

AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES ANTIMICROBIANAS E IMUNOLÓGICAS DE UM NOVO CIMENTO ENDODÔNTICO

JOANA DE BARROS CORREIA

DOUTORAMENTO EM MEDICINA DENTÁRIA

Porto, 2013

U. PORTO



FACULDADE DE
MEDICINA DENTÁRIA
UNIVERSIDADE DO PORTO

DISSERTAÇÃO DE CANDIDATURA AO GRAU DE DOUTOR EM
MEDICINA DENTÁRIA APRESENTADA À FACULDADE DE MEDICINA
DENTÁRIA DA UNIVERSIDADE DO PORTO

ORIENTADORA

Prof. Doutora Irene Pina Vaz

COORIENTADORA

Prof. Doutora Cidália Pina Vaz

CONSELHO CIENTÍFICO DA FACULDADE DE MEDICINA DENTÁRIA DA UNIVERSIDADE DO PORTO

Prof. Doutor Afonso Manuel Pinhão Ferreira

Prof. Doutor Américo dos Santos Afonso

Prof. Doutor António Cabral Campos Felino

Prof. Doutor César Fernando Coelho Leal Silva

Prof. Doutor Germano Neves Pinto Rocha

Prof. Doutora Irene Graça Azevedo Pina Vaz

Prof. Doutora Inês Alexandra Costa Morais Caldas

Prof. Doutor João Carlos Antunes Sampaio Fernandes

Prof. Doutor João Carlos Gonçalves Ferreira de Pinho

Prof. Doutor João Fernando Costa Carvalho

Prof. Doutor Jorge Manuel Carvalho Dias Lopes

Prof. Doutor José António Macedo Carvalho Capelas

Prof. Doutor José Carlos Reis Campos

Prof. Doutor José Mário Castro Rocha

Prof. Doutor Manuel José Fontes de Carvalho

Prof. Doutora Maria Cristina P. C. M. Figueiredo Pollmann

Prof. Doutora Maria Helena Guimarães Figueiral da Silva

Prof. Doutora Maria Helena Raposo Fernandes

Prof. Doutora Maria Lurdes Ferreira Lobo Pereira

Prof. Doutor Mário Augusto Pires Vaz

Prof. Doutor Mário Jorge Rebolho Fernandes Silva

Prof. Doutor Mário Ramalho Vasconcelos

Prof. Doutor Miguel Fernando Silva Gonçalves Pinto

Prof. Doutor Paulo Rui Galvão Ribeiro Melo

Prof. Doutor Ricardo Manuel Lobo Faria Almeida

DOCENTES JUBILADOS

Prof. Doutor Adão Fernando Pereira

Prof. Doutor Amílcar Almeida Oliveira

Prof. Doutor António Manuel Machado Capelas †

Dr. António Ulisses Matos dos Santos

Prof. Doutor Durval Manuel Belo Moreira

Prof. Doutor Francisco António Rebelo Morais Caldas

Dr. José Maria Vaz Osório

Prof. Doutor José Serra Silva Campos Neves

Prof. Doutor Manuel Desport Marques †

Prof. Doutor Manuel Guedes de Figueiredo

DOCENTES APOSENTADOS

Prof. Doutor António Manuel Guerra Capelas

Prof. Dr. Artur Manuel Osório de Araújo

Prof. Doutor Fernando Jorge Morais Branco

Prof. Doutor Fernando José Brandão Martins Peres †

Prof. Doutor José Albertino Cruz Lordelo

Prof. Doutor José Carlos Pina Almeida Rebelo

Prof. Doutor Manuel Pedro da Fonseca Paulo

Prof. Doutora Maria Adelaide Macedo Carvalho Capelas †

Prof. Doutora Maria Purificação Valenzuela Sampaio Tavares

Prof. Doutor Rogério Serapião Martins Aguiar Branco

Aos meus pais,

À minha Avó †,

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Professora Doutora Irene Graça Azevedo Pina Vaz, expresso o meu profundo agradecimento pela orientação e apoio incondicional e, em particular, pelo constante estímulo e incentivo, em todas as fases do projeto desta tese. Obrigada pelos ensinamentos ao longo destes anos e o exemplo na prática de Endodontia, obrigada pela total dedicação e disponibilidade sempre demonstradas e, sobretudo, obrigada por todo o carinho e amizade com que sempre me tratou.

À Professora Doutora Cidália Pina Vaz, coorientadora deste trabalho, obrigada pela dedicação, tempo e disponibilidade dos meios técnicos e humanos do Serviço e Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Medicina da Universidade do Porto, tornando possível a execução de parte experimental do trabalho.

À Professora Doutora Maria Ascensão Lopes, um agradecimento especial e com muito carinho por partilhar os seus conhecimentos, por dispor de tempo e paciência. Porque esteve presente em todas as fases do trabalho e se disponibilizou em todos os momentos agradeço a amizade e os incentivos constantes.

Ao Professor Doutor José Freitas Siqueira Jr., a minha sincera gratidão pela partilha de conhecimento, pela exigência, pela presença e disponibilidade. Por tudo aquilo que tive oportunidade de aprender e concretizar, pela confiança e pela disposição do Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Odontologia da Universidade Estácio de Sá do Rio de Janeiro, que permitiram realizar muito da componente experimental do trabalho. Obrigada por me ter recebido por um período de mobilidade internacional, por ter permitido a concretização de um sonho que guardo para sempre.

À Professora Doutora Maria Helena Raposo Fernandes, um agradecimento especial, pela colaboração e por ter disponibilizado os meios técnicos e humanos do Laboratório de Metabolismo e Regeneração Óssea da Faculdade de Medicina Dentária da Universidade do Porto, tornando possível a execução de parte do trabalho experimental. Muito obrigada pelo exemplo de dinamismo e trabalho.

Aos Professores Doutor Manuel José Fontes de Carvalho e ao Professor Doutor José António Macedo de Carvalho Capelas que acompanharam de perto a minha evolução, agradeço a docência, a amizade e a oportunidade de colaborar com o Departamento de Endodontia da Faculdade de Medicina Dentária da Universidade do Porto, dentro e fora da instituição.

Aos meus colegas de curso, de profissão e de vida, Rita Pinto, Tiago Coelho, Ana Roleira Marinho e Ana Milheiro, sempre lado a lado, obrigada por estarem sempre presentes.

A todos os meus colegas do Departamento, em especial à Professora Doutora Cláudia Rodrigues, ao Mestre Miguel Martins, à Dra. Joana Correia de Sousa, à Dra. Eva Salgueirinho, à Professora Doutora Rita Noites e à Dra. Ana Rita Silva, agradeço todo o apoio e todo o carinho.

A todas as pessoas fantásticas que tive oportunidade de conhecer, a todas as pessoas com quem partilhei experiências e batalhas gloriosas, momentos de alegria e outros nem tanto, agradeço o carinho e a atenção ao Mestre Miguel A. Rodrigues, Professor Doutor Flávio Rodrigues Ferreira Alves, Marlei Silva, Angélica Pedrosa, Professora Doutora Mónica Aparecida Schultz Neves, Professora Doutora Isabela das Neves Rôças Siqueira, Professor Doutor Júlio Cezar Machado de Oliveira, Professora Doutora Ana Isabel Silva Dias, Professor Doutor João Miguel da Costa Rodrigues e à Dra. Mónica Pereira Garcia.

A todos os colegas e amigos com quem partilho a prática clínica, o meu eterno agradecimento pela compreensão e apoio absoluto, Mestre Jorge André Cardoso, Dr. Luis Vieira Dias e Dra. Teresa Taveira.

A todos os meus amigos de sempre e para sempre, convosco o caminho foi mais fácil de percorrer. Obrigada Ana Luísa, Roberta Braz, Luis Caseiro, Nuno Ferreira e Miguel Tarujo. Obrigada especial a ti, João.

Ao meu irmão, pela cumplicidade, amor e amizade, que foram fundamentais em todas as etapas da minha formação.

Aos meus pais, guardo o maior agradecimento de todos, pelo amor incondicional, pelo apoio e compreensão extremas, pela presença inigualável em todos os momentos da minha vida. Obrigada pela total dedicação a mim e a este projeto, obrigada por acreditarem em mim, obrigada por me fazerem acreditar de que tudo é possível.

PUBLICAÇÕES

Fazem parte integrante desta dissertação os seguintes trabalhos já publicados ou em publicação:

ARTIGOS

- I. **Barros J**, Silva MG, Rôças IN, Gonçalves LS, Alves FR, Lopes MA, Pina-Vaz I, Siqueira JF, Jr. Antibiofilm effects of endodontic sealers containing quaternary ammonium polyethylenimine nanoparticles. J Endod 2013 Dec. DOI: 10.1016/j.joen.2013.12.021 (*in press*). Impact Factor: 2.929 ISI Journal Citation Reports © Ranking: 2012: 8/83 (D1) (Dentistry Oral Surgery & Medicine).
- II. **Barros J**, Silva MG, Rodrigues MA, Alves FR, Lopes MA, Pina-Vaz I, Siqueira JF, Jr. Antibacterial, physicochemical and mechanical properties of endodontic sealers containing quaternary ammonium polyethylenimine nanoparticles. Int Endod J 2013 Oct 18. DOI: 10.1111/iej.12207 (*in press*). Impact Factor: 2.051. ISI Journal Citation Reports © Ranking: 2012: 21/83 (Q2) (Dentistry Oral Surgery & Medicine).
- III. **Barros J**, Costa-Rodrigues J, Lopes MA, Pina-Vaz I, Fernandes MH. Response of human osteoblastic and osteoclastic cells to AH Plus and Pulp Canal Sealer containing quaternary ammonium polyethylenimine nanoparticles, submetido J Endod.
- IV. **Barros J**, Dias A, Pina-Vaz C, Rodrigues MA, Lopes MA, Pina-Vaz I. Antibiofilm and antimicrobial activity of polyethylenimine: an interesting compound for endodontic treatment, submetido JCDP.

RESUMOS

- I. **Barros J**, Silva MG, Alves FRF, Pina-Vaz I, Rôças IN, Siqueira, Jr JF. *In vitro* antibacterial activity of an endodontic sealer incorporated with PEI nanoparticles. *Int End J* 2013;46 (100):1-75.
- II. **Barros J**, Silva MG, Alves FRF, Pina-Vaz I, Rôças IN, Siqueira, Jr JF. *In vitro* antibacterial activity of an endodontic sealer incorporated with PEI nanoparticles. 16th Biennial Congress of the European Society of Endodontology abstract book 2013; R137, 46.
- III. **Barros J**, Ramalho PA, Pina-Vaz C, Rodrigues AG, Pina-Vaz I. Antimicrobial Activity Upon Planktonic Cells And Biofilms of Polyethyleneimine. 52nd ICAAC abstract book 2012; F-1492.
- IV. **Barros J**, Ramalho PA, Pina-Vaz C, Carvalho MF, Pina-Vaz I. Antimicrobial activity of new compounds for use in endodontic materials. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 1; 17 (Supplement 2): S31, 2012. doi:10.4317/medoral.17643816.

APRESENTAÇÕES SOB A FORMA DE POSTER EM CONGRESSOS NACIONAIS E INTERNACIONAIS

- I. *In vitro* antibacterial activity of an endodontic sealer incorporated with PEI nanoparticles. **Barros J**, Silva MG, Alves FRF, Pina-Vaz I, Rôças IN, Siqueira, Jr JF. 16th Biennial Congress of the European Society of Endodontology, Lisboa (Portugal) 2013.
- II. Antimicrobial Activity Upon Planktonic Cells And Biofilms of Polyethyleneimine. **Barros J**, Ramalho PA, Pina-Vaz C, Rodrigues AG, Pina-Vaz I. 52nd Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ICAAC), San Francisco (EUA) 2012.
- III. Antimicrobial activity of new compounds for use in endodontic materials. **Barros J**, Ramalho PA, Pina-Vaz C, Carvalho MF, Pina-Vaz I. IXI Congreso Nacional y VI International do SEOC, Santiago de Compostela (Espanha) 2012.
- IV. Actividade antimicrobiana dos cimentos endodônticos. Revisão Bibliográfica. **Barros J**, Salgueirinho E, Capelas JA, Carvalho MF, Pina-Vaz I. XXII Jornadas da Faculdade de Medicina Dentária da Universidade do Porto, Porto (Portugal) 2011.

COMUNICAÇÕES ORAIS NACIONAIS E INTERNACIONAIS

- I. Apresentação do tema “A atividade antimicrobiana de diferentes cimentos endodônticos – Projeto de Investigação”, no IV Seminário de Pesquisa da Universidade Estácio de Sá (Rio de Janeiro, Brasil – 20 de outubro de 2012).
- II. Apresentação do tema “Atividade Antimicrobiana dos Cimentos utilizados em Endodontia”, na Reunião Anual da Sociedade Portuguesa de Endodontologia, organizada pela Secção de Endodontologia da SPEMD (Braga – 7 de maio de 2011).
- III. Apresentação do tema “Cimentos de Obturação utilizados em Endodontia”, no âmbito do Curso Teórico-Prático de Endodontia Mecanizada, organizado pelo Centro de Formação Contínua da Faculdade de Medicina Dentária da Universidade do Porto (Porto – 5 de fevereiro de 2011).

RESUMO

A presença de microrganismos, susceptíveis de causarem infecções persistentes, é considerada a maior causa de fracasso do tratamento endodôntico, inclusive o isolamento de bactérias está descrito em cerca de 40 a 60 % dos canais radiculares de dentes com periodontite apical pós-tratamento endodôntico. As áreas do complexo sistema de canais radiculares não atingidas durante a preparação químico-mecânica são favoráveis à manutenção de conteúdo séptico-necrótico, contribuindo para o insucesso do tratamento endodôntico. A obturação do canal radicular deve preencher e selar o canal preparado de forma a evitar espaços vazios e nutrientes que favorecem o crescimento de bactérias residuais. Assim, o cimento endodôntico deve, idealmente, apresentar atividade antimicrobiana e alcançar essas áreas para exercer de forma mais efetiva os seus efeitos antibacterianos. O aumento da atividade antimicrobiana dos cimentos, com ação a longo prazo, parece ser uma abordagem interessante para maximizar a desinfecção do sistema de canais radiculares.

A espécie *Enterococcus faecalis* é a mais comumente isolada em dentes com infecção endodôntica, estando particularmente associada aos casos de insucesso do tratamento endodôntico. A capacidade destes microrganismos penetrarem no canal radicular permanecendo viáveis por longos períodos em ambiente desfavorável, e multiplicando-se, é relevante no que se refere à formação do biofilme, o qual está relacionado com a persistência de infecções endodônticas. Atualmente, a periodontite apical é considerada uma doença causada por biofilmes.

A biocompatibilidade dos cimentos endodônticos é uma propriedade essencial, já que estes materiais podem contactar diretamente com diversos tipos de células, nomeadamente, células ósseas, aquando a extrusão dos materiais para os tecidos periapicais. A avaliação *in vitro* destes materiais deve basear-se não apenas na proliferação e diferenciação dos osteoblastos, mas também na diferenciação e ativação dos osteoclastos.

Este trabalho procurou, por um lado, verificar *in vitro* o aumento da atividade antimicrobiana e antibiofilme de dois cimentos endodônticos comerciais pela incorporação de nanopartículas de amónia quaternária de polietilenoimina (QPEI) e, por outro lado, esclarecer se as propriedades físico-químicas e mecânicas, bem como a biocompatibilidade dos novos materiais, não sofreram alterações pela inclusão das nanopartículas.

Primeiramente, a solução de polietilenoimina (PEI), da qual são obtidas as nanopartículas de QPEI, foi avaliada quanto à sua eficácia antimicrobiana e antibiofilme contra estirpes de microrganismos geralmente envolvidos em infeções endodônticas persistentes. O mecanismo de ação deste composto também foi esclarecido por meio de citometria de fluxo. Os resultados confirmaram a forte atividade antimicrobiana e antibiofilme do PEI. Contudo, a solução de PEI tem igualmente uma grande citotoxicidade. Deste modo, foram sintetizadas e caracterizadas nanopartículas de QPEI e, posteriormente, incorporadas em cimentos de obturação selecionados, procurando uma solução antimicrobiana mas simultaneamente biocompatível para aplicação *in vivo*.

xx

Os resultados da avaliação da atividade antibacteriana foram indicativos de um aumento considerável e de longa duração da eficácia antibacteriana, contra o microrganismo *E. faecalis*, e sem alterações significativas nas propriedades físico químicas e mecânicas dos cimentos, determinadas de acordo com a Norma ISO 6876.

Considerando as propriedades antibacterianas e antibiofilme das nanopartículas QPEI, postulou-se a hipótese de que a atividade antibiofilme dos cimentos endodônticos também poderia ser melhorada, no sentido de aumentar a eficácia terapêutica, tendo em conta a importância e o reconhecimento da entidade do biofilme, como agente etiológico das infeções endodônticas. De facto este aspecto foi comprovado.

O comportamento biológico dos cimentos endodônticos com nanopartículas de QPEI foi também avaliado. Os resultados obtidos sugerem que a incorporação de nanopartículas de QPEI aos cimentos endodônticos estudados, não induz efeitos nocivos sobre as células ósseas, em comparação com os mesmos materiais na formulação comercial.

Assim, as nanopartículas de QPEI, para além de potenciação da atividade antibacteriana e antibiofilme dos cimentos endodônticos contra o microrganismo *E. faecalis*, são relativamente simples de sintetizar e economicamente acessíveis, conjugado com o facto de serem biocompatíveis com as células ósseas. Além disso, as propriedades físico-químicas

e mecânicas, requisitos fundamentais de um cimento ideal, não sofreram alterações. A extrapolação deste estudo para a prática clínica pode representar um passo importante no controlo das infeções primárias e secundárias/persistentes, relacionadas com o insucesso do tratamento endodôntico. Adicionalmente, as nanopartículas de QPEI podem ser úteis no âmbito de outras entidades clínicas infecciosas, comuns na cavidade oral. Esta aplicação terá com certeza repercussões em termos de prevenção das infeções endodônticas persistentes e/ou prognóstico da periodontite apical.

ABSTRACT

Microorganisms are the main etiological factor for endodontic treatment failure; in fact, persistent bacteria have been detected in approximately 40 to 60 % of the root canals of teeth with apical periodontitis following endodontic treatment. The areas of the complex root canal system untouched during the chemomechanical preparation are prone to maintain its septic-necrotic content, thus contributing to the failure of the endodontic treatment. Ideally, the root obturation should fill and seal the prepared canal and deny space and nutrients for growth of residual bacteria. Thus, the endodontic sealer must have antimicrobial activity and should ideally be forced to these areas to exert its antibacterial effects more effectively. Increasing the long-term antimicrobial activity of the sealers seems to be an interesting approach to maximize root canal disinfection.

Enterococcus faecalis was used because it is one of the most prevalent species in root canals of teeth with post-treatment disease. The ability of these microorganisms to penetrate the root canal, remaining viable for long periods of time in unfavorable environments and multiplying is relevant in regard to biofilm formation, which is associated with the persistence of endodontic infections. Apical periodontitis has been recognized as a biofilm-induced disease.

The biocompatibility of the endodontic sealers is an essential property, since these materials may contact directly with various types of cells, namely bone cells, during the extrusion of the materials into periapical tissues. *In vitro* evaluation of these materials must be based not only on the proliferation and differentiation of osteoblasts, but also in the differentiation and activation of osteoclasts.

The aim of this study was to verify *in vitro* an increase in the antimicrobial and antibiofilm activity of two commercial endodontic sealers by incorporating quaternary ammonium polyethyleneimine nanoparticles (QPEI) and also to clarify whether the physicochemical and mechanical properties, as well as biocompatibility are unaltered by the inclusion of nanoparticles in the materials.

First, the polyethylenimine (PEI) solution from which QPEI nanoparticles are obtained was evaluated for its antimicrobial and antibiofilm efficacy against strains of microorganisms that are usually involved in persistent endodontic infections. The mechanism of action of this compound was also clarified through flow cytometry. The results confirmed the effective antimicrobial activity of PEI. However, PEI solution has also a high cytotoxicity. Thus, QPEI nanoparticles were synthesized and characterized, and, subsequently, included in selected endodontic sealers, looking for an antimicrobial but also biocompatible material for *in vivo* application.

The results of the antibacterial activity evaluation showed a significant and long-term increase of the antibacterial efficacy against *E. faecalis*, with no significant changes in physicochemical and mechanical properties of sealers, determined in accordance with ISO 6876.

Considering the antibacterial and antibiofilm properties of QPEI nanoparticles, it was hypothesized that antibiofilm activity of endodontic sealers could be improved with the inclusion of these nanoparticles, in order to rise the therapeutic efficacy, taking into account the importance and recognition of the biofilm entity as an etiological agent of endodontic infections.

The biological behavior of endodontic sealers with QPEI nanoparticles was evaluated as well. The results suggest that the incorporation of QPEI nanoparticles in the studied endodontic sealers does not have harmful effects on bone cells, when compared to the same materials in its commercial formula.

QPEI nanoparticles, besides enhancing the antibacterial and antibiofilm activity of endodontic sealers against *E. faecalis*, are relatively simple to synthesize and affordable, along with the fact that they are biocompatible with bone cells. The extrapolation of this study for clinical practice may represent an important step in the control of primary and secondary/persistent infections, which are related to the failure of endodontic treatment. Additionally, QPEI nanoparticles may be useful in the context of other clinical infectious, common in the oral cavity. This application will certainly have repercussions in terms of prevention of persistent endodontic infections and/or outcome of apical periodontitis.

ESTRUTURA DA TESE

O presente trabalho investiga e caracteriza a possibilidade de potenciação do efeito antibacteriano e antibiofilme dos cimentos endodônticos, pela incorporação de nanopartículas de amônia quaternária de polietilenoimina (QPEI), avaliando também as propriedades físico-químicas, mecânicas e biológicas dos cimentos em estudo.

Esta tese é composta por 8 capítulos. O capítulo 1, consiste numa breve introdução sobre o tema e está organizado em subtemas: sucesso do tratamento endodôntico, considerações microbiológicas, cimentos endodônticos e nanotecnologia.

xxv

O capítulo 2 apresenta os objetivos gerais e específicos dos estudos realizados.

Os capítulos 3, 4 e 5 descrevem a parte experimental do trabalho. Cada capítulo é preparado com uma compilação da componente experimental, dos resultados obtidos e da discussão dos mesmos, que deram origem a trabalhos já publicados e aceites como artigos em revistas científicas internacionais, bem como a posters ou comunicações orais em conferências nacionais e internacionais.

No capítulo 3, o objetivo foi determinar a atividade antimicrobiana do polímero de polietilenoimina (PEI) contra células planctónicas e biofilmes de bactérias e fungos implicados em infeções endodônticas. Os efeitos antibiofilme e antimicrobiano do PEI foram determinados contra vários microrganismos: *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Candida albicans*, segundo protocolos de referência. O mecanismo de ação do PEI foi ainda esclarecido recorrendo à citometria de fluxo.

No capítulo 4, confirmada a forte atividade antimicrobiana da solução de PEI mas associado a uma relativa citotoxicidade, o autor propôs-se a realizar o estudo da atividade antimicrobiana e antibiofilme de nanopartículas de amônia quaternária de polietilenoimina (QPEI). A síntese e caracterização das nanopartículas de QPEI são também descritas neste

capítulo. Foram avaliadas as propriedades antibacterianas, físico-químicas e mecânicas de cimentos endodônticos contendo nanopartículas de QPEI. Os cimentos testados foram o AH Plus (Dentsply DeTrey, Konstanz, Alemanha) e o Pulp Canal Sealer EWT (PCS) (Kerr Italia Srl, Salerno, Itália), fórmula comercial ou contendo 1 % ou 2 % (m/m) QPEI. A atividade antibacteriana foi avaliada utilizando um teste de contacto direto (DCT) contra *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 e duas estirpes clínicas. Os testes físico-químicos e mecânicos foram conduzidos de acordo com a Norma ISO 6876. Também foi avaliada a atividade antibiofilme dos dois cimentos endodônticos (AH Plus e Pulp Canal Sealer EWT) com 2 % m/m de nanopartículas de QPEI, contra os biofilmes de *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 e uma estirpe clínica.

No capítulo 5, o objetivo foi avaliar a atividade biológica dos cimentos selecionados, com e sem incorporação de nanopartículas de QPEI, usando células osteoblásticas e células osteoclásticas da medula óssea humana. A citotoxicidade dos dois cimentos endodônticos (AH Plus e Pulp Canal Sealer EWT) com 2 % m/m de nanopartículas de QPEI, foi determinada pela obtenção de extratos de cimentos de acordo com a Norma ISO 10993-5.

O capítulo 6 desta tese apresenta as conclusões gerais da investigação realizada, destacando os aspetos mais importantes.

O capítulo 7 expõe perspectivas futuras sobre o tema de tese apresentado.

O último capítulo, capítulo 8, corresponde à compilação das publicações nacionais e internacionais que resultaram dos trabalhos realizados no âmbito da investigação desta tese.

A parte experimental deste trabalho foi realizado no Serviço e Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Medicina da Universidade do Porto (FMUP), no Departamento de Metalurgia e Materiais da Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto (FEUP), no Laboratório de Microbiologia do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Estácio de Sá do Rio de Janeiro (UNESA) e no Laboratório do Metabolismo e Regeneração Óssea da Faculdade de Medicina Dentária da Universidade do Porto (FMDUP).

ÍNDICE

Agradecimentos	xiii
Publicações	xv
Resumo	xix
Abstract	xxiii
Estrutura da Tese	xxv
ENQUADRAMENTO	33
CAPÍTULO 1 INTRODUÇÃO	
1.1. Sucesso do Tratamento Endodôntico	37
1.2. Considerações Microbiológicas	38
1.2.1. Biofilmes	40
1.2.2. Biofilmes e Periodontite Apical	42
1.3. Cimentos Endodônticos	45
1.3.1. Atividade Antimicrobiana	49
1.3.2. Propriedades Físico-Químicas e Mecânicas	51
1.3.3. Biocompatibilidade	53
1.4. Nanotecnologia	55
1.4.1. Nanopartículas de Amônia Quaternária de Polietilenoimina (QPEI)	56
1.5. Referências Bibliográficas	59
CAPÍTULO 2 OBJETIVOS	
2.1. Objetivos Gerais	73
2.2. Objetivos Específicos	73
CAPÍTULO 3 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E ANTIBIOFILME DO PEI	
3.1 <u>ESTUDO 1</u> Atividade Antimicrobiana e Antibiofilme do PEI	79
3.1.1. Objetivos	79
3.1.2. Materiais e Métodos	79
3.1.3. Resultados	82
3.1.4. Discussão	85
3.2. Referências Bibliográficas	89

CAPÍTULO 4 NANOPARTÍCULAS DE QPEI E CIMENTOS ENDODÔNTICOS	
4.1. <u>ESTUDO 2</u> Atividade Antimicrobiana e Antibiofilme de Nanopartículas de QPEI	95
4.1.1. Objetivos	95
4.1.2. Materiais e Métodos	95
4.1.3. Resultados	98
4.1.4. Discussão	101
4.2. <u>ESTUDO 3</u> Atividade Antimicrobiana e Propriedades Físico-Químicas e Mecânicas de Cimentos Endodônticos com Incorporação de Nanopartículas de QPEI	103
4.2.1. Objetivos	103
4.2.2. Materiais e Métodos	103
4.2.3. Resultados	107
4.2.4. Discussão	111
4.3. <u>ESTUDO 4</u> Atividade Antibiofilme de Cimentos Endodônticos com Incorporação de Nanopartículas de QPEI	
4.3.1. Objetivos	115
4.3.2. Materiais e Métodos	116
4.3.3. Resultados	118
4.3.4. Discussão	120
4.4. Referências Bibliográficas	123
CAPÍTULO 5 CIMENTOS ENDODÔNTICOS E NANOPARTÍCULAS DE QPEI: BIOCOMPATIBILIDADE	
5.1. <u>ESTUDO 5</u> Avaliação da Biocompatibilidade de Cimentos Endodônticos com Incorporação de Nanopartículas de QPEI	131
5.1.1. Objetivos	131
5.1.2. Materiais e Métodos	131
5.1.3. Resultados	134
5.1.4. Discussão	140
5.2. Referências Bibliográficas	144
CAPÍTULO 6 CONCLUSÕES	149
CAPÍTULO 7 PERSPETIVAS FUTURAS	153
CAPÍTULO 8 PUBLICAÇÕES	157

ÍNDICE DE TABELAS E FIGURAS

CAPÍTULO 3

TABELA 1 - Suscetibilidade antimicrobiana. Valores de CIM e CML do PEI. **82**

FIGURA 1 - Efeito da ação do PEI sobre a adesão, formação e desagregação dos biofilmes dos microrganismos ATCC testados, em percentagem de células metabolicamente ativas (método XTT). * Diferença estatística das diferentes concentrações de PEI em relação ao controlo positivo (concentração 0 mg/mL) ($p < 0,05$). **83**

FIGURA 2 - Histogramas representativos da análise de citometria de fluxo em relação a células não tratadas do microrganismo *Enterococcus faecalis* ATCC (**A** e **C**) e células tratadas com valores de CML (400 mg/L) do PEI (**B** e **D**), marcadas com DiBAC₄(3) (**A** e **B**) e IP (**C** e **D**), após 15 min. As leituras foram efetuadas no canal de fluorescência FL1 (530/30 nm) para o DiBAC₄(3) FL3 (670 nm) para o marcador IP. **84**

CAPÍTULO 4

TABELA 1 - Propriedades físico-químicas e mecânicas. 0 %, cimentos comerciais não modificados; 1 %, incorporação de QPEI nos cimentos na concentração 1 % m/m; 2 %, incorporação de QPEI nos cimentos na concentração 2 % m/m. AH, AH Plus; PCS, Pulp Canal Sealer EWT. * Diferença estatística entre o grupo teste e o grupo de cimento comercial ($p < 0,05$). **111**

FIGURA 1 - Efeito da ação do QPEI sobre a formação e desagregação dos biofilmes de *E. faecalis* ATCC e clínica (EF1), em percentagem de células metabolicamente ativas (método XTT). **A**: inibição da formação de biofilme *E. faecalis* ATCC, **B**: inibição da formação de biofilme *E. faecalis* clínica, **C**: desagregação do biofilme *E. faecalis* ATCC e **D**: desagregação do biofilme *E. faecalis* clínica.* Diferença estatística em relação ao controlo positivo (concentração 0 mg/mL) ($p < 0,05$). **99**

FIGURA 2 - Histogramas representativos da análise de citometria de fluxo em relação a células não tratadas do microrganismo *E. faecalis* ATCC (**A** e **C**) e células tratadas com valores de CML (1 % m/v) do QPEI (**B** e **D**), marcadas com DiBAC₄(3) (**A** e **B**) e IP (**C** e **D**), após 15 min. As leituras foram efectuadas no canal de fluorescência FL1 (530/30 nm) para o DiBAC₄(3) e FL3 (670 nm) para o marcador IP. **100**

FIGURA 3 - Teste de contacto direto. Sobrevivência de diferentes estirpes de *Enterococcus faecalis* após 10, 30 e 60 min de contacto com os cimentos incorporados com nanopartículas de QPEI a 1 % e 2 %. Amostras frescas (A-C); amostras envelhecidas, após 7 dias de endurecimento (D-F). CT, controlo positivo; PCS, Pulp Canal Sealer EWT; AH, AH Plus. * Valores significativamente diferentes em relação aos cimentos comerciais, no mesmo período de tempo ($p < 0,05$). **109**

FIGURA 4 - Resultado do Teste Difusão em Agar (ADT). Zona de inibição de crescimento das amostras do cimento PCS e PCS 2 % (nanopartículas de QPEI 2 % m/m), em duplicado, contra *Enterococcus faecalis* ATCC. **110**

FIGURA 5 - Efeitos de cimentos endodônticos sobre os biofilmes de duas estirpes de *Enterococcus faecalis* (ATCC e RW35). Ensaio antibiofilme: contato-direto (**A**) e membrana de restrição (**B**). **119**

FIGURA 6 - Efeitos dos cimentos endodônticos sobre os biofilmes de duas estirpes de *Enterococcus faecalis* (ATCC e RW35). Ensaio antibiofilme de cristal de violeta. **A**, extratos de cimentos 24 h; **B**, extratos de cimentos 48 h; **C**, suspensão dos cimentos 48 h. **119**

CAPÍTULO 5

FIGURA 1 - Resposta das células osteoblásticas e osteoclásticas aos extratos (diluições de 1:5000 a 1:20) de AH Plus e AH Plus-QPEI. **A**: ADN e atividade de ALP em culturas de células osteoblásticas e ADN e atividade TRAP em culturas de células osteoclásticas. **B** e **C**: apoptose, expressa como % da atividade da caspase-3 comparada com o controle, no dia 21, em culturas de células osteoblásticas (**B**) e osteoclásticas (**C**). * Significativamente diferente do controle (ausência do extrato). **135**

FIGURA 2 - Resposta das células osteoblásticas e osteoclásticas aos extratos (diluições 1:5000 a 1:20) dos cimentos PCS e PCS-QPEI. **A**: ADN e atividade de ALP em culturas de células osteoblásticas e ADN e atividade da TRAP em culturas de células osteoclásticas. **B** e **C**: apoptose expressa como % da atividade da caspase-3 comparada com o controle no dia 21, em culturas de células osteoblásticas (**B**) e osteoclásticas (**C**). * Significativamente diferente do controle (ausência do extrato). **137**

FIGURA 3 - Vias de sinalização intracelular envolvidas na resposta osteoblástica e osteoclástica nas culturas controle e nas culturas expostas aos extratos dos cimentos AH Plus e PCS, comerciais e modificados pela incorporação de QPEI (diluição 1:500). As culturas foram tratadas com inibidores de várias vias e foram avaliadas no dia 21, para as atividades de ALP e TRAP, respetivamente, em culturas de células osteoblásticas e osteoclásticas. * Significativamente diferente do controle (ausência de inibidor). **139**

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

°C	Grau Celsius
%	Percentagem
µg	Microgramas
µL	Microlitros
µM	Micromolar
α-MEM	<i>alfa-Minimal Essencial Medium</i>
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ADT	Teste de Difusão em Agar
ALP	Fosfatase Alcalina
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BHIA	Caldo de <i>Brain-Heart</i>
BHIB	Meio de Cultura <i>Brain-Heart</i>
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standard Institute</i>
CML	Concentração Mínima Letal
DCT	Teste de Contacto Direto
DiBAC₄(3)	Cloreto de bis-(ácido 1,3-dibutilbarbiturico) trimetina oxonol
DO	Densidade Ótica
EM	Mobilidade Electroforética
FBS	Soro Bovino Fetal
FUN-1	2-cloro-4-(2,3 dihidro-3-metil-(benzo-1,3-tiazol-2-il)-metilideno)-1-fenilquinolinio iodado
g	Gramas
h	Horas
HMSC-bm	<i>Human Mesenchymal Stem Cells - Bone Marrow</i>
IP	Iodeto de Propídeo
ISO	<i>International Standard Organization</i>
LB	Meio de Cultura <i>Luria-Bertani</i>
M	Molar
ME	Membrana Externa
mg	Miligramas
MHA	Caldo de Cultura <i>Mueller-Hinton</i>
MHB	Meio de Cultura <i>Mueller-Hinton</i>
min	Minutos
mM	Milimolar
mm	Milímetros
m/m	Concentração Mássica
MS	Meio de Cultura <i>Mitis Salivarius</i>
mV	Milivolt
mW	Miliwatt
ng	Nanograma

nm	Nanómetro
nM	Nanomolar
p	Probabilidade
PBS	Solução Tampão de Fosfato
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PEI	Polietilenoimina
pNPP	Para-nitrofenilfosfato
QPEI	Amónia Quaternária de Polietilenoimina
rpm	Rotações por minuto
RPMI	Meio de Cultura <i>Rosewell Park Memorial Institute</i>
seg	Segundos
TRAP	Fosfatase Ácida Resistente ao Tartarato
TSB	Meio de Cultura <i>Tryptic Soy Broth</i>
UFC	Unidades Formadoras de Colónias
UI	Unidade Internacional
UV	Ultravioleta
V	Volt
XTT	2,3-bis-(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-[(fenilamino)carbonil]-2H-hidróxido de tetrazólio
YPD	Meio de Cultura <i>Yeast Peptone Dextrose</i>

ENQUADRAMENTO

A Endodontia é uma área da Medicina Dentária que desempenha um papel essencial na promoção da saúde oral e que pode também contribuir para a saúde sistémica, pela redução da carga microbiana oral infecciosa. Primariamente, a Endodontia dedica-se à prevenção e tratamento da periodontite apical, uma doença inflamatória de etiologia infecciosa que pode apresentar diferentes manifestações clínicas. A periodontite apical, tal como a cárie e a doença periodontal, é das doenças orais que mais frequentemente afeta os seres humanos.

33

Atualmente, o tratamento endodôntico tem um grande impacto na prática clínica diária do médico dentista, pela crescente importância atribuída à preservação dos dentes. Se por um lado o médico dentista deve conhecer e acompanhar os avanços científicos da área, afim de proporcionar o melhor tratamento possível, o paciente informado é mais exigente quanto à qualidade e durabilidade dos seus tratamentos. Ao longo dos anos, a utilização de materiais inovadores tornou-se essencial na medida em que a investigação médica explora novas fronteiras científicas e diferentes aplicações para tratar e preservar os dentes. Este conhecimento contínuo é necessário para o desenvolvimento de novas técnicas e materiais.

A confirmação de que os microrganismos e os seus produtos exercem um papel decisivo na patogénese e na perpetuação das lesões perirradiculares confere ao tratamento endodôntico uma intervenção clínica de extrema importância. Este, deve ser pautado por procedimentos criteriosos e baseados em evidências científicas, com o objetivo máximo de eliminar eficazmente todos os microrganismos do sistema de canais radiculares. O tratamento endodôntico envolve assim um esforço considerável na prevenção da contaminação do sistema de canais radiculares e na eliminação, ou pelo menos redução, dos microrganismos para um número compatível com a cura dos tecidos perirradiculares. Desta forma, para evitar a reinfecção do sistema de canais radiculares, é necessário que a obturação, nomeadamente o cimento endodôntico, cumpra determinados requisitos. A necessidade de apresentar efeitos bactericidas e antibiofilme, ou pelo menos promover um ambiente desfavorável ao crescimento bacteriano, é uma característica de extrema

importância. Muitos investigadores dedicaram-se à análise da atividade antimicrobiana de vários cimentos de obturação constatando que estes materiais apresentam reduzida capacidade antimicrobiana. A variação dos resultados obtidos, dependentes do método de avaliação de atividade antimicrobiana e do tempo de endurecimento dos materiais, é de conhecimento generalizado.

A nanotecnologia é um campo extremamente promissor de criação de novas aplicações na área da saúde. Considerando a possibilidade de aumentar a eficácia terapêutica dos cimentos obturadores através da incorporação de nanopartículas, aliada aos poucos estudos de investigação nesta área de conhecimento, parece relevante a realização de estudos que se direcionem neste sentido. O avanço científico e a compreensão da microbiologia das infecções endodônticas e da resposta do hospedeiro é a base para estabelecer protocolos de tratamento baseados em evidências científicas que ofereçam um resultado previsível, sinónimo de sucesso do tratamento endodôntico.

C A P Í T U L O 1

INTRODUÇÃO

1.1. SUCESSO DO TRATAMENTO ENDODÔNTICO

O tratamento endodôntico tem como objetivo principal prevenir a periodontite apical ou tratá-la, quando presente. A observação de sinais e/ou sintomas de periodontite apical em dentes tratados endodônticamente pode ser consequência de uma infecção que se desenvolveu pós tratamento ou que persistiu após a realização do mesmo ou ainda, que depois de ter desaparecido surgiu de novo, situação designada por infecção recorrente.

Geralmente, quando os procedimentos de tratamento não alcançam padrões recomendados no que se refere à prevenção e controle da infecção endodôntica define-se por insucesso do tratamento endodôntico. O insucesso do tratamento endodôntico tem sido particularmente relacionado com erros cometidos durante a intervenção clínica, que podem conduzir a uma limpeza, desinfecção, conformação e/ou obturação incompleta ou insuficiente do sistema de canais radiculares (1, 2). A ocorrência de acidentes como fratura de instrumentos, formação de degraus e perfurações, desvio apical, sobreobturação ou subobturação poderão não colocar em risco o resultado do tratamento endodôntico se não estiverem associados, concomitantemente, à presença de infecção endodôntica (3).

O estabelecimento das taxas de sucesso e insucesso da terapêutica endodôntica deve considerar critérios clínicos e radiográficos, bem como o tempo de acompanhamento do caso clínico. O período mínimo de 1 ano de *follow-up* do tratamento endodôntico deve ser considerado (4). De acordo com a Sociedade Europeia de Endodontia (5) os seguintes parâmetros clínicos são indicativos de sucesso do tratamento endodôntico: ausência de dor, tumefação e outros sintomas, ausência de trajeto fistuloso, dente funcional na arcada dentária e evidência radiológica de uma normalidade do espaço do ligamento periodontal em torno da raiz. Na presença de uma imagem radiográfica, compatível com lesão de origem endodôntica, que mantém as dimensões iniciais ou apenas sofre uma pequena diminuição de tamanho, o resultado é considerado incerto. Nesta situação, é aconselhável avaliar a lesão até que esta seja resolvida ou por um período mínimo de 4 anos. Se a lesão persistir após este tempo, considera-se associada a uma infecção persistente (5). A simples diminuição da lesão de periodontite apical, não é por isso sinónimo de sucesso mas apenas significa uma diminuição da infecção endodôntica, eventualmente insuficiente para níveis compatíveis com a cura dos tecidos perirradiculares (6). Um prognóstico previsivelmente favorável pode ser revertido se ocorrer infecção ou reinfeção (7).

Casos clínicos aparentemente bem realizados que incorreram em fracasso têm sido associados, na maioria dos casos, a fatores microbianos. Fatores como a existência de interações microbianas,

a expressão de fatores de virulência em número suficiente para causar lesão perirradicular, a localização estratégica dos microrganismos no canal radicular, o microambiente endodôntico favorável à expressão dos genes de virulência, as defesas do hospedeiro que, ao mesmo tempo que tentam conter a infecção também conduzem ao dano tecidual associado à lesão perirradicular, contribuem e favorecem a persistência e/ou recorrência de microrganismos (6, 8).

Fatores não microbianos podem também ser considerados como causa de insucesso do tratamento endodôntico (2). Entende-se por fatores não microbianos a reação de corpo estranho, que pode induzir ou perpetuar uma lesão periapical após o tratamento endodôntico, decorrente da extrusão para os tecidos perirradiculares de material obturador ou da celulose, proveniente dos cones de papel, entre outros (fatores extrínsecos), bem como a presença de epitélio de um quisto verdadeiro ou a presença de cristais de colesterol (fatores intrínsecos) (9). A literatura sugere ainda que, algumas variações individuais relacionadas com alterações sistêmicas podem afetar o sistema imunológico do paciente e influenciar a resposta do hospedeiro à infecção, fatores designados por modificadores de doença. O polimorfismo genético, o tabagismo, a diabetes *mellitus*, a infecção pelo vírus da imunodeficiência humana, são exemplo de fatores modificadores de doença, relacionados com o hospedeiro (10-12).

38

Importa ainda referir que os índices de sucesso e insucesso da terapia endodôntica estão relacionados com condições predisponentes pré-operatórias, operatórias e pós-operatórias. Os fatores pré-operatórios incluem a idade, sexo, localização do dente, presença ou ausência de lesões, tamanho da lesão, condição pulpar, quadro assintomático ou sintomático e condição periodontal. Os fatores operatórios incluem o comprimento de trabalho, a qualidade da desinfecção e preparação químico-mecânica e a qualidade da obturação. O fator pós-operatório está relacionado com a qualidade do selamento coronário inerente ao tipo de restauração efetuada pós-tratamento endodôntico (13-17).

1.2. CONSIDERAÇÕES MICROBIOLÓGICAS

Os microrganismos são o principal fator etiológico das lesões pulpares e periapicais com papel de extrema relevância na indução e perpetuação de processos inflamatórios da polpa e dos tecidos perirradiculares (18-20). No final do século XIX, o primeiro estudo de microbiologia endodôntica realizado por Miller (1984), associou a presença de microrganismos à etiologia das patologias pulpares e dos tecidos perirradiculares. Um estudo clássico de Kakehashi (1965) confirmou esta

teoria pela análise histológica de polpas dentárias de ratos convencionais e *germ-free*, expostas ao meio oral. A polpa dentária dos ratos convencionais sofreu necrose associada à destruição óssea perirradicular, enquanto nos animais *germ-free* a polpa apresentou reparação pela neoformação dentinária. A presença ou ausência de bactérias foi determinante para o desenvolvimento da doença pulpar e periapical (19). Até meados da década de 70, perdurou o conceito da predominância de bactérias anaeróbias facultativas nas infecções endodônticas. No entanto, o desenvolvimento e aperfeiçoamento de técnicas de cultura de microrganismos anaeróbios estritos permitiram que Sundqvist (1976) contribuísse com novas perspectivas de conhecimento da microbiologia das infecções endodônticas. Atualmente, a etiologia das doenças pulpares e perirradiculares é referida como polimicrobiana e, além de incluir a presença de várias espécies bacterianas, também inclui fungos e archaeas (21, 22). Apesar da lista relativamente longa de bactérias identificadas nas infecções endodônticas, vinte a trinta espécies são inevitavelmente as mais prevalentes e, por isso, consideradas como os principais patógenos endodônticos. De uma forma mais resumida e generalizada, estas espécies pertencem aos gêneros: *Fusobacterium*, *Porphyromonas*, *Prevotella*, *Treponema*, *Tannerella*, *Parvimonas*, *Pseudoramibacter*, *Actinomyces*, *Streptococcus* e *Enterococcus* (23).

39

A literatura demonstra que a composição microbiana presente nos canais radiculares dos dentes infetados pode variar de acordo com o tipo de infecção, a presença de sintomatologia, a localização no canal radicular e com o tipo de população de estudo. As infecções primárias são causadas por microrganismos orais que invadem e colonizam o tecido pulpar necrosado, sendo consideradas a principal causa etiológica da periodontite apical. Este tipo de infecções é caracterizado por uma comunidade microbiana mista, composta por dez a vinte espécies e uma carga bacteriana de 10^3 a 10^8 células, por canal. As bactérias anaeróbias estritas são as mais prevalentes, com maior frequência os gêneros de Gram-negativo: *Tannerella*, *Treponema*, *Prevotella*, *Dialister*, *Porphyromonas*, *Fusobacterium*, *Campylobacter* e *Veillonella*, e de Gram-positivo os gêneros *Parvimonas*, *Filifactor*, *Pseudoramibacter*, *Olsonella*, *Actinomyces*, *Peptostreptococcus*, *Streptococcus*, *Propionibacterium* e *Eubacterium* (21, 22, 24). As infecções secundárias são causadas pela introdução de microrganismos no sistema de canais radiculares mediante a intervenção clínica, ou seja, durante ou após o tratamento endodôntico. As infecções persistentes ocorrem quando os microrganismos envolvidos nas infecções primárias ou secundárias, de alguma forma, resistiram aos procedimentos do tratamento endodôntico. Clinicamente, as infecções persistentes e secundárias são responsáveis por diversas complicações que incluem a persistência de sintomas, a ocorrência de *flare-ups* e o insucesso do tratamento endodôntico. Complicações infecciosas resultantes do tratamento endodôntico de dentes com polpa viva ou sem rarefação periapical prévia, são exemplos de infecções secundárias (7). Nas infecções secundárias/persistentes a carga bacteriana é de 10^2 a 10^5 por canal e o número de espécies varia de um a cinco. Contudo, se associado a um tratamento inadequado, pode variar de

duas a trinta. Está descrita a predominância de bactérias anaeróbias facultativas dos gêneros de Gram-positivo: *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Pseudoramibacter*, *Propionibacterium*, *Filifactor* e *Actinomyces* (25-27). No entanto, importa referir que a distinção entre as infecções secundárias/persistentes, relevante em termos teóricos, não é possível aplicar na maioria das situações clínicas.

A espécie *Enterococcus faecalis* é a mais comumente isolada em dentes com infecção endodôntica secundária ou persistente, estando particularmente associada aos casos de insucesso do tratamento endodôntico (28, 29). A capacidade de sobrevivência do microrganismo *Enterococcus faecalis*, em condições ambientais adversas, está relacionada com várias características e fatores de virulência (30). Este microrganismo é capaz de penetrar e colonizar os túbulos dentinários com formação de biofilmes, os quais lhe permitem sobreviver à ação dos instrumentos, irrigantes e medicamentos utilizados durante o tratamento endodôntico. A capacidade de resistir a elevados valores de pH mediados pelo hidróxido de cálcio, usado como medicação intracanal, foi descrita (31). Além disso, o microrganismo *E. faecalis* tem a capacidade de entrar num estado viável mas não cultivável, por um mecanismo de sobrevivência adotado quando exposto a condições ambientais desfavoráveis. Nestas condições, apesar da incapacidade de crescer, estas bactérias mantêm a sua viabilidade e patogenicidade, possuindo a capacidade de recolonização quando as condições ideais são retomadas (7). A aptidão para causar monoinfecção e sobreviver a longos períodos de privação nutricional, sem depender de nutrientes derivados do metabolismo de outras bactérias, é outra característica do *E. faecalis* (32). Todas estas propriedades ajudam a explicar a elevada prevalência deste microrganismo nos casos de insucesso endodôntico.

40

1.2.1. BIOFILMES

Os biofilmes representam uma estratégia de sobrevivência dos microrganismos a ambientes extremos. Este termo designa complexos ecossistemas microbianos constituídos por aglomerados de vários microrganismos com mecanismos adaptativos eficientes e ajustados a um ambiente adverso e a novas circunstâncias biológicas, formando comunidades estruturadas, coordenadas e funcionais. A formação de biofilme é um processo complexo e coordenado que ocorre de acordo com as condições ambientais e envolve múltiplas vias de sinalização de bactérias, incluindo a comunicação intercelular entre as comunidades bacterianas, processo designado por *quorum sensing*. Mas também envolve respostas a sinais químicos e nutricionais e a formação de uma matriz extracelular, formada por hidratos de carbono, proteínas e outras macromoléculas (33). Estas comunidades de microrganismos formam-se sobre uma superfície ou interface e são incorporadas numa matriz polimérica comum que proporciona proteção a uma variedade de

condições agressivas ou tensões ambientais (34). Nos biofilmes, a população bacteriana representa cerca de 10-15 % da massa total do biofilme e a matriz extracelular, 85-90 % (23). A estrutura do biofilme proporciona uma cooperação nutricional e metabólica entre células residentes da mesma ou de diferentes espécies (35). Por estas razões, as bactérias presentes em biofilmes exibem um aumento de resistência a uma vasta gama de agentes antimicrobianos ou defesas do hospedeiro, em comparação com as suas homólogas em estado planctónico (36, 37). Outra característica importante dos biofilmes é a transcrição de genes que pode alterar fenótipos e promover determinadas capacidades de virulência e de subsistência. A resposta e adaptação às alterações das condições ambientais depende da natureza do substrato e dos microrganismos envolvidos (38). De uma forma geral, a formação de biofilmes é uma estratégia importante usada por um grande número de microrganismos.

A terapêutica de patologias infecciosas causadas por biofilmes deve ser encarada de uma forma diferenciada. De acordo com Lewis (2001), três fatores podem ser considerados para explicar a resistência dos biofilmes aos antimicrobianos: a dificuldade de penetração no interior das comunidades microbianas, a característica de crescimento lento apresentado por algumas células presentes no biofilme e ainda a expressão de alguns genes biofilme-específicos (39). A matriz polimérica restringe a penetração de substâncias antimicrobianas pela barreira de difusão e pela carga negativa. Esta propriedade poderá fornecer resistência efetiva às células em comunidades perante grandes moléculas como as do sistema complemento, proteínas antimicrobianas e moléculas positivamente carregadas, como as de certos agentes antimicrobianos. O crescimento lento característico das células do biofilme dificulta a ação dos agentes antimicrobianos, os quais são geralmente mais efetivos sobre células em crescimento (40). Por exemplo, os beta-lactâmicos só exercem a sua função sobre células em crescimento; outros, como os aminoglicosídeos e fluoroquinolonas podem atuar sobre células que não estão em fase de crescimento, mas são evidentemente mais efetivos em células em crescimento exponencial. Além disso, a diferente expressão génica de algumas células presentes nos biofilmes confere vantagens metabólicas, adaptativas e de defesa que protegem este complexo ecossistema.

Os microrganismos do biofilme presente no sistema dos canais radiculares estão protegidos dos mecanismos de defesa do hospedeiro, assim como da ação de antimicrobianos sistémicos devido à ausência de circulação sanguínea, já que se encontram num espaço avascular (41). O reconhecimento do biofilme como o principal modo de estabelecimento de bactérias nos canais radiculares reforça ainda mais a dificuldade atual de combate às infeções endodônticas, seja pelo tratamento endodôntico convencional, seja pela falta de eficácia dos antibióticos sistémicos contra estas infeções (42).

1.2.2. BIOFILMES E PERIODONTITE APICAL

Atualmente, a periodontite apical é considerada uma doença causada por biofilmes bacterianos. Enquanto as bactérias, presentes na forma planctônica no canal principal, são mais facilmente eliminadas pela ação dos instrumentos e substâncias utilizadas durante o tratamento endodôntico, os biofilmes aderidos às paredes dos canais radiculares ou nos istmos, canais laterais e túbulos dentinários são definitivamente mais difíceis de eliminar. Os túbulos dentinários são frequentemente invadidos pelas bactérias presentes nos biofilmes que revestem a parede do canal. A infecção dos túbulos dentinários ocorre em cerca de 70-80 % dos dentes que evidenciam lesões de periodontite apical, uma vez que o diâmetro dos túbulos dentinários é suficientemente amplo para permitir a penetração da maioria dos microrganismos endodônticos (23). Um processo infeccioso de longa duração permite que as bactérias tenham tempo e condições de adaptação ao meio para o desenvolvimento de comunidades em forma de biofilme. Os biofilmes são mais frequentes em dentes associados a grandes lesões periapicais (> 10 mm diâmetro) (23).

42

O biofilme endodôntico pode ser dividido nas seguintes categorias (35): biofilme intrarradicular, biofilme extrarradicular, biofilmes periapicais e infecções centradas nos biomateriais. Os biofilmes microbianos formados na dentina radicular são designados por biofilme intrarradicular. A primeira vez que foi descrita uma estrutura similar a biofilme em Endodontia foi em 1987, por Nair (43). O autor descreveu uma massa de bactérias, em forma de aglomerado, com a presença de material amorfo nos espaços interbacterianos, em dentes associados com periodontite apical. Segundo Ricucci & Siqueira (2010), foram descritos biofilmes intrarradulares em 77 % dos segmentos apicais de dentes com periodontite apical observados, especificamente, 80 % em canais não tratados e 74 % em canais tratados (44). Os biofilmes intrarradulares normalmente são finos mas constituídos por várias camadas de células, apresentando uma proporção variável entre as células bacterianas/populações bacterianas e a matriz extracelular, diferindo morfológicamente de indivíduo para indivíduo. Em algumas localizações o biofilme pode não ter espessura consistente mas apresenta uma camada uniforme, enquanto que noutros casos, forma uma massa densa que ocupa totalmente o lúmen do canal (23).

Os biofilmes formados na superfície externa radicular de dentes com periodontite apical assintomática ou associada a lesões refratárias ao tratamento endodôntico convencional são designados por biofilme extrarradicular. No entanto, segundo Ricucci & Siqueira (2010), as infecções extrarradulares na forma de biofilmes são pouco comuns e usualmente dependem de infecções intrarradulares, sendo mais frequentes em dentes com periodontite apical sintomática (44).

Os biofilmes periapicais são biofilmes que se formam nos tecidos periapicais de dentes com envolvimento endodôntico (45). A maioria dos microrganismos associados a dentes com periodontite apical está restrita ao sistema de canais, bem como corresponde maioritariamente a patógenos oportunistas sem capacidade de sobrevivência aos mecanismos de defesa do hospedeiro (nos tecidos periapicais). No entanto, bactérias do género *Actinomyces* e a espécie *Propionobacterium propionicum* presentes neste tipo de biofilmes são capazes de persistir nos tecidos periapicais. Assim, mesmo em situações de infeções extrarradiculares independentes, ou seja, pós-resolução bem sucedida de infeções intrarradiculares, este tipo de biofilmes é observado e definido como Actinomicose apical (ou periapical/perirradicular). O estabelecimento dos microrganismos nos tecidos periapicais em forma de colónias, coletivamente resistentes ao processo de fagocitose, permite a perpetuação das lesões periapicais crónicas (23).

A presença de biomateriais na região periapical, acessível ao sistema imunitário do hospedeiro, aumenta a suscetibilidade de desenvolver biofilmes nas superfícies artificiais dos biomateriais, os quais são designados por infeções centradas nos biomateriais.

43

A partir destes aspetos, a noção de biofilme presente no interior dos canais radiculares ou na superfície externa da raiz tem especial implicação na estratégia do tratamento endodôntico. Os esforços terapêuticos incluindo o tratamento antimicrobiano químico e mecânico devem ser reconsiderados uma vez que as comunidades microbianas em biofilme são extremamente difíceis de erradicar. Os restos de tecido necrosado que podem permanecer em irregularidades anatómicas presentes no sistema de canais radiculares (canais laterais, túbulos dentinários e espaços entre a parede do canal e o material obturador) representam uma dificuldade acrescida ao tratamento. Desta forma, e na tentativa de sanificar totalmente o ambiente do sistema de canais radiculares, mesmo que se realize uma boa preparação químico-mecânica com soluções de irrigação potencialmente eficazes, os microrganismos poderão permanecer no canal radicular, numa arquitetura e funções bastante peculiares que os tornam mais resistentes às medidas de limpeza e desinfeção.

A capacidade de formação de biofilmes pelo microrganismo *E. faecalis* é um mecanismo adicional que permite a estas bactérias resistirem à preparação químico-mecânica e sobreviver em condições extremas nos dentes tratados endodônticamente, como discutido previamente. Kishen *et al.* (46), investigaram a interação entre o biofilme de *E. faecalis* e o substrato de dentina radicular tendo sugerido diferenças induzidas na estrutura da dentina de acordo com os estádios dos biofilmes. A natureza persistente de *E. faecalis* no canal radicular pode estar relacionada com a sua capacidade de induzir a reprecipitação de apatite em biofilmes maduros, por um processo mediado por bactérias. George *et al.* (47) demonstraram que as diferentes condições de crescimento de *E. faecalis*

afetam as propriedades físico-químicas e ultraestruturais do biofilme formado e a capacidade de penetração nos túbulos dentinários. Também foram descritas diferenças na capacidade de formação de biofilmes de *E. faecalis* de acordo com a origem das estirpes. Segundo os investigadores (48) as estirpes de *E. faecalis* de origem endodôntica têm uma menor capacidade de formar biofilmes do que as estirpes orais e estirpes associadas a outras infecções humanas. No entanto, um outro estudo demonstrou uma grande quantidade de formação de biofilme a partir de estirpes de origem endodôntica (49). Sem dúvida, o *E. faecalis* apresenta diferentes capacidades de virulência entre as várias estirpes da espécie (50).

44

Os biofilmes de *E. faecalis*, em particular, têm atraído atenção porque sendo um dos microrganismos mais frequentemente associado com a doença pós-tratamento endodôntico, é também relevante o seu papel sob a forma de biofilme. A maioria dos estudos sobre a atividade antimicrobiana em Endodontia, tem incidido sobre a atividade antimicrobiana dos materiais endodônticos contra bactérias sob a forma planctônica, o que em geral, não representa as condições de crescimento *in vivo*. Recentemente vários investigadores têm introduzido modelos de biofilme para realizar estes testes (51-54). No entanto, é importante considerar que a atividade dos materiais sobre biofilmes cultivados em condições laboratoriais será previsivelmente superior do que sobre biofilmes naturais (*in vivo*). Os biofilmes são mais susceptíveis ao contacto direto com os agentes antimicrobianos *in vitro* do que no complexo sistema de canais radiculares (55). O desenvolvimento de modelos de biofilme *in vitro*, o mais semelhante possível às condições clínicas, é uma necessidade reconhecida porque só assim a extrapolação dos resultados poderá ser mais previsível. Atualmente, estão descritos vários modelos experimentais de formação de biofilme que envolvem o sistema de células de fluxo, membranas de nitrato de celulose, utilização de dentes humanos infetados *in vivo* e *ex vivo*, utilização de dentes de cães *in vivo* e de bovino *ex vivo* infetados (45). No entanto, o número validado de modelos experimentais de biofilmes associado a estudos de estratégias antimicrobianas é limitado.

Embora tenham sido investigadas potenciais soluções irrigantes e substâncias a serem usadas como medicação intracanal, com ação antibiofilme (51, 52, 56), esta propriedade em cimentos endodônticos não tem sido estudada extensivamente. Recentemente, um estudo avaliou a atividade antibiofilme de diferentes cimentos endodônticos contra *E. faecalis*. No entanto, o método utilizado apenas avaliou o contacto direto do cimento endurecido com o biofilme, o que torna difícil extrapolar os resultados para a prática clínica onde o primeiro contacto ocorre com os cimentos de obturação ainda frescos (57). Com o objetivo de melhor reproduzir as condições clínicas, outro estudo investigou a atividade antibacteriana e a eficácia antibiofilme de diferentes nanopartículas catiónicas (nanopartículas de óxido de zinco, nanopartículas de

quitosano, mistura de óxido de zinco e nanopartículas de quitosano) isoladas e incorporadas num cimento endodôntico, à base de óxido de zinco e eugenol, tanto por contacto direto como por contacto indireto, mediante a interposição de uma membrana de restrição (58). Além do estudo de algumas propriedades físicas do cimento incorporado com as nanopartículas, foi avaliada a capacidade de adesão bacteriana em dentina radicular tratada com estas nanopartículas, ou seja, foi estudada a eficácia antibiofilme pela prevenção da adesão bacteriana. Este estudo demonstrou que a incorporação de nanopartículas não alterou a fluidez característica do cimento e melhorou as propriedades antibacterianas. Os resultados demonstraram ainda que houve uma redução significativa na adesão de *E. faecalis* nos espécimes de dentina tratada com nanopartículas ($p < 0,05$), o que levou os autores a destacarem o potencial das nanopartículas na desinfecção dos canais radiculares.

O conceito de biofilme endodôntico como unidade de patogenicidade para a periodontite apical é muito importante para a melhor compreensão dos mecanismos de resistência antimicrobiana e, ao mesmo tempo, para abrir novas perspectivas para o tratamento endodôntico.

45

1.3. CIMENTOS ENDODÔNTICOS

O sucesso do tratamento endodôntico requer uma obturação hermética com o máximo de impermeabilização e o mínimo de agressão aos tecidos vivos perirradiculares. A obturação definitiva do sistema de canais radiculares deverá eliminar os espaços vazios perpetuando a desinfecção obtida após a preparação químico-mecânica e reduzindo os riscos potenciais de reinfecção. Deve ser tridimensional promovendo um selamento eficaz, coronal e apical, do sistema de canais radiculares. A obturação desempenha um papel essencial na manutenção da assepsia, obtida nas etapas anteriores do tratamento, no controle da reinfecção, preenchendo fisicamente o espaço radicular, e promovendo atividade antimicrobiana pelos seus constituintes. Devido à complexidade do sistema de canais radiculares existe uma dificuldade acrescida em eliminar os microrganismos que permanecem nos canais, túbulos dentinários, superfície apical radicular externa e no peridodonto apical, mesmo depois de preconizados todos os procedimentos considerados ideais para um tratamento endodôntico de sucesso.

A preparação químico-mecânica do tratamento endodôntico compreende a utilização simultânea de instrumentos endodônticos e substâncias químicas como soluções irrigadoras. A ação mecânica realizada pela instrumentação e pelo fluxo e refluxo da solução irrigadora apresenta uma função

de destaque na eliminação da infecção instalada no sistema de canais radiculares, pois reduz significativamente o número de microrganismos do lúmen do canal principal. No entanto, a desinfecção e eliminação total de microrganismos somente com a ação mecânica dos instrumentos não é observada. A utilização de substâncias químicas com elevada atividade antimicrobiana como soluções irrigadoras, medicação intracanal e cimentos endodônticos é essencial. De acordo com Mickel *et al.* (59) os objetivos do selamento do sistema de canais radiculares são os seguintes: prevenir que o exsudado periapical se difunda para os espaços vazios do canal, o que poderia significar aporte nutricional para as bactérias persistentes; evitar a infiltração e recolonização bacteriana; e prevenir que as bactérias residuais tenham acesso aos tecidos periapicais, ou seja, isolar os microrganismos remanescentes (60).

46

A técnica clássica de obturação associa um cimento endodôntico com um material central sólido que funciona como um núcleo. O material mais utilizado é a guta-percha mas também o Resilon e os cones de guta-percha revestidos por outros materiais são usados como núcleos. O material de guta-percha pode apresentar diversas formas: cones (padronizados e auxiliares), guta-percha injetável (bastões) e sistemas transportadores de guta-percha (i.e. sistema Thermafil (Dentsply DeTrey, Konstanz, Alemanha) ou sistema Softcore (CMS Dental, Copenhaga, Dinamarca)). Os cones de guta-percha são o material mais popular e estão disponíveis em diferentes tamanhos e conicidades. O Resilon é uma resina sintética à base de um polímero de policaprolactona desenvolvido e introduzido na Endodontia baseado nos mesmos princípios de adesão da Dentisteria. Este material também está disponível sob a forma de cones principais e cones auxiliares e em forma de bastões para o emprego de técnicas de injeção de material termoplastificado. As suas propriedades de manuseamento são semelhantes às de guta-percha, podendo ser usado em qualquer técnica de obturação. Pode ser utilizado com Ephiphany, (Pentron Technologies Inc., Wallingford, Connecticut, EUA) um novo cimento de resina que, na tentativa de formar uma ligação adesiva na interface do material do núcleo (Resilon), parede do canal e cimento, cria uma ligação que é designada de “monobloco”. Sendo um sistema à base de resina é compatível com as atuais técnicas restauradoras em que os núcleos e espigões são colocados com sistemas resinosos de adesão. Os cones de guta-percha revestidos foram desenvolvidos segundo o mesmo princípio básico do Resilon (uma ligação entre a parede de dentina do canal, o núcleo do material e o cimento). Atualmente estão disponíveis duas versões de revestimento dos cones de guta-percha: revestimento com resina (Ultradent, South Jordan, Utah, EUA) que utiliza em conjunto o cimento EndoREZ (Ultradent) e revestimento com ionómero de vidro (Brasseler EUA, Savannah, Geórgia, EUA) que utiliza o cimento de ionómero de vidro Active GP Plus (Brasseler).

Os cimentos de obturação devem preencher os espaços vazios entre o material de núcleo e as paredes dentinárias dos canais radiculares. Uma vez que, fisicamente, os materiais que funcionam como núcleo são incapazes de preencher e obturar todas as irregularidades dos canais e, quimicamente não aderem à dentina, os cimentos endodônticos têm um papel fundamental na obturação.

Como referido, durante todas as fases do tratamento endodôntico procura-se eliminar eventuais falhas da cadeia asséptica e da capacidade de erradicar os microrganismos dos canais radiculares. A escolha de um cimento endodôntico com substancial atividade antimicrobiana pode ter capacidade de reduzir a contagem de microrganismos remanescentes, particularmente, em casos de necrose pulpar e periodontite apical. Grossman (61) enumerou vários requisitos e características de um cimento endodôntico ideal entre eles, apresentar efeito antimicrobiano, promover um selamento hermético e ser biocompatível. Características como promover uma boa adesão entre o material e a parede do canal, facilidade de manipulação e de remoção do canal radicular, radiopacidade e não provocar a alteração de cor do elemento dentário, também são preconizadas. Os cimentos são necessários para facilitar a introdução dos núcleos (cones) no canal, reduzir a interface cones/paredes do canal e cone principal/cones acessórios (técnica de condensação lateral) e preencher irregularidades que não são preenchidas pelos núcleos.

47

Atualmente, não existem cimentos que satisfaçam todos os critérios nem técnicas que garantam o selamento adequado de todo o sistema canal. A grande variedade de cimentos de obturação disponíveis no mercado é sinónima do reconhecimento da inexistência de um material ideal. Vários estudos documentam a avaliação da eficácia de diferentes cimentos contra os vários microrganismos da população microbiana oral e os resultados demonstram a falta de validação dos protocolos, uma vez que a metodologia utilizada varia nos diferentes estudos, o que leva à obtenção de resultados ambíguos (62-65). A necessidade de uma maior investigação, no sentido da padronização dos métodos de avaliação da atividade antimicrobiana dos cimentos, é uma realidade. Também a biocompatibilidade é uma propriedade essencial nos cimentos endodônticos e a sua avaliação apresenta, de igual modo, dificuldades na interpretação e comparação de resultados obtidos nos diferentes estudos. A seleção de um cimento de obturação mais adequado não é fácil pela quantidade de resultados das inúmeras investigações de avaliação antimicrobiana, biocompatibilidade e capacidade de selamento. Além disso, outros fatores devem influenciar a seleção do material como: o diagnóstico da patologia pulpar e perirradicular, a dimensão da constrição apical, a facilidade de manipulação, a facilidade da sua remoção dos canais radiculares, o custo associado e, ainda, a percepção individual de cada profissional.

Os cimentos endodônticos são classificados de acordo com a sua constituição em cimentos à

base de óxido de zinco-eugenol, de resinas, de hidróxido de cálcio, de silicone, de ionómero de vidro e de agregado trióxido mineral (MTA). De acordo com esta classificação, o mecanismo de ação antimicrobiana também difere (66-69). Os cimentos mais utilizados na prática clínica e com um maior número de estudos disponíveis na literatura são os cimentos à base de óxido de zinco-eugenol, quer seja na sua composição mais básica pelo pó de óxido de zinco e o líquido eugenol, como nas formulações com a adição de resinas, bário, paraformaldeído, corticoides, etc. Também os cimentos à base de resina epóxica, principalmente os de série AH, tornaram-se amplamente utilizados devido ao facto de promoverem uma boa adesão às paredes dos canais radiculares e não conterem eugenol, agente com efeitos citotóxicos associados (70) e com interferência na polimerização das resinas utilizadas nas reconstruções coronárias (71). Por esta razão, os cimentos de obturação utilizados nos estudos que constituem este trabalho pertencem às classificações mencionadas, ou seja, à base de óxido de zinco-eugenol e à base de resina epóxica. De uma forma resumida, serão mencionados alguns aspetos referentes aos cimentos selecionados.

Cimento à Base de Óxido de Zinco-Eugenol

Os cimentos de óxido de zinco e eugenol foram introduzidos por Grossman em 1958, e desde então, a sua fórmula original tem sofrido alterações. A grande vantagem destes cimentos é o facto de não sofrerem contração, preencherem adequadamente todos os espaços, apresentarem baixo custo, facilidade de manipulação e boa radiopacidade. A solubilidade apresentada nos fluidos tecidulares e alguma toxicidade associada, são desvantagens atribuídas a estes cimentos. O endurecimento ou presa do cimento dá-se por reação de ácido-base, em que o óxido de zinco atua como base e o eugenol como ácido, formando um sal quelato de eugenelato de zinco e água. O eugenol tem efeito antibacteriano, anestésico, anti-inflamatório e também bactericida, em concentrações relativamente altas (10^{-2} a 10^{-3} mol/L). Os efeitos biológicos do eugenol variam com a sua concentração. Doses elevadas de eugenol inibem o crescimento e a respiração celular, provocando a morte celular, além de promoverem alterações vasculares e causarem efeitos neurotóxicos. No entanto, baixas concentrações têm propriedades farmacológicas desejáveis, como ação anti-inflamatória e analgésica. Os iões de zinco também podem inibir o crescimento bacteriano uma vez que, em concentrações elevadas, funcionam como inibidores enzimáticos e interferem no metabolismo bacteriano. Todavia, tanto o eugenol como os iões de zinco podem ter efeito citotóxico (70). Há ainda outros componentes que podem ser citotóxicos, como a resina adicionada para aumentar a adesão à dentina, o paraformaldeído para aumentar o efeito antimicrobiano e mumificante, os germicidas para a ação antisséptica e os corticoides para inibirem a inflamação e a dor pós-operatória. O extravasamento de uma grande quantidade de cimento para os tecidos perirradiculares permite uma maior difusão de eugenol, o qual pode interferir negativamente no processo de reparação tecidual.

Cimento à Base de Resina Epóxica

Os cimentos à base de resina epóxica surgiram como alternativa aos cimentos existentes no mercado em função das suas características como uma boa adesão à estrutura dentária, longo tempo de trabalho, facilidade de manipulação e boa penetração em canais laterais. O cimento AH26 foi o primeiro cimento de obturação que surgiu à base de uma resina, sendo uma combinação macromolecular sintética do grupo das resinas epóxicas, que apresenta na sua formulação um pó (óxido de bismuto, prata pulverizada, dióxido de titânio e hexametenotetramina) e uma pasta (resina éter de bisfenol A diglicidil). A partir de então, diversas modificações foram realizadas e deram origem a uma variada gama de cimentos endodônticos à base de resina epóxica, como é exemplo o cimento AH Plus (Dentsply DeTrey, Konstanz, Alemanha). O cimento AH Plus é um cimento composto por duas pastas, cuja polimerização resulta da reação resina epoxi-amina. Tem uma composição química complexa, pelo que são várias as substâncias que se podem libertar durante a reação de polimerização e causar efeito tóxico. Segundo a literatura, este cimento tem efeito antimicrobiano moderado, o que também pode ser causa de alguma toxicidade (72). Também é reconhecido um longo tempo de trabalho (4 h a 23°C) e de endurecimento (cerca de 8 h a 37°C) (4).

49

Nos trabalhos experimentais da presente investigação, a avaliação da atividade antibacteriana e antibiofilme e das propriedades físico-químicas e mecânicas dos cimentos de obturação, bem como a determinação da biocompatibilidade dos cimentos, utilizou o cimento Pulp Canal Sealer EWT (PCS) (Kerr Itália Srl, Salerno, Itália), como representante de um cimento à base de óxido de zinco-eugenol e o cimento AH Plus (Dentsply DeTrey, Konstanz, Alemanha), como representante de um cimento à base de resina epóxica.

1.3.1. ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

A atividade antimicrobiana dos cimentos endodônticos é importante para prevenir a contaminação durante a fase de manipulação, completar o efeito antimicrobiano das medidas de desinfecção do sistema de canais radiculares e inibir o crescimento de microrganismos que persistam no canal, após a preparação químico-mecânica.

A maioria dos testes laboratoriais aplicados ao estudo da atividade antimicrobiana dos cimentos utilizava o Teste de Difusão em Agar (ADT) como método *standard*, apesar das suas reconhecidas limitações. Este método de ensaio não distingue entre as propriedades bacteriostáticas e bactericidas dos materiais, sendo um método relativamente pouco sensível e semi-quantitativo.

A avaliação da atividade antimicrobiana de um cimento mediante este teste é influenciada pela solubilidade e difusão do material no meio (73, 74). Outras limitações do teste devem-se à ausência de definição de um meio de cultura adequado, densidade do inóculo, viscosidade do agar, condições de armazenamento das placas, tamanho e número de espécies por placa, tempo e temperatura de incubação. Por todas as limitações enumeradas, atualmente o método de ADT não é recomendado para a avaliação da atividade antimicrobiana nas investigações na área de Endodontia (75). Çobankara *et al.* (76), concluíram que a técnica, o tempo e os materiais de estudo afetam os resultados dos estudos microbiológicos propondo que, no processo de avaliação das propriedades antibacterianas dos cimentos endodônticos, deva ser utilizado mais do que um método de estudo.

50

O Teste de Contacto Direto (DCT), introduzido por Weiss *et al.* (77), é um método quantitativo e reprodutível que resolveu muitas das limitações do método ADT. Este teste é amplamente utilizado para a avaliação dos efeitos antimicrobianos dos materiais e cimentos endodônticos porque, supostamente, simula o contacto direto entre o material e os microrganismos em estudo, independentemente da solubilidade e difusão dos componentes antimicrobianos dos cimentos (64, 77). Geralmente, os resultados obtidos pelo DCT são fornecidos pela leitura em espectrofotómetro. Zhang *et al.* (78) propôs uma alteração do método para a determinação do efeito bactericida, para além da avaliação do efeito bacteriostático dos materiais. A contagem de bactérias sobreviventes pode ser calculada por cultura bacteriana pelo método de Unidades Formadoras de Colónias (UFC), após diferentes períodos de tempo de contacto com o material. A informação sobre o efeito bactericida é clinicamente mais pertinente porque as bactérias residuais, que são inibidas pelo agente antimicrobiano, podem crescer novamente quando os efeitos inibitórios cessam. O fato de não fornecer nenhuma informação sobre a ação antibiofilme dos cimentos de obturação constitui uma desvantagem deste método (79).

Inúmeros estudos de avaliação de atividade antimicrobiana, de diferentes cimentos endodônticos, apresentam diferentes efeitos inibitórios dependendo do tipo de cimentos mas também do método de avaliação e dos tempos selecionados. Mediante o teste de avaliação utilizado, os resultados controversos obtidos através do ADT e DCT tornam difícil a comparação dos materiais. A maioria dos cimentos endodônticos apresenta uma atividade antibacteriana fraca e de curta duração, que diminui significativamente após endurecimento dos materiais (72, 73, 80-82). A atividade antimicrobiana de cada cimento endodôntico diminui com o tempo e depende da suscetibilidade microbiana (83). Considera-se que nenhum cimento de obturação presente no mercado inibe por completo o crescimento bacteriano.

Aos cimentos à base de óxido de zinco-eugenol é atribuída uma pronunciada atividade antibacteriana, amplamente descrita na literatura, independentemente dos métodos utilizados para a sua avaliação (72, 76, 83, 84). A maior parte dos efeitos antimicrobianos são atribuídos ao eugenol (85), embora o óxido de zinco e a prata, presentes na composição do pó do cimento, também podem contribuir com alguns efeitos.

O cimento AH Plus tem sido continuamente utilizado em estudos comparativos de propriedades antimicrobianas, físico-químicas, mecânicas e biológicas de cimentos endodônticos (86, 87). O efeito antibacteriano do AH Plus pode estar relacionado com a resina éter de bisfenol A diglicidil (88). Pizzo *et al.* (89) utilizou o teste DCT e concluiu que apenas as amostras de AH Plus recentemente preparadas, ou seja, as amostras “frescas” demonstraram atividade antibacteriana, enquanto que as amostras de 24 h e 7 dias (após endurecimento) não demonstraram efeitos significativos contra o microrganismo *E. faecalis*. Resultados semelhantes foram descritos por outros autores (72, 78).

1.3.2. PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS E MECÂNICAS

Com o objetivo de determinar de uma forma sistematizada as propriedades físicas e tecnológicas dos materiais de obturação, os ensaios para estas avaliações foram padronizados por organizações como a *American National Standards Institute* (ANSI) e a *American Dental Association* (ADA 2000) nos EUA e pela *International Organization for Standardization* (ISO), a nível mundial.

As propriedades físico-químicas influenciam a fluidez apresentada pelos materiais. Esta propriedade tem um papel importante nos cimentos endodônticos pois está associada à capacidade do material penetrar nas irregularidades, istmos e ramificações características do complexo sistema de canais radiculares. Siqueira *et al.* (73) testaram a fluidez de vários cimentos (Pulp Canal Sealer, Fill Canal, ThermaSeal, Sealer 26, AH Plus e Sealer Plus) e observaram que os cimentos AH Plus e Pulp Canal Sealer apresentaram valores significativamente superiores aos restantes. A profundidade e a densidade de penetração dos cimentos nos túbulos dentinários são influenciadas pela fluidez do cimento endodôntico. Mamootil & Messer (90) demonstraram que os cimentos resinosos (AH26 e EndoREZ) apresentam uma maior capacidade de penetração, referente à profundidade e densidade, quando comparados com o cimento Pulp Canal Sealer EWT. No entanto, se por um lado a fluidez é importante pelas razões expostas, por outro lado, um excesso de fluidez pode levar a um risco aumentado de extravasamento para os tecidos periapicais, comprometendo eventualmente a cura das lesões periapicais.

O tempo de trabalho e o tempo de endurecimento, apresentados por um cimento de obturação, são essencialmente testes de controlo sobre a estabilidade do material e estão dependentes dos componentes que fazem parte da sua constituição, do tamanho das partículas da fase sólida (pó), da pureza das matérias-primas e das condições do ambiente clínico (humidade relativa do ar e temperatura) (91). Não há um tempo de endurecimento estipulado mas clinicamente deve de ser longo o suficiente para permitir a sua colocação nos canais radiculares de forma a realizar uma obturação adequada (92). Ao cimento AH Plus é atribuído um longo tempo de endurecimento associado a uma conversão gradual de monómeros em polímeros, devido a uma polimerização lenta do cimento (93, 94). No entanto, o facto dos cimentos antes de tomarem presa, induzirem geralmente reações teciduais adversas, justifica o requisito de que, idealmente, o tempo de endurecimento não seja demasiado longo (95).

52

A avaliação das características de solubilidade e alterações dimensionais dos cimentos também permitem determinar a estabilidade dos materiais. A solubilidade corresponde à capacidade dos materiais endurecidos se dissolverem, durante um período de imersão em água, e é determinada pela perda de massa verificada (96). Os cimentos de obturação devem ser pouco solúveis quando em contacto com os fluidos teciduais. Por esta razão, os efeitos da exposição prolongada dos cimentos nos fluidos devem ser determinados, usando água para esse fim. Os testes laboratoriais pretendem simular as condições *in vivo*, mas os resultados devem ser cuidadosamente interpretados, pois os materiais são preparados com áreas de superfície muito grandes e expostos diretamente, e por excesso, à água (97). No entanto, os valores de solubilidade ideal destes materiais são discutíveis. Por um lado, se os cimentos à base de hidróxido de cálcio necessitam de ser solúveis para atuarem, devido ao seu mecanismo de ação, por outro lado, é desejável que dentro dos canais não ocorra qualquer solubilidade dos cimentos endodônticos (4, 95). A dissolução dos materiais pode irritar os tecidos periapicais e permitir espaços entre as paredes dos canais radiculares e o material de obturação, o que pode promover a infiltração bacteriana ao longo do tempo (94). Os cimentos à base de óxido de zinco-eugenol são conhecidos por apresentarem uma solubilidade considerável que, segundo alguns autores, pode resultar da contínua libertação de eugenol da matriz do cimento. Ao cimento AH Plus está associado uma baixa solubilidade, eventualmente relacionada com as características da matriz resinosa, que pode ser mais resistente à solubilidade (98-100). Considerando que a determinação das alterações dimensionais dos cimentos de obturação demonstra, em termos percentuais, as alterações de contração ou expansão após endurecimento, este teste também é preconizado pelas normas e muitas vezes objetivo de estudo (86, 91, 101). Tal como os valores de solubilidade, as alterações dimensionais dos cimentos endodônticos ao longo do tempo, podem favorecer o aparecimento de espaços nas várias interfaces cimento/parede do canal, cimento/guta-percha que, conseqüentemente, viabilizam a proliferação de microrganismos remanescentes.

1.3.3. BIOCOMPATIBILIDADE

A ciência dos materiais dentários engloba um conhecimento e apreciação de determinados aspectos biológicos associados com a seleção e utilização de materiais destinados para o uso na cavidade oral (85). No passado, a maioria das normas internacionais de avaliação dos materiais dentários focalizavam a determinação das propriedades físicas e químicas. Atualmente, a maioria das normas requerem também testes biológicos. A biocompatibilidade é definida como a capacidade de um material promover uma resposta apropriada numa aplicação específica, com o mínimo de reações alérgicas, inflamatórias ou tóxicas, quando em contacto com os tecidos vivos ou fluidos orgânicos (102). No caso específico dos cimentos endodônticos é essencial uma boa compatibilidade tecidual, pois estes materiais podem entrar em contacto direto com as células ósseas, especialmente, se ocorrer extrusão para os tecidos periapicais. Ainda que o objetivo da obturação dos canais radiculares seja que o material obturador fique confinado ao interior dos canais, há sempre o risco de extravasamento, maior ou menor, conforme as técnicas de instrumentação e/ou obturação. Como todos os materiais de obturação têm algum efeito irritante para os tecidos vivos, nomeadamente para os tecidos periapicais, o contacto direto pode causar distúrbios na normalidade da atividade metabólica óssea pelos efeitos causados sobre as células osteoblásticas e osteoclásticas. Assim, a determinação da biocompatibilidade de um cimento é extremamente importante porque pode influenciar a resolução de uma lesão pré-existente ou, até mesmo, originar uma reação inflamatória num tecido ósseo saudável. A resposta tecidual aos diferentes tipos de cimentos de obturação varia consideravelmente de acordo com: a quantidade de cimento presente, a área de contacto entre o material e os tecidos, a interação entre a dentina e os produtos libertados pelos cimentos e a quantidade e velocidade de absorção das substâncias libertas (103-105). Embora a maioria dos cimentos apresente níveis variados de citotoxicidade antes de tomarem presa, normalmente, perdem esta característica após endurecimento. Importa saber que a biocompatibilidade de um cimento endodôntico depende diretamente dos seus componentes, do tempo de endurecimento e da solubilidade que apresenta (4).

O comportamento biológico dos cimentos e dos seus componentes com capacidade de difusão, deve ser estudado criteriosamente para averiguar a viabilidade do uso de cimentos *in vivo* (106). Ao longo dos anos, a biocompatibilidade dos cimentos endodônticos foi estudada *in vitro* e *in vivo* (107-111). A remodelação óssea requer a regulação coordenada da atividade dos osteoclastos e dos osteoblastos, pelo que a análise da proliferação e diferenciação das células osteoblásticas e a diferenciação e a atividade das células osteoclásticas devem de ser objetivos de estudo nas investigações destinadas a avaliar a biocompatibilidade destes materiais. Apesar de inúmeros estudos terem avaliado os efeitos celulares de diferentes cimentos endodônticos, a grande

discrepância de resultados observada dificulta o estabelecimento de padrões de citotoxicidade ou a previsão dos efeitos do contacto dos tecidos vivos com o material. O tipo de célula alvo, a preparação dos extratos de cimentos, as concentrações testadas e o tempo de exposição são variáveis, o que poderá explicar os diferentes resultados disponíveis na literatura.

Os testes de avaliação de citotoxicidade dos materiais endodônticos em culturas celulares são simples, rápidos e mais económicos que outros métodos. A reprodutibilidade destes testes permite avaliar qualitativamente e quantitativamente um grande número de materiais. Diferentes sistemas de células osteoblásticas são usados nos estudos de citotoxicidade: linhas celulares de osteosarcoma U2-OS e MG-63, linhas celulares de rato MC3T3-E1 e ROS 17/2.8 e células da calota craniana de rato. A maioria dos estudos de avaliação dos cimentos endodônticos corresponde à apreciação do comportamento das células de osteoblastos quando expostas a extratos de cimentos preparados de acordo com a Norma ISO 10993-5 (112). Nesta metodologia, a área de contacto entre o cimento e as células ou o meio de cultura a partir do qual se preparam os extratos é normalmente grande. No entanto, *in vivo* o contacto direto entre o material de obturação e os tecidos periapicais é muito menor e as interações indiretas resultantes da difusão ou perfusão dos seus componentes ou subprodutos da polimerização são limitadas ao foramen apical, aos canais laterais/acessórios ou aos túbulos dentinários (113-115). Apesar da importância dos efeitos de avaliação de cimentos endodônticos em células de osteoclastos, existem poucos estudos sobre estas células (116).

54

Além do interesse inquestionável do estudo de citotoxicidade dos cimentos, nos diferentes tipos celulares, os fatores dose e tempo merecem também especial atenção. Os resultados obtidos dos estudos do comportamento celular após contato imediato com os cimentos representam os efeitos agudos; aos resultados obtidos por um longo período de tempo atribuem-se efeitos a longo prazo, os quais podem evidenciar uma resposta celular adaptativa à presença dos cimentos (116).

Aos cimentos à base de óxido de zinco-eugenol é associada uma toxicidade *in vitro* (104, 117, 118) e *in vivo* (119) pela libertação do eugenol por hidrólise. No entanto, a libertação de eugenol parece diminuir com o tempo (120), pelo que a toxicidade dos cimentos também diminui ao longo do tempo (118). Além disso, a toxicidade pode ser influenciada por outros componentes como iões zinco ou óxido de zinco (121), como já foi referido.

Em relação aos cimentos à base de resina epoxi bisfenol, vários estudos referem a libertação de uma pequena quantidade de formaldeído durante a reação de polimerização. Ao cimento AH Plus é atribuído uma pequena toxicidade relacionada com a libertação de formaldeído, mas também com a presença de constituintes como aminas, adicionadas para acelerar a polimerização, e à resina epoxi (104, 122-124).

Do ponto de vista biológico são considerados apropriados os cimentos endodônticos que apresentem boa tolerância tecidual, sejam reabsorvidos na região apical em casos de extravasamento acidental e permitam a cicatrização, contribuindo para que se obtenha a menor agressão possível aos tecidos periapicais. Assim, o factor biológico deve ser entendido e valorizado como essencial, pela inegável importância que os cimentos representam no contexto do tratamento endodôntico.

1.4. NANOTECNOLOGIA

Nas últimas décadas, tem sido observado um grande número de pesquisas envolvendo materiais nanoestruturados. A designação de materiais nanoestruturados é referente a materiais de dimensões extremamente pequenas, constituídos por um número bastante reduzido de átomos. A nanociência dedica-se ao estudo e ao desenvolvimento de novos métodos de síntese e caracterização de materiais de escala nanométrica, com o objetivo de controlar o tamanho e as propriedades apresentadas e compreender o comportamento dos materiais. A nanotecnologia tem como objetivo o aproveitamento e a aplicação destes materiais pelas propriedades inovadoras que apresentam (125, 126). A nanociência e a nanotecnologia constituem uma área emergente do conhecimento científico com um forte impacto na sociedade. A principal vantagem que justifica o rápido desenvolvimento e utilização dos nanomateriais é justamente a observação da alteração de diversas propriedades, quando estes se encontram em nanoescala, sem alteração da composição química dos mesmos. A exploração de novas propriedades fundamenta as inúmeras investigações científicas, pelas novas possibilidades de aplicações nas mais diversas áreas das ciências (127). Em função do exposto, novos modelos de biomateriais com a incorporação de nanopartículas estão em desenvolvimento. Esta tecnologia permite a obtenção de produtos com propriedades terapêuticas e com melhor tolerância tecidual.

A área de Medicina Dentária não é exceção a esta inovação tecnológica. Os efeitos antibacterianos de numerosas nanopartículas de diversos compostos, como potenciais agentes antimicrobianos têm sido investigados, tais como óxido de magnésio (MgO), óxido de cálcio (CaO), óxido de zinco (ZnO), prata (Ag), óxido de cobre (CuO) e quitosano (CS). As nanopartículas são partículas com dimensões entre 1 e 100 nanómetros e os seus efeitos antimicrobianos, superiores às partículas homólogas de maiores dimensões, estão geralmente relacionados com uma maior área de superfície apresentada e com a carga elétrica, que favorece a interação com as células bacterianas. A interação eletrostática entre as nanopartículas positivas e a membrana negativa das células bacterianas e a acumulação de um elevado número de nanopartículas sobre a membrana celular,

têm sido associadas ao aumento de permeabilidade e disfunção da membrana bacteriana (128). Na área da Medicina Dentária, o estudo de nanopartículas ainda é incipiente. As nanopartículas de prata parecem ser as que têm sido utilizadas num maior número de investigações pela já reconhecida propriedade antimicrobiana, sendo incorporadas em compósitos resinosos na área da Dentisteria, nos sistemas adesivos utilizados na Ortodontia e nos cimentos de obturação na área da Endodontia (129-131).

A aplicação bem sucedida de nanopartículas em Endodontia depende da eficácia antimicrobiana e do mecanismo de ação dessas partículas, na complexa anatomia do sistema de canais radiculares. O estudo da interação das nanopartículas e dos materiais a que são incorporadas com os tecidos do hospedeiro e as células imunológicas também requer uma maior investigação. Considerando a possibilidade de aumentar a eficácia terapêutica dos cimentos obturadores através da incorporação de nanopartículas, associada aos poucos estudos de investigação nesta área, parece justificar a realização de mais estudos neste sentido.

56

1.4.1. NANOPARTÍCULAS DE AMÓNIA QUATERNÁRIA DE POLIETILENOIMINA (QPEI)

O impacto de um agente antimicrobiano é determinado pela sua carga de superfície positiva e a natureza hidrofóbica do composto. Como as superfícies bacterianas são carregadas negativamente a um pH fisiológico, os compostos policatiónicos com grupos de amónia quaternária têm sido utilizados como agentes antibacterianos (132). Estes compostos têm um amplo espectro de atividade antimicrobiana contra microrganismos de Gram positivo e negativo, são estáveis quimicamente, não são voláteis e a sua atividade antimicrobiana é de longa duração. Os antimicrobianos policatiónicos de amónia quaternária têm elevada densidade de carga, apresentando por isso, uma forte atividade antimicrobiana.

O polímero sintético de polietilenoimina (PEI), preparado a partir de aziridina por polimerização catiónica, é um exemplo de um composto policatiónico que apresenta propriedades antimicrobianas. A sua estrutura contém grupos amina primários, secundários e terciários (1:2:1). Os grupos amina do PEI são quimicamente reativos, consequentemente, permitem uma ampla variedade de modificações químicas que proporcionam ao composto diferentes propriedades físico-químicas. Devido à sua carga positiva e comportamento hidrofóbico, o PEI atraiu atenção como um possível agente antimicrobiano (133-135). Este composto pode ser utilizado na terapia genética como vetor não viral (136), no desenvolvimento de suportes de catalisadores, devido

à neutralização eficaz de carga aniônica de excesso coloidal, especialmente sob condições de pH ácido e neutro, e como um ingrediente comum envolvido em composições microbicidas e numa variedade de formulações de agentes de lavagem para materiais de embalagem (134). O polímero antimicrobiano PEI está disponível comercialmente e tem sido utilizado em diversas investigações científicas. Como as substâncias policatiônicas podem aumentar a permeabilidade da membrana bacteriana externa para solutos que normalmente são incapazes de a penetrar, vários investigadores estudaram a ação do PEI como agente de permeabilização e descobriram que, sem induzir a libertação de lipopolissacarídeos (LPS) a partir da membrana externa, o PEI tem um efeito de permeabilização forte, mas nenhum efeito bactericida sobre bactérias de Gram-negativo (134). Khalil *et al.* (137) concluiu que, dependendo das estruturas químicas de alguns antibióticos testados, o PEI pode ter um efeito sinérgico ou um efeito antagonista, quando utilizado em combinação com antibióticos. Quando a atividade bactericida de determinados antibióticos melhora na presença de PEI é devido à sua forte ligação ao LPS, o que leva a desorganização da membrana externa bacteriana e facilita a penetração do antibiótico. Os efeitos do PEI são dependentes da estrutura e peso molecular, características que influenciam diretamente a citotoxicidade apresentada pelo composto (136). Vários estudos, maioritariamente realizados na área de transcrição genética, tanto de ADN como RNA, avaliaram os diferentes efeitos citotóxicos do PEI de acordo com as suas propriedades (138-140). O facto de o PEI ser uma substância policatiônica, induz à forte interação com as superfícies celulares e consequentes danos celulares associados. Por conseguinte, a síntese de partículas de baixo peso molecular e/ou modificações na estrutura polimérica do PEI podem ser úteis na redução de toxicidade do polímero, alargando assim as suas bio-aplicações (141).

57

A quaternização do PEI em amónia quaternária de polietilenoimina (QPEI) e a síntese de nanopartículas de QPEI pode ser realizada por duas etapas, aminação redutiva e N-alquilação, das quais resulta o aumento da carga positiva através da conversão de grupos amina primários, secundários e terciários do PEI em grupos catiónicos de amónia quaternária. Mesmo as diferenças na estrutura policatiônica das nanopartículas têm um papel significante na atividade antibacteriana e na eficiência da transfeção genética (142, 143). Foi previamente descrito, que as nanopartículas QPEI incorporadas em cimentos provisórios e em vários compósitos de resinas demonstraram um forte e duradouro efeito antibacteriano contra bactérias orais, sem comprometer algumas propriedades físicas (144-146).

Considerando as propriedades antibacterianas das nanopartículas QPEI postulou-se a hipótese de que, incorporadas em cimentos endodônticos, poderiam promover o aumento da atividade antimicrobiana e antibiofilme dos materiais, no sentido de desenvolver uma futura estratégia

terapêutica nas infecções endodônticas. Além disso, é necessário assegurar que as nanopartículas adicionadas aos produtos comerciais existentes, idealmente, não alterem substancialmente as propriedades físico-químicas, mecânicas e biológicas dos materiais aos quais são adicionadas.

1.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Sundqvist G, Figdor D, Persson S, Sjogren U. Microbiologic analysis of teeth with failed endodontic treatment and the outcome of conservative re-treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1998;85(1):86-93.
2. Siqueira JF, Jr. Aetiology of root canal treatment failure: why well-treated teeth can fail. *Int Endod J* 2001;34(1):1-10.
3. Lin LM, Rosenberg PA, Lin J. Do procedural errors cause endodontic treatment failure? *The Journal of the American Dental Association* 2005;136(2):187-93.
4. Lopes HP, Siqueira JF, Jr. *Endodontia: biologia e técnica*; 2010. 3ª ed. Rio de Janeiro; Brasil; Guanabara Koogan.
5. European Society of Endodontology. Quality guidelines for endodontic treatment: consensus report of the European Society of Endodontology. *Int Endod J* 2006;39(12):921-30.
6. Siqueira JF, Jr., Roças IN. Clinical implications and microbiology of bacterial persistence after treatment procedures. *J Endod* 2008;34(11):1291-301 e3.
7. Siqueira JF, Jr. *Treatment of Endodontic Infections*; 2011. 1st ed, Berlin, Germany: Quintessence Publishing Co. Ltd.
8. Ricucci D, Siqueira JF, Jr. Anatomic and microbiologic challenges to achieving success with endodontic treatment: a case report. *J Endod* 2008;34(10):1249-54.
9. Nair PNR. On the causes of persistent apical periodontitis: a review. *Int Endod J* 2006;39(4):249-81.
10. Quesnell BT, Alves M, Hawkinson RW, Jr., Johnson BR, Wenckus CS, *et al.* The effect of human immunodeficiency virus on endodontic treatment outcome. *J Endod* 2005;31(9):633-6.
11. Segura-Egea JJ, Jimenez-Pinzon A, Rios-Santos JV, Velasco-Ortega E, Cisneros-Cabello R, *et al.* High prevalence of apical periodontitis amongst type 2 diabetic patients. *Int Endod J* 2005;38(8):564-9.
12. Siqueira JF, Jr., Roças IN, Provenzano JC, Daibert FK, Silva MG, *et al.* Relationship between Fcγ receptor and interleukin-1 gene polymorphisms and post-treatment apical periodontitis. *J Endod* 2009;35(9):1186-92.
13. Torabinejad M, Kutsenko D, Machnick TK, Ismail A, Newton CW. Levels of evidence for the outcome of nonsurgical endodontic treatment. *J Endod* 2005;31(9):637-46.

14. Stoll R, Betke K, Stachniss V. The influence of different factors on the survival of root canal fillings: a 10-year retrospective study. *J Endod* 2005;31(11):783-90.
15. Paiva J, Barros J, Noites R, Fontes Carvalho M, Pina-Vaz I. Comparação da Infiltração Apical entre a Desobturação Imediata do Canal Radicular e a Desobturação após 8 Dias para a Preparação do Espaço para o Espigão. *Rev Port Estomatol Med Dent Cir Maxilofac* 2010;51:197-205.
16. Pina-Vaz I, Barros J, Noites R, Fontes Carvalho M, Villa-Vigil A, Lordelo J. Restoration of endodontically treated teeth: importance of the remaining tooth structure. *Revista Europea de Odontoestomatologia* 2011.
17. Barros J, Cruz J, Fontes Carvalho M, Pina-Vaz I. Influence of the timing of post space preparation on apical sealing / Influência do timing da colocação de retentor intraradicular no selamento apical *Rev Gaúcha Odontol* 2013;61(2):199-204.
18. Moller AJ, Fabricius L, Dahlen G, Ohman AE, Heyden G. Influence on periapical tissues of indigenous oral bacteria and necrotic pulp tissue in monkeys. *Scand J Dent Res* 1981;89(6):475-84.
19. Kakehashi S, Stanley HR, Fitzgerald RJ. The Effects of Surgical Exposures of Dental Pulp in Germ-Free and Conventional Laboratory Rats. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1965;20:340-9.
20. Siqueira JF, Jr. Endodontic infections: concepts, paradigms, and perspectives. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2002;94(3):281-93.
21. Siqueira JF, Jr., Roças IN. Diversity of endodontic microbiota revisited. *J Dent Res* 2009;88(11):969-81.
22. Siqueira JF, Jr., Alves FR, Roças IN. Pyrosequencing analysis of the apical root canal microbiota. *J Endod* 2011;37(11):1499-503.
23. Ricucci D, Siqueira JF, Jr. *Endodontology: An integrated biological and clinical view*; 2013. 1st ed. United Kingdom: Quintessence Publishing.
24. Jung I-Y, Choi B-k, Kum K-Y, Yoo Y-J, Yoon T-C, *et al.* Identification of oral spirochetes at the species level and their association with other bacteria in endodontic infections. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2001;92(3):329-34.
25. Adib F. Clinical techniques. *Br Dent J* 2004;197(4):170-1; author reply 71.
26. Gomes BP, Pinheiro ET, Gade-Neto CR, Sousa EL, Ferraz CC, *et al.* Microbiological examination of infected dental root canals. *Oral Microbiol Immunol* 2004;19(2):71-6.

27. Sakamoto M, Siqueira JF, Jr., Roças IN, Benno Y. Bacterial reduction and persistence after endodontic treatment procedures. *Oral Microbiol Immunol* 2007;22(1):19-23.
28. Roças IN, Siqueira JF, Jr., Santos KR. Association of *Enterococcus faecalis* with different forms of periradicular diseases. *J Endod* 2004;30(5):315-20.
29. Subramanian K, Mickel AK. Molecular analysis of persistent periradicular lesions and root ends reveals a diverse microbial profile. *J Endod* 2009;35(7):950-7.
30. Kayaoglu G, Ørstavik D. Virulence factors of *Enterococcus faecalis*: relationship to endodontic disease. *Crit Rev Oral Biol Med* 2004;15(5):308-20.
31. Evans M, Davies JK, Sundqvist G, Figdor D. Mechanisms involved in the resistance of *Enterococcus faecalis* to calcium hydroxide. *Int Endod J* 2002;35(3):221-8.
32. Figdor D, Davies JK, Sundqvist G. Starvation survival, growth and recovery of *Enterococcus faecalis* in human serum. *Oral Microbiol Immunol* 2003;18(4):234-9.
33. Blackledge MS, Worthington RJ, Melander C. Biologically inspired strategies for combating bacterial biofilms. *Curr Opin Pharmacol* 2013;13(5):699-706.
34. Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 1999;284(5418):1318-22.
35. Ingle JI BL, Baumgartner Jc. *Endodontics*; 2008. 6th ed: PMPH-USA, St. Louis.
36. Fux CA, Costerton JW, Stewart PS, Stoodley P. Survival strategies of infectious biofilms. *Trends Microbiol* 2005;13(1):34-40.
37. Sandoe JA, Wysome J, West AP, Heritage J, Wilcox MH. Measurement of ampicillin, vancomycin, linezolid and gentamicin activity against enterococcal biofilms. *J Antimicrob Chemother* 2006;57(4):767-70.
38. Svensäter G, Bergenholtz G. Biofilms in endodontic infections. *Endodontic Topics* 2004;9(1):27-36.
39. Lewis K. Riddle of biofilm resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 2001;45(4):999-1007.
40. Jefferson KK. What drives bacteria to produce a biofilm? *FEMS Microbiol Lett* 2004;236(2):163-73.
41. Siqueira JF, Jr., De Uzeda M, Fonseca ME. A scanning electron microscopic evaluation of in vitro dentinal tubules penetration by selected anaerobic bacteria. *J Endod* 1996;22(6):308-10.

42. Siqueira JF, Roças IN, Ricucci D. Biofilms in endodontic infection. *Endodontic Topics* 2010;22(1):33-49.
43. Ramachandran Nair PN. Light and electron microscopic studies of root canal flora and periapical lesions. *J Endod* 1987;13(1):29-39.
44. Ricucci D, Siqueira JF, Jr. Biofilms and apical periodontitis: study of prevalence and association with clinical and histopathologic findings. *J Endod* 2010;36(8):1277-88.
45. Mohammadi Z, Palazzi F, Giardino L, Shalavi S. Microbial biofilms in endodontic infections: an update review. *Biomed J* 2013;36(2):59-70.
46. 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(2):406-15.
47. George S, Kishen A, Song KP. The role of environmental changes on monospecies biofilm formation on root canal wall by Enterococcus faecalis. *J Endod* 2005;31(12):867-72.
48. Duggan JM, Sedgley CM. Biofilm formation of oral and endodontic Enterococcus faecalis. *J Endod* 2007;33(7):815-8.
49. Arias-Moliz MT, Ferrer-Luque CM, Gonzalez-Rodriguez MP, Navarro-Escobar E, de Freitas MF, *et al.* Antimicrobial activity and enterococcus faecalis biofilm formation on chlorhexidine varnishes. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2012;17(4):e705-9.
50. Zoletti GO, Pereira EM, Schuenck RP, Teixeira LM, Siqueira JF, Jr., *et al.* Characterization of virulence factors and clonal diversity of Enterococcus faecalis isolates from treated dental root canals. *Res Microbiol* 2011;162(2):151-8.
51. Lima KC, Fava LR, Siqueira JF, Jr. Susceptibilities of Enterococcus faecalis biofilms to some antimicrobial medications. *J Endod* 2001;27(10):616-9.
52. Dunavant TR, Regan JD, Glickman GN, Solomon ES, Honeyman AL. Comparative evaluation of endodontic irrigants against Enterococcus faecalis biofilms. *J Endod* 2006;32(6):527-31.
53. Distel JW, Hatton JF, Gillespie MJ. Biofilm formation in medicated root canals. *J Endod* 2002;28(10):689-93.
54. Estrela C, Sydney GB, Figueiredo JA, Estrela CR. A model system to study antimicrobial strategies in endodontic biofilms. *J Appl Oral Sci* 2009;17(2):87-91.
55. Özok Ahmet R; van der Sluis Luc WM; Wu MK; Wesselink P. Biofilm in relation to root canal infection *Endodontic Practice Today* 2007;1(3):173-80.

56. Abdullah M, Ng Y-L, Gulabivala K, Moles DR, Spratt DA. Susceptibilities of Two *Enterococcus faecalis* Phenotypes to Root Canal Medications. *J Endod* 2005;31(1):30-36.
57. Faria-Junior NB, Tanomaru-Filho M, Berbert FL, Guerreiro-Tanomaru JM. Antibiofilm activity, pH and solubility of endodontic sealers. *Int Endod J* 2013;46(8):755-62.
58. Kishen A, Shi Z, Shrestha A, Neoh KG. An investigation on the antibacterial and antibiofilm efficacy of cationic nanoparticulates for root canal disinfection. *J Endod* 2008;34(12):1515-20.
59. Mickel AK, Nguyen TH, Chogle S. Antimicrobial activity of endodontic sealers on *Enterococcus faecalis*. *J Endod* 2003;29(4):257-8.
60. Siqueira JF, Jr., Rocas IN, Favieri A, Abad EC, Castro AJ, *et al.* Bacterial leakage in coronally unsealed root canals obturated with 3 different techniques. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2000;90(5):647-50.
61. Grossman L. *Endodontic Practic*; 1981. Philadelphia: Lea & Febiger.
62. Kaplan AE, Picca M, Gonzalez MI, Macchi RL, Molgatini SL. Antimicrobial effect of six endodontic sealers: an in vitro evaluation. *Endod Dent Traumatol* 1999;15(1):42-5.
63. Miyagak DC, de Carvalho EM, Robazza CR, Chavasco JK, Levorato GL. In vitro evaluation of the antimicrobial activity of endodontic sealers. *Braz Oral Res* 2006;20(4):303-6.
64. Slutzky-Goldberg I, Slutzky H, Solomonov M, Moshonov J, Weiss EI, *et al.* Antibacterial properties of four endodontic sealers. *J Endod* 2008;34(6):735-8.
65. Yasuda Y, Kamaguchi A, Saito T. In vitro evaluation of the antimicrobial activity of a new resin-based endodontic sealer against endodontic pathogens. *J Oral Sci* 2008;50(3):309-13.
66. Lai CC, Huang FM, Yang HW, Chan Y, Huang MS, *et al.* Antimicrobial activity of four root canal sealers against endodontic pathogens. *Clin Oral Investig* 2001;5(4):236-9.
67. Bodrumlu E, Semiz M. Antibacterial activity of a new endodontic sealer against *Enterococcus faecalis*. *J Can Dent Assoc* 2006;72(7):637.
68. Tanomaru-Filho M, Tanomaru JM, Barros DB, Watanabe E, Ito IY. In vitro antimicrobial activity of endodontic sealers, MTA-based cements and Portland cement. *J Oral Sci* 2007;49(1):41-5.
69. 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(4):307-13.

70. Guigand M, Pellen-Mussi P, Le Goff A, Vulcain JM, Bonnaure-Mallet M. Evaluation of the cytocompatibility of three endodontic materials. *J Endod* 1999;25(6):419-23.
71. Macchi RL, Capurro MA, Herrera CL, Cebada FR, Kohen S. Influence of endodontic materials on the bonding of composite resin to dentin. *Endod Dent Traumatol* 1992;8(1):26-9.
72. Kayaoglu G, Erten H, Alacam T, Ørstavik D. Short-term antibacterial activity of root canal sealers towards *Enterococcus faecalis*. *Int Endod J* 2005;38(7):483-8.
73. Siqueira JF, Jr., Favieri A, Gahyva SM, Moraes SR, Lima KC, *et al.* Antimicrobial activity and flow rate of newer and established root canal sealers. *J Endod* 2000;26(5):274-7.
74. Eldeniz AU, Erdemir A, Hadimli HH, Belli S, Erganis O. Assessment of antibacterial activity of EndoREZ. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2006;102(1):119-26.
75. Wanted: A Base of Evidence. *J Endod* 2007;33(12):1401-02.
76. Çobankara 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(1):57-60.
77. Weiss EI, Shalhav M, Fuss Z. Assessment of antibacterial activity of endodontic sealers by a direct contact test. *Endod Dent Traumatol* 1996;12(4):179-84.
78. 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(7):1051-5.
79. Haapasalo M, Shen Y. Current therapeutic options for endodontic biofilms. *Endodontic Topics* 2010;22(1):79-98.
80. Ørstavik D. Antibacterial properties of root canal sealers, cements and pastes. *Int Endod J* 1981;14(2):125-33.
81. Spangberg LS, Barbosa SV, Lavigne GD. AH 26 releases formaldehyde. *J Endod* 1993;19(12):596-8.
82. Siqueira JF, Gonçalves RB. Antibacterial activities of root canal sealers against selected anaerobic bacteria. *J Endod* 1996;22(2):79-80.
83. Gomes BP, Pedroso JA, Jacinto RC, Vianna ME, Ferraz CC, *et al.* In vitro evaluation of the antimicrobial activity of five root canal sealers. *Braz Dent J* 2004;15(1):30-5.
84. Saleh IM, Ruyter IE, Haapasalo M, Ørstavik 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(3):193-8.

85. Hauman CH, Love RM. Biocompatibility of dental materials used in contemporary endodontic therapy: a review. Part 2. Root-canal-filling materials. *Int Endod J* 2003;36(3):147-60.
86. Versiani MA, Carvalho-Junior JR, Padilha MI, Lacey S, Pascon EA, *et al.* A comparative study of physicochemical properties of AH Plus and Epiphany root canal sealants. *Int Endod J* 2006;39(6):464-71.
87. Baer J, Maki JS. In vitro evaluation of the antimicrobial effect of three endodontic sealers mixed with amoxicillin. *J Endod* 2010;36(7):1170-3.
88. Siqueira JF, Gonçalves RB. Antibacterial activities of root canal sealers against selected anaerobic bacteria. *J Endod* 1996;22(2):79-80.
89. Pizzo G, Giammanco GM, Cumbo E, Nicolosi G, Gallina G. In vitro antibacterial activity of endodontic sealers. *J Dent* 2006;34(1):35-40.
90. Mamootil K, Messer HH. Penetration of dentinal tubules by endodontic sealer cements in extracted teeth and in vivo. *Int Endod J* 2007;40(11):873-81.
91. Ørstavik DAG. Materials used for root canal obturation: technical, biological and clinical testing. *Endodontic Topics* 2005;12(1):25-38.
92. Resende LM, Rached-Junior FJ, Versiani MA, Souza-Gabriel AE, Miranda CE, *et al.* A comparative study of physicochemical properties of AH Plus, Epiphany, and Epiphany SE root canal sealers. *Int Endod J* 2009;42(9):785-93.
93. Lin-Gibson S, Landis FA, Drzal PL. Combinatorial investigation of the structure-properties characterization of photopolymerized dimethacrylate networks. *Biomaterials* 2006;27(9):1711-7.
94. Flores DS, Rached FJ, Jr., Versiani MA, Guedes DF, Sousa-Neto MD, *et al.* Evaluation of physicochemical properties of four root canal sealers. *Int Endod J* 2011;44(2):126-35.
95. McMichen FR, Pearson G, Rahbaran S, Gulabivala K. A comparative study of selected physical properties of five root-canal sealers. *Int Endod J* 2003;36(9):629-35.
96. Carvalho-Junior JR, Correr-Sobrinho L, Correr AB, Sinhoreti MA, Consani S, *et al.* Solubility and dimensional change after setting of root canal sealers: a proposal for smaller dimensions of test samples. *J Endod* 2007;33(9):1110-6.
97. Donnelly A, Sword J, Nishitani Y, Yoshiyama M, Agee K, *et al.* Water sorption and solubility of methacrylate resin-based root canal sealers. *J Endod* 2007;33(8):990-4.
98. Schafer E, Zandbiglari T. Solubility of root-canal sealers in water and artificial saliva. *Int Endod J* 2003;36(10):660-9.

99. Carvalho-Junior JR, Guimaraes LF, Correr-Sobrinho L, Pecora JD, Sousa-Neto MD. Evaluation of solubility, disintegration, and dimensional alterations of a glass ionomer root canal sealer. *Braz Dent J* 2003;14(2):114-8.
100. Garrido AD, Lia RC, Franca SC, da Silva JF, Astolfi-Filho S, *et al.* Laboratory evaluation of the physicochemical properties of a new root canal sealer based on Copaifera multijuga oil-resin. *Int Endod J* 2010;43(4):283-91.
101. Ørstavik D, Nordahl I, Tibballs JE. Dimensional change following setting of root canal sealer materials. *Dent Mater* 2001;17(6):512-9.
102. Williams DF. *Definitions in Biomaterials*; 1987. Oxford: Elsevier.
103. Figueiredo JA, Pesce HF, Gioso MA, Figueiredo MA. The histological effects of four endodontic sealers implanted in the oral mucosa: submucous injection versus implant in polyethylene tubes. *Int Endod J* 2001;34(5):377-85.
104. Huang FM, Tai KW, Chou MY, Chang YC. Cytotoxicity of resin-, zinc oxide-eugenol-, and calcium hydroxide-based root canal sealers on human periodontal ligament cells and permanent V79 cells. *Int Endod J* 2002;35(2):153-8.
105. Kaplan AE, Ormaechea MF, Picca M, Canzobre MC, Ubios AM. Rheological properties and biocompatibility of endodontic sealers. *Int Endod J* 2003;36(8):527-32.
106. Huang TH, Yang JJ, Li H, Kao CT. The biocompatibility evaluation of epoxy resin-based root canal sealers in vitro. *Biomaterials* 2002;23(1):77-83.
107. Kolokouris I, Economides N, Beltes P, Vlemmas I. In vivo comparison of the biocompatibility of two root canal sealers implanted into the subcutaneous connective tissue of rats. *J Endod* 1998;24(2):82-85.
108. Ames JM, Loushine RJ, Babb BR, Bryan TE, Lockwood PE, *et al.* Contemporary methacrylate resin-based root canal sealers exhibit different degrees of ex vivo cytotoxicity when cured in their self-cured mode. *J Endod* 2009;35(2):225-8.
109. Huang FM, Yang SF, Chang YC. Effects of root canal sealers on alkaline phosphatase in human osteoblastic cells. *J Endod* 2010;36(7):1230-3.
110. Xu P, Liang J, Dong G, Zheng L, Ye L. Cytotoxicity of RealSeal on human osteoblast-like MG63 cells. *J Endod* 2010;36(1):40-4.
111. Brackett MG, Messer RL, Lockwood PE, Bryan TE, Lewis JB, *et al.* Cytotoxic response of three cell lines exposed in vitro to dental endodontic sealers. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2010;95(2):380-6.

112. International Organization for Standardization. Biological Evaluation of Medical Devices-Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity. Geneva, Switzerland 2009: ISO 10993-5.
113. Schmalz G, Hiller KA, Nunez LJ, Stoll J, Weis K. Permeability characteristics of bovine and human dentin under different pretreatment conditions. *J Endod* 2001;27(1):23-30.
114. Schwarze T, Fiedler I, Leyhausen G, Geurtsen W. The cellular compatibility of five endodontic sealers during the setting period. *J Endod* 2002;28(11):784-6.
115. Susini G, About I, Tran-Hung L, Camps J. Cytotoxicity of Epiphany and Resilon with a root model. *Int Endod J* 2006;39(12):940-4.
116. Rodrigues C, Costa-Rodrigues J, Capelas JA, Fernandes MH. Long-term dose- and time-dependent effects of endodontic sealers in human in vitro osteoclastogenesis. *J Endod* 2013;39(6):833-8.
117. Gulati N, Chandra S, Aggarwal PK, Jaiswal JN, Singh M. Cytotoxicity of eugenol in sealer containing zinc-oxide. *Endod Dent Traumatol* 1991;7(4):181-5.
118. Abou Hashieh I, Camps J, Dejoui J, Franquin JC. Eugenol diffusion through dentin related to dentin hydraulic conductance. *Dent Mater* 1998;14(4):229-36.
119. Koch G, Magnusson B, Nyquist G. Contact allergy to medicaments and materials used in dentistry. II. Sensitivity to eugenol and colophony. *Odontol Revy* 1971;22(3):275-89.
120. Becker RM, Hume WR, Wolinsky LE. Release of eugenol from mixtures of ZOE in vitro. *J Pedod* 1983;8(1):71-7.
121. Maseki T, Nakata K, Kohsaka T, Kobayashi F, Hirano S, *et al.* Lack of correlation between the amount of eugenol released from zinc oxide-eugenol sealer and cytotoxicity of the sealer. *J Endod* 1991;17(2):76-9.
122. Leonardo MR, Bezerra da Silva LA, Filho MT, Santana da Silva R. Release of formaldehyde by 4 endodontic sealers. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1999;88(2):221-5.
123. Cohen BI, Pagnillo MK, Musikant BL, Deutsch AS. An in vitro study of the cytotoxicity of two root canal sealers. *J Endod* 2000;26(4):228-9.
124. Zmener O, Spielberg C, Lamberghini F, Rucci M. Sealing properties of a new epoxy resin-based root-canal sealer. *Int Endod J* 1997;30(5):332-4.
125. Roco MC. International strategy for Nanotechnology Research. *J Nanopart Res* 2001;3(5-6):353-60.

126. Islam N, Miyazaki K. Nanotechnology innovation system: Understanding hidden dynamics of nanoscience fusion trajectories. *Technol Forecast Soc Change* 2009;76(1):128-40.
127. Rao CNR, Cheetham AK. Science and technology of nanomaterials: current status and future prospects. *J Mater Chem* 2001;11(12):2887-94.
128. Kishen A. Advanced therapeutic options for endodontic biofilms. *Endodontic Topics* 2010;22(1):99-123.
129. Magalhães ANP, Santos LB, Lopes LG, *et al.* Nanosilver Application in Dental Cements. *ISRN Nanotechnology* 2012;2012:6.
130. Shrestha A, Shi Z, Neoh KG, Kishen A. Nanoparticulates for antibiofilm treatment and effect of aging on its antibacterial activity. *J Endod* 2010;36(6):1030-5.
131. Mohamed Hamouda I. Current perspectives of nanoparticles in medical and dental biomaterials. *J Biomed Res* 2012;26(3):143-51.
132. Beyth N, Yudovin-Farber I, Bahir R, Domb AJ, Weiss EI. Antibacterial activity of dental composites containing quaternary ammonium polyethylenimine nanoparticles against *Streptococcus mutans*. *Biomaterials* 2006;27(21):3995-4002.
133. Hilal N, Kochkodan V, Al-Khatib L, Levadna T. Surface modified polymeric membranes to reduce (bio)fouling: a microbiological study using *E. coli*. *Desalination* 2004;167(0):293-300.
134. Helander IM AH, Latva-Kala K, Koski P. Polyethyleneimine is an effective permeabilizer of Gram-negative bacteria. *Microbiology* 1997(143):3193-99.
135. WO Chung JW, DT. Hobbs. Mini Review: Novel antimicrobial compounds in the age of increasing bacterial resistance. In: Mendez-Vilas A, editor.: *Formatex Research Center*; 2011. p. 722-27.
136. Fischer D, Bieber T, Li Y, Elsasser HP, Kissel T. A novel non-viral vector for DNA delivery based on low molecular weight, branched polyethylenimine: effect of molecular weight on transfection efficiency and cytotoxicity. *Pharm Res* 1999;16(8):1273-9.
137. Khalil H, Chen T, Riffon R, Wang R, Wang Z. Synergy between polyethylenimine and different families of antibiotics against a resistant clinical isolate of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 2008;52(5):1635-41.
138. Breunig M, Hozsa C, Lungwitz U, Watanabe K, Umeda I, *et al.* Mechanistic investigation of poly(ethylene imine)-based siRNA delivery: disulfide bonds boost intracellular release of the cargo. *J Control Release* 2008;130(1):57-63.

139. Deng R, Yue Y, Jin F, Chen Y, Kung H-F, *et al.* Revisit the complexation of PEI and DNA — How to make low cytotoxic and highly efficient PEI gene transfection non-viral vectors with a controllable chain length and structure? *J Control Release* 2009;140(1):40-46.
140. Weber ND, Merkel OM, Kissel T, Munoz-Fernandez MA. PEGylated poly(ethylene imine) copolymer-delivered siRNA inhibits HIV replication in vitro. *J Control Release* 2012;157(1):55-63.
141. Wiegand C, Bauer M, Hipler U-C, Fischer D. Poly(ethyleneimines) in dermal applications: Biocompatibility and antimicrobial effects. *Int J Pharm* 2013;456(1):165-74.
142. Yudovin-Farber I, Golenser J, Beyth N, Weiss EI, Domb AJ. Quaternary Ammonium Polyethyleneimine: Antibacterial Activity. *J Nanomater* 2010;2010.
143. Xu Z, Shen G, Xia X, Zhao X, Zhang P, *et al.* Comparisons of three polyethyleneimine-derived nanoparticles as a gene therapy delivery system for renal cell carcinoma. *J Transl Med* 2011;9(1):46.
144. Beyth N, Yudovin-Farber I, Perez-Davidi M, Domb AJ, Weiss EI. Polyethyleneimine nanoparticles incorporated into resin composite cause cell death and trigger biofilm stress in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010;107(51):22038-43.
145. Beyth N, Yudovin-Farber I, Domb AJ, Weiss EI. Long-term antibacterial surface properties of composite resin incorporating polyethyleneimine nanoparticles. *Quintessence Int* 2010;41(10):827-35.
146. Shvero DK, Davidi MP, Weiss EI, Sreter N, Beyth N. Antibacterial effect of polyethyleneimine nanoparticles incorporated in provisional cements against *Streptococcus mutans*. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2010;94(2):367-71.

C A P Í T U L O 2

OBJETIVOS

2.1. OBJETIVOS GERAIS

Os objetivos gerais deste trabalho estão centrados no estudo da atividade antimicrobiana e antibiofilme dos cimentos mais utilizados na obturação dos canais radiculares, pela incorporação de nanopartículas de amónia quaternária de polietilenoimina (QPEI). A caracterização físico-química e mecânica e a compreensão do comportamento biológico dos materiais são também objetivos de estudo.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Especificamente, este trabalho tem os seguintes objetivos:

- Estudo da atividade antimicrobiana e antibiofilme do polímero de polietilenoimina (PEI);
- Esclarecimento do mecanismo de ação do PEI por meio de citometria de fluxo;
- Síntese e caracterização de nanopartículas de amónia quaternária de polietilenoimina (QPEI);
- Estudo da atividade antimicrobiana e antibiofilme das nanopartículas de QPEI;
- Determinação do mecanismo de ação das nanopartículas de QPEI por meio de citometria de fluxo;
- Avaliação *in vitro* da atividade antimicrobiana dos cimentos de obturação AH Plus (Dentsply DeTrey, Konstanz, Alemanha) e Pulp Canal Sealer EWT (PCS) (Kerr, Italia Srl, Salerno, Itália), incorporados com nanopartículas de QPEI, a 1 % e 2 % (m/m);
- Avaliação das propriedades físico-químicas e mecânicas dos cimentos de obturação AH Plus (Dentsply DeTrey, Konstanz, Alemanha) e Pulp Canal Sealer EWT (PCS) (Kerr, Italia Srl, Salerno, Itália) incorporados com nanopartículas QPEI a 1 % e 2 % (m/m), de acordo com a Norma ISO 6876;
- Avaliação *in vitro* da atividade antibiofilme dos cimentos de obturação AH Plus (Dentsply DeTrey, Konstanz, Alemanha) e Pulp Canal Sealer EWT (PCS) (Kerr, Italia Srl, Salerno, Itália) incorporados com nanopartículas de QPEI a 2 % (m/m);
- Avaliação *in vitro* da citotoxicidade dos cimentos de obturação AH Plus (Dentsply, DeTrey Konstanz, Alemanha) e Pulp Canal Sealer EWT (PCS) (Kerr, Italia Srl, Salerno, Itália) incorporados com nanopartículas de QPEI a 2 % (m/m), no comportamento biológico de células osteoblásticas e células osteoclásticas, de acordo com a Norma ISO 10993-5;

C A P Í T U L O 3

**ATIVIDADE
ANTIMICROBIANA
E ANTIBIOFILME
DO PEI**

NOTA PRÉVIA

Este capítulo descreve a parte experimental, os resultados e a discussão do Estudo 1, intitulado “**Atividade Antimicrobiana e Antibiofilme do PEI**”. Este estudo foi realizado em colaboração com o Serviço e Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Medicina da Universidade do Porto (FMUP), Porto (Portugal).

3.1 ESTUDO 1 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E ANTIBIOFILME DO PEI

3.1.1. OBJETIVOS

- Determinação da atividade antimicrobiana e antibiofilme do PEI contra estirpes de *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Candida albicans*, microrganismos frequentemente envolvidos em infecções endodônticas persistentes, na forma de células planctônicas e de biofilme;
- Esclarecimento do mecanismo de ação do PEI por citometria de fluxo;

3.1.2. MATERIAIS E MÉTODOS

Meios de Cultura e Componentes Químicos

Os meios de cultura de agar Mueller-Hinton e caldo (MHA/MHB), agar Brain Heart e caldo (BHIB/ BHIA) e dextrose de Sabouraud foram preparados de acordo com as instruções do fabricante (Difco Laboratories, Detroit, MI, EUA). A solução tampão de fosfato pH 7,4 (PBS) e o meio de cultura de RPMI 1640 suplementado com L-glutamina e tamponado com MOPS, ambos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA), também foram preparados de acordo com as instruções do fabricante. A solução de stock a 25 % (m/v) de PEI (solução de Polietilenoimina, média mW ~ 750.000, referência 181978 ramificado; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), foi utilizada nas experiências.

Estirpes Microbianas e Condições de Crescimento

Uma estirpe pertencente à *American Type Culture Collection* (ATCC) e uma estirpe clínica isolada de cada microrganismo foram utilizadas: *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212 e EF1), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923 e AE1), *Escherichia coli* (ATCC 25922 e CO1) e *Candida albicans* (ATCC 90028 e CA1). As estirpes clínicas foram identificadas pelo sistema de Vitek2 (bioMérieux, Vercieux, França). As estirpes bacterianas foram mantidas no congelador a -70°C em meio Luria-Bertani (LB) (Difco Laboratories, Detroit, MI, EUA) suplementado com 20 % de glicerol e as estirpes de fungos, em meio de Yeast Peptone Dextrose (YPD) (Difco Laboratories, Detroit, MI, EUA) suplementado com 40 % de glicerol, até à realização dos testes. Para cada experiência os microrganismos foram subcultivados duas vezes, em placas de agar LB a 37°C durante 24 h (bactérias) ou agar Sabouraud a 35°C durante 24 h (fungos), para avaliar a pureza da cultura e a sua viabilidade.

Teste de Suscetibilidade Antimicrobiana

A concentração inibitória mínima (CIM) da solução de PEI foi determinada de acordo com o método de referência (protocolo M100-S23 de 2013, para as bactérias e protocolo M27-A3 de 2012, para os fungos) do *Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)*. As concentrações de PEI testadas variaram de 3200–6,25 mg/L. O valor de CIM foi definido como a menor concentração de substância teste que inibe por completo o crescimento dos microrganismos nos poços de microdiluição. Os resultados foram lidos ao fim de 24 h no caso das bactérias e 48 h no caso dos fungos. Para determinar a concentração mínima letal (CML), 20 µl de cada poço de microdiluição foram semeados em MHA (para as bactérias) e em agar de Sabouraud (para fungos). As placas foram incubadas a $35 \pm 1^\circ\text{C}$ por 24 h (estirpes bacterianas) e 48 h (fungos), com posterior contagem de UFC. O valor de CML foi definido como a menor concentração de substância teste que mata pelo menos 99,9 % do inóculo final.

Ensaio de Adesão e Biofilme

Para todos os ensaios, as células bacterianas e de fungos foram cultivadas *overnight* a 37°C com agitação (180 rpm), em caldo de MHB e Sabouraud para bactérias e fungos, respectivamente. Após incubação, as células foram colhidas por centrifugação (5000 g, 5 min), lavadas com solução PBS e o inóculo ajustado com auxílio do densitômetro, a uma suspensão padronizada de 1×10^7 células/mL, em meio MHB para bactérias e 1×10^6 células/mL em meio RPMI, para fungos.

- i. Para avaliar o efeito do PEI na adesão de microrganismos ao poliestireno, 1 mL de suspensão de células de cada microrganismo foi colocado em cada poço das placas de poliestireno de 12-poços, revestidas com três concentrações de PEI: 0, 200, 400 e 800 mg/L. Posteriormente, as placas foram incubadas durante 90 min a 37°C , com agitação (150 rpm). Decorrido o tempo de adesão, os poços foram lavados com PBS e a adesão foi quantificada espectrofotometricamente pelo ensaio de redução semiquantitativa de XTT (2,3-bis-(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-[(fenilamino)carbonil]-2H-hidróxido de tetrazólio);
- ii. Para avaliar se o PEI tem a capacidade de impedir a formação de biofilme, induziu-se a formação de biofilmes das diferentes espécies de microrganismos em placas de poliestireno na presença de PEI, durante 24 h. Foram utilizadas as mesmas concentrações de PEI (0, 200, 400 e 800 mg/L). Após o período de incubação, o efeito do PEI foi determinado pela quantificação da atividade metabólica de biofilme, pelo ensaio de redução XTT;
- iii. Para estudar a desagregação do biofilme, biofilmes bacterianos e fúngicos foram formados em placas de poliestireno de 12-poços, durante 24 h a 37°C . Posteriormente, os biofilmes foram lavados duas vezes com PBS e as placas incubadas com PEI com as concentrações usadas anteriormente, por mais 24 h. O efeito do PEI na desagregação do biofilme foi avaliado com análise de redução XTT;

Mecanismo de Ação Antimicrobiana

Após a incubação com a solução de PEI, os diferentes microrganismos foram corados separadamente com dois marcadores fluorescentes. O iodeto de propídeo (IP) (Molecular Probes Europe BV, Leiden, Holanda) trata-se de um fluorocromo com marcada afinidade para os ácidos nucleicos, apenas penetrando em células com graves lesões de membrana citoplasmática (marcador de morte celular). O cloreto de bis-(ácido 1,3-dibutilbarbitúrico) trimetina oxonol (DiBac₄(3)) (Molecular Probes, Europe BV, Leiden, Holanda), é um fluorocromo lipofílico e aniônico, acumulado intracelularmente quando a membrana citoplasmática sofre despolarização. Um terceiro fluorocromo foi utilizado, o FUN-1 (2-cloro-4-(2,3 dihidro-3-metil-(benzo-1,3-tiazol-2-il)-metilideno)-1-fenilquinolinio iodado) que mede a atividade metabólica das leveduras. A análise por citometria de fluxo foi realizada com o software BD CellQuest (BD Biosciences, San Jose, CA, EUA) baseado em sinais de fluorescência e de dispersão de luz resultantes da ação do laser a 15 mW, a 488 nm e 635 nm. Sinais correspondentes de dispersão frontal e lateral da luz laser (FSC e SSC) assim como de fluorescência foram avaliados em FL1 (530/30 nm) para o DiBAC₄(3), FL2 (620 nm) para o FUN-1 e FL3 (670 nm) para o IP. Para a preparação da amostra, 1×10^6 células/mL foram expostas ao valor de CML do PEI, durante 15, 30, 60 e 120 min. Após exposição ao PEI, as diferentes estirpes foram incubadas com cada marcador fluorescente, no escuro, durante 30 min com 1 µg/ml de DiBAC₄(3) e IP, 0,5 µM de FUN-1. Como controles foram utilizadas suspensões celulares não tratadas com PEI: 1, sem qualquer marcação - autofluorescência e 2, células marcadas - controle de viabilidade com o qual as células tratadas são comparadas. Pelo menos 30 000 células de cada suspensão foram analisadas pelo BD FACSCalibur (BD Biosciences, San Jose, CA, EUA).

81

Análise Estatística

A atividade metabólica de biofilme foi expressa em percentagem em relação ao controlo (células não tratadas com PEI). Os resultados da adesão e efeito inibitório de biofilme, em diferentes concentrações, foram avaliados com teste ANOVA One-Way, com correção de Bonferroni. O teste de t-Student foi utilizado para avaliar a atividade de tratamento em biofilmes pré-formados. A significância estatística foi considerada para um valor de p inferior a 0,05. A análise estatística foi realizada pelo software SPSS (v. 20.0).

3.1.3. RESULTADOS

Atividade Antimicrobiana

O valor do CIM do PEI para as bactérias foi de 400 mg/L e para *C. albicans* foi de 50 mg/L. O valor obtido para o CML de PEI foi igual ao valor de CIM (CIM = CML). Os valores obtidos para as estirpes clínicas e ATCC foram iguais (Tabela 1).

Microrganismos	PEI (mg/L)	
	CIM	CML
<i>E. faecalis</i> ATCC	400	400
<i>E. faecalis</i> EF1	400	400
<i>S. aureus</i> ATCC	400	400
<i>S. aureus</i> AE1	400	400
<i>E. coli</i> ATCC	400	400
<i>E. coli</i> CO1	400	400
<i>C. albicans</i> ATCC	50	50
<i>C. albicans</i> CA1	50	50

TABELA 1 - Suscetibilidade antimicrobiana. Valores de CIM e CML do PEI.

Adesão e Biofilme

Todas as estirpes aderiram às placas de poliestireno, no entanto, a adesão foi significativamente reduzida na presença de todas as concentrações testadas de PEI ($p < 0,05$) (Figura 1). Em relação ao ensaio de formação de biofilme, o PEI inibiu significativamente a formação de biofilme, em todas as concentrações testadas para todos os microrganismos ($p < 0,05$). No ensaio de desagregação do biofilme, provavelmente, o ensaio mais importante em termos clínicos, uma vez que corresponde ao tratamento do biofilme propriamente dito, o PEI reduziu de forma significativa o biofilme, em relação a todos os microrganismos, mesmo nas concentrações mais baixas. Pela análise dos resultados obtidos, o PEI consegue ser mais eficaz no tratamento (desagregação) do biofilme formado do que na inibição da sua formação, pelas diferenças observadas na atividade metabólica (XTT). Também neste ensaio, o biofilme de leveduras sofreu uma maior redução de atividade metabólica, em qualquer das concentrações testadas, em comparação com os biofilmes bacterianos. A concentração de PEI de 200 mg/L causou uma redução de atividade metabólica de *C. albicans* ATCC de 95,38 %; 400 mg/L uma redução de 94,65 %; e 800 mg/L uma redução de 95,38 %, os valores mais baixos obtidos neste ensaio.

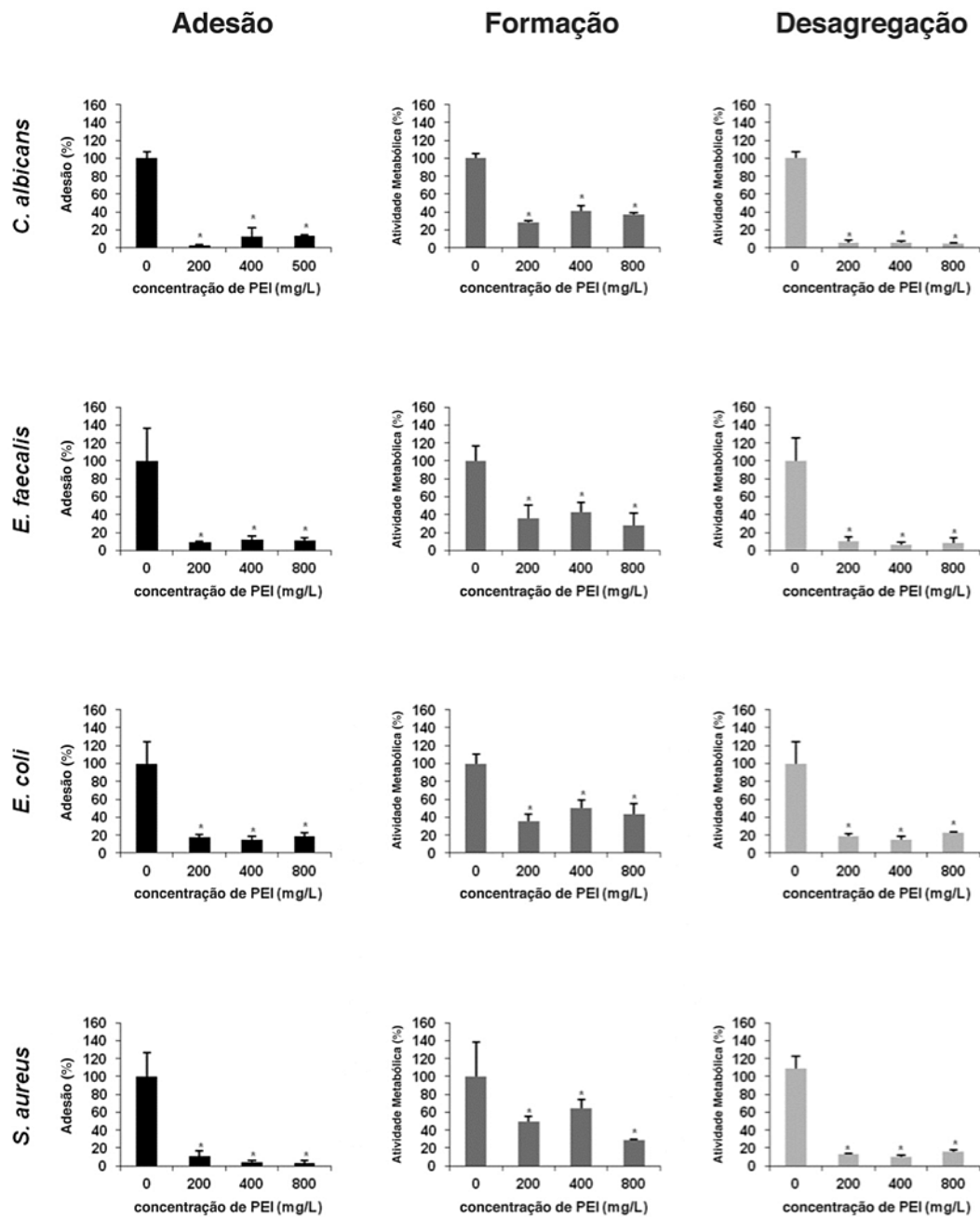


FIGURA 1 - Efeito da ação do PEI sobre a adesão, formação e desagregação dos biofilmes dos microrganismos ATCC testados, em percentagem de células metabolicamente ativas (método XTT). * Diferença estatística das diferentes concentrações de PEI em relação ao controlo positivo (concentração 0 mg/mL) (p < 0,05).

Mecanismo de Ação Antimicrobiana

Cerca de 50 % das células mostraram permeabilidade ao IP (Figura 2: D) indicando grave lesão da membrana celular, devido à exposição de PEI num curto período de tempo (15 min). A despolarização celular foi demonstrada pelo aumento de coloração das células após coloração com DiBAC₄(3) (Figura 2: B). Para os fungos foram obtidos resultados semelhantes. As alterações metabólicas foram demonstradas por um aumento da coloração do FUN-1.

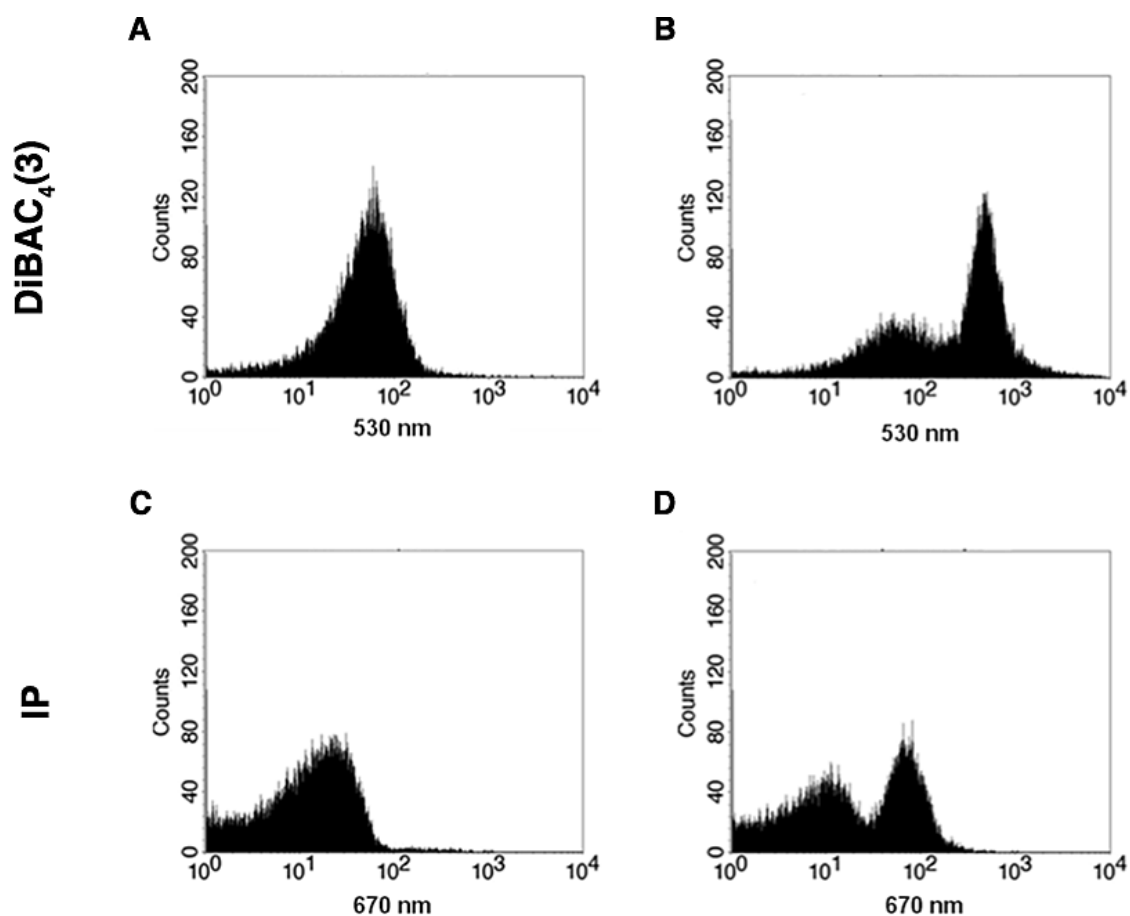


FIGURA 2 - Histogramas representativos da análise de citometria de fluxo em relação a células não tratadas do microrganismo *Enterococcus faecalis* ATCC (A e C) e células tratadas com valores de CML (400 mg/L) do PEI (B e D), marcadas com DiBAC₄(3) (A e B) e IP (C e D), após 15 min. As leituras foram efetuadas no canal de fluorescência FL1 (530/30 nm) para o DiBAC₄(3) e FL3 (670 nm) para o marcador IP.

3.1.4. DISCUSSÃO

A atividade antibiofilme e antimicrobiana de amplo espectro demonstrada pela ação do PEI, tanto contra bactérias de Gram positivo e de Gram negativo, como contra fungos, revelou que o PEI é um composto realmente promissor, com possível aplicação na incorporação ou revestimento de materiais endodônticos. A efetiva redução da formação de biofilme de *C. albicans*, pelo revestimento de PEI em superfícies de um polímero modificado utilizado na produção de dispositivos de longa duração, tais como próteses de voz, foi previamente descrita (1). No presente estudo, a adesão microbiana, o primeiro passo para o estabelecimento de infecção, foi significativamente reduzida na presença de PEI. Além disso, também se verificou um efeito dose-dependente na inibição da formação e desagregação do biofilme. No que diz respeito às bactérias, estes eventos ocorreram mesmo na presença de concentrações sub-inibitórias de PEI. Este facto é particularmente interessante na desagregação do biofilme, uma vez que é reconhecido que existe sempre algum biofilme formado e os microrganismos presentes em biofilmes exibem uma maior resistência aos agentes antimicrobianos clássicos. A seleção das concentrações utilizadas nos ensaios de adesão e biofilme foram seleccionadas de modo a incluir os valores CIM, CML, 2x CIM e uma concentração sub-inibitória ($\frac{1}{2}$ CIM) das bactérias (superiores às dos fungos) por vários motivos: 1, nas infecções endodônticas, as bactérias são mais frequentes do que os fungos, 2, as bactérias demonstraram maior resistência ao PEI pelos resultados obtidos no teste de suscetibilidade antimicrobiana, e 3, finalmente o objetivo era eleger a melhor concentração de PEI com capacidade de inibição de todos os microrganismos, para uma possível incorporação ou revestimento de materiais endodônticos.

De acordo com o teste de suscetibilidade antimicrobiana, apesar de o PEI ter demonstrado maior eficiência como fungicida (valor de CML de 50 mg/L, inferior ao das bactérias), também apresentou efeito bactericida, tanto para as bactérias de Gram negativo como para as bactérias de Gram positivo. Este amplo espectro é fundamental dada a etiologia polimicrobiana das doenças pulpares e perirradiculares. O facto de o PEI atuar sobre todos os microrganismos testados demonstra o potencial interesse deste composto em futuras aplicações como agente antimicrobiano na área da Endodontia.

Embora muitos estudos referenciem o *E. faecalis* como o principal microrganismo responsável pela manutenção de periodontite apical, tem sido descrita a presença de fungos associada à periodontite apical, em cerca de 1 % a 20 % dos casos (2, 3). A capacidade de invasão dos túbulos dentinários, de adaptação e sobrevivência em ambientes variados, de produção de enzimas hidrolíticas, de transição morfológica e formação de biofilmes são características que permitem

aos fungos resistirem e/ou se estabelecerem no sistema de canais radiculares, mesmo depois dos procedimentos do tratamento endodôntico (4). Apesar da presença de fungos estar relacionada, principalmente, com as lesões secundárias ou persistentes ao tratamento, a participação de fungos nas infecções endodônticas pode também ocorrer em casos em que não houve tratamento – lesões primárias (2-4). No entanto, importa referir que, provavelmente, estes microrganismos aparecem como oportunistas devido ao desaparecimento ou à remoção de outros microrganismos dos canais radiculares, já que os fungos têm a capacidade de crescer em ambientes com baixa quantidade de nutrientes, como o ambiente dos canais radiculares tratados. Das espécies fúngicas encontradas na cavidade oral, a *Candida albicans* tem sido a mais frequentemente isolada (3, 5).

86

Nos ensaios de biofilmes, os biofilmes bacterianos e o biofilme de leveduras tiveram comportamentos semelhantes. Os biofilmes bacterianos e fúngicos partilham muitas características como a formação do biofilme pela adesão inicial de microcolônias, a síntese de polímeros constituintes da membrana extracelular que lhes confere proteção em relação ao sistema imunológico, e o lento crescimento celular. No entanto, a composição do biofilme de *C. albicans* consiste numa mistura de células hospedeiras, células em forma de leveduras, pseudohifas e hifas, além de matriz extracelular composta por proteínas e polissacarídeos (6). A organização em biofilmes confere aos microrganismos inúmeras vantagens como melhor captação de nutrientes, crescimento mais ordenado da comunidade microbiana, maior proteção contra fagocitose, desidratação e resistência a agentes antimicrobianos. Além das características comuns dos biofilmes, a resistência aos antimicrobianos pode estar relacionada com vários fatores como limitações na difusão dos antimicrobianos pela matriz extracelular, alterações fenotípicas das células no biofilme e ainda com o desenvolvimento de mecanismos de resistência por alteração do genótipo das células (7, 8). Os resultados do presente estudo, demonstram que o biofilme de leveduras é mais afetado pelo PEI do que os biofilmes bacterianos, tanto no ensaio de inibição de formação de biofilme como no de avaliação de desintegração do biofilme, o que pode ser justificado por se usarem concentrações bastante acima da CIM para os fungos.

A técnica de citometria de fluxo tem-se revelado uma excelente ferramenta no campo da microbiologia como método de determinação da suscetibilidade aos antimicrobianos, pois rapidamente demonstra a atividade antimicrobiana e auxilia no esclarecimento do mecanismo de ação/resistência aos antimicrobianos (9, 10). A marcação com IP demonstrou a capacidade do PEI em provocar grave lesão da membrana citoplasmática nas bactérias e fungos, após curto tempo de incubação com o componente (15 min). Ainda, despolariza a membrana celular das bactérias e perturba o metabolismo dos fungos. Helander *et al.* (11) relataram que em contraste com outros permeabilizadores, o PEI não induz a libertação de lipopolissacarídeos (LPS) da membrana

externa (ME), mas antes provoca uma alteração na distribuição de fosfolípidos da camada interna para a externa o que faz aumentar a permeabilidade. A redução da atividade bactericida de alguns antibacterianos (particularmente os hidrofílicos, carregados positivamente) por ação do PEI pode ser devido a uma competição para a mesma ligação. O PEI apresenta uma carga positiva mais elevada, quando comparado com outros compostos, o que pode justificar a maior afinidade com a ME do que entre os antibacterianos e a ME (12). Ao contrário dos agentes antimicrobianos clássicos, cuja utilização favorece a emergência de resistências, os polímeros antimicrobianos têm a vantagem de promover uma atividade antimicrobiana de longa duração, sem libertação de produtos tóxicos (13). O mecanismo de ação através da lesão da membrana celular pode explicar a citotoxicidade do PEI (14) e ter implicações diferentes dependendo da aplicação biomédica. A fim de equilibrar a biocompatibilidade do PEI, vários investigadores desenvolveram algumas modificações, tendo como base que elevadas densidades de carga catiónica, estruturas compactas e muito ramificadas e elevados pesos moleculares, afetam negativamente a biocompatibilidade do composto (15, 16). Está descrito que a alta citotoxicidade do PEI de alto peso molecular, é devida à elevada afinidade de ligação à superfície externa da membrana plasmática, no entanto, a um baixo peso molecular do composto está associada uma baixa citotoxicidade (15).

87

Foi recentemente descrita a síntese de nanopartículas de PEI, designadas por nanopartículas de amónia quaternária de polietilenoimina (QPEI), com propriedades antibacterianas (17). Ao contrário das características de solubilidade e do comportamento hidrofílico do PEI, as nanopartículas de QPEI foram descritas como partículas insolúveis e hidrofóbicas, exercendo a sua ação apenas por contacto direto. Diferente dos agentes antimicrobianos comuns, estes não promovem a libertação de compostos tóxicos e a sua elevada carga positiva traduz-se num potente efeito antibacteriano. Devido à extensa área de superfície, o efeito das nanopartículas de QPEI pode ser verificado mesmo em baixas concentrações. Assim, é expectável que as nanopartículas de QPEI possam assegurar a estabilidade dos materiais com atividade antimicrobiana de longa duração, sem comprometer as propriedades físico-químicas e mecânicas dos materiais a que são adicionadas.

A nível geral, devem ser realizados mais estudos para avaliar a inclusão do composto PEI em dispositivos biomédicos, e mais especificamente, nos materiais utilizados na Endodontia. Os resultados obtidos pelo estudo realizado confirmaram a forte atividade antimicrobiana e fungicida do PEI contra microrganismos frequentemente associados à etiologia da periodontite apical. Devido à eficácia demonstrada pelo PEI, este parece ser um composto interessante para o tratamento endodôntico. Contudo a citotoxicidade a que está associado pode ser incompatível com certas aplicações biomédicas. Nos cimentos de obturação ou no revestimento da superfície

dos instrumentos/guta-percha, o contacto com os tecidos perirradiculares é praticamente inexistente, ainda que o aumento da atividade antimicrobiana de longa duração seja um requisito vantajoso a apresentar por estes materiais.

Apesar da existência de inúmeros agentes antimicrobianos usados em Endodontia, nenhum parece ser suficientemente eficaz na erradicação dos microrganismos do sistema de canais radiculares. Sob a forma de nanopartículas de QPEI será possível, com uma pequena concentração, e conseqüente menor toxicidade, potenciar o efeito antimicrobiano dos materiais utilizados.

3.2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. De Prijck K, De Smet N, Coenye T, Schacht E, Nelis HJ. Prevention of *Candida albicans* biofilm formation by covalently bound dimethylaminoethylmethacrylate and polyethylenimine. *Mycopathologia* 2010;170:213-21.
2. Waltimo TM, Sen BH, Meurman JH, Ørstavik D, Haapasalo MP. Yeasts in apical periodontitis. *Crit Rev Oral Biol Med* 2003;14:128-37.
3. Baumgartner JC, Watts CM, Xia T. Occurrence of *Candida albicans* in infections of endodontic origin. *J Endod* 2000;26:695-98.
4. Siqueira JF Jr, Sen BH. Fungi in endodontic infections. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2004;97:632-64.
5. Siqueira JF Jr, Rôças IN, Lopes HP, Elias CN, de Uzeda M. Fungal infection of the radicular dentin. *J Endod* 2002;28:770-73.
6. Mukherjee PK, Zhou G, Munyon R, Ghannoum MA. *Candida* Biofilm; a well-designed protected environment. *Med Mycol* 2005;43:191-208.
7. Chandra J. Biofilm Formation by the Fungal Pathogen *Candida albicans*: Development, Architecture, and Drug Resistance. *J Bacteriol* 2001;183:5385-94.
8. Lopes HP, Siqueira JF Jr. *Endodontia: Biologia e Técnica*; 2010. 3ª ed. Rio de Janeiro, Brasil: Guanabara Koogan.
9. Pina-Vaz C, Rodrigues AG, Costa-de-Oliveira S, Ricardo E, Mardh PA. Potent synergic effect between ibuprofen and azoles on *Candida* resulting from blockade of efflux pumps as determined by FUN-1 staining and flow cytometry. *J Antimicrob Chemother* 2005;56:678-85.
10. Pina-Vaz C, Rodrigues AG. Evaluation of antifungal susceptibility using flow cytometry. *Methods Mol Biol* 2010;638:281-89.
11. Helander IM, Latva-Kala K, Lounatmaa K. Permeabilizing action of polyethyleneimine on *Salmonella typhimurium* involves disruption of the outer membrane and interactions with lipopolysaccharide. *Microbiology* 1998;144:385-90.
12. Khalil H, Chen T, Riffon R, Wang R, Wang Z. Synergy between polyethylenimine and different families of antibiotics against a resistant clinical isolate of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 2008;52:1635-41.
13. Gould IM. A review of the role of antibiotic policies in the control of antibiotic resistance. *J Antimicrob Chemother* 1999;43:459-65.

14. Brunot C, Ponsonnet L, Lagneau C, Farge P, Picart C, Grosogeat B. Cytotoxicity of polyethyleneimine (PEI), precursor base layer of polyelectrolyte multilayer films. *Biomaterials* 2007;28:632-40.
15. Fischer D, Bieber T, Li Y, Elsasser HP, Kissel T. A novel non-viral vector for DNA delivery based on low molecular weight, branched polyethylenimine: effect of molecular weight on transfection efficiency and cytotoxicity. *Pharm Res* 1999;16(8):1273-79.
16. Fugeson DY, Chan WS, Yockman JW, Kim SW. Modified linear polyethylenimine- Cholesterol conjugates for DNA complexation. *Bioconjugate Chem* 2003;14:840-47.
17. Beyth N, Yudovin-Farber I, Bahir R, Domb AJ, Weiss EI. Antibacterial activity of dental composites containing quaternary ammonium polyethylenimine nanoparticles against *Streptococcus mutans*. *Biomaterials* 2006;27:3995-4002.

C A P Í T U L O 4

**NANOPARTÍCULAS
DE QPEI
E
CIMENTOS
ENDODÔNTICOS**

NOTA PRÉVIA

Este capítulo descreve a parte experimental, os resultados e a discussão dos Estudos 2, 3 e 4.

O Estudo 2, intitulado “**Atividade Antimicrobiana e Antibiofilme de Nanopartículas de QPEI**”, foi realizado em colaboração com o Serviço e Laboratório de Microbiologia da FMUP e o Departamento de Metalurgia e Materiais da Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto (FEUP), Porto (Portugal).

O Estudo 3, intitulado “**Atividade Antimicrobiana e Propriedades Físico-Químicas e Mecânicas de Cimentos Endodônticos com Incorporação de Nanopartículas de QPEI**” foi realizado no Laboratório de Microbiologia do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Estácio de Sá, Rio de Janeiro (Brasil) em colaboração com o Departamento de Metalurgia e Materiais da FEUP.

O Estudo 4, intitulado “**Atividade Antibiofilme de Cimentos Endodônticos com Incorporação de Nanopartículas de QPEI**”, foi realizado no Laboratório de Microbiologia do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Faculdade Estácio de Sá, Rio de Janeiro (Brasil).

4.1. ESTUDO 2 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E ANTIBIOFILME DE NANOPARTÍCULAS DE QPEI

4.1.1. OBJETIVOS

- Síntese e caracterização de nanopartículas de amónia quaternária de polietilenoimina (QPEI);
- Determinação da atividade antimicrobiana das nanopartículas QPEI contra *E. faecalis*, na forma de células planctónicas;
- Determinação da atividade antimicrobiana das nanopartículas QPEI contra *E. faecalis*, na forma de biofilme;
- Determinação do mecanismo de ação das nanopartículas QPEI por citometria de fluxo;

95

4.1.2. MATERIAIS E MÉTODOS

Síntese de Nanopartículas QPEI

O PEI foi dissolvido em etanol absoluto e reticulado com glutaraldeído, durante 6 h à temperatura ambiente. A reação de N-alkilação deu-se por adição de octanal 1:1 proporção molar (monómero de amina primária de PEI/moléculas de octanal). Este passo foi realizado à temperatura ambiente durante 24 h. A suspensão amarela resultante foi reduzida com cianoborohidreto de sódio. Utilizou-se iodeto de metilo para o processo de metilação a 42°C durante 48 h, durante o qual formou-se um precipitado amarelo. Uma quantidade molar equivalente de bicarbonato de sódio foi adicionada para recolher o iodeto de hidrogénio formado. Durante 24 h, e nas mesmas condições, a neutralização foi continuada. No final, deixou-se que o precipitado atingisse a temperatura ambiente, lavou-se com hexano e água bidestilada e de seguida foi liofilizado. O rendimento médio foi de 75 % (mol/mol).

Caracterização das Nanopartículas QPEI

O potencial zeta das nanopartículas de amónia quaternário de polietilenoimina (QPEI) foi caracterizado com um equipamento Zetasizer Nano-ZS (Malvern Instruments, Malvern, Reino Unido). A profundidade foi de cerca de 5 nm e os espectros obtidos foram coletados num

analisador hemisférico, usando uma energia de passagem de 150 V. O tamanho médio de partícula e a distribuição de tamanhos das nanopartículas foram determinados por dispersão dinâmica da luz utilizando um Zetasizer Nano-ZS (Malvern Instruments). A medição foi realizada num ângulo fixo de 90°, com as amostras diluídas aproximadamente 1000 vezes em água ultrapura. O tamanho da partícula das suspensões foi descrito pela média (média z) de diâmetro cumulativo. Todas as leituras foram realizadas em triplicado.

Meios de Cultura e Componentes Químicos

Os meios de cultura de agar e caldo de Mueller-Hinton (MHB/MHA), Brain Heart (BHIB/BHIA) e dextrose de Sabouraud foram preparados de acordo com as instruções do fabricante (Difco Laboratories, Detroit, MI, EUA). A solução tampão de fosfato pH 7,4 (PBS) e o meio de cultura de RPMI 1640 suplementado com L-glutamina e tamponado com MOPS, ambos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA), também foram preparados de acordo com as instruções do fabricante. A solução de stock de 25 % (m/v) de nanopartículas de QPEI foi utilizada nas experiências.

96

Estirpes Microbianas e Condições de Crescimento

Os estudos com nanopartículas de QPEI foram realizados com o microrganismo *Enterococcus faecalis*, uma estirpe pertencente à *American Type Culture Collection* (ATCC), *E. faecalis* ATCC 29212 e outra clínica, EF1. A estirpe clínica foi identificada pelo sistema de Vitek2 (bioMérieux, Vercieux, França). As estirpes bacterianas foram mantidas no congelador a -70°C em meio de cultura Luria-Bertani (LB) (Difco Laboratories, Detroit, MI, EUA) suplementado com 20 % de glicerol. Para cada experiência os microrganismos foram subcultivados duas vezes, em placas de agar LB a 37°C durante 24 h, para avaliar a pureza da cultura e a sua viabilidade.

Teste de Suscetibilidade Antimicrobiana

O valor de CIM da solução de nanopartículas de QPEI foi determinada de acordo com o método de referência, protocolo M100-S23 de 2013. As concentrações de QPEI testadas variaram de 2 %-0,001 % (m/v). O valor de CIM foi definido como a menor concentração de substância teste que inibe por completo o crescimento dos microrganismos nos poços de microdiluição. Os resultados foram obtidos ao fim de 24 h. Para determinar a concentração mínima letal (CML), 20 µl de cada poço de microdiluição foram semeados em agar MHA. As placas foram incubadas a $35 \pm 1^\circ\text{C}$ por 24 h com posterior contagem de UFC. O valor de CML foi definido como a menor concentração de substância teste que mata pelo menos 99,9 % do inóculo final.

Ensaio de Biofilme

Para ambos os ensaios as células bacterianas foram cultivadas *overnight*, a 37°C com agitação (180 rpm), em caldo de MHB. Após incubação, as células foram colhidas por centrifugação (5000 g, 5 min), lavadas com solução PBS e o inóculo ajustado com auxílio do densitômetro, a uma suspensão padronizada de 1×10^7 células/mL em meio MHB.

- i. Para avaliar se o QPEI tem a capacidade de impedir a formação de biofilme, induziu-se a formação de biofilmes em placas de poliestireno na presença de QPEI, durante 24 h. Foram utilizadas as seguintes concentrações de QPEI: 0, 0,0625 %, 0,125 %, 0,25 % e 0,5 % (m/v). Após o período de incubação, o efeito do QPEI foi determinado pela quantificação da atividade metabólica de biofilme, pelo ensaio de redução XTT;
- ii. Para estudar a desagregação do biofilme bacteriano foram formados biofilmes em placas de poliestireno de 12-poços, durante 24 h a 37°C. Posteriormente, foram lavados duas vezes com PBS e incubados com QPEI com as mesmas concentrações usadas anteriormente, por mais 24 h. O efeito do QPEI na desagregação do biofilme foi avaliado com análise de redução XTT;

97

Mecanismo de Ação

Após a incubação com a solução de nanopartículas de QPEI, os diferentes microrganismos foram corados separadamente com dois marcadores fluorescentes. Os fluorocromos utilizados foram o IP e o DiBAC₄(3) (Molecular Probes, Europe BV, Leiden, Holanda) pelas diferentes propriedades que apresentam, conforme descrito no Estudo 1 (Capítulo 3). A análise por citometria de fluxo foi realizada com o software BD CellQuest Pro (BD Biosciences) baseado em sinais de fluorescência e de dispersão de luz resultantes da ação do laser a 15 mW, a 488 nm e 635 nm. Sinais correspondentes de dispersão frontal e lateral da luz laser (FSC e SSC) assim como de fluorescência foram avaliados em FL1 (530/30 nm) para o DiBAC₄(3) e FL3 (670 nm) para o IP. Para a preparação da amostra, 1×10^6 células/mL foram expostas ao valor de CML do QPEI, durante 15, 30, 60 e 120 min. Após exposição ao QPEI, as diferentes estirpes foram incubadas no escuro durante 30 min, com cada marcador fluorescente, 1 µg/ml de IP e DiBAC₄(3). Como controlos foram utilizadas suspensões celulares não tratadas com QPEI: 1, sem qualquer marcação - autofluorescência e 2, células marcadas - controlo de viabilidade com o qual as células tratadas são comparadas. Pelo menos 30 000 células de cada suspensão foram analisadas pelo BD FACSCalibur (BD Biosciences).

Análise Estatística

Foi efetuado o teste ANOVA One-Way, seguindo-se o teste de Bonferroni para comparações *post hoc*, com o Software SigmaStat 3.5. As diferenças foram consideradas significativas a um nível de $p < 0,05$.

4.1.3. RESULTADOS

Caracterização das Nanopartículas QPEI

As partículas produzidas de amônia quaternária de polietilenoimina (QPEI) apresentaram um diâmetro médio nanométrico de 58 ± 18 nm. O valor de $68,5 \pm 1,9$ mV obtido pelo potencial zeta indica a carga positiva das nanopartículas, como esperado.

Atividade Antimicrobiana

As nanopartículas QPEI demonstraram um efeito bactericida para o microrganismo *E. faecalis*, sendo o valor de CIM 0,5 % e o valor de CLM 1 % (m/v). Os valores obtidos para a estirpe ATCC e clínica foram iguais.

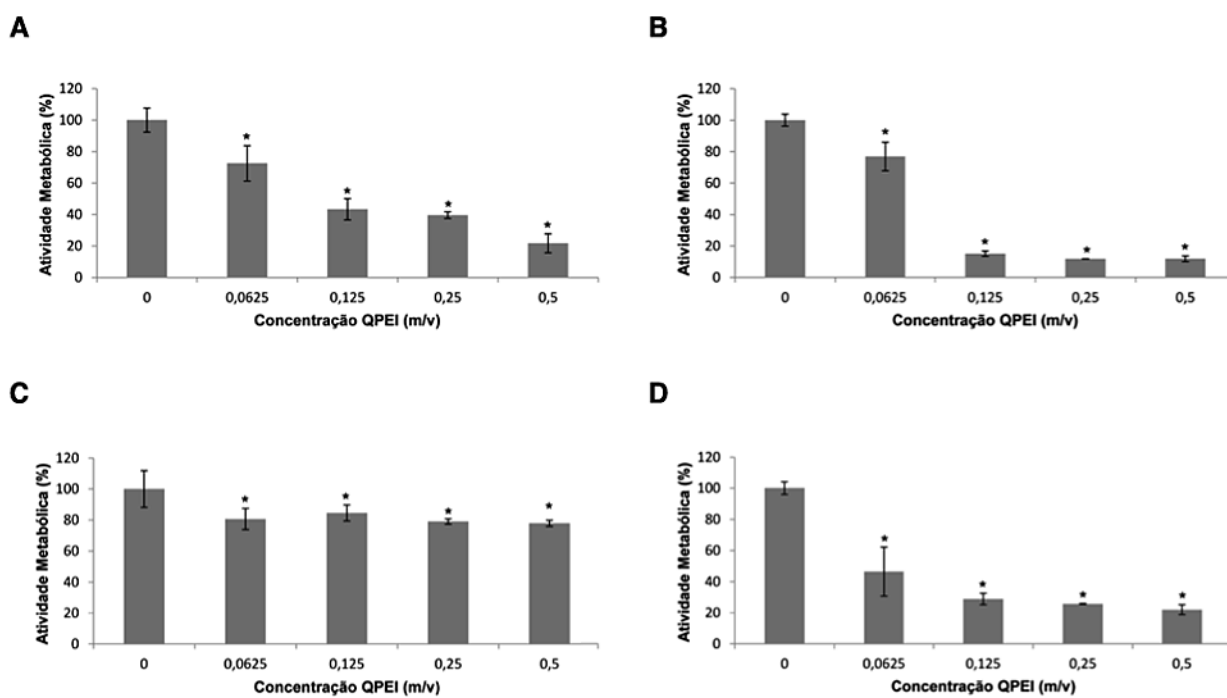
Ensaio de Biofilme

Os resultados obtidos estão representados na Figura 1. Em relação ao ensaio de formação de biofilme, o QPEI inibiu significativamente a formação de biofilme em todas as concentrações testadas, tanto para *E. faecalis* ATCC como para a estirpe clínica (EF1) ($p < 0,05$). De uma forma geral, associado ao aumento da concentração de QPEI está uma diminuição da atividade metabólica de ambas as estirpes, mais notória na estirpe clínica (EF1). Na maior concentração de QPEI (0,5 %) a estirpe ATCC sofreu uma redução de atividade metabólica de 78,29 % e a estirpe clínica de 88,15 %.

No ensaio de desagregação do biofilme, o QPEI reduziu significativamente o biofilme, mesmo nas concentrações mais baixas. Também neste ensaio, a estirpe clínica sofreu um maior efeito antibiofilme do que a ATCC. A maior redução de atividade metabólica verificada na estirpe ATCC foi de 22,16 %, na concentração 0,5 % de QPEI. No entanto, e em relação à estirpe clínica, importa referir que as concentrações de 0,125 %, 0,25 % e 0,5 % de QPEI causaram uma redução de atividade metabólica de 71,03 %, 74,20 % e 77,97 %, respetivamente.

Mecanismo de Ação

Ao fim de 15 min, cerca de 42 % das células foram marcadas com o IP o que significa que sofreram lesão da membrana. Em relação à avaliação da despolarização celular mediante o DiBAC₄(3), a média de intensidade de fluorescência aumentou para o dobro.



99

FIGURA 1 - Efeito da ação do QPEI sobre a formação e desagregação dos biofilmes de *E. faecalis* ATCC e clínica (EF1), em porcentagem de células metabolicamente ativas (método XTT). **A**: inibição da formação de biofilme *E. faecalis* ATCC, **B**: inibição da formação de biofilme *E. faecalis* clínica, **C**: desagregação do biofilme *E. faecalis* ATCC e **D**: desagregação do biofilme *E. faecalis* clínica. * Diferença estatística em relação ao controle positivo (concentração 0 mg/mL) ($p < 0,05$).

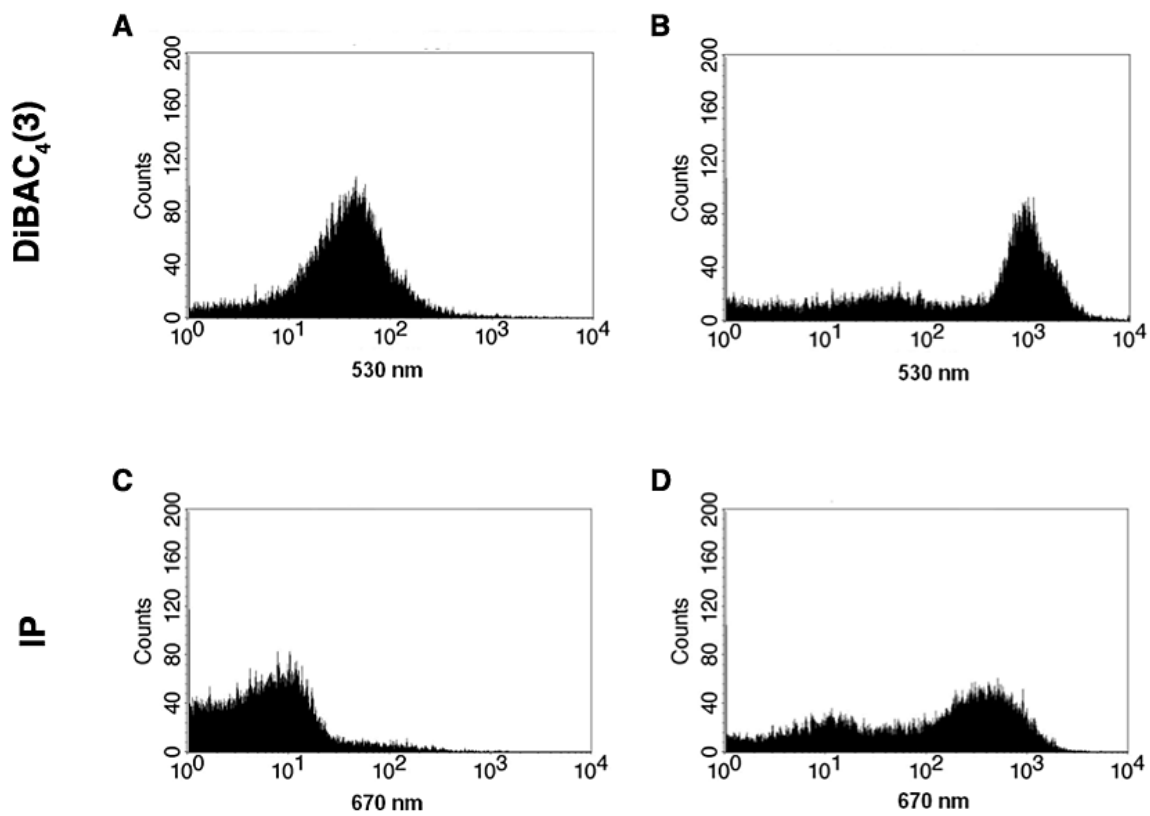


FIGURA 2 - Histogramas representativos da análise de citometria de fluxo em relação a células não tratadas do microrganismo *E. faecalis* ATCC (**A** e **C**) e células tratadas com valores de CML (1 % m/v) do QPEI (**B** e **D**), marcadas com DiBAC₄(3) (**A** e **B**) e IP (**C** e **D**), após 15 min. As leituras foram efectuadas no canal de fluorescência FL1 (530/30 nm) para o DiBAC₄(3) e FL3 (670 nm) para o marcador IP.

4.1.4. DISCUSSÃO

O presente estudo teve como primeiro objetivo a síntese e caracterização de nanopartículas de QPEI. As nanopartículas de QPEI foram preparadas através do método de aminação reductiva e N-metilação, o que leva ao aumento da sua carga positiva através da conversão de grupos amina primários, secundários e terciários do PEI em grupos catiónicos de amónia quaternária (1). O valor do potencial zeta das nanopartículas de QPEI de aproximadamente 68,5 mV foi determinado e utilizado neste estudo. Este valor está associado a partículas com potencial eficiência contra várias espécies bacterianas (2, 3). O tamanho de partícula de cerca de 58 nm confirmou a escala nanométrica das partículas, permitindo uma extensa e específica área da superfície do material, com várias porções carregadas positivamente, capazes de exercer atividade antimicrobiana. Lin *et al.* (4) relataram que a N-alkilação do PEI pode ser eficaz contra uma variedade de bactérias de Gram-positivo e de Gram-negativo. Beyth *et al.* (5) sugeriram que as características de carga positiva e a insolubilidade deste material estão relacionadas com o mecanismo de ação antibacteriano; compostos de amónia quaternária causam a lise das células bacterianas através da ligação a componentes da parede celular, promovendo perdas do material citoplasmático. Existem vários parâmetros que determinam o impacto de um agente antimicrobiano, tal como a carga de superfície positiva e a natureza hidrofóbica do agente. Como as superfícies bacterianas são carregadas negativamente, a um pH fisiológico, os compostos com grupos de amónia quaternária (catiônicos) têm sido identificados como agentes antibacterianos.

O segundo objetivo do estudo realizado foi avaliar a atividade antimicrobiana e antibiofilme das nanopartículas de QPEI contra o microrganismo *Enterococcus faecalis*. O microrganismo *E. faecalis* tem sido selecionado para estes ensaios por ser resistente à terapêutica antimicrobiana em Endodontia e por ser frequentemente detetado em canais radiculares de dentes com periodontite apical pós-tratamento endodôntico (6-8).

Em relação à suscetibilidade antibacteriana foi observado um efeito bactericida das nanopartículas de QPEI (1 % m/v). A concentração de 0,5 % (m/v) representa o valor de CIM obtido para o microrganismo *E. faecalis*, ou seja, o valor em que as nanopartículas QPEI têm um efeito bacteriostático. Assim, pelos resultados obtidos, esta concentração poderá ser considerada a concentração mínima mais eficaz para que o microrganismo seja afetado no estado planctónico.

Apesar dos padrões globais de suscetibilidade relativamente semelhante entre as estirpes de *E. faecalis* selecionadas foram observadas variações, o que parece confirmar a necessidade do uso de diferentes estirpes isoladas a partir dos locais de interesse a estudar. De realçar, que em ambos os ensaios de avaliação do biofilme, inibição e degradação, a estirpe clínica foi um pouco mais

102 suscetível à ação do QPEI, uma vez que, foi maior a redução da atividade metabólica em todas as concentrações testadas, em comparação com a estirpe ATCC. Na avaliação da inibição de formação de biofilme do microrganismo *E. faecalis* ATCC verificou-se um efeito dose-dependente e, apesar da concentração mais baixa testada (0,625 %) apresentar uma redução de atividade metabólica (27,52 %), estatisticamente significativa ($p < 0,05$) em relação ao controlo, a concentração de 0,5 % é mais eficaz (redução de atividade metabólica de 78,29 %). Em relação à estirpe clínica o mesmo não é válido, pois os valores de redução de atividade metabólica das 3 maiores concentrações testadas (0,125 %, 0,25 % e 0,5 %) apresentaram valores muito semelhantes (~ 85 % - 88 %). A determinação da inibição de formação do biofilme pode representar em termos clínicos um ensaio de prevenção de contaminação bacteriana que, no tratamento endodôntico, corresponderia à manutenção das condições de assepsia atingidas durante a preparação químico-mecânica. A avaliação da desagregação do biofilme bacteriano, por sua vez, representa o tratamento, ou seja, a eficácia em eliminar possíveis bactérias remanescentes resistentes ao tratamento endodôntico. Neste ensaio, os valores de redução de atividade metabólica não foram tão elevados como os do ensaio de inibição de formação do biofilme, em ambas as estirpes. Este facto não é surpreendente uma vez que se espera uma maior dificuldade em perturbar um biofilme já formado do que a inibição da sua formação. O facto de as nanopartículas de QPEI apresentarem os dois efeitos (inibição de formação de biofilme e degradação do biofilme formado) em concentrações sub-inibitórias parece muito interessante.

Em relação à determinação do mecanismo de ação das nanopartículas QPEI por citometria de fluxo, os resultados obtidos foram muito semelhantes aos do Estudo 1 (Capítulo 3). Assim, ao fim de pouco tempo (15 min), as nanopartículas de QPEI lesam gravemente a membrana citoplasmática do microrganismo *E. faecalis* e ainda induzem a despolarização da membrana celular.

A possibilidade de melhorar e prolongar os efeitos antibacterianos dos cimentos endodônticos tem o potencial de contribuir para a melhoria da desinfecção do sistema de canais radiculares. A incorporação de nanopartículas de QPEI, em dois cimentos endodônticos diferentes quanto à sua constituição base, foram o ponto de partida para a hipótese de aumento da atividade antibacteriana e/ou prolongamento dos efeitos antibacterianos destes materiais.

4.2. ESTUDO 3 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS E MECÂNICAS DE CIMENTOS ENDODÔNTICOS COM INCORPORAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE QPEI

4.2.1. OBJETIVOS

- Avaliação da atividade antimicrobiana dos cimentos de obturação AH Plus (Dentsply DeTrey, Konstanz, Alemanha) e Pulp Canal Sealer EWT (PCS) (Kerr Italia Srl, Salerno, Itália), incorporados com nanopartículas de QPEI, a 1 % e 2 % (m/m) contra o *Enterococcus faecalis* ATCC e duas estirpes clínicas endodônticas (RW35 e RN44);
- Avaliação das propriedades físico-químicas e mecânicas dos cimentos de obturação AH Plus (Dentsply DeTrey, Konstanz, Alemanha) e Pulp Canal Sealer EWT (PCS) (Kerr Italia Srl, Salerno, Itália) incorporados com nanopartículas de QPEI a 1 % e 2 % (m/m), de acordo com a Norma ISO 6876;

103

4.2.2. MATERIAIS E MÉTODOS

Estirpes Bacterianas e Condições de Cultura

Três estirpes de *E. faecalis* foram utilizadas neste estudo: ATCC 29212 e duas estirpes clínicas isoladas de canais de dentes submetidos a tratamento endodôntico (RW35 e RN44) (9). As estirpes foram cultivadas *overnight* a 37°C, em meio de cultura TSB (Difco, Detroit, MI, EUA) suplementado com 1 % de glicose (Merck, Whitehouse Station, NJ, EUA). A pureza da cultura foi verificada e o inóculo foi ajustado em PBS para uma turbidez de 0,5 na escala de McFarland (cerca de $1,5 \times 10^8$ UFC/mL).

Amostras

Os cimentos endodônticos testados neste estudo foram o cimento AH Plus (AH) (Dentsply DeTrey, Konstanz, Alemanha) e o Pulp Canal Sealer EWT (PCS) (Kerr Italia Srl, Salerno, Itália). As nanopartículas de QPEI foram incorporadas nos cimentos em ambas as concentrações de 1 % e 2 % (m/m). Os cimentos foram preparados segundo as instruções do fabricante.

Teste de Contacto Direto (DCT)

O teste de contacto direto (DCT) foi realizado como descrito previamente por Zhang *et al.* (10). Uma placa de poliestireno de 96-poços (modelo 92096 TPP “Techno Plastic Products”, certificação ISO 9001, Trasadingen, Suíça) foi colocada verticalmente e uma área de tamanho fixo na parede lateral dos poços foi revestida com aproximadamente 30 µL de cada um dos materiais testados, usando uma seringa de insulina e uma espátula de compósito. Os cimentos foram testados até 20 min após a mistura (amostras frescas) ou armazenados por 7 dias, a 37°C em 100 % de humidade relativa (amostras envelhecidas) em estufa. Alíquotas de 10 µL de suspensão bacteriana (contendo cerca de $1,5 \times 10^6$ bactérias) foram colocadas sobre a superfície de cada cimento. A suspensão bacteriana foi aplicada nas paredes de poços não revestidos - grupo controlo positivo. Não foi aplicada suspensão bacteriana nas paredes de poços revestidos com cimentos - grupo controlo negativo.

As placas de 96-poços foram incubadas a 37°C em 100 % de humidade relativa, durante 10, 30 e 60 min e em seguida colocadas na horizontal de modo a permitir que 200 µL de TSB fosse adicionado a cada poço. A suspensão bacteriana de cada poço foi misturada suavemente com uma pipeta durante 1 min e em seguida, o conteúdo foi transferido para placas de microdiluição estéreis e submetido a 10 diluições em série, em solução salina estéril. A sobrevivência bacteriana foi determinada por cultura de alíquotas de 10 µL de cada diluição em placas de agar *Mitis Salivarius* (MS). As unidades formadoras de colónias (UFC) foram contadas após 24 h de incubação a 37°C. As amostras foram avaliadas em triplicado.

Teste de Difusão em Agar (ADT)

Com o auxílio de uma zaragatoa fez-se a inoculação de 0,1 mL das 3 estirpes de *E. faecalis* em placas de Petri com agar *Mitis Salivarius* (MS). Depois da adsorção, foram realizados no agar quatro poços com 6 mm de diâmetro e 5 mm de profundidade, onde foram depositados os cimentos preparados. As placas foram incubadas em estufa a 37°C por 48 h. Os efeitos antibacterianos de cada material testado foram determinados pelas medições do diâmetro dos halos da zona de inibição em mm. Foi considerada como zona inibitória, a menor distância desde a margem externa do poço até ao ponto onde se verifica o início do crescimento bacteriano. As amostras de cimentos comerciais e incorporados com nanopartículas QPEI na concentração de 2 % (m/m) foram avaliadas em duplicado.

Propriedades Físico-Químicas e Mecânicas

As propriedades físico-químicas dos cimentos endodônticos, na fórmula comercial e com

incorporação de nanopartículas QPEI, tais como o tempo de endurecimento, fluidez, solubilidade, porosidade aparente, alteração dimensional, molhabilidade e potencial zeta foram determinadas. O comportamento mecânico, como a resistência à compressão também foi investigado. Os testes foram realizados de acordo com a Norma ISO 6876:2001 (11).

TEMPO DE ENDURECIMENTO

Três discos de plástico com um diâmetro interno de 10 mm e espessura de 1 mm serviram de molde. Os moldes foram preenchidos com cada material teste e posteriormente transferidos para uma câmara de fluxo com 95 % de humidade relativa, a 37°C. Decorridas 24 h do início de mistura dos materiais, uma agulha tipo Gilmore com uma massa de $100 \pm 0,5$ g e extremidade fixa de $2,0 \pm 0,1$ mm de diâmetro, foi aplicada verticalmente sobre a superfície horizontal de cada amostra. A ponta da agulha foi limpa e a sondagem foi repetida até as indentações deixarem de ser visíveis, tendo sido registado o tempo de endurecimento.

TESTE DE FLUIDEZ

Uma seringa graduada e descartável de 1 ml foi utilizada para colocar 0,5 mL de cimento numa placa de vidro (40 x 40 x 5 mm). Após 180 ± 5 seg do início da mistura, outra placa de vidro foi aplicada centralmente na parte superior do material, para fazer uma massa total de 120 g. Dez minutos após o início da mistura, a carga foi retirada e a média dos diâmetros, maior e menor dos discos comprimidos, foi medido utilizando um calibrador digital com uma leitura de 0,025 mm. A média das três medições para cada cimento, expressa em milímetros, foi registada como o valor de fluidez do material.

SOLUBILIDADE

Moldes de aço inoxidável com um diâmetro interno de $20 \pm 0,1$ mm e altura de $1,5 \pm 0,1$ mm, foram utilizados para a preparação das amostras. Os moldes foram colocados sobre uma placa de vidro e preenchidos com um ligeiro excesso dos materiais teste preparados. Após o preenchimento dos moldes, uma outra placa de vidro foi colocada no topo dos moldes. Três conjuntos de amostras para cada material foram preparados de uma só vez. Todas as amostras foram armazenadas durante 24 h numa câmara de fluxo, a 37°C e 100 % de humidade relativa. Os moldes (com as amostras) foram expostos ao ar durante 15 min e de seguida pesados três vezes, e a média dos valores registados foi calculada. As amostras de cada material foram colocadas individualmente em recipientes, previamente tarados, contendo 5 mL de água destilada. Os recipientes foram transferidos para uma estufa, a 37°C durante 24 h. Removeu-se as amostras, e procedeu-se à sua lavagem com água destilada tendo esta água sido recolhida nos respetivos

recipientes. A água dos recipientes foi evaporada numa estufa a 105°C e de seguida estes foram colocados num exsiccador para arrefecimento e posterior pesagem. A diferença entre este peso e o peso original dos recipientes foi dividido pelo peso seco inicial das amostras e multiplicado por 100. O resultado foi registado como o valor de solubilidade.

POROSIDADE APARENTE

A porosidade aparente foi avaliada de acordo com o teste de imersão (princípio de Arquimedes, norma ASTM C830), utilizando água. As amostras foram inicialmente pesadas em condições secas (W_d). Após 1 h de imersão em água, a amostra foi pesada (W_h) e novamente pesada após imersão em água (W_i). A porosidade aparente da amostra foi calculada a partir da massa de água retida em poros abertos, de acordo com a seguinte fórmula: Porosidade aparente (%) = $[(W_h - W_d) / (W_i - W_d)] \times 100$.

VARIAÇÃO DIMENSIONAL

Prepararam-se moldes cilíndricos com um diâmetro de 6 mm e uma altura de 12 mm. Depois de preenchidos os moldes com cada material teste, o conjunto dos moldes e as placas foram firmemente fixados com um gancho. Após 5 min do início da mistura, o molde com o gancho foi transferido para uma câmara de fluxo com 95-100 % de humidade relativa e mantido durante 30 dias a 37°C. A dimensão dos cilindros foi novamente medida e a variação dimensional (%) avaliada por meio da alteração do volume ($(V_i - V_f) / V_i \times 100$, V_i representa o volume inicial e V_f o volume final). Estas medições foram realizadas com um paquímetro, um instrumento de medida extremamente preciso (Vernier Caliper, erro $\pm 0,025$ mm).

MOLHABILIDADE

A molhabilidade dos cimentos endodônticos foi determinada pela medição do ângulo de contacto formado com água ultrapura. Os cimentos testados foram espalhados uniformemente sobre placas de vidro e mantidos num ambiente com 100 % de humidade relativa, a 37°C, até endurecerem. Foi usado o método da gota séssil, avaliando-se pelo menos 10 gotas de 4 μ L na superfície de cada uma das amostras secas. O equipamento Dataphysics - *Contact Angle Sistem OCA 15 Plus* foi utilizado para medir o ângulo de contacto.

POTENCIAL ZETA

O potencial zeta das amostras dos cimentos em pó, comerciais e incorporados com nanopartículas de QPEI a 1 % e 2 % (m/m), foi avaliado usando o equipamento Zetasizer

Nano ZS (Malvern Instruments), um equipamento de microeletroforese de laser Doppler. Os pós foram suspensos em água ultrapura concentrada a 0,5 % (m/v). A suspensão foi filtrada através de um filtro de celulose com poros de tamanho 0,2 µm. Foi aplicado um campo elétrico às soluções aquosas com os cimentos em pó dispersos, que em seguida se deslocaram a uma velocidade relacionada com o seu potencial zeta. A profundidade de análise foi de aproximadamente 5 nm, e os espectros foram recolhidos por um analisador hemisférico usando energia de passagem de 150 V. O cálculo da mobilidade electroforética (EM) e o potencial zeta é determinado de acordo com a seguinte equação de Smoluchowski: $ZP = 4ph/D \times E$, h corresponde à viscosidade em *poise* e o D , à constante dielétrica do líquido de suspensão. Foram efetuadas três leituras por amostra para assegurar a reprodutibilidade.

RESISTÊNCIA À COMPRESSÃO

Foram utilizadas cinco amostras cilíndricas com uma proporção de 1:2 de base de diâmetro por altura para cada material testado. Utilizando um equipamento Tira Teste 2705, cada amostra foi sujeita à força de compressão com uma célula de carga de 500 N, a uma taxa de 0,3 mm/seg até fraturar. A carga máxima suportada antes da fratura foi considerada como a resistência à compressão.

107

Análise Estatística

Após verificar a aplicabilidade da distribuição normal aos resultados obtidos, foi efetuado o teste ANOVA One-Way, seguindo-se o teste de Bonferroni para comparações *post hoc*, com o Software SigmaStat 3.5. As diferenças foram consideradas significativas a um nível de $p < 0,05$.

4.2.3. RESULTADOS

Efeitos Antibacterianos

Os resultados do teste de contacto direto (DCT) para os efeitos antibacterianos nos cimentos endodônticos, não modificados ou contendo nanopartículas de QPEI, estão representados na Figura 3. No grupo de cimentos “frescos” (amostras frescas), o PCS apresentou os efeitos antibacterianos mais fortes, independentemente da presença de nanopartículas de QPEI. A eliminação total de células bacterianas das duas estirpes endodônticas (RW 35 e RN44) foi observada aos 10 min de contacto. O AH Plus demonstrou, de uma forma geral, propriedades antibacterianas inferiores ao PCS. A erradicação bacteriana total foi observada somente após 60

min de contacto, com uma das estirpes (RW35). A incorporação de nanopartículas de QPEI não alterou significativamente a atividade antimicrobiana de nenhum dos cimentos em estado “fresco” ($p > 0,05$).

Após 7 dias de endurecimento, ambos os cimentos PCS e AH Plus (comerciais) perderam efeito antibacteriano contra todas as estirpes testadas (amostras envelhecidas). No entanto, o PCS incorporado com nanopartículas de QPEI em concentrações de 1 % e 2 % (m/m), apresentou atividade antimicrobiana contra todas as estirpes testadas de *E. faecalis*, no tempos de 30 e 60 min de contacto, significativamente superior à fórmula comercial ($p < 0,05$). As três estirpes de *E. faecalis* foram completamente erradicadas no período de tempo de 60 min de contacto com o cimento PCS 2 %. A incorporação de nanopartículas de QPEI (1 % ou 2 %) ao cimento AH Plus não promoveu qualquer aumento significativo do efeito antibacteriano após o endurecimento. Todos os controlos negativos apresentaram ausência de crescimento bacteriano.

108

Os resultados do teste de difusão em agar (ADT), para os efeitos antibacterianos dos cimentos endodônticos testados, não demonstraram diferenças significativas ($p > 0,05$) entre os cimentos na formulação comercial e os cimentos com nanopartículas de QPEI 2 % e entre as diferentes estirpes avaliadas. Tanto o cimento PCS como o AH Plus revelaram halos de inibição de crescimento bacteriano. O valor médio do diâmetro das zonas de inibição promovido pelo PCS para a estirpe *E. faecalis* ATCC foi de 4 mm e para ambas as estirpes clínicas de 3 mm. Os valores médios obtidos para o cimento PCS 2 % foram semelhantes (Figura 4). Em relação ao cimento AH Plus e AH Plus 2 %, os valores médios obtidos para a estirpe ATCC foi de 4 mm e para ambas as estirpes clínicas de 5 mm. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os cimentos PCS e AH Plus ($p > 0,05$).

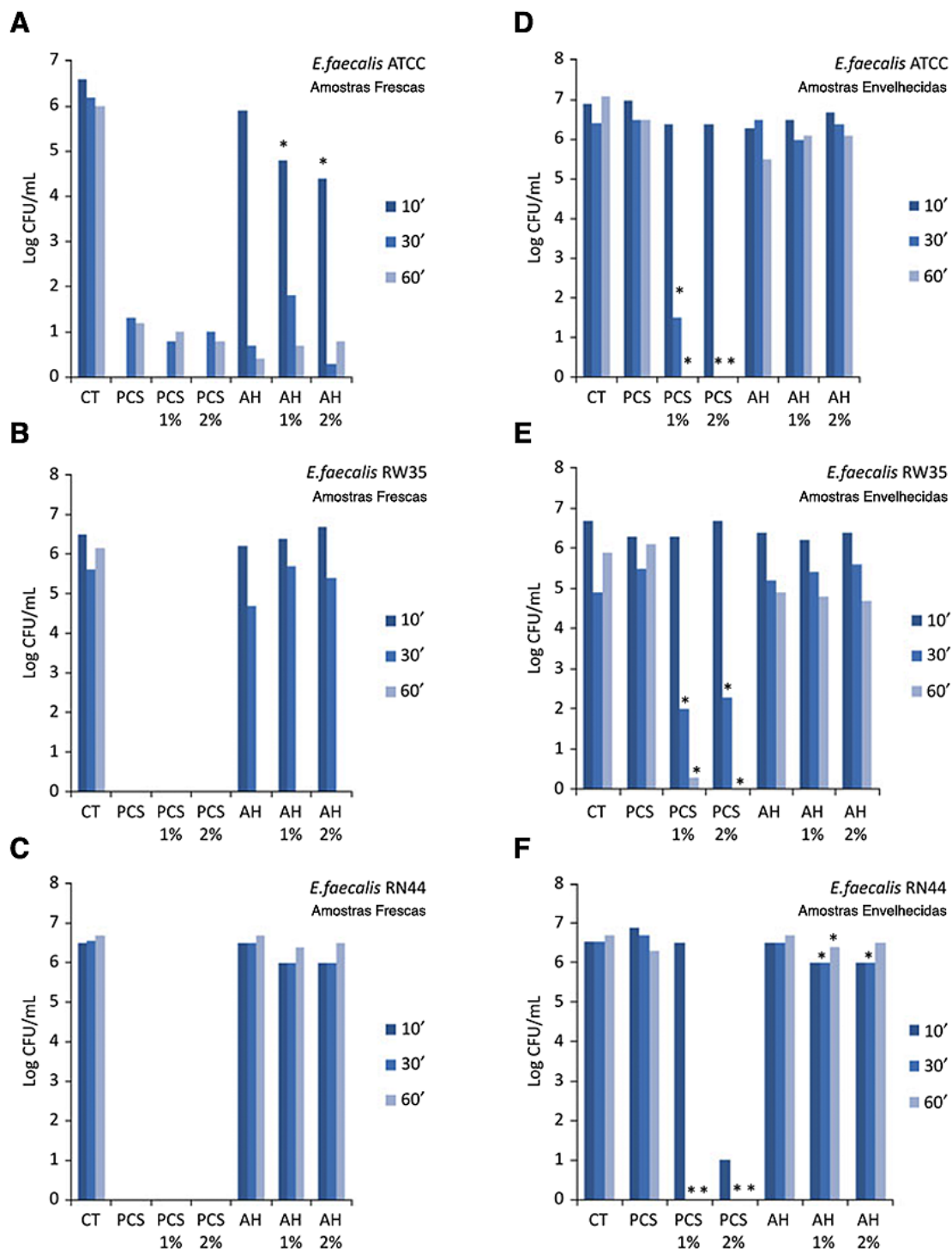


FIGURA 3 - Teste de contacto direto. Sobrevivência de diferentes estirpes de *Enterococcus faecalis* após 10, 30 e 60 min de contacto com os cimentos incorporados com nanopartículas de QPEI a 1% e 2%. Amostras frescas (A-C); amostras envelhecidas, após 7 dias de endurecimento (D-F). CT, controlo positivo; PCS, Pulp Canal Sealer EWT; AH, AH Plus. * Valores significativamente diferentes em relação aos cimentos comerciais, no mesmo período de tempo ($p < 0,05$).

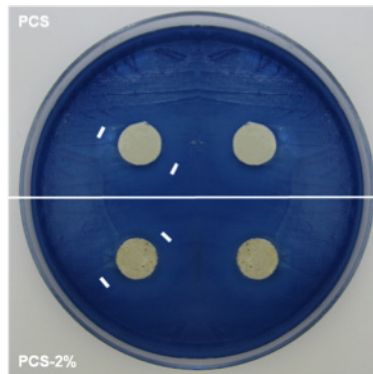


FIGURA 4 - Resultado do Teste Difusão em Agar (ADT). Zona de inibição de crescimento das amostras do cimento PCS e PCS 2 % (nanopartículas de QPEI 2 % m/m), em duplicado, contra *Enterococcus faecalis* ATCC.

Propriedades físico-químicas e mecânicas

As propriedades físico-químicas e mecânicas dos cimentos com e sem a incorporação de nanopartículas de QPEI estão registradas na Tabela 1. Comparando as propriedades dos cimentos comerciais AH Plus e PCS, verificou-se um tempo de endurecimento muito maior para o AH Plus, o qual também apresentou um ligeiro aumento nos valores de variação dimensional e valores inferiores na fluidez, em relação ao PCS. Os resultados obtidos na avaliação da solubilidade e molhabilidade nos dois cimentos foram semelhantes. As principais diferenças verificaram-se nos valores do potencial zeta e na resistência à compressão. O AH Plus apresentou valores de resistência à compressão muito superiores aos valores do PCS. Relativamente ao potencial zeta, apesar de ambos os materiais apresentarem valores próximos de zero, o cimento AH Plus demonstrou uma carga de superfície negativa, em oposição ao PCS, que demonstrou possuir uma superfície carregada positivamente.

As propriedades dos cimentos incorporados com nanopartículas de QPEI foram primeiramente avaliadas com a concentração de 2 % (m/m). Naquelas propriedades em que se registaram valores muito diferentes em relação aos cimentos comerciais também foram avaliados os materiais com a concentração de 1 % (m/m). Os resultados indicaram que apenas o tempo de endurecimento, a molhabilidade e o potencial zeta dos cimentos testados sofreram alterações pela presença de nanopartículas de QPEI. O PCS 2 % QPEI demonstrou um aumento significativo do tempo de endurecimento ($p < 0,05$). Ambos os cimentos comerciais (AH Plus e PCS) apresentaram um comportamento hidrofóbico, mas após a incorporação de nanopartículas de QPEI tornaram-se hidrofílicos. O aumento da molhabilidade foi diretamente proporcional ao aumento

da concentração de nanopartículas de QPEI, para ambos os cimentos. A incorporação de nanopartículas fez com que a carga de superfície se tornasse mais positiva em ambos os cimentos. A incorporação de 2 % QPEI ao cimento AH Plus causou um ligeiro aumento na carga da superfície enquanto que a concentração de 1 % demonstrou apenas um aumento mínimo. A carga da superfície da matriz de PCS demonstrou uma alteração significativa nos valores obtidos (com 2 % e 1 % m/m) uma vez que passou de $3,93 \pm 0,18$ mV para $69,80 \pm 2,28$ mV, após a incorporação de 2 % (m/m) de nanopartículas QPEI ($p < 0,05$).

Propriedades	AH Plus			Pulp Canal Sealer EWT		
	AH-0%	AH-1%	AH-2%	PCS-0%	PCS-1%	PCS-2%
Tempo de Endurecimento (min)	470 ± 10	475 ± 10	475 ± 15	55 ± 2	60 ± 3	62 ± 3*
Fluidez (mm)	29,0 ± 0,66	28,4 ± 0,55	27,8 ± 0,21	33,6 ± 0,60	32,7 ± 0,30	32,0 ± 0,31
Solubilidade (%)	0,7 ± 0,1	-	0,8 ± 0,1	0,9 ± 0,2	-	0,9 ± 0,1
Porosidade Aparente (%)	5,6 ± 1,4	-	6,0 ± 1,3	10,5 ± 2,5	-	12,2 ± 3,0
Variação Dimensional (%)	-0,43 ± 0,01	-	-0,40 ± 0,01	-0,23 ± 0,02	-	-0,13 ± 0,01
Molhabilidade (o)	80,9 ± 0,4	65,8 ± 1,9*	56,2 ± 2,0*	84,0 ± 1,2	70,4 ± 1,7*	50,4 ± 3,4*
Potencial Zeta (mV)	-8,26 ± 1,27	-8,12 ± 1,25	-3,85 ± 0,6*	3,93 ± 0,18	46,7 ± 2,02*	69,80 ± 2,28*
Resistência à Compressão (MPa)	7,68 ± 0,41	-	7,56 ± 0,04	1,18 ± 0,21	-	1,15 ± 0,30

TABELA 1 - Propriedades físico-químicas e mecânicas. 0 %, cimentos comerciais não modificados; 1 %, incorporação de QPEI nos cimentos na concentração 1 % m/m; 2 %, incorporação de QPEI nos cimentos na concentração 2 % m/m. AH, AH Plus; PCS, Pulp Canal Sealer EWT. * Diferença estatística entre o grupo teste e o grupo de cimento comercial ($p < 0,05$).

4.2.4. DISCUSSÃO

No presente estudo as nanopartículas de QPEI foram incorporadas nos cimentos endodônticos AH Plus e PCS, com o objetivo de aumentar os seus efeitos antibacterianos. As nanopartículas antibacterianas apresentam uma forte atividade antibacteriana, mais elevada do que os seus homólogos em pó, o que pode estar relacionado com o facto de exibirem uma maior área de superfície e de densidade de carga que parece favorecer a interação com as superfícies bacterianas carregadas negativamente (12). Os resultados obtidos demonstraram que o cimento PCS com nanopartículas de QPEI, após 7 dias de endurecimento (amostras envelhecidas), apresenta um pronunciado efeito antibacteriano contra estirpes selecionadas de *E. faecalis*, superior ao cimento comercial.

Uma vez que a presença do microrganismo *E. faecalis* está associada a infecções de dentes com periodontite apical, esta espécie tem sido utilizada em várias investigações sobre os efeitos antibacterianos dos procedimentos, materiais e substâncias utilizados no tratamento endodôntico. Além de uma estirpe ATCC com origem na urina, foram também incluídas nos estudos de atividade antimicrobiana, duas estirpes endodônticas isoladas a partir dos canais radiculares de dentes com tratamento endodôntico e periodontite apical e já antes caracterizadas em estudos anteriores (9). A utilização de estirpes isoladas do ambiente de interesse é fortemente recomendada para investigações desta natureza, apesar de nem sempre os estudos incluírem estirpes clínicas. Este estudo reforçou o que antes já tinha sido referido (Estudo 2), ou seja, que existem diferenças nos padrões globais de suscetibilidade das estirpes, o que dá ênfase à necessidade do uso de diferentes estirpes clínicas implicadas nas infecções, alvo de estudos.

112

Shvero *et al.* (13) observaram que a incorporação de baixas concentrações (0,5 %, 1 % e 2 % m/m) de nanopartículas QPEI num cimento provisório, conferiu efeitos antibacterianos (1 % e 2 %) contra *Streptococcus mutans* e *E. faecalis*, por um período de 14 dias. Além disso, Beyth *et al.* (14, 15) obtiveram um melhor desempenho clínico de resinas compostas incorporadas com nanopartículas QPEI 1 % (m/m), pela inibição do crescimento bacteriano e prevenção das alterações de rugosidade da superfície dos materiais.

No presente estudo, o ensaio de avaliação da atividade antibacteriana utilizado, o teste de contacto direto (DCT), foi modificado de forma a permitir a análise do efeito bactericida (9). Assim, a contagem de bactérias sobreviventes (UFC) foi calculada, após cada tempo de contacto, por meio de culturas bacterianas. A informação obtida pela análise dos efeitos bactericidas é clinicamente relevante porque as bactérias residuais, no caso de não ser obtido efeito bactericida, podem proliferar de novo quando os efeitos inibitórios do agente microbiano cessam. Importa referir que a avaliação dos efeitos bacteriostáticos dos materiais pelo método clássico de DCT, baseado em medições de densidade óptica, podem ainda estar influenciados por partículas libertadas pelos próprios cimentos (16).

A maioria dos cimentos endodônticos apresenta uma atividade antibacteriana insuficiente e de curta duração, que diminui significativamente após presa (17-20), o que foi confirmado na presente investigação, particularmente para o PCS. A incorporação de nanopartículas de QPEI prolongou o efeito antimicrobiano do PCS, após endurecimento. Teoricamente, a possibilidade de prolongar os efeitos antibacterianos dos cimentos de obturação pode ser extremamente interessante na prevenção da reinfeção do sistema de canais radiculares e, na forte probabilidade, de afetar as bactérias residuais que consigam sobreviver aos procedimentos do tratamento endodôntico. O PCS é um cimento à base de óxido de zinco-eugenol, amplamente descrito em

relação à pronunciada atividade antibacteriana que apresenta, independentemente dos métodos utilizados para a avaliação antimicrobiana (20-23). A maioria dos seus efeitos antibacterianos é atribuída ao eugenol (24), embora o óxido de zinco e prata presentes na composição do pó, também apresentem propriedades antimicrobianas. Os resultados desta investigação confirmaram que o PCS é eficaz no estado fresco, mas perde eficácia após endurecimento. A incorporação de nanopartículas de QPEI em baixas concentrações (1 % e 2 % m/m) aumentou significativamente os efeitos antibacterianos em amostras endurecidas permitindo inferir que se traduzirá em efeitos antimicrobianos de longa duração do cimento.

O cimento endodôntico AH Plus também foi testado, uma vez que tem sido continuamente utilizado em estudos comparativos das propriedades físico-químicas, antimicrobianas e biológicas dos cimentos (25, 26). Inúmeros investigadores utilizaram o DCT e observaram que apenas as amostras frescas de AH Plus possuem atividade antibacteriana, enquanto que as amostras envelhecidas não apresentam efeitos significativos sobre *E. faecalis* (9, 20, 27). Os resultados do presente estudo estão em linha com as investigações anteriores. As amostras frescas evidenciaram eficácia antibacteriana (exceto para uma estirpe clínica endodôntica) e as amostras envelhecidas não apresentaram efeitos significativos. A incorporação de nanopartículas de QPEI no cimento AH Plus, independentemente da concentração utilizada, não melhorou os efeitos antibacterianos, tanto nas amostras frescas como nas envelhecidas. As razões pelas quais isto ocorre são desconhecidas, mas pode especular-se que as nanopartículas de QPEI poderão ficar orientadas com uma configuração em que os grupos hidrofílicos permaneçam na superfície do AH Plus, embora esta não fique tão fortemente carregada, possivelmente devido à complexa composição química do cimento, o que pode afetar a disponibilidade de carga. Esta explicação ganha credibilidade, quando se verifica o aumento na molhabilidade do cimento AH Plus (grupos hidrofílicos sobre a superfície do cimento) e a alteração quase nula do valor do potencial zeta.

Um estudo recente, também avaliou os efeitos da incorporação de baixas concentrações (0,5 %, 1 % e 2 % m/m) de nanopartículas de QPEI sobre a atividade antibacteriana dos cimentos AH Plus e GuttaFlow, após 4 semanas de endurecimento, contra uma estirpe clínica de *E. faecalis* (28). No entanto, os resultados obtidos no presente estudo em relação ao cimento AH Plus estão em desacordo com a investigação referida (28). O facto dos métodos de avaliação utilizados serem diferentes pode ser uma justificação válida. No estudo de Kesler-Shvero *et al.* (28), a viabilidade bacteriana foi estabelecida usando uma curva de calibração baseada em valores de densidade óptica (teste de contacto direto convencional). Uma complicação associada a este método é que as nanopartículas podem elas mesmo contribuir para uma maior densidade óptica da amostra (16). Outra possível razão para a diferença de resultados referida, pode estar relacionada com os

diferentes lotes de cimentos utilizados nos estudos, porque mesmo amostras de AH Plus obtidas a partir das mesmas embalagens podem apresentar diferentes propriedades físico-químicas (29), eventualmente com possíveis implicações na ação antimicrobiana.

O método tradicional de difusão em agar (ADT), utilizado para a avaliação da atividade antibacteriana dos cimentos endodônticos, não reflete adequadamente as condições clínicas. No entanto, este teste também foi realizado como ferramenta de comparação com os resultados disponíveis na literatura. Os resultados obtidos mediante este estudo confirmaram que ambos os cimentos endodônticos, PCS e AH Plus, apresentam atividade antibacteriana, o que está de acordo com os resultados de várias investigações (30–33). Os resultados sugerem que as nanopartículas QPEI adicionadas aos cimentos endodônticos não são libertadas da matriz do cimento impedindo a sua ação antibacteriana. Tal como se suspeitava, devido à insolubilidade das nanopartículas, estas partículas atuam por contato direto. Ainda assim, importa referir que também Kesler-Shvero *et al.* (28) realizaram o teste ADT para os cimentos na fórmula comercial e com 2 % de nanopartículas QPEI e reportaram a ausência de formação de qualquer halo de inibição do crescimento bacteriano, independentemente, dos materiais testados. No entanto, esta avaliação foi determinada após 4 semanas de endurecimento dos cimentos o que pode explicar os resultados reportados, uma vez que após presa os materiais perdem atividade antibacteriana.

114

Os ensaios de avaliação das propriedades físico-químicas e mecânicas dos cimentos AH Plus e PCS incorporados com 1 % e 2 % (m/m) de nanopartículas de QPEI também foram realizados. Os resultados obtidos indicaram que a incorporação de nanopartículas de QPEI nos cimentos de obturação não afetou significativamente a maioria das propriedades avaliadas, exceto o tempo de endurecimento (PCS), a molhabilidade (PCS e AH Plus) e a carga de superfície (PCS e AH Plus). As nanopartículas de QPEI utilizadas neste estudo têm um núcleo hidrofílico reticulado ligado a uma cadeia hidrofóbica que contém os grupos catiónicos de amónia quaternária. Como ambos os cimentos são constituídos por vários materiais orgânicos e inorgânicos, é difícil propor um mecanismo de interação cimento-QPEI. Os cimentos comerciais avaliados apresentaram um comportamento hidrofóbico. A incorporação de nanopartículas de QPEI tornou ambos os cimentos mais hidrofílicos sendo possível inferir que o núcleo das partículas fica mais perto da superfície e as cadeias hidrofóbicas em interação com os componentes hidrofóbicos dos cimentos. À partida os cimentos com uma superfície mais hidrofílica apresentam uma maior facilidade de penetração nas irregularidades do sistema de canais radiculares, o que pode, de alguma forma, ter implicações na eliminação das bactérias residuais nestas áreas. Além disso, após a incorporação de QPEI foram observadas alterações na carga de superfície sendo possível que, na interação cimento-QPEI, os grupos catiónicos localizem-se preferencialmente na superfície de ambos os

cimentos, mas com menos cargas positivas disponíveis para o cimento AH Plus, como discutido anteriormente.

De uma forma geral, tanto a eficácia antimicrobiana como a baixa toxicidade são propriedades requeridas num cimento endodôntico ideal. Com a incorporação de nanopartículas de QPEI é esperada uma atividade antimicrobiana superior, mantida a longo prazo e com poucos efeitos citotóxicos, uma vez que este material apenas atua localmente, por contacto (34). Recentemente, foram avaliados os efeitos citotóxicos de três cimentos comerciais (AH Plus, GuttaFlow e Epiphany), antes e depois da incorporação de 1 % QPEI, e os resultados obtidos não demonstraram influência significativa sobre a biocompatibilidade do cimento (35).

A avaliação da citotoxicidade destes cimentos deve ser tema sujeito a investigação antes de os cimentos endodônticos, com nanopartículas de QPEI, serem aprovados para uso clínico. Do mesmo modo a avaliação da atividade antibiofilme dos cimentos é fundamental pela importância e significado clínico que representa.

115

4.3. ESTUDO 4 ATIVIDADE ANTIBIOFILME DE CIMENTOS ENDODÔNTICOS COM INCORPORAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE QPEI

4.3.1. OBJETIVOS

- Avaliação da atividade antibiofilme dos cimentos de obturação AH Plus (Dentsply DeTrey, Konstanz, Alemanha) e Pulp Canal Sealer EWT (PCS) (Kerr Italia Srl, Salerno, Itália) incorporados com nanopartículas de QPEI a 2 % (m/m), por um método de contacto direto material-biofilme e restrição por membrana;
- Avaliação da atividade antibiofilme dos cimentos de obturação AH Plus (Dentsply DeTrey, Konstanz, Alemanha) e Pulp Canal Sealer EWT (PCS) (Kerr Italia Srl, Salerno, Itália) incorporados com nanopartículas de QPEI a 2 % (m/m), pelo método de cristal de violeta;

4.3.2. MATERIAIS E MÉTODOS

Amostras

Os cimentos endodônticos utilizados neste estudo foram o cimento AH Plus (AH) (Dentsply DeTrey, Konstanz, Alemanha) e o Pulp Canal Sealer EWT (PCS) (Kerr Italia Srl, Salerno, Itália). As nanopartículas de QPEI foram preparadas e incorporadas nos cimentos com a concentração de 2 % (m/m). Os cimentos foram preparados de acordo com as instruções do fabricante.

Atividade Antibiofilme

CONTATO DIRETO E RESTRIÇÃO POR MEMBRANA

As estirpes de *E. faecalis*, uma ATCC 29212 e outra clínica RW35, foram cultivadas *overnight* a 37°C, em meio de cultura TSB (Difco, Detroit, MI, EUA). O inóculo bacteriano foi padronizado para uma densidade óptica (DO) de 0,1 (600 nm). A formação dos biofilmes foi induzida em discos de papel (4 mm de diâmetro, Whatman GmbH, Dassel, Alemanha) e em membranas de nitrato de celulose (tamanho de poro de 0,22 µm, 13 mm de diâmetro, Whatman GmbH, Dassel, Alemanha). Os discos e as membranas foram colocados sobre a superfície das placas de agar de *Mitis Salivarius* (MS). Em seguida, alíquotas de 5 mL e 10 mL de suspensão bacteriana foram aplicadas à superfície de cada disco e membrana, respectivamente. As placas foram armazenadas durante 48 h a 37°C.

Para o teste de contacto direto material-biofilme, sobre os biofilmes formados em discos de papel e membranas, foram colocados cerca de 40 µL de cada um dos cimentos frescos. No ensaio da membrana de restrição, antes da colocação do cimento, foi colocada uma membrana de filtro estéril sobre os biofilmes formados nas membranas. Foram usados quatro discos ou membranas por cada cimento. O tempo de contacto em ambos os testes foi de 30 min, a 37°C. Após o período de contacto, no teste direto a maior parte do cimento foi retirado da superfície do disco de papel usado. No ensaio da membrana de restrição, a membrana de filtro com o cimento foi descartada. Como controlos positivos, foram utilizados discos e membranas com biofilme formado, sem qualquer contacto com o cimento; os controlos negativos, consistiram em discos e membranas estéreis, expostos aos cimentos. Os discos e as membranas foram transferidos para frascos contendo 2 mL de solução salina estéril tamponada com fosfato (PBS) e foram ligeiramente agitados para remover as células não aderidas. De seguida, foram transferidos para um outro frasco contendo 2 mL de PBS, que sofreu centrifugação durante 30 seg, seguido de ultra-sons durante 5 min. Após 10 diluições em série em solução salina estéril, a sobrevivência

das bactérias foi determinada por cultura de alíquotas de 10 µL de cada diluição em placas de agar MS. Após incubação, por um período de 24 h a 37°C, contaram-se as unidades formadoras de colônias (UFC).

ENSAIO CRISTAL VIOLETA

As amostras foram preparadas de acordo com a Norma ISO 10993-5 (36). Resumidamente, após a mistura do cimento (de acordo com as instruções dos fabricantes), 0,1 g de cada cimento foram colocados em poços de placas de 24-poços, aos quais foram adicionados 1 ml de solução salina. Logo de seguida, as placas foram incubadas durante 24 h e 48 h, numa câmara a 37°C, em ambiente com humidade relativa. Os extratos obtidos foram coletados. Um terceiro grupo experimental consistiu numa suspensão densa de cada cimento, preparadas da seguinte forma: os cimentos foram misturados de acordo com as indicações dos fabricantes (2,5 g cada) e deixados a endurecer por 48 horas a 37°C, numa câmara em ambiente com humidade relativa. Em seguida, as amostras de cimento foram moídas num moinho criogénico 6750 (Spex, Metuchen, New Jersey, EUA) que atua pela temperatura de azoto líquido; 2 g de pó de cada material foi misturado com 20 mL de solução salina.

117

A biomassa dos biofilmes foi visualizada e quantificada por um ensaio de cristal de violeta modificado. Utilizaram-se as mesmas estirpes bacterianas usadas no ensaio de avaliação do efeito antibiofilme, descrito previamente. As estirpes foram cultivadas *overnight* a 37°C, em meio de cultura TSB (Difco, Detroit, MI, EUA) suplementado com 1 % de glicose (Merck, Whitehouse Station, NJ, EUA). O inóculo bacteriano foi ajustado em PBS para uma turbidez de 0,5 na escala de McFarland (cerca de $1,5 \times 10^8$ UFC/mL). Após agitação por vórtice, alíquotas de 200 µL da suspensão bacteriana foram distribuídas em poços de placas de poliestireno de 96-poços (modelo 92096 TPP “Techno Plastic Products”, certificação ISO 9001, Trasadingen, Suíça) e incubadas durante 24 h a 37°C. O conteúdo de cada poço foi coletado e os poços foram lavados três vezes com 200 µL de PBS, para remoção das células pouco aderidas. Foram aplicados 200 µL por poço dos extratos e suspensões pesadas dos cimentos, durante 120 min a 37°C. Depois de remover as amostras dos cimentos, cada poço foi lavado três vezes com PBS e em seguida aplicou-se 200 µL de solução de cristal de violeta a 0,1 %, durante 20 min e à temperatura ambiente, para que as bactérias aderentes fossem marcadas. O excesso de corante foi removido por lavagem abundante com água destilada. As placas foram viradas e secas ao ar livre e o corante, ligado às células aderentes, foi solubilizado com 150 mL de etanol a 95 % durante 5 min. Para quantificar a biomassa de biofilme remanescente após o tratamento, a absorvância (590 nm) da solução de violeta de cristal foi medida, utilizando um leitor de ELISA (Modelo 680, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EUA). Para o controlo positivo, foi utilizado soro fisiológico em vez

da substância teste. Para o controlo negativo, utilizou-se meio de cultura estéril. Todos os ensaios foram realizados com quatro repetições, em duas ocasiões diferentes. O valor de *cut-off* para as medições de densidade óptica (DO) foi definido como três desvios padrão acima da média da DO do controlo negativo (37). Portanto, os valores finais de OD foram expressos como o valor médio da DO reduzido pelo valor de *cut-off*. Todos os procedimentos experimentais foram realizados em condições assépticas.

Análise Estatística

Os resultados obtidos foram analisados usando o programa estatístico SPSS, versão 20.0 (Chicago, IL, EUA). Os efeitos antibiofilme dos materiais testados em todos os ensaios, e contra as duas estirpes de *E. faecalis*, foram comparados por uma análise de variância ANOVA e teste *post hoc* de Tukey. As diferenças foram consideradas significativas a um nível de significância estatística de $p < 0,05$.

118

4.3.3. RESULTADOS

A avaliação da atividade antibiofilme, pelo ensaio de contacto direto material-biofilme e de restrição por membrana, fornece informações sobre os efeitos dos materiais testados sobre a viabilidade das células que formam o biofilme. A formação de biofilme nos discos de papel e nas membranas de nitrocelulose foi confirmada por microscopia eletrónica de varredura. Os resultados obtidos demonstraram que o PCS 2 % foi o único material capaz de promover a total erradicação dos biofilmes de *E. faecalis* ATCC, tanto no teste direto material-biofilme como no de restrição por membrana (Figura 5). Este material foi significativamente melhor do que todos os outros materiais testados e do que o controlo positivo ($p < 0,01$). Além disso, todos os materiais promoveram uma redução significativa das contagens bacterianas dos biofilmes de *E. faecalis* ATCC, em comparação com o controlo positivo, em ambos os testes ($p < 0,05$). No ensaio de membrana de restrição, o cimento AH Plus 0 % apresentou resultados significativamente melhores do que o cimento AH Plus 2 %. No teste de contacto direto, contra *E. faecalis* RW35, o cimento PCS 2 % foi significativamente mais eficaz do que os outros materiais e o único que promoveu contagens bacterianas significativamente mais baixas do que o controlo positivo ($p < 0,05$). No ensaio de restrição por membrana contra a estirpe RW35, nenhum material mostrou efeitos letais significativos (Figura 5: B).

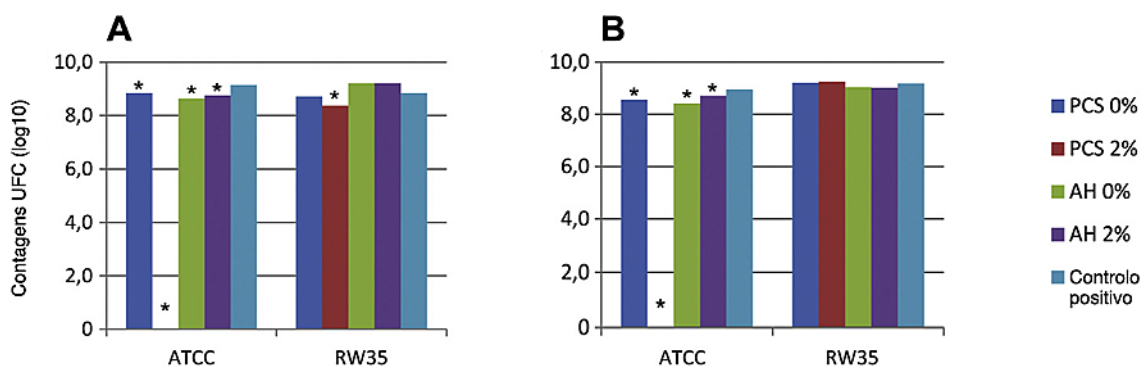


FIGURA 5 - Efeitos de cimentos endodônticos sobre os biofilmes de duas estirpes de *Enterococcus faecalis* (ATCC e RW35). Ensaio antibiofilme: contacto-direto (A) e membrana de restrição (B).

A avaliação da atividade antibiofilme, pelo método de ensaio cristal de violeta, fornece informações sobre os efeitos dos materiais sobre a biomassa do biofilme. Nesta experiência, o cimento AH Plus, com ou sem nanopartículas QPEI, demonstrou em geral os melhores valores de DO. No entanto, a análise estatística revelou que apenas o material AH 2 % obteve leituras DO significativamente menores do que o grupo controlo positivo da estirpe ATCC ($p < 0,05$) (Figura 6). Não foram observados outros efeitos significativos sobre a biomassa do biofilme, das duas estirpes de *E. faecalis*, por qualquer dos cimentos testados ($p > 0,05$).

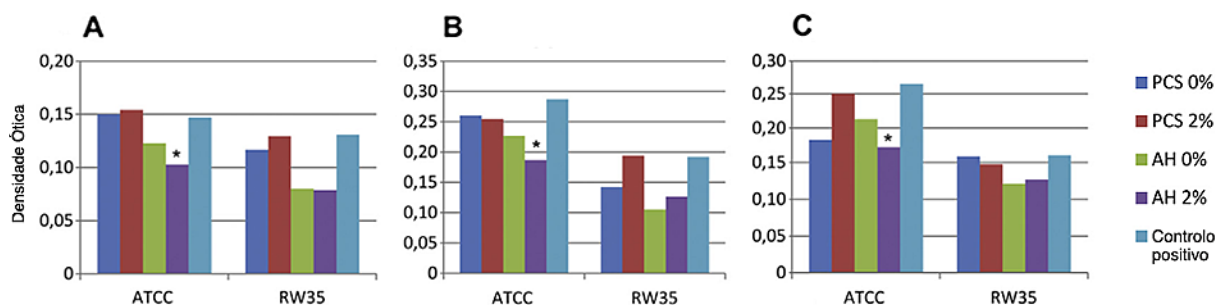


FIGURA 6 - Efeitos dos cimentos endodônticos sobre os biofilmes de duas estirpes de *Enterococcus faecalis* (ATCC e RW35). Ensaio antibiofilme cristal de violeta. A, extratos de cimentos 24 h; B, extratos de cimentos 48 h; C, suspensão dos cimentos 48 h.

4.3.4. DISCUSSÃO

Idealmente, os cimentos endodônticos devem apresentar atividade antibiofilme, o que pode incluir a capacidade de matar células bacterianas e/ou perturbar a biomassa do biofilme. Os resultados obtidos no ensaio antibiofilme, em ambos os testes de contacto direto material-biofilme e de restrição por membrana, demonstraram que o cimento PCS com nanopartículas de QPEI (PCS 2 %) foi o único material capaz de promover a morte de todas as bactérias dos biofilmes, formados pela estirpe de *E. faecalis* ATCC. Este cimento também foi significativamente mais eficaz do que os outros materiais, no ensaio antibiofilme de contacto direto, contra a estirpe *E. faecalis* RW35. Estes resultados estão de acordo com os resultados obtidos no estudo anterior (Estudo 3, Capítulo 4), utilizando o DCT para avaliação da atividade antimicrobiana sobre células planctônicas das mesmas estirpes. Quanto aos efeitos sobre a biomassa do biofilme, apenas o cimento AH Plus com nanopartículas de QPEI (AH Plus 2 %), demonstrou valores de DO significativamente reduzidos quando comparado com os outros grupos, resultado observado para a estirpe *E. faecalis* ATCC.

120

Mais uma vez, o microrganismo *E. faecalis* foi utilizado no presente estudo, pois é uma das espécies predominantes nos canais radiculares dos dentes com periodontite apical pós-tratamento endodôntico, apresentando-se resistente às substâncias antimicrobianas (soluções irrigantes e medicação intracanal) mais utilizadas no tratamento endodôntico (6, 38, 39). As duas estirpes utilizadas foram as mesmas dos estudos descritos anteriormente (ATCC e RW35). No ensaio antibiofilme foram observadas variações no comportamento entre as estirpes ATCC e clínica, que merecem atenção e reforçam a conveniência de uma seleção adequada do tipo de estirpe, a ser utilizada de acordo com o objetivo do estudo. A estirpe clínica de origem endodôntica (RW35) foi menos afetada pelos cimentos testados do que a estirpe ATCC. Entre as estirpes clínicas a variação da suscetibilidade é corroborada por outros autores (9, 40), podendo a diferente capacidade de formação de biofilmes de cada estirpe justificar os resultados obtidos.

Os efeitos antibiofilme de substâncias e materiais podem ser determinados por variados métodos de investigação (41), mas a maioria deles é extremamente difícil de adaptar para a avaliação dos cimentos de obturação endodôntica. Consequentemente, o número de estudos que avaliam os efeitos antibiofilme dos cimentos (12, 20, 42) é bastante limitado. Um destes estudos, avaliou a atividade de sete cimentos diferentes contra biofilmes de *E. faecalis*, formados em dentina de origem bovina (42), enquanto os outros dois estudos, utilizaram ensaios antibiofilme de contacto direto e restrição por membrana (12, 20). Enquanto que o primeiro estudo (42) tem a vantagem de se aproximar das condições clínicas, pela utilização de dentina para a formação de biofilme, nos

outros ensaios antibiofilme é mais fácil padronizar, controlar e recuperar as células remanescentes dos biofilmes experimentais. No presente estudo, a atividade antibiofilme foi avaliada contra biofilmes monoespécies de *E. faecalis* isolados após 48 h de incubação. Os diferentes níveis de maturação dos biofilmes podem influenciar a suscetibilidade aos agentes antimicrobianos (43,44), portanto devem ser realizadas mais investigações sobre a atividade antibiofilme dos cimentos endodônticos contra biofilmes mais maduros.

No Estudo 3, verificou-se que a incorporação de nanopartículas QPEI no cimento PCS foi significativamente eficaz em matar as células planctônicas, de três estirpes de *E. faecalis*, 7 dias após endurecimento (amostras envelhecidas), sem afetar as várias propriedades físico-químicas e mecânicas do cimento. A adição de nanopartículas de QPEI ao cimento induziu alterações no potencial zeta e na molhabilidade, as quais parecem poder justificar o melhor desempenho antibacteriano dos materiais. A obtenção destes resultados motivou a realização do presente estudo de análise dos efeitos antibiofilme dos mesmos materiais.

121

Uma possível razão para a potenciação dos efeitos antibacterianos e antibiofilme, após a incorporação de nanopartículas de QPEI, está relacionada com o facto de os grupos catiónicos de amónia quaternária ficarem localizados, preferencialmente, na superfície do cimento PCS. Como já foi referido anteriormente, as nanopartículas de QPEI, utilizadas neste estudo, têm um núcleo hidrófilico reticulado ligado a uma cadeia hidrofóbica que contém os grupos catiónicos de amónia quaternária. Também, já se verificou, que a adição de nanopartículas de QPEI torna o cimento PCS mais hidrofílico. Um cimento endodôntico com superfície hidrofílica parece ter um melhor contacto com o biofilme e melhor capacidade de penetração nas estruturas deste complexo ecossistema bacteriano, o que pode favorecer a eliminação das bactérias e destruição da matriz extracelular do biofilme.

No presente estudo, o cimento AH Plus, com ou sem nanopartículas de QPEI, foi eficaz apenas contra biofilmes da estirpe ATCC. Curiosamente, no ensaio de restrição por membrana, a adição de QPEI reduziu a eficácia antibacteriana do cimento embora sem relevância estatística. Por conseguinte, a incorporação de nanopartículas de QPEI no cimento AH Plus, não promoveu melhoria na capacidade de causar morte celular, contra as duas estirpes de *E. faecalis* ATCC e RW35. Uma explicação possível para este resultado pode residir numa menor disponibilidade de carga catiónica à superfície do cimento, por exemplo, por alguma interferência com componentes do cimento.

A outra abordagem experimental utilizada foi o ensaio de cristal de violeta, em biofilmes formados em placas de microdiluição. Este ensaio experimental tem sido amplamente utilizado para

investigar os efeitos de substâncias sobre a biomassa dos biofilmes (45-47). No presente estudo, o método foi adaptado para permitir a avaliação de cimentos de obturação, recorrendo à obtenção de extratos dos cimentos de acordo com a Norma ISO 10993-5 de avaliação de citotoxicidade dos materiais e, também, pela preparação de uma suspensão densa de cada material. Se por um lado a obtenção dos extratos simula o comportamento dos cimentos frescos, as suspensões densas preparadas simulam a ação de um cimento endurecido. Apesar da elevada reprodutibilidade e a rápida quantificação da diminuição do biofilme, este método semi-quantitativo marca tanto células viáveis como células mortas, bem como a matriz do biofilme. Portanto, não deve ser utilizado especificamente para avaliar a viabilidade bacteriana (41,48). Mediante a utilização deste ensaio colorimétrico, valores elevados de DO não significam menor capacidade bactericida sobre as células do biofilme mas permite aferir os efeitos na massa do biofilme. Assim, pelo exposto pode-se justificar a ausência de efeitos significativos do PCS 2 % no ensaio cristal violeta, material que teve o melhor desempenho antibiofilme no ensaio de contacto direto material-biofilme. Os resultados do ensaio cristal violeta do AH Plus 2 % sobre o biofilme ATCC sugerem, que os componentes do cimento podem provocar alguma degradação da matriz do biofilme produzida por esta estirpe, apesar de o mesmo material não ter apresentado um efeito antibiofilme relevante no ensaio direto.

122

Desempenhando o biofilme bacteriano um papel fundamental na etiologia das infeções endodônticas, o desenvolvimento de cimentos de obturação com atividade antibiofilme pode potenciar os níveis de sucesso do tratamento endodôntico. A utilização destes cimentos na obturação dos canais radiculares deverá ser alvo de maior investigação no sentido de melhorar esta capacidade, sem menosprezar a biocompatibilidade e comportamento físico-químico e mecânico dos novos materiais.

4.4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Beyth N, Domb AJ, Farber I, Davidi MP, Weiss EI (2007) Antimicrobial nanoparticulate additives forming non-leachable sustained antimicrobial polymeric compositions. In: Ltd. HMRSAD, Jerusalem YRDCOTHUO, eds. A01N25/12 edn.
2. Yudovin-Farber I, Beyth N, Nyska A, Weiss EI, Golenser J, Domb AJ. Surface characterization and biocompatibility of restorative resin containing nanoparticles. *Biomacromolecules* 2008;9:3044-50.
3. Yudovin-Farber I, Golenser J, Beyth N, Weiss EI, Domb AJ. Quaternary Ammonium Polyethyleneimine: Antibacterial Activity. *Journal of Nanomaterials* 2010, Article ID 826343 (doi:10.1155/2010/826343).
4. Lin J, Qiu S, Lewis K, Klibanov AM. Mechanism of bactericidal and fungicidal activities of textiles covalently modified with alkylated polyethylenimine. *Biotechnol Bioeng* 2003;83:168-72.
5. Beyth N, Yudovin-Farber I, Bahir R, Domb AJ, Weiss EI. Antibacterial activity of dental composites containing quaternary ammonium polyethylenimine nanoparticles against *Streptococcus mutans*. *Biomaterials* 2006;27:3995-4002.
6. Sundqvist G, Figdor D, Persson S, Sjogren U. Microbiologic analysis of teeth with failed endodontic treatment and the outcome of conservative re-treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1998;85:86-93.
7. Siqueira JF, Jr, Rôças IN. Polymerase chain reaction-based analysis of microorganisms associated with failed endodontic treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2004;97:85-94.
8. Stuart CH, Schwartz SA, Beeson TJ, Owatz CB. *Enterococcus faecalis*: Its role in root canal treatment failure and current concepts in retreatment. *J Endod* 2006;32:93-98.
9. Zoletti GO, Pereira EM, Schuenck RP, Teixeira LM, Siqueira JF, Jr., dos Santos KR. Characterization of virulence factors and clonal diversity of *Enterococcus faecalis* isolates from treated dental root canals. *Res Microbiol* 2011;162,151-58.
10. Zhang H, Shen Y, Ruse ND, Haapasalo M. Antibacterial activity of endodontic sealers by modified direct contact test against *Enterococcus faecalis*. *J Endod* 2009;35,1051-55.
11. International Organization for Standardization. Dental root canal sealing materials. Geneva, Switzerland 2001:ISO 6876.
12. Kishen A, Shi Z, Shrestha A, Neoh KG. An investigation on the antibacterial and antibiofilm efficacy of cationic nanoparticulates for root canal disinfection. *J Endod* 2008;34,1515-20.

13. Shvero DK, Davidi MP, Weiss EI, Sreer N, Beyth N. Antibacterial effect of polyethyleneimine nanoparticles incorporated in provisional cements against *Streptococcus mutans*. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2010;94:367-71.
14. Beyth N, Yudovin-Farber I, Perez-Davidi M, Domb AJ, Weiss EI. Polyethyleneimine nanoparticles incorporated into resin composite cause cell death and trigger biofilm stress in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2010;107:22038-43.
15. Beyth N, Yudovin-Farber I, Domb AJ, Weiss EI. Long-term antibacterial surface properties of composite resin incorporating polyethyleneimine nanoparticles. *Quintessence Int* 2010;41:827-35.
16. Seil JT, Webster TJ. Antimicrobial applications of nanotechnology: methods and literature. *Int J Nanomedicine* 2012;7:2767-81.
17. Ørstavik D. Antibacterial properties of root canal sealers, cements and pastes. *Int Endod J* 1981;14:125-33.
18. Spangberg LS, Barbosa SV, Lavigne GD. AH 26 releases formaldehyde. *J Endod* 1993;19:596-98.
19. Siqueira JF, Jr, Gonçalves RB. Antibacterial activities of root canal sealers against selected anaerobic bacteria. *J Endod* 1996;22:89-90.
20. Kayaoglu G, Erten H, Alacam T, Ørstavik D. Short-term antibacterial activity of root canal sealers towards *Enterococcus faecalis*. *Int Endod J* 2005;38:483-88.
21. Çobankara 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.
22. Gomes BP, Pedroso JA, Jacinto RC, Vianna ME, Ferraz CC, *et al.* In vitro evaluation of the antimicrobial activity of five root canal sealers. *Brazilian Dental Journal* 2004;15:30-35.
23. Saleh IM, Ruyter IE, Haapasalo M, Ørstavik D. Survival of *Enterococcus faecalis* in infected dentinal tubules after root canal filling with different root canal sealers in vitro. *Int Endod J* 2004;37:193-98.
24. Hauman CH, Love RM. Biocompatibility of dental materials used in contemporary endodontic therapy: a review. Part 2. Root-canal-filling materials. *Int Endod J* 2003;36:147-60.
25. Versiani MA, Carvalho-Junior JR, Padilha MI, Lacey S, Pascon EA, Sousa-Neto MD. A comparative study of physicochemical properties of AH Plus and Epiphany root canal sealants. *Int Endod J* 2006;39:464-71.

26. Baer J, Maki JS. In vitro evaluation of the antimicrobial effect of three endodontic sealers mixed with amoxicillin. *J Endod* 2010;36:1170-73.
27. Pizzo G, Giammanco GM, Cumbo E, Nicolosi G, Gallina G. In vitro antibacterial activity of endodontic sealers. *J Dent* 2006;34:35-40.
28. Kesler-Shvero D, Abramovitz I, Zaltsman N, Perez Davidi M, Weiss EI, Beyth N. Towards antibacterial endodontic sealers using quaternary ammonium nanoparticles. *Int Endod J* 2013;46:747-54.
29. Baldi JV, Bernardes RA, Duarte MA, Ordinola-Zapata R, Cavenago DC, *et al.* Variability of physicochemical properties of an epoxy resin sealer taken from different parts of the same tube. *Int Endod J* 2012;45:915-20.
30. Siqueira JF, Jr., Favieri A, Gahyva SM, Moraes SR, Lima KC, *et al.* Antimicrobial activity and flow rate of newer and established root canal sealers. *J Endod* 2000;26(5):274-7.
31. Lai CC, Huang FM, Yang HW, Chan Y, Huang MS, *et al.* Antimicrobial activity of four root canal sealers against endodontic pathogens. *Clin Oral Investig* 2001;5(4):236-9.
32. Miyagak DC, de Carvalho EM, Robazza CR, Chavasco JK, Levorato GL. In vitro evaluation of the antimicrobial activity of endodontic sealers. *Braz Oral Res* 2006;20(4):303-6.
33. 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(4):307-13.
34. Yudovin-Farber I, Beyth N, Nyska A, Weiss EI, Golenser J, Domb AJ. Surface characterization and biocompatibility of restorative resin containing nanoparticles. *Biomacromolecules* 2008;9:3044-50.
35. Abramovitz I, Beyth N, Weinberg G, Borenstein A, Polak D, *et al.* *In Vitro* Biocompatibility of Endodontic Sealers Incorporating Antibacterial Nanoparticles. *J Nanomat*, Volume 2012, Article ID 858073.
36. International Organization for Standardization. *Biological Evaluation of Medical Devices – Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity*. Geneva, Switzerland 2009: ISO 10993-95.
37. Stepanovic S, Vukovic D, Hola V, Di Bonaventura G, Djukic S, Cirkovic I, Ruzicka F. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. *APMIS* 2007; 115: 891-9.
38. Sedgley C, Nagel A, Dahlen G, Reit C, Molander A. Real-time quantitative polymerase chain reaction and culture analyses of *Enterococcus faecalis* in root canals. *J Endod* 2006;32:173-77.

39. Rôças IN, Siqueira JF, Jr. Characterization of microbiota of root canal-treated teeth with posttreatment disease. *J Clin Microbiol* 2012;50:1721-24.
40. Duggan JM, Sedgley CM. Biofilm formation of oral and endodontic *Enterococcus faecalis*. *J Endod* 2007;33:815-18.
41. Kishen A, Haapasalo M. Biofilm models and methods of biofilm assessment. *Endod Topics* 2010;22:58-78.
42. Faria-Junior NB, Tanomaru-Filho M, Berbert FL, Guerreiro-Tanomaru JM. Antibiofilm activity, pH and solubility of endodontic sealers. *Int Endod J* 2013;46:755-62.
43. Shen Y, Stojicic S, Haapasalo M. Antimicrobial efficacy of chlorhexidine against bacteria in biofilms at different stages of development. *J Endod* 2011; 37: 657-61.
44. Stojicic S, Shen Y, Haapasalo M. Effect of the source of biofilm bacteria, level of biofilm maturation, and type of disinfecting agent on the susceptibility of biofilm bacteria to antibacterial agents. *J Endod* 2013; 39: 473-7.
45. Alves FR, Neves MA, Silva MG, Rôças IN, Siqueira JF, Jr. Antibiofilm and antibacterial activities of farnesol and xylitol as potential endodontic irrigants. *Braz Dent J* 2013;24:224-29.
46. Izano EA, Wang H, Rangunath C, Ramasubbu N, Kaplan JB. Detachment and killing of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* biofilms by dispersin B and SDS. *J Dent Res* 2007;86:618-22.
47. Dusane DH, Rajput JK, Kumar AR, Nancharaiah YV, Venugopalan VP, Zinjarde SS. Disruption of fungal and bacterial biofilms by lauroyl glucose. *Lett Appl Microbiol* 2008;47:374-79.
48. Alves FR, Silva MG, Rôças IN, Siqueira JF, Jr. Biofilm biomass disruption by natural substances with potential for endodontic use. *Braz Oral Res* 2013;27:20-25.

C A P Í T U L O 5

**CIMENTOS ENDODÔNTICOS E
NANOPARTÍCULAS DE QPEI:
BIOCOMPATIBILIDADE**

NOTA PRÉVIA

Este capítulo descreve a parte experimental, os resultados e a discussão do Estudo 5, intitulado “**Avaliação da Biocompatibilidade de Cimentos Endodônticos com Incorporação de Nanopartículas de QPEI**”.

Este estudo foi realizado em colaboração com o Laboratório do Metabolismo e Regeneração Óssea da Faculdade de Medicina Dentária da Universidade do Porto (FMDUP) e o Departamento de Metalurgia e Materiais da Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto (FEUP), Porto (Portugal).

5.1. ESTUDO 5 AVALIAÇÃO DA BIOCOMPATIBILIDADE DE CIMENTOS ENDODÔNTICOS COM INCORPORAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE QPEI

5.1.1. OBJETIVOS

- Avaliação da citotoxicidade de dois cimentos endodônticos (AH Plus e Pulp Canal Sealer EWT) incorporados com 2 % m/m de nanopartículas de QPEI, usando células osteoblásticas e células osteoclásticas da medula óssea humana e extratos dos cimentos, obtidos de acordo com a Norma ISO 10993-5;

5.1.2. MATERIAIS E MÉTODOS

Amostras

Foram testados dois cimentos endodônticos: AH Plus (Dentsply DeTrey, Konstanz, Alemanha) e Pulp Canal Sealer EWT (PCS) (Kerr Italia Srl, Salerno, Itália). As nanopartículas de QPEI previamente sintetizadas, foram incorporadas nos cimentos de obturação na concentração de 2 % m/m, utilizando a metodologia descrita para os estudos anteriores.

Os cimentos foram preparados segundo as instruções do fabricante sob condições assépticas. Os extratos dos cimentos, não modificados e contendo nanopartículas de QPEI, foram preparados de acordo com a Norma ISO 10993-5 (1). Para cada cimento, colocou-se no fundo dos poços de uma placa de poliestireno de 24-poços (2 cm²) (Orange Scientific, Braine-l'Alleud, Bélgica) 0,3 mL de cimento (~0,78g AH Plus; ~0,62g PCS) e alisou-se a superfície do material. Imediatamente depois, adicionou-se 1,5 mL de meio de cultura a cada poço. O meio de cultura consistiu em *alfa-Minimal Essencial Medium* (Ö-MEM - Gibco, Reino Unido), 10 % de soro bovino fetal (FBS), 100 UI/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina e 2,5 µg/mL de anfotericina B. As placas foram mantidas durante 24 h, a 37°C num ambiente húmido (5 % CO₂/ar). De seguida, o meio de cultura foi recolhido e filtrado (tamanho de poro de 0,2 µm), diluído (1:20, 1:100, 1:500, 1:2500 e 1:5000), aliquoteado e congelado a -20°C. O pH do meio de cultura permaneceu constante nesta gama de concentrações (pH ~ 7,4). Todos os procedimentos experimentais foram realizados sobre condições assépticas.

Culturas de células osteoblásticas e osteoclásticas. Exposição aos extratos dos cimentos

As culturas de células osteoblásticas foram estabelecidas a partir de células mesenquimais humanas, derivadas da medula óssea (HMSC - bm, Innoprot, Derio, Espanha). As células foram cultivadas nas condições descritas acima. O efeito dos extratos foi avaliado em células da 3ª subcultura (10^4 células/cm²). As células foram cultivadas em condições que favorecem a diferenciação osteoblástica, isto é, em meio de cultura suplementado com 50 mg/mL de ácido ascórbico e 10 nM de dexametasona (2).

Utilizando uma metodologia descrita anteriormente (3) e após obtenção de consentimento informado de doadores de sangue (saudáveis, gênero masculino, 25-35 anos de idade), as culturas de células osteoclásticas foram estabelecidas a partir da cultura de células mononucleares do sangue periférico (PBMCs). As células PBMCs foram semeadas ($1,5 \times 10^6$ células/cm²) e cultivadas em Ö-MEM, 30 % de soro autólogo, 2 mM de L-glutamina, 100 UI/mL de penicilina, 100 mg/mL de estreptomicina e 2,5 mg/mL de anfotericina B, e suplementado com M-CSF (25 ng/mL, R&D Systems, Minneapolis, EUA) e RANKL (40 ng/mL, Insight Biotechnology, Wembley, Reino Unido) como indutores osteoclastogênicos (3).

Nos ensaios de exposição aos extratos dos cimentos, as células osteoblásticas e osteoclásticas foram cultivadas durante 24 h nas condições descritas. Posteriormente, as culturas foram cultivadas durante 21 dias na presença dos extratos dos cimentos (diluições de 1:20 a 1:5000). As culturas foram mantidas a 37°C num ambiente húmido de 5 % de CO₂. O meio de cultura foi substituído uma vez por semana e os extratos foram renovados, em cada mudança de meio. As concentrações testadas foram selecionadas a partir de experiências preliminares que demonstraram que as concentrações mais elevadas dos extratos dos cimentos causam morte celular rápida.

Como controlo positivo foram utilizadas culturas celulares de osteoblastos e osteoclastos com ausência de extratos, ou seja, em condições estabelecidas que permitem a diferenciação adequada do respetivo fenótipo. O controlo positivo é considerado como representativo de modelos de proliferação e diferenciação dos tipos celulares em estudo (2, 3).

As culturas celulares foram caracterizadas utilizando a metodologia que a seguir se descreve.

Conteúdo de ADN

O conteúdo de ADN foi analisado nos dias 7, 14 e 21 utilizando o ensaio de quantificação de DNA *PicoGreen* (Quant-iT PicoGreen dsDNA Assay Kit, Molecular Probes Inc., Eugene, EUA),

de acordo com as instruções do fabricante. As culturas foram tratadas com Triton X-100 (0,1 %) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) e a fluorescência foi medida num leitor de ELISA (Synergy HT, Biotek) com comprimentos de onda de 480/520 nm (excitação/emissão).

Atividades ALP e TRAP

A atividade enzimática da fosfatase alcalina (ALP) (culturas de células osteoblásticas) e da fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP) (culturas de células osteoclásticas) foram avaliadas em suspensões celulares (obtidas por tratamento com 0,1 % de Triton X-100, 5 min) aos dias 7, 14 e 21, através da hidrólise do para-nitrofenilfosfato (*p*NPP), a um pH de 10,3 e 4,8, respetivamente. O produto da reação (*p*-nitrofenol) foi avaliado a 400 nm num leitor de ELISA (Synergy HT, Biotek). As atividades enzimáticas foram normalizadas pelo conteúdo em ADN e expressas em $\text{nmol} / \text{min pg}_{\text{ADN}}^{-1}$.

Quantificação da Apoptose

A apoptose foi analisada pela quantificação da atividade da caspase-3, com o ensaio *EnzCheck Caspase-3 Assay Kit #2* (Molecular Probes Inc., Eugene, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. A fluorescência foi medida a 496/520 nm (excitação/emissão) num leitor de placas de ELISA (Synergy HT, Biotek). Os resultados são apresentados como a % de variação em comparação com o controlo.

Vias de Sinalização

As culturas controlo e as culturas expostas aos extratos na diluição 1:500, foram avaliadas relativamente a várias vias de sinalização envolvidas na osteoblastogénese (4) e osteoclastogénese (5, 6). A concentração de extrato selecionada foi a menor que causou efeitos estatisticamente significativos na atividade da ALP (culturas de osteoblastos) e na atividade da TRAP (culturas de osteoclastos). Os extratos, na diluição de 1:500, causaram sempre um efeito inibitório, exceto o PCS-QPEI que causou um aumento da atividade de ALP.

As culturas foram tratadas com inibidores das vias de sinalização durante o tempo de cultura. No dia 21, as culturas de células osteoblásticas e osteoclásticas foram avaliadas para a atividade da ALP e da TRAP, respetivamente. As vias de sinalização testadas foram as seguintes: NFkB (inibidor PDTC, 10 mM), p38 (inibidor SB202190, 5 mM), JNK (inibidor SP600125, 10 mM) e MEK (inibidor U0126, 1 mM). Os resultados são apresentados como a % de variação em relação ao controlo (ausência de inibidor).

Análise Estatística

Os resultados foram obtidos a partir de três experiências independentes, cada uma realizada em triplicado. Os dados são expressos como a média \pm desvio padrão e foram analisados pelo teste ANOVA em combinação com o teste *post-hoc* de Bonferroni. Valores de $p \leq 0,05$ foram considerados significativos.

5.1.3. RESULTADOS

RESPOSTA DAS CÉLULAS ÓSSEAS PARA O CIMENTO AH PLUS E AH PLUS-QPEI

Resposta celular osteoblástica

O cimento AH Plus causou um aumento do conteúdo de ADN na diluição do extrato de 1:2500 (~ 25 %, no dia 21) e causou inibição dose-dependente em diluições $< 1:500$. Comparativamente, com o cimento AH Plus-QPEI na mesma concentração (1:2500), o conteúdo de ADN foi significativamente superior (aumento de ~ 80 %, no dia 21) e também se observou a indução da proliferação celular na diluição de 1:500 (~ 50 %, no dia 21). Além disso, os extratos mais concentrados causaram toxicidade inferior. Em relação à atividade da ALP, os dois cimentos causaram reduções dose-dependentes semelhantes, em diluições $\leq 1:500$.

Os resultados da percentagem de apoptose foram de encontro aos observados para o conteúdo de ADN. Os cimentos provocaram diminuição da apoptose nas diluições de 1:2500 e 1:500 (com valores ligeiramente mais baixos para o cimento com nanopartículas de QPEI). Nas concentrações mais elevadas dos extratos, a citotoxicidade foi menor para o cimento AH Plus-QPEI. Na diluição de 1:20, o cimento AH Plus-QPEI provocou uma elevada percentagem de apoptose, mas o cimento AH Plus não modificado causou morte celular total. A Figura 1 mostra estes resultados.

Resposta celular osteoclástica

Os extratos dos cimentos AH Plus e AH Plus-QPEI causaram um aumento no conteúdo de ADN nas diluições de 1:5000 a 1:500 e diminuições dose-dependentes, nas concentrações mais elevadas. Em relação à atividade da TRAP, foram observados efeitos inibitórios dose-dependentes para ambos os cimentos, em diluições $\leq 1:500$.

Em comparação com o controlo, a % de apoptose foi menor nas diluições 1:2500 e 1:500 de ambos os cimentos (formulação comercial e contendo nanopartículas QPEI) e mais elevada,

com os extratos de cimentos mais concentrados. Na diluição de 1:20, o cimento AH Plus-QPEI causou ~ 50 % de aumento na apoptose, enquanto o AH Plus não modificado causou a morte celular total. Os extratos de cimentos mais concentrados aumentam a apoptose mas os extratos AH Plus-QPEI demonstraram uma menor toxicidade. Os resultados são apresentados na Figura 1.

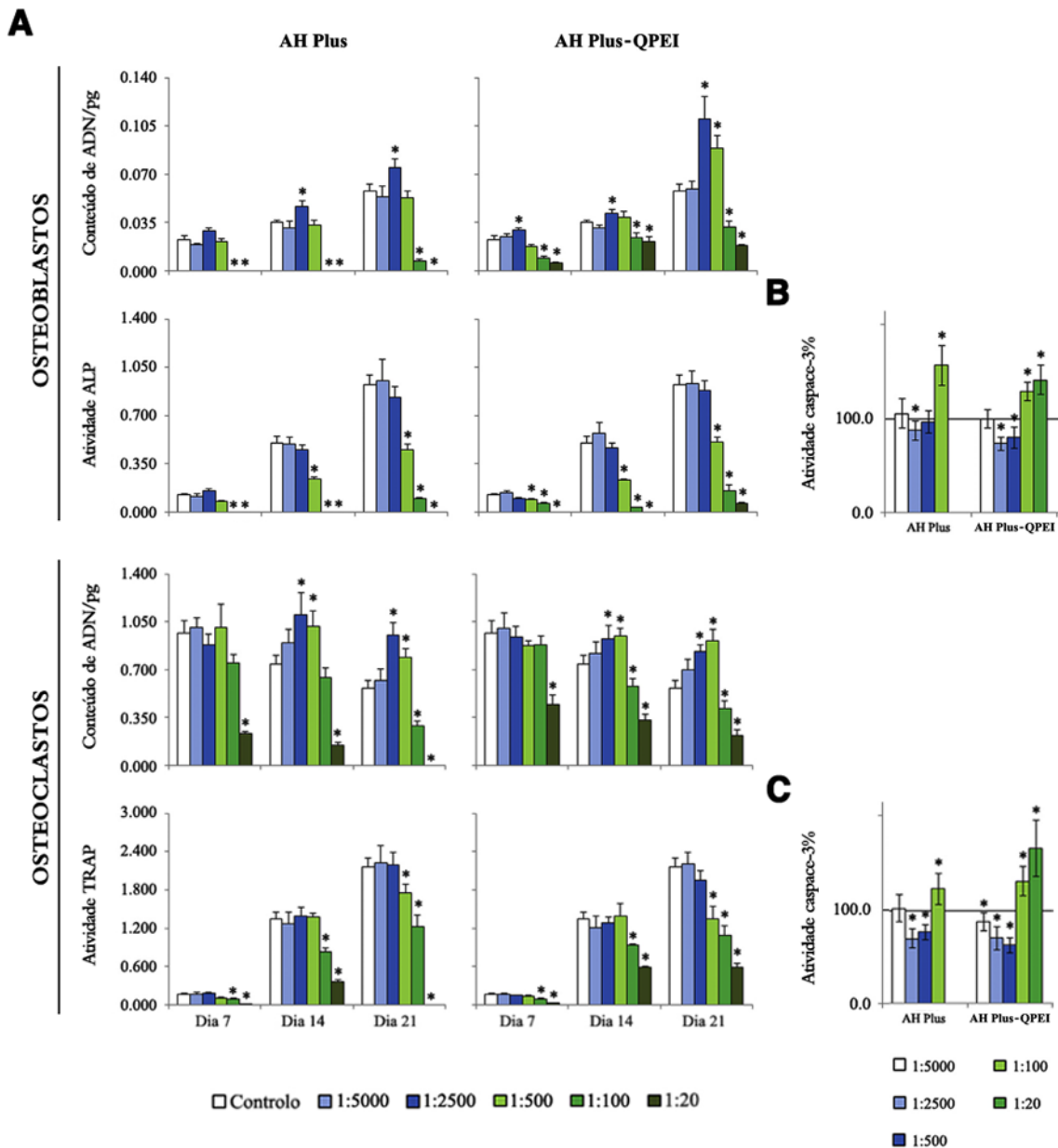


FIGURA 1 - Resposta das células osteoblásticas e osteoclásticas aos extratos (diluições de 1:5000 a 1:20) de AH Plus e AH Plus-QPEI. **A**: ADN e atividade de ALP em culturas de células osteoblásticas e ADN e atividade TRAP em culturas de células osteoclásticas. **B** e **C**: apoptose, expressa como % da atividade da caspase-3 comparada com o controlo, no dia 21, em culturas de células osteoblásticas (**B**) e osteoclásticas (**C**). * Significativamente diferente do controlo (ausência do extrato).

RESPOSTA DAS CÉLULAS ÓSSEAS PARA O CIMENTO PCS E PCS-QPEI

Resposta celular osteoblástica

Concentrações baixas do extrato do cimento PCS não afetaram a proliferação celular (até 1:500) nem a atividade de ALP, nas concentrações até 1:2500. PCS-QPEI aumentou significativamente a atividade da ALP nas diluições 1:2500 e 1:500 (~ 30 %, em relação ao controlo). Para ambos os cimentos, os extratos mais concentrados do que os indicados acima, causaram inibição dose-dependente do crescimento celular e da atividade enzimática.

Em relação à apoptose, foram observados efeitos dose-dependentes semelhantes com os dois cimentos. Os resultados são apresentados na Figura 2.

Resposta celular osteoclástica

136

Ambos os cimentos de obturação causaram um pequeno estímulo no conteúdo de ADN nas diluições 1:2500 e 1:500 (que foi mais pronunciado para PCS-QPEI). Nas concentrações mais elevadas (\leq 1:500) ocorreu uma diminuição do conteúdo de ADN e da atividade da TRAP.

Na presença de extratos de maiores concentrações observou-se também um aumento na % de apoptose. No entanto, com o cimento PCS-QPEI, verificou-se uma ligeira diminuição na taxa de apoptose, nas diluições de 1:2500 e 1:500. Os resultados são resumidos na Figura 2.

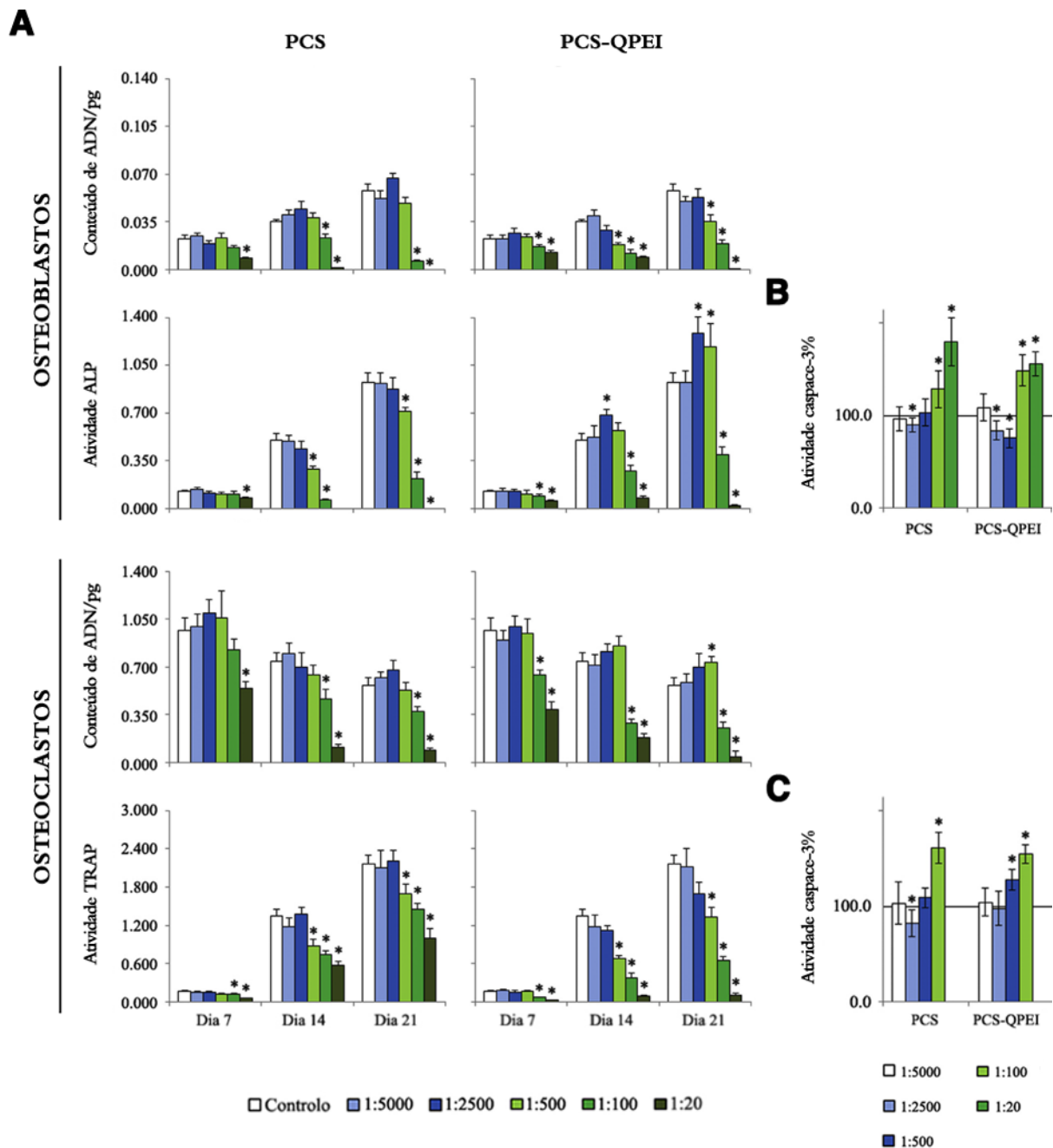


FIGURA 2 - Resposta das células osteoblásticas e osteoclásticas aos extratos (diluições 1:5000 a 1:20) dos cimentos PCS e PCS-QPEI. **A**: ADN e atividade de ALP, em culturas de células osteoblásticas e ADN e atividade da TRAP, em culturas de células osteoclásticas. **B** e **C**: apoptose expressa como % da atividade da caspase-3 comparada com o controlo no dia 21, em culturas de células osteoblásticas (**B**) e osteoclásticas (**C**). * Significativamente diferente do controlo (ausência do extrato).

Vias de Sinalização Intracelular

As culturas celulares foram testadas para algumas vias de sinalização intracelulares. Nas culturas celulares expostas aos extratos dos cimentos, a concentração selecionada (diluição 1:500) foi a mais baixa que causou um efeito estatisticamente significativo nas atividades de ALP e TRAP, isto é, um efeito inibitório (exceto para PCS-QPEI que aumentou a atividade de ALP). As respostas celulares foram avaliadas na presença de inibidores específicos das vias de sinalização NFkB, p38, JNK e MEK, que desempenham um papel na osteoclastogênese e osteoblastogênese. A atividade de ALP (culturas de células osteoblástica) e atividade de TRAP (culturas de células osteoclástica) foram avaliadas no dia 21. Os resultados podem ser observados na Figura 3.

Nas culturas controlo das células de osteoblastos, a presença de inibidores provocou uma diminuição da atividade de ALP, sugerindo o envolvimento de todas as vias de sinalização (com uma elevada contribuição de p38). Nas culturas celulares expostas aos cimentos AH Plus e PCS, a atividade de ALP diminuiu parcialmente com o inibidor da via p38 e estava ausente na presença do inibidor da via NFkB. Os cimentos com nanopartículas QPEI incorporados apresentaram um padrão distinto. Com o cimento AH Plus-QPEI, a síntese de ALP foi praticamente abolida na presença dos inibidores das vias MEK e JNK, ao passo que se observou uma diminuição parcial com os inibidores das vias NFkB e p38. Curiosamente, com o cimento PCS-QPEI, a síntese de ALP foi totalmente abolida na presença dos inibidores das vias NFkB e p38, parcialmente diminuída na presença do inibidor da via JNK e não foi afetada pelo inibidor da via MEK.

Nas culturas controlo das células de osteoclastos, a atividade da TRAP foi quase abolida na presença dos inibidores das vias NFkB e p38 e diminuiu parcialmente com os inibidores das vias JNK e MEK. Curiosamente, em ambos os cimentos, comerciais e modificados, a atividade da TRAP na presença do inibidor da via NFkB, foi apenas parcialmente afetada (AH Plus e AH Plus-QPEI) ou não sofreu qualquer alteração (cimentos PCS e PCS-QPEI). Além disso, com os cimentos incorporados com QPEI a atividade da TRAP não foi afetada pelo inibidor da via p38. Os resultados podem ser observados na Figura 3.

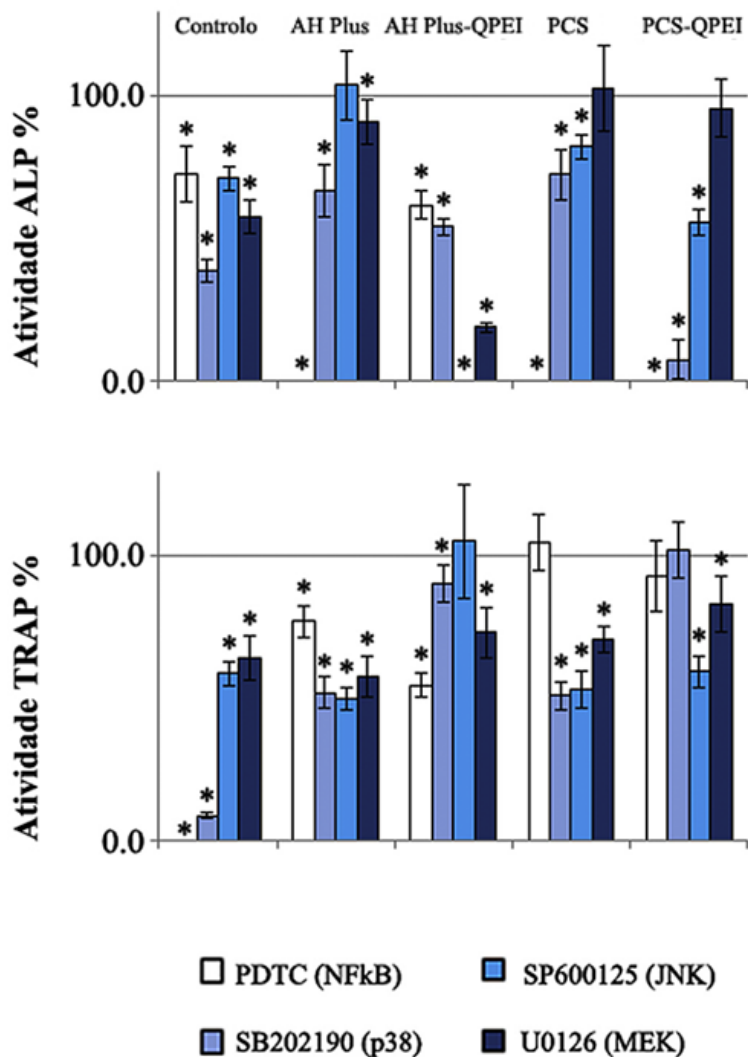


FIGURA 3 - Vias de sinalização intracelular envolvidas na resposta osteoblástica e osteoclástica nas culturas controle e nas culturas expostas aos extratos dos cimentos AH Plus e PCS, comerciais e modificados pela incorporação de QPEI (diluição 1:500). As culturas foram tratadas com inibidores de várias vias e foram avaliadas no dia 21, para as atividades de ALP e TRAP, respetivamente, em culturas de células osteoblásticas e osteoclásticas. * Significativamente diferente do controlo (ausência de inibidor).

5.1.4. DISCUSSÃO

A potenciação da atividade antibacteriana dos cimentos de obturação pela incorporação de nanopartículas de amônia quaternária de polietilenoimina (QPEI) é uma medida extremamente promissora, pela importância que representa na prevenção de possíveis infecções locais. No entanto, os cimentos devem permanecer compatíveis com os tecidos periapicais. O contato de longa duração dos tecidos com os cimentos não deve perturbar o processo de regeneração óssea local nem os eventos de remodelação responsáveis pela manutenção da integridade do osso. O metabolismo ósseo envolve as atividades coordenadas dos osteoblastos, responsáveis pela formação do osso, e dos osteoclastos, envolvidos na reabsorção óssea (7, 8). Os osteoblastos derivam de células mesenquimatosas multipotentes do estroma da medula óssea, apresentam elevada atividade enzimática da fosfatase alcalina (ALP) e são responsáveis pela formação da matriz extracelular e a sua mineralização (2, 7, 8). Por outro lado, os osteoclastos são células multinucleadas que descendem de precursores hematopoiéticos CD14 (+), presentes na medula óssea e em circulação no sangue periférico, expressam níveis elevados de fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP) e são responsáveis pela reabsorção óssea (3, 7, 8). A remodelação óssea envolve processos de formação e reabsorção, sujeitos a mecanismos de regulação complexos em que intervêm uma variedade de vias de sinalização intracelular, regulados por numerosos mediadores (7, 8).

140

No Estudo 3 (Capítulo 4), os cimentos AH Plus e Pulp Canal Sealer EWT, com a concentração de 1 % e 2 % (m/m) de nanopartículas de QPEI incorporadas, foram avaliados quanto à sua atividade antibacteriana e propriedades físico-químicas e mecânicas, e os resultados demonstraram que o cimento PCS-QPEI apresentou melhor atividade antibacteriana a longo prazo. E, ainda, que a presença de nanopartículas não compromete propriedades chave como o tempo de endurecimento, a fluidez, a solubilidade, a porosidade aparente, a variação dimensional e a resistência à compressão. No entanto, os cimentos incorporados com nanopartículas de QPEI apresentaram um aumento na molhabilidade e de densidade de carga de superfície, propriedades que influenciam a interação entre a superfície do cimento e o ambiente fluido circundante, afetando a taxa de eluição e a composição dos extratos do cimento que contactam diretamente com os tecidos periapicais. Assim, o presente estudo teve como objetivo avaliar se o comportamento biológico dos cimentos comerciais é afetado pela incorporação de nanopartículas de QPEI. Células osteoblásticas e osteoclásticas humanas foram cultivadas na presença de extratos de cimentos, preparados a partir dos cimentos comerciais AH Plus e PCS (não modificados e contendo nanopartículas QPEI 2 % m/m), e o comportamento celular foi avaliado pela proliferação celular, apoptose e diferenciação fenotípica.

As culturas celulares foram preparadas a partir de células mesenquimais e células precursoras mononucleares do sangue periférico e cultivadas em condições experimentais, que favorecem a diferenciação dos osteoblastos e osteoclastos, respectivamente, como documentado em estudos anteriores (2, 3). Os extratos dos cimentos foram obtidos por incubação do material recentemente misturado (amostras frescas) com o meio de cultura, uma vez que, os cimentos são clinicamente aplicados nesta forma. Além disso, os extratos foram testados numa ampla gama de concentrações, de forma a simular o contato dos tecidos periapicais com concentrações progressivamente mais baixas dos compostos libertos pelos cimentos, devido à contínua depuração pelos fluidos extracelulares. No presente trabalho, os extratos obtidos com o mesmo protocolo com diluições $\leq 1:10$ causaram morte celular rápida. Assim, foram utilizadas diluições de extratos de 1:20 a 1:5000, o que permitiu obter informações sobre os efeitos dependentes da dose sobre as células ósseas, simulando os acontecimentos locais ao longo do tempo.

Os resultados obtidos demonstraram que concentrações baixas dos extratos dos cimentos AH Plus e PCS, foram capazes de aumentar o conteúdo de ADN em células osteoblásticas e osteoclásticas e de diminuir a taxa de apoptose, sem afetar significativamente a atividade dos marcadores fenótipos ALP e TRAP. A incorporação das nanopartículas de QPEI promoveu um efeito distinto no comportamento celular, dependente do cimento e do tipo celular estudado. Assim, com o cimento AH Plus-QPEI (1:2500, 1:500), a proliferação celular foi bastante aumentada, enquanto a atividade da ALP (1:2500, 1:500) não foi significativamente afetada. No entanto, a presença de nanopartículas de QPEI no cimento PCS causou uma indução significativa na atividade da ALP, sem afetar a proliferação celular. Quanto às células osteoclásticas, o conteúdo de ADN aumentou (AH Plus) ou não foi afetado significativamente (PCS) em diluições superiores ou igual a 1:500, mas diminuiu com extratos mais concentrados. Por outro lado, a atividade de TRAP diminuiu com os extratos de ambos os cimentos com diluições $\leq 1:500$. As elevadas concentrações dos extratos dos cimentos comerciais e modificados foram citotóxicas, no entanto, os cimentos com nanopartículas incorporadas, particularmente o cimento AH Plus, apresentaram menor citotoxicidade.

A resposta celular dos osteoblastos e osteoclastos envolve uma variedade de vias de sinalização intracelulares altamente sensíveis ao meio ambiente celular (7, 8). No presente estudo, foram avaliados alguns mecanismos conhecidos por desempenharem um papel tanto na osteoblastogênese como osteoclastogênese (4-6). É a contribuição global destes mecanismos que dita a adequada adaptação celular a contextos metabólicos e ambientais específicos. A exposição das culturas celulares aos extratos dos cimentos contou com algumas respostas adaptativas sobre os mecanismos testados. As culturas celulares foram avaliadas na presença do extrato na concentração mais baixa

que causou efeitos estatisticamente significativos nas atividades da ALP e TRAP, isto é, na diluição de 1:500. Em relação às culturas de controlo de células osteoblásticas, os resultados demonstraram que todas as vias de sinalização testadas estavam envolvidas na síntese de ALP em condições de controlo, embora com uma maior contribuição de p38. O efeito inibitório sobre a atividade de ALP, detetado com o extrato AH Plus e PCS na diluição de 1:500, parece estar associado com uma maior importância da via NFkB e uma menor relevância das vias JNK e MEK. No entanto, os cimentos-QPEI apresentaram um comportamento distinto. O extrato do cimento AH Plus-QPEI, em comparação com o extrato de AH Plus, que também causou um efeito inibidor sobre a atividade de ALP, parece causar uma estimulação significativa das vias JNK e MEK. No entanto, em comparação com o PCS, houve um aumento de relevância das vias NFkB e p38 e menor relevo da via MEK com o cimento PCS-QPEI, o que pode estar relacionado com o efeito estimulante sobre a atividade de ALP observado com este cimento, na presença da diluição 1:500.

142

Por outro lado, relativamente às culturas de células osteoclásticas realizadas em condições de controlo, as vias de sinalização NFkB e p38 foram essenciais para a síntese de TRAP. Os extratos dos cimentos PCS e AH Plus, na formulação comercial e modificada, e na diluição de 1:500, causaram um efeito inibitório sobre a atividade da TRAP, e, curiosamente, as vias NFkB e p38 assumiram menor importância. Resultados que estão de acordo com o papel desempenhado pelas vias de sinalização na diferenciação osteoclástica. Praticamente não se observou o envolvimento da via p38 com os extratos dos cimentos com nanopartículas de QPEI incorporadas. Os resultados demonstraram que os cimentos endodônticos afetam a complexa interação intracelular, modulando a resposta das células ósseas, e que os cimentos-QPEI influenciam ainda mais estes mecanismos.

As diferenças observadas no comportamento celular, entre os cimentos comerciais AH Plus e PCS e os cimentos modificados pela incorporação de nanopartículas de QPEI, sugerem alterações na composição dos extratos. A presença de nanopartículas de carga positiva induz alterações na estrutura original dos cimentos e aumenta o comportamento hidrofílico e a carga superficial dos materiais (Estudo 3, Capítulo 4), fatores que afetam as interações entre o cimento e os fluidos circundantes, com consequências na taxa de eluição e na composição do extrato. Os dois cimentos com nanopartículas QPEI afetaram o comportamento dos osteoblastos de forma distinta. Ou seja, observou-se uma maior estimulação da proliferação celular com o extrato AH Plus-QPEI e uma indução da atividade de ALP com o extrato PCS-QPEI, provavelmente devido à diferente composição dos dois cimentos. Para o cimento PCS-QPEI, pode-se supor que o extrato resultante pode conter uma maior concentração de íons zinco, devido ao aumento da hidrofília da superfície do cimento que favorece a interação com o meio aquoso circundante.

O zinco desempenha um papel chave no metabolismo ósseo uma vez que, é capaz de induzir a diferenciação em osteoblastos *in vitro* e de induzir a formação de osso *in vivo*, quando presente numa variedade de biomateriais (6, 9-12). Curiosamente, o comportamento das células osteoclásticas não foi significativamente afetado pela presença de nanopartículas de QPEI, em ambos os cimentos testados. Os resultados obtidos estão de acordo com um estudo recente que demonstrou, num sistema de coculturas celulares, que as células osteoblásticas são mais sensíveis à toxicidade de extratos de cimentos endodônticos, incluindo o AH Plus e Tubliseal (um cimento à base de óxido de zinco-eugenol, do mesmo tipo que o PCS), do que as células osteoclásticas (13). Sabe-se que as células osteoblásticas são particularmente sensíveis ao microambiente circundante (14). Da mesma forma, outros estudos evidenciaram que os osteoblastos e osteoclastos respondem de forma diferente aos mesmos materiais e os resultados sugerem uma maior sensibilidade das células osteoblásticas (15, 16).

A resposta das células ósseas aos cimentos AH Plus e à base de óxido de zinco-eugenol tem sido avaliada principalmente em relação às células osteoblásticas. Assim, o cimento AH Plus foi testado em células de osteossarcoma U2-OS (17, 18) e em linhas de células de rato MC3T3-E1 e ROS 17/2.8 (19, 20), e a citotoxicidade do cimento PCS foi avaliada em osteoblastos humanos (17, 21). Os cimentos endodônticos AH Plus e Tubliseal também foram avaliados quanto à resposta de células osteoclásticas (22) e de coculturas de osteoblastos e osteoclastos (13). Os resultados obtidos no presente estudo estão em linha com os poucos estudos que mostraram que a presença de nanopartículas de QPEI em alguns materiais dentários, não aumenta a sua citotoxicidade. Importa referir que uma investigação recente demonstrou que a incorporação de 1 % de QPEI aos cimentos AH Plus, Epiphany e GuttaFlow não causou nenhum efeito citotóxico sobre a viabilidade de fibroblastos L-929 e de macrófagos RAW264.7, enquanto que a incorporação de 2 % demonstrou apenas um ligeiro aumento tóxico dependente do material testado, das condições de cultura e do tipo de células (23). Além disso, a presença de nanopartículas QPEI, em algumas resinas compostas, não compromete a biocompatibilidade dos materiais (24, 25).

Em conclusão, as células osteoblásticas apresentaram maior sensibilidade às eventuais alterações da composição dos extratos dos cimentos com nanopartículas de QPEI incorporadas. Na presença de baixas concentrações de extrato, foram observados efeitos positivos, nomeadamente, a proliferação celular aumentou com o cimento AH Plus-QPEI e verificou-se indução da atividade de ALP com o cimento PCS-QPEI. No entanto, o comportamento das células osteoclásticas não foi significativamente afetado. A incorporação das nanopartículas também induziu algumas alterações nas vias de sinalização intracelular envolvidas na resposta das células ósseas.

5.2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. International Organization for Standardization. Biological Evaluation of Medical Devices – Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity. Geneva, Switzerland 2009: ISO 10993-5.
2. Coelho MJ, Fernandes MH. Human bone cell cultures in biocompatibility testing. Part II: effect of ascorbic acid, beta-glycerophosphate and dexamethasone on osteoblastic differentiation. *Biomaterials* 2000;21:1095-102.
3. Costa-Rodrigues J, Fernandes A, Fernandes MH. Spontaneous and induced osteoclastogenic behaviour of human peripheral blood mononuclear cells and their CD14(+) and CD14(-) cell fractions. *Cell Prolif* 2011;44:410-9.
4. Lian JB, Stein GS, Javed A, *et al.* Networks and hubs for the transcriptional control of osteoblastogenesis. *Rev Endocr Metab Disord* 2006;7:1-16.
5. Vaananen HK, Laitala-Leinonen T. Osteoclast lineage and function. *Arch Biochem Biophys* 2008;473:132-8.
6. Zhao Q, Shao J, Chen W, Li YP. Osteoclast differentiation and gene regulation. *Front Biosci* 2007;12:2519-29.
7. Datta HK, Ng WF, Walker JA, Tuck SP, Varanasi SS. The cell biology of bone metabolism. *J Clin Pathol* 2008;61:577-87.
8. Matsuo K, Irie N. Osteoclast-osteoblast communication. *Arch Biochem Biophys* 2008;473:201-9.
9. Bandyopadhyay A, Bernard S, Xue W, Bose S. Calcium Phosphate-Based Resorbable Ceramics: Influence of MgO, ZnO, and SiO₂ Dopants. *J Am Ceram Soc* 2006;89:2675-88.
10. Barrère F, van Blitterswijk CA, de Groot K. Bone regeneration: molecular and cellular interactions with calcium phosphate ceramics. *Int J Nanomed* 2006;1:317-32.
11. Ikeuchi M, Ito A, Dohi Y, Ohgushi H, Shimaoka H, *et al.* Osteogenic differentiation of cultured rat and human bone marrow cells on the surface of zinc-releasing calcium phosphate ceramics. *J Biomed Mater Res A* 2003;67:1115-22.
12. Hussain NS, Gomes PS, Lopes MA, Fernandes MH, Santos JD. Cell adhesion and proliferation over zinc-glass reinforced hydroxyapatite composites (Zn-GRHA). In *Biomaterials for Bone Regenerative Medicine*. Ed NS Hussain and JD Santos. Trans Tech Publishers (Ttp), Switzerland; ISBN: 978-0-87849-153-7; 2010.
13. Rodrigues C, Costa-Rodrigues J, Capelas JA, Fernandes MH. Behaviour of co-cultured

- human osteoclastic and osteoblastic cells exposed to endodontic sealers' extracts. *Clin Oral Invest* 2013; doi:10.1007/s00784-013-0983-6.
14. Neve A, Corrado A, Cantatore FP. Osteoblast physiology in normal and pathological conditions. *Cell Tissue Res* 2011;343:289-302.
 15. Hao J, Kuroda S, Ohya K, Bartakova S, Aoki H, *et al.* Enhanced osteoblast and osteoclast responses to a thin film sputtered hydroxyapatite coating. *J Mater Sci: Mater Med* 2011;22:1489-99.
 16. Bang SM, Moon HJ, Kwon YD, Yoo JY, Pae A, *et al.* Osteoblastic and osteoclastic differentiation on SLA and hydrophilic modified SLA titanium surfaces. *Clin Oral Impl Res* 2013; doi: 10.1111/clr.12146.
 17. Huang FM, Chou MY, Chang YC. Induction of cyclooxygenase-2 mRNA and protein expression by epoxy resin and zinc oxide-eugenol based root canal sealers in human osteoblastic cells. *Biomaterials* 2003;24:1869-75.
 18. Huang FM, Tsai CH, Yang SF, Chang YC. Induction of interleukin-6 and interleukin-8 gene expression by root canal sealers in human osteoblastic cells. *J Endod* 2005;31:679-83.
 19. Brackett MG, Messer RL, Lockwood PE, Bryan TE, Lewis JB, *et al.* Cytotoxic response of three cell lines exposed in vitro to dental endodontic sealers. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2010;95:380-86.
 20. Bryan TE, Khechen K, Brackett MG, Messer RL, Ei-Awady A, *et al.* In vitro osteogenic potential of an experimental calcium silicate-based root canal sealer. *J Endod* 2010;36:1163-9.
 21. Scelza MZ, Linhares AB, Silva LE, Granjeiro JM, Alves GG, *et al.* A multiparametric assay to compare the cytotoxicity of endodontic sealers with primary human osteoblasts. *Int Endod J* 2012;45:12-8.
 22. Rodrigues C, Costa-Rodrigues J, Capelas JA, Fernandes MH. Long-term dose- and time-dependent effects of endodontic sealers in human in vitro osteoclastogenesis. *J Endod* 2013;39:833-8.
 23. Abramovitz I, Beyth N, Weinberg G, Borenstein A, Polak D, *et al.* In Vitro Biocompatibility of Endodontic Sealers Incorporating Antibacterial Nanoparticles. *J Nanomater* 2012 (2012) Article ID 858073.
 24. Beyth N, Hourri-Haddad Y, Baraness-Hadar L, Yudovin-Farber I, Domb AJ, *et al.* Surface antimicrobial activity and biocompatibility of incorporated polyethylenimine nanoparticles. *Biomaterials* 2008;9:4157-63.

25. Yudovin-Farber I, Beyth N, Nyska A, Weiss EI, Golenser J, *et al.* Surface characterization and biocompatibility of restorative resin containing nanoparticles. *Biomacromolecules* 2008;9:3044–50.

C A P Í T U L O 6

CONCLUSÕES

CONCLUSÕES

A marcada atividade antibiofilme e antimicrobiana de amplo espectro demonstrada pela ação do PEI, tanto contra bactérias de Gram positivo e negativo como contra fungos, revelou que o PEI é um composto promissor, com possível aplicação na incorporação ou revestimento de materiais endodônticos. As nanopartículas de QPEI apresentaram atividade antibacteriana e antibiofilme semelhante ao PEI. Também o mecanismo de ação contra o microrganismo *E. faecalis* ocorre por lesão da membrana celular para ambos os compostos, segundo os resultados obtidos por citometria de fluxo.

A quaternização do PEI em amônia quaternária de polietilenoimina (QPEI) e a síntese de nanopartículas de QPEI foi realizada em duas etapas, aminação redutiva e N-alquilação, dos quais resultou o aumento da carga positiva através da conversão de grupos amina primários, secundários e terciários do PEI em grupos catiônicos de amônia quaternária. O valor do potencial zeta das nanopartículas de QPEI foi de aproximadamente 68,5 mV. O tamanho de partícula de cerca de 58 nm confirmou a escala nanométrica das partículas.

A incorporação de nanopartículas de QPEI no cimento de obturação PCS (1 % e 2 % m/m) aumentou a eficácia antibacteriana contra as três estirpes de *E. faecalis* avaliadas, por um período de tempo de 7 dias após tomada de presa do material. As propriedades físico-químicas e mecânicas dos cimentos PCS e AH Plus não foram afetadas pela incorporação das nanopartículas exceto o tempo de endurecimento, a molhabilidade e o potencial zeta. As alterações verificadas nestas propriedades podem melhorar a atividade antibacteriana e aumentar a capacidade do cimento de penetrar no complexo sistema de canais radiculares.

A adição de nanopartículas de QPEI ao cimento PCS potenciou os efeitos antibacterianos contra ambas as estirpes de *E. faecalis* avaliadas sob a forma de biofilme. Os efeitos antibiofilme do cimento AH Plus com nanopartículas QPEI verificaram-se essencialmente sobre a biomassa do biofilme da estirpe ATCC.

Em relação ao estudo de biocompatibilidade dos materiais utilizados, as células osteoblásticas apresentaram maior sensibilidade às eventuais alterações da composição dos extratos dos cimentos com nanopartículas de QPEI incorporadas, enquanto que o comportamento das células osteoclásticas não foi significativamente afetado. Efeitos positivos foram observados na presença de baixas concentrações de extrato, como o aumento da proliferação celular com o cimento AH Plus-QPEI e a indução da atividade de ALP com o cimento PCS-QPEI. Os resultados obtidos

sugerem que a incorporação de nanopartículas de QPEI em cimentos endodônticos não induz efeitos deletérios nas células ósseas, em comparação com os mesmos materiais na formulação comercial. No entanto, podem modular eventos de proliferação/diferenciação, dependendo da composição dos cimentos e do tipo de células.

Os resultados das investigações do comportamento das nanopartículas QPEI nos cimentos endodônticos deixam em aberto possíveis linhas de pesquisa, susceptíveis de criar condições para o desenvolvimento de novos materiais, que poderão influenciar de modo decisivo o sucesso do tratamento endodôntico e por extensão a outros procedimentos em Medicina Dentária.

C A P Í T U L O 7

PERSPETIVAS

FUTURAS

PERSPETIVAS FUTURAS

Dada a relevância do tema abordado e como desenvolvimento futuro desta investigação, destacam-se os seguintes temas:

- Avaliação da capacidade de selamento dos cimentos endodônticos, usando um modelo *ex vivo* de avaliação de infiltração por bactérias.

A capacidade de um cimento endodôntico promover um bom selamento está diretamente relacionado com as suas inúmeras propriedades físico-químicas. A importância do selamento torna-se capital pois impede que as bactérias que possam persistir, mesmo após um tratamento endodôntico criterioso, tenham a possibilidade de atingir o periápice e, conseqüentemente, conduzir ao insucesso do tratamento.

Uma vez que o fator microbiológico está na origem das infecções endodônticas, é por isso reconhecido que um modelo experimental de avaliação de infiltração com bactérias tem inúmeras vantagens. Neste estudo foi desenvolvido um modelo experimental, na tentativa de ultrapassar as limitações referidas aos modelos existentes. O desenho do estudo permitirá também uma abordagem de biologia molecular para além do método de cultura microbiológica para a detecção do microrganismo *E. faecalis*.

A investigação referida encontra-se em desenvolvimento em colaboração com o Laboratório de Microbiologia do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Faculdade Estácio de Sá, Rio de Janeiro (Brasil).

- Avaliação da atividade antimicrobiana e antibiofilme das nanopartículas QPEI contra a *Candida albicans*.

Neste sentido a atividade antimicrobiana e antibiofilme de PEI foi já avaliada contra estirpes de *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Candida albicans* (microrganismos frequentemente envolvidos em infecções endodônticas persistentes), na forma de células planctónicas e de biofilme (Capítulo 3). Devido a limitações de recursos laboratoriais e de tempo, os estudos de nanopartículas de QPEI, isoladas ou incorporadas nos cimentos endodônticos, foram realizados apenas em relação ao microrganismo *E. faecalis*. Embora este microrganismo seja o mais frequentemente utilizado neste tipo de investigações consideramos relevante o estudo de outros microrganismos, devido à etiologia polimicrobiana das infecções endodônticas. A *Candida albicans* sendo a espécie fúngica mais frequentemente isolada e associada à periodontite apical, assume particular importância. Atualmente, foi já iniciado o estudo da atividade antimicrobiana contra *C. albicans* na forma de células planctónicas e de biofilme.

C A P Í T U L O 8

PUBLICAÇÕES

ANTIBACTERIAL, PHYSICOCHEMICAL AND MECHANICAL PROPERTIES OF ENDODONTIC SEALERS CONTAINING QUARTENARY
AMMONIUM POLYETHYLENIMINE NANOPARTICLES
159-168

ANTIBIOFILM EFFECTS OF ENDODONTIC SEALERS CONTAINING QUARTENARY AMMONIUM POLYETHYLENIMINE NANOPARTICLES **157**
169-173

IN VITRO ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF AN ENDODONTIC SEALER INCORPORATED WITH PEI NANOPARTICLES
175

ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF NEW COMPOUNDS FOR USE IN ENDODONTIC MATERIALS
177

ANTIMICROBIAL ACTIVITY UPON PLANKTONIC CELLS AND BIOFILMS OF POLYETHYLENIMINE
179

Antibacterial, physicochemical and mechanical properties of endodontic sealers containing quaternary ammonium polyethylenimine nanoparticles

J. Barros¹, M. G. Silva², M. A. Rodrigues³, F. R. F. Alves⁴, M. A. Lopes³, I. Pina-Vaz¹ & J. F. Siqueira Jr⁴

¹Department of Endodontics, Faculty of Dental Medicine, University of Porto, Porto, Portugal; ²Institute of Microbiology Prof. Paulo de Góes, Federal University of Rio de Janeiro, RJ, Brazil; ³Department of Metallurgical and Materials Engineering, Faculty of Engineering, University of Porto, Porto, Portugal; and ⁴Department of Endodontics, Faculty of Dentistry, Estácio de Sá University, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

Abstract

Barros J, Silva MG, Rodrigues MA, Alves FRF, Lopes MA, Pina-Vaz I, Siqueira JF Jr. Antibacterial, physicochemical and mechanical properties of endodontic sealers containing quaternary ammonium polyethylenimine nanoparticles. *International Endodontic Journal*.

Aim To evaluate the antibacterial, physicochemical and mechanical properties of two endodontic sealers incorporating quaternary ammonium polyethylenimine (QPEI) nanoparticles at concentrations of 1% and 2% (w/w).

Methodology The sealers tested were AH Plus and Pulp Canal Sealer EWT in the commercial unmodified form or containing 1% or 2% QPEI. Antibacterial activity was evaluated using a direct contact test (DCT) against *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 and two endodontic isolates (RW35 and RN44). Sealers freshly mixed or set for 7 days were exposed to bacterial suspensions for 10, 30 and 60 min. Setting time, flow test, solubility, apparent porosity, dimensional change following setting, wettability, zeta potential and compressive strength were assessed according to the International Standard Organization 6876:2001 (ISO 6876).

Results DCT results revealed that both freshly prepared sealers had antibacterial effects unaffected by QPEI incorporation. Both unmodified sealers had lost much of their antibacterial effects after 7 days. However, for Pulp Canal Sealer EWT incorporated with 1% and 2% QPEI nanoparticles, the antibacterial effects against all test *E. faecalis* strains within 30 and 60 min of contact were significantly greater than the unmodified formula. Addition of QPEI resulted in no significant increase in the antibacterial effects of AH Plus after ageing. As for physicochemical and mechanical tests, setting time, wettability and zeta potential were influenced by the presence of QPEI nanoparticles.

Conclusion Incorporation of QPEI nanoparticles can improve the long-term antibacterial activity of Pulp Canal Sealer EWT without relevant changes in physicochemical and mechanical properties.

Keywords: antibacterial activity, endodontic sealers, *Enterococcus faecalis*, nanoparticles, physicochemical properties, quaternary ammonium.

Received 29 August 2013; accepted 15 October 2013

Correspondence: Joana Barros, Department of Endodontics, Faculty of Dental Medicine of University of Porto, Porto, Portugal. Rua Dr. Manuel Pereira da Silva, 4200-393 Porto, Portugal. (Tel.: +351 220 901 100; Fax: +351 220 901 101; e-mail: joana.barros.c@gmail.com).

Introduction

Persistent bacteria have been detected in approximately 40–60% of the root canals following chemo-mechanical preparation (Siqueira & Rôças 2008).

Ideally, the root filling should fill and seal the prepared canal and deny space and nutrients for growth of residual bacteria. In addition, because most of the infections in cases with post-treatment disease are located in areas untouched by instruments and irrigants (Ricucci *et al.* 2009), the root canal sealer should ideally be forced to these areas to exert its antibacterial effects. Studies have reported that several sealers possess antimicrobial activity, mainly before setting (Ørstavik 1981, Spangberg *et al.* 1993, Siqueira & Gonçalves 1996, Siqueira *et al.* 2000, Kayaoglu *et al.* 2005). Increasing the long-term antimicrobial activity of the sealers seems to be an interesting approach to maximize root canal disinfection.

The antibacterial effects of numerous nanoscale structures have been investigated and nanoparticles of many compounds such as magnesium oxide (MgO), calcium oxide (CaO), zinc oxide (ZnO), silver (Ag), copper oxide (CuO) and chitosan (CS) have emerged as potential antimicrobial agents (Kishen 2010). Nanoparticles are sized between 1 and 100 nanometres, and their superior antimicrobial effects when compared to their bulk counterparts are usually related to their higher surface area and charge density, resulting in enhanced interaction with microbial cells. Nanoparticles made from insoluble cross-linked quaternary ammonium polyethylenimine (QPEI) have attracted attention as possible antimicrobial agent because of its positive charge and hydrophobicity (Beyth *et al.* 2006a). It has been previously reported that QPEI nanoparticles incorporated into provisional cements and various composite resins demonstrated a strong and long-lasting antibacterial effect against oral bacteria without compromising some physical properties (Beyth *et al.* 2010a,b, Shvero *et al.* 2010). A recent study evaluated the effects on a clinical strain of *Enterococcus faecalis* of two endodontic sealers (AH Plus and GuttaFlow) incorporating low concentrations of insoluble antibacterial QPEI nanoparticles (Kesler-Shvero *et al.* 2013). The direct contact test (DCT) with absorbance reading was used, and the results revealed a pronounced and long-lasting antibacterial activity of modified sealers when compared with the unmodified form. Therefore, QPEI nanoparticles have the potential to improve the antibacterial effect of endodontic sealers either by increasing efficacy in the fresh state or generating prolonged effects, or both. Moreover, substances added to extant commercial products should ideally not alter substantially other biological as well as physicochemical and mechanical properties.

This study investigated and compared the antibacterial activity of two endodontic sealers loaded with QPEI nanoparticles at low concentrations (1% and 2%, w/w) against three *E. faecalis* strains. Furthermore, the effects of QPEI addition on several physicochemical and mechanical properties of the sealers were tested in accordance with the International Standard Organization 6876:2001 (ISO 6876). The null hypothesis was that there is no difference between loaded and unload sealers in their properties.

Materials and methods

Synthesis of QPEI nanoparticles

PEI was dissolved in absolute ethanol and cross-linked with glutaraldehyde for 6 h at room temperature. N-alkylation was conducted by adding octanal at 1 : 1 mole ratio (primary amine of PEI monomer units/octanal). The alkylation step was performed at room temperature for 24 h. The resulting yellow suspension was reduced with sodium cyanoborohydride. Afterwards, methyl iodide was used for the methylation process at 42 °C for 48 h, during which, a yellow precipitate was formed. An equivalent amount of sodium bicarbonate was added to collect released hydrogen iodide. Neutralization was continued at the same conditions for additional 24 h. The precipitate was allowed to reach room temperature and washed with hexane and double distilled and then was freeze-dried. The average yield was 75% (mol/mol).

Characterization of QPEI nanoparticles

Zeta potential of polyethylenimine nanoparticles was characterized using a Zetasizer Nano-ZS equipment (Malvern Instruments, Malvern, UK). Typical analysis depths were approximately 5 nm, and survey spectra were collected into a hemispherical analyser using a pass energy of 150 V. The average particle size and size distribution of the nanoparticles were determined by dynamic light scattering using a Zetasizer Nano-ZS (Malvern Instruments). Measurement was carried out at a fixed angle of 90° with the samples diluted approximately 1000 times in ultrapure water. The particle size of the suspensions was described by the cumulative mean (z-average) diameter. All readings were carried out in triplicate.

Bacterial strains and culture conditions

Three *E. faecalis* strains were used in this study: one from the American Type Culture Collection (ATCC 29212) and two strains (RW35 and RN44) isolated from canals from teeth undergoing root canal treatment (Zoletti et al. 2011). Strains were grown overnight at 37 °C in tryptic soy broth (TSB, Difco, Detroit, MI, USA) supplemented with 1% glucose (Merck, Whitehouse Station, NJ, USA). Purity of the culture was checked, and the inoculum was adjusted in PBS to a turbidity of 0.5 McFarland scale (approximately 1.5×10^8 colony-forming units mL⁻¹).

Test specimens

The endodontic sealers tested in this study were AH Plus (Dentsply DeTrey, Konstanz, Germany) and Pulp Canal Sealer EWT (PCS) (Kerr Italia Srl, Salerno, Italy). QPEI nanoparticles were incorporated into the sealers at either 1% or 2% w/w concentration. Sealers were prepared following the manufacturers' instructions.

Direct contact test

Direct contact test was used as described previously (Zhang et al. 2009). A 96-well microtiter plate (model 92096 TPP 'Techno Plastic Products', certified ISO 9001, Trasadingen, Switzerland) was held vertically, and an area of fixed size on the side wall of the wells was coated with approximately 30 µL of each material using an insulin syringe and a cavity liner applicator. Sealers were either tested 20 min following mixing (fresh samples) or allowed to set for 7 days at 37 °C in 100% relative humidity (aged samples). Aliquots of 10 µL of bacterial suspension (containing approximately 1.5×10^6 bacteria) were placed on the surface of each test sealer. Bacterial suspensions applied to the wall of uncoated wells served as positive controls, whilst walls coated with sealers but with no bacterial suspension were used as negative controls.

Plates were incubated at 37 °C in 100% relative humidity for 10, 30 and 60 min and then horizontally positioned so as to permit 200 µL of TSB to be added to each well. The bacterial suspension from each well was gently mixed with a pipette for 1 min and then transferred to sterile microtitre plates and subjected to 10-fold serial dilutions in sterile saline. Bacterial survival was determined by culturing 10-µL aliquots of each dilution onto *Mitis Salivarius* (MS) agar plates.

Colony-forming units were counted after incubation for 24 h at 37 °C. Samples were evaluated in triplicate.

Physicochemical and mechanical properties

Physicochemical properties such as setting time, flow test, solubility, apparent porosity, dimensional change, wettability and zeta potential as well as mechanical properties such as compressive strength for root canal sealers loaded or unloaded with QPEI nanoparticles were measured according to ISO 6876 (2001), as briefly described below.

Setting time

Three plastics discs having an internal diameter of 10 mm and thickness of 1 mm were prepared. The moulds were filled with each test material and transferred to a chamber with 95% relative humidity and temperature of 37 °C. After 24 h from the start of mixing, the sealer a Gilmore-type needle with a mass of 100 ± 0.5 g having a flat end of 2.0 ± 0.1 mm in diameter was lowered vertically onto the horizontal surface of each sample. The needle tip was cleaned, and probing was repeated until indentations ceased to be visible and the setting time was recorded.

Flow test

Using a graduated disposable 1-mL syringe, a total of 0.5 mL of sealer was placed onto a glass plate ($40 \times 40 \times 5$ mm). At 180 ± 5 s after the start of mixing, another glass plate was applied centrally on top of the material, to make a total mass on the plate of 120 g. Ten minutes after the start of mixing, the load was removed, and the average of the major and minor diameters of the compressed discs was measured using a digital caliper with a readout of 0.025 mm. The mean of three measurements for each sealer, expressed to the nearest millimetre, was taken as the flow of the material.

Solubility

Stainless steel ring moulds with an internal diameter of 20 ± 0.1 mm and height of 1.5 ± 0.1 mm were used for sample preparation. Moulds were placed on a glass plate and filled to slight excess with the mixed materials. After filling the moulds, another glass plate was placed on top of the moulds. Three sets of specimens for

each material were prepared in one operation. All samples were left to set for 24 h on a grating in a cabinet at 37 °C and 100% relative humidity. Samples in their moulds were exposed to air for 15 min, weighed 3 times, and the average reading was recorded. The specimens of each material were individually placed in tarred bottles, containing 5 mL of distilled water. Bottles were then transferred to an oven at 37 °C where they remained for 24 h. They were removed from the oven and rinsed with distilled water, which was then collected in the same bottles. After that, water was evaporated at a temperature slightly below the boiling point. Bottles and residues were dried in an oven at 105 °C, cooled down in the same desiccator and weighed. The differences found between this weight and the original bottle weight were divided by the initial dry weight of the specimens and multiplied by 100. The result was recorded as solubility.

Apparent porosity

The apparent porosity was evaluated according to the immersion test (Archimedes principle, ASTM C830 standard) using water. Samples are initially weighed in dry conditions (W_d). After 1 h of soaking in water, the wet sample was weighed (W_h) and weighed once again immersed in water (W_i). The apparent porosity of the sample was calculated from the mass of water retained in its open pores, according to the following formula: apparent porosity (%) = $[(W_h - W_d)/(W_i - W_d)] \times 100$.

Dimensional change

Cylindrical test specimens with a diameter of 6 mm and height of 12 mm were made in triplicate. After filling moulds with each sealer, the moulds and plates were held firmly together with a clamp. Five minutes after start of mixing, the mould with clamp was transferred to a cabinet with 95–100% relative humidity and kept for 30 days at 37 °C. The dimension of the cylinders was measured again, and the dimensional change (%) assessed through the volume change $((V_i - V_f)/V_i) \times 100$, where V_i stands for initial volume and V_f for final volume). A Vernier caliper, an extremely precise measuring instrument, was used (error ± 0.025 mm).

Wettability

Wettability of the endodontic sealers by water was determined by contact angle measurement. Sealers

were spread evenly onto glass slides and kept in 100% relative humidity at 37 °C until setting. Sessile drop contact angle measurements were performed using ultrapure water and pumping no less than 10 droplets of 4 μ L in each surface of the dried samples. Dataphysics – Contact Angle System OCA 15 plus equipment was used to measure the contact angle.

Zeta potential

The zeta potential of powdered samples of the commercial endodontic sealers unloaded and loaded with 1% and 2% QPEI nanoparticles was assessed using a Zetasizer Nano-ZS equipment (Malvern Instruments), a laser Doppler micro-electrophoresis equipment. The powders were suspended in ultrapure water at 0.5% (w/v) concentration. The mixture solution was filtered through a cellulose filter with 0.2- μ m-pore-size pre-analysis. An electric field was applied to the aqueous solutions with powdered sealers dispersed, which then move with a velocity related to their zeta potential. Typical analysis depths were approximately 5 nm, and survey spectra were collected into a hemispherical analyser using pass energy of 150 V. This enables the calculation of electrophoretic mobility (EM), and the zeta potential is determined according to the following Smoluchowski's equation: $ZP = 4\phi h/D \times E$, where h and D are the viscosity in poise and the dielectric constant of the suspending liquid, respectively. Three readings were carried out per sample to ensure reproducibility.

Compressive strength

Five specimens were used for each sealer. The specimens were cylindrical and had a 1 : 2 ratio of base diameter to height. Each specimen was subjected to compression in a Tira Test 2705 equipment with a load cell of 500 N, at a rate of 0.3 mm s⁻¹ until fracture. The maximum load supported before fracture was deemed as the compressive strength.

Statistical analysis

Statistical analysis of data was tested for normal distribution, and the one-way ANOVA was performed, followed by the Bonferroni test for *post hoc* comparison, with the software SIGMASTAT 3.5. Differences were considered to be significant at a level of $P < 0.05$.

Results

Characterizations of the QPEI nanoparticles

Quaternary ammonium polyethylenimine particles had a nanoscale diameter of 58 ± 18 nm. In terms of charge, the value of 68.5 ± 1.9 mV achieved for zeta potential indicates the positive charge of the particles as expected.

Antibacterial effects

Direct contact test results for the antibacterial effects of the root canal sealers unmodified or containing QPEI nanoparticles are depicted in Fig. 1. As for fresh sealers, PCS had the strongest antibacterial effects, regardless of the presence of QPEI nanoparticles. Total elimination of cells of the two endodontic strains was observed as early as 10-min contact. AH Plus had overall antibacterial properties lower than PCS. Total bacterial eradication was observed only after 60-min contact with one of the strains (RW35). Incorporation of PEI nanoparticles did not alter significantly the antimicrobial activities of both sealers in a fresh state ($P > 0.05$).

After 7 days of setting, both unmodified sealers had lost much of their antibacterial effects. However, for PCS incorporated with QPEI nanoparticles at concentrations of 1% and 2% w/w, the antibacterial effects against all test *E. faecalis* strains within 30 and 60 min of contact were significantly greater than the unmodified formula ($P < 0.05$). The three *E. faecalis* strains were completely eradicated within 60 min of contact with PCS containing 2% QPEI. Addition of either 1% or 2% QPEI resulted in no significant increase in the antibacterial effects of AH Plus after ageing. All negative controls yielded no growth.

Physicochemical and mechanical properties

The physicochemical and mechanical properties of the sealers loaded or not with QPEI nanoparticles are listed in Table 1. Comparing the properties of unmodified AH Plus and PCS sealers, a setting time much longer for the former was found, which also showed a slightly higher dimension change and lower flow ability. Similar solubility and wettability were found for the two sealers. The major differences were found for the zeta potential and compressive strength. AH Plus presented a much higher strength than PCS. Regarding the zeta potential, despite both materials

had values close to zero, the AH Plus sealer had a negative surface charge as opposed to PCS, which had a positively charged surface.

The properties of the sealers loaded with QPEI nanoparticles were first evaluated for 2% w/w addition, and the ones that were found to be different from the unmodified sealers were also evaluated for the addition of 1% w/w. Findings indicated that only setting time, wettability and zeta potential of the sealers were influenced by the presence of QPEI nanoparticles. PCS containing 2% QPEI had increased setting time ($P < 0.05$). Both commercial sealers were hydrophobic, but after incorporation of QPEI nanoparticles, they became hydrophilic. Increase in wettability was directly proportional to an increase in QPEI nanoparticle concentration for both sealers. Incorporation of QPEI nanoparticles made the surface charge to become more positive in both sealers. Addition of 2% QPEI to the AH Plus sealer caused a slight increase in surface charge, whereas 1% showed only an intangible increase. A strong effect was seen in the surface charge of the PCS matrix, which changed from 3.93 ± 0.18 mV to 69.80 ± 2.28 mV following addition of 2% w/w of QPEI nanoparticles ($P < 0.05$).

Discussion

Improving and prolonging the antibacterial effects of sealers have the potential to contribute to improved disinfection of the root canal system. In the present study, QPEI nanoparticles were prepared and incorporated into the root canal sealers AH Plus and PCS to enhance their antibacterial effects. Antibacterial nanoparticles are reported to exhibit higher antibacterial activity than their powder counterparts, and this may be related to the fact that the higher surface area and charge density of nanoparticles favour the interaction with negatively charged bacterial surfaces (Kishen et al. 2008). The present study showed that aged PCS with QPEI nanoparticles demonstrated stronger antibacterial effects against *E. faecalis* strains than the unmodified sealer.

Enterococcus faecalis was used because it may be resistant to some medicaments used in endodontics and is frequently detected in root canals of teeth with post-treatment apical periodontitis (Sundqvist et al. 1998, Siqueira & Rôças 2004, Stuart et al. 2006). Consequently, this species has been used in numerous investigations of antibacterial effects of procedures, materials and substances. In addition to a commonly used ATCC strain from urine origin, two endodontic

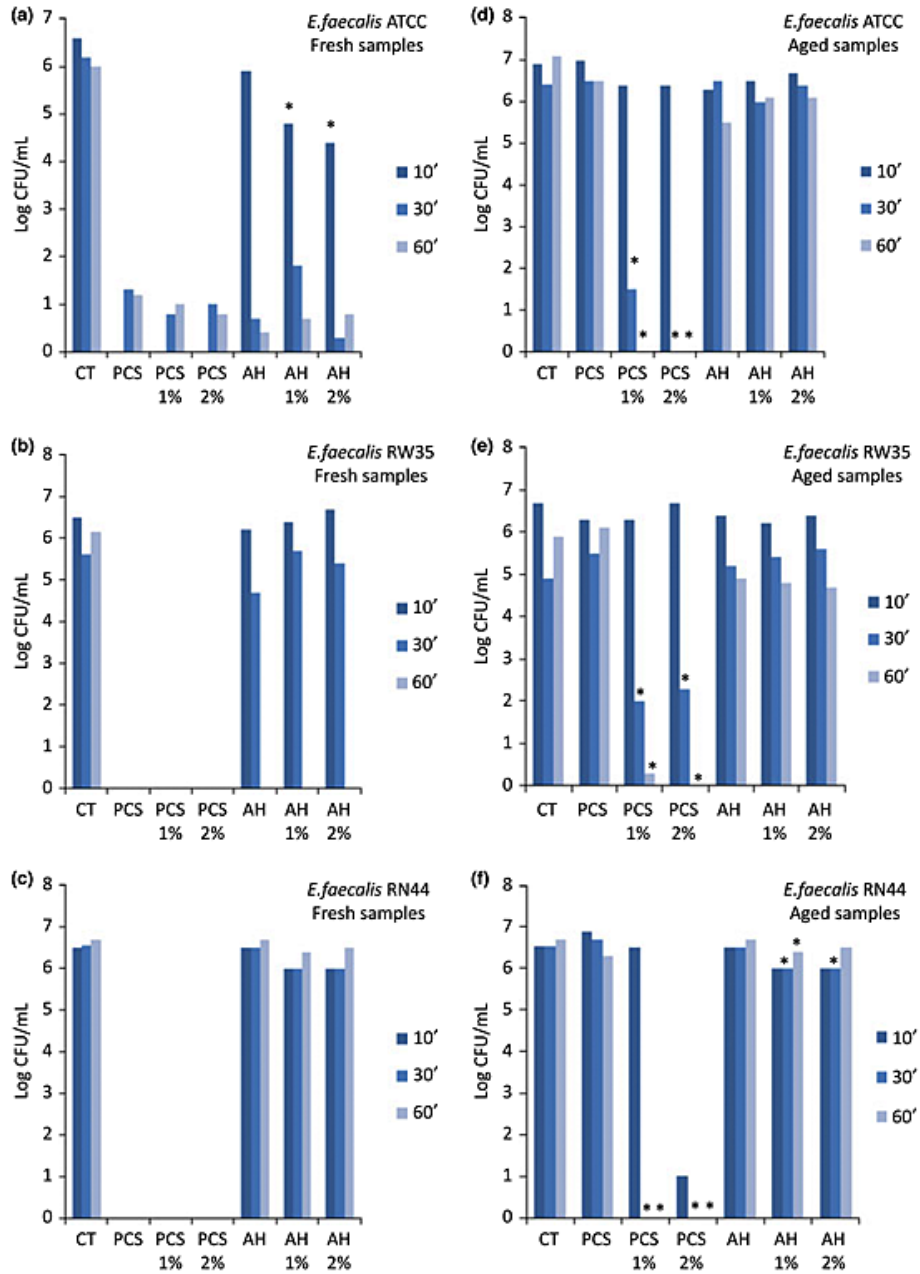


Figure 1 Survival of different *Enterococcus faecalis* strains after direct contact test for 10, 30 and 60 min with sealers containing 1% and 2% quaternary ammonium polyethylenimine (QPEI) nanoparticles. Fresh samples (a–c); aged samples, sealers set for 7 days. (d–f). CT, Positive Control; PCS, Pulp Canal Sealer EWT; AH, AH Plus.* Value differs significantly from the unmodified sealers at the same time period ($P < 0.05$).

Table 1 Physicochemical and mechanical properties of the sealers loaded or not with QPEI nanoparticles

Property	AH Plus			Pulp Canal Sealer EWT		
	AH-0%	AH-1%	AH-2%	PCS-0%	PCS-1%	PCS-2%
Setting time (min)	470 ± 10	475 ± 10	475 ± 15	55 ± 2	60 ± 3	62 ± 3*
Flow (mm)	29.0 ± 0.66	28.4 ± 0.55	27.8 ± 0.21	33.6 ± 0.60	32.7 ± 0.30	32.0 ± 0.31
Solubility (%)	0.7 ± 0.1	–	0.8 ± 0.1	0.9 ± 0.2	–	0.9 ± 0.1
Apparent porosity (%)	5.6 ± 1.4	–	6.0 ± 1.3	10.5 ± 2.5	–	12.2 ± 3.0
Dimensional change (%)	–0.43 ± 0.01	–	–0.40 ± 0.01	–0.23 ± 0.02	–	–0.13 ± 0.01
Wettability (°)	80.9 ± 0.4	65.8 ± 1.9*	56.2 ± 2.0*	84.0 ± 1.2	70.4 ± 1.7*	50.4 ± 3.4*
Zeta potential (mV)	–8.26 ± 1.27	–8.12 ± 1.25	–3.85 ± 0.6*	3.93 ± 0.18	46.7 ± 2.02*	69.80 ± 2.28*
Compressive strength (MPa)	7.68 ± 0.41	–	7.56 ± 0.04	1.18 ± 0.21	–	1.15 ± 0.30

0%, commercial unmodified sealer; 1%, incorporation of QPEI in sealers at 1% w/w concentration; 2%, incorporation of QPEI in sealers at 2% w/w concentration.

QPEI, quaternary ammonium polyethylenimine; AH, AH Plus; PCS, Pulp Canal Sealer EWT.

*Statistical difference between test group and commercial sealer group ($P < 0.05$).

strains isolated from root canal-treated teeth and characterized in previous studies were also included (Zoletti *et al.* 2011). Using wild strains isolated from the environment of interest is strongly recommended for studies of this nature, and many previous studies failed to do so. This study demonstrated that the overall susceptibility patterns of the strains were somewhat similar, but the variations observed seem to confirm the need for using different strains isolated from the site of interest.

There are several parameters that determine the antimicrobial impact of an agent, such as a positive surface charge and hydrophobicity nature. Because bacterial surfaces are negatively charged at physiological pH, compounds with quaternary ammonium groups (cationic) have been used as antibacterial agents. QPEI nanoparticles were prepared via reductive amination method followed by further N-methylation, which raises their positive charge by converting PEI's primary, secondary and tertiary amino groups into cationic quaternary amino groups (Beyth *et al.* 2006b). The value of zeta potential of approximately 68.5 mV of the QPEI nanoparticles used in this study is considered to be in a range of particle charge with potential to be effective against several bacterial species (Yudovin-Farber 2008, Yudovin-Farber *et al.* 2010). The particle size of approximately 58 nm confirms the nanoscale of the particles, leaving a wide specific surface area of the material with several positively charged moieties capable of exerting antimicrobial activity. Lin *et al.* (2003) reported that N-alkylated PEI could be effective against a variety of Gram-positive and Gram-negative bacteria. Beyth *et al.* (2006a) suggested that the characteristics of positive charge and insolubility of this material relate

to the antibacterial mechanism: the quaternary ammonium compounds cause lysis of the bacterial cells by binding to cell wall components and causing leakage of the cytoplasmic material. Shvero *et al.* (2010) observed that QPEI nanoparticles incorporated at low concentrations in a provisional cement exhibited antibacterial effects against *Streptococcus mutans* and *E. faecalis* for a period of 14 days. Also, Beyth *et al.* (2010a,b) reported the improvement of clinical performance of composite resins by inhibiting bacterial growth and by preventing changes in the surface roughness.

The DCT is a quantitative and reproducible method that has been widely used for the evaluation of the antimicrobial effects of sealers and root-end filling materials, because it allegedly simulates the contact of the test bacteria with the material in the clinical setting (Weiss *et al.* 1996, Zhang *et al.* 2009). One disadvantage of DCT is that it provides no information on the antibiofilm effects of sealers (Haapasalo & Shen 2010). The assay used herein was modified to permit analysis of the bactericidal instead of the bacteriostatic effects of the materials (Zhang *et al.* 2009). This information is usually available from DCT using turbidimetric measurements. In the assay used in the present study, surviving bacterial counts can be calculated after each contact time by cultivation. Information on bactericidal effects is more clinically relevant, since residual bacteria that are inhibited by the antimicrobial agent may start to flourish again when the inhibitory effects cease. In addition to evaluating the bacteriostatic effects, the DCT based on measurements of the optical density may have the results influenced by particles released from the sealer (Seil & Webster 2012).

Most root canal sealers have weak and short-term antibacterial activity, which significantly decreases after setting (Ørstavik 1981, Spangberg *et al.* 1993, Siqueira & Gonçalves 1996, Siqueira *et al.* 2000, Kayaoglu *et al.* 2005). This was confirmed in this study, especially for PCS. Addition of QPEI nanoparticles prolonged the antimicrobial effect of PCS. Theoretically, prolonging the antibacterial effects of sealers may be interesting to help prevent reinfection and possibly to affect residual bacteria that survived the treatment procedures. PCS is a zinc oxide-eugenol-based sealer that is widely reported as having pronounced antibacterial activity, regardless of the methods used for evaluation (Cobankara *et al.* 2004, Gomes *et al.* 2004, Saleh *et al.* 2004, Kayaoglu *et al.* 2005). Most of the effects are attributed to eugenol (Hauman & Love 2003), although zinc oxide and silver powder present in PCS composition may also contribute some effects. The results of this investigation confirmed that PCS is effective in the fresh state, but loses effectiveness after setting. Incorporation of QPEI nanoparticles at low concentrations (1% and 2% w/w) significantly increased the sealer's long-lasting antibacterial effects.

AH Plus, a two-component paste root canal sealer, based on a polymerization reaction of epoxy resin amines was also tested for comparison, as it has been continuously used in comparative studies of physicochemical, biological and antimicrobial properties of root canal sealers (Versiani *et al.* 2006, Baer & Maki 2010). The antibacterial effects of AH Plus may be related to bisphenol diglycidyl ether (Siqueira & Gonçalves 1996). Pizzo *et al.* (2006) used DCT and reported that only freshly prepared AH Plus possessed antibacterial activity, whereas 24-h and 7-day-old samples of this material showed no significant effects on *E. faecalis*. Similar results were reported by other authors (Kayaoglu *et al.* 2005, Zhang *et al.* 2009). The results of the present study are in line with the previous ones, with fresh samples showing antibacterial effectiveness (except for one endodontic strain), and aged samples exhibiting no significant effects. Incorporation of QPEI nanoparticles in AH Plus sealer, regardless of the concentration used, did not improve the antibacterial effects of either fresh or aged samples. The reasons why this occurred are unknown, but one may speculate that the QPEI nanoparticles may be oriented in such a configuration that allows the hydrophilic groups of the nanoparticles to be at the surface of AH Plus, although not heavily charged, possibly due to the complex chemical composition of the sealer, which may affect charge

availability. This explanation gains credibility when one analyses the wettability increase in AH Plus (hydrophilic groups on the surface of the sealer) and the almost null change in the zeta potential.

A recent study has also evaluated the effects of adding QPEI nanoparticles on the antibacterial effects of AH Plus and GuttaFlow against an *E. faecalis* strain (Kesler-Shvero *et al.* 2013). The results showed antibacterial effects that were maintained for 4 weeks. The present findings for AH Plus are in disagreement with their study, and this may be because of the different methods used. In their study, bacterial viability was established using a calibration curve based on optical density values. A complication associated with this method is that nanoparticles themselves may contribute to the optical density of the sample (Seil & Webster 2012). Another possible reason for the difference may be related to the different batches of sealers used in the two studies, since even samples from AH Plus taken from the same tube may exhibit different physicochemical properties (Baldi *et al.* 2012). This possibility remains to be tested.

Physicochemical and mechanical tests were also conducted in this study, and the results indicated that incorporating QPEI nanoparticles into sealers did not significantly affect most of the properties evaluated, except for setting time (PCS), wettability (both sealers) and surface charge (both sealers). The nanoparticles of QPEI used in this study have a hydrophilic reticulated core linked to a hydrophobic chain containing the cationic quaternary ammonium groups. As both sealers are composed of several organic and inorganic materials, it is difficult to propose a sealer-QPEI interaction mechanism. The commercial sealers under study showed a hydrophobic behaviour. Because addition of nanoparticles of QPEI made both sealers become more hydrophilic, it is possible to infer that the core of the particles are near the surface and the hydrophobic chains are interacting with hydrophobic components of the sealers. Sealers with a more hydrophilic surface may have their penetration in irregularities of the root canal system facilitated, which may in some way impact on elimination of residual bacteria in these areas. Furthermore, from the surface charge changes observed after QPEI incorporation, it is possible that the interaction sealer-QPEI led to quaternary ammonium cationic groups being located preferentially on the surface of both sealers, but with less available charges for AH Plus as discussed above.

In general, both effective antimicrobial activity and low toxicity are properties required for an ideal root

canal sealer. With QPEI nanoparticle incorporation, a long antimicrobial activity with low tissue toxic effects is expected because this material only acts locally, by contact (Yudovin-Farber *et al.* 2008). Recently, the cytotoxic effects of three commercially sealers (AH Plus, GuttaFlow and Epiphany), before and following incorporation of 1% QPEI, were evaluated, and findings demonstrated no significant influence on the sealer's biocompatibility (Abramovitz *et al.* 2012). Future studies evaluating the cytotoxicity of these sealers, as well as other mechanical properties such as sealing ability, are required before sealers incorporated with QPEI nanoparticles be clinically used.

Conclusion

Incorporation of QPEI nanoparticles in PCS EWT at 1% w/w and 2% w/w concentration enhanced the antibacterial effectiveness against *E. faecalis* strains, for a period of 7 days after setting. Several physicochemical and mechanical properties of the sealers are not affected by QPEI nanoparticle incorporation, except for setting time, wettability and zeta potential. Changes of these properties may enhance the antibacterial activity and increase the ability of the sealer to penetrate in the complex root canal system. Further investigations of other properties such as cytotoxicity and antibiofilm and sealing abilities are necessary.

Acknowledgements

This study was financially supported by FEDER funds through the program COMPETE – Programa Operacional Factores de Competitividade – under the project PEst-C/EME/UI0285/2011, and by grants from Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Brazilian Governmental Institutions. The authors deny any conflict of interest.

References

- Abramovitz I, Beyth N, Weinberg G *et al.* (2012) In vitro biocompatibility of endodontic sealers incorporating antibacterial nanoparticles. *Journal of Nanomaterials*, **2012**, Article ID 858073 (doi:10.1155/2012/858073).
- Baer J, Maki JS (2010) In vitro evaluation of the antimicrobial effect of three endodontic sealers mixed with amoxicillin. *Journal of Endodontics* **36**, 1170–3.
- Baldi JV, Bernardes RA, Duarte MA *et al.* (2012) Variability of physicochemical properties of an epoxy resin sealer taken from different parts of the same tube. *International Endodontic Journal* **45**, 915–20.
- Beyth N, Yudovin-Farber I, Bahir R, Domb AJ, Weiss EI (2006a) Antibacterial activity of dental composites containing quaternary ammonium polyethylenimine nanoparticles against *Streptococcus mutans*. *Biomaterials* **27**, 3995–4002.
- Beyth N, Domb AJ, Farber I, Davidi MP, Weiss EI (2006b) Antimicrobial nanoparticulate additives forming non-leachable sustained antimicrobial polymeric compositions. Patent no. WO2006070376 A1 and US 8535645 B2.
- Beyth N, Yudovin-Farber I, Perez-Davidi M, Domb AJ, Weiss EI (2010a) Polyethylenimine nanoparticles incorporated into resin composite cause cell death and trigger biofilm stress in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**, 22038–43.
- Beyth N, Yudovin-Farber I, Domb AJ, Weiss EI (2010b) Long-term antibacterial surface properties of composite resin incorporating polyethylenimine nanoparticles. *Quintessence International* **41**, 827–35.
- Cobankara FK, Altinoz HC, Ergani O, Kav K, Belli S (2004) In vitro antibacterial activities of root-canal sealers by using two different methods. *Journal of Endodontics* **30**, 57–60.
- Gomes BP, Pedrosa JA, Jacinto RC *et al.* (2004) In vitro evaluation of the antimicrobial activity of five root canal sealers. *Brazilian Dental Journal* **15**, 30–5.
- Haapasalo M, Shen Y (2010) Current therapeutic options for endodontic biofilms. *Endodontic Topics* **22**, 79–98.
- Hauman CH, Love RM (2003) Biocompatibility of dental materials used in contemporary endodontic therapy: a review. Part 2. Root-canal-filling materials. *International Endodontic Journal* **36**, 147–60.
- International Standard ISO 6876 (2001) Dental root canal sealing materials.
- Kayaoglu G, Erten H, Alacam T, Ørstavik D (2005) Short-term antibacterial activity of root canal sealers towards *Enterococcus faecalis*. *International Endodontic Journal* **38**, 483–8.
- Kesler-Shvero D, Abramovitz I, Zaltsman N, Perez Davidi M, Weiss EI, Beyth N (2013) Towards antibacterial endodontic sealers using quaternary ammonium nanoparticles. *International Endodontic Journal* **46**, 747–54.
- Kishen A (2010) Advanced therapeutic options for endodontic biofilms. *Endodontic Topics* **22**, 99–123.
- Kishen A, Shi Z, Shrestha A, Neoh KG (2008) An investigation on the antibacterial and antibiofilm efficacy of cationic nanoparticulates for root canal disinfection. *Journal of Endodontics* **34**, 1515–20.
- Lin J, Qiu S, Lewis K, Klivanov AM (2003) Mechanism of bactericidal and fungicidal activities of textiles covalently modified with alkylated polyethylenimine. *Biotechnology and Bioengineering* **83**, 168–72.

- Orstavik D (1981) Antibacterial properties of root canal sealers, cements and pastes. *International Endodontic Journal* **14**, 125–33.
- Pizzo G, Giammanco GM, Cumbo E, Nicolosi G, Gallina G (2006) In vitro antibacterial activity of endodontic sealers. *Journal of Dentistry* **34**, 35–40.
- Ricucci D, Siqueira JF Jr, Bate AL, Pitt Ford TR (2009) Histologic investigation of root canal-treated teeth with apical periodontitis: a retrospective study from twenty-four patients. *Journal of Endodontics* **35**, 493–502.
- 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**, 193–8.
- Seil JT, Webster TJ (2012) Antimicrobial applications of nanotechnology: methods and literature. *International Journal of Nanomedicine* **7**, 2767–81.
- Shvero DK, Davidi MP, Weiss EI, Sreer N, Beyth N (2010) Antibacterial effect of polyethyleneimine nanoparticles incorporated in provisional cements against *Streptococcus mutans*. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* **94**, 367–71.
- Siqueira JF Jr, Gonçalves RB (1996) Antibacterial activities of root canal sealers against selected anaerobic bacteria. *Journal of Endodontics* **22**, 89–90.
- Siqueira JF Jr, Rôças IN (2004) Polymerase chain reaction-based analysis of microorganisms associated with failed endodontic treatment. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontics* **97**, 85–94.
- Siqueira JF Jr, Rôças IN (2008) Clinical implications and microbiology of bacterial persistence after treatment procedures. *Journal of Endodontics* **34**, 1291–301 e3.
- Siqueira JF Jr, Favieri A, Gahyva SM, Moraes SR, Lima KC, Lopes HP (2000) Antimicrobial activity and flow rate of newer and established root canal sealers. *Journal of Endodontics* **26**, 274–7.
- Spangberg LS, Barbosa SV, Lavigne GD (1993) AH 26 releases formaldehyde. *Journal of Endodontics* **19**, 596–8.
- Stuart CH, Schwartz SA, Beeson TJ, Owatz CB (2006) *Enterococcus faecalis*: its role in root canal treatment failure and current concepts in retreatment. *Journal of Endodontics* **32**, 93–8.
- Sundqvist G, Figdor D, Persson S, Sjogren U (1998) Microbiologic analysis of teeth with failed endodontic treatment and the outcome of conservative re-treatment. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontics* **85**, 86–93.
- Versiani MA, Carvalho-Junior JR, Padilha MI, Lacey S, Pascon EA, Sousa-Neto MD (2006) A comparative study of physicochemical properties of AH Plus and Epiphany root canal sealants. *International Endodontic Journal* **39**, 464–71.
- Weiss EI, Shalhav M, Fuss Z (1996) Assessment of antibacterial activity of endodontic sealers by a direct contact test. *Endodontics & Dental Traumatology* **12**, 179–84.
- Yudovin-Farber I (2008) Bioactive polyelectrolytes (PhD Thesis) Jerusalem: Hebrew University.
- Yudovin-Farber I, Beyth N, Nyska A, Weiss EI, Golenser J, Domb AJ (2008) Surface characterization and biocompatibility of restorative resin containing nanoparticles. *Biomacromolecules* **9**, 3044–50.
- Yudovin-Farber I, Golenser J, Beyth N, Weiss EI, Domb AJ (2010) Quaternary ammonium polyethyleneimine: antibacterial activity. *Journal of Nanomaterials*, **2010**, Article ID 826343 (doi:10.1155/2010/826343).
- 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**, 1051–5.
- Zoletti GO, Pereira EM, Schuenck RP, Teixeira LM, Siqueira JF Jr, dos Santos KR (2011) Characterization of virulence factors and clonal diversity of *Enterococcus faecalis* isolates from treated dental root canals. *Research in Microbiology* **162**, 151–8.

Antibiofilm Effects of Endodontic Sealers Containing Quaternary Ammonium Polyethylenimine Nanoparticles

- Joana Barros, DMD,* Marlei G. Silva, BBS,[†] Isabela N. Rôças, PhD,[‡] Lucio S. Gonçalves, PhD,[‡]
- Flávio F. Alves, PhD,[‡] Maria A. Lopes, PhD,[‡] Irene Pina-Vaz, PhD,* and José F. Siqueira, Jr, PhD[‡]

Abstract

Introduction: This study evaluated the antibiofilm effects of 2 endodontic sealers incorporated with quaternary ammonium polyethylenimine (QPEI) nanoparticles at a 2% concentration (w/w). **Methods:** The materials tested were AH Plus and Pulp Canal Sealer EWT (PCS) in the commercial unmodified form or containing 2% QPEI. Antibiofilm assays were conducted by using direct-contact and membrane-restricted tests for evaluation of bacterial viability in biofilms grown onto membranes or paper disks and the crystal violet microtiter-plate assay to evaluate the effects of sealer extracts on the biofilm biomass. Two *Enterococcus faecalis* strains (ATCC and an endodontic isolate) were used. **Results:** Direct contact and membrane-restricted antibiofilm tests revealed that PCS 2% was the only material to promote total killing of *E. faecalis* ATCC biofilms. All the materials significantly reduced bacterial counts in *E. faecalis* ATCC biofilms when compared with the positive control in both tests ($P < .05$). In the direct test against *E. faecalis* RW35, PCS 2% was significantly more effective than the other materials and was the only one that showed significantly lower counts than the positive control ($P < .05$). In the crystal violet assay, only AH Plus 2% presented optical density readings significantly lower than the positive control of the ATCC strain ($P < .05$). No other significant effects on the biofilm biomass of the 2 *E. faecalis* strains were observed for any of the sealers tested ($P > .05$). **Conclusions:** Addition of QPEI nanoparticles improved the killing ability of PCS against biofilms of both *E. faecalis* strains and the effects of AH Plus on the biomass of biofilms from the ATCC strain. (*J Endod* 2014; ■:1–5)

Key Words

Biofilms, endodontic sealers, *Enterococcus faecalis*, nanoparticles, quaternary ammonium

Apical periodontitis has been recognized as a biofilm-induced disease (1). Although the currently available methods for chemomechanical debridement have been shown to promote significant microbial reduction in infected canals, complete eradication is still unattainable in most cases (2, 3). Studies have demonstrated that biofilms present in areas such as isthmus, lateral canals, and apical ramifications may remain untouched after root canal instrumentation and irrigation procedures (4, 5). Not surprisingly, it has been shown that treated teeth with persistent disease are commonly associated with biofilms present in these areas (6). Therefore, reduction of the critical bacterial concentration and disruption of biofilms can predictably improve the chances for a positive periradicular response to endodontic treatment.

Endodontic filling materials with antimicrobial properties have the potential to eliminate or entomb microorganisms that persisted after chemomechanical procedures. Preventing bacterial recontamination is also a goal to be reached with filling materials. Ideally, root canal sealers should exhibit antibacterial and antibiofilm effects. They should be used in a way that permits the material to reach residual bacterial biofilms in remote areas of the root canal system. Although several studies have reported the antimicrobial activity of some endodontic sealers (7–10), most investigations used either the direct contact test (DCT) or the agar diffusion test. Both methods have significant limitations. Whereas DCT evaluates the effects against planktonic bacteria, agar diffusion test requires diffusion of the test material through the culture medium and does not differentiate bactericidal from bacteriostatic effects. In the clinical condition, some factors such as tissue remnants, smear layer, and previous dressings or filling materials may prevent close contact between the sealer and residual bacteria. To simulate these conditions, some studies have proposed changes in the methods to test the antibacterial activity of the sealers, including a membrane-restricted assay in which a membrane is placed between the sealer and the biofilm (11). Although there have been many investigations on the antibiofilm effects of irrigants and medicaments, root canal sealers have not been consistently studied.

Incorporation of nanoparticles of different antimicrobial compounds has emerged as an approach to increase the antimicrobial activity of endodontic sealers (8, 10, 12, 13). It has been previously reported that incorporation of quaternary ammonium polyethylenimine (QPEI) nanoparticles into various composite resins, provisional cements, and root canal sealers promoted strong and long-lasting antibacterial properties. Besides, this increase in the antibacterial activity did not introduce significant changes on other biological, physicochemical, and mechanical properties of the materials (8, 14–16).

The purpose of the present study was to evaluate the effects of 2 endodontic sealers, unmodified or loaded with QPEI nanoparticles at 2% w/w concentration, on

From the *Department of Endodontics, Faculty of Dentistry, University of Porto, Porto, Portugal; [†]Department of Endodontics, Faculty of Dentistry, Estácio de Sá University, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil; and [‡]CEMUC, Department of Metallurgical and Materials Engineering, Faculty of Engineering, University of Porto, Porto, Portugal.

Address requests for reprints to Dr Joana Barros, Department of Endodontics, Faculty of Dental Medicine, University of Porto, Rua Dr. Manuel Pereira da Silva, 4200-393 Porto, Portugal. E-mail address: joana.barros.c@gmail.com
0099-2399/\$ - see front matter

Copyright © 2014 American Association of Endodontists.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.joen.2013.12.021>

Basic Research—Technology

biofilms formed by 2 *Enterococcus faecalis* strains. The methods used were the direct contact and membrane-restricted antibiofilm assays and the crystal violet microtiter-plate test.

Materials and Methods

Materials Tested

Two endodontic sealers were tested, AH Plus (Dentsply, DeTrey, Konstanz, Germany) and Pulp Canal Sealer EWT (PCS) (Kerr, Italia Srl, Salerno, Italy). QPEI nanoparticles were synthesized via reductive amination and incorporated into the sealers at 2% w/w by using the methodology reported before (8).

Antibiofilm Activity: Direct Contact and Membrane-restricted Experiments

E. faecalis strains ATCC 29212 and RW35 (isolated from a root canal with post-treatment apical periodontitis) were grown overnight at 37°C in trypticase soy broth (Difco, Detroit, MI). Bacterial inoculum was standardized to an optical density (OD) of 0.1 (600 nm). Biofilms were grown on filter paper disks (4 mm in diameter; Whatman GmbH, Dassel, Germany) or cellulose nitrate membrane filters (0.22- μ m pore size, 13 mm in diameter; Whatman GmbH). Disks and membranes were placed on the surface of *Mitis Salivarius* agar plates. Then, aliquots of 5 or 10 μ L of the bacterial suspension were applied to the surface of each disk or membrane, respectively, and plates were stored for 48 hours at 37°C.

For the DCT, approximately 40 μ L of each fresh sealer was placed onto the biofilms formed on paper disks. For the membrane-restricted test, a sterile filter membrane was placed over the biofilm-containing membrane before placement of the sealer. Four disks or membranes were used for each sealer. The contact time in both tests was 30 minutes at 37°C. After exposure, the bulk of sealer was wiped off from the surface of the paper disk in the DCT. In the membrane-restricted test, the filter membrane with the sealer was discarded. As positive controls, biofilm-containing disks and membranes without any contact with sealer were used; negative controls consisted of sterile disks and membranes exposed to the sealers.

Disks and membranes were transferred to vials containing 2 mL sterile phosphate-buffered saline (PBS) and slightly agitated to remove unattached cells. Then they were transferred to another flask containing 2 mL PBS and vortexed for 30 seconds, followed by ultrasonication for 5 minutes. After serial 10-fold dilutions, bacterial survival was determined by culturing 10- μ L aliquots of each dilution onto *Mitis Salivarius* agar plates. Colony-forming units were counted after incubation for 24 hours at 37°C.

Antibiofilm Activity: Crystal Violet Assay

Test samples were prepared according to International Standard Organization 10993-5:2009 (17). Briefly, 0.1 g of each sealer was immersed in 1 mL saline solution and incubated for 24 and 48 hours at 37°C in a humidified chamber. The final extracts were collected. A third experimental group consisted of a heavy suspension of each sealer prepared as follows. The sealers were mixed according to the manufacturer's instruction (2.5 g each) and left to set for 48 hours at 37°C in a humidified chamber. Afterwards, the sealer specimens were ground in a 6750 freezer mill (Spex, Metuchen, NJ) operated at the liquid nitrogen temperature, and 2 g of powder from each material powder was mixed with 20 mL saline solution.

Biofilm biomass was visualized and quantified with a modified crystal violet binding assay. The bacterial strains used were the same as those used in the antibiofilm experiment described above. Inoculum was prepared in trypticase soy broth (Difco) supplemented with 1% glucose

(Merck, Whitehouse Station, NJ) according to the 0.5 McFarland standard from an overnight culture of each bacterial strain. After agitation by vortex, 200- μ L aliquots of the bacterial suspension were distributed in wells of a 96-well microtiter plate (tissue culture-treated polystyrene, flat bottoms, model 92096 TPP; Techno Plastic Products, Trasadingen, Switzerland) and incubated for 24 hours at 37°C. The content of each well was aspirated, and the wells were rinsed 3 times with 200 μ L PBS (pH 7.2) to remove loosely attached cells. Sealer extracts or heavy suspensions were applied at 200 μ L per well for 120 minutes at 37°C. After removal of the sealer samples, each well was washed 3 times with PBS, and then adhering bacteria were stained for 20 minutes with 200 μ L 0.1% crystal violet solution at room temperature. Excess stain was rinsed off by copious washing with distilled water. Plates were overturned and air-dried, and the dye bound to the adhering cells was solubilized with 150 μ L 95% ethanol for 5 minutes. To quantify the biofilm biomass remaining after treatment, absorbance (590 nm) of the crystal violet solution was measured by using an enzyme-linked immunosorbent assay reader (Model 680; Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). For the positive control, saline was used instead of the test substance. For the negative control, sterile culture broth was used. All assays were performed with 4 repetitions on 2 separate occasions. The cutoff value for OD measurements was defined as 3 standard deviations above the mean OD of the negative control (18). Therefore, final OD values were expressed as average OD value reduced by the cutoff value.

Statistical Analysis

Data were analyzed by using the Statistical Package for the Social Sciences software, version 20.0 (SPSS, Chicago, IL). The antibiofilm effects of the test materials in all assays and against the 2 *E. faecalis* strains were compared by one-way analysis of variance and Tukey post hoc test. The statistical significance level of 5% ($P < .05$) was established for all analyses.

Results

The direct contact and membrane-restricted antibiofilm assays provide information about the effects of the materials tested on the viability of cells forming the biofilm. Biofilm formation on the filter disks and membranes was confirmed by scanning electron microscopy (data not shown). Results showed that PCS 2% was the only material to promote total killing of *E. faecalis* ATCC biofilms in both direct and membrane-restricted tests (Fig. 1). This material was significantly better than all the other materials tested and the positive control ($P < .01$). In addition, all the materials significantly reduced bacterial counts in *E. faecalis* ATCC biofilms when compared with the positive control in both tests ($P < .05$). In the DCT against *E. faecalis* RW35, PCS 2% was significantly more effective than the other materials and the only one to promote significantly lower bacterial counts than the positive control ($P < .05$). No material showed significant killing effects in the membrane-restricted assay against strain RW35 (Fig. 1).

The microtiter plate assay using crystal violet provides information on the effects of the materials on the biofilm biomass. In this experiment, AH Plus with or without QPEI showed overall the lowest OD values, but statistical analysis revealed that only AH Plus 2% showed OD readings significantly lower than the positive control of the ATCC strain ($P < .05$) (Fig. 2). No other significant effects on the biofilm biomass of the 2 *E. faecalis* strains were observed for any of the sealers tested ($P > .05$).

Discussion

The biofilm mode of growth is a microbial strategy to survive in most environments and endure adverse conditions (19). In an

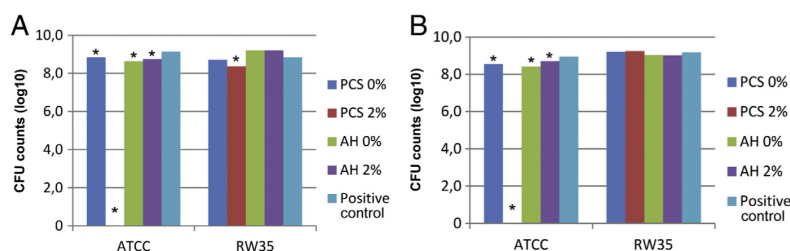


Figure 1. Effects of root canal sealers on biofilms from 2 *E. faecalis* strains. Direct contact (A) and membrane-restricted (B) antibiofilm assays. *Significantly different from the control group. CFU, colony-forming units.

attempt to improve the antibiofilm and antibacterial effects of sealers, QPEI nanoparticles were prepared and incorporated into AH Plus and PCS.

The present findings showed that PCS with QPEI nanoparticles was the only material in both direct contact and membrane-restricted antibiofilm assays to promote total bacterial killing in biofilms formed by the *E. faecalis* ATCC strain. This material was also significantly more effective than the others in the direct contact antibiofilm test against the RW35 strain. These results are in line with our previous study that used DCT for testing the effects on planktonic cells of the same strains (8). As for the effects on the biofilm biomass, only AH Plus with QPEI nanoparticles showed significantly reduced OD when compared with the other groups, but this was only observed for the ATCC strain.

E. faecalis was used in this study because it is one of the most prevalent species in root canals of teeth with post-treatment disease and may be resistant to various substances used in the root canal treatment (20–22). The 2 strains used were shown to form biofilms in all experiments. The ATCC strain is from urine origin and has been commonly used in endodontic studies, whereas the other strain is an endodontic isolate from a root canal-treated tooth with persistent disease (RW35) (23). The endodontic strain was clearly less affected by the sealers than the ATCC strain. The variations observed on the behavior of the 2 strains underline the need for using clinical strains isolated from the site of interest. Moreover, different endodontic isolates

of *E. faecalis* diverge in their abilities to form biofilms (24, 25), and this may help explain the present results.

There are many methods to investigate the antibiofilm effects of substances and materials (26), but most of them are very difficult to be adapted for the evaluation of endodontic sealers. Consequently, there are only a limited number of studies assessing the antibiofilm effects of endodontic sealers (11, 13, 27). One of these studies evaluated the activity of 7 different sealers against *E. faecalis* biofilms formed on bovine dentin (27), whereas the other 2 studies used the direct contact and membrane-restricted antibiofilm assays (11, 13). Although the former has the advantage of being closer to the clinical conditions because it has a substrate of dentin for biofilm formation, the latter methods are easier to standardize, control, and retrieve remaining cells from the experimental biofilms. In the present study, antibiofilm activity was evaluated against monospecies biofilms of *E. faecalis* strains after 48-hour incubation. Because different levels of maturation may influence the susceptibility of biofilms to antimicrobial agents (28, 29), further studies should investigate the antibiofilm activity of sealers against older biofilms.

Compounds with quaternary ammonium cationic groups have been used as antibacterial agents. Their mechanism of action is related to the ability to cause lysis of the bacterial cell wall and consequent leakage of the cytoplasmic content (14). The increased surface area and charge density of nanoparticles, when compared with their bulk counterparts, greatly increase the degree of interaction with the

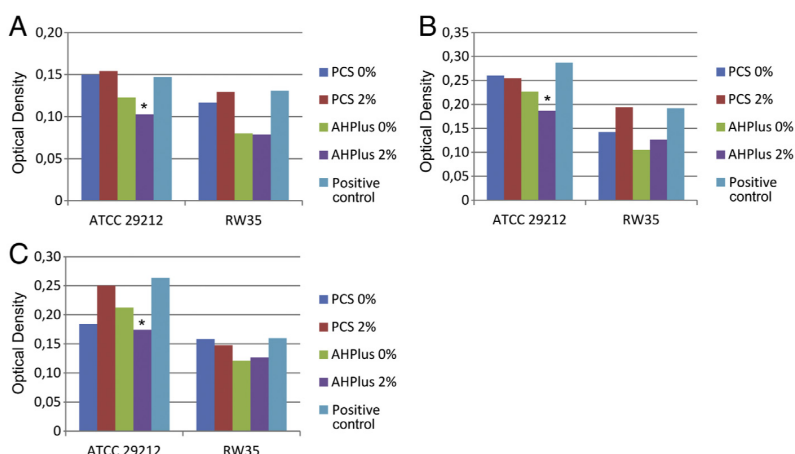


Figure 2. Effects of root canal sealers on biofilms from 2 *E. faecalis* strains. Microtiter-plate crystal violet antibiofilm assay. (A) Test using extracts from sealers prepared 24 hours before, (B) test after 48 hours of mixing, and (C) test using heavy suspension from sealers prepared 48 hours before. *Significantly different from the control group.

Basic Research—Technology

negatively charged bacterial surface (30). QPEI antimicrobial activity against several bacterial species has been reported (31, 32). Our group (8) demonstrated that incorporation of QPEI nanoparticles in PCS EWT sealer at 1% w/w and 2% w/w concentrations was significantly effective in killing planktonic cells of 3 *E. faecalis* strains 7 days after setting, without affecting the physicochemical and mechanical properties. QPEI incorporation led to alterations in zeta potential and wettability of the sealers. Nevertheless, both properties may positively influence the antibacterial performance of the materials. These findings prompted us to expand the analysis also to antibiofilm effects.

PCS is a zinc oxide-eugenol-based sealer that has been shown to exhibit antimicrobial activity, mostly related to the content of eugenol (7, 8,11). One possible reason for its improved antibacterial effects after incorporation of QPEI nanoparticles is related to the fact that quaternary ammonium cationic groups of nanoparticles become located preferentially on the surface of the PCS sealer mass. The nanoparticles of QPEI used in this study have a hydrophilic reticulated core, which is linked to a hydrophobic chain containing the cationic quaternary ammonium groups. In a previous study, it was observed that addition of nanoparticles of QPEI made PCS more hydrophilic (8). A root canal sealer with hydrophilic surface may have its contact and penetration in biofilm structures increased, which may favor bacterial elimination and matrix destruction.

AH Plus is a widely used epoxy resin-based sealer and has been shown to have antimicrobial activity, especially before setting (8, 9,11). In the present study, AH Plus with or without QPEI was effective only against biofilms from the ATCC strain. Incorporation of QPEI nanoparticles in AH Plus sealer promoted no improvement in the killing ability of the sealer against 2 *E. faecalis* strains. The reasons for this may be related to the interference of other components of the sealer, for instance, affecting charge availability.

The other experimental approach used in this study was the crystal violet microtiter-plate assay, which has been widely used to investigate the effects on the biofilm biomass (33–35). This method was adapted for root canal sealers by using a saturated solution or a heavy suspension of each material. Despite the high reproducibility and rapid quantification of biofilm reduction, this semiquantitative method stains both viable and dead cells as well as the biofilm matrix. Consequently, it cannot be used specifically to evaluate bacterial viability (26, 36). A poor result in this colorimetric assay does not mean that the test substance did not kill the bacteria in biofilms. This helps explain the absence of significant effects of PCS 2%, which had the best performance in the bacterial killing tests. The results for AH Plus 2% on the ATCC strain biofilm suggest that components from the sealer may cause some degradation of the biofilm matrix produced by this strain.

In conclusion, addition of QPEI nanoparticles improved the killing ability of PCS against both *E. faecalis* strains and the effects of AH Plus on the biomass of biofilms from the ATCC strain. If having antibiofilm effects is considered relevant for endodontic sealers, improvements in this ability are required and should be a target for future research efforts.

Acknowledgments

Supported by grants from program COMPETE – Pest-C/EME/ UI0285/2011, FAPERJ, and CNPq.

The authors deny any conflicts of interest related to this study.

References

- Ricucci D, Siqueira JF Jr. Biofilms and apical periodontitis: study of prevalence and association with clinical and histopathologic findings. *J Endod* 2010;36:1277–88.
- Paiva SS, Siqueira JF Jr, Rôças IN, et al. Molecular microbiological evaluation of passive ultrasonic activation as a supplementary disinfecting step: a clinical study. *J Endod* 2013;39:190–4.
- Rôças IN, Lima KC, Siqueira JF Jr. Reduction in bacterial counts in infected root canals after rotary or hand nickel-titanium instrumentation: a clinical study. *Int Endod J* 2013;46:681–7.
- 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.
- Vera J, Siqueira JF Jr, Ricucci D, et al. One- versus two-visit endodontic treatment of teeth with apical periodontitis: a histobacteriologic study. *J Endod* 2012;38: 1040–52.
- Ricucci D, Siqueira JF Jr, Bate AL, Pitt Ford TR. Histologic investigation of root canal-treated teeth with apical periodontitis: a retrospective study from twenty-four patients. *J Endod* 2009;35:493–502.
- Siqueira JF Jr, Favieri A, Gahyva SM, et al. Antimicrobial activity and flow rate of newer and established root canal sealers. *J Endod* 2000;26:274–7.
- Barros J, Silva MG, Rodrigues MA, et al. Antibacterial, physicochemical and mechanical properties of endodontic sealers containing quaternary ammonium polyethyleneimine nanoparticles. *Int Endod J* 2013 Oct 18. <http://dx.doi.org/10.1111/iej.12207>. [Epub ahead of print].
- 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.
- Shvero DK, Abramovitz I, Zaltsman N, et al. Towards antibacterial endodontic sealers using quaternary ammonium nanoparticles. *Int Endod J* 2013;46:747–54.
- Kayaoglu G, Erten H, Alacam T, Ørstavik D. Short-term antibacterial activity of root canal sealers towards *Enterococcus faecalis*. *Int Endod J* 2005;38:483–8.
- Abramovitz I, Beyth N, Weinberg G, et al. *In vitro* biocompatibility of endodontic sealers incorporating antibacterial nanoparticles. *J Nanomater* 2012. Article ID 858073 (<http://dx.doi.org/10.1155/2012/>).
- Kishen A, Shi Z, Shrestha A, Neoh KG. An investigation on the antibacterial and anti-biofilm efficacy of cationic nanoparticulates for root canal disinfection. *J Endod* 2008;34:1515–20.
- Beyth N, Yudovin-Farber I, Bahir R, et al. Antibacterial activity of dental composites containing quaternary ammonium polyethyleneimine nanoparticles against *Streptococcus mutans*. *Biomaterials* 2006;27:3995–4002.
- Shvero DK, Davidi MP, Weiss EI, et al. Antibacterial effect of polyethyleneimine nanoparticles incorporated in provisional cements against *Streptococcus mutans*. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2010;94:367–71.
- Beyth N, Yudovin-Farber I, Domb AJ, Weiss EI. Long-term antibacterial surface properties of composite resin incorporating polyethyleneimine nanoparticles. *Quintessence Int* 2010;41:827–35.
- International Organization for Standardization. *Biological Evaluation of Medical Devices: Part 5—Tests for In Vitro Cytotoxicity*. Geneva, Switzerland: ISO; 2009:10993–5.
- Stepanovic S, Vukovic D, Hola V, et al. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. *APMIS* 2007;115:891–9.
- Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev* 2002;15:167–93.
- Sundqvist G, Figdor D, Persson S, Sjogren U. Microbiologic analysis of teeth with failed endodontic treatment and the outcome of conservative re-treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1998;85:86–93.
- Sedgley C, Nagel A, Dahlen G, et al. Real-time quantitative polymerase chain reaction and culture analyses of *Enterococcus faecalis* in root canals. *J Endod* 2006;32:173–7.
- Rôças IN, Siqueira JF Jr. Characterization of microbiota of root canal-treated teeth with posttreatment disease. *J Clin Microbiol* 2012;50:1721–4.
- Zoletti GO, Siqueira JF Jr, Santos KR. Identification of *Enterococcus faecalis* in root-filled teeth with or without periradicular lesions by culture-dependent and -independent approaches. *J Endod* 2006;32:722–6.
- Duggan JM, Sedgley CM. Biofilm formation of oral and endodontic *Enterococcus faecalis*. *J Endod* 2007;33:815–8.
- Zoletti GO, Pereira EM, Schuenck RP, et al. Characterization of virulence factors and clonal diversity of *Enterococcus faecalis* isolates from treated dental root canals. *Res Microbiol* 2011;162:151–8.
- Kishen A, Haapasalo M. Biofilm models and methods of biofilm assessment. *Endod Topics* 2010;22:58–78.
- Faria-Junior NB, Tanomaru-Filho M, Berbert FL, Guerreiro-Tanomaru JM. Antibiofilm activity, pH and solubility of endodontic sealers. *Int Endod J* 2013;46:755–62.
- Shen Y, Stojicic S, Haapasalo M. Antimicrobial efficacy of chlorhexidine against bacteria in biofilms at different stages of development. *J Endod* 2011;37:657–61.
- Stojicic S, Shen Y, Haapasalo M. Effect of the source of biofilm bacteria, level of biofilm maturation, and type of disinfecting agent on the susceptibility of biofilm bacteria to antibacterial agents. *J Endod* 2013;39:473–7.

ARTICLE IN PRESS

Basic Research—Technology

30. Haapasalo M, Shen Y. Current therapeutic options for endodontic biofilms. *Endod Topics* 2010;22:79–98.
31. Lin J, Qiu S, Lewis K, Klibanov AM. Mechanism of bactericidal and fungicidal activities of textiles covalently modified with alkylated polyethylenimine. *Biotechnol Bioeng* 2003;83:168–72.
32. Yudovin-Farber I, Golenser J, Beyth N, et al. Quaternary ammonium polyethyleneimine: antibacterial activity. *J Nanomater* 2010. Article ID 826343 (<http://dx.doi.org/10.1155/2010/826343>).
33. Alves FR, Neves MA, Silva MG, et al. Antibiofilm and antibacterial activities of farnesol and xylitol as potential endodontic irrigants. *Braz Dent J* 2013;24:224–9.
34. Izano EA, Wang H, Ragunath C, et al. Detachment and killing of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* biofilms by dispersin B and SDS. *J Dent Res* 2007;86:618–22.
35. Dusané DH, Rajput JK, Kumar AR, et al. Disruption of fungal and bacterial biofilms by lauroyl glucose. *Lett Appl Microbiol* 2008;47:374–9.
36. Alves FR, Silva MG, Rôças IN, Siqueira JF Jr. Biofilm biomass disruption by natural substances with potential for endodontic use. *Braz Oral Res* 2013;27:20–5.

Abstracts

R136

S. Dias^{1*}, M. Lopes², H.S. Luis³, A. Ginjeira¹, C. Martins¹,
D. Guerreiro¹, P. Cruz¹ & R. Costa¹
Departments of ¹Endodontics, ²Biomaterials & ³BioStatistics,
University of Lisbon School of Dental Medicine, Lisbon, Portugal

Impact of polishing or not polishing the samples on dentine/sealer interface: a backscattered FEG-SEM study

Aim The purpose of this study was to investigate if the polishing procedures under field emission gun scanning electron microscopy (FEG-SEM) observation influence the dentine-sealer interface in apical, middle and coronal thirds.

Methodology The root canals of single-rooted human teeth were prepared with the Protaper technique up to F4 and filled by the continuous wave technique with gutta-percha Protaper cones and epoxy resin-based sealer- AH-Plus (Dentsply De Trey, Germany). The teeth were sectioned perpendicular to their long axis to obtain 36 dentine discs 2 mm thick. The samples were prepared for scanning electron microscopy (SEM). Eighteen discs were polished with wet silicon carbide papers of decreasing abrasiveness (up to 1200-grit) and soft tissue with increasingly fine diamond suspension to a particle size of 1 µm (Buehler, Ltd.). The other eighteen discs were not polished. Statistical analysis was performed using Mann-Whitney U-test ($P < 0.05$).

Results No statistical significance concerning the presence of gaps on dentine/sealer interface was found between polished or not polished samples ($P = 0.479$) and between apical, middle and coronal thirds ($P > 0.05$).

Conclusions Since there was no statistical significance between the groups it can be concluded that polishing the samples may be an advantage because it produces a better and cleaner image for SEM observation.

R137

J. Barros^{1*}, M.G. Silva², F.R.F. Alves³, I. Pina-Vaz¹, I.N. Rôças³ & J.F. Siqueira Jr³
¹Department of Endodontology, Faculty of Dentistry of the University of Porto, Porto, Portugal, ²Institute of Microbiology Prof. Paulo de Góes, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro & ³Department of Endodontology, Dental School, Estácio de Sá University, Rio de Janeiro, Brazil

In vitro antibacterial activity of an endodontic sealer incorporated with PEI nanoparticles

Aim To investigate the antimicrobial activity of a root canal sealer with incorporated quaternary ammonium polyethyleneimine (PEI) nanoparticles.

Methodology The antibacterial activity of Pulp Canal Sealer EWT unmodified (PCS) or containing 2% w/w of PEI-nanoparticles (PCS-2%PEI) was evaluated against *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 using the agar diffusion test (ADT), the direct contact test (DCT), and a membrane biofilm assay (MBA). For ADT, the diameters of bacterial inhibition zones were measured after 24 h of incubation at 37°C. For DCT, a bacterial suspension was exposed to the test sealers (freshly mixed or set for 7 days) for 10, 30 and 60 min. Nitrocellulose membrane filters were used to induce biofilm formation for 48 h at 37°C. With or without a membrane filter placed between the biofilm and freshly prepared sealers, the colony-forming units were counted after 30 min of exposure.

Results ADT results showed no difference in the zones of inhibition between the test sealers. In DCT, both fresh PCS and PCS-2% PEI had pronounced antibacterial activity. After 7 days of setting, both sealers had a decrease in antibacterial activity in relation to the same materials in fresh state: however, set PCS-2%PEI exhibited

significantly greater antibacterial effects within 30 and 60 min of contact when compared with set PCS ($P < 0.05$). In MBA, PCS-2% PEI had increased effectiveness against 48-h *E. faecalis* biofilms in a membrane-restricted contact test when compared to PCS.

Conclusions Addition of PEI nanoparticles has the potential to increase the antibacterial effects of sealers, especially after setting.

R138

L. Andriukaitiene^{1*}, N. Bolstad Limchaichana¹, A. Verket² & E.N. Kerosuo¹
¹Institute of Clinical Dentistry, Tromsø University, Tromsø & ²Department of Biomaterials, Institute of Clinical Dentistry, Oslo University, Oslo, Norway

Effect of smear layer on the adaptation of two sealers to root canal dentine: a micro-CT evaluation

Aim Quantitatively evaluate adaptation of two resin-based root canal sealers with gutta-percha (GP) to dentine walls with and without smear layer using non-destructive three-dimensional micro-computed tomography analysis.

Methodology Twenty maxillary central incisors were instrumented up to size 80 using 2.5% NaOCl as an irrigant. Thereafter 10 roots were irrigated with 17% EDTA for 5 min. Canals were filled with GP using a lateral condensation technique and divided into four subgroups ($N = 5$) with two sealers: AH Plus or MTA Fill Apex, both with or without using EDTA. After 1-week setting, samples were subjected to high-resolution Skyscan 1172 µ-CT system for scanning, performed by 360° rotations around the vertical axis with rotation step of 0.3°. Cross-sectional pixel size and intersection distance was 3 µm. Cross-section images were reconstructed from the projection image and then quantified using image software. The gaps along the dentine/filling material were expressed in mm³ in coronal, middle and apical part of the root. ANOVA with Bonferroni *post hoc* test was used to compare the groups.

Results With both materials, the lowest mean volume of voids were observed in the apical third, and in the presence of smear, being 0.002 ± 0.003 mm³ and 0.025 ± 0.051 mm³ for AH Plus and MTA Fill Apex, respectively. Volume of voids increased gradually from apical part to coronal in all tested groups regardless of dentin pretreatment.

Conclusions Canal filling using AHPlus sealer with smear layer left *in situ* had considerably lower mean value of voids compared to MTA Fill Apex.

R139

C.M. Diegritz*, O. Gerlitzki, C. Fotiadou & M. Folwaczny
Restorative Dentistry and Periodontology, Ludwig Maximilians University, Munich, Germany

In vitro high resolution infrared thermo-imaging analysis of four different root filling devices for warm vertical compaction

Aim To assess the temperature range of four root filling devices for warm vertical compaction at a temperature setting of 200°C.

Methodology B&L Alpha 2 (B&L Biotech; Bala Cynwyd, USA), System B (SybronEndo, USA), Elements Obturation Unit (SybronEndo, USA) as well as VDW Beefill 2 in 1 (VDW GmbH, Germany) were selected for this study. Plugger sizes 0.03, 0.04, 0.05, 0.06, 0.08, 0.10 were used and the temperature level was set at 200°C. Seven runs of 3 s activation period were analysed by the infrared temperature sensor TIM 400 (Micro Epsilon, Germany). The thermograms were recorded at a 0.01 s interval. The filling device was placed in a black box and the plugger was blackened to minimize

XIX National Congress and VI International of the Spanish Society of Conservative Dentistry

17-19, May 2012

Santiago de Compostela, Spain

Meeting Abstract

Sponsors: Sociedad Española de Odontología Conservadora (SEOC)

- Oral Presentation 31

TITLE: Antimicrobial activity of new compounds for use in endodontic materials.

AUTHORS: Barros, Joana¹; Ramalho, Patrícia²; Pina-Vaz, Cidália²; Fontes de Carvalho, Manuel¹; Pina-Vaz, Irene¹

1.-Department of Endodontics, Faculty of Dentistry University of Oporto 2.-Department of Microbiology, Faculty of Medicine University of Oporto

177

SOURCE: Med Oral Patol Oral Cir Bucal. 2012 August 1;17(Supplement2):S31.

* doi:10.4317/medoral.17643816

<http://dx.doi.org/10.4317/medoral.17643816>

ABSTRACT

Introduction: One of the main goals of endodontic treatment is to eliminate microorganisms from the root canal system. However, treatment might reduce, but not necessarily completely eliminate, root infection. During the last decades continuous efforts have been made to develop materials with antimicrobial properties to improve the outcome of endodontic treatment. Objective: The aim of this study was to determine the antimicrobial activity of polyethylenimine, chitosan and cerium nitrate against usual root canal microbial colonizers. Methods: Polyethylenimine (PEI), low molecular weight chitosan (LMWC) and cerium nitrate minimum inhibitory concentration (MIC) and minimal lethal concentration (MLC) was calculated regarding two strains of *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Candida albicans*, one clinical isolate and other belonging to American Type Culture Collection (ATCC). Results: All the tested compounds exhibited antimicrobial activity regarding all tested microorganisms. Chitosan was the less effective being more efficient for bacteria. Cerium nitrate was equally efficient for bacteria and yeasts. PEI was the most efficient compound regarding bacteria and yeast. The results obtained clearly showed the fungicide and bactericide capabilities of PEI and chitosan since MIC and MLC values were similar. Regarding cerium nitrate, MLC values were greater than MIC values indicating its bacteriostatic and fungistatic effect. Conclusions: These compounds may play a promising role regarding different biomedical applications namely regarding on endodontic materials where they can be used isolated or in combination with the commercially available materials.

KEYWORDS antimicrobial activity, polyethylenimine, low molecular weight chitosan, cerium nitrate.

52nd ICAAC, Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy

San Francisco, EUA, Sept. 2012

F-1492

Antimicrobial Activity Upon Planktonic Cells And Biofilms Of Polyethylenimine

J. Barros, MD - *PhD Student*¹, P. A. Ramalho, PhD², C. Pina-Vaz, PhD MD - *Professor*², A. G. Rodrigues, PhD MD - *Professor*², I. Pina-Vaz, PhD MD - *Researcher*²;

179

¹Faculty of Dentistry, Porto, Portugal, ²Faculty of Medicine, Porto, Portugal.

Background: The human body is colonized by a variety of bacteria and fungi, but most individuals maintain a healthy homeostasis. Since bacterial and fungal antimicrobial resistance represents an increasing problem, the development of suitable alternatives to control infections is of extreme importance. Polyethylenimine (PEI) is an antimicrobial peptide that has proved to exhibit antibacterial activity against various oral pathogens, including those that cause periodontitis, caries and endodontic infections, suggesting that they can be developed as a novel class of antibacterials. The objective of our work is to study the effect of this compound on planktonic cells and biofilms and to explain the mechanism of action. **Methods:** The antimicrobial and anti-biofilm effect of PEI was tested against *Candida albicans*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*, both ATCC and clinical strains. CLSI protocols were followed for MIC and MLC determination and the biofilm metabolic activity, assessed in polystyrene plates and in hydroxyapatite discs, was measured using a colorimetric tetrazolium reduction assay. After incubation with several concentrations of PEI, cell suspensions, were stained with the fluorescent markers propidium iodide (PI-a dead indicator) and DIBAC₄ (indicator of membrane potential) and analysed in a FACScalibur cytometer. **Results:** The MIC and MLC values obtained for PEI were similar and ranged between 0.03 and 0.4 mg/l proving the microbicidal and fungicidal activity of this compound. PEI proved to be more efficient for fungi than for bacteria. Antibiofilm activity was also proved for all the microorganisms. Flow cytometry analysis indicate severe lesion of the membrane by staining with PI and depolarization of the cells by staining with DIBAC₄ treated with MLC values of PEI. **Conclusions:** PEI may play a promising role regarding different biomedical applications. In order to increase the antimicrobial activity of endodontic materials, PEI can be used, isolated or combined with commercially available compounds. Regarding the catheter use, the impregnation of these medical devices is a possibility.