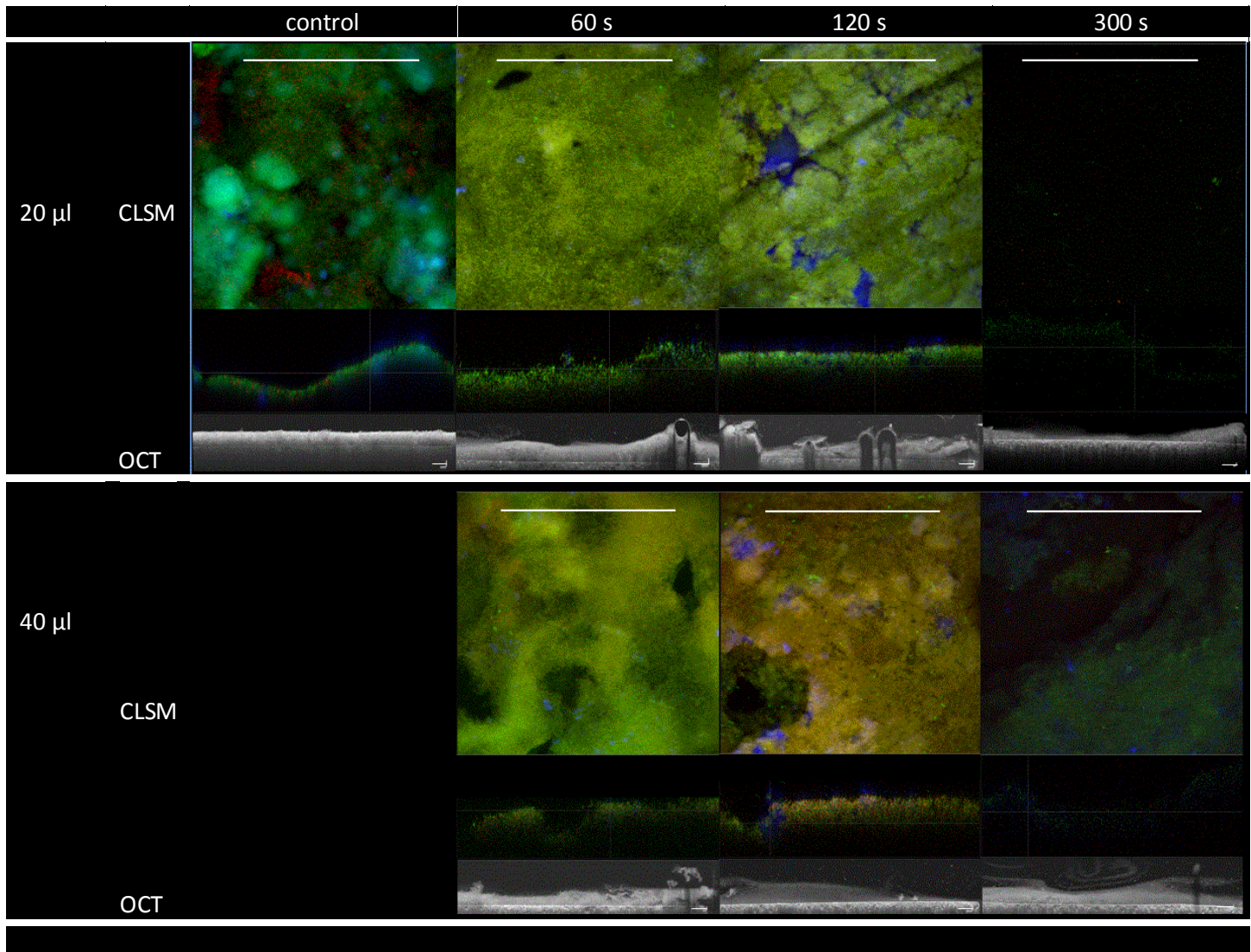


Figure 3 The effect of buffer, 2% NaOCl applied on 20 and 40 µl during 60, 120 and 300s. *S. oralis* – *A. naeslundii* biofilms cultured during 4 days in the CDFF. Scale bars represent 250 µm in length for both the CLSM and OCT images.

Effect of volume within 60 seconds of NaOCl administration (Table 1, Figure 1) In the 20µl the E1 was significantly lower ($p=.02$) and the E4 was significantly higher ($p=.027$) than the 40µl group.

Effect of volume within 120 seconds of NaOCl administration (Table 1, Figure 1)

In the 40µl group more rigid layer was chemically dissolved ($p=.02$) and the washy layer was thicker ($p=.02$) and the percentage of live stained bacterial cells was higher ($p=.007$) than in the 20µl group. The percentage of EPS was higher in the 20µl group ($p=.003$).

Effect of volume within 300 seconds of NaOCl administration (Table 1, Figure 1)

A higher percentage dead stained bacterial cells could be found in the 20 μ l group (p=.011)

Effect of application time and volume: 120 seconds 40 μ l versus 300 seconds 20 μ l

No difference between the groups was observed, indicating that the same chemical efficiency and efficacy could be reached with a lower volume after a longer exposure time.

Discussion

The findings of the study indicate that, the longer the application time the higher the chemical efficacy and the higher the volume the higher the chemical efficiency of the 2% NaOCl solution used, resulting in more dissolution of the rigid layer of the biofilm and an increase in the washy layer of the biofilm. With help of the OCT imaging a rigid and washy layer could be discriminated. The washy layer increased after prolonged contact with the NaOCl solution demonstrating a chemical effect on the biofilm which could not dissolve the biofilm. However, effective irrigation, at least flow rate 5ml/min, can remove this layer. This demonstrates the importance of an effective irrigation procedure during root canal disinfection.

Due to the standardized limited contact surface, the chemical effect of a higher volume could only be transmitted through the diffusion process. The results show that by increasing the volume of NaOCl, its chemical effect is indeed influenced, but differently for the various application times. After 60 seconds, only small changes in viscoelastic behaviour of the remaining biofilm of the 20 μ l group could be seen. However, longer application times induced a significant increase in the biofilm dissolution of the rigid layer; exposing the biofilm to 2% NaOCl for 120 seconds (40 μ l group only) and 300 seconds (20 and 40 μ l groups) resulted in substantial biomass decrease of the rigid layer compared to 60 seconds exposure and the control biofilm. There seems to be a balance between the application time and the volume of the 2% NaOCl used for achieving efficient and efficacious outcomes; by increasing the volume, significant biofilm dissolution after 120 seconds was observed, but by increasing the application time to 300 seconds the same effect on the biofilm reduction was brought about even with lower volumes of NaOCl compared to the

control can be achieved. This was confirmed by the finding that the chemical efficacy of NaOCl 20 μ l 300 seconds was similar to the 40 μ l 120 seconds.

In this study, the contact surface biofilm-NaOCl was more realistic and clinically relevant, because the biofilm was cultured in round holders (diameter 5 mm) where only the top surface of the biofilm was in contact with a limited volume of the NaOCl solution as in the root canal during the irrigation procedure. This mimics the situation in which biofilm is present in oval extensions, lateral canals and/or isthmuses where only the surface of the biofilm is susceptible to the chemical effect of NaOCl. The results show that it takes some time for the molecules to diffuse through the biofilm and become chemically active. The exact working mechanisms of NaOCl on a biofilm are not known. However, it has been shown that NaOCl can dissolve matrix polysaccharides, diffuse through the biofilm matrix (Tawakoli et al. 2015) and attack bacteria (Winter et al. 2008).

With regard to the percentage of dead/live bacteria in the remaining biofilm, strikingly enough no substantial differences were observed between the groups, with the only significant difference detected being that, compared to the control biofilm, all NaOCl-treated biofilms exhibited a reduction in dead cells and a higher percentage of live cells. This contradictory finding could lend some credence to the speculation that NaOCl has a stronger bacterial eradication effect on bacterial cells that already exhibit defects on their cell membrane, thereby rendering them more tractable to removal. Nevertheless, an inherent shortcoming of the dead/live staining needs to be taken into consideration; that is, that the staining needs to penetrate through the biofilm and with the penetration depth being around 60 μ m, only the surface sections of the biofilm become subjective to evaluation.

It is known that biofilms are stratified and that the bottom layer has a more cellular structure (Derlon et al. 2008, Renslow et al. 2010). Therefore, in this study a cell-rich biofilm grown in a Cell Depth Film Fermentor (CDFF) was employed, thus mimicking the basal layer of an oral biofilm (He et al. 2013). Furthermore, provided that the structure of the remaining biofilm guides the process of recurrent biofilm re-establishment, acknowledging the effect of a medicament on the remaining biofilm becomes of paramount importance (Busscher et al. 2010, Ohsumi et al. 2015). The viscoelastic properties of the remaining biofilm, left after chemical dissolution, did only show differences from the control biofilm after 20 μ l of NaOCl administration for 60 and 120 seconds. Probably this was due to the fact that not much biofilm rigid

layer was dissolved in comparison to an increase of the 'washy' layer. It highlights the need of developing anti-biofilm protocols able to disorder the structure of any remaining biofilm as well.

In this study, all biofilms were grown and tested in a confined space. It was noticed that the chemically disrupted biofilm as opposed to the chemically dissolved biofilm could only be removed when the biofilm-carrying disc was removed from the holder; it was then that the chemically weakened biofilm could flow away. This clearly accentuates the importance of convection for the biofilm removal and resurfaces the acknowledged problems related to the complete eradication of biofilm from isthmuses, oval extensions and anatomical constraints within the root canal system, where irrigant flow is intrinsically limited.

Conclusions

Increasing the application time improves the chemical efficacy, whereas increasing the applied volume increases the chemical efficiency of a 2% NaOCl solution against standardized biofilms grown in confined spaces. The aspects of application time and irrigant volume should be taken into account in devising effective strategies for dissolving and disrupting the biofilm structure and/or influencing the biofilm structure of the remaining biofilm.

Acknowledgements

The authors thank the Scientific and Technological National Council (CNPq), Ministry of Science & Technology Brazil, that funded the doctoral scholarship for the first author.

References

Busscher HJ, Jager D, Finger G, Schaefer N, van der Mei HC (2010) Energy transfer, volumetric expansion, and removal of oral biofilms by non-contact brushing. *Eur J Oral Sci* **118**, 177–82.

Chávez de Paz LE, Bergenholtz G, Svensäter G (2010) The effects of antimicrobials on endodontic biofilm bacteria. *J Endod* **36**, 70-7.

Derlon N, Masse A, Escaudie R, Bernet N, Paul E (2008) Stratification in the cohesion of biofilms grown under various environmental conditions. *Water Res* **42**, 2102–10.

Dutner J, Mines P, Anderson A (2012) Irrigation trends among American Association of Endodontists members: a web-based survey. *J Endod* **38**, 37–40.

Gómez-Suárez C, Busscher HJ, van der Mei HC (2001) Analysis of bacterial detachment from substratum surfaces by the passage of air-liquid interfaces. *Appl Environ Microbiol* **67**, 2531-7.

He Y, Peterson BW, Jongsma MA, Ren Y, Sharma PK, Busscher HJ, Van der Mei HC (2013) Stress relaxation analysis facilitates a quantitative approach towards antimicrobial penetration into biofilms. *PLoS ONE* **8**, e63750.

Heydorn A, Toftgaard Nielsen A, Hentzer M, Sternberg C, Givskov M, Kjaer Ersboll B, Molin S (2000) Quantification of the biofilm structures by the novel computer program Comstat. *Microbiology* **146**, 2395-407.

Hope CK, Wilson M. 2006. Biofilm structure and cell vitality in a laboratory model of subgingival plaque. *J Microbiol Methods* **66**, 390–8.

Koo H, Falsetta ML, Klein MI (2013) The Exopolysaccharide Matrix: A Virulence Determinant of Cariogenic Biofilm. *J Dent Res* **92**, 1065-73.

Jungbluth H, Marending M, De-Deus G, Sener B, Zehnder M (2011) Stabilizing sodium hypochlorite at high pH: effects on soft tissue and dentin. *J Endod* **37**, 693-6.

Macedo RG, Wesselink PR, Zaccheo F, Fanali D, Van Der Sluis LW (2010) Reaction rate of NaOCl in contact with bovine dentine: effect of activation, exposure time, concentration and pH. *Int Endod J* **43**, 1108-15.

Macedo RG, Verhaagen B, Wesselink PR, Versluis M, van der Sluis LWM (2014a) Influence of refreshment/activation cycles and temperature rise on the reaction rate of sodium hypochlorite with bovine dentine during ultrasonic activated irrigation. *Int Endod J* **47**, 147-54.

Macedo RG, Pascual Herrero N, Wesselink PR, Versluis M, van der Sluis LWM (2014b) Influence of the dentinal wall on the pH of NaOCl during root canal irrigation. *J Endod* **40**, 1005-8.

Moorer WR, Wesselink PR (1982) Factors promoting the tissue dissolving capability of sodium hypochlorite. *Int Endod J* **15**, 187-96.

Nair PN, Henry S, Vera J (2005) Microbial status of apical root canal system of human mandibular first molars with primary apical periodontitis after "one-visit" endodontic treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Path Oral Radiol Endod* **99**, 231-52.

Ohsumi T, Takenaka S, Wakamatsu R, Sakaue Y, Narisawa N, Senpuku H, Ohshima H, Terao Y, Okiji T (2015) Residual structure of *Streptococcus mutans* biofilm following complete disinfection favors secondary bacterial adhesion and biofilm re-development. *PLoS One* **10**, e0116647.

Otsu N (1979) "A threshold selection method from gray-level histograms. *IEEE Trans Sys Man Cyber* **9**, 62–6.

Paramonova E, de Jong ED, Krom BP, Van der Mei HC, Busscher HJ, Sharma PK (2007) Low-load compression testing: a novel way of measuring biofilm thickness. *Appl Environ Microbiol* **73**, 7023-8.

Peterson BW, He Y, Ren Y, Zerdoum A, Libera MR, Sharma PK et al (2015) Viscoelasticity of biofilms and their recalcitrance to mechanical and chemical challenges. *FEMS Microbiol Rev* **39**,234-5.

Peterson BW, van der Mei HC, Sjollem J, Busscher HJ, Sharma PK (2013) A Distinguishable Role of eDNA in the Viscoelastic Relaxation of Biofilms. *MBio* **4**, e00497-513.

Renslow RS, Majors PD, McLean JS, Fredrickson JK, Ahmed B, Beyenal H (2010) In Situ Effective Diffusion Coefficient Profiles in Live Biofilms Using Pulsed-Field Gradient Nuclear Magnetic Resonance. *Biotechnol Bioeng* **106**, 928-37.

Ricucci D, Siqueira JF Jr (2010) Biofilms and apical periodontitis: study of prevalence and association with clinical and histopathologic findings. *J Endod* **36**, 1277-88.

Ricucci D, Siqueira JF Jr (2008) Anatomic and microbiologic challenges to achieving success with endodontic treatment: a case report. *J Endod* **34**, 1249-54.

Rosenfeld EF, James GA, Burch BS (1978) Vital pulp tissue response to sodium hypochlorite. *J Endod* **4**, 140-6.

Sezgin M, Sankur B (2004) Survey over image thresholding techniques and quantitative performance evaluation. *J Electron Imaging* **13**,146–65.

Shiozawa A (2000) Characterization of reactive oxygen species generated from the mixture of NaClO and H₂O₂ used as root canal irrigants. *J Endod* **26**, 11-5.

Sirtes G, Waltimo T, Schaetzle M, Zehnder M (2005) The effects of temperature on sodium hypochlorite short-term stability, pulp dissolution capacity, and antimicrobial efficacy. *J Endod* **31**, 669–71.

Tawakoli PN, Ragnarsson KT, Rechenberg DK, Mohn D, Zehnder M (2015) Effects of endodontic irrigants on biofilm matrix polysaccharides. *Int Endod J.* **50**, 153-60.

Winter J, Ilbert M, Graf PCF, Ozcelik D, Jakob U (2008) Bleach Activates a Redox-Regulated Chaperone by Oxidative Protein Unfolding. *Cell* **135**, 691–701.

Zehnder M, Schmidlin P, Sener B, Waltimo T (2005) Chelation in root canal therapy reconsidered. *J Endod* **31**, 817-20.

Zehnder M, Kosicki D, Luder H, Sener B, Waltimo T (2002) Tissue-dissolving capacity and antibacterial effect of buffered and unbuffered hypochlorite solutions. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* **94**, 756-62.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Esta tese é composta por dois trabalhos que estudaram a ação de soluções irrigadoras utilizadas em tratamentos endodônticos sobre biofilmes *in-vitro*. Aspectos relacionados aos resultados obtidos e sua correlação com a literatura existente já foram abordados nas seções de Discussão dos artigos. Portanto, nesta seção serão expostas reflexões acerca das metodologias utilizadas para o desenvolvimento dos experimentos, limitações encontradas e perspectivas futuras.

Diversos estudos tem avaliado a capacidade das soluções irrigadoras em remover biofilmes, visto a real dificuldade de realizar esta etapa em tratamentos endodônticos. Para tanto, utiliza-se grandes volumes de solução, associado a um método físico para sua dispersão, o que inviabiliza avaliar o mecanismo de ação dos medicamentos isoladamente, além do comportamento do biofilme frente à ação química da solução testada. Neste estudo, biofilmes foram desafiados em espaços confinados, de modo que apenas uma superfície apresentasse contato direto com os medicamentos, aplicados de forma represada e em quantidades muito pequenas. Assim, cada solução permaneceu por um determinado período de tempo sobre o biofilme sem que houvesse sua renovação, tornando possível avaliar sua a ação química e o comportamento do biofilme frente à agressão.

Os métodos empregados para avaliar biofilmes após a ação de soluções irrigadoras normalmente informam o volume de biofilme remanescente e viabilidade celular. Imagens obtidas por MCL permite analisar a quantidade de células vivas e mortas, por meio da coloração dos biofilmes com Iodeto de propídio e Syto 9, cuja capacidade de penetração e coloração é de cerca de 70 μm , podendo variar conforme a solução testada e a permeabilidade do biofilme. Para este estudo, essa característica representa uma limitação, visto que o biofilme formado apresenta uma espessura de 200 μm e que a ação de algumas soluções não alterou a espessura dos biofilmes. Além disso, uma vez que outro método de análise aplicado neste estudo analisa as propriedades viscoelásticas do biofilme, considerou-se interessante identificar o componente estrutural responsável por essa característica. Por meio da coloração com calcofluor branco é possível visualizar na MCL a matriz de PEC. Poucos estudos em endodontia lançam mão desse recurso, embora muitos estudos sejam realizados com MCL.

Para a avaliação das propriedades viscoelásticas, o método de escolha foi o Teste de Resistência à Baixa Compressão e posterior cálculo dos elementos da curva de relaxamento ao stress por meio da equação de Maxwell (PARAMONOVA et al., 2007). O equipamento utilizado é único e exclusivo ao centro de pesquisa onde foi realizado este estudo. Visto que a viscoelasticidade é considerada um dos fatores de virulência pertinente a biofilmes, o método possibilita estabelecer características relacionadas ao comportamento dos biofilmes frente à ação química das soluções testadas. A visualização do comportamento também foi viabilizada por meio da Tomografia de Coerência Óptica. A técnica não invasiva permite sua associação com outros métodos, visto que dispensa coloração e pode ser executada diversas vezes na mesma amostra. Apesar de ser um equipamento antigo (HUANG, 1991), seu uso ainda tem sido pouco explorado na Odontologia. Além de viabilizar a visualização de características já sedimentadas, como a formação de bolhas e ruptura do biofilme frente à ação do hipoclorito de sódio, a utilização da TCO permitiu estabelecer novos paradigmas, como a relação entre a ação da clorexidina e a matriz de PEC, e as alterações estruturais causadas pelos medicamentos testados nos biofilmes remanescentes.

Com relação à formação dos biofilmes, estudos que avaliam o efeito de soluções irrigadoras normalmente utilizam métodos de crescimento de forma estática, como, por exemplo, biofilmes cultivados em canais radiculares de raízes previamente preparadas. Essas metodologias possibilitam o desenvolvimento de inúmeros estudos, visto que o custo é relativamente baixo, tanto para aquisição de materiais (descartáveis, em sua maioria), quanto para o andamento dos experimentos. Porém, a constante necessidade de manipular os espécimes, como para a troca dos meios de cultura, depende de treinamento do operador para que sejam realizadas de forma idêntica para todas as amostras, além de representar um risco de contaminação.

Estes são os primeiros estudos em que biofilmes crescidos em CDFE são aplicados na área da Endodontia. A metodologia possibilita o crescimento por compactação, em ambiente totalmente controlado, com características semelhantes a biofilmes orais (PRATTEN, 2007; HE et al., 2013). Também representa um custo mais elevado, tanto para a aquisição e manutenção do equipamento (além do emprego de soluções necessárias para os cuidados com o equipamento, como detergentes, ácidos, álcool) quanto para o crescimento dos biofilmes (devido à

quantidade de meios de cultura dispensados). Porém, devido ao fato de se obter um biofilme compactado e envelhecido, sua utilização pode resultar em economia de tempo e otimização de recursos, visto que um único ciclo de crescimento permite a obtenção de 75 amostras idênticas.

Apesar de empregar o substrato de interesse para a Endodontia e a possibilidade de observar a relação dos túbulos dentinários e demais características anatômicas com o biofilme formado, os resultados deste estudo mostram que os biofilmes crescidos de forma estática e por CDFE apresentam características distintas, que podem influenciar na ação das soluções irrigadoras.

Por fim, esse estudo apresentou novas metodologias para avaliação em estudos *in-vitro*. O Teste de Resistência à Baixa Compressão e a Tomografia de Coerência Óptica representam excelentes recursos para visualizar o comportamento e as características estruturais de biofilmes, especialmente frente à ação de agentes antimicrobianos. Assim, torna-se imperativo o desenvolvimento de novos estudos, seja para ratificar metodologias já utilizadas e estratégias sedimentadas, bem como explorar novas tecnologias, novos métodos físicos associados às soluções irrigadoras para remoção destes biofilmes, além da possibilidade de confirmar ou modificar paradigmas já existentes.

REFERÊNCIAS

- AFKHAMI, F., AKBARI, S., CHINIFORUSH N. Enterococcus faecalis elimination in root canals using silver nanoparticles, photodynamic therapy, diode laser, or laser-activated nanoparticles: An In Vitro Study. **Journal of Endodontics**, Chicago, v. 43, n. 2, p. 279-282, Feb. 2017.
- AKCAY, M. et al. Effect of photon-initiated photoacoustic streaming, passive ultrasonic, and sonic irrigation techniques on dentinal tubule penetration of irrigation solution: a confocal microscopic study. **Clinical Oral Investigation**. Berlin, 2016. Disponível em: < <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00784-016-2013-y>>. Acessado em: Mar, 20, 2017.
- ARIAS-MOLIZ, M.T. et al. Bactericidal activity of phosphoric acid, citric acid, and EDTA solutions against Enterococcus faecalis. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology**, St Louis, v.106, n.2, p. 84-89, Aug. 2008.
- ATHANASSIADIS, B., ABBOT, P.V., WALSH, J.L. The use of calcium hydroxide, antibiotics and biocides as antimicrobial medicaments in endodontics. **Australian Dental Journal**, Sidney, v. 52, n. 1, p. 564-582, Mar. 2007:
- BERLEMAN, J.E. et al. Exopolysaccharide microchannels direct bacterial motility and organize multicellular behavior. **The ISME Journal**, Geneva, v. 10, n. 11, p. 2620-2632, Nov. 2016.
- BUSANELLO, F.H et al. Passive ultrasonic irrigation in calcium hydroxide removal from root canals: A sem/eds analysis. **Journal of Research in Dentistry**, Tubarão, v. 3, n. 3, p. 668-677, May-Jun. 2015.
- CHAVEZ DE PAZ, L.E., MOLANDER, A., DAHLEN G. Gram-positive rods prevailing in teeth with apical periodontitis undergoing root canal treatment. **International Endodontic Journal**, Oxford, v. 37, n. 9, p. 579-587, Sep. 2004.
- CHAVEZ DE PAZ, L.E. Redefining the Persistent Infection in Root Canals: Possible Role of Biofilm Communities. **Journal of Endodontics**, Chicago, v. 33, n. 6, p. 652-662, Jun. 2007.
- COENYE, T., NELIS, H.J. In vitro and in vivo model systems to study microbial biofilm formation. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 83, n. 2, p. 89-105, Nov. 2010.
- COSTERTON, J.W. et al. Bacterial biofilms in nature and disease. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 41, p. 435-464, 1987.
- COSTERTON, J.W., STEWART, P.S., GREENBERG, E.P. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. **Science**, Washington DC, v. 284, n. 5418, p. 1318-1322, May 1999.

CUNNINGHAM, W.T., BALEKJIAN, A.Y. Effect of temperature on collagen-dissolving ability of sodium hypochlorite endodontic irrigant. **Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology**, New York, v. 49, n. 2, p. 175-177, Feb. 1980.

DAS, T. et al. Role of extracellular DNA in initial bacterial adhesion and surface aggregation. **Applied and Environmental Microbiology**. Washington DC , V. 76, n. 10, p. 3405-3408, May 2010.

DAS, T., SEHAR, S., MANEFIELD, M. The roles of extracellular DNA in the structural integrity of extracellular polymeric substance and bacterial biofilm development. **Environmental Microbiology Reports**, London, v. 5, n. 6, p. 778-786, Dec. 2013.

DE MOOR, R.J. et al. Efficacy of ultrasonic versus laser-activated irrigation to remove artificially placed dentin debris plugs. **Journal of Endodontics**, Chicago, v. 36, n. 9, p. 1580-1583, Sep. 2010.

DONLAN, R. Biofilms: microbial life on surfaces. **Emerging Infectious Disease**, Atlanta, v. 8, n. 9, p. 881-890, Sep. 2002.

DU, T. et al. Effect of Long-term Exposure to Endodontic Disinfecting Solutions on Young and Old *Enterococcus faecalis* Biofilms in Dentin Canals. **Journal of Endodontics**, Chicago, v. 40, n. 4, p. 509-514, Apr. 2014.

DUNAVANT, T.R. et al. Comparative evaluation of endodontic irrigants against *Enterococcus faecalis* biofilms. **Journal of Endodontics**, Chicago, v. 32, n. 6, p. 527-531, Jun. 2006.

DUTNER, J., MINES, P., ANDERSON, A. Irrigation trends among American Association of Endodontists members: a web-based survey. **Journal of Endodontics**, Chicago, v. 38, n. 1, p. 37-40, Jan. 2012.

ESTRELA, C. et al. Frequency of root canal isthmi in human permanent teeth determined by cone-beam computed tomography. **Journal of Endodontics**, Chicago, v. 41, n. 9, p. 1535-1539, Sep. 2015.

FERRAZ, C.C. et al. In vitro assessment of the antimicrobial action and the mechanical ability of chlorhexidine gel as an endodontic irrigant. **Journal of Endodontics**, Chicago, v. 27, n. 7, p. 452-455, Jul. 2001.

FLEMMING, H.C. et al. Biofilms: an emergent form of bacterial life. **Nature Reviews. Microbiology**. London, v. 14, n. 9, p. 563-575, Aug. 2016.

FLEMMING, H.C., NEU, T.R., WOZNIAK, D.J. The EPS matrix: the "house of biofilm cells". **Journal of Bacteriology**, Washington DC, v. 189, n. 22, p. 7945-7947, Nov. 2007.

FLEMMING, H.C., WINGENDER, J. The biofilm matrix. **Nature Reviews. Microbiology**, London, v. 8, n. 9, p. 623-633, Sep. 2010.

FRIIS, K.B., THEMSTRUP, L., JEMEC, G.B. Optical coherence tomography in the diagnosis of actinic keratosis - A systematic review. **Photodiagnosis Photodynamic**

Therapy, Amsterdam, P. 1-26, 2017. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/piiS1572100016302654>>. Acesso em: Feb, 28, 2017.

GARBEROGLIO, R., BECCE, C. Smear layer removal by root canal irrigants. A comparative scanning electron microscopic study. **Oral Surgery, Oral Medicine and Oral Pathology**, Philadelphia, v. 78, n. 3, p. 359-367, Sep. 1994.

GILBERT, P., DAS, J., FOLEY, I. Biofilm susceptibility to antimicrobials. **Advances in Dental Research**, Thousand Oaks, v. 11, n. 1, p. 160-167, Apr. 1997.

GOMES, B.P. et al. In vitro antimicrobial activity of several concentrations of sodium hypochlorite and chlorhexidine gluconate in the elimination of *Enterococcus faecalis*. **International Endodontic Journal**, Oxford, v. 34, n. 6, p. 424-428, Sep. 2001.

GOMES, B.P., MARTINHO, F.C., VIANNA, M.E. Comparison of 2.5% sodium hypochlorite and 2% chlorhexidine gel on oral bacterial lipopolysaccharide reduction from primarily infected root canals. **Journal of Endodontics**, Chicago, v. 35, n. 10, p. 1350-1353, Oct. 2009.

GU, L.S. et al. Review of contemporary irrigant agitation techniques and devices. **Journal of Endodontics**, Chicago, v. 35, n. 6, p. 791-804, Jun. 2009.

GONZALEZ, A.M. et al. Continuous drip flow system to develop biofilm of *E. faecalis* under anaerobic conditions. **Scientific World Journal**, London, p. 1-5, 2014. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4211154/>>. Acesso em: Feb, 28, 2017.

GUASTALLI, A.R., CLARKSON, R.M., ROSSI-FEDELE, G. The Effect of Surfactants on the Stability of Sodium Hypochlorite Preparations. **Journal of Endodontics**, Chicago, v. 41, n. 8, p. 1344-1348, Aug. 2015.

GUERREIRO-TANOMARU, J.M. et al. Antibiofilm activity of irrigating solutions associated with cetrimide. Confocal laser scanning microscopy. **International Endodontic Journal**, Oxford, v. 47, n. 11, p. 1058-1063, Nov. 2014.

GUERREIRO-TANOMARU, J.M. et al. Comparative analysis of *Enterococcus faecalis* biofilm formation on different substrates. **Journal of Endodontics**, Chicago, v. 39, n. 3, p. 346-350, Mar. 2013.

HAAPASALO, M. et al. Irrigation in endodontics. **Dental Clinics of North America**, Philadelphia, v. 54, n. 2, p. 291-312, Apr. 2010.

HE, Y. et al. Antimicrobial penetration in a dual-species oral biofilm after noncontact brushing: an in vitro study. **Clinical Oral Investigation**, Berlin, v. 18, n. 4, p. 1103-1109, May 2014.

HE, Y. et al. Stress relaxation analysis facilitates a quantitative approach towards antimicrobial penetration into biofilms. **PLoS One**, San Francisco, v. 8, n. 5, e63750, May 2013.

- HOPE, C.K. et al. A direct comparison between extracted tooth and filter-membrane biofilm models of endodontic irrigation using *Enterococcus faecalis*. **Archives of Microbiology**, Berlin, v. 192, n. 9, p. 775-781, Sep. 2010.
- HOPE, C.K., WILSON, M. Biofilm structure and cell vitality in a laboratory model of subgingival plaque. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 66, n. 3, p. 390-398, Sep. 2006.
- HORIBA, N. et al. A study of distribution of endotoxin in the dentinal wall of infected root canals. **Journal of Endodontics**, Chicago, v. 16, n. 7, p. 331-334, Jul. 1990.
- HOOD, D.C. Improving our understanding, and detection, of glaucomatous damage: An approach based upon optical coherence tomography (OCT). **Progress in Retinal and Eye Research**. Amsterdam, p. 1-30, 2016. Disponível em: < <http://www.science-direct.com/science/article/pii/S1350946216300702> >. Acessado em: Feb, 28, 2017.
- HUANG, D. et al. Optical coherence tomography. **Science**, Washington, v. 254, n. 5035, p. 1178-1181, Nov. 1991.
- HÜLSMANN, M., HECKENDORFF, M., LENNON, A. Chelating agents in root canal treatment: mode of action and indications for their use. **International Endodontic Journal**, Oxford, v. 36, n. 12, p. 810-830, Dec. 2003.
- JAFFE, G.J., CAPRIOLI, J. Optical coherence tomography to detect and manage retinal disease and glaucoma. **American Journal of Ophthalmology**, New York, v. 137, n. 1, p. 156-169, Jan. 2004.
- JEANSONNE, M.J., WHITE, R.R. A comparison of 2.0% chlorhexidine gluconate and 5.25% sodium hypochlorite as antimicrobial endodontic irrigants. **Journal of Endodontics**, Chicago, v. 20, n. 6, p. 276-278, Jun. 1994.
- KLAPPER, I. et al. Viscoelastic fluid description of bacterial biofilm material properties. **Biotechnology and Bioengineering**, New Jersey, v. 80, n. 3, p. 289-296, Nov. 2002.
- KÖRSTGENS, V. et al. Uniaxial compression measurement device for investigation of the mechanical stability of biofilms. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 46, n. 1, p. 9-17, Nov. 2001.
- KUNGWANI, M.L., PRASAD, K.P., KHIYANI, T.S. Comparison of the cleaning efficacy of EndoVac with conventional irrigation needles in debris removal from root canal. An in-vivo study. **Journal of Conservative Dentistry**, Amritsar, v. 17, n. 4, p. 374-378, Jul. 2014
- LLOYD, A. et al. Removal of calcium hydroxide from Weine Type II systems using photon-induced photoacoustic streaming, passive ultrasonic, and needle irrigation: a microcomputed tomography study. **Journal of Applied Oral Science**, Bauru, v. 24, n. 6, p. 543-548, Dec. 2016.
- MA, J. et al. A new noninvasive model to study the effectiveness of dentin disinfection by using confocal laser scanning microscopy. **Journal of Endodontics**, Chicago, v. 37, n. 10, p. 1380-1385, Oct. 2011.

- MACEDO, R.G. et al. A novel methodology providing insights into removal of biofilm-mimicking hydrogel from lateral morphological features of the root canal during irrigation procedures. **International Endodontic Journal**, Oxford, v. 47, n. 11, p. 1040-1051, Nov. 2014.
- MADHWANI, T., MCBAIN, A.J. Bacteriological effects of a *Lactobacillus reuteri* probiotic on in vitro oral biofilms. **Archives of Oral Biology**, Amsterdam, v. 56, n. 11, p. 1264-1273, Nov. 2011.
- MCDONNELL, G., RUSSELL, A.D. Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 12, n. 1, p. 147-169, Jan. 1999.
- MELLO, I. et al. Influence of final rinse technique on ability of ethylenediaminetetraacetic acid of removing smear layer. **Journal of Endodontics**, Chicago, v. 36, n. 3, p. 512-514, Mar. 2010.
- MITCHELL, R.P., YANG, S.E., BAUMGARTNER, J.C. Comparison of apical extrusion of NaOCl using the EndoVac or needle irrigation of root canals. **Journal of Endodontics**, Chicago, v. 36, n. 2, p. 338-341, Feb. 2010.
- MOHAMMADI, Z. et al. An Update on the Management of Endodontic Biofilms Using Root Canal Irrigants and Medicaments. **Iranian Endodontic Journal**, Tehran, v. 9, n. 2, p. 89-97, 2014.
- MOHAMMADI, Z. et al. Microbial biofilms in endodontic infections: an update review. **Biomedical Journal**, Mumbai, v. 36, n. 2, p. 59-70, Mar-Apr. 2013.
- NAENNI, N., THOMA, K., ZEHNDER, M. Soft tissue dissolution capacity of currently used and potential endodontic irrigants. **Journal of Endodontics**, Chicago, v. 30, n. 11, p. 785-787, Nov. 2004.
- NAIR, P.N. Endodontic biofilm, technology and pulpal regenerative therapy: where do we go from here? **International Endodontic Journal**, Oxford, v. 47, n. 11, p. 1003-1011, Nov. 2014.
- NAIR, P.N. et al. Microbial status of apical root canal system of human mandibular first molars with primary apical periodontitis after "one-visit" endodontic treatment. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology**, St Louis, v. 99, n. 2, p. 231-252, Feb. 2005.
- NASHER, R., FRANZEN, R., GUTKNECHT, N. The effectiveness of the Erbium:Yttrium aluminum garnet PIPS technique in comparison to different chemical solutions in removing the endodontic smear layer-an in vitro profilometric study. **Lasers in Medical Science**, London, v. 31, n. 9, p. 1871-1882, Dec. 2016.
- NIELSEN, B.A., BAUMGARTNER, J.C. Comparison of the EndoVac system to needle irrigation of root canals. **Journal of Endodontics**, Chicago, v. 33, n. 5, p. 611-615, May 2007.
- OKINO, L.A. et al. Dissolution of pulp tissue by aqueous solution of chlorhexidine digluconate and chlorhexidine digluconate gel. **International Endodontic Journal**,

Oxford, v. 37, n. 1, p. 38-41, Jan. 2004.

ORDINOLA-ZAPATA, R. et al. Antimicrobial effect of endodontic solutions used as final irrigants on a dentine biofilm model. **International Endodontic Journal**, Oxford, v. 45, n. 2, p. 162-168, Feb. 2012.

PARAMONOVA, E. et al. Impact of hydrodynamics on oral biofilm strength. **Journal of Dental Research**, Thousand Oaks, v. 88, n. 10, p. 922-926, Oct. 2009.

PARAMONOVA, E. et al. Low-load compression testing: a novel way of measuring biofilm thickness. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington DC, v. 73, n. 21, p. 7023-7028, Nov. 2007.

PETERS, A.C., WIMPENNY, J.W. A constant-depth laboratory model film fermentor. **Biotechnology and Bioengineering**, New Jersey, v. 32, n. 3, p. 263-270, Jul. 1988.

PETERSON, B.W. Et al. Visualization of microbiological processes underlying stress relaxation in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. **Microscopy and Microanalysis**, New York, v. 20, n. 3, p. 912-915, Jun 2014.

PRATTEN, J. Growing oral biofilms in a constant depth film fermentor (CDFF). **Current Protocols in Microbiology**, New Jersey, Suppl. 6, Cap. 1 – 1B5, Aug, 2007.

RICUCCI, D. et al. Histologic investigation of root canal treated teeth with apical periodontitis: a retrospective study from twenty-four patients. **Journal of Endodontics**, Chicago, v. 35, n. 4, p. 493-502, Apr. 2009.

RICUCCI, D., LOGHIN, S., SIQUEIRA JR, J.F. Exuberant biofilm infection in a lateral canal as the cause of short-term endodontic treatment failure: report of a case. **Journal of Endodontics**, Chicago, v. 39, n. 5, p. 712-718, May 2013.

RICUCCI, D., SIQUEIRA, J.F. JR. Biofilms and apical periodontitis: study of prevalence and association with clinical and histopathologic findings. **Journal of Endodontics**, Chicago, v. 36, n. 8, p. 1277-1288, Nov. 2010.

SEELIGER, J., et al. Enamel Thickness before and after Orthodontic Treatment Analysed in Optical Coherence Tomography. **Biomedical Research Internarional**, New York, p. 1-7, 2017. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5294353/>>. Acesso em: 21 Mar. 2017.

SIQUEIRA, J.F. Aetiology of root canal treatment failure: why well-treated teeth can fail. **International Endodontic Journal**, Oxford, v. 34, n. 1, p. 1-10, Jan. 2001.

SOUSA, V. et al. Experimental models for contamination of titanium surfaces and disinfection protocols. **Clinical Oral Implants Research**, Paris, v. 27, n. 10, p. 1233-1242, Oct. 2016.

STEWART, P.S., FRANKLIN, M.J. Physiological heterogeneity in biofilms. **Nature Reviews. Microbiology**. London, v. 6, n. 3, p. 199-210, Mar. 2008.

STOJICIC S et al. Tissue dissolution by sodium hypochlorite: effect of concentration,

temperature, agitation, and surfactant. **Journal of Endodontics**, Chicago, v. 36, n. 9, p. 1558-1562, Sep. 2010.

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

TANOMARU-FILHO, M. et al. Intermittent or continuous ultrasonically activated irrigation: micro-computed tomographic evaluation of root canal system cleaning. **Clinical Oral Investigation**, Berlin, v.20, n. 7, p. 1541-1546, Sep. 2016.

TAWAKOLI, P.N. et al. Effect of endodontic irrigants on biofilm matrix polysaccharides. **International Endodontic Journal**, Oxford, v. 50, n. 2, p. 153-160, Feb. 2017.

TERASHIMA, M., KANEDA, H., SUZUKI T. The role of optical coherence tomography in coronary intervention. **Korean Journal of Internal Medicine**, Seoul, v. 27, n. 1, p. 1-12, Mar. 2012.

VAN DER SLUIS, L.W. et al. The influence of volume, type of irrigant and flushing method on removing artificially placed dentine debris from the apical root canal during passive ultrasonic irrigation. **International Endodontic Journal**, Oxford, v. 39, n. 6, p. 472-476, Jun. 2006.

VAN DER WAAL, S.V. et al. Diffusion of antimicrobials in multispecies biofilms evaluated in a new biofilm model. **International Endodontic Journal**, Oxford, p. 1-10, 2016. Disponível em: < <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/iej.12634/abstract>>. Acesso em: Feb. 28, 2017.

VERA, J. et al. One-versus two visit endodontic treatment of teeth with apical periodontitis: a histobacteriologic study. **Journal of Endodontics**, Chicago, v. 38, n. 8, p. 1040-1052. Aug. 2012.

VERSIANI, M.A. et al. Micro-CT evaluation of the efficacy of hard-tissue removal from the root canal and isthmus area by positive and negative pressure irrigation systems. **International Endodontic Journal**, Oxford, v. 49, n. 11, p. 1079-1087, Nov. 2016.

VIANA, M.E et al. In vivo evaluation of microbial reduction after chemo-mechanical preparation of human root canals containing necrotic pulp tissue. **International Endodontic Journal**, Oxford, v. 36, n. 9, p. 484-492, Jun.2006.

VIVAN, R.R., et al. Evaluation of Different Passive Ultrasonic Irrigation Protocols on the Removal of Dentinal Debris from Artificial Grooves. **Brazilian Dental Journal**, Ribeirão Preto, v. 27, n. 5, p. 586-572, Sep-Oct. 2016.

WANG, Z., SHEN, Y., HAAPASALO, M. Effectiveness of endodontic disinfecting solutions against young and old *Enterococcus faecalis* biofilms in dentin canals. **Journal of Endodontics**, Chicago, v. 38, n. 10, p. 1376-1379, Oct. 2012.

WANG, Z., SHEN, Y., HAAPASALO, M. Dentin Extends the Antibacterial Effect of Endodontic Sealers against *Enterococcus faecalis* Biofilms. **Journal of Endodontics**, Chicago, v. 40, n. 4, p. 505-8, Apr. 2014.

WIMPENNY, J., MANZ, W., SZEWZYK, U. Heterogeneity in Biofilm. **FEMS Microbiology Reviews**, Delft, v. 24, n. 5, p. 661-671, Dec. 2000.

XI, C. et al. High-resolution three-dimensional imaging of biofilm development using optical coherence tomography. **Journal of Biomedical Optics**. Bellingham, v. 11, n. 3, 34001, May-Jun. 2006.

ZAPATA, R.O. et al. Confocal laser scanning microscopy is appropriate to detect viability of *Enterococcus faecalis* in infected dentin. **Journal of Endodontics**, Chicago, v. 34, n. 10, p. 1198-1201, Oct. 2008.

ZAURA, E. et al. The effects of fractions from shiitake mushroom on composition and cariogenicity of dental plaque microcosms in an in vitro caries model. **Journal of Biomedicine & Biotechnology**, Cairo, v. 2011, 135034, p. 1-10, 2011.

ZHAO, B. et al. Soft tissue integration versus early biofilm formation on different dental implant materials. **Dental Materials**, Lake Oswego, v. 30, n. 7, p. 716-727, Jul. 2014.