Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"

Faculdade de Odontologia de Araraquara

Programa de Pós-Graduação em Odontologia

NORBERTO BATISTA DE FARIA JÚNIOR

Avaliação do desenvolvimento de biofilme e da atividade antibiofilme, pH e solubilidade de cimentos endodônticos

Araraquara

2012

Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"

Faculdade de Odontologia de Araraquara

Programa de Pós-Graduação em Odontologia

NORBERTO BATISTA DE FARIA JÚNIOR

Avaliação do desenvolvimento de biofilme e da atividade antibiofilme, pH e solubilidade de cimentos endodônticos

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia – Área de Endodontia – da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Odontologia.

Orientadora: Prof.ª Dr.ª Juliane Maria Guerreiro Tanomaru

Araraquara

2012

Faria Júnior, Norberto Batista de
Avaliação do desenvolvimento de biofilme e da atividade antibiofilme, pH e solubilidade de cimentos endodônticos / Norberto Batista de Faria Junior.-- Araraquara: [s.n.], 2012.
101 f. ; 30 cm.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia
Orientadora: Profa. Dra. Juliane Maria Guerreiro Tanomaru

1. Biofilmes 2. Enterococcus faecalis 3. Microscopia confocal 4. Concentração de íons de hidrogênio 5. Solubilidade I. Título

Ficha catalográfica elaborada pela Bibliotecária Marley C. Chiusoli Montagnoli, CRB-8/5646
Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação da Faculdade de Odontologia de Araraquara / UNESP

NORBERTO BATISTA DE FARIA JÚNIOR

Avaliação do desenvolvimento de biofilme e da atividade antibiofilme, pH e solubilidade de cimentos endodônticos

COMISSÃO JULGADORA

TESE PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE DOUTOR

Presidente e Orientadora: Profa. Dra. Juliane Maria Guerreiro Tanomaru

2º Examinador: Prof. Dr. Evandro Watanabe

3º Examinador: Prof. Dr. Paulo Henrique Weckwerth

4º Examinador: Prof. Dr. Fábio Luiz Camargo Villela Berbert

5º Examinador: Profa. Dra. Elisabeth Loshchagin Pizzolitto

Araraquara, 30 de março de 2012.

DADOS CURRICULARES

NORBERTO BATISTA DE FARIA JÚNIOR

Nascimento 05 de Janeiro de 1980 em Belém, Pará, Brasil.

Filiação Norberto Batista de Faria
Tereza Cristina Leandro de Faria

1999 – 2003 Curso de Graduação em Odontologia na Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN).

2003 – 2004 Curso de Aperfeiçoamento em Endodontia na Associação Brasileira de Endodontia secção do Rio Grande do Norte.

2004 – 2006 Curso de Especialização em Endodontia na Associação Brasileira de Odontologia secção do Rio Grande do Norte (ABO/RN).

2006 – 2008 Curso de Pós-Graduação em Endodontia, nível de Mestrado, na Faculdade de Odontologia de Araraquara da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (FOAr/UNESP).

2009 – 2012 Curso de Pós-Graduação em Odontologia (área de Endodontia), nível de Doutorado, na Faculdade de Odontologia de Araraquara da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (FOAr/UNESP).

Associações Associação Brasileira de Odontologia (ABO/RN).
Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica (SBPqO).
International Association for Dental Research (IADR).

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho...

A **Deus** que tem guiado minhas escolhas, suportado minhas decisões, trilhado meu caminho e me dado muita força para superar os mais diversos obstáculos. Agradeço pelo dom da vida, por me proporcionar paz, conforto, saúde, proteção, uma família maravilhosa e, também, por todas as conquistas que alcancei. Sem **Ele**, eu nada seria.

À minha avó paterna, **Beatriz Cavalcante de Faria** (*in memoriam*), que nos deixou em fevereiro de 2010. Agradeço pelo carinho, atenção e incentivo constante. Enfim, muito obrigado por todo amor dispensado a mim durante todo o tempo que estivemos juntos. Volto para Natal/RN e, infelizmente, não a vejo mais, não a encontro mais. Sinto muito a sua falta, **vovó Beatriz!!!**

À minha avó materna, **Miriam Raposo Leandro**, sinônimo de alegria e descontração. Obrigado pelo incentivo constante, por toda torcida e por toda vibração nos momentos de felicidade. Suas palavras positivas me impulsionam e me dão força para superar meus limites e alcançar minhas metas. Agradeço ainda pela forma carinhosa com que sempre me tratou, pelo imenso amor transmitido e pelos incontáveis momentos inesquecíveis vividos juntos.

Aos meus pais, **Norberto Batista de Faria** e **Tereza Cristina Leandro de Faria**, símbolos de trabalho, dedicação e competência. Criaram seus filhos

com muito amor e sempre demonstrando a importância da educação na vida de todos. Maiores incentivadores das minhas decisões, apoiaram-me totalmente quando resolvi morar longe de Natal/RN para fazer o Mestrado e, posteriormente, o Doutorado. São meus alicerces, sempre me motivando e vibrando a cada vitória conquistada e me consolando e orientando diante dos tropeços e das dificuldades. É difícil expressar neste espaço em palavras todos meus sentimentos e tudo que representam para mim. Peço desculpas por todas as vezes que agi de forma grossa e rude, explodindo nos meus momentos de stress frente aos problemas profissionais e pessoais. Sem a ajuda dos dois, eu nunca teria chegado onde estou hoje. Assim, essa conquista não é apenas minha, é nossa! Agradeço por todo apoio emocional, afetivo e financeiro. **Painho e Mainha, amo muito vocês!!!**

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Agradeço de forma muito especial...

À minha irmã, **Marjorie Leandro de Faria Uchôa**, e ao seu marido, **Glauber Cavalcante Uchôa**, pela torcida constante, pelo valioso incentivo e pela vibração e felicidade nos momentos de vitória. Agradeço também, por terem me dado dois sobrinhos maravilhosos, **Felipe de Faria Uchôa** e **Ingrid de Faria Uchôa** que tanto me trazem alegrias com suas brincadeiras espontâneas e atitudes de carinho. Amo muito todos vocês!

À minha família, representada pelos meus tios - **Miguel Leandro**, **Sandra Abreu Leandro**, **Lourdinha Machado**, **Luiz Machado Junior**, **Zaira Raposo Leandro Mendes**, **Waldir Mendes**, **Maria da Penha Faria**, **Hélio Batista de Faria** e **Marilda de Faria** (*in memoriam*) - e primos - **Matheus Leandro**, **Ana Flávia Leandro Machado Souza**, **Ana Teresa Leandro Machado Dias**, **Waldir Mendes Filho**, **Carolina Raposo Mendes**, **Hélio Batista de Faria Junior** e **Tatiana Monteiro** - pelo imenso carinho e pela torcida contínua para que eu pudesse correr atrás dos meus sonhos e conquistar meus objetivos.

AGRADECIMENTOS

À **Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"** (UNESP), na presença de seu Magnífico Reitor **Prof. Dr. Herman Jacobus Cornelis Voorwald**.

À **Faculdade de Odontologia de Araraquara (FOAr)** da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (UNESP), na pessoa de seu Diretor **Prof. Dr. José Cláudio Martins Segalla** e de sua vice-diretora **Profa. Dra. Andreia Affonso Barreto Montandon**, pela oportunidade de crescimento profissional concedida.

Ao **Departamento de Odontologia Restauradora** da Faculdade de Odontologia de Araraquara (UNESP), representado pelo Chefe de Departamento **Prof. Dr. Osmir Batista de Oliveira Júnior** e pelo vice-chefe **Prof. Dr. Idomeo Bonetti Filho**.

Ao **Programa de Pós-Graduação em Odontologia** da Faculdade de Odontologia de Araraquara (UNESP), na pessoa de seu coordenador **Prof. Dr. Mário Tanomaru Filho** e de seu vice-coordenador **Prof. Dr. Carlos Rossa Junior**, pela oportunidade de ser aluno deste tão conceituado programa.

À minha orientadora, **Profa. Dra. Juliane Maria Guerreiro Tanomaru**, sinônimo de dedicação, trabalho e determinação. Com muita luta e persistência conseguiu montar o Laboratório de Ensaios Microbiológicos do Departamento de

Odontologia Restauradora. Perdi as contas de quantos finais de semana, feriados e madrugadas passamos nesse laboratório para concluir as mais diversas pesquisas de iniciação científica, mestrado e doutorado. Em poucos anos de funcionamento, já está colhendo os frutos desse esforço. Tenho muito orgulho de ter participado dos primeiros projetos lá desenvolvidos e de muitos outros que surgiram em sequência. Muito obrigado pelo respeito, amizade, confiança depositada no meu trabalho, pelos ensinamentos transmitidos e, acima de tudo, pela paciência. Que esta parceria não termine após a conclusão do meu doutorado e que ainda possamos desenvolver muitos trabalhos juntos.

Ao **Prof. Dr. Mário Tanomaru Filho**, docente da disciplina de Endodontia da Faculdade de Odontologia de Araraquara (UNESP), pela amizade, confiança, respeito e paciência. Com muita dedicação conquistou seu espaço tornando-se hoje, sem dúvida, um dos maiores pesquisadores de Endodontia do Brasil e do mundo. Tem visão, sensibilidade, competência e muita vontade de trabalhar duro. A sua grande capacidade intelectual e profissional foi mais uma vez comprovada quando recentemente tornou-se Professor Titular da Faculdade de Odontologia de Araraquara. Sinto-me muito orgulhoso por ter sido seu aluno e por termos trabalhados juntos. Meu muito obrigado pela convivência agradável e pelos ensinamentos.

Ao **Prof. Dr. Idomeo Bonetti Filho**, docente da disciplina de Endodontia da Faculdade de Odontologia de Araraquara (UNESP), pelo carinho, amizade e atenção. Sabe balancear e relacionar como poucos a clínica, o ensino e a pesquisa. Além de tudo, é uma pessoa de coração, um verdadeiro agregador. Por várias vezes, organizou encontros - churrascos e pasteladas - de professores

e alunos em sua residência como forma de descontração e de aproximar os laços de união de todos. Muito obrigado pelo convívio agradável e pelos ensinamentos transmitidos.

Ao **Prof. Dr. Fábio Luiz Camargo Villela Berbert**, docente da disciplina de Endodontia da Faculdade de Odontologia de Araraquara (UNESP), pela parceria nos trabalhos, pelos momentos de descontração, pelo convívio enriquecedor e companheirismo durante todos os anos que vivi em Araraquara. Tudo que planejamos nos tempos de mestrado foi concluído e coroado em forma de publicações. A sua confiança no meu trabalho me proporcionou tranquilidade e segurança para o desenvolvimento dos trabalhos que participamos. Meu muito obrigado.

Ao **Prof. Dr. Renato de Toledo Leonardo**, docente da disciplina de Endodontia da Faculdade de Odontologia de Araraquara (UNESP), pela convivência e respeito. Tem o dom da palavra, com a sua sabedoria é capaz, como ninguém, de prender a atenção de toda a plateia em suas aulas, palestras e conferências. Em suas apresentações, leva o nome da Faculdade de Odontologia de Araraquara (UNESP) para o mundo, contribuindo para torná-la cada vez mais conhecida. Era o coordenador da Pós-graduação em Endodontia quando prestei a prova de mestrado, agradeço, então, pela confiança e pela oportunidade. Enfim, meu muito obrigado pela amizade e pelos ensinamentos passados.

Ao **Prof. Dr. Milton Carlos Kuga**, docente da disciplina de Endodontia da Faculdade de Odontologia de Araraquara (UNESP), pela parceria nos artigos e pela confiança no meu trabalho. Dono de uma inteligência ímpar, sabe ensinar de

forma simples e clara, transformando o “difícil” em fácil. Muito obrigado pela convivência e pela contribuição à minha formação profissional.

À **Profa. Dra. Gisele Faria**, docente da disciplina de Urgência em Odontologia da Faculdade de Odontologia de Araraquara (UNESP), pela atenção e respeito. Apesar do curto período de convivência, rapidamente percebi sua grande inteligência e dedicação pelo trabalho. Obrigado pelo companheirismo e pela disponibilidade com que sempre me ajudou, principalmente durante a fase de análise estatística dos meus dados.

Aos **funcionários do Departamento de Odontologia Restauradora** da Faculdade de Odontologia de Araraquara (UNESP), **Marinho**, **Creusa**, **Conceição** e **Dona Cida**, pelo convívio agradável e pela prontidão e simpatia com que sempre me ajudaram.

Aos **funcionários da Seção de Pós-Graduação** da Faculdade de Odontologia de Araraquara (UNESP), **Mara Cândida Munhoz do Amaral**, **Rosangela Aparecida Silva dos Santos**, **José Alexandre Garcia**, **Flávia Souza de Jesus** e **Sergio Luiz Gusmão Gimenes Romero,** pelo auxílio prestado durante todo o curso, pela disponibilidade e pela atenção com que sempre atenderam às minhas solicitações.

Aos **funcionários da Biblioteca** da Faculdade de Odontologia de Araraquara (UNESP), pela preparação da ficha catalográfica, pelas orientações quanto às normas de preparação deste trabalho e pela ajuda na busca de dissertações, teses, livros artigos e revistas. Gostaria de deixar registrado um

agradecimento adicional para **Ceres Maria Carvalho Galvão de Freitas** e **Marley Cristina Chiusoli Montagnoli** pela grande ajuda na revisão final desta tese.

Ao **Prof. Dr. José Mauro Granjeiro** do Laboratório de Bioengenharia, Biomateriais e Mineralização Biológica da Universidade Federal Fluminense, por ter gentilmente fornecido os discos de hidroxiapatita para a indução dos biofilmes.

Ao **Prof. Dr. Marco Antônio Húngaro Duarte** da Faculdade de Odontologia de Bauru (FOB) da Universidade de São Paulo (USP), por todo o apoio concedido para a realização desta pesquisa.

A **Márcia Sirlene Zardin Graeff** do Laboratório Multi-usuário da Faculdade de Odontologia de Bauru (FOB) da Universidade de São Paulo (USP), pela atenção, simpatia, disponibilidade e ajuda na aquisição das imagens dos biofilmes no microscópio confocal.

A **Ronald Ordinola Zapata**, pós-graduando da Faculdade de Odontologia de Bauru (FOB) da Universidade de São Paulo (USP), por todo o auxílio durante a realização desta pesquisa. A sua ajuda na análise das imagens dos biofilmes em microscopia confocal foi fundamental.

Ao **Prof. Dr. Luiz Chávez de Paz** da Universidade de *Connecticut*, por ter gentilmente fornecido o programa *BioImage_L*.

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)**, pela bolsa de estudos concedida durante todo o curso.

Aos colegas de Pós-graduação, **Santiago Massi**, **Ana Carolina Mascarenhas Oliveira**, **Geraldine Faccio da Silveira**, **Naiana Viana Viola**, **Roberta Vieira Farac**, **Paula Aparecida Nakazone**, **Renata Dornelles Morgental**, **Ariele Patrícia Rabello**, **Flávia Angélica Guiotti**, **Gisselle Moraima Chavez Andrade**, **Rafael Vicente Ferino**, **Rosymere Freitas de Souza**, **Camila Almeida Nascimento**, **Matheus Franco da Frota**, **Natália Kalatzis, Arnaldo Sant'Anna Júnior**, **Sergio Herrero Moraes**, **Regina Karla de Pontes Lima**, **Roberta Bosso**, **Raqueli Viapiana**, **Ana Lívia Gomes Cornélio**, **Carolina Andolfatto, Alana Priscila Souza Aguiar** e **Arturo Javier Aranda Garcia**, pelo convívio agradável, companheirismo, troca de experiências e momentos de descontração.

Gostaria de deixar registrado um agradecimento adicional às colegas **Roberta Bosso**, **Camila Almeida Nascimento**, **Gisselle Moraima Chavez Andrade** e **Raqueli Viapiana**, pela grande ajuda no desenvolvimento da parte experimental da minha tese. O auxílio de vocês foi essencial.

Aos colegas da minha turma de doutorado **Adriana Simionatto Guinesi**, **Érica Gouveia Jorge**, **Guilherme Ferreira da Silva**, **Loise Pedrosa Salles** e **Rodrigo Ricci Vivan**, pelo companheirismo, momentos de aprendizado e convívio enriquecedor.

Aos amigos **Prof. Dr. José Maurício dos Santos Nunes Reis** e **Érica Gouveia Jorge**, pela amizade, parceria e pelos momentos compartilhados que ficarão sempre marcados nas minhas lembranças. Estendo meus agradecimentos aos seus pais e irmãos, **Luiz Fernando Reis**, **Ana Laura dos Santos Nunes**

Reis, **Fernando Reis Neto**, **Manuel Eurico Jorge**, **Sônia Jorge**, **Danilo Jorge** e **Andréa Jorge**, por toda atenção e carinho com que sempre me receberam em suas casas, pelos momentos de descontração e pela convivência harmoniosa. Recentemente, foram abençoados com o nascimento de **Maria Júlia** que trouxe ainda mais harmonia e felicidade para o lar de todos vocês.

A **Elisama Mayonara do Monte Silva** que nos últimos anos tem me dado apoio constante, atenção, carinho e amor, apesar da distância e dos meus longos períodos de ausência. Sua companhia me deu paz, alegria e conforto. Suas palavras de incentivo me deram energia para impulsionar meu trabalho, força para vencer as batalhas do dia-a-dia e esperança para acreditar que tudo aquilo que sonho pode ser tornar realidade. Muito obrigado!

Ao amigo **Gustavo Sivieri de Araújo**, pela amizade e parceria. Sou muito grato pelos momentos compartilhados, pela descontração, pelas conversas e por toda ajuda que já me deu. Sua determinação certamente o levará para onde mais deseja. Continue lutando firme pelos seus ideais de vida. Conte sempre comigo, meu irmão! Agradeço também, aos seus pais, **Cecília** e **Carlos**, pessoas de coração bondoso, repleto de amor e respeito. Obrigado pelo carinho, incentivo e pelos conselhos.

Aos amigos **Sergei Godeiro Fernandes Rabelo Caldas**, **Marília Regalado Galvão Rabelo Caldas**, **Alexandre Antônio Ribeiro**, **Beatriz Regalado Galvão** e **Marcell Medeiros**, exemplos a serem seguidos de competência, seriedade, dedicação e, acima de tudo, responsabilidade. Agradeço de coração a todos vocês pela ajuda nos momentos necessários, pela amizade

sincera, pelas brincadeiras e pelos numerosos e inesquecíveis momentos de descontração. Espero vocês em Natal/RN para que possamos dar continuidade a tudo isso.

Aos amigos**, Fábio Ferreira de Souza Abbott Galvão**, **Sarah Abreu**, **Bruno Xavier de Carvalho**, **Ana Luísa Rocha**, **Gustavo** e **Mila**, pela amizade, convívio harmonioso e pelos inúmeros momentos de descontração. Nossos almoços, jantares e churrascos com cardápio especialmente nordestino para sempre serão lembrados. Não poderia deixar de registrar que todos esses encontros citados não teriam sido os mesmos sem a presença e as brincadeiras do nosso ilustre amigo/palhaço/intelectual, **Fábio Ferreira de Souza Abbott Galvão "de Orléans e Bragança"**.

Aos amigos, **Antônio Alves de Almeida Junior**, **Fabiana Carlino**, **Carolina de Andrade Lima Chaves** e **Raphael Freitas de Souza**, exemplos de simplicidade, alegria e competência. Agradeço pela amizade sincera, pelos conhecimentos transmitidos e pelo convívio agradável. Que a força da distância não seja suficiente para romper os laços de companheirismo criados durante esses anos em Araraquara/SP.

Aos amigos e companheiros, **Filipe de Oliveira Abi Rached** e **Marcelo Antonialli Del'Acqua**, pela amizade, pelos ensinamentos, pelo apoio, por toda ajuda nos momentos necessários, pelos conselhos e pelos diversos momentos de descontração compartilhados.

Aos amigos dos mais diferentes cursos de Pós-graduação, **Cibele Braga de Oliveira**, **Ana Patrícia de Sousa Pereira**, **Leila Santana Coimbra**, **Nicole Nogueira**, **Mariana de Almeida Basílio**, **Diana Gabriela de Souza Soares**, **Flávia Regina Machado de Medeiros**, **Rodrigo de Paula Pereira**, **Carlos Eduardo Leão Lombardo**, **Aloisio Junior**, **Alexandre Vianna**, **André Monini**, **Camilla Vieira**, **Ruy Veras Filho**, **Fabiana Alves** e **Matheus Coelho Bandéca**, pela ajuda, pelas trocas de experiências clínicas, pelas conversas, pelos conselhos e, principalmente, pelos momentos de descontração tão necessários para aliviar o stress dos seminários, dos casos clínicos complicados, das pesquisas e dos artigos científicos.

Ao **Prof. Dr. Renato Parsekian Martins** pela amizade que se iniciou logo após a minha chegada em Araraquara. A dedicação e, acima de tudo, a seriedade com que conduz seus trabalhos são dignos de muito respeito e representam um exemplo de profissionalismo. Agradeço também pelo convívio e pelos momentos de descontração.

Aos amigos de Natal/RN, **Daniel Henrique de Sá**, **Igor Brito**, **Paulo Gustavo**, **Thiago Cunha Araújo** e **Rayner Viana Azar**, que mesmo de longe acompanharam minha trajetória e torceram muito pelo meu sucesso. Muito obrigado pela amizade verdadeira e pelas palavras de incentivo.

A todos os professores de Endodontia de Natal/RN que contribuíram de forma significativa para minha formação clínica e acadêmica. Gostaria de agradecer de forma muito especial a **Profa. Dra. Rejane Andrade de Carvalho**, **Prof. Dr. Fábio Roberto Dametto**, **Profa. MSc. Conceição Aparecida Dornelas**

Monteiro Maia (Cida), **Profa. Dra. Rosângela Lustosa d'Ávila Pinheiro Daniel**, **Prof. Dr. Marcílio Dias Chaves Oliveira**, **Prof. Dr. Cícero Romão Gadê Neto**, **Profa. MSc. Inês de Medeiros Rocha**, **Profa. MSc. Moema Medeiros**, **Profa. MSc. Jovanka Última Marinho**, **Prof. MSc. Luiz Felipe Câmara Neto** (*in memoriam*) e **Prof. MSc. Olívio Jorge Domingues Santana Silva**.

Enfim, à todos aqueles que de alguma forma colaboraram com a realização deste trabalho, **minha eterna gratidão!!!**

Com a conclusão do doutorado, sigo meu caminho de volta para casa com a plena convicção de que realizei um bom trabalho na Pós-graduação. Não há melhor recompensa do que a grande satisfação e sensação do dever cumprido. Foram seis longos anos de muito aprendizado, muita dedicação, muito suor, muitas lágrimas, mas também de grandes realizações pessoais e profissionais. Alguém poderia, então, perguntar: valeu a pena? Deixo como resposta um trecho do poema “Mar Português” do poeta Fernando Pessoa.

> *“Tudo vale a pena se a alma não é pequena. Quem quer passar além do Bojador tem que passar além da dor. Deus ao mar o perigo e o abismo deu, mas nele é que espelhou o céu”.*

SUMÁRIO

Resumo.....18

Abstract.....21

Introdução.....24

Objetivo.....36

Capítulo 1.....38

Capítulo 2.....61

Considerações finais.....88

Referências.....93

Resumo

Faria-Junior NB. Avaliação do desenvolvimento de biofilme e da atividade antibiofilme, pH e solubilidade de cimentos endodônticos [Tese de Doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2012.

RESUMO

Objetivo: Este estudo avaliou: (experimento 1) a influência de diferentes substratos na formação de biofilmes de *Enterococcus faecalis*; e (experimento 2) a atividade antibacteriana contra *E. faecalis*, pH e solubilidade dos cimentos AH Plus, Sealer 26, Epiphany SE, Sealapex, Activ GP, MTA Fillapex e MTA Sealer. **Metodologia:** (1) Biofilmes de *E. faecalis* foram desenvolvidos sobre dentina bovina, guta-percha, hidroxiapatita e osso bovino por 14 ou 21 dias. Após os períodos de incubação, os espécimes (n=5 por substrato por período) foram marcados pela técnica *Live/Dead* e observados usando microscopia confocal de varredura a laser. Quatro imagens foram obtidas para cada amostra e analisadas pelo programa bioImage_L. Os parâmetros avaliados foram biovolume (μm^3) da população total e verde (células vivas) e o percentual de cobertura do substrato. (2) Para o segundo experimento, discos de cada cimento endodôntico foram preparados e armazenados por 2 ou 7 dias. A atividade antibacteriana foi avaliada pelo teste de difusão em ágar (TDA) e pelo teste de contato direto sobre biofilme (TCDB, antibiofilme). No TCDB, biofilmes foram induzidos em blocos de dentina bovina por 14 dias. Os cimentos foram, então, colocados sobre os biofilmes e permaneceram em contato por 5, 10 ou 15 h. No grupo controle, nenhum cimento foi colocado sobre os biofilmes. Os blocos de dentina com o biofilme remanescente foram avaliados quantitativamente (número de unidades formadoras de colônia [UFC]). A solubilidade dos cimentos correspondeu à perda de massa (%) após 15 h de imersão em água destilada. Os valores de pH foram mensurados nos períodos de 5, 10 e 15 h. A análise estatística foi realizada por testes paramétricos e não paramétricos (p=0,05). **Resultados:** (1) Houve formação de biofilme em todos os grupos. Não houve diferença significativa no

percentual de cobertura entre os substratos aos 21 dias (p>0,05). Porém, aos 14 dias o osso bovino apresentou o maior percentual (p<0,05). A guta-percha apresentou o menor biovolume total aos 14 dias (p<0,05). Aos 21 dias, a hidroxiapatita teve o maior biovolume total (p<0,05). Considerando a população verde, não houve diferença significativa aos 14 dias. (p>0,05). No entanto, aos 21 dias, a hidroxiapatita obteve o maior biovolume verde (p<0,05). (2) No TDA, nenhum dos cimentos exibiu zona de inibição. De acordo com o TCDB, dois dias após a manipulação, Sealapex e MTA Fillapex reduziram de forma significativa o número de UFC quando comparados ao controle (p<0,05). Sete dias após a espatulação, o Sealapex reduziu de forma significativa a contagem bacteriana quando comparado ao controle (p<0,05). O Sealapex alcançou os valores mais altos de pH, tanto aos 2 quanto aos 7 dias (p<0,05). Dois dias após a manipulação, os cimentos MTA Fillapex, MTA Sealer, Sealapex e Activ GP mostraram os maiores valores de solubilidade (p<0,05). Enquanto que no período de 7 dias, o MTA Sealer e o MTA Fillapex foram mais solúveis que os demais cimentos (p<0,05). **Conclusão:** (1) *E. faecalis* formou biofilme em todos os substratos em ambos os períodos de incubação; a hidroxiapatita mostrou os melhores resultados para o desenvolvimento de biofilmes nos dois períodos; (2) MTA Fillapex e Sealapex reduziram de modo significante a quantidade de bactérias nos biofilmes, exibindo alta solubilidade; nenhum dos cimentos eliminou os biofilmes de *E. faecalis.*

Palavras-chave: Biofilmes; *Enterococcus faecalis*; microscopia confocal; concentração de íons de hidrogênio; solubilidade.

Abstract

Faria-Junior NB. Evaluation of the biofilm formation and of the antibiofilm activity, pH and solubility of endodontic sealers [Tese de Doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2012.

ABSTRACT

Objective: This study evaluated: (experiment 1) the influence of different substrates on the *Enterococcus faecalis* biofilm formation; and (experiment 2) the antibacterial activity against *E. faecalis*, pH and solubility of the sealers AH Plus, Sealer 26, Epiphany SE, Sealapex, Activ GP, MTA Fillapex and MTA Sealer. **Methods:** (1) *E. faecalis* biofilms were grown on bovine dentin, gutta-percha, hydroxyapatite and bovine bone for 14 or 21 days. After the incubation periods, the specimens (n=5 per substrate per period) were stained using the Live/Dead technique and observed using a confocal laser scanning microscope. Four confocal pictures were obtained from each sample and analyzed by the software bioImage_L. The parameters evaluated were biovolume (μm^3) of total and green population (live cells) and the percentage of surface covered by microorganisms (covering grade). (2) For the second experiment, disks of each material were prepared and stored for 2 or 7 days. Antimicrobial activity was evaluated by the agar diffusion test (ADT) and the direct contact test on biofilm (DCTB, antibiofilm). For the DCTB, biofilms were grown on bovine dentin blocks for 14 days. Then, the sealers were placed on the biofilms and remained in contact for 5, 10 or 15 h. In the control group, no sealer was placed on the biofilms. The dentin blocks containing the remaining biofilms were assessed quantitatively (number of colony-forming units [CFU]). The solubility of the sealers corresponded to their mass loss (%) after 15 h immersion in distilled water. The pH values were measured at 5, 10 and 15 h. Statistical analysis was performed using parametric and non-parametric tests ($p=0.05$). **Results:** (1) There was biofilm formation in all groups. Considering the values of the covering grade there was not significant difference among the substrates at 21 days ($p>0.05$). However, at 14 days the bovine bone had the

highest covering grade ($p<0.05$). Gutta-percha had the lowest total biovolume at 14 days ($p<0.05$). At 21 days, hydroxyapatite had the highest total biovolume ($p<0.05$). Regarding the green population, it was not observed significant difference in the biovolume at 14 days ($p>0.05$). However, at 21 days, hydroxyapatite had the highest green biovolume ($p<0.05$). (2) In the ADT, none of the sealers showed zone of inhibition. According to the DCTB, two days after mixing, Sealapex and MTA Fillapex reduced significantly the CFU when compared to control ($p<0,05$). Seven days after mixing, Sealapex reduced the bacterial counts significantly when compared to control ($p<0,05$). Sealapex reached the highest pH values in both 2 days and 7 days groups ($p<0,05$). Regarding solubility, two days after mixing, MTA Fillapex, MTA Sealer, Sealapex and Activ GP showed the highest values ($p<0,05$). While seven days after mixing, MTA Sealer and MTA Fillapex had higher solubility than the other sealers ($p<0,05$). **Conclusion:** (1) *E. faecalis* was able to form biofilm in all substrates and in both incubation periods; hydroxyapatite was the substrate that showed the best results for the development of biofilm; (2) MTA Fillapex and Sealapex significantly reduced the amount of biofilm bacteria, but exhibited high solubility; none of the sealers eradicated *E. faecalis* biofilms.

Key words: Biofilms; *Enterococcus faecalis*; microscopy, confocal; hydrogen-ion concentration; solubility.

Introdução

INTRODUÇÃO

Os micro-organismos e seus produtos são os principais fatores etiológicos da doença pulpar e periapical[6]. Desta forma, a remoção das bactérias durante o tratamento, a inibição de um novo crescimento das bactérias remanescentes e a prevenção da recolonização bacteriana são fatores chave para o sucesso do tratamento endodôntico[37, 66]. A instrumentação, a irrigação e o curativo de demora reduzem significativamente a carga microbiana dos canais radiculares contaminados. No entanto, a completa eliminação dos micro-organismos do sistema de canais radiculares é difícil de ser obtida[69]. A persistência de micro-organismos nos túbulos dentinários e no cemento apical após tratamento endodôntico tem sido relatada[33, 35]. Além disso, novos micro-organismos podem ganhar acesso ao sistema de canais radiculares mesmo quando a obturação é bem realizada[40].

O *Enterococcus faecalis* é a espécie mais frequentemente isolada em canais radiculares de dentes com lesão periapical persistente, em culturas mistas ou em monoculturas, apesar de ser menos encontrado em casos de infecção endodôntica primária[17, 28, 45, 48]. A dificuldade de eliminar o *E. faecalis* dos canais radiculares pode estar relacionada com sua grande capacidade de penetração nos túbulos dentinários, desenvolvendo o biofilme, além da sua maior resistência à ação de soluções e medicamentos que os demais micro-organismos presentes nas infecções endodônticas[27, 47]. Por conseguinte, o *E. faecalis* se tornou o micro-organismo mais apropriado para realização de testes antimicrobianos in vitro de

diferentes soluções irrigadoras, curativos de demora e cimentos obturadores utilizados em Endodontia[7, 46].

A maioria das bactérias cresce na forma de biofilmes que consistem em uma ou mais comunidades de bactérias aderidas a uma superfície e envolvidas por uma matriz hidratada de polissacarídeos e proteínas[61, 62]. Bactérias organizadas em comunidades se comunicam entre si por meio de um mecanismo denominado *quorum sensing*, ou percepção da densidade. Por meio dele, as bactérias regulam a expressão de conjuntos de genes especializados em resposta à densidade celular[49, 61]. Bactérias tradicionalmente definidas como seres unicelulares de estrutura celular procarionte podem atuar de maneira multicelular quando um determinado nível populacional crítico é atingido. A percepção da densidade celular resulta da comunicação intercelular mediada pela secreção de sinais moleculares sintetizados pelas células individuais. Estas moléculas são detectadas por receptores específicos o que permite as células bacterianas “tomarem conhecimento” do tamanho da população por meio da concentração dos sinais. Quando o nível crítico é atingido elas passam a agir em grupo como um único organismo multicelular. Este nível crítico caracteriza, como no caso de uma assembleia, um “quorum” onde as ações passam a ser tomadas em conjunto[49].

Esse mecanismo de comunicação entre bactérias interfere na estrutura do biofilme uma vez que estimula o crescimento de espécies benéficas ao biofilme e dificulta o crescimento de outras espécies competitivas. Algumas propriedades fisiológicas das células bacterianas podem ser alteradas pelo *quorum sensing*. A expressão dos genes para a resistência a antibióticos, por

exemplo, pode promover a proteção de toda a comunidade bacteriana, e estima-se que a resistência do biofilme aos antibióticos seja de 1000 a 1500 vezes maior que das bactérias na forma planctônica[61, 62]. Alguns estudos têm demonstrado a maior resistência de biofilmes orais à clorexidina, amoxicilina, doxiciclina e metronidazol quando comparados a bactérias na forma planctônica[11, 24, 51, 54, 67].

Os mecanismos a seguir podem explicar a maior resistência dos micro-organismos em biofilmes: 1) a matriz extracelular do biofilme pode restringir fisicamente a difusão dos agentes antimicrobianos; 2) a redução de oxigênio e nutrientes dentro do biofilme faz com que algumas bactérias entrem em estado estacionário, no qual elas são menos susceptíveis aos agentes dependentes do crescimento microbiano; 3) uma subpopulação bacteriana pode se diferenciar em um estado fenotipicamente resistente; e 4) alguns organismos do biofilme podem expressar genes específicos de resistência a antimicrobianos que não são necessários para a formação do biofilme[44].

Em dentes com necrose pulpar e nítida lesão periapical, o biofilme pode estar presente não só nas paredes dentinárias do sistema de canais radiculares[29, 36, 52], mas também na porção externa da raiz, aderida à superfície radicular, em áreas de reabsorção cementária e dentinária[26, 34], e sua erradicação certamente representa um dos grandes desafios do tratamento endodôntico.

Após a obturação dos canais radiculares, o material obturador pode exercer importante papel impedindo o desenvolvimento de micro-organismos residuais nos túbulos dentinários e sistema de canais radiculares. Porém, se o

cimento apresenta alta dissolução como resultado do contato com os fluidos apicais e ausência de ação antimicrobiana pode haver formação dos biofilmes[64].

Além disso, um estudo recente[53] demonstrou que micro-organismos como *E. faecalis*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguinis*, *Candida albicans* e *Prevotella nigrescens* podem aderir a guta-percha e até mesmo a diversos cimentos obturadores, tais como: AH-Plus, Tubli Seal, Real Seal SE, EndoREZ, ApexitPlus e GuttaFlow. Desta forma, na ocorrência de infiltração coronária a saliva poderia contaminar os materiais obturadores possibilitando a formação de biofilme sobre os mesmos.

Para que haja doença, os micro-organismos devem atingir uma densidade populacional (carga) que seja capaz de causar dano tecidual. Até que esse limiar seja alcançado, nenhum sinal clínico ou sintoma da doença é revelado. Devido à diversidade dos patógenos envolvidos na instalação e progressão da patologia endodôntica, torna-se muito complicado estabelecer o limite para iniciar a doença. A virulência dos micro-organismos e a defesa do hospedeiro também são fatores importantes nesse processo. Os procedimentos de limpeza, modelagem e desinfecção durante o tratamento endodôntico podem não ser suficientes para reduzir os níveis microbianos abaixo do limiar citado, levando à persistência da doença. No entanto, a desorganização da estrutura do biofilme e a redução significativa da carga microbiana promoverá a redução e eliminação dos sinais e sintomas, podendo decretar a cura da doença[59]. Desta forma, a utilização de cimentos obturadores endodônticos com atividade antimicrobiana é considerada benéfica a medida que configura um esforço

adicional para reduzir o número de micro-organismos remanescentes e, consequentemente, erradicar a infecção[69].

Alguns fatores relacionados aos cimentos obturadores podem interferir na sua atuação contra micro-organismos. Já foi demonstrada[14] a influência de 4 consistências de manipulação dos cimentos Roth, CRCS e AH26 na atividade antimicrobiana contra o *E. faecalis*. De modo geral, quanto menor a consistência maior foi a propriedade antibacteriana.

Cimentos endodônticos que contêm hidróxido de cálcio em sua composição parecem ser apropriados para a eliminação bacteriana. O efeito exercido por esses materiais obturadores nos micro-organismos vem da liberação de íons hidroxila que causam elevação do pH. Um pH maior que 9 pode inativar de modo irreversível ou não enzimas bacterianas resultando em perda de atividade biológica[13].

Na tentativa de se encontrar um cimento endodôntico com propriedades mais próximas das ideais, novos materiais têm sido continuamente lançados comercialmente. O mineral de trióxido agregado (MTA) é um material à base de cimento Portland e vem sendo amplamente utilizado na Endodontia no tratamento de perfurações radiculares, capeamento pulpar, pulpotomia e em retrobturações. Novos cimentos à base de MTA, como o Endo CPM Sealer e o Fillapex, têm sido desenvolvidos para o uso como cimento obturador de canais radiculares apresentando boas propriedades biológicas[16]. Um cimento experimental (MTA-S) contendo cimento Portland, um agente radiopacificador, aditivos e veículos apropriados está em desenvolvimento na Faculdade de

Odontologia de Araraquara (FOAr/UNESP) para ser utilizado como cimento obturador.

A capacidade seladora antimicrobiana do MTA-S e do Endo CPM Sealer foi comparada com a dos cimentos AH Plus, Sealer 26, Epiphany SE, Sealapex, Activ GP e Endofill[40]. Cento e trinta dentes unirradiculares humanos extraídos foram instrumentados e, então, obturados com guta-percha e um dos cimentos ou com Resilon e o cimento Epiphany SE. Os dentes foram esterilizados com óxido de etileno antes do início do experimento de infiltração com o *E. faecalis*. A infiltração foi avaliada diariamente por 16 semanas. Todos os cimentos permitiram a infiltração bacteriana.

O MTA Fillapex é um cimento obturador à base de MTA lançado recentemente no mercado pela Angelus (Londrina/PR, Brasil). Ele também apresenta em sua composição resina salicilato, resina diluente, resina natural, óxido de bismuto, sílica nanoparticulada e pigmentos. Comercialmente apresenta-se na forma de pasta base e pasta catalisadora. Segundo o fabricante, seu tempo de trabalho é de 30 minutos e o tempo mínimo de presa é de 120 minutos. Já foi relatado[30] que o MTA Fillapex apresenta ação contra *E. faecalis* apenas antes de tomar presa.

Muitos estudos vem sendo realizados para avaliar a atividade antimicrobiana de diversos cimentos obturadores[3, 6, 14, 23, 57, 58, 60, 63, 69]. Contudo, pouco se sabe sobre a atividade antimicrobiana do MTA Fillapex e do MTA-S.

Vários métodos são utilizados na avaliação da atividade antimicrobiana dos cimentos obturadores[21, 50]. Dentre eles, o teste de difusão em ágar é o mais comumente aplicado[3, 6, 14, 37, 58]. Porém, as limitações desse método são bem conhecidas[66]. Um material que se difunde mais facilmente irá, provavelmente, promover uma maior zona de inibição. Assim, além da citotoxicidade direta sobre o micro-organismo, diferentes taxas de difusão de diferentes cimentos podem influenciar os resultados. Os dados obtidos podem não refletir o verdadeiro potencial antimicrobiano dos diversos cimentos e agentes desinfetantes.

Na tentativa de superar essas limitações, um teste de contato direto vem sendo aplicado na avaliação do efeito antimicrobiano de cimentos endodônticos e materiais retrobturadores[12, 66]. Esse método é baseado na mensuração do efeito do íntimo contato entre a bactéria e o material avaliado na cinética do crescimento microbiano usando uma microplaca em espectrofotômetro com temperatura controlada[66].

Empregando o teste do contato direto, Eldeniz et al.[12] (2006) avaliaram a atividade antibacteriana de vários materiais retrobturadores - amálgama, ProRoot MTA, *Intermediate Restorative Material* (IRM), Super Bond C&B, Geristore, Dyract, Clearfil APX combinado com SE Bond ou Protect Bond – contra *Staphylococcus aureus*, *E. faecalis* e *Pseudomonas aeruginosa*. Os materiais foram testados imediatamente após a manipulação e após 3 dias do preparo. Dez microlitros da suspensão bacteriana foram colocados em cada poço para o contado direto com cada material por 1 hora a 37ºC. O crescimento das bactérias sobreviventes foi então mensurado em espectrofotômetro a 620 nm por 15 horas. Doze poços sem cimento utilizando os mesmos procedimentos serviram como

controle positivo. O IRM e o ProRoot MTA inibiram, de modo geral, mais o crescimento bacteriano do que os outros materiais.

Utilizando o método do contato direto modificado, Zhang et al.[69] (2009) estudaram a efetividade antimicrobiana de 7 cimentos endodônticos (AH Plus, ApexitPlus, iRoot SP, Tubli Seal, Sealapex, Epiphany SE e EndoRez) contra o *E. faecalis*. A bactéria em suspensão foi exposta aos materiais por 2 a 60 minutos usando os cimentos recém manipulados ou tomados presa por 1, 3 e 7 dias. O efeito antimicrobiano dos cimentos foi relativamente estável por até 3 dias. O iRoot SP recém espatulado erradicou todas as bactérias em apenas 2 minutos de contato. O AH Plus e o EndoRez recém espatulados reduziram significativamente o número de bactérias viáveis em 2 minutos e eliminaram todas as bactérias entre 5 e 20 minutos. Após 7 dias a maioria dos cimentos perdeu muito da atividade contra o *E. faecalis*, exceto o Sealapex e o EndoRez. Para os autores, o método utilizado é vantajoso por ser quantitativo e reprodutível, além de permitir testar materiais insolúveis e poder ser utilizado em condições padronizadas.

Apesar do teste de contato direto ser um método mais preciso que o difusão em ágar, ele também pode não representar exatamente o que acontece nas situações in vivo. Isso acontece devido à possibilidade de encontrarmos as bactérias organizadas em biofilme dentro do sistema de canais radiculares. Esse fato configura uma situação de maior dificuldade para a eliminação dos micro-organismos. Diante disso, fica a dúvida se os resultados obtidos por Zhang et al.[69] (2009), que mostraram a total eliminação dos micro-organismos pelo cimento iRoot SP, também seriam os mesmos se o referido material fosse colocado em contato com um biofilme maduro de *E. faecalis*. Desta forma, torna-se evidente a

importância e a necessidade do desenvolvimento de metodologias para a realização de pesquisas acerca da atividade antimicrobiana de cimentos endodônticos sobre biofilmes ao invés de micro-organismos na forma planctônica.

Modelos experimentais empregando biofilmes têm sido utilizados para avaliação da atividade antimicrobiana de soluções irrigadoras. Dunavant et al.[10] (2006) utilizaram metodologia in vitro para o crescimento de biofilme de *E. faecalis* incubado em um sistema de fluxo celular e posteriormente submerso nas soluções a serem avaliadas por 1 ou 5 minutos. Foram avaliados o hipoclorito de sódio a 1% e 6%, MTAD®, clorexidina a 2%, REDTA e Smear Clear. O efeito de cada solução foi determinado pela contagem da porcentagem de células bacterianas mortas em relação às bactérias viáveis. Não houve diferença estatisticamente significante com relação ao tempo de ação das substâncias avaliadas. Os autores afirmaram ser esta metodologia eficaz para o crescimento do biofilme e para a avaliação da ação de medicamentos sobre o biofilme.

Os testes antimicrobianos também podem ser realizados sobre biofilmes mistos. Muller et al.[32] (2007) cultivaram, em discos esmalte bovino, biofilmes formados por seis espécies - *Actinomyces naeslundii*, *Veillonella díspar*, *Fusobacterium nucleatum*, *Streptococcus sobrinous*, *S. oralis* e *Candida albicans*. Os mesmos foram tratados com aplicação de ozônio, laser de baixa intensidade (terapia fotodinâmica), clorexidina ou hipoclorito de sódio. A análise dos resultados foi feita após suspensão das células do biofilme, diluições seriadas e cultura em ágar sangue. Apenas o NaOCl a 5% eliminou completamente os micro-organismos do biofilme.

Em um outro estudo[39], a avaliação da atividade sobre biofilme foi realizada em microscopia eletrônica de varredura (MEV). Os biofilmes foram cultivados sobre fatias de 2 mm de dentina humana. Amostras colhidas de canais radiculares com polpas necróticas foram utilizadas para a cultura de biofilmes em ambiente anaeróbio por 12 dias. Após o contato dos biofilmes com antibióticos, os espécimes foram observados em MEV diariamente por oito dias. Nenhum dos antibióticos avaliados foi eficaz na eliminação do biofilme.

Os biofilmes de *E. faecalis* geralmente são avaliados por microscopia eletrônica de varredura[15, 38, 64]. Porém, esse método não fornece informações quantitativas sobre toda a arquitetura estrutural dos biofilmes. Por outro lado, a microscopia confocal de varredura laser vem sendo cada vez mais empregada nos últimos anos[43, 53] por permitir a análise de múltiplas secções do biofilme, em diferentes planos, com facilidade de observação e de preparo das amostras. O emprego de corantes como o Live/Dead e de programas de análise de imagens vem sendo bastante utilizado e merece destaque, pois possibilita a identificação e a quantificação de células viáveis e não-viáveis[41, 43, 65].

A microscopia confocal foi utilizada por Pappen et al.[43] (2010) quando investigaram o efeito antimicrobiano do Tetraclean, MTAD e cinco soluções irrigadoras experimentais pelos testes de exposição direta em culturas planctônicas e frente ao biofilme. No teste de exposição direta, uma suspensão de *E. faecalis* foi misturada com uma das soluções irrigadoras. Após 30 s, 1 min, 3 min e 10 min um neutralizante foi adicionado e o número de bactérias sobreviventes foi calculado. Para o outro teste, um biofilme misto da placa bacteriana subgengival foi cultivado por 14 dias em caldo BHI em condições de

anaerobiose sobre discos sintéticos de hidroxiapatita. Os biofilmes foram expostos às soluções por 30 s, 1 min e 3 min. As amostras foram observadas em microscopia confocal após serem submetidas ao corante Live/Dead® BacLight Bacterial Viability Kit L7012 (Molecular Probes, Inc., Eugene, OR, EUA). As imagens foram analisadas quantitativamente e o volume de células mortas foi calculado para cada medicamento. O Tetraclean foi mais efetivo do que o MTAD contra o *E. faecalis* em cultura planctônica e no biofilme multi-espécies.

A indução de biofilme vem sendo realizada por diferentes métodos e sobre diversas superfícies ou substratos, dentre eles: dentina humana[22, 39], dentina bovina[4], esmalte dentário bovino[32], discos de silicone[25], membranas de acetato de celulose[24] e hidroxiapatita[43, 56]. Isso, de certa forma, denota a inexistência de um método ideal que reproduza da forma mais fidedigna possível as condições encontradas in vivo. Além disso, pouco se sabe sobre o desenvolvimento de biofilmes nos materiais obturadores.

O grande número de substratos utilizados atualmente, aliado ao recente interesse sobre o desenvolvimento de biofilmes nos materiais obturadores, justifica a realização de pesquisas adicionais sobre a influência do substrato na qualidade dos biofilmes desenvolvidos in vitro.

Objetivo

OBJETIVO

OBJETIVO GERAL

- ✓ Avaliar a formação do biofilme de *Enterococcus faecalis*, bem como a atividade antibiofilme, o pH e a solubilidade de cimentos obturadores endodônticos.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Avaliar a indução de biofilme de *Enterococcus faecalis* sobre 4 superfícies - dentina bovina, guta-percha, hidroxiapatita e osso bovino - nos períodos de 14 e 21 dias;
- ✓ Avaliar a atividade antibacteriana pelos métodos de difusão em ágar e contato direto sobre biofilme (antibiofilme), o pH e a solubilidade dos cimentos endodônticos AH Plus, Sealer 26, Epiphany SE, Sealapex, Activ GP, MTA Fillapex e o MTA-S (cimento endodôntico experimental resinoso à base de MTA).

Capítulo 1

Desenvolvimento de biofilme de *Enterococcus faecalis* em diferentes substratos

RESUMO

Introdução: O objetivo deste estudo foi avaliar a influência de diferentes substratos no desenvolvimento de biofilme de *Enterococcus faecalis*. **Metodologia:** Placas de cultura celular contendo meio de cultura e *E. faecalis* (ATCC 29212) foram utilizadas para desenvolvimento de biofilme em: dentina bovina, guta-percha, hidroxiapatita e osso bovino. Os substratos foram incubados a 37ºC por 14 ou 21 dias, com troca do meio a cada 48 h. Após os períodos de incubação os espécimes (n = 5 por grupo e período) foram corados pela técnica Live/Dead e quatro imagens em microscopia confocal foram obtidas de cada amostra. O software BioImage_L foi utilizado para quantificação do biovolume total (μm^3), biovolume das bactérias vivas/verdes (μm^3) e cobertura do substrato (%). Os resultados obtidos foram analisados por testes não paramétricos ($p=0,05$). **Resultados:** Houve formação de biofilme em todos os grupos. A guta-percha apresentou o menor biovolume total aos 14 dias ($p<0,05$) e a hidroxiapatita o maior aos 21 dias ($p<0,05$). Não houve diferença significativa no biovolume verde aos 14 dias. Já no período de 21 dias, a hidroxiapatita apresentou o maior volume ($p<0,05$). O percentual de cobertura foi semelhante entre os substratos aos 21 dias ($p>0,05$), porém aos 14 dias o osso bovino obteve

o maior percentual (p<0,05). **Conclusão:** *E. faecalis* foi capaz de desenvolver biofilme em todos os substratos e em ambos os períodos; a hidroxiapatita foi o substrato que apresentou os melhores resultados para o desenvolvimento de biofilme; o tipo de substrato influenciou nas características dos biofilmes de acordo com os parâmetros avaliados.

Palavras-chave: biofilme, *Enterococcus faecalis*, guta-percha, microscopia confocal.

INTRODUÇÃO

Os micro-organismos e seus produtos são os principais fatores etiológicos da doença pulpar e periapical (1). *Enterococcus faecalis* é uma bactéria anaeróbia facultativa gram positiva frequentemente isolada em canais radiculares de dentes com lesão periapical persistente, apesar de ser pouco encontrada em casos de infecção endodôntica primária (2-5). A presença de *E. faecalis* nos insucessos endodônticos pode acorrer em função de sua persistência a partir de uma infecção primária, ou da recolonização decorrente de selamento inadequado (6).

A maioria das bactérias resistentes da microbiota endodôntica apresenta capacidade de adesão à superfícies formando comunidades denominadas biofilmes. A capacidade do micro-organismo formar biofilme depende da natureza do substrato formado sobre a superfície que representa a interface onde ocorrem as interações microbianas. A formação dos biofilmes

compreende as seguintes etapas: adesão bacteriana, formação de microcolônias e acúmulo ou crescimento do biofilme. A natureza da superfície do material determina a composição da película condicionante, a qual por vez influencia a adesão dos micro-organismos (7).

Alguns micro-organismos apresentam reconhecida capacidade de adesão, colonização e formação de biofilmes na dentina intra-radicular e no cemento apical (8, 9). Micro-organismos como *E. faecalis*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguis*, *Candida albicans* e *Prevotella nigrescens* podem aderir a guta-percha e até mesmo a diversos cimentos obturadores (10). Desta forma, na ocorrência de infiltração coronária a saliva poderia contaminar a guta-percha possibilitando a formação de biofilme sobre a mesma (10-13).

Dentre os substratos mais usados no desenvolvimento de biofilmes estão a hidroxiapatita e a dentina bovina (14-18). Os biofilmes produzidos em hidroxiapatita apresentam morfologia regular e relativa aderência ao substrato impedindo descolamento durante os procedimento laboratoriais. Contudo, se for levado em consideração que fatores inerentes à dentina influenciam na formação e eliminação dos biofilmes (19, 20) o emprego da hidroxiapatita para testes antimicrobianos deve ser visto com cuidado.

O desenvolvimento de biofilme de *E. faecalis* geralmente é avaliado por microscopia eletrônica de varredura (10, 12, 13). Porém, esse método não fornece informações quantitativas sobre toda a arquitetura estrutural dos biofilmes. Por outro lado, a microscopia confocal de varredura a laser vem sendo cada vez mais empregada (11, 14) por permitir a análise de múltiplas secções do

biofilme, em diferentes planos, com facilidade de observação e de preparo das amostras. O emprego de corantes como o Live/Dead e de programas de análise de imagens vem sendo bastante utilizado, pois possibilita identificação e quantificação de células viáveis e não-viáveis (14, 18, 21).

Frente ao exposto, o objetivo deste estudo foi avaliar a influência de diferentes substratos - dentina bovina, guta-percha, hidroxiapatita e osso bovino - no desenvolvimento de biofilme de *E. faecalis* em dois períodos de indução.

MATERIAL E MÉTODO

OBTENÇÃO E PREPARO DA AMOSTRA

Blocos de dentina foram obtidos a partir de incisivos centrais bovinos com comprimento variando de 23,5 a 25 mm e com raízes completamente formadas. Inicialmente as suas coroas foram cortadas na região da junção cemento-esmalte. Em seguida, o remanescente radicular foi separado longitudinalmente em segmentos de 0,7 mm de espessura e a região do canal radicular foi planificada. Por fim, os segmentos obtidos foram cortados para a obtenção de blocos de dentina com dimensões de 5 mm x 5 mm x 0,7 mm (largura x comprimento x espessura). Todos os cortes foram realizados por um disco diamantado em baixa velocidade (Isomet – Buehler, LakeBluff, IL, EUA) com irrigação abundante. Os blocos obtidos foram colocados em um tudo de ensaio contendo água destilada e levados a uma autoclave para esterilização a 121ºC por 20 min.

Discos de guta-percha foram confeccionados a partir de cones convencionais de guta-percha (Dentsply-Maillefer, Petrópolis, RJ, Brasil). Para isto, os cones foram imersos em água por 60 segundos no aparelho de aquecimento para material de moldagem em prótese (Plastificador de godiva Righetto e Cia., Campinas, SP) na temperatura de 70°C, controlada por meio de termômetro. Em seguida, o material aquecido foi colocado em anel metálico apresentando 10 mm de diâmetro interno e 1,5 mm de espessura e prensado entre duas placas de vidro a uma pressão controlada e constante de 0,5 N, durante 1 minuto. Os discos foram retirados do anel e o excesso de material foi removido com lâmina de bisturi. Foram armazenados a temperatura ambiente (25 a 30°C) por 24 horas. Os discos foram esterilizados com luz ultravioleta em câmara de fluxo laminar por 30 minutos cada um dos lados.

Os discos hidroxiapatita utilizados neste estudo foram cedidos pelo Laboratório de Bioengenharia, Biomateriais e Mineralização Biológica da Universidade Federal Fluminense. Os mesmos apresentavam 10 mm de diâmetro e 1 mm de espessura e foram esterilizados com luz ultravioleta em câmara de fluxo laminar por 30 minutos cada um dos lados.

A partir de mandíbulas bovinas foram preparados discos com diâmetro de 10 mm e espessura de 0,5 mm. A cortical vestibular da mandíbula foi perfurada com uma broca trefina de 10 mm (260-801-810) da Bicon Dental Implants (Boston, MA, E.U.A.), acoplada a um contra-ângulo montado em um micromotor, sob irrigação constante. O cilindro de osso obtido foi cortado em fatias com a espessura desejada por um disco diamantado em baixa velocidade (Isomet – Buehler, LakeBluff, IL, EUA) com irrigação abundante. Os discos

obtidos foram colocados em um tudo de ensaio contendo água destilada e levados a uma autoclave para esterilização a 121ºC por 20 min.

CRESCIMENTO DO BIOFILME

Os procedimentos microbiológicos e a manipulação dos substratos foram realizados em ambiente asséptico, dentro de câmara de fluxo laminar (Veco Flow Ltda., Campinas, SP, Brasil), para evitar contaminação das amostras.

Para a formação do biofilme foi empregada uma cepa padrão de *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212). Após confirmação da pureza da cepa, realizada pela coloração de Gram e morfologia da colônia, o micro-organismo foi reativado em 4,0 mL de caldo BHI estéril e mantido em estufa a 37ºC, durante 12 horas. Após este período a densidade óptica do meio foi medida em espectrofotômetro (Modelo 600 Plus, Femto, São Paulo, SP, Brasil) com comprimento de onda de 600 nm. A densidade celular foi 3,2 x 10^7 unidades formadoras de colônia por mL (UFC/mL). Em seguida, uma alíquota equivalente a 1% do volume utilizado para contaminação dos espécimes foi adicionado ao meio de cultura estéril e homogeneizado.

Para todos os substratos, uma das suas faces foi marcada com um traço de lápis. Esta face identificada ficou voltada para a superfície da placa, enquanto a face não marcada foi utilizada para o desenvolvimento do biofilme. Em uma placa de cultura celular de 24 poços foram dispensados 2,0 mL de meio BHI puro contendo 1% da suspensão bacteriana, deixando os substratos totalmente submersos. As placas foram colocadas em uma jarra de microaerofilia

e mantidas em uma incubadora de bancada com agitação orbital (modelo Q816M20,Quimis Aparelhos Científicos Ltda., Diadema, SP, Brasil) a 37ºC durante 14 ou 21 dias. Para que não houvesse deficiência de nutrientes para as células bacterianas, o meio de cultura BHI de cada espécime foi totalmente trocado a cada 48 h, sem a adição de novos micro-organismos.

VERIFICAÇÃO DO BIOFILME EM MICROSCOPIA CONFOCAL

Após os períodos de indução, os substratos foram enxaguados duas vezes em solução salina para eliminar o meio de cultura e células não aderidas. Os mesmos foram colocados sobre uma lâmina de vidro e corados com 50 µL da solução Live/Dead® BacLight Bacterial Viability Kit L7012 (Molecular Probes, Inc., Eugene, OR, EUA), gotejada sobre o biofilme. Em seguida, foram incubados com o corante em temperatura ambiente por 10 min e, então, levados à microscopia confocal.

O corante *Live/Dead® BacLight*, que cora em verde as células viáveis e em vermelho as células com danos na membrana, foi preparado imediatamente antes do seu uso. O mesmo foi mantido em local protegido da luz e do calor durante todos os procedimentos. Cada amostra foi processada e analisada individualmente.

Todos os substratos foram observados usando um microscópio confocal de varredura a laser (Leica TCS-SPE; Leica Microsystems GmbH, Mannheim, Alemanha). Para isso, os substratos foram colocados sobre uma lamínula de vidro e a análise foi feita com lente objetiva de 40 X de aumento.

Foram utilizados 5 substratos por grupo e em cada um deles foram observados 4 campos, totalizando 20 campos por grupo em cada período. As imagens foram capturadas a cada intervalo de 1,0 µm, no formato de 512 x 512 pixels, usando o programa *Leica Application Suite-Advanced Fluorescence* (LAS AF, Leica Microsystems GmbH). Cada imagem obtida representava uma área de 275 x 275 μm^2.

As imagens foram transferidas para o programa BioImage_L (22). A ferramenta análise de biofilme foi empregada para avaliar os quatro campos de cada amostra. Ao final do processo é gerado um arquivo com extensão XLS o qual apresenta várias planilhas, sendo duas com os dados de interesse. A primeira é denominada *biovolume-stack* e a segunda *substratum*. Os resultados da cada grupo foram reunidos em uma coluna para fornecer uma média única representativa dos 20 campos. A avaliação foi realizada por um examinador cego para os grupos. As variáreis estudadas foram biovolume total (μm^3), biovolume verde (μm^3) e percentual de cobertura do substrato (%). O biovolume total representa o volume ocupado por todas as células do biofilme. Já o biovolume verde indica o volume ocupado apenas pelas células vivas.

Os resultados obtidos foram analisados inicialmente pelo teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov. Diante dos resultados, optou-se pela utilização dos testes não paramétricos Kruskal-Wallis, Dunn e Mann-Whitney. As análises foram realizadas pelo programa *GraphPad Prism v. 5.0 for Macintosh* (GraphPad Software, San Diego, Califórnia, EUA), considerando $p<0,05$ significativo.

RESULTADOS

A análise dos substratos revelou que houve adesão bacteriana com consequente formação de biofilme em todos os grupos. A Figura 1 representa imagens dos biofilmes obtidos em dentina bovina, guta-percha, hidroxiapatita e osso bovino nos períodos de 14 e 21 dias.

A Figura 2 representa uma reconstrução em 3D do biofilme da Figura 1A (biofilme em dentina bovina - 14 dias). A imagem foi adquirida com o auxílio do programa *OsiriX* v.3.9.4 (Pixmeo, Genebra, Suíça). Nela é possível observar a presença de micro-organismos por toda a extensão do substrato, com grande predomínio de bactérias vivas. Em algumas regiões é possível observar um grande acúmulo de bactérias formando montanhas ou copas de árvores (setas).

A média, mediana, valor máximo e valor mínimo das variáveis biovolume total (μm^3), biovolume verde (μm^3) e cobertura do substrato (%) para cada grupo estão expressos nas Tabelas 1, 2 e 3.

Aos 14 dias de indução, o maior biovolume total foi encontrado na hidroxiapatita, mas sem diferença significativa para os demais substratos ($p>0,05$). O menor biovolume total foi encontrado na guta-percha, com diferença significativa para o osso bovino ($p<0,05$). Após 21 dias de indução, a hidroxiapatita apresentou o maior biovolume total com diferença significativa ($p<0,05$) para a guta-percha que mais uma vez obteve a menor mediana. O teste de Mann-Whitney não revelou diferença significativa ($p>0,05$) entre 14 dias e 21 dias de indução, independente do substrato.

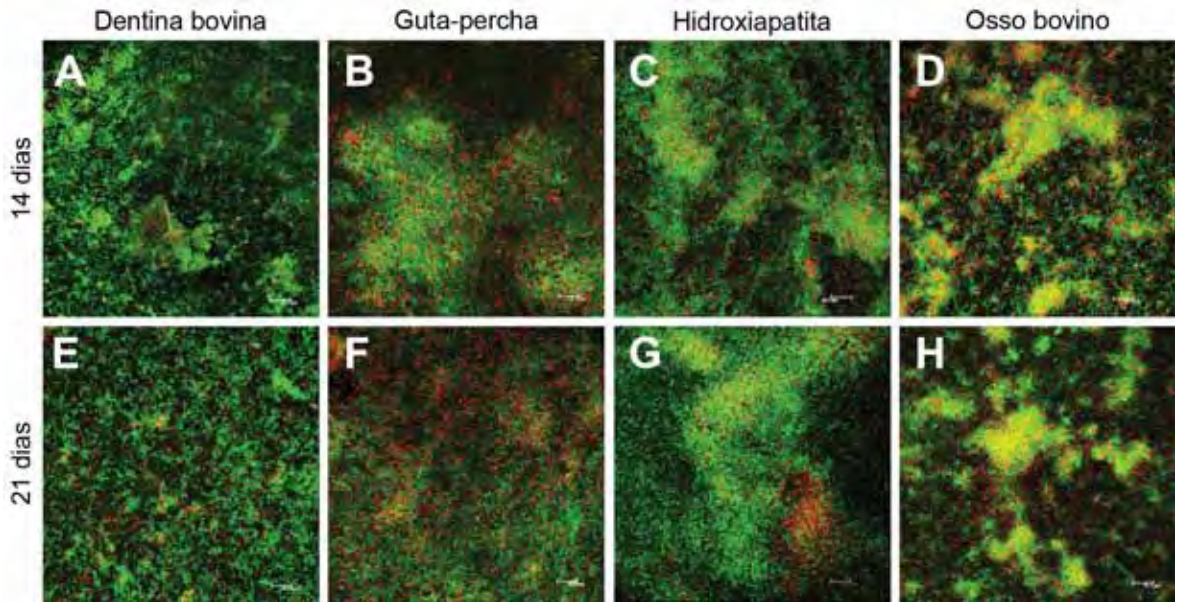


Figura 1. Imagens dos biofilmes formados sobre dentina bovina, guta-percha, hidroxiapatita e osso bovino, nos períodos de 14 e 21 dias. Magnificação original de 40x.

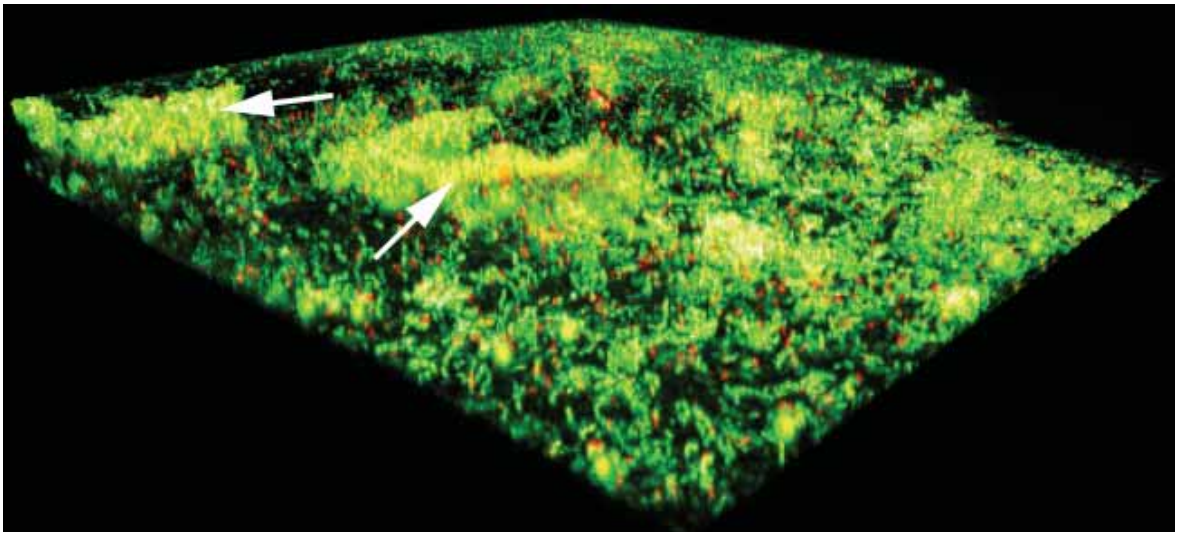


Figura 2. Reconstrução em 3D da Figura 1A (biofilme de dentina bovina - 14 dias). As setas brancas indicam áreas de maior quantidade de bactérias.

Tabela 1. Média, mediana, valor mínimo e valor máximo do biovolume total (μm^3) de acordo com cada substrato e período de indução

	Dentina	Guta-percha	Hidroxiapatita	Osso bovino
14 dias				
Mínimo	$1,31 \times 10^5$	$2,08 \times 10^4$	$1,87 \times 10^4$	$4,55 \times 10^5$
Máximo	$8,95 \times 10^6$	$1,92 \times 10^6$	$1,60 \times 10^7$	$7,13 \times 10^6$
Mediana	$5,02 \times 10^5$ ABa	$3,00 \times 10^5$ Aa	$1,92 \times 10^6$ ABa	$1,09 \times 10^6$ Ba
Média	$1,25 \times 10^6$	$5,73 \times 10^5$	$2,98 \times 10^6$	$2,06 \times 10^6$
21 dias				
Mínimo	$2,43 \times 10^4$	$8,24 \times 10^3$	$2,85 \times 10^5$	$1,44 \times 10^5$
Máximo	$4,72 \times 10^6$	$7,52 \times 10^6$	$1,83 \times 10^7$	$5,12 \times 10^6$
Mediana	$1,16 \times 10^6$ ABa	$3,09 \times 10^5$ Aa	$2,29 \times 10^6$ Ba	$8,31 \times 10^5$ ABa
Média	$1,35 \times 10^6$	$1,50 \times 10^6$	$3,24 \times 10^6$	$1,18 \times 10^6$

[A, B] Valores seguidos por letras maiúsculas diferentes representam diferença estatística significativa entre os substratos de acordo com os testes Kruskal-Wallis e Dunn ($p<0,05$).
[a] Valores seguidos por letras minúsculas iguais representam igualdade estatística entre os períodos de indução de acordo com o teste Mann-Whitney ($p>0,05$).

Quando apenas as células vivas foram levadas em consideração, a hidroxiapatita apresentou o maior biovolume verde, mas não houve diferença significativa entre os substratos no período de 14 dias ($p>0,05$). Já no período de 21 dias, houve diferença entre hidroxiapatita e guta-percha ($p<0,05$). Nenhum dos substratos demonstrou diferença estatística entre os períodos de 14 e 21 dias ($p>0,05$).

O substrato que exibiu o maior percentual de cobertura aos 14 dias foi o osso bovino o qual mostrou diferença estatística para a guta-percha ($p<0,05$) que, por sua vez, alcançou o menor valor. Já no período de 21 dias, o maior valor foi obtido pela hidroxiapatita, mas não houve diferença significativa para os demais grupos ($p>0,05$). Quando foram comparados os períodos de indução, apenas a guta-percha apresentou um aumento significativo do período de 14 dias para o de 21 dias ($p<0,05$).

Tabela 2. Média, mediana, valor mínimo e valor máximo do biovolume verde (μm^3) de acordo com cada substrato e período de indução

	Dentina	Guta-percha	Hidroxiapatita	Osso bovino
14 dias				
Mínimo	$8,13 \times 10^4$	$9,30 \times 10^3$	$1,53 \times 10^4$	$1,55 \times 10^5$
Máximo	$8,51 \times 10^6$	$1,86 \times 10^6$	$1,12 \times 10^7$	$4,60 \times 10^6$
Mediana	$4,73 \times 10^5$ Aa	$2,30 \times 10^5$ Aa	$1,56 \times 10^6$ Aa	$6,46 \times 10^5$ Aa
Média	$1,14 \times 10^6$	$4,69 \times 10^5$	$2,33 \times 10^6$	$1,40 \times 10^6$
21 dias				
Mínimo	$1,68 \times 10^4$	$3,26 \times 10^3$	$1,45 \times 10^5$	$4,44 \times 10^4$
Máximo	$4,50 \times 10^6$	$6,97 \times 10^6$	$1,19 \times 10^7$	$3,61 \times 10^6$
Mediana	$1,06 \times 10^6$ ABa	$1,97 \times 10^5$ Aa	$1,56 \times 10^6$ Ba	$6,02 \times 10^5$ ABa
Média	$1,19 \times 10^6$	$1,24 \times 10^6$	$2,31 \times 10^6$	$8,55 \times 10^5$

[A, B] Valores seguidos por letras maiúsculas diferentes representam diferença estatística significativa entre os substratos de acordo com os testes Kruskal-Wallis e Dunn ($p<0,05$).
[a] Valores seguidos por letras minúsculas iguais representam igualdade estatística entre os períodos de indução de acordo com o teste Mann-Whitney ($p>0,05$).

Tabela 3. Média, mediana, valor mínimo e valor máximo do percentual de cobertura do substrato (%) de acordo com cada grupo

	Dentina	Guta-percha	Hidroxiapatita	Osso bovino
14 dias				
Mínimo	1,81	0,70	0,19	3,93
Máximo	24,72	36,24	55,05	40,88
Mediana	5,60 ABa	4,01 Aa	15,95 ABa	19,78 Ba
Média	8,34	7,28	17,34	20,38
21 dias				
Mínimo	1,00	0,18	1,55	1,50
Máximo	44,68	51,30	67,16	42,69
Mediana	7,61 Aa	12,64 Ab	19,49 Aa	11,40 Aa
Média	12,66	16,63	23,91	15,41

[A, B] Valores seguidos por letras maiúsculas diferentes representam diferença estatística significativa entre os substratos de acordo com os testes Kruskal-Wallis e Dunn ($p<0,05$).
[a, b] Valores seguidos por letras minúsculas diferentes representam diferença estatística significativa entre os períodos de indução de acordo com o teste Mann-Whitney ($p<0,05$).

DISCUSSÃO

Estudos que empregam o desenvolvimento de biofilme in vitro utilizam os mais diversos tipos de substratos, dentre eles: dentina humana (23, 24),

dentina bovina (15), esmalte dentário bovino (25), discos de silicone (26), membranas de acetato de celulose (27) e hidroxiapatita (14, 16). Quando são utilizados substratos com configuração anatômica mais complexa há a formação de biofilme de forma irregular, onde em certas áreas apresenta-se espesso, e em outras apenas células bacterianas isoladas são encontradas.

Os estudos in vitro devem simular as condições encontradas na situação in vivo. Para estudos relacionados ao sistema de canais radiculares, o substrato ideal é a própria dentina de dentes humanos extraídos. Diante da facilidade de obtenção e similaridade de estrutura e composição em relação aos dentes humanos, o esmalte e a dentina de dentes bovinos têm sido frequentemente utilizados (17, 18, 25).

No presente estudo, a hidroxiapatita foi escolhida por servir como modelo para comparação com os demais materiais devido à sua reconhecida capacidade de formar biofilmes espessos, com forma regular e que cobrem a maior parte da sua superfície (14, 16, 28). Por outro lado, não foram encontrados relatos de indução de biofilme em osso bovino. Contudo, por apresentar hidroxiapatita em sua constituição e ser de fácil obtenção, o osso bovino foi selecionado como modelo experimental.

A guta-percha é o material obturador em estado sólido mais usado no mundo há décadas e apresenta o óxido de zinco como seu principal componente. Por apresentar fraca ou nenhuma atividade antimicrobiana, algumas sustâncias como o iodofórmio, a clorexidina e o hidróxido de cálcio foram incorporadas à guta-percha (29). No presente estudo foi utilizada a guta-percha convencional

sem agentes antimicrobianos e foi possível observar o desenvolvimento de biofilme em sua superfície. No período de 14 dias, a guta-percha apresentou o menor biovolume total com diferença significativa para o osso bovino. Esse baixo valor encontrado pode ter relação com alguma atividade antibacteriana exercida pelo óxido de zinco presente na guta-percha, mas insuficiente para evitar a adesão microbiana.

Os substratos avaliados formaram biofilmes com diferenças observadas nas três variáveis. A hidroxiapatita apresenta maior biovolume total e biovolume verde, em ambos os períodos de indução. De forma contrária, a guta-percha alcançou valores menores nessas duas variáveis. Houve uma tendência de aumento do biovolume total e do biovolume verde para a guta-percha no período de 21 dias, porém só houve diferença significativa no percentual de cobertura do substrato. Os outros dois substratos analisados - dentina bovina e osso bovino - apresentaram, de modo geral, resultados intermediários.

O desenvolvimento in vitro de biofilmes possibilita a realização de estudos sobre atividade antimicrobiana de cimentos endodônticos, soluções irrigadoras e medicação intracanal sobre comunidades de micro-organismos, ao invés dos testes normalmente realizados com células planctônicas. Nesse contexto, a escolha do substrato deve considerar fatores envolvidos no estudo e implicações clínicas dos resultados. Deng et al (20) estudaram o feito do substrato sobre o pH e a susceptibilidade à clorexidina 0,2% de biofilmes de *S. mutans*. Os autores concluíram que a natureza do substrato afetou não apenas a atividade metabólica dos biofilmes, mas também a sua susceptibilidade ao agente antimicrobiano. Portenier et al (19) avaliaram a atividade antibacteriana de

clorexidina com e sem cetramida e do MTAD® contra duas cepas de *E. faecalis*, na presença ou ausência de dentina ou albumina sérica bovina. A presença de dentina, ou de albumina de soro bovino diminuiu consideravelmente a ação antibacteriana destas substâncias. Assim, pesquisas que comparam produtos empregados no sistema de canais radiculares devem, preferencialmente, utilizar a dentina como substrato.

Um dos fatores relacionados a maior resistência dos biofilmes é o seu estágio de desenvolvimento (24). Já foi demonstrado que os biofilmes apresentam resistência progressiva aos antibióticos a medida que se tornam maduros com resistência máxima na fase clímax de crescimento (30). Do mesmo modo já foi demonstrado um aumento da resistência do biofilme ao hipoclorito de sódio com o aumento da sua maturação (31). Os estudos utilizam períodos de indução bem diversificados. Desta forma, biofilme incubados por curtos períodos podem não representar um biofilme maduro. O presente estudo teve como objetivo não apenas verificar adesão microbiana e sim caracterizar biofilmes maduros. Desta forma, os biofilmes foram induzidos por períodos mais prolongados, como 14 e 21 dias. Já foi relatado que *E. faecalis* desenvolve um biofilme pouco estruturado nos primeiros dias (32).

O desenvolvimento de biofilmes também pode ser realizado in situ, isto é, diretamente na cavidade oral de pacientes com aparelhos ortodônticos removíveis contendo o substrato de interesse (18). Diante de condições ambientais bastante favoráveis, os micro-organismos formam um biofilme maduro em menor tempo. Por outro lado, nesse modelo de indução, o biofilme formado é polimicrobiano, dificultando o estudo de micro-organismo-alvo específico.

O desenvolvimento e aderência de biofilme não devem ocorrer pelo mesmo mecanismo em diferentes meios. As cepas provavelmente utilizam estratégias diferentes e expressam diferentes genes promotores de biofilmes dependendo dos recursos ambientais disponíveis. Estruturas de superfície, como por exemplo proteínas e outras organelas com propriedades adesivas bem como fatores que meramente contribuem para a hidrofobicidade/hidrofilicidade da superfície celular, podem ser expressadas muito diferentemente dependendo do meio de cultura e influenciar fortemente as propriedades de aderência da cepa (7). Já foi demonstrado que as condições ambientais nutritivas também apresentam influência no desenvolvimento de biofilme de *E. faecalis*. O biofilme formado com abundância nutricional apresenta morfologia regular, enquanto que o biofilme desenvolvido sob privação de nutrientes é irregular e escasso (10). Durante os dois períodos de indução no presente estudo, o meio de cultura foi trocado a cada 48 horas para fornecer constante fonte de nutrientes e para remover células bacterianas mortas.

Para identificação e caracterização dos biofilmes, várias metodologias têm sido aplicadas. A microscopia eletrônica de varredura (MEV) é bastante empregada para localização de micro-organismos no sistema de canais radiculares, no interior dos túbulos dentinários, na superfície externa do ápice radicular e região periapical (8, 33). No entanto, essa técnica limita-se a avaliar apenas a camada superficial de uma estrutura rica e complexa com a dos biofilmes. O microscópio confocal tornou-se uma das ferramentas com mais recursos nas pesquisas que envolvem o biofilme. Ele emite feixes de luz que se difundem através do biofilme, detectando sua estrutura e formando uma

sequência de imagens 2D. Toda imagem 2D pode ser sobreposta e fotos em 3D são produzidas. Marcadores fluorescentes podem ser adicionados para detectar e identificar micro-organismos, assim como podem ser usados para determinar aspectos bioquímicos, fisiológicos, físico-químicos do meio ao seu redor e diferenciar micro-organismos gram-positivos dos gram-negativos (34).

Após a aquisição das imagens, torna-se necessária a utilização de programas específicos para analisar parâmetros quantitativos da estrutura dos biofilmes. O BioImage_L é de fácil utilização, apresenta ferramentas com comandos simples e possibilita a obtenção de informações importantes sobre os biofilmes, como biovolume total, biovolume verde, biovolume vermelho, espessura média e percentual de cobertura do substrato. Pela identificação das tonalidades de cor, o programa processa independentemente as subpopulações de cor (verde e vermelho) caracterizando a viabilidade das células do biofilme (22).

A análise da proporção do volume de células viáveis vem sendo aplicada em estudos que avaliam a atividade de soluções irrigadoras sobre biofilme (14, 28). Ela consiste no cálculo da razão entre o volume das células vermelhas (mortas) sobre o volume total de células vermelhas e verdes (vivas). Entretanto, por se tratar de uma proporção, resultados semelhantes entre grupos podem representar realidades distintas quando o valor absoluto é analisado. No presente estudo, os dados absolutos referentes ao volume total e volume das células verdes foram usados por representam melhor a quantidade de células presentes no biofilme. Diante das inúmeras variáveis que envolvem as diversas pesquisas deve-se dar grande importância a seleção das condições

experimentais e das comparações de resultados obtidos nos diferentes estudos sobre biofilmes (7).

Uma vez que biofilmes de *E. faecalis* podem ser formados sobre os materiais obturadores como a guta-percha, os resultados desta pesquisa reforçam a importância dos procedimentos de limpeza e desinfecção realizados durante o preparo biomecânico. O profissional deve lançar mão de todas as ferramentas e estratégias disponíveis para propiciar a redução do número de micro-organismos remanescentes.

Considerando a metodologia empregada e os resultados obtidos pode ser concluído que: *E. faecalis* foi capaz de desenvolver biofilme em todos os substratos avaliados, tanto no período de 14 dias como no de 21 dias; a hidroxiapatita foi o substrato que apresentou os melhores resultados para o desenvolvimento de biofilme; o tipo de substrato influenciou nas características dos biofilmes de acordo com os parâmetros avaliados.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Luiz Chavez de Paz (*University of Connecticut Health Center*) por ter fornecido o programa BioImage_L para análise dos biofilmes. Ao Prof. Dr. José Mauro Granjeiro do Laboratório de Bioengenharia, Biomateriais e Mineralização Biológica da Universidade Federal Fluminense por ter fornecido os discos de hidroxiapatita.

REFERÊNCIAS

1. Cobankara FK, Altinoz HC, Ergani O, Kav K, Belli S. In vitro antibacterial activities of root-canal sealers by using two different methods. J Endod 2004;30:57-60.

2. Haapasalo M, Udnaes T, Endal U. Persistent, recurrent and acquired infection of the root canal system post-treatment. Endod Topics 2003;6:29-56.

3. Molander A, Reit C, Dahlen G, Kvist T. Microbiological status of root-filled teeth with apical periodontitis. Int Endod J 1998;31:1-7.

4. Peciuliene V, Balciuniene I, Eriksen HM, Haapasalo M. Isolation of Enterococcus faecalis in previously root-filled canals in a Lithuanian population. J Endod 2000;26:593-5.

5. Rocas IN, Jung IY, Lee CY, Siqueira JF, Jr. Polymerase chain reaction identification of microorganisms in previously root-filled teeth in a South Korean population. J Endod 2004;30:504-8.

6. Oliveira AC, Tanomaru JM, Faria-Junior N, Tanomaru-Filho M. Bacterial leakage in root canals filled with conventional and MTA-based sealers. Int Endod J 2011;44:370-5.

7. Hancock V, Witso IL, Klemm P. Biofilm formation as a function of adhesin, growth medium, substratum and strain type. Int J Med Microbiol 2011;301:570-6.

8. Leonardo MR, Rossi MA, Silva LA, Ito IY, Bonifacio KC. EM evaluation of bacterial biofilm and microorganisms on the apical external root surface of human teeth. J Endod 2002;28:815-8.

9. Nair PN. Pathogenesis of apical periodontitis and the causes of endodontic failures. Crit Rev Oral Biol Med 2004;15:348-81.

10. George S, Basrani B, Kishen A. Possibilities of gutta-percha-centered infection in endodontically treated teeth: an in vitro study. J Endod 2010;36:1241-4.

11. Senges C, Wrbas KT, Altenburger M, et al. Bacterial and Candida albicans Adhesion on Different Root Canal Filling Materials and Sealers. J Endod 2011;37:1247-52.

12. Takemura N, Noiri Y, Ehara A, Kawahara T, Noguchi N, Ebisu S. Single species biofilm-forming ability of root canal isolates on gutta-percha points. Eur J Oral Sci 2004;112:523-9.

13. Noiri Y, Ehara A, Kawahara T, Takemura N, Ebisu S. Participation of bacterial biofilms in refractory and chronic periapical periodontitis. J Endod 2002;28:679-83.

14. Pappen FG, Shen Y, Qian W, Leonardo MR, Giardino L, Haapasalo M. In vitro antibacterial action of Tetraclean, MTAD and five experimental irrigation solutions. Int Endod J 2010;43:528-35.

15. Brandle N, Zehnder M, Weiger R, Waltimo T. Impact of growth conditions on susceptibility of five microbial species to alkaline stress. J Endod 2008;34:579-82.

16. Shen Y, Stojicic S, Qian W, Olsen I, Haapasalo M. The synergistic antimicrobial effect by mechanical agitation and two chlorhexidine preparations on biofilm bacteria. J Endod 2010;36:100-4.

17. Del Carpio-Perochena AE, Bramante CM, Duarte MA, et al. Biofilm dissolution and cleaning ability of different irrigant solutions on intraorally infected dentin. J Endod 2011;37:1134-8.

18. Ordinola-Zapata R, Bramante CM, Cavenago B, et al. Antimicrobial effect of endodontic solutions used as final irrigants on a dentine biofilm model. Int Endod J 2012;45:162-8.

19. Portenier I, Waltimo T, Orstavik D, Haapasalo M. Killing of Enterococcus faecalis by MTAD and chlorhexidine digluconate with or without cetrimide in the presence or absence of dentine powder or BSA. J Endod 2006;32:138-41.

20. Deng DM, Buijs MJ, ten Cate JM. The effects of substratum on the pH response of Streptococcus mutans biofilms and on the susceptibility to 0.2% chlorhexidine. Eur J Oral Sci 2004;112:42-7.

21. Upadya MH, Kishen A. Influence of bacterial growth modes on the susceptibility to light-activated disinfection. Int Endod J 2010;43:978-87.

22. Chavez de Paz LE. Image analysis software based on color segmentation for characterization of viability and physiological activity of biofilms. Appl Environ Microbiol 2009;75:1734-9.

23. Kishen A, George S, Kumar R. Enterococcus faecalis-mediated biomineralized biofilm formation on root canal dentine in vitro. J Biomed Mater Res A 2006;77:406-15.

24. Norrington DW, Ruby J, Beck P, Eleazer PD. Observations of biofilm growth on human dentin and potential destruction after exposure to antibiotics. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2008;105:526-9.

25. Muller P, Guggenheim B, Schmidlin PR. Efficacy of gasiform ozone and photodynamic therapy on a multispecies oral biofilm in vitro. Eur J Oral Sci 2007;115:77-80.

26. Larsen T, Fiehn NE. Development of a flow method for susceptibility testing of oral biofilms in vitro. APMIS 1995;103:339-44.

27. Larsen T. Susceptibility of Porphyromonas gingivalis in biofilms to amoxicillin, doxycycline and metronidazole. Oral Microbiol Immunol 2002;17:267-71.

28. Shen Y, Qian W, Chung C, Olsen I, Haapasalo M. Evaluation of the effect of two chlorhexidine preparations on biofilm bacteria in vitro: a three-dimensional quantitative analysis. J Endod 2009;35:981-5.

29. Tanomaru JM, Pappen FG, Tanomaru Filho M, Spolidorio DM, Ito IY. In vitro antimicrobial activity of different gutta-percha points and calcium hydroxide pastes. Braz Oral Res 2007;21:35-9.

30. Sedlacek MJ, Walker C. Antibiotic resistance in an in vitro subgingival biofilm model. Oral Microbiol Immunol 2007;22:333-9.

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

32. Sun J, Song X. Assessment of antimicrobial susceptibility of Enterococcus faecalis isolated from chronic periodontitis in biofilm versus planktonic phase. J Periodontol 2011;82:626-31.

33. Sen BH, Piskin B, Demirci T. Observation of bacteria and fungi in infected root canals and dentinal tubules by SEM. Endod Dent Traumatol 1995;11:6-9.

34. Wimpenny J, Manz W, Szewzyk U. Heterogeneity in biofilms. FEMS Microbiol Rev 2000;24:661-71.

Capítulo 2

Avaliação da atividade antibiofilme, pH e solubilidade de cimentos endodônticos

RESUMO

Objetivo: Este estudo avaliou a atividade antibiofilme e antibacteriana contra *Enterococcus faecalis*, pH e solubilidade dos cimentos AH Plus (AHP), Sealer 26 (S26), Epiphany SE (ESE), Sealapex (SEA), Activ GP (AGP), MTA Fillapex (MTA-F) e o MTA Sealer (MTA-S). **Metodologia:** Para todos os testes, amostras dos cimentos foram preparadas em matrizes e ficaram armazenadas por 2 ou 7 dias até o momento do uso. A atividade antibacteriana foi verificada pelo teste de difusão em ágar (TDA) e por uma nova metodologia proposta, o teste de contato direto sobre biofilme (TCDB). Para o TCDB os cimentos foram colocados sobre o biofilme induzido por 14 dias em dentina bovina e permaneceram em contato por 5 h, 10 h ou 15 h. No grupo controle o biofilme não foi mantido em contato com nenhum cimento. A análise foi realizada a partir da contagem do número de unidades formadoras de colônia (UFC/mL) do biofilme remanescente. A solubilidade dos cimentos correspondeu ao percentual de perda de massa após 15 h de imersão em água destilada. O pH dos cimentos foi mensurado nos períodos de 5 h, 10 h e 15 h. A análise estatística foi realizada com nível de significância de 5%. **Resultados:** No TDA nenhum cimento apresentou halo de inibição contra *E. faecalis*. No grupo de 2 dias o TCDB mostrou que o SEA e o

MTA-F promoveram maior redução bacteriana nos 3 períodos avaliados em relação ao grupo controle ($p < 0,05$). Já no de 7 dias, o SEA foi o cimento mais eficaz com maior eliminação nos períodos de 10 h e 15 h. O SEA apresentou os maiores valores de pH, tanto nos grupos de 2 dias e 7 dias. Quanto à solubilidade, no grupo de 2 dias os maiores valores foram para o MTA-F, MTA-S, SEA e AGP ($p < 0,05$). Já no período de 7 dias, o MTA-S e o MTA-F apresentaram maior solubilidade que os demais ($p < 0,05$). **Conclusão:** Apenas os cimentos SEA e MTA-F reduzem de forma significativa a quantidade de bactérias do biofilme, apresentando maior solubilidade. A associação das propriedades solubilidade e pH podem estar relacionadas a atuação dos cimentos. O teste de contato direto sobre biofilme é um método confiável para avaliação da atividade sobre o biofilme de cimentos endodônticos após presa inicial.

Palavras-chave: atividade antibacteriana, pH, solubilidade, cimentos obturadores.

INTRODUÇÃO

Os micro-organismos e seus produtos são os principais fatores etiológicos das alterações pulpares e periapicais. A persistência de micro-organismos nos túbulos dentinários e no cemento apical após o tratamento endodôntico tem sido amplamente relatada (Nair *et al.* 2005, Nair 2006). Ainda, micro-organismos podem alcançar o sistema de canais radiculares mesmo quando a obturação é bem realizada (Oliveira *et al.* 2011). Desta forma, o emprego de materiais obturadores endodônticos com propriedades

antimicrobianas pode contribuir com a eliminação de micro-organismos remanescentes e/ou prevenção da recontaminação.

Vários métodos são utilizados na avaliação da atividade antimicrobiana dos cimentos obturadores (Saleh *et al.* 2004, Kayaoglu *et al.* 2005, Morgental *et al.* 2011). Dentre eles, o teste de difusão em ágar é o mais comumente aplicado (Cobankara *et al.* 2004, Bodrumlu & Semiz 2006, Nawal *et al.* 2011). Porém, apresenta limitações (Weiss *et al.* 1996), sendo influenciado pela solubilidade e difusão do material no meio (Nawal *et al.* 2011). Além disso, este método não é satisfatório para avaliar materiais insolúveis em água (Eldeniz *et al.* 2006).

Micro-organismos organizados em biofilmes apresentam maior resistência contra o sistema imunológico do hospedeiro e substâncias como antissépticos e antibióticos (Socransky & Haffajee 2002). Em dentes com necrose pulpar e lesão periapical, o biofilme pode estar presente não só nas paredes dentinárias, mas também na superfície externa apical radicular, em áreas de reabsorção cementária e dentinária e sua eliminação representa um desafio para o tratamento endodôntico (Leonardo *et al.* 2002, Nair 2004). Vários estudos têm sido realizados sobre a ação antibiofilme de diferentes soluções irrigadoras (Pappen *et al.* 2010). Contudo a ação direta de cimentos obturadores sobre essas comunidades de micro-organismos é pouco conhecida.

Enterococcus faecalis é frequentemente isolado em canais radiculares de dentes com lesão periapical persistente, apesar de ser raramente encontrado em casos de infecção endodôntica primária (Molander *et al.* 1998, Peciuliene *et al.* 2000, Haapasalo *et al.* 2003, Rocas *et al.* 2004). A dificuldade de eliminar tal

bactéria dos canais radiculares pode estar relacionada com sua grande capacidade de penetração nos túbulos dentinários além da sua maior resistência à ação de soluções e medicamentos que os demais micro-organismos presentes nas infecções endodônticas (Love 2001, Radcliffe *et al.* 2004).

Cimentos endodônticos que contêm hidróxido de cálcio em sua composição podem apresentar ação antibacteriana (Slutzky-Goldberg *et al.* 2008) em função de liberação de íons hidroxila e aumento do pH (Leonardo *et al.* 2000). Um pH maior que 9 pode inativar de modo irreversível ou não enzimas bacterianas resultando na perda de atividade biológica (Estrela *et al.* 1995).

Na busca de um cimento endodôntico com propriedades mais próximas das ideais, novos materiais são propostos. O sistema de obturação Epiphany/Resilon visa melhor adesão entre os materiais obturadores e as paredes dentinárias dos canais radiculares. Na sua segunda geração, o cimento denominado Epiphany SE é auto-condicionante (Oliveira *et al.* 2011). Materiais obturadores à base de Mineral Trióxido Agregado (MTA) têm sido desenvolvidos. Recentemente no mercado, o MTA Fillapex (Angelus, Londrina/PR, Brasil) apresenta na composição resina salicilato, resina diluente, resina natural, óxido de bismuto, sílica nanoparticulada, MTA e pigmentos. Um outro cimento à base de MTA, o MTA Sealer (MTA-S), está em fase de desenvolvimento, contendo cimento Portland, agente radiopacificador, aditivos e veículos, apresentando propriedades favoráveis para ser indicado como cimento obturador endodôntico (Massi *et al.* 2011). Porém, pouco se sabe sobre as propriedades antimicrobianas desses novos cimentos.

O objetivo deste estudo foi avaliar a atividade antibacteriana pelo método de difusão em ágar e por teste de contato direto sobre biofilme, além do pH e solubilidade de cimentos endodônticos.

MATERIAL E MÉTODO

Para os testes de atividade antibiofilme por contato direto, atividade antibacteriana por difusão em ágar, pH e solubilidade foram confeccionados discos a partir dos cimentos endodônticos com 7 mm de diâmetro interno e 1 mm de espessura. Após a confecção dos espécimes com cimento recém-manipulado, eles foram mantidos em estufa a 37 ± 1 °C em umidade por 2 ou 7 dias (período pós-manipulação).

A proporção pó-resina do cimento Sealer 26 foi utilizada conforme descrito em um outro estudo (Duarte *et al.* 2000), ou seja, 2,0g de pó para 1,1g de resina. Para o Activ GP foi utilizada a proporção recomendada pelo fabricante. O MTA-S foi manipulado na proporção de 5:3 (pó : líquido) em peso de acordo um estudo prévio (Massi *et al.* 2011). Para os demais cimentos, que se apresentam na forma de pasta/pasta, foram utilizados comprimentos iguais da pasta base e da pasta catalisadora.

ANÁLISE DA ATIVIDADE ANTIBIOFILME PELO MÉTODO DE CONTATO DIRETO

Incisivos centrais bovinos com raízes completamente formadas foram usados para obtenção do substrato para o desenvolvimento do biofilme. As raízes

foram seccionadas longitudinalmente em segmentos de 0,7 mm de espessura e a região do canal radicular foi planificada. Foram obtidas secções de blocos de dentina com dimensões de 5 mm x 5 mm x 0,7 mm (largura x comprimento x espessura). Todos os cortes foram realizados em disco diamantado em baixa velocidade (Isomet – Buehler, Lake Bluff, IL, EUA) com irrigação abundante. Os blocos colocados em um tudo de ensaio contendo água destilada foram levados a autoclave para esterilização a 121ºC por 20 min.

Os procedimentos microbiológicos e a manipulação dos blocos de dentina esterilizados foram realizados em câmara de fluxo laminar (Veco Flow Ltda., Campinas, SP, Brasil).Para a formação do biofilme foi empregada uma cepa padrão de *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212). Após confirmação da pureza da cepa, realizada pela coloração de Gram e morfologia da colônia, o micro-organismo foi reativado em 4,0 mL de caldo BHI estéril e mantido em estufa a 37ºC, durante 12 horas. Após este período a densidade óptica do meio foi medida em espectrofotômetro (Modelo 600 Plus, Femto, São Paulo, SP, Brasil) com comprimento de onda de 600 nm. A densidade celular foi de 3,2 x 10^7 unidades formadoras de colônia por mL (UFC/mL). Em seguida, uma alíquota equivalente a 1% do volume utilizado para contaminação dos espécimes foi adicionado ao meio de cultura estéril e homogeneizado.

Em uma placa de cultura celular de 24 poços foram dispensados 2,0 mL de meio BHI puro contendo 1% da suspensão bacteriana, deixando os blocos de dentina totalmente submersos. As placas foram colocadas em uma incubadora de bancada com agitação orbital (modelo Q816M20, Quimis Aparelhos Científicos Ltda., Diadema, SP, Brasil) em ambiente de microaerofilia a 37ºC durante 14 dias.

Para que não houvesse deficiência de nutrientes para as células bacterianas, o meio de cultura BHI de cada espécime foi totalmente trocado a cada 48 h, sem a adição de novos micro-organismos.

Transcorridos os períodos pós-manipulação, cada disco de cimento foi removido da matriz e colocado sobre um dos blocos de dentina contendo o biofilme formado, lavados previamente em solução salina para remoção de bactérias planctônicas. Os conjuntos formados pelos blocos de dentina com os discos de cimentos foram colocados em Placas de Petri. Sobre cada conjunto foram gotejados 20 µL de solução salina estéril para evitar o ressecamento dos mesmos. Os tempos de contato foram de 5 h, 10 h e 15 h e as placas foram mantidas em estufa a 37°C. Foram utilizados 4 discos para cada período pós-manipulação e para cada tempo de contato. Foi incluído um grupo controle onde o biofilme não entrou em contato com nenhum cimento, servindo de comparação para os resultados.

Decorridos os períodos de contato, os discos de cimentos foram removidos e os blocos de dentina com o biofilme remanescente, inclusive o grupo controle, foram individualmente colocados em tubos de ensaio contendo 1 mL de solução salina estéril e pérolas de vidro. Os tubos foram agitados em vortex (modelo Q220, Quimis Aparelhos Científicos Ltda., Diadema, SP, Brasil) por 1 min para suspensão dos micro-organismos.

Em seguida, foi realizada a diluição decimal seriada da suspensão de *E. faecalis* obtida. Ao final das diluições, três alíquotas de 20 µL de cada uma das suspensões foram distribuídas em placas de Petri contendo o meio de cultura *m*-

Enterococcus Ágar (Difco Laboratories-Becton Dickinsonand Company - USA). As placas foram incubadas a 37ºC por 48 h.

A leitura dos resultados de cada placa de cultura resultou da média do número de UFC/mL das três áreas de crescimento bacteriano, na diluição onde havia em cada área um número de colônias entre 5 e 50. A partir destas médias foi calculado o número de UFC/mL após cada um dos tempos de contato entre os discos de cimentos obturadores e o biofilme desenvolvido nos blocos de dentina. Os dados foram submetidos à transformação logarítmica e o resultado de cada grupo foi calculado a partir da média dos seus quatro espécimes.

ATIVIDADE ANTIBACTERIANA PELO MÉTODO DE DIFUSÃO EM ÁGAR

A avaliação da atividade antibacteriana foi realizada pela técnica de difusão em ágar contra *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212). O inóculo foi obtido pela semeadura da cepa indicadora em caldo BHI e incubação a 37°C por 12 horas.

Os testes foram realizados em triplicata em placas com camada dupla, ou seja, com camada base e camada “seed” do meio de cultura. A camada base foi obtida com 12 mL de meio de cultura esterilizado e resfriado até cerca de 50°C em placas de Petri de 15 x 150 mm esterilizadas. Após solidificação, foram adicionados 8 mL de camada “seed”, que foi obtida pela adição de inóculo na concentração final de 10^6 UFC/mL de meio de cultura resfriado até cerca de 50°C.

Após solidificação da camada “seed”, discos de 5 mm de diâmetro dos cimentos obturadores foram posicionados a cerca de 15 mm das bordas das placas e em pontos equidistantes. Os discos foram preparos como já descrito anteriormente e permaneceram em estufa a 37ºC até o momento do uso. Os cimentos foram testados após 2 e 7 dias da manipulação. Foi utilizado como controle positivo um disco de papel com solução de clorexidina 2%.

As placas com os discos já posicionados foram mantidas à temperatura ambiente por duas horas, para pré-difusão do material, e depois incubadas a 37ºC por 24 h. Decorrido o período de incubação, foram adicionadas alíquotas de 5 ml de gel de TTC preparado com ágar (Difco) a 1,0% com 0,05% de cloreto de trifenil-tetrazólico (Merck KgaA, Darmstadt, Germany) para coloração das células viáveis e otimização da leitura do halo de inibição. Após a solidificação, as amostras foram incubadas a 37°C por 30 minutos.

As imagens das placas bem iluminadas e com fundo na cor azul, contrastando com a coloração rósea do crescimento microbiano após o uso do gel de TTC foram digitalizadas e o diâmetro dos halos de inibição formados ao redor dos discos foram mensurados com o auxílio do programa *Image Tool* (UTHSCSA *Image Tool for Windows v. 3.00*). O resultado de cada grupo consistiu na média de três halos de inibição.

AVALIAÇÃO DO PH

Para o teste de pH novamente foram preparos discos dos cimentos obturadores de 7 mm de diâmetro, os quais permaneceram em estufa a 37ºC até

o momento do uso. Os cimentos foram avaliados após 2 e 7 dias da manipulação. A amostra constou de 5 discos de cada material em cada período pós-manipulação.

Transcorrido o tempo determinado, os discos foram imersos em frascos plásticos contendo 10 ml de água deionizada (DG500UF - Gehaka, Brasil) cujo pH foi aferido previamente (6,5). Os frascos foram fechados e mantidos em uma estufa a 37ºC. As mensurações de pH foram realizadas após 5 h, 10 h e 15 h da imersão dos discos com o pHmetro Digimed (Digimed, Brasil) previamente calibrado. Após cada mensuração, que foi feita em triplicata, a média do pH de cada grupo em cada período experimental foi calculada.

SOLUBILIDADE

Os discos de cimentos obturadores para este teste foram confeccionados de modo semelhante ao já descrito. A única mudança consistiu na colocação de uma das extremidades de um pedaço de 5 cm de fio dental no cimento durante a inserção do material no orifício da matriz.

Decorridos os períodos pós-manipulação, as amostras foram removidas da matriz e após a remoção dos resíduos ou partículas soltas, foram colocadas em um dessecador com sílica. Após uma hora, os discos juntamente com o fio dental foram pesados em balança de precisão modelo Adventurer^{TM} (Ohaus Corp. USA, USA) para a obtenção da massa inicial.

Realizada essa etapa, cada uma das amostras foi suspensa pelo fio dental e colocada no interior de um recipiente plástico contendo 10 mL de água

deionizada, tomando-se o cuidado de não permitir qualquer contato entre a amostra e a superfície interna do recipiente. As amostras, assim preparadas, foram levadas para o interior de uma estufa a 37ºC, permanecendo por 15 h.

Após esse período, os cimentos foram retirados dos recipientes e enxaguados com água destilada e deionizada. O excesso de água foi removido com auxílio de papel absorvente. Realizada esta etapa, as amostras foram colocadas em um dessecador com sílica por 24 h e, posteriormente, nova pesagem foi realizada para obtenção da massa final. A estabilização da massa de cada amostra foi constatada após um novo ciclo de 24 h no dessecador com sílica.

Foram utilizados 5 discos de cada cimento para cada um dos dois períodos pós-manipulação. A solubilidade dos cimentos correspondeu à perda de massa identificada pelo peso de cada amostra, expressa como porcentagem da massa original.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada utilizando-se o programa *GraphPad Prism v. 5.0 for Macintosh* (*GraphPad Software*, San Diego, California, EUA), considerando $p < 0,05$ significativo. A escolha do teste mais apropriado para cada situação foi baseada: nos resultados do teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov e de homogeneidade de variâncias de Bartlett; na classificação das variáveis do estudo; e no emparelhamento ou não dos dados.

Para analisar os resultados do teste de contato direto sobre biofilme foram empregados os testes de Kruskal-Wallis e de Dunn, tanto para comparar os cimentos ou grupo controle em um mesmo tempo de contato (5 h, 10 h ou 15 h), bem como os tempo de contato para cada cimento ou grupo controle. Os resultados da atividade antibacteriana pelo teste de difusão em ágar não foram avaliados estatisticamente.

Na avaliação do pH, as comparações entre os cimentos dentro de um mesmo período (5 h, 10 h ou 15 h) foram realizadas pelos testes Kruskal-Wallis e Dunn. Para as comparações entre os períodos (5 h, 10 h e 15 h) para cada cimento foram empregados os testes Friedman e Dunn.

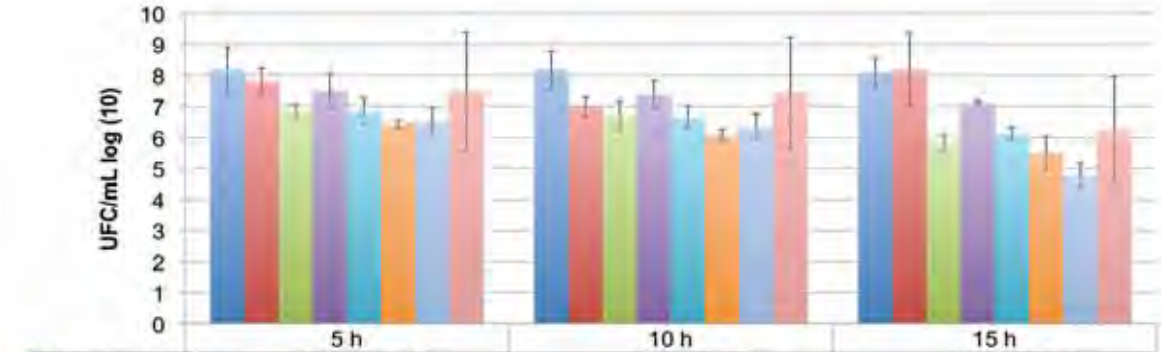
No teste de solubilidade, a análise estatística foi realizada com os testes ANOVA e T2 de Tamhane para comparar os cimentos em cada período. Essa análise foi realizada no programa SPSS v. 20 *for Macintosh* (IBM Corp., Armonk, New York, EUA).

RESULTADOS

AÇÃO ANTIBIOFILME POR CONTATO DIRETO

A Figura 1 exibe as médias em logaritmo das UFC/mL após 5h, 10h ou 15h de contato entre os cimentos que tomaram presa por 2 dias e os biofilmes. Na comparação entre os materiais, Sealapex e MTA Fillapex promoveram maior redução de *E. faecalis* que os demais materiais nos 3 períodos avaliados, em

relação ao grupo controle ($p < 0,05$). No tempo de contato de 15 h, o MTA Sealer apresentou menor quantidade de UFC/mL do que o grupo controle ($p < 0,05$). O Sealapex e o MTA Fillapex apresentaram diferença entre os períodos, com maior redução microbiana para 15 h em relação ao período de 5h ($p < 0,05$). Em nenhum caso houve eliminação do biofilme.

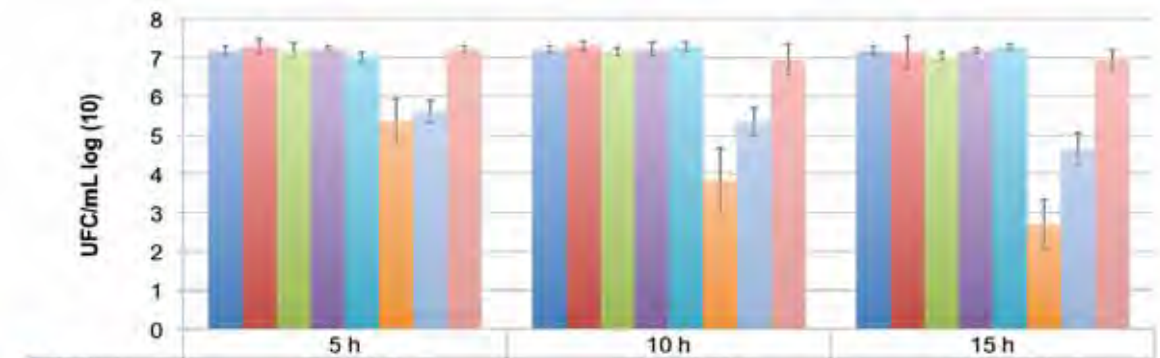


	5 h	10 h	15 h
Controle	8,1543 A, a	8,1613 A, a	8,1032 A, a
AH Plus	7,8000 A, a, b	6,9882 A, a, b	8,1680 A, a, b
Activ GP	6,8314 A, a, b	6,6938 A, a, b	5,8295 A, a, b, c
Epiphany SE	7,5091 A, a, b	7,3848 A, a, b	7,1171 A, a, b, c
Selaer 26	6,8196 A, a, b	6,6535 A, a, b	6,1201 A, a, b, c
Sealapex	6,4270 A, b	6,0553 A, B, b	5,4945 B, b, c
MTA Fillapex	6,5161 A, b	6,3539 A, B, b	4,7971 B, c
MTA-S	7,4927 A, a, b	7,4374 A, a, b	6,2381 A, b, c

Figura 1. Média do Log (10) do número de UFC/mL após cada um dos tempos de contato para os cimentos com dois dias pós-manipulação. Letras maiúsculas diferentes representam diferença estatística significativa ($p < 0,05$) entre os tempos de contato para cada cimento ou grupo controle. Letras minúsculas diferentes representam diferença estatística significativa ($p < 0,05$) entre os cimentos ou grupo controle em cada tempo de contato.

Os resultados obtidos no teste antibiofilme por contato direto no grupo que os cimentos tomaram presa por 7 dias estão expressos na Figura 2. No período de contato de 5 h não houve diferença significativa entre os grupos ($p > 0,05$). Nos períodos de 10 h e 15 h, o cimento Sealapex apresentou menor contagem de UFC/mL do que o grupo controle e os cimentos AH Plus e Sealer 26 ($p < 0,05$). Para o Sealapex, houve uma redução significativa das UFC/mL entre os tempos de contato de 5 h e 15 h ($p < 0,05$). Para os demais grupos não houve

redução significativa das UFC/mL. Em nenhum caso houve eliminação do biofilme.



	5 h	10 h	15 h
Controle	7,1900 A, a	7,2155 A, a	7,1832 A, a
AH Plus	7,2842 A, a	7,2981 A, a	7,1329 A, a
Activ GP	7,1878 A, a	7,1520 A, a, b	7,0312 A, a, b
Epiphany SE	7,2351 A, a	7,2187 A, a, b	7,1864 A, a, b
Selaer 26	7,0146 A, a	7,2825 A, a	7,2593 A, a
Sealapex	5,3586 A, a	3,8272 A, B, b	2,7141 B, b
MTA Fillapex	5,6121 A, a	5,3445 A, a, b	4,6487 A, a, b
MTA-S	7,2196 A, a	6,9401 A, a, b	6,9423 A, a, b

Figura 2. Média do Log (10) do número de UFC/mL após cada um dos tempos de contato para os cimentos com sete dias pós-manipulação. Letras maiúsculas diferentes representam diferença estatística significativa ($p < 0,05$) entre os tempos de contato para cada cimento ou grupo controle. Letras minúsculas diferentes representam diferença estatística significativa ($p < 0,05$) entre os cimentos ou grupo controle em cada tempo de contato.

Difusão em ágar

Os resultados das médias dos halos de inibição do teste de difusão em ágar estão expressos na Tabela 1. Apenas a clorexidina (grupo controle) formou halo contra *E. faecalis*.

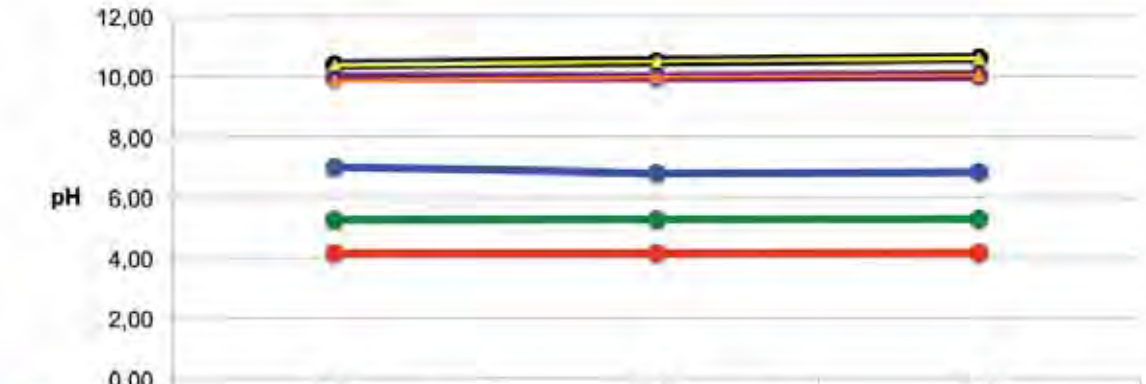
Tabela 1. Médias dos halos de inibição nos períodos de 2 e 7 dias.

Grupo	2 dias	7 dias
AH Plus	0,0	0,0
Activ GP	0,0	0,0
Epiphany SE	0,0	0,0
Sealer 26	0,0	0,0
Sealapex	0,0	0,0
MTA Fillapex	0,0	0,0
MTA Sealer	0,0	0,0
Clorexidina	15,0	14,3

pH

Os valores do pH dos cimentos com dois dias pós-manipulação estão representados na Figura 3. Os cimentos Sealapex, MTA Fillapex e MTA Sealer apresentaram aumento significativo ($p < 0,05$) do pH do período 5 h para 15 h. Nos três períodos, os maiores valores de pH foram obtidos pelos cimentos Sealapex e MTA Sealer, sempre com diferença significativa ($p < 0,05$) para os cimentos Epiphany SE e Activ GP.

A Figura 4 exibe os valores de pH dos cimentos com 7 dias pós-manipulação. Os cimentos AH Plus, Sealapex e MTA Sealer apresentaram aumento significativo ($p < 0,05$) do período 5 h para 15 h. Nos três períodos, os maiores valores de pH foram obtidos pelos cimentos Sealapex e MTA Fillapex, sempre com diferença significativa ($p < 0,05$) para os cimentos Epiphany SE e Activ GP.



	5 h	10 h	15 h
AH Plus	7,00 A, a, b, c	6,80 A, a, b	6,84 A, a, b
Activ GP	4,16 A, c	4,16 A, b	4,18 A, b
Epiphany SE	5,25 A, b, c	5,27 A, b	5,29 A, b
Sealer 26	9,99 A, a, b	9,99 A, a, b	10,04 A, a, b
Sealapex	10,40 A, a	10,52 A, B, a	10,62 B, a
MTA Fillapex	9,86 A, a, b, c	9,98 A, B, a, b	10,06 B, a, b
MTA Sealer	10,38 A, a	10,50 A, B, a	10,61 B, a

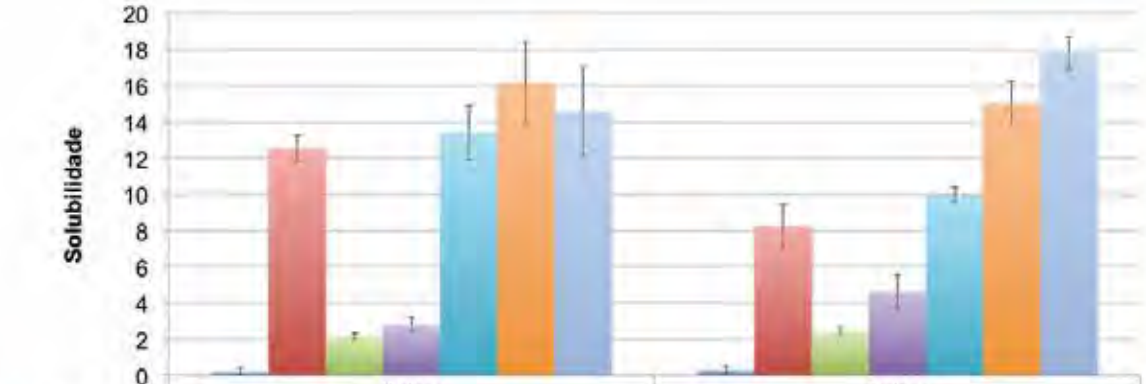
Figura 3. pH médio em cada período de avaliação para os cimentos com dois dias pós-manipulação. Letras maiúsculas diferentes representam diferença significativa ($p < 0,05$) entre os períodos para cada cimento. Letras minúsculas diferentes representam diferença estatística significativa ($p < 0,05$) entre os cimentos em cada período.

	5 h	10 h	15 h
AH Plus	7,00 A, b, c	7,08 A, B, b, c	7,34 B, b, c
Activ GP	5,49 A, c	5,46 A, B, c	5,23 B, c
Epiphany SE	5,59 A, c	5,68 A, c	5,72 A, c
Sealer 26	8,43 A, a, b, c	8,49 A, a, b, c	8,67 A, a, b, c
Sealapex	10,80 A, a	10,96 A, B, a	11,20 B, a
MTA Fillapex	9,97 A, a, b	10,08 A, a, b	10,08 A, a, b
MTA Sealer	8,93 A, a, b, c	9,04 A, B, a, b, c	9,29 B, a, b

Figura 4. pH médio em cada período de avaliação para os cimentos com sete dias pós-manipulação. Letras maiúsculas diferentes representam diferença significativa ($p < 0,05$) entre os períodos para cada cimento. Letras minúsculas diferentes representam diferença estatística significativa ($p < 0,05$) entre os cimentos em cada período.

Solubilidade

A solubilidade dos cimentos com dois e sete dias pós-manipulação está ilustrada na Figura 5. O cimento AH Plus apresentou a menor solubilidade para os dois tempos pós-manipulação ($p < 0,05$). Para os cimentos com 2 dias pós-manipulação os maiores valores encontrados foram para o MTA Fillapex, MTA Sealer, Sealapex e Activ GP ($p < 0,05$). Já no período de 7 dias, os cimentos MTA Sealer e MTA Fillapex apresentaram maior solubilidade que os demais ($p < 0,05$).



	2 dias	7 dias
AH Plus	0,23 a	0,32 a
Activ GP	12,54 c	8,26 c
Epiphany SE	2,16 b	2,45 b
Selaer 26	2,80 b	4,63 b
Sealapex	13,42 c	9,97 c
MTA Fillapex	16,15 c	15,03 d
MTA Sealer	14,57 c	17,79 d

Figura 5. Solubilidade média para os cimentos com dois dias e sete dias pós-manipulação. Letras minúsculas diferentes representam diferença estatística significativa ($p < 0,05$) entre os cimentos dentro de um mesmo período pós-manipulação.

Discussão

No teste de difusão em ágar, nenhum cimento avaliado foi capaz de inibir o crescimento de *E. faecalis* em ambos os períodos. A alta resistência dessa bactéria contra cimentos obturadores tem sido relatada para esse mesmo teste

(Gomes *et al.* 2004, Miyagak *et al.* 2006). Investigações prévias relataram que o tempo de presa inicial dos cimentos avaliados é de até 24 h (Resende *et al.* 2009, Garrido *et al.* 2010, Flores *et al.* 2011, Massi *et al.* 2011). Como o teste de difusão em ágar depende diretamente da difusão do material no meio, a ação dos cimentos pode diminuir pela sua utilização após dois e sete dias da manipulação. A vantagem do método de difusão em Agar é a possibilidade de comparação direta de cimentos contra os micro-organismos avaliados (Gomes *et al.* 2004). Além disso, é um método satisfatório para avaliar a atividade de cimentos recém-manipulados (Morgental *et al.* 2011). Por outro lado, devido suas desvantagens previamente relatadas, esta metodologia vem sendo utilizada como complementar a outros testes antimicrobianos.

Na tentativa de superar as limitações do teste de difusão em ágar, o teste de contato direto vem sendo aplicado (Weiss *et al.* 1996, Eldeniz *et al.* 2006). Todavia, em ambas metodologias os cimentos são avaliados contra bactérias na forma planctônica. Diante da importância dos biofilmes na patologia periapical, torna-se importante avaliar se os cimentos obturadores apresentam algum efeito sobre essa forma de organização dos micro-organismos. A nova metodologia utilizada visa a avaliação da atividade por teste de contato direto sobre biofilme. O teste é realizado por contato direto dos cimentos após presa.

E. faecalis é um micro-organismo anaeróbio facultativo, gram positivo, com capacidade de se estabelecer e sobreviver em cultura isolada. Diversos estudos têm demonstrado a maior resistência do *E. faecalis* a agentes antibacterianos como soluções irrigadoras e medicação intracanal (Evans *et al.* 2002, Radcliffe *et al.* 2004). A persistência desta bactéria casos de insucesso do

tratamento endodôntico demonstra a sua importância na terapêutica endodôntica (Evans *et al.* 2002). Deste modo, a complexa morfologia e fisiologia do biofilme aliada a sua maior resistência aos agentes antibacterianos justificam seu uso como modelo in vitro para avaliação de atuação de materiais obturadores.

Um fator envolvido no processo de resistência dessa bactéria é a sua capacidade de sobreviver em ambiente altamente alcalino (Evans *et al.* 2002). Quatro dos cimentos avaliados - Sealer 26, Sealapex, MTA Fillapex e MTA Sealer proporcionam aumento significativo do pH, sem contudo eliminar as bactéria do biofilme. Apenas os cimentos Sealapex e MTA Fillapex reduziram de forma significativa a quantidade de UFC/mL do período de 5 h para o de 15 h.

No teste de atividade antibiofilme por contato direto, o AH Plus não foi capaz de reduzir de forma significativa a quantidade de UFC/mL nos períodos de contato avaliados. A ineficácia do AH Plus frente a esse micro-organismo já foi relatada (Gomes *et al.* 2004, Miyagak *et al.* 2006). Esse fato pode ser relacionado ao pH neutro e baixa solubilidade observados neste estudo para o material. Utilizando metodologias diferentes, outros estudos relataram atividade do AH Plus contra *E. faecalis* quando o mesmo foi empregado logo após a manipulação (Cobankara *et al.* 2004, Zhang *et al.* 2009).

O sistema de obturação Activ GP consiste em cimento à base de ionômero de vidro e cones de guta-percha revestidos por ionômero de vidro. O cimento apresenta tempo de presa de 15 min e é pouco radiopaco (Tanomaru-Filho *et al.* 2008, Flores *et al.* 2011). No presente estudo apresentou alta solubilidade tanto no período de dois dias quanto no de sete dias - 12,54% e

8,26%, respectivamente. Resultado semelhante foi observado (Flores *et al.* 2011) apontando que o cimento ficou acimado valor máximo de 3% recomendado pela especificação nº 57 da ANSI/ADA.O Activ GP apresentou pH baixo em todos os períodos avaliados. Tem sido demonstrado que os cimentos com ionômero de vidro apresentam pH ácido (Cinar *et al.* 2009).

O Epiphany SE apresentou valores baixos de pH, sendo pouco solúvel. Demonstrou pequena atuação antibiofilme de *E. faecalis*. A ineficácia do Epiphany SE contra *E. Faecalis* na forma planctônica já foi demonstrada por meio de teste de contato direto (Slutzky-Goldberg *et al.* 2008).

O Sealer 26 é um cimento endodôntico à base de resina epóxica. A presença de hidróxido de cálcio em sua composição possibilita a liberação de íons cálcio, além de manter o meio alcalino por longos períodos (Duarte *et al.* 2000). No presente estudo, o Sealer 26 apresentou pH elevado no período de dois dias e sofreu uma leve redução no período de sete dias. No entanto, essa propriedade não foi suficiente para proporcionar ao cimento efeito contra biofilme de *E. faecalis*.

O cimento MTA-S ainda está em fase de desenvolvimento, sendo relatado para o mesmo tempo de presa inicial de 535 min e final de 982 min; pH variando entre 7,90 e 9,83; e liberação de íons cálcio maior que o cimento Portland, o MTA e o AH Plus (Massi *et al.* 2011). Em outro estudo, o MTA-S, além de outros cimentos avaliados não impediram a infiltração de *E. faecalis* em obturações de canais radiculares realizadas guta-percha pela técnica da condensação lateral ativa (Oliveira *et al.* 2011). No presente estudo, apesar do pH

elevado proporcionado pelo MTA-S, ele não foi capaz de reduzir de forma significativa a quantidade de bactérias do biofilme.

Dos sete cimentos avaliados, apenas dois, Sealapex e MTA Fillapex apresentaram atividade antibiofilme de *E. faecalis*. Em outro estudo (Morgental *et al.* 2011), a atividade antibacteriana do MTA Fillapex frente ao *E. faecalis* foi demonstrada pelo teste de difusão em ágar (cimento fresco) e por um método de contato direto (cimento sete dias pós-manipulação). O MTA Fillapex fresco produziu uma zona de inibição de média 7,32 mm, sem atuação no teste de contato direto. Já no presente estudo, o MTA Fillapex mostrou atividade mesmo após sete dias da manipulação, sendo utilizado um maior tempo de contato com o material. O Sealapex é um cimento endodôntico com reconhecida atividade antimicrobiana tanto no período pós manipulação quanto dias após sua presa (Zhang *et al.* 2009). O seu desempenho é atribuído, em parte, a sua capacidade de manter o pH do meio adjacente elevado por longos períodos (Duarte *et al.* 2000).

Em nenhum caso o biofilme foi totalmente eliminado. Desta forma, podemos considerar como ação secundária do material obturador a capacidade de contribuir para a eliminação de uma parte de micro-organismos que possam ter sido mantidos após procedimentos técnicos de limpeza e desinfecção.

CONCLUSÕES

Baseado na metodologia empregada observamos que somente os cimentos Sealapex e MTA Fillapex reduzem de forma significativa a quantidade de bactérias do biofilme, apresentando também solubilidade elevada. Os cimentos obturadores avaliados não são capazes de eliminar biofilme de *E. faecalis.* As propriedades solubilidade e pH podem estar relacionadas aos resultados obtidos. A atividade antibiofilme por teste de contato direto é um método confiável para avaliar a atividade antibiofilme de cimentos endodônticos pós-presa inicial.

AGRADECIMENTOS

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP 07/08563-3) pelo apoio financeiro para a realização desta pesquisa.

REFERÊNCIAS

Bodrumlu E, Semiz M (2006) Antibacterial activity of a new endodontic sealer against Enterococcus faecalis. *Journal - Canadian Dental Association* **72,** 637a-637c.

Cinar C, Ulusu T, Ozcelik B, Karamuftuoglu N, Yucel H (2009) Antibacterial effect of silver-zeolite containing root-canal filling material. *Journal of biomedical materials research. Part B, applied biomaterials* **90,** 592-595.

Cobankara FK, Altinoz HC, Ergani O, Kav K, Belli S (2004) In vitro antibacterial activities of root-canal sealers by using two different methods. *Jounal of Endodontics* **30,** 57-60.

Duarte MA, Demarchi AC, Giaxa MH, Kuga MC, Fraga SC, de Souza LC (2000) Evaluation of pH and calcium ion release of three root canal sealers. *Jounal of Endodontics* **26,** 389-390.

Eldeniz AU, Hadimli HH, Ataoglu H, Orstavik D (2006) Antibacterial effect of selected root-end filling materials. *Jounal of Endodontics* **32,** 345-349.

Estrela C, Sydney GB, Bammann LL, Felippe Junior O (1995) Mechanism of action of calcium and hydroxyl ions of calcium hydroxide on tissue and bacteria. *Brazilian Dental Journal* **6,** 85-90.

Evans M, Davies JK, Sundqvist G, Figdor D (2002) Mechanisms involved in the resistance of Enterococcus faecalis to calcium hydroxide. *International Endodontic Journal* **35,** 221-228.

Flores DS, Rached FJ, Jr., Versiani MA, Guedes DF, Sousa-Neto MD, Pecora JD (2011) Evaluation of physicochemical properties of four root canal sealers. *International Endodontic Journal* **44,** 126-135.

Garrido AD, Lia RC, Franca SC, da Silva JF, Astolfi-Filho S, Sousa-Neto MD (2010) Laboratory evaluation of the physicochemical properties of a new root canal sealer based on Copaifera multijuga oil-resin. *International Endodontic Journal* **43,** 283-291.

Gomes BP, Pedroso JA, Jacinto RC et al. (2004) In vitro evaluation of the antimicrobial activity of five root canal sealers. *Brazilian Dental Journal* **15,** 30-35.

Haapasalo M, Udnaes T, Endal U (2003) Persistent, recurrent and acquired infection of the root canal system post-treatment. *Endodontic Topics* **6,** 29-56.

Kayaoglu G, Erten H, Alacam T, Orstavik D (2005) Short-term antibacterial activity of root canal sealers towards Enterococcus faecalis. *International Endodontic Journal* **38,** 483-488.

Leonardo MR, da Silva LA, Tanomaru Filho M, Bonifacio KC, Ito IY (2000) In vitro evaluation of antimicrobial activity of sealers and pastes used in endodontics. *Journal of Endodontics* **26,** 391-394.

Leonardo MR, Rossi MA, Silva LA, Ito IY, Bonifacio KC (2002) EM evaluation of bacterial biofilm and microorganisms on the apical external root surface of human teeth. *Journal of Endodontics* **28,** 815-818.

Love RM (2001) Enterococcus faecalis--a mechanism for its role in endodontic failure. *International Endodontic Journal* **34,** 399-405.

Massi S, Tanomaru-Filho M, Silva GF et al. (2011) pH, Calcium Ion Release, and Setting Time of an Experimental Mineral Trioxide Aggregate-based Root Canal Sealer. *Journal of Endodontics* **37,** 844-846.

Miyagak DC, de Carvalho EM, Robazza CR, Chavasco JK, Levorato GL (2006) In vitro evaluation of the antimicrobial activity of endodontic sealers. *Brazilian Oral Research* **20,** 303-306.

Molander A, Reit C, Dahlen G, Kvist T (1998) Microbiological status of root-filled teeth with apical periodontitis. *International Endodontic Journal J* **31,** 1-7.

Morgental RD, Vier-Pelisser FV, Oliveira SD, Antunes FC, Cogo DM, Kopper PM (2011) Antibacterial activity of two MTA-based root canal sealers. *International Endodontic Journal* **44,** 1128-1133.

Nair PN (2004) Pathogenesis of apical periodontitis and the causes of endodontic failures. *Critical reviews in oral biology and medicine* **15,** 348-381.

Nair PN (2006) On the causes of persistent apical periodontitis: a review. *International Endodontic Journal* **39,** 249-281.

Nair PN, Henry S, Cano V, Vera J (2005) Microbial status of apical root canal system of human mandibular first molars with primary apical periodontitis after "one-visit" endodontic treatment. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology and endodontics* **99,** 231-252.

Nawal RR, Parande M, Sehgal R, Naik A, Rao NR (2011) A comparative evaluation of antimicrobial efficacy and flow properties for Epiphany, Guttaflow and AH-Plus sealer. *International Endodontic Journal* **44,** 307-313.

Oliveira AC, Tanomaru JM, Faria-Junior N, Tanomaru-Filho M (2011) Bacterial leakage in root canals filled with conventional and MTA-based sealers. *International Endodontic Journal* **44,** 370-375.

Pappen FG, Shen Y, Qian W, Leonardo MR, Giardino L, Haapasalo M (2010) In vitro antibacterial action of Tetraclean, MTAD and five experimental irrigation solutions. *International Endodontic Journal* **43,** 528-535.

Peciuliene V, Balciuniene I, Eriksen HM, Haapasalo M (2000) Isolation of Enterococcus faecalis in previously root-filled canals in a Lithuanian population. *Journal of Endodontics* **26,** 593-595.

Radcliffe CE, Potouridou L, Qureshi R et al. (2004) Antimicrobial activity of varying concentrations of sodium hypochlorite on the endodontic microorganisms Actinomyces israelii, A. naeslundii, Candida albicans and Enterococcus faecalis. *International Endodontic Journal* **37,** 438-446.

Resende LM, Rached-Junior FJ, Versiani MA et al. (2009) A comparative study of physicochemical properties of AH Plus, Epiphany, and Epiphany SE root canal sealers. *International Endodontic Journal* **42,** 785-793.

Rocas IN, Jung IY, Lee CY, Siqueira JF, Jr. (2004) Polymerase chain reaction identification of microorganisms in previously root-filled teeth in a South Korean population. *Journal of Endodontics* **30,** 504-508.

Saleh IM, Ruyter IE, Haapasalo M, Orstavik D (2004) Survival of Enterococcus faecalis in infected dentinal tubules after root canal filling with different root canal sealers in vitro. *International Endodontic Journal* **37,** 193-198.

Slutzky-Goldberg I, Slutzky H, Solomonov M, Moshonov J, Weiss EI, Matalon S (2008) Antibacterial properties of four endodontic sealers. *Journal of Endodontics* **34,** 735-738.

Socransky SS, Haffajee AD (2002) Dental biofilms: difficult therapeutic targets. *Periodontology 2000* **28,** 12-55.

Tanomaru-Filho M, Jorge EG, Tanomaru JM, Goncalves M (2008) Evaluation of the radiopacity of calcium hydroxide- and glass-ionomer-based root canal sealers. *International Endodontic Journal* **41,** 50-53.

Weiss EI, Shalhav M, Fuss Z (1996) Assessment of antibacterial activity of endodontic sealers by a direct contact test. *Endodontics and dental traumatology* **12,** 179-184.

Zhang H, Shen Y, Ruse ND, Haapasalo M (2009) Antibacterial activity of endodontic sealers by modified direct contact test against Enterococcus faecalis. *Journal of Endodontics* **35,** 1051-1055.

Considerações finais

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O primeiro capítulo desta tese avaliou a indução de biofilme de *E. faecalis* sobre dentina bovina, guta-percha, hidroxiapatita e osso bovino. A escolha do substrato é um dos pontos mais importantes no delineamento de estudo com desenvolvimento de biofilmes. Características inerentes ao substrato afetam não apenas a atividade metabólica dos biofilmes, mas também a sua susceptibilidade a agentes antimicrobianos[8]. No presente estudo, apesar dos resultados obtidos apontarem para uma maior quantidade de bactérias nos grupos da hidroxiapatita, a dentina pode ser considerada como o substrato padrão para os estudos em Endodontia.

Para melhorar a qualidade dos biofilmes produzidos em dentina, modificações na metodologia devem ser avaliadas com o intuito de aumentar a quantidade de células bacterianas e o grau de cobertura do substrato. Vários modelos experimentais são utilizados para desenvolver biofilme. Assim como em outros estudos[42, 43], nos dois capítulos desta tese o método consistiu na colocação dos substratos individualmente em poços de placas de cultura celular contendo meio de cultura juntamente com o(s) micro-organismo(s) de interesse. Por não haver circulação contínua do meio de cultura, esse método de indução é conhecido como estático. Por outro lado, no método de desenvolvimento de biofilme com fluxo dinâmico, o meio de cultura circula continuamente sobre o substrato. Isso ocorre devido à utilização de dispositivos denominados de biorreatores. Um biorreator simula condições microbiológicas da cavidade oral e

permite o estudo da formação de biofilmes em diferentes substratos, bem como avaliar estratégias para modular ou influenciar a formação de biofilme de micro-organismos em culturas simples ou mistas[1]. Portanto, o uso de biorreatores é um ponto a ser considerado em investigações futuras.

Um importante fator de virulência do *E. faecalis* é a sua capacidade de formar biofilmes. A maioria dos estudos sobre formação de biofilmes utiliza monoculturas de *E. faecalis*. Diante da natureza polimicrobiana das infecções de canais radiculares, torna-se importante entender a formação de biofilme de *E. faecalis* na presença de outros micro-organismos. Foi demonstrado recentemente[9] que o número células viáveis de *E. faecalis* em um biofilme é significativamente maior quando esta bactéria é colocada juntamente com *S. mutans*. Assim, novas pesquisas devem dar mais atenção para o desenvolvimento de biofilmes polimicrobianos.

A microscopia confocal tornou-se uma ferramenta muito útil como complemento para as técnicas microbiológicas, histológicas, microscópicas e moleculares bem estabelecidas para a identificação de bactérias viáveis[68] e, como consequência, vem sendo cada vez mais empregada nos estudos sobre biofilme[41, 43, 56]. Para o melhor aproveitamento de todos os seus recursos, muitos cuidados devem ser tomados deste as etapas de preparação e processamentos das amostras até o momento da análise das imagens e interpretação dos resultados. Durante a confecção dos substratos, uma atenção especial deve ser dada para que a superfície fique a mais plana e regular possível. Desníveis na superfície impedem a obtenção do foco adequado para a visualização do biofilme. Dos substratos utilizados nesta pesquisa, a guta-percha apresentou, em alguns

poucos casos, irregularidades que impediram a leitura do campo. Nessas situações, a região de leitura foi substituída por outra área.

Diversos programas estão disponíveis para visualização e análise das imagens obtidas em microscopia confocal, tais como: BioImage_L[5], Osirix[19], Daime[20], MetaMorph[2], Fluoview[31], MeVisLab[55], Imaris[42] e o COMSTAT[18]. No presente estudo o programa escolhido foi o BioImage_L pois é de fácil utilização, apresenta ferramentas com comandos simples e possibilita a obtenção de informações importantes sobre os biofilmes, como biovolume total, biovolume verde, biovolume vermelho e percentual de cobertura do substrato[5, 41]. Devido à grande variedade de programas existentes, estudos adicionais são necessários para avaliar se os resultados obtidos por todos eles são semelhantes, para que resultados de diferentes pesquisas possam ser ou não comparados.

Diante das limitações previamente relatadas dos métodos existentes até então e, também, da importância que os biofilmes assumem nas infecções endodônticas, o segundo capítulo propôs uma nova metodologia para avaliação da atividade antimicrobiana dos cimentos endodônticos, o teste de contato direto sobre biofilme. Nenhum dos cimentos avaliados conseguiu eliminar totalmente as bactérias. Isso demonstrou, em parte, que a atividade antimicrobiana atribuída a alguns materiais obturadores é pouco efetiva no combate aos micro-organismos organizados em comunidades. Resultados diferentes poderiam ter sido encontrados se essa metodologia permitisse avaliar cimentos recém-espatulados, o que não pode ser realizado devido à adesão do cimento ao substrato. Assim, apesar das limitações do teste de difusão em ágar, ele ainda é usado[30] para avaliar a ação de cimentos frescos.

A avaliação foi realizada pela contagem no número de UFC/mL do biofilme remanescente na dentina após os períodos de contato com os cimentos. Foi incluído um grupo controle negativo no qual o biofilme não entrou em contato com nenhum cimento, servindo de comparação para os resultados.

Por se tratar de um novo modelo experimental, modificações podem ser realizadas para aperfeiçoar o método. A utilização de outros micro-organismos ou até mesmo o emprego de biofilmes polimicrobianos certamente ajudaria a melhor compreensão da real capacidade antimicrobiana dos cimentos endodônticos.

Referências

REFERÊNCIAS[1]

1. Al-Ahmad A, Muller N, Wiedmann-Al-Ahmad M, Sava I, Hubner J, Follo M, et al. Endodontic and salivary isolates of Enterococcus faecalis integrate into biofilm from human salivary bacteria cultivated in vitro. J Endod. 2009; 35: 986-91.

2. Al-Ahmad A, Wunder A, Auschill TM, Follo M, Braun G, Hellwig E, et al. The in vivo dynamics of Streptococcus spp., Actinomyces naeslundii, Fusobacterium nucleatum and Veillonella spp. in dental plaque biofilm as analysed by five-colour multiplex fluorescence in situ hybridization. J Med Microbiol. 2007; 56: 681-7.

3. Bodrumlu E, Semiz M. Antibacterial activity of a new endodontic sealer against Enterococcus faecalis. J Can Dent Assoc. 2006; 72: 637a-c.

4. Brandle N, Zehnder M, Weiger R, Waltimo T. Impact of growth conditions on susceptibility of five microbial species to alkaline stress. J Endod. 2008; 34: 579-82.

5. Chavez de Paz LE. Image analysis software based on color segmentation for characterization of viability and physiological activity of biofilms. Appl Environ Microbiol. 2009; 75: 1734-9.

6. Cobankara FK, Altinoz HC, Ergani O, Kav K, Belli S. In vitro antibacterial activities of root-canal sealers by using two different methods. J Endod. 2004; 30: 57-60.

7. Dahlen G, Samuelsson W, Molander A, Reit C. Identification and antimicrobial susceptibility of enterococci isolated from the root canal. Oral Microbiol Immunol. 2000; 15: 309-12.

8. Deng DM, Buijs MJ, ten Cate JM. The effects of substratum on the pH response of Streptococcus mutans biofilms and on the susceptibility to 0.2% chlorhexidine. Eur J Oral Sci. 2004; 112: 42-7.

[1] De acordo com o estilo Vancouver. Disponível em: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

9. Deng DM, Hoogenkamp MA, Exterkate RA, Jiang LM, van der Sluis LW, Ten Cate JM, et al. Influence of Streptococcus mutans on Enterococcus faecalis biofilm formation. J Endod. 2009; 35: 1249-52.

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

11. El-Azizi M. Enhancement of the in vitro activity of amphotericin B against the biofilms of non-albicans Candida spp. by rifampicin and doxycycline. J Med Microbiol. 2007; 56: 645-9.

12. Eldeniz AU, Hadimli HH, Ataoglu H, Orstavik D. Antibacterial effect of selected root-end filling materials. J Endod. 2006; 32: 345-9.

13. Estrela C, Sydney GB, Bammann LL, Felippe Junior O. Mechanism of action of calcium and hydroxyl ions of calcium hydroxide on tissue and bacteria. Braz Dent J. 1995; 6: 85-90.

14. Fuss Z, Charniaque O, Pilo R, Weiss E. Effect of various mixing ratios on antibacterial properties and hardness of endodontic sealers. J Endod. 2000; 26: 519-22.

15. George S, Basrani B, Kishen A. Possibilities of gutta-percha-centered infection in endodontically treated teeth: an in vitro study. J Endod. 2010; 36: 1241-4.

16. Gomes-Filho JE, Watanabe S, Bernabe PF, de Moraes Costa MT. A mineral trioxide aggregate sealer stimulated mineralization. J Endod. 2009; 35: 256-60.

17. Haapasalo M, Udnaes T, Endal U. Persistent, recurrent and acquired infection of the root canal system post-treatment. Endod Topics. 2003; 6: 29-56.

18. Herzberg M, Dosoretz CG, Kuhn J, Klein S, Green M. Visualization of active biomass distribution in a BGAC fluidized bed reactor using GFP tagged Pseudomonas putida F1. Water Res. 2006; 40: 2704-12.

19. Hidalgo G, Burns A, Herz E, Hay AG, Houston PL, Wiesner U, et al. Functional tomographic fluorescence imaging of pH microenvironments in microbial biofilms by use of silica nanoparticle sensors. Appl Environ Microbiol. 2009; 75: 7426-35.

20. Kara D, Luppens SB, van Marle J, Ozok R, ten Cate JM. Microstructural differences between single-species and dual-species biofilms of Streptococcus mutans and Veillonella parvula, before and after exposure to chlorhexidine. FEMS Microbiol Lett. 2007; 271: 90-7.

21. Kayaoglu G, Erten H, Alacam T, Orstavik D. Short-term antibacterial activity of root canal sealers towards Enterococcus faecalis. Int Endod J. 2005; 38: 483-8.

22. Kishen A, George S, Kumar R. Enterococcus faecalis-mediated biomineralized biofilm formation on root canal dentine in vitro. J Biomed Mater Res A. 2006; 77: 406-15.

23. Lai CC, Huang FM, Yang HW, Chan Y, Huang MS, Chou MY, et al. Antimicrobial activity of four root canal sealers against endodontic pathogens. Clin Oral Investig. 2001; 5: 236-9.

24. Larsen T. Susceptibility of Porphyromonas gingivalis in biofilms to amoxicillin, doxycycline and metronidazole. Oral Microbiol Immunol. 2002; 17: 267-71.

25. Larsen T, Fiehn NE. Development of a flow method for susceptibility testing of oral biofilms in vitro. APMIS. 1995; 103: 339-44.

26. Leonardo MR, Rossi MA, Silva LA, Ito IY, Bonifacio KC. EM evaluation of bacterial biofilm and microorganisms on the apical external root surface of human teeth. J Endod. 2002; 28: 815-8.

27. Love RM. Enterococcus faecalis--a mechanism for its role in endodontic failure. Int Endod J. 2001; 34: 399-405.

28. Molander A, Reit C, Dahlen G, Kvist T. Microbiological status of root-filled teeth with apical periodontitis. Int Endod J. 1998; 31: 1-7.

29. Molven O, Olsen I, Kerekes K. Scanning electron microscopy of bacteria in the apical part of root canals in permanent teeth with periapical lesions. Endod Dent Traumatol. 1991; 7: 226-9.

30. Morgental RD, Vier-Pelisser FV, Oliveira SD, Antunes FC, Cogo DM, Kopper PM. Antibacterial activity of two MTA-based root canal sealers. Int Endod J. 2011; 44: 1128-33.

31. Motegi M, Takagi Y, Yonezawa H, Hanada N, Terajima J, Watanabe H, et al. Assessment of genes associated with Streptococcus mutans biofilm morphology. Appl Environ Microbiol. 2006; 72: 6277-87.

32. Muller P, Guggenheim B, Schmidlin PR. Efficacy of gasiform ozone and photodynamic therapy on a multispecies oral biofilm in vitro. Eur J Oral Sci. 2007; 115: 77-80.

33. Nair PN. On the causes of persistent apical periodontitis: a review. Int Endod J. 2006; 39: 249-81.

34. Nair PN. Pathogenesis of apical periodontitis and the causes of endodontic failures. Crit Rev Oral Biol Med. 2004; 15: 348-81.

35. Nair PN, Henry S, Cano V, Vera J. Microbial status of apical root canal system of human mandibular first molars with primary apical periodontitis after "one-visit" endodontic treatment. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2005; 99: 231-52.

36. Nair PNR. Light and electron microscopic studies of root canal flora and periapical lesions. J Endod. 1987; 13: 29-39.

37. Nawal RR, Parande M, Sehgal R, Naik A, Rao NR. A comparative evaluation of antimicrobial efficacy and flow properties for Epiphany, Guttaflow and AH-Plus sealer. Int Endod J. 2011; 44: 307-13.

38. Noiri Y, Ehara A, Kawahara T, Takemura N, Ebisu S. Participation of bacterial biofilms in refractory and chronic periapical periodontitis. J Endod. 2002; 28: 679-83.

39. Norrington DW, Ruby J, Beck P, Eleazer PD. Observations of biofilm growth on human dentin and potential destruction after exposure to antibiotics. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2008; 105: 526-9.

40. Oliveira AC, Tanomaru JM, Faria-Junior N, Tanomaru-Filho M. Bacterial leakage in root canals filled with conventional and MTA-based sealers. Int Endod J. 2011; 44: 370-5.

41. Ordinola-Zapata R, Bramante CM, Cavenago B, Graeff MS, Gomes de Moraes I, Marciano M, et al. Antimicrobial effect of endodontic solutions used as final irrigants on a dentine biofilm model. Int Endod J. 2012; 45: 162-8.

42. Pappen FG. Efeito antibacteriano in vitro das soluções Tetraclean®, MTAD® e modificações: teste de contato direto e ação sobre o biofilme [tese de doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2008.

43. Pappen FG, Shen Y, Qian W, Leonardo MR, Giardino L, Haapasalo M. In vitro antibacterial action of Tetraclean, MTAD and five experimental irrigation solutions. Int Endod J. 2010; 43: 528-35.

44. Patel R. Biofilms and antimicrobial resistance. Clin Orthop Relat Res. 2005: 41-7.

45. Peciuliene V, Balciuniene I, Eriksen HM, Haapasalo M. Isolation of Enterococcus faecalis in previously root-filled canals in a Lithuanian population. J Endod. 2000; 26: 593-5.

46. Portenier I, Waltimo T, Orstavik D, Haapasalo M. The susceptibility of starved, stationary phase, and growing cells of Enterococcus faecalis to endodontic medicaments. J Endod. 2005; 31: 380-6.

47. Radcliffe CE, Potouridou L, Qureshi R, Habahbeh N, Qualtrough A, Worthington H, et al. Antimicrobial activity of varying concentrations of sodium hypochlorite on the endodontic microorganisms Actinomyces israelii, A. naeslundii, Candida albicans and Enterococcus faecalis. Int Endod J. 2004; 37: 438-46.

48. Rocas IN, Jung IY, Lee CY, Siqueira JF, Jr. Polymerase chain reaction identification of microorganisms in previously root-filled teeth in a South Korean population. J Endod. 2004; 30: 504-8.

49. Rumjanek NG, Fonseca MCC, Xavier GR. Quorum sensing em sistemas agrícolas. Biotecnologia Cienc Desenvolv. 2004; 33: 35-50.

50. Saleh IM, Ruyter IE, Haapasalo M, Orstavik D. Survival of Enterococcus faecalis in infected dentinal tubules after root canal filling with different root canal sealers in vitro. Int Endod J. 2004; 37: 193-8.

51. Sedlacek MJ, Walker C. Antibiotic resistance in an in vitro subgingival biofilm model. Oral Microbiol Immunol. 2007; 22: 333-9.

52. Sen BH, Piskin B, Demirci T. Observation of bacteria and fungi in infected root canals and dentinal tubules by SEM. Endod Dent Traumatol. 1995; 11: 6-9.

53. Senges C, Wrbas KT, Altenburger M, Follo M, Spitzmuller B, Wittmer A, et al. Bacterial and Candida albicans adhesion on different root canal filling materials and sealers. J Endod. 2011; 37: 1247-52.

54. Shani S, Friedman M, Steinberg D. The anticariogenic effect of amine fluorides on Streptococcus sobrinus and glucosyltransferase in biofilms. Caries Res. 2000; 34: 260-7.

55. Shen Y, Qian W, Chung C, Olsen I, Haapasalo M. Evaluation of the effect of two chlorhexidine preparations on biofilm bacteria in vitro: a three-dimensional quantitative analysis. J Endod. 2009; 35: 981-5.

56. Shen Y, Stojicic S, Qian W, Olsen I, Haapasalo M. The synergistic antimicrobial effect by mechanical agitation and two chlorhexidine preparations on biofilm bacteria. J Endod. 2010; 36: 100-4.

57. Sipert CR, Hussne RP, Nishiyama CK, Torres SA. In vitro antimicrobial activity of Fill Canal, Sealapex, Mineral Trioxide Aggregate, Portland cement and EndoRez. Int Endod J. 2005; 38: 539-43.

58. Siqueira-Jr JF, Favieri A, Gahyva SM, Moraes SR, Lima KC, Lopes HP. Antimicrobial activity and flow rate of newer and established root canal sealers. J Endod. 2000; 26: 274-7.

59. Siqueira-Jr JF, Rocas IN. Clinical implications and microbiology of bacterial persistence after treatment procedures. J Endod. 2008; 34: 1291-301 e3.

60. Slutzky-Goldberg I, Slutzky H, Solomonov M, Moshonov J, Weiss EI, Matalon S. Antibacterial properties of four endodontic sealers. J Endod. 2008; 34: 735-8.

61. Socransky SS, Haffajee AD. Dental biofilms: difficult therapeutic targets. Periodontol 2000. 2002; 28: 12-55.

62. Stewart PS, Costerton JW. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. Lancet. 2001; 358: 135-8.

63. Tabrizizadeh M, Mohammadi Z. In vitro evaluation of antibacterial activities of root canal sealers. J Clin Dent. 2005; 16: 114-6.

64. Takemura N, Noiri Y, Ehara A, Kawahara T, Noguchi N, Ebisu S. Single species biofilm-forming ability of root canal isolates on gutta-percha points. Eur J Oral Sci. 2004; 112: 523-9.

65. Upadya MH, Kishen A. Influence of bacterial growth modes on the susceptibility to light-activated disinfection. Int Endod J. 2010; 43: 978-87.

66. Weiss EI, Shalhav M, Fuss Z. Assessment of antibacterial activity of endodontic sealers by a direct contact test. Endod Dent Traumatol. 1996; 12: 179-84.

67. Yang Y, Sreenivasan PK, Subramanyam R, Cummins D. Multiparameter assessments to determine the effects of sugars and antimicrobials on a polymicrobial oral biofilm. Appl Environ Microbiol. 2006; 72: 6734-42.

68. Zapata RO, Bramante CM, de Moraes IG, Bernardineli N, Gasparoto TH, Graeff MS, et al. Confocal laser scanning microscopy is appropriate to detect viability of Enterococcus faecalis in infected dentin. J Endod. 2008; 34: 1198-201.

69. Zhang H, Shen Y, Ruse ND, Haapasalo M. Antibacterial activity of endodontic sealers by modified direct contact test against Enterococcus faecalis. J Endod. 2009; 35: 1051-5.

Autorizo a reprodução deste trabalho.

(Direitos de publicação reservado ao autor)

Araraquara, 30 de março de 2012.

NORBERTO BATISTA DE FARIA JÚNIOR