



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA  
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM ENDODONTIA

JÚLIA ROBERTA RÉGIS

**Avaliação do potencial antimicrobiano da lisozima pura ou associada  
a uma solução alcalina em um modelo de biofilme endodôntico multiespécie**

Florianópolis

2023

Júlia Roberta Régis

**Avaliação do potencial antimicrobiano da lisozima pura ou associada  
a uma solução alcalina em um modelo de biofilme endodôntico multiespécie**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do título de Mestre em Odontologia.

Orientadora: Profa. Dra. Thais Mageste Duque

Florianópolis

2023

Ficha de identificação da obra elaborada pela autora,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Régis, Júlia Roberta

Avaliação do potencial antimicrobiano da lisozima pura ou associada a uma solução alcalina em um modelo de biofilme endodôntico multiespécie / Júlia Roberta Régis ; orientadora, Thais Mageste Duque, 2023.

57 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Florianópolis, 2023.

Inclui referências.

1. Odontologia. 2. Biofilme. 3. Atividade antimicrobiana. 4. Lisozima. I. Duque, Thais Mageste . II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Odontologia. III. Título.

Júlia Roberta Régis

**Avaliação do potencial antimicrobiano da lisozima pura ou associada a uma solução alcalina em um modelo de biofilme endodôntico multiespécie**

O presente trabalho em nível de mestrado foi avaliado e aprovado por bancaexaminadora composta pelos seguintes membros:

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Thais Mageste Duque  
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Ericka Tavares Pinheiro  
Universidade Estadual de São Paulo

Prof. Dr. Francisco Montagner  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de mestre em Odontologia.

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Mariane Cardoso  
Coordenadora do Programa

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Thais Mageste Duque  
Orientadora

Florianópolis  
2023

*Dedico este trabalho às minhas avós,  
Alvina e Maria, que tanto me inspiram,  
motivam e apoiam. Sem vocês,  
nada disso seria possível!*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus e a Nossa Senhora pela minha vida e proteção. Por estarem sempre comigo, me guiando, iluminando cada passo meu e me abençoando. Obrigada por me darem a fé e a força necessária para lutar e enfrentar todos os obstáculos, sem nunca desistir.

Eu estaria mentindo se dissesse que esses 2 anos de mestrado foram fáceis, tive inúmeros empecilhos durante o caminho. No entanto, mais uma vez fui abençoada pela vida e encontrei pessoas que facilitaram esse trajeto para mim, e me ajudaram para que eu conseguisse levar a pós-graduação de forma leve. Trilhar este caminho só foi possível com todo o apoio e dedicação que recebi.

Primeiramente, gostaria de expressar minha gratidão especial à Profa. Dra. Thais Mageste Duque, minha orientadora e, sobretudo, uma grande amiga, pela pessoa e profissional inspiradora que é. Agradeço por me acolher mais uma vez na Universidade, por sua dedicação, que a fez por diversas vezes deixar seus momentos de descanso para me ajudar e orientar. Obrigada pelos conselhos, pela amizade, pela confiança e pelo apoio depositado em mim desde os tempos da graduação. Sou e serei eternamente grata. Sua didática e amor pela docência são admiráveis!

Agradeço à minha família pela compreensão, ao serem privados em muitos momentos da minha companhia e atenção, e pelo apoio, me estimulando nos momentos mais difíceis. Obrigada por desejarem sempre o melhor para mim, pelo esforço que fizeram para que eu pudesse superar cada obstáculo em meu caminho e chegar aqui e, principalmente, pelo amor imenso que vocês têm por mim.

Aos meus grandes amigos e parceiros de pós na UFSC: Helô Martins e Jardel Dorigon, pelo companheirismo, amizade, conversas, conselhos e pelas inúmeras boas risadas. Tudo ficou mais fácil e leve trabalhando com vocês!

Agradeço à Profa. Dra. Ericka Pinheiro pela acolhida e por ter me aberto as portas de seu laboratório na Universidade de São Paulo para a execução da minha pesquisa. Obrigada pelos inestimáveis ensinamentos, pela competência, pela ajuda, pelo comprometimento e pelo suporte tão importantes para a realização deste trabalho.

Um obrigado especial às amigas Alana Aguiar, Ana Cambuí, Erica Mina, Larissa Dantas e Letícia Maranhão que me acolheram, me ajudaram e compartilharam importantes conhecimentos comigo, me ensinando muitas coisas, estando ao meu lado, dispostas para me ajudar sempre que necessário. Obrigada pela amizade, pela atenção e por serem tão solícitas!

À equipe Mordent agradeço por todo o auxílio e carinho desde o início dessa jornada. Agradeço, especialmente, pelo imenso suporte dado nesses dois anos de pós-graduação. Sou muito

grata por poder sempre contar com a sua ajuda e o apoio de vocês!

À Universidade Federal de Santa Catarina, por ter me acolhido desde a graduação e por ter propiciado o meu crescimento profissional e pessoal.

Aos docentes do Programa de Pós-graduação em Odontologia da Universidade Federal de Santa Catarina por participarem e contribuírem com a minha formação profissional e acadêmica.

Eu agradeço aos amigos e amigas do coração, que sempre estão ao meu lado, me dando suporte, carinho, atenção e diversão.

Agradeço também aos professores membros da banca pelos conselhos, sugestões e interesse em contribuir para o desenvolvimento deste projeto.

Por fim, a todos aqueles que contribuíram, direta ou indiretamente, para a realização desta dissertação, o meu sincero agradecimento.

Mais importante do que a chegada é a caminhada, e não há caminho sem metamorfose:  
ela é a ponte que torna possível a nossa travessia até os novos continentes  
a serem descobertos dentro de nós (BEHLING, Kamila).



## RESUMO

Microrganismos organizados em biofilmes podem ser cerca de mil vezes mais resistentes contra agentes antibacterianos. A lisozima possui grande potencial para ser utilizada na Odontologia, visto suas propriedades anti-inflamatórias, antivirais, antissépticas, anti-histamínicas e antineoplásicas. Este trabalho teve como objetivo avaliar *in vitro* o potencial antimicrobiano da lisozima em um modelo de biofilme endodôntico multiespécie de dez espécies. Foram utilizados 36 blocos de dentina bovina. O biofilme endodôntico composto por *Actinomyces oris*, *Enterococcus faecalis*, *Fusobacterium nucleatum*, *Parvimonas micra*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Selenomonas sputigena*, *Streptococcus oralis*, *Tannerella forsythia* e *Veillonella dispar*, foi formado nos espécimes inseridos em placas de 24 poços. Após a incubação do biofilme por 21 dias, os espécimes foram divididos em 4 grupos (n=9): Controle, pH Alcalino (pH da solução = 12,5), Lisozima, pH Alcalino + Lisozima. Após, as respectivas soluções de cada grupo foram depositadas no interior dos poços sob os espécimes de dentina com biofilmes e incubadas por 24 horas em anaerobiose a 37°C. O plaqueamento das diluições  $10^{-4}$  e  $10^{-5}$  de cada espécime foi realizado. As placas foram incubadas durante 5 dias em condições anáerobias a 37°C para contagem das Unidades Formadoras de Colônias (UFC). Os dados das contagens de UFC foram transformados em log, e as diferenças entre os grupos de tratamento foram testadas pela ANOVA e teste de Tukey através do software IBM SPSS. O grupo Lisozima com pH Alcalino apresentou diferença estatística ao ser comparado com todos os outros grupos: Controle (p= 0,009), pH Alcalino (p=0,001) e Lisozima (p=0,002). Os demais grupos não apresentaram diferença estatística. O grupo pH Alcalino + Lisozima apresentou maior potencial antimicrobiano em relação ao biofilme (média do grupo = 5,4 log<sub>10</sub> UFC/mL). Concluímos que a lisozima demonstrou eficácia antimicrobiana quando analisada *in vitro* em um modelo de biofilme endodôntico multiespécie.

**Palavras-chave:** Biofilme; Atividade antimicrobiana; Lisozima.

## ABSTRACT

Microorganisms organized in biofilms can be about a thousand times more resistant against antibacterial agents. Lysozyme has great potential to be used as a substance, given its anti-inflammatory, antiviral, antiseptic, antihistamine and antineoplastic properties. This work aims to evaluate in vitro the antimicrobial potential of lysozyme in a multispecies endodontic biofilm model of ten species. 36 blocks of bovine dentin were used. Afterwards, the endodontic biofilm composed of *Actinomyces oris*, *Enterococcus faecalis*, *Fusobacterium nucleatum*, *Parvimonas micra*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Selenomonas sputigena*, *Streptococcus oralis*, *Tannerella forsythia* and *Veillonella dispar*, was formed in the specimens inserted in 24-well plates. After incubating the biofilm for 21 days, the specimens were divided into 4 groups (n=9): Control, Alkaline pH, Lysozyme, Alkaline pH + Lysozyme. Afterwards, the respective solutions of each group were deposited inside the wells under the dentin specimens with biofilms and incubated for 24 hours in anaerobiosis at 37°C. Plating of 10<sup>-4</sup> and 10<sup>-5</sup> dilutions of each specimen was performed. Plates were incubated for 5 days in anaerobic conditions at 37°C for Colony Forming Units (UFC) counts. UFC counts data were log-transformed, and differences between treatment groups were tested by ANOVA and Tukey's test using IBM SPSS software. The Lysozyme with Alkaline pH group showed statistical difference when compared with all other groups: Control (p= 0.009), Alkaline pH (p=0.001) and Lysozyme (p=0.002). The other groups showed no statistical difference. The Alkaline pH + Lysozyme group had the highest antimicrobial potential compared to the biofilm (group mean = 5.4 log<sub>10</sub> UFC/mL). Lysozyme demonstrated antimicrobial efficacy when analyzed in vitro in a multispecies endodontic biofilm model.

**Key-words:** Biofilm; Antimicrobial activity; Lysozyme.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

EDTA – Ácido etilenodiaminotetracético

LPS – Lipopolissacarídeo

LTA – Ácido lipoteicóico

mFUM – Meio universal fluído modificado

ATCC – American Type Culture Collection

PBS – Soro fisiológico tamponado com fosfato

SFB – Soro fetal bovino

UFC – Unidade formadora de colônias

µL – Microlitros

*E. faecalis* – *Enterococcus faecalis*

*V. dispar* – *Veionella dispar*

*P. gingivalis* – *Porphyromonas gingivalis*

*P. intermedia* – *Prevotella intermedia*

*F. nucleatum* – *Fusobacterium nucleatum*

*S. mutans* – *Streptococcus mutans*

*S. aureus* – *Staphylococcus aureus*

*O. uli* – *Olsenella uli*

*E. colli* – *Escherichia colli*

*S. anginosus* – *Streptococcus anginosus*

*S. gordonii* – *Streptococcus gordonii*

*S. oralis* – *Streptococcus oralis*

*L. casei* – *Lactobacillus casei*

*P. aeruginosa* – *Pseudomonas aeruginosa*

*C. albicans* – *Candida albicans*

*M. luteus* – *Micrococcus luteus*

*A. brasiliensis* – *Aspergillus brasiliensis*

*A. baumannii* – *Acinetobacter baumannii*

*L. rhamnosus* – *Lactobacillus rhamnosus*

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA</b>	<b>13</b>
1.1 Biofilmes orais	13
1.2 Infecções endodônticas	13
1.3 Biofilmes endodônticos	13
1.4 Modelos de Biofilmes endodônticos in vitro	18
1.5 Substâncias utilizadas como medicação intracanal	20
1.6 Lisozima	23
<b>2 JUSTIFICATIVA</b>	<b>27</b>
<b>3 OBJETIVOS E HIPÓTESE NULA</b>	<b>28</b>
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>29</b>
4.1 Obtenção da Amostra	29
4.2 Formação do Biofilme	29
4.3 Manipulação das Soluções e Tratamento	31
4.4 Microscopia Confocal de Varredura a Laser	32
4.5 Contagem Bacteriana	32
4.6 Análise Estatística	32
<b>5 RESULTADOS</b>	<b>34</b>
<b>6 DISCUSSÃO</b>	<b>38</b>
<b>7 CONSIDERAÇÕES FINAIS</b>	<b>44</b>
<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>45</b>
<b>APÊNDICE A</b>	<b>56</b>
<b>APÊNDICE B</b>	<b>57</b>

# 1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

## 1.1 Biofilmes orais

As bactérias se organizam em estruturas complexas denominadas biofilmes. Os biofilmes são comunidades bacterianas inseridas em uma matriz de polissacarídeos (Haapasalo; Udnaes; Endal, 2003) e que serve de barreira física contra agentes antimicrobianos (Svensater; Bergenholtz, 2004). Essas comunidades podem se comunicar e agregar entre si, podendo compartilhar e capturar nutrientes, trocar materiais genéticos, assim como se tornarem mais resistentes as respostas do hospedeiro (Jhajharia *et al.*, 2015; Neelakantan *et al.*, 2017).

As bactérias inseridas no biofilme possuem capacidade de adaptação, promovendo alterações genéticas e metabólicas. Além disso, entre as bactérias, pode ocorrer o sinergismo, resistência a antimicrobianos e competência para sobreviver em locais com baixa fonte de nutrição (Siqueira Jr; Rôças, 2008).

Os biofilmes podem ser monoespécie ou multiespécie. Biofilmes monoespécie possuem uma única bactéria, sendo assim, mais práticos de desenvolver e reproduzir, permitindo alta produtividade experimental (Garg; Mala; Kamath, 2021).

Biofilmes multiespécie possuem diferentes bactérias (Neelakantan *et al.*, 2017). Por essa razão, são mais custosos e trabalhosos visto que exigem uma maior complexidade para se desenvolver e reproduzir (Garg; Mala; Kamath, 2021). No entanto, por serem polimicrobianos se assemelham mais com a realidade clínica (De Paz, 2012).

## 1.2 Infecções endodônticas

Bactérias e seus subprodutos são considerados os principais agentes etiológicos da periodontite apical (Haapasalo; Udnaes; Endal, 2003). O objetivo do tratamento endodôntico é a remoção dessa infecção, prevenindo a reinfecção do sistema de canais radiculares (Ørstavik, 2003; Mounce, 2004; Rodrigues *et al.*, 2017).

As infecções endodônticas são de natureza polimicrobiana, sendo a variedade de microorganismos e/ou suas interações importantes aspectos a serem considerados na patogênese da

doença (Segura *et al.*, 2018). A mesma combinação de espécies bacterianas, em concentrações semelhantes, gera respostas diferentes nos hospedeiros. Além disso, a resistência do hospedeiro é fundamental na determinação da progressão da doença (Siqueira Jr; Rôças, 2008).

As infecções do canal radicular podem ser primárias ou secundárias. A infecção primária ocorre quando a infecção é decorrente da inflamação pulpar e da infecção do canal radicular após a invasão dos microorganismos e de seus subprodutos. A infecção secundária ocorre de maneira persistente, recorrente, como uma reinfecção em dentes que foram previamente tratados no canal radicular (Sjögren *et al.*, 1997).

O controle da infecção do canal radicular é essencial para um bom resultado do tratamento endodôntico (Byström, 1986; Jorgen, 1996). As bactérias podem ficar em ramificações, istmos ou outras irregularidades, permitindo escapar da ação dos instrumentos e substâncias (Nair *et al.*, 2005). A persistência dos microrganismos e a reinfecção são as principais causas de falha no tratamento endodôntico (Ricucci *et al.*, 2009; Vieira *et al.*, 2012; Alves, *et al.*, 2016; Abusrewill *et al.*, 2020).

A esterilização do sistema de canais radiculares é praticamente impossível de ser alcançada com o preparo químico mecânico, por isso, a redução da carga bacteriana intraradicular com níveis compatíveis com a cicatrização deve ser o principal objetivo microbiológico do tratamento endodôntico (Siqueira Jr; Rôças, 2008). O tratamento endodôntico consiste na eliminação da inflamação/infecção, através da limpeza mecânica realizada com os instrumentos, em combinação com o uso das soluções irrigantes com propriedades desinfetantes. Além disso, a utilização de uma medicação intracanal no sistema de canais radiculares pode ser considerada uma forma complementar de desinfecção (Sjögren *et al.* 1991; Athanassiadis *et al.* 2007; Swimberghe *et al.*, 2019).

### 1.3 Biofilmes endodônticos

Nas infecções endodônticas, o biofilme está presente nas paredes do canal radicular, incluindo suas ramificações e extensões (Swimberghe *et al.*, 2019). Os microrganismos formam biofilmes bem aderidos em áreas distantes dos canais principais, como deltas apicais, istmos e canais laterais. Por conta dessa complexidade anatômica, muitas vezes, essas regiões são impossíveis de serem alcançadas com os instrumentos endodônticos e as bactérias ficam longe do alcance das células do sistema imunológico assim como da ação de antibióticos administrados de forma sistêmica (Haapasalo *et al.*, 2007; Siqueira Jr; Rôças, 2008). A instrumentação por si só não é capaz de remover de forma efetiva todo o biofilme intra-radicular, em consequência da anatomia do sistema de canais radiculares, parte

do canal não é alcançada durante a instrumentação (Peters *et al.*, 2000; Jhajharia *et al.*, 2015; Pereira *et al.*, 2017). Em seu estudo, Peters e Schönenberger (2001) constataram que após a instrumentação, em média 35 a 53% das paredes dos canais permaneciam intocadas.

A composição do biofilme endodôntico varia de indivíduo para indivíduo (Siqueira Jr; Rôças, 2008). Ricucci & Siqueira Jr (2010) em um estudo clínico, analisaram 106 amostras de dentes com periodontite apical. Eles concluíram que a estrutura morfológica do biofilme das infecções endodônticas não possui nenhum padrão, uma vez que sua composição variou de amostra para amostra.

Assim como na natureza, na cavidade oral, os biofilmes de espécies mistas são predominantemente encontrados visto que mais de 700 espécies coabitam neste espaço (Ricucci & Siqueira Jr, 2010).

Por isso, o manejo das infecções endodônticas deve ser baseado na erradicação não específica de microrganismos endodônticos através de substâncias com capacidade antimicrobiana de amplo espectro e sem especificidade, a fim de atingir o maior número de bactérias possíveis (Segura *et al.*, 2018). A redução bacteriana pode ser correlacionada com a cicatrização da periodontite apical (Byström, 1986; Jorgen, 1996; Siqueira Jr; Rôças, 2008).

Bactérias organizadas em biofilmes podem ser cerca de 1000 vezes mais resistentes a agentes antibacterianos (Roy *et al.*, 2018). A desinfecção do biofilme presente no sistema de canais radiculares é um desafio para os endodontistas, visto que, por ser multiespécie, é mais resistente a agentes antimicrobianos quando comparado a bactérias encontradas em forma isolada (Al-Ahmad *et al.*, 2014).

A infecção do canal radicular é um processo dinâmico, devido às alterações das condições ambientais como a presença do oxigênio e a disponibilidade de nutrientes, alterando as características do biofilme (Fabricius *et al.* 1982; Neelakantan *et al.*, 2017; Swimberghe *et al.*, 2019).

Fabricius *et al.* (1982) avaliaram a presença de diferentes espécies bacterianas em amostras de canais radiculares de macacos em diferentes partes do sistema de canais radiculares, e em diferentes períodos de tempo. Com o tempo, o número de bactérias anaeróbias aumentou de forma significativa, ultrapassando a quantidade de bactérias facultativas após 90 dias. Após 90 ou 180 dias de infecção, 85-98% das bactérias presentes no terço apical do canal radicular infectado eram anaeróbias.

Durante a fase inicial do processo infeccioso, bactérias aeróbias e anaeróbias facultativas podem ser encontradas nos canais radiculares ricos em oxigênio (Winkler, Van Amerongen, 1959;

Antunes *et al.*, 2015). Com a necrose, há perda da circulação sanguínea e privação de oxigênio devido ao consumo do mesmo pelos colonizadores primários. Por isso, prevalecem os microrganismos anaeróbios (Fabricius *et al.* 1982). Para Siqueira Jr (2005b) os microrganismos da região apical de polpas necróticas geralmente são, em sua maioria, anaeróbios, sendo que o tempo de infecção pode influenciar tal predominância. Conforme a progressão da doença, a ecologia do interior do canal radicular vai alterando (Neelakantan *et al.*, 2017).

Os canais radiculares primários infectados são canais não tratados com a presença bacteriana prejudicando sua função. O perfil microbiano das infecções primárias varia de 10-30 espécies por canal. As espécies presentes na região apical podem desenvolver um papel importante na patogênese da periodontite apical (Gomes; Herrera, 2018).

As espécies mais encontradas nas infecções primárias são: *Fusobacterium*, *Porphyromonas*, *Prevotella*, *Parvimonas*, *Tannerella*, *Treponema*, *Dialister Filifactor*, *Actinomyces*, *Olsenellae* *Pseudoramibacter*. Alguns estreptococos facultativos ou microaerófilos também são comumente encontrados nesses casos (Siqueira Jr; Rôças, 2005; Siqueira Jr; Rôças, 2009). *Porphyromonas*, *Prevotella*, *Fusobacterium*, *Treponema*, *Camphylobacter*, *Eubacterium* e *Peptostreptococcus* também são espécies bacterianas comumente encontradas em infecções primárias (Neelakantan *et al.*, 2017).

Em canais infectados por infecções persistentes/secundárias, advindos da falha do tratamento endodôntico, os microrganismos encontrados são compostos por um grupo mais restrito de espécies. Canais aparentemente bem tratados têm sido relacionados com menos de cinco espécies. Nos casos de obturação insatisfatória, podem abrigar de 10-30 espécies, número semelhante ao das infecções primárias (Siqueira Jr; Rôças, 2005). As bactérias anaeróbicas facultativas e Gram-positivas predominam em canais com infecções secundárias (Pinheiro *et al.*, 2003; Gomes; Herrera, 2018).

Gomes *et al.* (2008) avaliaram as bactérias presentes em dentes com infecções secundárias e presença de lesão periapical. A espécie comumente encontrada foi a *Enterococcus faecalis*, seguida por *Peptostreptococcus micros*, *Porphyromonas gingivalis*, *Porphyromonas endodontalis*, *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens*, *Filifactor alocis*, *Treponema denticola*, e *Tannerella forsythia*.

Em outro estudo, *Parvimonas micra* foi a espécie mais prevalente em casos de lesão periapical causada pela presença de infecção, seguida por *E. faecalis*, *Fusobacterium nucleatum* e



*Porphyromonas endodontalis* (Bronzato *et al.*, 2021).

Um estudo buscou avaliar a frequência da *F. nucleatum* em infecções primárias e secundárias, sendo esta mais encontrada em infecções primárias do que em secundárias/recorrentes (Gomes *et al.*, 2021).

Para Molander *et al.* (1998) as bactérias anaeróbicas facultativas, principalmente as Gram-positivas, podem sobreviver em fase quiescente com atividade metabólica reduzida por algum tempo, onde fatores como a infiltração coronal durante ou após o tratamento do canal radicular poderia alterar as condições nutricionais, contribuindo para o crescimento bacteriano.

O lipopolissacarídeo (LPS) ou endotoxina, encontrado na parede celular das bactérias Gram-negativas, é secretado em vesículas por organismos em crescimento ou até mesmo na desintegração celular, após sua morte. Na infecção periapical, o LPS é um dos fatores de virulência mais importantes envolvidos no desenvolvimento da inflamação periapical e destruição óssea, pois realiza a ativação da cascata da inflamação, liberando uma série de mediadores pró-inflamatórios (Dauphinee & Karsan 2006, To *et al.*, 2015; Marinho *et al.*, 2018; Gomes; Herrera, 2018). Em um estudo clínico, a aplicação da medicação intracanal de gel de clorexidina associada com o hidróxido de cálcio por 14 dias neutralizou a maioria das endotoxinas que permaneceram nos canais após o preparo químico-mecânico (De Oliveira *et al.*, 2012).

Nas bactérias Gram-positivas, o principal componente da parede celular dessas bactérias é o ácido lipoteicóico (LTA). O LTA possui propriedades adesivas, pois liga-se na hidroxiapatita através da sua porção lipídica, e estimulam leucócitos, monócitos e macrófagos a liberarem mediadores inflamatórios (Ginsburg, 2002; Zhao *et al.*, 2014). Geralmente, o LTA está associado à resistência bacteriana aos agentes antimicrobianos (Gomes; Herrera, 2018).

O LPS e o LTA são fatores de virulência bacteriana presentes nos componentes estruturais e produtos advindos do metabolismo bacteriano. Ambos ferem os tecidos indiretamente pela ativação de uma resposta imune semelhante, que resulta em inflamação (Fouad, 2009). Alguns estudos mostram que LPS e LTA residuais foram encontrados em todos os canais radiculares com infecções endodônticas primárias e secundárias após o preparo químico mecânico (Endo *et al.*, 2012; Aveiro *et al.*, 2020; Bronzato *et al.*, 2021).

Widmer *et al.* (2018) demonstraram que a polpa de dentes saudáveis também possui DNA bacteriano detectável. Em baixas concentrações, tanto o LPS como o LTA estimulam a resposta inata do sistema de defesa do hospedeiro; em níveis mais elevados, são relacionados à dor de origem pulpar e à inflamação perirradicular (Martinho; Gomes, 2008; Fouad, 2009).

As bactérias precisam alcançar um quórum de células suficientes para serem patogênicas. Após o alcance da carga bacteriana necessária, a doença infecciosa inicia. O tratamento deve consistir na redução das células bacterianas abaixo do limiar patogênico, caso contrário, a doença persiste. O sucesso do tratamento consiste na redução das bactérias em níveis compatíveis com a cicatrização (Siqueira Jr; Rôças, 2008).

O terço apical do canal radicular pode ser considerado um território crítico, para formação de biofilme, uma vez que para as bactérias patogênicas a proximidade com os tecidos perirradiculares facilita a obtenção de nutrientes, assim como a indução de danos. Para o hospedeiro, é crítico, pois as células de defesa devem se concentrar nessa região para isolar os microrganismos como tentativa de impossibilitar a propagação de infecção. O resultado do tratamento depende do quão eficaz o clínico será na redução da infecção e na formação de um ambiente propício que vede o sistema de canais radiculares de fluidos e bactérias favorecendo o reparo (Siqueira Jr, 2004).

Na maioria dos casos com periodontite apical, o tratamento endodôntico resulta na resolução da lesão apical. Segundo uma revisão sistemática, em média, um em cada cinco dentes com infecção primária do canal radicular e periodontite apical não se cura (Ng *et al.*, 2008). O resultado do tratamento endodôntico depende do controle do biofilme intra-radicular através de uma instrumentação eficaz e da desinfecção através de irrigantes e medicamentos (Peters *et al.*, 2000; Parolia *et al.*, 2020).

#### 1.4 Modelos de Biofilmes endodônticos *in vitro*

Na Endodontia, os biofilmes são cultivados a fim de reunir informações das relações microbianas ou até mesmo dos microrganismos e das células de defesa do hospedeiro (Peters *et al.*, 2011). Com o intuito de simular a realidade, muitos estudos de modelo de biofilme *in vitro* estão sendo utilizados em experimentos bacterianos na Endodontia (Garg; Mala; Kamath, 2021).

Estudos para a avaliação da eficiência de materiais, procedimentos de irrigação e medicamentos

intracanais são realizados em modelos de biofilme *in vitro* (Peters *et al.*, 2011). Biofilmes monoespécie são mais práticos de desenvolver e reproduzir (Garg; Mala; Kamath, 2021). Porém, biofilmes multiespécie são mais condizentes com a realidade clínica (De Paz, 2012).

Swimberghe *et al.* (2019) ao avaliar e comparar a suscetibilidade ao hipoclorito de sódio de biofilmes monoespécie e multiespécie com diferentes tempos de maturação, constataram que parâmetros como a idade do biofilme, composição do biofilme e o substrato utilizado influenciaram nos resultados obtidos.

Para Garg, Mala & Kamath (2021), é um grande desafio desenvolver em laboratório as características de um biofilme que simule a realidade, porém não é impossível. A realização de novos estudos e experimentos com foco em analisar os modelos de biofilme e a complexidade do biofilme intracanal é essencial, principalmente para que possamos reavaliar a erradicação das espécies assim como investigar o efeito de novos agentes antibacterianos nos biofilmes (Lukic *et al.*, 2020).

As complexas interações interespécies, assim como a composição do biofilme influenciam no desenvolvimento de um biofilme misto (Lukic *et al.*, 2020).

A bactéria comumente mais utilizada em estudos com modelos de biofilme do tipo endodôntico é o *E. faecalis* (George; Kishen, 2007), que é uma bactéria anaeróbica facultativa, Gram-positiva, e selecionada na maior parte dos estudos devido sua alta prevalência em casos de insucesso endodôntico (Roças; Siqueira Jr, 2008).

Alguns estudos abordam que o *E. faecalis* possui capacidade de sobreviver em locais de baixa nutrição dentro do sistema de canais radiculares, podendo apresentar resistência à medicação intracanal e ao preparo químico mecânico, sobrevivendo como uma mono infecção no interior desses canais (Sundqvist *et al.*, 1998; Dunavant *et al.*, 2006; Fisher; Philips, 2009; Gomes; Herrera, 2018).

Segundo Prada *et al.* 2019, o *E. faecalis* é o principal microrganismo associado ao insucesso endodôntico, mas, outras bactérias como *Fusobacterium nucleatum* e *Propionibacterium* também têm sido associadas em casos de infecções recorrentes.

Para Swimberghe *et al.* (2019), os modelos de biofilmes endodônticos devem conter comunidades mistas, incluindo bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, dado que cada terapia pode

possuir um efeito diferente nesses tipos de bactérias. A mesma situação de combinação é discutida em relação à presença de oxigênio, a fim de representar a maioria das infecções persistentes.

Outro fator a ser considerado é a idade ou o estágio de maturação do biofilme, visto que estudos anteriores demonstram que biofilmes mais antigos costumam ser mais resistentes à substâncias antimicrobianas do que biofilmes jovens (Shen *et al.*, 2011; Stojicic; Shen; Haapasalo, 2013; Yang *et al.*, 2016; Swimberghe *et al.*, 2021; Meire; Van Der Waal, 2022). Stojicic, Shen e Haapasalo (2013) avaliaram a sensibilidade das bactérias presentes em biofilmes de diferentes tempos de maturação, entre 2 e 3 semanas de maturação as bactérias presentes nos biofilmes passaram a ser mais resistentes aos agentes desinfetantes do que bactérias presentes em biofilmes jovens de 1 semana.

### 1.5 Substâncias utilizadas como medicação intracanal

O sucesso do tratamento endodôntico depende de um conjunto de fatores, da desinfecção químico-mecânica do canal radicular, da remoção dos microrganismos e do biofilme (Prada *et al.*, 2019). As bactérias podem penetrar profundamente os túbulos dentinários em até 300 µm do canal radicular ficando aderidas às fibras de colágeno da dentina (Siqueira Jr; Rôças; Lopes, 2002). Além disso, o sucesso endodôntico depende também de uma obturação adequada e de um bom selamento definitivo (Tabassum; Khan, 2016).

Estudos salientam que mesmo após a alta redução nos níveis bacterianos, muitos canais permanecem infectados após o preparo químico-mecânico. Em razão disso, abordagens complementares são recomendadas para melhorar a desinfecção do canal radicular (Vianna *et al.*, 2006; Siqueira Jr; Rôças, 2011; Rôças *et al.*, 2016; Neves *et al.*, 2016; ; Carvalho *et al.*, 2020).

Quando o tratamento endodôntico não for capaz de eliminar totalmente a infecção, podemos utilizar uma medicação intracanal. Assim, para sobreviver, as bactérias precisam resistir ou fugir dos procedimentos de desinfecção intracanal realizados e se adaptar rapidamente ao novo ambiente. A sobrevivência bacteriana e o resultado do tratamento dependem diretamente da capacidade de adaptação das espécies (Siqueira Jr; Rôças, 2008).

Através do conhecimento do microbioma do canal radicular, podemos ter um guia para tomada de decisão e estratégias personalizadas efetivas para essas infecções (Abusrewill *et al.*, 2020).

Medicações intracanaís biocompatíveis com eficácia antimicrobiana podem reduzir ou

erradicar as bactérias intracanaís, aumentando de forma significativa o resultado do tratamento endodôntico e assim, favorecer o prognóstico (Estrela *et al.*, 2009; Kandawasmy *et al.*, 2010). Para Siqueira Jr e Rôças (2008), o uso de uma medicação no interior do canal radicular pode ser a solução para bactérias resistentes. O canal radicular pode ser considerado um reservatório local, tendo como objetivo a ação sobre os tecidos endodônticos e periodontais (Lopes e Siqueira, 1999; Gomes *et al.*, 2009). No entanto, formulações convencionais como gel, solução e outras formas de medicamentos intracanaís são inacessíveis às bactérias porque têm penetrabilidade limitada nos túbulos dentinários (Waltimo *et al.*, 2007). Para Ordinola-Zapata e colaboradores (2022) o uso de medicações intracanaís é bastante discutido na Odontologia, visto que muitos estudos encontraram diferentes resultados ao comparar o tratamento de múltiplas consultas versus tratamento em sessão única.

O hidróxido de cálcio é a medicação intracanal mais utilizada, devido suas características anti-inflamatórias e bactericidas, e também por possuir um pH alcalino que pode se difundir através dos túbulos dentinários, favorecendo o reparo e induzindo a calcificação dos tecidos perirradiculares (Carrote, 2004; Kambale *et al.*, 2014). O pH do hidróxido de cálcio é 12,5 (Siqueira Jr; Lopes, 1999). Os íons hidroxila geram radicais livres que são capazes de destruir componentes das membranas celulares bacterianas, além de inibir a replicação do DNA e a atividade celular ao reagir com o DNA bacteriano (Ordinola-Zapata *et al.*, 2022). As limitações do hidróxido de cálcio têm estimulado pesquisadores a buscar novas alternativas (Del Carpio-Perochena *et al.*, 2017). A ação tampão da dentina, a hidroxiapatita, o exsudato inflamatório, restos de tecido pulpar necrótico e as toxinas bacterianas podem diminuir e até neutralizar a ação antimicrobiana do hidróxido de cálcio (Siqueira Jr; Lopes, 1999; Mohammadi; Dummer, 2011).

No estudo de Ordinola-Zapata *et al.* (2013) o hidróxido de cálcio não apresentou eficácia na redução bacteriana. O hidróxido de cálcio possui um espectro antimicrobiano limitado, possuindo ação apenas em algumas bactérias da microbiota das infecções endodônticas (Fava; Saunders, 1999; Siqueira Jr; Lopes, 1999; Sathorn; Parashos; Messer, 2007). Em biofilmes polimicrobianos, o hidróxido de cálcio apresenta apenas ação bacteriostática (Del Carpio-Perochena *et al.*, 2017).

Um estudo recente avaliou a ação do hidróxido de cálcio na estrutura de um biofilme *in vitro* de *E. faecalis*, a medicação testada não apresentou ação anti-biofilme. Além disso, foi constatado que o hidróxido de cálcio auxiliou na estrutura do biofilme (Momenijavid *et al.*, 2022). Para Mohammadi e

Dummer (2011) o hidróxido de cálcio é eficaz em condições laboratoriais, porém não é tanto quanto eficaz ao ser utilizado *in vivo*.

### 1.5.1 Medicações intracanáis em biofilmes monoespécie

Alguns estudos desenvolveram biofilme monoespécie de *E. faecalis* para testar a suscetibilidade a alguns medicamentos intracanáis (Saber; El-Hady, 2012; Lakhani *et al.*, 2017). Saber & El-Hady (2012) avaliaram *in vitro* o efeito antimicrobiano da amoxicilina + clavunulato, ciprofloxacina, doxicilina e clindamicina em um biofilme maduro de *E. faecalis* dentro do sistema de canais radiculares. O efeito antimicrobiano da amoxicilina + clavunulato, ciprofloxacina e clindamicina foi significativamente melhor do que a doxiciclina.

No estudo de Lakhani *et al.* (2017), as amostras foram contaminadas com *E. faecalis* por 21 dias, e posteriormente divididas em 5 grupos: soro fisiológico (grupo controle), hidróxido de cálcio, clorexidina gel 2%, pasta antibiótica tripla (metronidazol, minociclina e ciprofloxacino) e moxifloxacino. O gel de clorexidina 2% alcançou o melhor efeito antimicrobiano contra *E. faecalis*. Na sequência, os melhores resultados após a clorexidina foram obtidos pela pasta tripla antibiótica, logo moxifloxacina, e por fim, hidróxido de cálcio. Del Carpio-Perochena *et al.* (2017) avaliaram a eficácia de nanopartículas de quitosana e extrato de própolis associadas em uma pasta de hidróxido de cálcio em biofilmes mono e multiespécie.

Zancan *et al.* (2019) avaliaram a atividade de medicações intracanáis em biofilmes monoespécie de 21 dias de *E. faecalis* e *Candida albicans* em blocos de dentes bovinos. Hidróxido de cálcio, clorexidina, ciprofloxacina, metronidazol, cetoconazol, antibiótico duplo, antibiótico triplo, ciprofloxacina + cetoconazol, ciprofloxacina + metronidazol + cetoconazol, e por fim, metronidazol + cetoconazol foram testadas por sete dias e comparadas com um grupo controle. As pastas metronidazol + cetoconazol e ciprofloxacina + cetoconazol apresentaram eficácia para ambos os biofilmes. As pastas de hidróxido de cálcio e clorexidina não foram eficazes para todos os biofilmes.

Um estudo avaliou a ação de uma mistura de três antibióticos (ciprofloxacina, cefuroxima e metronidazol) na superfície extrarradicular inoculada com *F. nucleatum* por 8 dias. Os grupos testados foram: grupo controle com solução salina estéril, propilenoglicol, ciprofloxacina, cefuroxima e metronidazol e hidróxido de cálcio. Apenas os dentes inoculados com a pasta de três antibióticos, foi capaz de penetrar através da dentina e inibir o crescimento do *F. nucleatum* (Zaruba *et al.*, 2016).

Kandaswamy *et al.* (2010) avaliaram a atividade antimicrobiana do gel de clorexidina 2%, própolis, suco de morinda citrifolia, iodopovidona 2% e do hidróxido de cálcio em dentina infectada com *E. faecalis* por 21 dias. A clorexidina gel 2% foi a medicação que obteve os melhores resultados, seguido pelos grupos iodopovidona 2%, própolis, suco de morinda citrifolia e hidróxido de cálcio.

### 1.5.2 Medicações intracanáis em biofilmes multiespécie

Recentemente, Del Carpio-Perochena *et al.* (2017) testaram a eficácia da ação de nanopartículas de quitosana e do extrato etanólico de própolis associados ao hidróxido de cálcio em biofilmes mono e multiespécie. Parece que o hidróxido de cálcio, quando associado às nanopartículas de quitosana tem sua eficácia aumentada em biofilmes multiespécie durante um período de 7 a 14 dias.

Outros autores testaram a ação do ácido 2 hidroxi-isocaproico e da alfa mangostina em um modelo de biofilme multiespécie de *C. albicans*, *E. faecalis*, *L. rhamnosus* e *S. gordonii* com maturação de 21 dias. O ácido 2 hidroxi-isocaproic e a alfa mangostina apresentaram atividade antimicrobiana contra biofilmes bacterianos-fúngicos multiespécie (Leelapornpisid *et al.*, 2021).

Para Neelakantan *et al.* (2017) faltam pesquisas de avaliação da capacidade das medicações intracanáis em penetrar na matriz extracelular dos biofilmes. Os autores também reforçam a necessidade de uma melhor compreensão dos biofilmes.

Garg, Mala & Kamath (2021) e De Paz (2012) afirmam que biofilmes multiespécie simulam melhor a realidade. No entanto, são mais caros e complexos para serem desenvolvidos (Garg; Mala; Kamath, 2021).

### 1.6 Lisozima

A lisozima é uma enzima encontrada em tecidos e fluidos do corpo humano. Ela contribui com a resposta imunológica natural de combate às reações inflamatórias e infecções (Freitas, 2010; Kryzygiak *et al.*, 2015; Lima, 2017; Vahdati, Tohidi Moghadam, 2020). Somado a isso, possui propriedade antibacteriana presente na saliva humana, relacionada à capacidade de degradação da camada de mureína da parede celular bacteriana, podendo levar a lise bacteriana (Edgerton, Koshlukolova, 2000).

Desde que Fleming descobriu a lisozima em 1921, seu potencial antibacteriano tem sido bastante utilizado na parte de preservação de alimentos, biomedicina, biomateriais e até mesmo em ração animal (Fleming, 1922; Cegielska-Radziejewska *et al.*, 2008; Oliver, Wells, 2015; Wu *et al.*, 2019; Sarkar *et al.*, 2020; Chen *et al.*, 2022). A lisozima pode ser obtida através dos ovos de galinha, lágrimas e outras secreções (Purice *et al.*, 2007).

Na saliva, contribui para prevenção de patologias como a candidíase oral, doenças periodontais e cárie dental (Krzygciak *et al.*, 2015; Seeba *et al.*, 2017). A lisozima é uma enzima com ação de hidrólise nas ligações glicosídicas entre o ácido N-acetilmurâmico e os resíduos de N-acetilglicosamina encontrados na camada peptídica da parede celular bacteriana de bactérias Gram-positivas (Chipman, Sharon, 1969; De Andrade *et al.*, 2014; Krzygciak *et al.*, 2015; Tongut-Altin *et al.*, 2015; Sebaa, 2017). Por conta disso, a lisozima apresenta propriedades bactericidas e bacteriostáticas, principalmente contra bactérias Gram-positivas (Pellegrini *et al.*, 1997; Chen *et al.*, 2022). A lisozima é comumente utilizada em laboratório em kits para extração de DNA bacteriano devido a sua capacidade de romper ligações da parede celular bacteriana (Yuan *et al.*, 2012).

Para Ferraboschi, Ciceri e Grisenti (2021) o efeito antimicrobiano da lisozima acontece também em bactérias Gram-negativas, mas é reduzido em consequência da presença de uma camada protetora de lipopolissacarídeos na membrana externa. Um estudo recente sugeriu que a aplicação clínica da lisozima apresenta menor risco de resistência bacteriana (Ferraboschi, Ciceri, Grisenti, 2021).

Ao ser associada com o ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), a lisozima possui seu espectro antimicrobiano ampliado, podendo agir em bactérias Gram-negativas (Padgett *et al.*, 1998; Branen; Davidson, 2004; Mecitoğlu *et al.*, 2006; Lima, 2017). Além disso, possui atividade de quitinase, quebrando a ligação glicosídica presente na parede de fungos (Ruas *et al.*, 2010).

Mecitoğlu *et al.* (2006) avaliaram a ação da lisozima em embalagens antimicrobianas do ramo alimentício e sugeriram que quando associada com o EDTA, seu espectro foi aumentado, apresentando ação também contra *Escherichia coli*.

Alguns autores afirmam que caso a lisozima sofra desnaturação, seja por meio de aquecimento ou de mudança do pH, a mesma pode atuar contra bactérias Gram-negativas (Ibrahim *et al.*, 1996; Masschlck *et al.*, 2001; Ferraboshi, Ciceri, Grisenti, 2021). Em um estudo, a lisozima sofreu desnaturação de 50% de sua estrutura ao ser submetida em um pH 9,6 (Ansari *et al.*, 2010). Para Kumar e colaboradores (2018) a total desnaturação da lisozima obtida da clara de ovo da galinha acontece em



um pH maior que 12,9.

No estudo de Ibrahim e colaboradores (1996), a lisozima apresentou atividade bactericida contra Gram-positivas e Gram-negativas após ser desnaturada termicamente através do aumento da temperatura para 80°C em pH 7,2. A lisozima apresenta ação bactericida mesmo desnaturada, independente da ação enzimática residual (Ibrahim *et al.*, 1996; Ibrahim *et al.*, 2002, Mine; Larau, 2004). Por essa razão, a ação bactericida da lisozima também pode ser associada às suas propriedades catiônicas e hidrofóbicas (Ibrahim *et al.*, 2002).

Peptídeos antimicrobianos isolados da lisozima de clara de ovo de galinha desnaturada apresentaram atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (Pellegrini *et al.*, 1997; Mine; Larau, 2004). Para Mine & Larau (2004) a lisozima obtida da clara do ovo possui sequências peptídicas capazes de induzir a inibição bacteriana. Os peptídeos antimicrobianos possuem amplo espectro e auxiliam na ruptura da matriz do biofilme, aumentando a difusão de antibióticos e a eficácia dos antibióticos devido uma maior difusão das medicações (Talapko *et al.*, 2022; Pereira *et al.*, 2022). São oligopeptídeos catiônicos de origem natural ou projetados através do uso da tecnologia, seu uso apresenta segurança, com baixa toxicidade e menor propensão ao desenvolvimento de resistência bacteriana (Ordinola-Zapata *et al.*, 2022). Possuem ação na permeabilidade da membrana celular bacteriana, levando à alteração do potencial eletroquímico, danificando a membrana e permitindo a entrada de moléculas maiores para destruição bacteriana, levando a morte celular (Lei *et al.*, 2019).

Estudos recentes testaram a ação da lisozima em patógenos da cavidade oral (Andrade *et al.*, 2014; Pinheiro *et al.*, 2015). Andrade *et al.* (2014) observaram em seu estudo que as concentrações de 54,4mg/mL, 108 mg/mL e 217,6 mg/mL foram capazes de inibir o crescimento do *S. mutans*, ao mesmo tempo que, em concentrações mais baixas (27,2 mg/mL), apresentou eficácia para inibir o crescimento do *L. casei*. A eficácia de uma mistura de lisozima, lactoferrina e lactoperoxidase associada ao cimento de ionômero de vidro foi avaliada em um modelo de biofilme cariogênico. Os resultados mostraram que essa associação amplifica a ação antimicrobiana do cimento de ionômero de vidro em relação a *S. mutans* (Pinheiro *et al.*, 2015).

A lisozima é uma potente moduladora da capacidade de formação de biofilme de diferentes espécies (Hukic *et al.*, 2018). Os efeitos da lisozima em um biofilme de *Candida albicans* foram diferentes conforme a alteração na concentração utilizada. Em concentrações de lisozima, menores de 30 µg/ml, a lisozima apresentou atividade anti-biofilme. No entanto, em concentrações acima de

300 µg/ml houve ação pró-biofilme, aumentando a adesão (Seeba *et al.*, 2017). A ação anti-biofilme da lisozima 30 µg/ml foi testada em um biofilme de *Pseudomonas aeruginosa*, a enzima foi capaz de inibir significativamente a formação do biofilme (Eladawy *et al.*, 2020).

Para Wu *et al.* (2016) a lisozima possui grande potencial para ser utilizada, visto suas propriedades anti-inflamatórias, antivirais, antissépticas, anti-histamínicas e antineoplásicas.

## **2 JUSTIFICATIVA**

Novas substâncias com potencial antimicrobiano, têm sido investigadas para auxiliar no processo de desinfecção do sistema de canais radiculares durante o tratamento endodôntico. A lisozima tem sido investigada, principalmente por apresentar propriedades bactericidas e bacteriostáticas. Porém, tais propriedades ainda não foram testadas sequer de forma isolada ou associada com uma solução alcalina em um modelo de biofilme endodôntico multiespécie, justificando nossa pesquisa.

### 3 OBJETIVOS E HIPÓTESE NULA

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar *in vitro*, o potencial antimicrobiano da lisozima pura ou associada à um pH alcalino em um modelo de biofilme endodôntico multiespécie.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Comparar a ação antimicrobiana da lisozima associada ao pH alcalino no biofilme multiespécie;
- Avaliar se a associação da lisozima com pH alcalino potencializa a ação antimicrobiana, diminuindo o número de microrganismos viáveis;
- Ilustrar a estrutura do biofilme após a realização dos tratamentos através da Microscopia Confocal de Varredura a Laser;
- Avaliar se a lisozima pode ser uma alternativa para ser utilizada como substância antimicrobiana na terapia endodôntica.

#### 3.3 HIPÓTESE NULA

A hipótese nula testada foi de que a lisozima de forma isolada e sua associação com uma solução alcalina não apresentam ação antimicrobiana em um modelo de biofilme endodôntico multiespécie.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Obtenção da Amostra

Neste estudo experimental *in vitro*, foram utilizados 20 dentes bovinos obtidos através de doação. Através do uso de uma máquina de corte de precisão Isomet 2000 (Buheler, Lake Forest, IL, EUA) acoplada a um disco diamantado (South Bay Technology, San Clement, EUA) de 0,3mm de espessura, com velocidade de 250 rpm sob refrigeração constante, 36 blocos de dentina bovina foram obtidos. Com o auxílio de uma máquina Politriz (EcoMet/Automat 2000 Buehler, IL, EUA) com rotação 100 rpm, sob refrigeração, através do uso de lixas de granulação ordenado de 600, 400 e 220 os espécimes de dentina foram polidos e padronizados em uma dimensão final de 9mm x 4mm x 0,5mm. Logo, os espécimes foram depositados em microtubos do tipo Eppendorf (Kasvi, São José dos Pinhais – PR, Brasil) e ultrassonificados durante 10 minutos em cuba ultrassônica. Em seguida, a esterilização dos espécimes foi realizada em autoclave a 121° C por 40 minutos. Todo o preparo dos espécimes de dentina foi realizado no Laboratório de Biomecânica e Materiais Dentários da UFSC.

A saliva utilizada durante todo o experimento foi obtida dos pesquisadores responsáveis pelo estudo. A saliva não foi estimulada, sendo coletada com pelo menos 1,5 horas após comer, beber ou escovar os dentes. As coletas foram inicialmente armazenadas em tubos Falcon de plástico estéreis de 50 mL (Kasvi, São José dos Pinhais – PR, Brasil) e congeladas a -20°C. O processamento da saliva total foi realizado no Laboratório de Microbiologia Oral da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo (USP). Inicialmente, a saliva foi centrifugada por 30 minutos, a 4°C, 27.000 x g. O sobrenadante foi pasteurizado a 60°C por 30 minutos, e novamente centrifugado em Falcons estéreis. O volume resultante da última centrifugação foi armazenado a -20°C (Guggenheim *et al.*, 2001). O plaqueamento de amostras de saliva foi realizado em placas de ágar sangue, incubadas por 72 horas a 37°C em anaerobiose, para avaliar a eficiência da pasteurização.

### 4.2 Formação do Biofilme

As etapas a seguir, referentes a formação e ao tratamento do biofilme, foram realizadas no Laboratório de Microbiologia Oral da Faculdade de Odontologia e no Laboratório de Microbiologia Oral do Instituto de Ciências Biomédicas (ICB) II da USP. O desenvolvimento do biofilme multiespécie foi realizado através do estudo prévio de Pereira *et al.* (2022).

Dez bactérias foram utilizadas: *Actinomyces oris* OMZ 745 (ATCC 27044), *Enterococcus faecalis* OMZ 422 (ATCC 29212), *Fusobacterium nucleatum* OMZ 2598 (KP-F2), *Parvimonas micra* OMZ 518 (ATCC 33270), *Porphyromonas gingivalis* OMZ 925 (ATCC 33277), *Prevotella intermedia* OMZ 278 (ATCC 25611), *Selenomonas sputigena* OMZ 527 (ATCC 35185), *Streptococcus oralis* OMZ 607 (SK 248), *Tannerella forsythia* OMZ 1132 (ATCC 43037) e *Veillonella dispar* OMZ 493 (ATCC 17748). De forma individualizada, as cepas que compõem o biofilme foram descongeladas e cultivadas em anaerobiose a 37°C em placas de ágar Columbia com suplementação de 5% de sangue de carneiro desfibrinado. A pureza das culturas foi confirmada através da morfologia das colônias, coloração de Gram e teste de catalase.

Logo, as cepas ainda individualizadas foram transferidas para o meio universal fluido modificado (mFUM) que é um meio à base de levedura e triptona, modificado pela suplementação de tampão de Sørensen 67 mM com pH final 7,2 e concentração de carboidratos em mFUM de 0,3% (p/v) de glicose. (Gmür & Guggenheim, 1983). O mFUM contendo 1 mL de lactato de sódio 1g/10mL foi utilizado para o cultivo da *V. dispar*. Para a *P. gingivalis* e para *P. intermedia* o mFUM foi complementado com 50 µL de hemina (1 mg/mL) e 10 µL de menadiona (0,5 mg/mL).

Anteriormente à formação do biofilme, as cepas foram incubadas em anaerobiose a 37°C *overnight*, e por mais 4 horas e 30 minutos para o crescimento exponencial.

Os espécimes foram inseridos em placas de cultura celular de poliestireno de 24 poços de fundo chato (Kasvi, São José dos Pinhais – PR, Brasil). Previamente à inoculação do biofilme, os espécimes de dentina presentes nas placas de cultura de 24 poços foram imersos em saliva pasteurizada por 4 horas em temperatura ambiente sob um agitador de laboratório orbital (Kasvi, São José dos Pinhais – PR, Brasil).

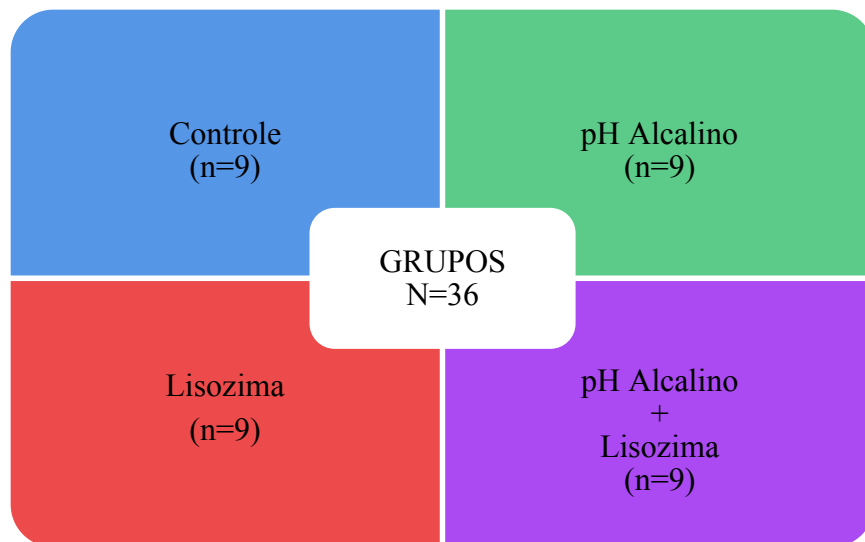
Para iniciar a formação de biofilme, os espécimes foram transferidos da placa contendo saliva pasteurizada para uma nova placa, com 1,6 mL de meio de crescimento por poço, sendo 960 µL de saliva, 480 µL de meio universal de fluido modificado pela suplementação de tampão de Sørensen 67 mM com pH final 7,2 (mFUM), e 160 µL de soro bovino fetal (SFB). Em seguida, 200 µL de suspensão microbiana preparada a partir de volumes e densidades iguais (1 mL) de cada cepa correspondendo a uma densidade óptica de 550 nm de 0,9-1,2 confirmada via espectrofotômetro foram adicionados por poço.

O biofilme foi incubado por 21 dias em condições anaeróbias a 37°C. Sendo que a cada 48 horas os espécimes de dentina eram lavados 3 vezes em soro fisiológico tamponado com fosfato (PBS)

e depositados em novos poços contendo 960  $\mu\text{L}$  de saliva, 480  $\mu\text{L}$  de mFUM, e 160  $\mu\text{L}$  de SFB.

Após a incubação do biofilme, os espécimes foram divididos em 4 grupos:

Figura 1 – Representação da divisão dos grupos



Duas placas de cultura de 24 poços foram utilizadas para a realização do experimento. Os espécimes foram divididos, e dois experimentos independentes em quadruplicata foram realizados. Oito discos por grupo foram utilizados para contagem bacteriana, e um por grupo para obtenção de imagem ilustrativa via Microscopia Confocal de Varredura a Laser.

#### 4.3 Manipulação das Soluções e Tratamento

Para o grupo Controle, foi utilizado apenas o mFUM. O mFUM com pH alcalino (pH=12,5) foi obtido através do uso do pHmêtro (BEL Engineering, Itália) com auxílio das soluções de ácido clorídrico (HCl) e hidróxido de sódio (NaOH) até o estabelecimento do pH 12,5.

A lisozima de clara de ovo de galinha em pó liofilizado na proporção de proteína  $\geq 90\%$ ,  $\geq 40.000$  unidades/mg de proteína (Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA) foi pesada em balança de alta precisão (BEL Photonics do Brasil, Piracicaba, SP, BR) e em seguida diluída. Foi utilizado 200  $\mu\text{g}$  de lisozima para 1 mL de mFUM para realização do tratamento do grupo Lisozima, e 200  $\mu\text{g}$  de lisozima em 1 mL de mFUM com pH alcalino para o grupo pH Alcalino com Lisozima. O pH final das soluções

com pH Alcalino foi de 12,5. As medicações foram misturadas através de um Agitador Magnético de Mistura (Capp Denmark, Nordhausen, TH; DE) associado a uma Barra Magnética de Agitação.

Após o preparo, as respectivas soluções de cada grupo foram depositadas no interior dos poços sob os espécimes de dentina com biofilmes (1 ml por espécime), e incubadas por 24 horas em anaerobiose a 37°C.

#### 4.4 Microscopia Confocal de Varredura a Laser

De forma aleatória, um espécime por grupo foi selecionado após as 24 horas de tratamento. Os espécimes foram levados para visualização em Microscopia Confocal de Varredura a Laser no Laboratório Multiusuário CEFAP-Pluma do ICB III da USP. Previamente a visualização no microscópio, as amostras foram coradas através da imersão dos espécimes, por 20 minutos, em corantes do kit de viabilidade bacteriana LIVE/DEAD BacLight (Thermo Fischer, Waltham, MA, USA). Células viáveis são coradas em verde com o corante SYTO 9, e células mortas em vermelho através do corante Iodeto de propídio. Logo, os espécimes foram visualizados através do Microscópio Confocal de Varredura a Laser ZEISS LSM 800 (Carl Zeiss, Jena, TH; DE), através da lente objetiva de 10x. As imagens foram obtidas através do software ZEISS ZEN 3.7 (Carl Zeiss, Jena, TH; DE).

#### 4.5 Contagem Bacteriana

Esta etapa foi realizada no Laboratório de Microbiologia Oral da Faculdade de Odontologia e no Laboratório de Microbiologia Oral do ICB II da USP. Após o tratamento, as amostras foram lavadas por 3 vezes de 2 imersões cada em PBS, e transferidos para outro tubo com 1 mL de PBS. Os espécimes foram vortexados por 3 minutos. Em seguida, banho ultrassônico a 30 W por 8 minutos (Sonifier B-12, Branson Ultrasonics, Danbury, CT, USA) e novamente em vórtex por 30s. A diluição em série foi realizada até  $10^{-5}$ , as suspensões de  $10^{-4}$  e  $10^{-5}$  foram plaqueadas em placas contendo ágar sangue e posteriormente incubadas anaerobicamente a 37 °C por 5 dias. Após o período de incubação, foi realizada a contagem das Unidades Formadoras de Colônias (UFC) via aplicativo Promega Colony Counter (Promega Corporation, Madison, WI, USA).



#### 4.6 Análise Estatística

Os dados das contagens de UFC foram transformados em log, e as diferenças entre os grupos de tratamento testadas pela ANOVA, seguida pelo teste de múltiplas comparações de Tukey. O valor utilizado para indicar diferença significativa foi o de  $p < 0,05$ . A análise estatística foi realizada através do software de análise estatística IBM SPSS Statistic™ (versão 21.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

## 5 RESULTADOS

Os dados obtidos apresentaram distribuição paramétrica (Quadro 1) e foram comparados utilizando os testes One-way ANOVA (Quadro 2) e post-hoc Tukey (Quadro 3). Um nível de significância de 5% foi empregado.

Quadro 1 – Teste de Normalidade Shapiro-Wilk

<b>Grupo</b>	<b>Estatística</b>	<b>Nº amostra</b>	<b>Nº de significância (p)</b>
Controle	0,861	8	0,124
pH Alcalino	0,972	8	0,910
Lisozima	0,894	8	0,254
pH Alcalino + Lisozima	0,855	8	0,108

Quadro 2 – One-way ANOVA

	<b>Soma dos quadrados</b>	<b>df</b>	<b>Quadrado médio</b>	<b>Z</b>	<b>Nº de significância (p)</b>
Entre grupos	19,079	3	6,360	8,130	0,000
Nos grupos	21,904	28	0,782		
Total	40,983	31			

Segundo os resultados, observa-se que há diferença estatística entre os grupos ( $p < 0,05$ ). O grupo Lisozima com pH Alcalino apresentou diferença estatística ao ser comparado com todos os outros grupos: Controle ( $p = 0,009$ ), pH Alcalino ( $p = 0,001$ ) e Lisozima ( $p = 0,002$ ). Os demais grupos não apresentaram diferença estatística além desta anteriormente citada (Quadro 3).

Quadro 3 – Teste Post-Hoc Tukey

Grupo (I)	Grupo (J)	Diferença média (I-J)	Erro padrão	Nº de significância (p)	Intervalo de Confiança 95%	
					Limite superior	Limite inferior
Controle	pH Alcalino	-0,41000	0,44223	0,791	-1,6174	-0,7974
	Lisozima	-0,25625	0,44223	0,937	-1,4637	0,9512
	pH Alcalino + Lisozima	1,52875	0,44223	0,009	0,3213	2,7362
pH Alcalino	Controle	0,41000	0,44223	0,791	-0,7974	1,6174
	Lisozima	0,15375	0,44223	0,937	-1,0537	1,3612
	pH Alcalino + Lisozima	1,93875	0,44223	0,001	0,7313	3,1462
Lisozima	Controle	0,25625	0,44223	0,937	-0,9512	1,4637
	pH Alcalino	-0,15375	0,44223	0,985	-1,3612	1,0537
	pH Alcalino + Lisozima	1,78500	0,44223	0,002	0,5776	2,9924
pH Alcalino + Lisozima	Controle	-1,52875	0,44223	0,009	-2,7362	-0,3213
	pH Alcalino	-1,93875	0,44223	0,001	-3,1462	-0,7313
	Lisozima	-1,78500	0,44223	0,002	-2,9924	-0,5776

O grupo pH Alcalino com Lisozima apresentou maior potencial antimicrobiano no biofilme representando uma redução de 1 – 1,9 UFC/ml log<sub>10</sub> quando comparado aos outros grupos (média do respectivo grupo = 5,4 UFC/mL log<sub>10</sub> – Quadro 4).

Quadro 4 – Descritivos

Grupo	N	Média de UFC/ml em log <sub>10</sub>	Intervalo de confiança para 95% para média	
			Limite superior	Limite inferior
Controle	8	6,9313	6,4795	7,3830
pH Alcalino	8	7,3413	6,5073	8,1752
Lisozima	8	7,1875	6,7180	7,6570
pH Alcalino + Lisozima	8	5,4025	4,3696	6,4354

Imagens dos grupos após o tratamento foram realizadas através da Microscopia Confocal a Laser a fim de ilustrar os resultados.

Figura 2 – Imagens de Microscopia Confocal do grupo Controle: bactérias não viáveis (1A), viáveis (1B) e sobreposição das imagens (1C)

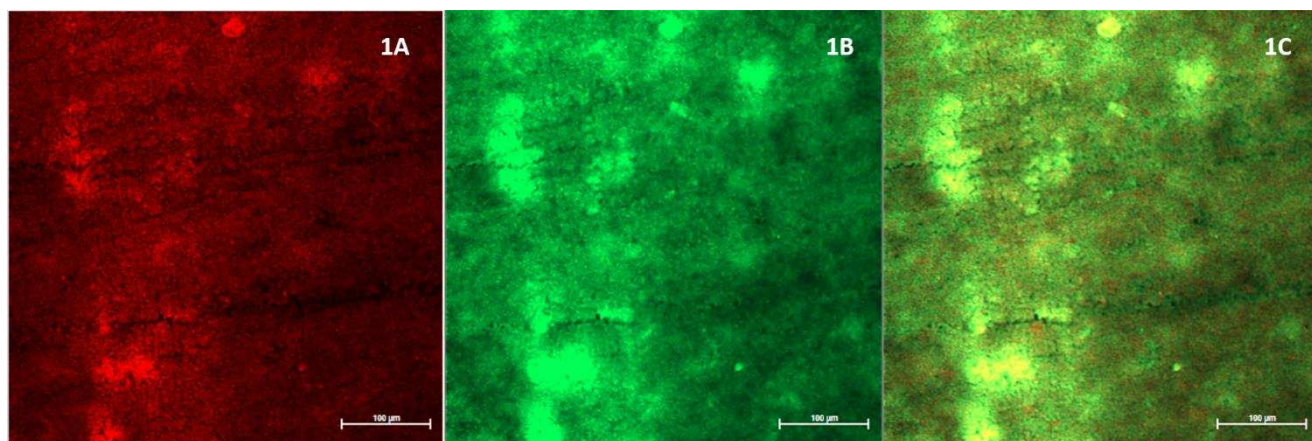


Figura 3 – Imagens de Microscopia Confocal do grupo pH Alcalino: bactérias não viáveis (2A), viáveis (2B) e sobreposição das imagens (2C)

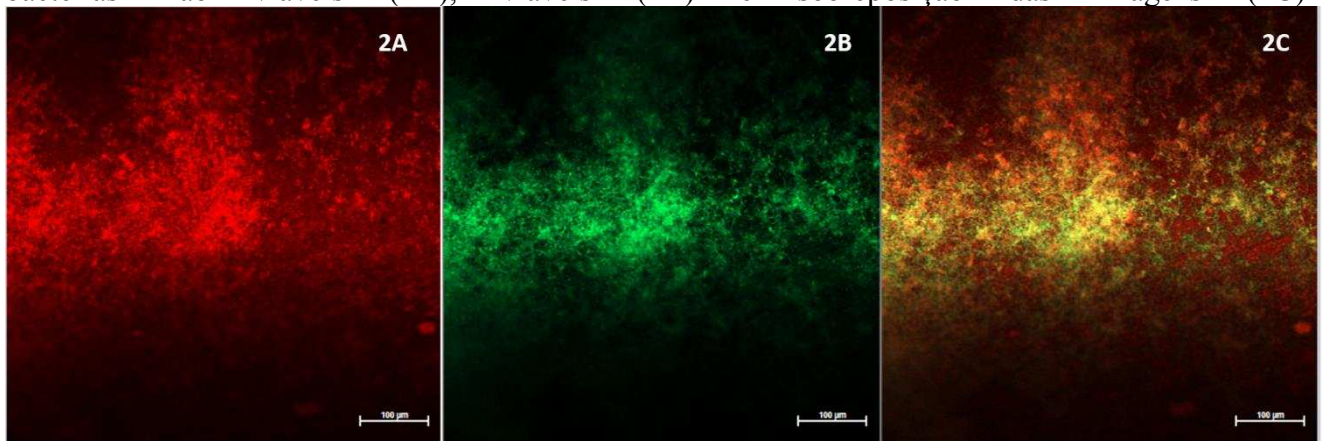


Figura 4 – Imagens de Microscopia Confocal do grupo Lisozima: bactérias não viáveis (3A), viáveis (3B) e sobreposição das imagens (3C)

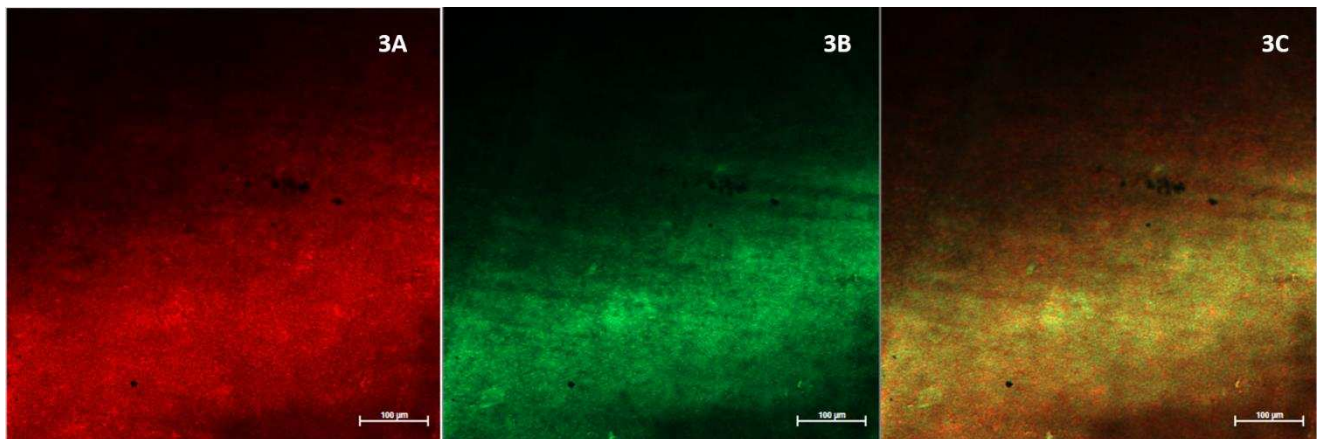
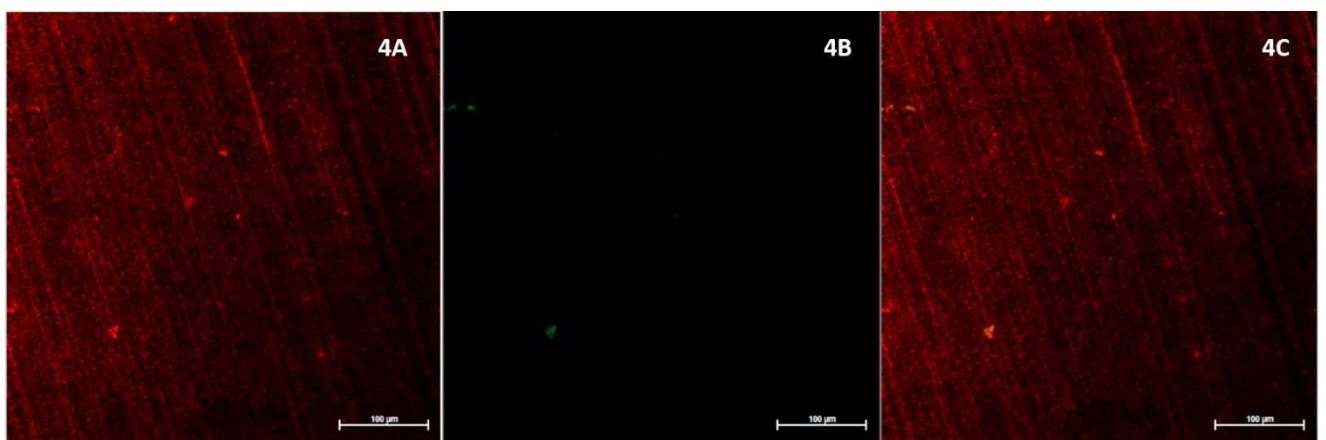


Figura 5 – Imagens de Microscopia Confocal do grupo pH Alcalino com Lisozima: bactérias não viáveis (4A), viáveis (4B) e sobreposição das imagens (4C)



## 6 DISCUSSÃO

O objetivo deste trabalho foi avaliar *in vitro* o potencial antimicrobiano da lisozima e de sua associação com uma solução alcalina em um biofilme endodôntico multiespécie. A hipótese nula foi rejeitada visto que houve diferença estatística entre os grupos testados.

Novas abordagens são imprescindíveis para melhorar a interrupção e a erradicação do biofilmes, como compostos naturais ou até mesmo produtos nanoparticulados (Abusrewill *et al.*, 2020). Mudanças no biofilme gerados por alterações do pH ou pela ação de antimicrobianos podem ativar cascatas genéticas possíveis de modificar as características fenotípicas das bactérias gerando resistência bacteriana (Chávez de Paz *et al.*, 2007). Novos agentes com ação antimicrobiana devem ser desenvolvidos a fim de superar a resistência aos antibióticos (Hall; Mah, 2017; Roy *et al.*, 2018; Jiao *et al.*, 2019; Levashov *et al.*, 2019; Saito *et al.*, 2019; Diken Gür *et al.*, 2021). Para Siqueira Jr e Rôças (2011), a pesquisa por novas técnicas e estratégias de tratamento antimicrobiano mais eficazes na Endodontia deve ser estimulada, em virtude da possível presença de bactérias persistentes no sistema de canais radiculares.

Comumente, 20 a 30 espécies são detectadas com maior frequência em biofilmes endodônticos. No entanto, o microbioma endodôntico possui alta variabilidade interindividual em relação a composição e a densidade bacteriana de cada espécie (Siqueira Jr; Rôças, 2022). Bactérias sésseis, aderidas em um biofilme, possuem vantagens como alimentação cruzada, remoção de metabólitos nocivos e desenvolvimento de um meio ambiente adequado para elas, visto que as bactérias planctônicas não têm (Estrela *et al.*, 2009). Espécies incluídas em um biofilme são resistentes em ambientes extremos, podendo resistir a radiação ultravioleta, temperatura extrema, pH extremo, alta salinidade, alta pressão, escassez de nutrientes, podendo até mesmo se proteger e resistir a agentes antimicrobianos (Yin *et al.*, 2019).

Siqueira Jr e Rôças (2022) revisaram aspectos microbiológicos das infecções endodônticas em razão da importância das interações bacterianas na patogenicidade da periodontite apical. Técnica de irrigação, tamanho do preparo apical, uso de medicação intracanal, número de consultas necessárias para finalizar o tratamento, fatores do hospedeiro e fatores microbianos podem influenciar no resultado do tratamento endodôntico (Ordinola-Zapata *et al.*, 2022). Durante a infecção endodôntica há uma prevalência maior de espécies bacterianas anaeróbias restritas em biofilmes de dentes com periodontite apical primária, e cepas bacterianas anaeróbias facultativas em infecções secundárias (Siqueira Jr;

Rôças, 2022). Uma das principais características dos biofilmes endodônticos é a troca de material genético entre as bactérias do biofilme a fim de evitar a morte celular por remoção mecânica ou tratamentos antimicrobianos, beneficiando a persistência bacteriana (Chávez de Paz, 2022).

Em sua revisão, Swimberghe *et al.* (2019) destacaram a importância dos modelos de biofilmes endodônticos incluírem bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, anaeróbias estritas e facultativas. Biofilmes multiespécie são mais custosos e complexos para reproduzir, mas representam melhor a realidade (Garg; Mala; Kamath, 2021; De Paz, 2012). Geralmente, biofilmes multiespécie produzem biofilmes mais espessos e tolerantes à resposta do hospedeiro do que biofilmes de uma única espécie (Swimberghe *et al.*, 2019). Nesses biofilmes, as espécies apresentam maior virulência e podem contribuir para alterar o nicho de infecção e modificar a resposta imune do hospedeiro (Peters *et al.*, 2012; Tay *et al.*, 2016; Swimberghe *et al.*, 2019). Em relação a maturação do biofilme, biofilmes de 21 dias são mais resistentes a agentes antimicrobianos do que biofilmes jovens (Stojicic; Shen; Haapasalo, 2013; Yang *et al.*, 2016).

O nosso modelo de biofilme apresenta como vantagens a padronização e a reprodutibilidade. Além disso, inclui dez espécies bacterianas comumente relacionadas às infecções endodônticas, apresentando espécies Gram-positivas e Gram-negativas, anaeróbias estritas e facultativas. Estudos recentes utilizaram este mesmo modelo de biofilme, ou modelo semelhante, demonstrando ser um modelo bem sedimentado na literatura (Lukic *et al.*, 2020; Pinheiro *et al.*, 2021; Pereira *et al.*, 2022).

Estudos anteriores salientam que a ação antimicrobiana do hidróxido de cálcio é limitada, e não envolve todas as bactérias encontradas nas infecções endodônticas (Fava; Saunders, 1999; Siqueira Jr; Lopes, 1999; Sathorn; Parashos; Messer, 2007). A presença de exsudado inflamatório, ação tampão na dentina, restos de tecido necrótico, assim como substâncias advindas da infecção bacteriana enfraquecem o potencial antimicrobiano do hidróxido de cálcio (Siqueira Jr; Lopes, 1999; Mohammadi; Dummer, 2011; Del Carpio-Perochena *et al.*, 2017). Ao avaliar a ação antimicrobiana da pasta triantibiótica, do hidróxido de cálcio e da clorexidina gel 2% em um biofilme infectado intraoralmente, Ordinola-Zapata e colaboradores notaram que após 24 horas a pasta triantibiótica apresentou maior eficácia, seguida pela clorexidina gel 2%. O hidróxido de cálcio apresentou menor potencial antimicrobiana das opções testadas (Ordinola-Zapata *et al.*, 2013), os mesmos dados foram encontrados no estudo de Del Carpio-Perochena e colaboradores (2017). A medicação de hidróxido de cálcio não apresentou ação anti-biofilme ao ser analisada em um biofilme de *E. faecalis* realizado *in vitro*, e sim ação pró-biofilme auxiliando na estrutura (Momenijavid *et al.*, 2022).

Por isso, novas alternativas têm sido buscadas a fim de desenvolver uma medicação com maior espectro antimicrobiano, que apresente eficácia em inibir biofilmes.

Um estudo recente salientou a importância de realizar novos estudos associando a lisozima com modificações e/ou a outros produtos que possam proporcionar um aumento de sua atividade antibacteriana para o desenvolvimento de novas medicações com amplo espectro antimicrobiano (Pereira *et al.*, 2019). A lisozima pode ser uma potencial alternativa para combater as dificuldades atualmente encontradas no combate ao biofilme endodôntico, visto que é uma enzima de origem natural com ação antimicrobiana, sendo considerada um peptídeo antimicrobiano.

Neste estudo, a lisozima foi analisada de forma isolada e em associação com pH Alcalino, sendo que os melhores resultados foram encontrados no grupo Lisozima com pH 12,5. A lisozima associada ao pH alcalino favoreceu uma maior ação antimicrobiana da substância. Esse aumento na eficácia antimicrobiana pode ter acontecido devido a presença de uma alteração estrutural na conformação da lisozima ao ter seu pH alterado, ou por meio da alcalinização do meio (mecanismo do hidróxido de cálcio). Alterações térmicas, mudanças de pH ou associações podem causar a desnaturação da lisozima ampliando assim seu espectro antimicrobiano para as bactérias Gram-negativas (Ibrahim *et al.*, 1996; Masschleck *et al.*, 2001; Ferraboshi, Ciceri, Grisenti, 2021). Após a desnaturação da lisozima, foram encontrados peptídeos antimicrobianos com atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (Pellegrini *et al.*, 1997; Mine; Larau, 2004).

Ao analisar nossos resultados, acredita-se que a lisozima teve seu espectro antimicrobiano amplificado ao ter seu pH alterado para alcalino, visto uma maior redução na contagem de UFC no respectivo grupo. Os dados encontrados vão de acordo com o que Ordinola-Zapata e colaboradores (2022) sugeriram ao incentivar novas pesquisas com peptídeos antimicrobianos para o desenvolvimento de medicações intracanaais, sugerindo que o uso dos peptídeos antimicrobianos é bastante promissor.

Um estudo avaliou a taxa de sobrevivência da *E. faecalis* na forma planctônica e em biofilme de acordo com a variação do pH. Foi observado que a vitalidade celular foi reduzida apenas em condição alcalina alta com pH acima de 10,0; além disso, as bactérias do biofilme foram mais tolerantes à alcalinidade (Yan; Liang; Jiang, 2012). Ao alterar o pH de um meio simulando a alcalinidade gerada pela ação do hidróxido de cálcio, Chávez de Paula *et al.* (2007) constataram que após 24 horas nenhuma cepa de *F. nucleatum*, *E. faecalis*, *O. uli*, *S. anginosus*, *S. gordonii* e *S. oralis*



foi capaz de crescer em pH 10,0. Em nosso estudo, houve uma redução dos microrganismos viáveis quando a lisozima foi associada com uma solução alcalina.

Weckwerth *et al.* (2013) analisaram o crescimento de *E. Faecalis* em diferentes pH, concluindo que esta espécie bacteriana pode sobreviver em pH extremamente alcalino como 12,5 em 24 e 48 horas; apenas após 72 horas não foi notado nenhum crescimento neste pH.

Para Krzyżciak *et al.*, (2015) a lisozima possui ação em microrganismos comumente encontrados em doenças que acometem a cavidade oral, e sua ação bactericida seria relacionada à sua concentração. Frank; Rouchon e Harris (2020) desenvolveram um kit com lisozima para tratar infecções causadas por *E. faecalis* após testarem seus efeitos em um biofilme monoespécie. A associação da lisozima com um polímero catiônico ampliou a eficácia antimicrobiana da lisozima para bactérias Gram-positivas e Gram-negativas resistentes, demonstrando uma ação antibacteriana superior ao cloridrato de minociclina em um modelo de biofilme periodontal em ratos (Zhang *et al.*, 2022).

Pereira (2019) avaliou a eficácia antimicrobiana da lisozima sobre a *S. mutans* e *S. aureus* por meio da determinação da concentração inibitória mínima e da concentração bactericida mínima, não sendo possível determinar um efeito bactericida para ambas pois as concentrações utilizadas apresentaram apenas efeito bacteriostático sobre a *S. aureus*. Em relação a concentração inibitória mínima, a concentração de 300 µg/mL demonstrou eficácia na redução do crescimento tanto da *S. mutans* quanto da *S. aureus*, sendo a *S. mutans* mais susceptível a ação da enzima que apresentou ação bacteriostática na concentração de 20µg/mL e bactericida com 300 µg/mL (Pereira, 2019). Nosso modelo de biofilme apresentava a *S. mutans*, no entanto, a concentração testada foi de 200 µg/mL por ser uma concentração eficaz e biocompatível e que foi observada em estudos prévios ainda não publicados realizados na UFSC.

Ruas e colaboradores (2010) avaliaram a atividade antimicrobiana da lisozima em concentrações de 0,04 a 10mg/mL nos microrganismos *E. colli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *C. albicans*, *M. luteus* e *A. brasiliensis*. A lisozima não apresentou eficácia antimicrobiana sobre os microrganismos Gram-negativos, nem para o fungo *A. brasiliensis*. Em contrapartida, foi notada ação antimicrobiana sobre o crescimento da *S. aureus* com 7,5mg/mL, *C. albicans* com 10mg/mL e do *M. luteus* a partir da concentração de 5mg/mL (Ruas *et al.*, 2010).

A toxicidade *in vitro* das amostras de até 10mg/mL de lisozima foram testadas pela viabilidade celular de fibroblastos ATCC CCL-92, não apresentando citotoxicidade na avaliação realizada no estudo de Ruas e colaboradores (2010).

Através da visualização do biofilme em Microscopia Confocal, foi notado um maior rompimento das paredes celulares bacterianas no grupo pH Alcalino com Lisozima. Saito *et al.* (2019) testaram a ação antimicrobiana de uma associação de lisozima-quitosana com oligossacarídeos contra *P. aeruginosa*, *A. baumannii* e *S. aureus* resistente à meticilina; a associação apresentou eficácia, ampliando o espectro antimicrobiano das substâncias, afetando as membranas bacterianas, assim como observado em nosso trabalho.

Ao analisar a eficácia da lisozima em diferentes concentrações, foi notado que em 54,4mg/mL, 108 mg/mL e 217,6 mg/mL a lisozima foi capaz de inibir o crescimento do *S. mutans*; e em 27,2 mg/mL inibiu o crescimento do *L. casei* (Andrade *et al.*, 2014). A eficácia de uma mistura de lisozima, lactoferrina e lactoperoxidase associada ao cimento de ionômero de vidro foi avaliada em um modelo de biofilme cariogênico. Os resultados mostraram que essa associação amplifica a ação antimicrobiana do cimento de ionômero de vidro em relação a *S. mutans* (Pinheiro *et al.*, 2015).

Neste estudo, a lisozima foi utilizada em uma concentração de 200 µg/mL pura e em associação a um pH alcalino sobre um biofilme multiespécie do tipo endodôntico. Essa concentração foi definida de acordo com estudos prévios, ainda não publicados, que demonstraram que a lisozima apresentava ação antimicrobiana quando utilizada nas concentrações de 200 e 300 µg/mL, no entanto, ao realizar o teste de citotoxicidade e biocompatibilidade foi notado que a concentração de 300 µg/mL agrediu fibroblastos; por isso optou-se pela lisozima na concentração de 200 µg/mL que demonstrou ser biocompatível. Na maioria dos estudos relatados na literatura a eficácia da lisozima foi avaliada em biofilmes monoespécie ou em bactérias planctônicas. Em nosso estudo, a análise da ação antimicrobiana da lisozima foi realizada em um biofilme multiespécie. Como não foi realizado nenhum método molecular para identificação das bactérias após o tratamento, não é possível afirmar sobre quais espécies a substância apresentou melhor ação. No entanto, estudos prévios testaram a ação da lisozima na *S. mutans* e na *E. faecalis*, e a substância apresentou capacidade antimicrobiana nestas bactérias que também fazem parte da composição do nosso biofilme. A avaliação do potencial antimicrobiano da lisozima foi realizada através do método tradicional de contagem de UFC. É necessário que novos estudos sejam realizados, buscando obter um número amostral maior para a obtenção das imagens via Microscopia Confocal e principalmente para entender os principais

mecanismos de ação envolvidos na associação da lisozima com a solução alcalina. Além disso, seria interessante uma avaliação por meios moleculares, como o qPCR, e o sequenciamento do DNA das culturas encontradas nas placas de cultura buscando realizar uma análise a fim de identificar as bactérias que foram mais resistentes aos tratamentos.

## 7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com base nos resultados obtidos, de acordo com a metodologia apresentada, é possível concluir que a lisozima associada a uma solução alcalina demonstrou potencial antimicrobiano quando analisada *in vitro* em um modelo de biofilme endodôntico multiespécie. O grupo pH Alcalino apresentou menor atividade antimicrobiana que o grupo Lisozima. A lisozima em solução alcalina teve sua ação antimicrobiana potencializada, reduzindo o número de bactérias viáveis. As imagens obtidas na Microscopia Confocal foram capazes de demonstrar a estrutura do biofilme, ilustrando o presente trabalho.

Portanto, podemos concluir que a lisozima e suas associações pode ser uma alternativa para ser utilizada como substância antimicrobiana na terapia endodôntica. Sugere-se que novos estudos sejam realizados a fim de explorar essa eficácia antimicrobiana da lisozima em associação ao meio alcalino, buscando compreender também quais as alterações estruturais e bioquímicas causadas na lisozima pela alteração do pH para 12,5.

## REFERÊNCIAS

- ABUSREWIL, Sumaya et al. Detection, treatment and prevention of endodontic biofilm infections: what's new in 2020. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 46, n. 2, p. 194-212, 2020.
- AL-AHMAD, Ali et al. Antibiotic resistance and capacity for biofilm formation of different bacteria isolated from endodontic infections associated with root-filled teeth. **Journal of Endodontics**, v. 40, n. 2, p. 223-230, 2014.
- ALVES, Flávio RF et al. Adjunctive steps for disinfection of the mandibular molar root canal system: a correlative bacteriologic, micro-computed tomography, and cryopulverization approach. **Journal of Endodontics**, v. 42, n. 11, p. 1667-1672, 2016.
- ANDRADE, Flaviana Bombarda de et al. Antimicrobial activity and synergism of lactoferrin and lysozyme against cariogenic microorganisms. **Brazilian Dental Journal**, v. 25, p. 165-169, 2014.
- ANSARI, M. A. et al. Identification and characterization of molten globule-like state of hen egg-white lysozyme in presence of salts under alkaline conditions. **Protein and Peptide Letters**, v. 17, n. 1, p. 11-17, 2010
- ANTUNES, Henrique S. et al. Total and specific bacterial levels in the apical root canal system of teeth with post-treatment apical periodontitis. **Journal of Endodontics**, v. 41, n. 7, p. 1037-1042, 2015.
- ATHANASSIADIS, B.; ABBOTT, P. V.; WALSH, Laurence J. The use of calcium hydroxide, antibiotics and biocides as antimicrobial medicaments in endodontics. **Australian Dental Journal**, v. 52, p. S64-S82, 2007.
- AVEIRO, E. et al. Efficacy of reciprocating and ultrasonic activation of 6% sodium hypochlorite in the reduction of microbial content and virulence factors in teeth with primary endodontic infection. **International Endodontic Journal**, v. 53, n. 5, p. 604-618, 2020.
- BERGEY, David Hendricks. **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology**. Lippincott Williams & Wilkins, 1994.
- BRANEN, Jill K.; DAVIDSON, P. Michael. Enhancement of nisin, lysozyme, and monolaurin antimicrobial activities by ethylenediaminetetraacetic acid and lactoferrin. **Int J Microbiol Alimentar**. 1 de janeiro de 2004; 90 (1): 63-74. PubMed; PMID: 14672831.
- BRONZATO, J. D. et al. Bacteria and virulence factors in periapical lesions associated with teeth following primary and secondary root canal treatment. **International Endodontic Journal**, v. 54, n. 5, p. 660-671, 2021.
- BYSTRÖM, Anders. **Evaluation of endodontic treatment of teeth with apical periodontitis**. 1986. Tese de Doutorado. Umeå universitet.
- CARROTTE, P. Endodontics: Part 9 Calcium hydroxide, root resorption, endo-perio lesions. **British Dental Journal**, v. 197, n. 12, p. 735, 2004.
- CEGIELSKA-RADZIEJEWSKA, Renata; LESNIEROWSKI, Grzegorz; KIJOWSKI, Jacek. Properties and application of egg white lysozyme and its modified preparations-a review. **Polish**

**Journal of Food and Nutrition Sciences**, v. 58, n. 1, 2008.

CHÁVEZ DE PAZ, Luis Eduardo et al. Response to alkaline stress by root canal bacteria in biofilms. **International Endodontic Journal**, v. 40, n. 5, p. 344-355, 2007.

CHÁVEZ DE PAZ, Luis E. Microbial Biofilms in Root Canal Systems. **Endodontic Advances and Evidence-Based Clinical Guidelines**, p. 74-84, 2022.

CHEN, Liang-Liang et al. Antibacterial activity of lysozyme-loaded cream against MRSA and promotion of scalded wound healing. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 627, p. 122200, 2022.

CHIPMAN, David M.; SHARON, Nathan. Mechanism of Lysozyme Action: Lysozyme is the first enzyme for which the relation between structure and function has become clear. **Science**, v. 165, n. 3892, p. 454-465, 1969.

DAUPHINEE, Shauna M.; KARSAN, Aly. Lipopolysaccharide signaling in endothelial cells. **Laboratory Investigation**, v. 86, n. 1, p. 9-22, 2006.

DEL CARPIO-PEROCHENA, Aldo et al. Antibacterial properties of chitosan nanoparticles and propolis associated with calcium hydroxide against single-and multispecies biofilms: an in vitro and in situ study. **Journal of Endodontics**, v. 43, n. 8, p. 1332-1336, 2017.

DE OLIVEIRA, Luciane Dias et al. Efficacy of endodontic treatment for endotoxin reduction in primarily infected root canals and evaluation of cytotoxic effects. **Journal of Endodontics**, v. 38, n. 8, p. 1053-1057, 2012.

DE PAZ, Luis E. Chávez. Development of a multispecies biofilm community by four root canal bacteria. **Journal of Endodontics**, v. 38, n. 3, p. 318-323, 2012.

DIKEN GÜR, Sinem et al. Antibacterial effect against both Gram-positive and Gram-negative bacteria via lysozyme imprinted cryogel membranes. **Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition**, v. 32, n. 8, p. 1024-1039, 2021.

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

EDGERTON, M.; KOSHLUKOVA, S.E. Salivary histatin 5 and its similarities to the other antimicrobial proteins in human saliva. **Advances in Dental Research**, [s.l.], v. 14, n. 1, p.16-21, dez. 2000.

ELADAWY, Mohamed et al. Effects of lysozyme, proteinase K, and cephalosporins on biofilm formation by clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. **Interdisciplinary perspectives on infectious diseases**, v. 2020, 2020.

ENDO, M. S. et al. Quantification of cultivable bacteria and endotoxin in post-treatment apical periodontitis before and after chemo-mechanical preparation. **European Journal of Clinical microbiology & Infectious diseases**, v. 31, n. 10, p. 2575-2583, 2012.

ESTRELA, Carlos et al. Antibacterial efficacy of intracanal medicaments on bacterial biofilm: a critical review. **Journal of Applied Oral Science**, v. 17, n. 1, p. 1-7, 2009.

FABRICIOUS, LARS et al. Predominant indigenous oral bacteria isolated from infected root canals after varied times of closure. **European Journal of Oral Sciences**, v. 90, n. 2, p. 134-144, 1982.

FAVA, L. R. G.; SAUNDERS, W. P. Calcium hydroxide pastes: classification and clinical indications. **International endodontic journal**, v. 32, n. 4, p. 257-282, 1999.

FERRABOSCHI, Patrizia; CICERI, Samuele; GRISENTI, Paride. Applications of lysozyme, an innate immune defense factor, as an alternative antibiotic. **Antibiotics**, v. 10, n. 12, p. 1534, 2021.

FISHER, Katie; PHILLIPS, Carol. The ecology, epidemiology and virulence of *Enterococcus*. **Microbiology**, v. 155, n. 6, p. 1749-1757, 2009.

FLEMING, Alexander. On a remarkable bacteriolytic element found in tissues and secretions. **Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Containing Papers of a Biological Character**, v. 93, n. 653, p. 306-317, 1922.

FOUAD, Ashraf F. Endodontic infections and systemic disease. In: **Endodontic Microbiology**. Wiley-Blackwell, Ames, IA, 2009. p. 320-338.

FRANK, Kristi Lynn; ROUCHON, Candace; HARRIS, Joann Arathi. **Antibacterial methods and related kits**. U.S. Patent Application n. 16/631,225, 9 jul. 2020.

FREITAS, Débora S.; ABRAHÃO-NETO, José. Biochemical and biophysical characterization of lysozyme modified by PEGylation. **Int J of Pharm**. 2010 Mar; 392(1- 2):111-17.

GATELLI, GECYCA; BORTOLINI, MARIA CECÍLIA TEZELLI. O uso da clorexidina como solução irrigadora em endodontia. **REVISTA UNINGÁ REVIEW**, [S.l.], v. 20, n. 1, out. 2014.

GARG, Anirudh; MALA, Kundabala; KAMATH, Priyanka Madhav. Biofilm models in endodontics-A narrative review. **Journal of Conservative Dentistry: JCD**, v. 24, n. 1, p. 2, 2021.

GEORGE, Saji; KISHEN, Anil. Effect of tissue fluids on hydrophobicity and adherence of *Enterococcus faecalis* to dentin. **Journal of Endodontics**, v. 33, n. 12, p. 1421-1425, 2007.

GINSBURG, Isaac. Role of lipoteichoic acid in infection and inflammation. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 2, n. 3, p. 171-179, 2002.

GMÜR, R.; GUGGENHEIM, B. Antigenic heterogeneity of *Bacteroides intermedius* as recognized by monoclonal antibodies. **Infection and Immunity**, v. 42, n. 2, p. 459-470, 1983.

GOMES, Brenda PFA et al. Microbial analysis of canals of root-filled teeth with periapical lesions using polymerase chain reaction. **Journal of Endodontics**, v. 34, n. 5, p. 537-540, 2008.

GOMES, Brenda PFA et al. Antimicrobial action of intracanal medicaments on the external root surface. **Journal of Dentistry**, v. 37, n. 1, p. 76-81, 2009.

GOMES, Brenda Paula Figueiredo de Almeida; HERRERA, Daniel Rodrigo. Etiologic role of root canal infection in apical periodontitis and its relationship with clinical symptomatology. **Brazilian Oral Research**, v. 32, 2018.

GOMES, Brenda PFA et al. Identification of *Fusobacterium nucleatum* in primary and secondary endodontic infections and its association with clinical features by using two different methods. **Clinical Oral Investigations**, v. 25, n. 11, p. 6249-6258, 2021.

GUGGENHEIM, B. et al. Validation of an in vitro biofilm model of supragingival plaque. **Journal of Dental Research**, v. 80, n. 1, p. 363-370, 2001.

GUGGENHEIM, Bernhard et al. In vitro modeling of host-parasite interactions: the subgingival biofilm challenge of primary human epithelial cells. **BMC Microbiology**, v. 9, n. 1, p. 1-12, 2009.

HAAPASALO, Markus; UDNÆS, Trude; ENDAL, Unni. Persistent, recurrent, and acquired infection of the root canal system post-treatment. **Endodontic Topics**, v. 6, n. 1, p. 29-56, 2003.

HAAPASALO, Markus et al. Effects of dentin on the antimicrobial properties of endodontic medicaments. **Journal of Endodontics**, v. 33, n. 8, p. 917-925, 2007.

HALL, Clayton W.; MAH, Thien-Fah. Molecular mechanisms of biofilm-based antibiotic resistance and tolerance in pathogenic bacteria. **FEMS microbiology reviews**, v. 41, n. 3, p. 276-301, 2017.

HUKIĆ, Mirsada et al. The effect of lysozyme on reducing biofilms by *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Gardnerella vaginalis*: an in vitro examination. **Microbial Drug Resistance**, v. 24, n. 4, p. 353-358, 2018.

IBRAHIM, H.R.; HIGASHIGUCHI, S.; KOKETSU, M.; JUNEJA, L.R.; KIM, M.; YAMAMOTO, T.; SUGIMOTO, Y.; AOKI, T. Partially Unfolded Lysozyme at Neutral pH Agglutinates and Kills Gram-Negative and Gram-Positive Bacteria through Membrane Damage Mechanism. **J. Agric. Food Chem**, v. 44, p. 3799-3806, 1996.

IBRAHIM, Hisham R. et al. A structural phase of heat-denatured lysozyme with novel antimicrobial action. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 44, n. 6, p. 1416-1423, 1996.

IBRAHIM - desnaturação: IBRAHIM, Hisham R.; AOKI, Takayoshi; PELLEGRINI, Antonio. Strategies for new antimicrobial proteins and peptides: lysozyme and aprotinin as model molecules. **Current Pharmaceutical Design**, v. 8, n. 9, p. 671-693, 2002.

JIAO, Yang et al. Advancing antimicrobial strategies for managing oral biofilm infections. **International Journal of Oral Science**, v. 11, n. 3, p. 28, 2019.

JHAJHARIA, Kapil et al. Biofilm in endodontics: a review. **Journal of International Society of Preventive & Community Dentistry**, v. 5, n. 1, p. 1, 2015.

JORGEN, U. Success and Failure in Endodontics [Odontological Dissertation No. 60]. **Umea, Sweden: University of Umea**, 1996.

KAMBALE, S. et al. A sequential approach in treatment of endo-perio lesion a case report. **Journal of Clinical and Diagnostic Research**, v. 8, n. 8, p. 22-24, 2014.

KANDASWAMY, D. et al. Dentinal tubule disinfection with 2% chlorhexidine gel, propolis, morinda citrifolia juice, 2% povidone iodine, and calcium hydroxide. **International Endodontic Journal**, v. 43, n. 5, p. 419-423, 2010.

KRZYGCIAK, Wirginiaś JURCZAK, Annaś PIĄTKOWSKI, Jakubś KOŃCIELNIAK, Dorota; GREGORCZYK-MAGA, Iwonaś KOŁODZIEJ, Iwonaś PAPIEŹ Monika A.ś Olczak Kowalczyk, Dorota. Effect of histatin-5 and lysozyme on the ability of *Streptococcus mutans* to form biofilms in vitro conditions. **Postępy Higieny i Medycyny Doswiadczałnej**. Krakow. 2015 Set; 69: 1056-66.



- KUMAR, Rajesh et al. Macromolecular crowding-induced molten globule states of the alkali pH-denatured proteins. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics**, v. 1866, n. 11, p. 1102-1114, 2018.
- LAKHANI, Ashik Ali et al. Efficacy of triple antibiotic paste, moxifloxacin, calcium hydroxide and 2% chlorhexidine gel in elimination of *E. faecalis*: an in vitro study. **Journal of Clinical and Diagnostic Research: JCDR**, v. 11, n. 1, p. ZC06, 2017.
- LEELAPORNPISID, Warat et al. Effectiveness of D, L-2-hydroxyisocaproic acid (HICA) and alpha-mangostin against endodontopathogenic microorganisms in a multispecies bacterial–fungal biofilm in an ex vivo tooth model. **International Endodontic Journal**, v. 54, n. 12, p. 2243-2255, 2021.
- LEI, Jun et al. The antimicrobial peptides and their potential clinical applications. **American journal of translational research**, v. 11, n. 7, p. 3919, 2019.
- LEVASHOV, P. A. et al. A novel method of covalent lysozyme immobilization for the development of materials for medical applications. **Russian Journal of Bioorganic Chemistry**, v. 45, p. 101-106, 2019.
- LIMA, Palloma R. Avaliação da atividade e estabilidade da lisozima da clara de ovo submetida ao tratamento com campo magnético. 2017. 80 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de ProGrama de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, Centro Tecnológico, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2017.
- LOPES, Hélio Pereira; SIQUEIRA JR, José Freitas. Endodontia: biologia e técnica. In: **Endodontia: biologia e técnica**. 1999. p. 650-650.
- LUKIC, Dejana et al. Endodontic-like oral biofilms as models for multispecies interactions in endodontic diseases. **Microorganisms**, v. 8, n. 5, p. 674, 2020.
- MANOIL, Daniel; AL-MANEI, Khaled; BELIBASAKIS, Georgios N. A systematic review of the root canal microbiota associated with apical periodontitis: lessons from next-generation sequencing. **PROTEOMICS–Clinical Applications**, v. 14, n. 3, p. 1900060, 2020.
- MARINHO, A. C. S. et al. Detection and function of lipopolysaccharide and its purified lipid A after treatment with auxiliary chemical substances and calcium hydroxide dressings used in root canal treatment. **International Endodontic Journal**, v. 51, n. 10, p. 1118-1129, 2018.
- MARTINHO, Frederico C.; GOMES, Brenda PFA. Quantification of endotoxins and cultivable bacteria in root canal infection before and after chemomechanical preparation with 2.5% sodium hypochlorite. **Journal of Endodontics**, v. 34, n. 3, p. 268-272, 2008.
- MASSCHALCK, Barbara et al. Inactivation of Gram-negative bacteria by lysozyme, denatured lysozyme, and lysozyme-derived peptides under high hydrostatic pressure. **Applied and environmental microbiology**, v. 67, n. 1, p. 339-344, 2001.
- MEIRE, Maarten A.; VAN DER WAAL, Suzette V. A critical analysis of research methods and experimental models to study intracanal medicaments. **International Endodontic Journal**, 2022.
- MINE, Yoshinori; MA, Fupeng; LAURIAU, Sophie. Antimicrobial peptides released by enzymatic hydrolysis of hen egg white lysozyme. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 5, p. 1088-1094, 2004.

- MOHAMMADI, Z.; DUMMER, Paul Michael Howell. Properties and applications of calcium hydroxide in endodontics and dental traumatology. **International Endodontic Journal**, v. 44, n. 8, p. 697-730, 2011.
- MOHANTY, Rinkee et al. Red complex: Polymicrobial conglomerate in oral flora: A review. **Journal of Family Medicine and Primary Care**, v. 8, n. 11, p. 3480, 2019.
- MOLANDER, A. et al. Microbiological status of root-filled teeth with apical periodontitis. **International Endodontic Journal**, v. 31, n. 1, p. 1-7, 1998.
- MOMENIJAVID, Mahere et al. Effect of calcium hydroxide on morphology and physicochemical properties of *Enterococcus faecalis* biofilm. **Scientific Reports**, v. 12, n. 1, p. 7595, 2022.
- MOUNCE, Richard. The biologic objectives of root canal therapy: meeting the standard. **Compendium of Continuing Education in Dentistry (Jamesburg, NJ: 1995)**, v. 25, n. 8, p. 576, 578-81, 2004.
- NAIR, P. N. R. 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**, v. 99, n. 2, p. 231-252, 2005.
- NEELAKANTAN, Prasanna et al. Biofilms in endodontics—current status and future directions. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 8, p. 1748, 2017.
- NEVES, Mônica AS et al. Clinical antibacterial effectiveness of root canal preparation with reciprocating single-instrument or continuously rotating multi-instrument systems. **Journal of Endodontics**, v. 42, n. 1, p. 25-29, 2016.
- NG, Y.-L. et al. Outcome of primary root canal treatment: systematic review of the literature—Part 2. Influence of clinical factors. **International Endodontic Journal**, v. 41, n. 1, p. 6-31, 2008.
- OLIVER, W. T.; WELLS, J. E. Lysozyme as an alternative to growth promoting antibiotics in swine production. **Journal of Animal Science and Biotechnology**, v. 6, n. 1, p. 1-7, 2015.
- ORDINOLA-ZAPATA, Ronald et al. Antimicrobial activity of triantibiotic paste, 2% chlorhexidine gel, and calcium hydroxide on an intraoral-infected dentin biofilm model. **Journal of Endodontics**, v. 39, n. 1, p. 115-118, 2013.
- ORDINOLA-ZAPATA, Ronald et al. Present status and future directions of intracanal medicaments. **International Endodontic Journal**, v. 55, n. Suppl 3, p. 613, 2022.
- ØRSTAVIK, Dag. Root canal disinfection: a review of concepts and recent developments. **Australian Endodontic Journal**, v. 29, n. 2, p. 70-74, 2003.
- PADGETT, T.; HAN, I. Y.; DAWSON, P. L. Incorporation of food-grade antimicrobial compounds into biodegradable packaging films. **Journal of Food Protection**, v. 61, n. 10, p. 1330-1335, 1998.
- PAROLIA, Abhishek et al. Effectiveness of chitosan-propolis nanoparticle against *Enterococcus faecalis* biofilms in the root canal. **BMC Oral Health**, v. 20, n. 1, p. 1-14, 2020.
- PASTER, Bruce J. et al. Bacterial diversity in human subgingival plaque. **Journal of Bacteriology**,

v. 183, n. 12, p. 3770-3783, 2001.

PELLEGRINI, A. et al. Identification and isolation of a bactericidal domain in chicken egg white lysozyme. **Journal of Applied Microbiology**, v. 82, n. 3, p. 372-378, 1997.

PEREIRA, R. S. et al. Microbial analysis of root canal and periradicular lesion associated to teeth with endodontic failure. **Anaerobe**, v. 48, p. 12-18, 2017.

PEREIRA, Orestes Feliciano Goulart. Concentrações Inibitória e Bactericida Mínimas na Atividade Antimicrobiana da Lisozima. <https://repositorio.ufsc.br/handle/123456789/196940?show=full>, 2019.

PEREIRA, Ana CC et al. Antibiofilm Activity of LL-37 Peptide and D-Amino Acids Associated with Antibiotics Used in Regenerative Endodontics on an Ex Vivo Multispecies Biofilm Model. **Life**, v. 12, n. 11, p. 1686, 2022.

PETERS, Ove A. et al. Three-dimensional analysis of root canal geometry by high-resolution computed tomography. **Journal of Dental Research**, v. 79, n. 6, p. 1405-1409, 2000.

PETERS, Ove A.; SCHÖNENBERGER, K.; LAIB, A. Effects of four Ni–Ti preparation techniques on root canal geometry assessed by micro computed tomography. **International Endodontic Journal**, v. 34, n. 3, p. 221-230, 2001.

PETERS, Ove A. et al. Disinfection of root canals with photon-initiated photoacoustic streaming. **Journal of Endodontics**, v. 37, n. 7, p. 1008-1012, 2011.

PETERS, Brian M. et al. Polymicrobial interactions: impact on pathogenesis and human disease. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 25, n. 1, p. 193-213, 2012.

PINHEIRO, E. T. et al. Microorganisms from canals of root-filled teeth with periapical lesions. **International Endodontic Journal**, v. 36, n. 1, p. 1-11, 2003.

PINHEIRO, Sérgio Luiz et al. Antimicrobial capacity of casein phosphopeptide/amorphous calcium phosphate and enzymes in glass ionomer cement in dentin carious lesions. **Acta Stomatologica Croatica**, v. 49, n. 2, p. 104, 2015.

PINHEIRO, Ericka T. et al. Antibacterial Effect of Sodium Hypochlorite and EDTA in Combination with High-Purity Nisin on an Endodontic-like Biofilm Model. **Antibiotics**, v. 10, n. 9, p. 1141, 2021.

PRADA, Ilaria et al. Update of the therapeutic planning of irrigation and intracanal medication in root canal treatment. A literature review. **Journal of Clinical and Experimental Dentistry**, v. 11, n. 2, p. e185, 2019.

PRADA, Ilaria et al. Influence of microbiology on endodontic failure. Literature review. **Medicina Oral, Patologia Oral y Cirugia Bucal**, v. 24, n. 3, p. e364, 2019.

PURICE, Andreea et al. Surface morphology of thin lysozyme films produced by matrix-assisted pulsed laser evaporation (MAPLE). **Applied Surface Science**, v. 254, n. 4, p. 1244-1248, 2007.

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

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

RÔÇAS, Isabela N. et al. Disinfecting effects of rotary instrumentation with either 2.5% sodium hypochlorite or 2% chlorhexidine as the main irrigant: a randomized clinical study. **Journal of Endodontics**, v. 42, n. 6, p. 943-947, 2016.

RODRIGUES, Renata Costa Val et al. Influence of the apical preparation size and the irrigant type on bacterial reduction in root canal-treated teeth with apical periodontitis. **Journal of Endodontics**, v. 43, n. 7, p. 1058-1063, 2017.

ROY, Ranita et al. Strategies for combating bacterial biofilms: A focus on anti-biofilm agents and their mechanisms of action. **Virulence**, v. 9, n. 1, p. 522-554, 2018.

RUAS, Gabriele Wander et al. Avaliação da atividade antimicrobiana da lisozima de ovo de galinha, para aplicação como conservante cosmético. **Cosmetics & Toiletries**, v. 22, n. 3, p. 138 res. P10, 2010.

SABER, Shehab El-Din Mohamed; EL-HADY, Soha A. Development of an intracanal mature *Enterococcus faecalis* biofilm and its susceptibility to some antimicrobial intracanal medications; an in vitro study. **European Journal of Dentistry**, v. 6, n. 01, p. 043-050, 2012.

SAITO, Hiroaki et al. Antibacterial activity of lysozyme-chitosan oligosaccharide conjugates (LYZOX) against *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* and Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **PloS one**, v. 14, n. 5, p. e0217504, 2019.

SARKAR, Sharanya et al. Protein nanocomposites: Special inferences to lysozyme based nanomaterials. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 151, p. 467-482, 2020.

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

SEBAA, Sarra et al. Dose-dependent effect of lysozyme upon *Candida albicans* biofilm. **Molecular Medicine Reports**, v. 15, n. 3, p. 1135-1142, 2017.

SEGURA-EGEA, J. J. et al. European Society of Endodontology position statement: the use of antibiotics in endodontics. **International Endodontic Journal**, v. 51, n. 1, p. 20-25, 2018.

SHEN, Ya; STOJICIC, Sonja; HAAPASALO, Markus. Antimicrobial efficacy of chlorhexidine against bacteria in biofilms at different stages of development. **Journal of Endodontics**, v. 37, n. 5, p. 657-661, 2011.

SILVA, F. et al. ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE SOLUÇÕES IRRIGADORAS NO PREPARO BIOMECÂNICO DE CANAIS RADICULARES FRENTE A *Enterococcus faecalis*. **Brazilian Journal of Surgery and Clinical Research**, v. 15, n. 1, p. 34-38, 2016.

SIQUEIRA JR, J. F.; LOPES, HP10551109. Mechanisms of antimicrobial activity of calcium hydroxide: a critical review. **International Endodontic Journal**, v. 32, n. 5, p. 361-369, 1999.

SIQUEIRA JR, José F.; RÔÇAS, Isabela N.; LOPES, Hélio P. Patterns of microbial colonization in primary root canal infections. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology**, v. 93, n. 2, p. 174-178, 2002.

SIQUEIRA JR, José F. et al. Selected endodontic pathogens in the apical third of infected root canals: a molecular investigation. **Journal of Endodontics**, v. 30, n. 9, p. 638-643, 2004.

SIQUEIRA JR, José F. Reaction of periradicular tissues to root canal treatment: benefits and drawbacks. **Endodontic Topics**, v. 10, n. 1, p. 123-147, 2005.

SIQUEIRA JR, J. F.; RÔÇAS, I. N. Exploiting molecular methods to explore endodontic infections: part 1—current molecular technologies for microbiological diagnosis. **Journal of Endodontics**, v. 31, n. 6, p. 411-423, 2005a.

SIQUEIRA JR, J. F.; RÔÇAS, I. N. Exploiting molecular methods to explore endodontic infections: part 2—redefining the endodontic microbiota. **Journal of Endodontics**, v. 31, n. 7, p. 488-498, 2005b.

SIQUEIRA JR, José F.; RÔÇAS, Isabela N. Clinical implications and microbiology of bacterial persistence after treatment procedures. **Journal of Endodontics**, v. 34, n. 11, p. 1291-1301. e3, 2008.

SIQUEIRA JR, J. F.; RÔÇAS, I. N. Diversity of endodontic microbiota revisited. **Journal of Dental Research**, v. 88, n. 11, p. 969-981, 2009.

SIQUEIRA JR, José F.; RÔÇAS, Isabela N. Optimising single-visit disinfection with supplementary approaches: A quest for predictability. **Australian Endodontic Journal**, v. 37, n. 3, p. 92-98, 2011.

SIQUEIRA JR, José F.; RÔÇAS, Isabela N. Present status and future directions: Microbiology of endodontic infections. **International Endodontic Journal**, v. 55, p. 512-530, 2022.

SJÖGREN, U. et al. The antimicrobial effect of calcium hydroxide as a short-term intracanal dressing. **International Endodontic Journal**, v. 24, n. 3, p. 119-125, 1991.

SJÖGREN, U. et al. Influence of infection at the time of root filling on the outcome of endodontic treatment of teeth with apical periodontitis. **International Endodontic Journal**, v. 30, n. 5, p. 297-306, 1997.

STOJICIC, Sonja; SHEN, Ya; HAAPASALO, Markus. Effect of the source of biofilm bacteria, level of biofilm maturation, and type of disinfecting agent on the susceptibility of biofilm bacteria to antibacterial agents. **Journal of Endodontics**, v. 39, n. 4, p. 473-477, 2013.

SUNDQVIST, Göran et al. Microbiologic analysis of teeth with failed endodontic treatment and the outcome of conservative re-treatment. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology**, v. 85, n. 1, p. 86-93, 1998

SWIMBERGHE, R. C. D. et al. Biofilm model systems for root canal disinfection: a literature review. **International Endodontic Journal**, v. 52, n. 5, p. 604-628, 2019.

SVENSÄTER, Gunnel; BERGENHOLTZ, Gunnar. Biofilms in endodontic infections. **Endodontic Topics**, v. 9, n. 1, p. 27-36, 2004.

- TABASSUM, Sadia; KHAN, Farhan Raza. Failure of endodontic treatment: The usual suspects. **European Journal of Dentistry**, v. 10, n. 01, p. 144-147, 2016.
- TALAPKO, Jasminka et al. Antimicrobial peptides—Mechanisms of action, antimicrobial effects and clinical applications. **Antibiotics**, v. 11, n. 10, p. 1417, 2022.
- TAY, Wei Hong; CHONG, Kelvin Kian Long; KLINE, Kimberly A. Polymicrobial–host interactions during infection. **Journal of Molecular Biology**, v. 428, n. 17, p. 3355-3371, 2016.
- TO, Thao T. et al. Subgingival plaque in periodontal health antagonizes at toll-like receptor 4 and inhibits e-selectin expression on endothelial cells. **Infection and Immunity**, v. 84, n. 1, p. 120-126, 2015.
- TONGUC-ALTIN, K. et al. Development of novel formulations containing Lysozyme and Lactoferrin and evaluation of antibacterial effects on Mutans Streptococci and Lactobacilli. **Archives of Oral Biology**, v. 60, n. 5, p. 706-714, 2015.
- THURNHEER, T.; BOSTANCI, N.; BELIBASAKIS, G. N. Microbial dynamics during conversion from supragingival to subgingival biofilms in an in vitro model. **Molecular Oral Microbiology**, v. 31, n. 2, p. 125-135, 2016.
- VAHDATI, Mahsa; TOHIDI MOGHADAM, Tahereh. Synthesis and characterization of selenium nanoparticles-lysozyme nanohybrid system with synergistic antibacterial properties. **Scientific reports**, v. 10, n. 1, p. 510, 2020.
- VIANNA, 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**, v. 39, n. 6, p. 484-492, 2006
- VIEIRA, Adalberto R. et al. Dentinal tubule infection as the cause of recurrent disease and late endodontic treatment failure: a case report. **Journal of Endodontics**, v. 38, n. 2, p. 250-254, 2012.
- WALTIMO, T. et al. Antimicrobial effect of nanometric bioactive glass 45S5. **Journal of Dental Research**, v. 86, n. 8, p. 754-757, 2007.
- WECKWERTH, Paulo Henrique et al. In vitro alkaline pH resistance of *Enterococcus faecalis*. **Brazilian Dental Journal**, v. 24, p. 474-476, 2013.
- WINKLER, K. C.; VAN AMERONGEN, J. Bacteriologic results from 4,000 root canal cultures. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology**, v. 12, n. 7, p. 857-875, 1959.
- WIDMER, Christopher et al. Culture-independent characterization of the microbiome of healthy pulp. **Journal of Endodontics**, v. 44, n. 7, p. 1132-1139. e2, 2018.
- WU, Tiantian et al. Integration of lysozyme into chitosan nanoparticles for improving antibacterial activity. **Carbohydrate Polymers**, v. 155, p. 192-200, 2017.
- WU, Tiantian et al. What is new in lysozyme research and its application in food industry? A review. **Food chemistry**, v. 274, p. 698-709, 2019.

YAN, Pei-Fang; LIANG, Jing-Ping; JIANG, Yun-Tao. The influence of different alkaline pH conditions on *Enterococcus faecalis* in planktonic and biofilm mode. **Shanghai Journal of Stomatology**, v. 21, n. 1, 2012.

YIN, Wen et al. Biofilms: the microbial “protective clothing” in extreme environments. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 14, p. 3423, 2019.

YANG, Yan et al. Evaluation of the susceptibility of multispecies biofilms in dentinal tubules to disinfecting solutions. **Journal of Endodontics**, v. 42, n. 8, p. 1246-1250, 2016.

YUAN, Sanqing et al. Evaluation of methods for the extraction and purification of DNA from the human microbiome. **PLoS one**, v. 7, n. 3, p. e33865, 2012.

ZANCAN, Rafaela Fernandes et al. Antimicrobial activity of intracanal medications against both *Enterococcus faecalis* and *Candida albicans* biofilm. **Microscopy Research and Technique**, v. 82, n. 5, p. 494-500, 2019.

ZARUBA, Markus et al. Endodontic drug delivery for root surface disinfection: a laboratory feasibility evaluation. **Clinical Oral Investigations**, v. 20, n. 3, p. 607-613, 2016.

ZHANG, Tong et al. N-Terminal Lysozyme Conjugation to a Cationic Polymer Enhances Antimicrobial Activity and Overcomes Antimicrobial Resistance. **Nano Letters**, v. 22, n. 20, p. 8294-8303, 2022.

ZHAO, L. et al. Effects of *Enterococcus faecalis* lipoteichoic acid on receptor activator of nuclear factor- $\kappa$  B ligand and osteoprotegerin expression in periodontal ligament fibroblasts. **International Endodontic Journal**, v. 47, n. 2, p. 163-172, 2014.

**APÊNDICE A**  
**LISTA DE FIGURAS**

<b>Figura 1</b> – Representação da divisão dos grupos .....	31
<b>Figura 2</b> – Grupo Controle: bactérias não viáveis (A), viáveis (B) e sobreposição das imagens (C).....	36
<b>Figura 3</b> – Grupo pH Alcalino: bactérias não viáveis (A), viáveis (B) e sobreposição das imagens (C).....	37
<b>Figura 4</b> – Grupo Lisozima: bactérias não viáveis (A), viáveis (B) e sobreposição das imagens (C).....	37
<b>Figura 5</b> – Grupo pH Alcalino com Lisozima: bactérias não viáveis (A), viáveis (B) e sobreposição das imagens (C).....	37



**APÊNDICE B**  
**LISTA DE QUADROS**

<b>Quadro 1</b> – Teste de Normalidade Shapiro-Wilk.....	34
<b>Quadro 2</b> – One-way ANOVA.....	34
<b>Quadro 3</b> – Teste Post-Hoc Tukey.....	35
<b>Quadro 4</b> – Descritivos.....	36