

Josiane de Almeida

**POTENCIAL DE DIFERENTES SOLUÇÕES PARA
DESAGREGAÇÃO, ELIMINAÇÃO E INIBIÇÃO DO BIOFILME**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Doutor em Odontologia, área de concentração Endodontia.

Orientador: Prof. Dr. Wilson Tadeu Felipe

Coorientador: Prof. Dr. Wim Crielaard

Florianópolis
2016

Josiane de Almeida

**POTENCIAL DE DIFERENTES SOLUÇÕES PARA
DESAGREGAÇÃO, ELIMINAÇÃO E INIBIÇÃO DO BIOFILME**

Esta Tese foi julgada adequada para obtenção do Título de “Doutor”, e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Odontologia, área de concentração Endodontia.

Florianópolis, 15 de fevereiro de 2016.

Prof.^a Izabel Cristina de Almeida, Dr.^a
Coordenadora do Curso

Banca Examinadora:

Prof. Wilson Tadeu Felipe, Dr.
Orientador
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Giulio Gavini, Dr.
Universidade de São Paulo

Prof. Fernando Branco Barletta, Dr.
Universidade Luterana do Brasil

Prof. Eduardo Antunes Bortoluzzi, Dr.
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof.^a Ana Maria Hecke Alves, Dr.^a
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof.^a Cleonice da Silveira Teixeira, Dr.^a
Universidade Federal de Santa Catarina

*Dedico, principalmente, aos meus
amados pais, e ao meu marido
Gustavo.*

AGRADECIMENTOS

*Agradeço a **Deus** pela oportunidade de viver a cada dia o milagre de uma vida tão perfeita. Por guiar meus passos, iluminar meu caminho e me proteger de todo o mal.*

*Aos meus queridos pais, **Sandra e Jorge**, pelos conselhos, pelo amor, pelo carinho, pelos abraços e beijos. Por estarem sempre torcendo pela minha felicidade. Por dedicarem tanto tempo das suas vidas para o meu bem estar. Por toda a ajuda na conquista dos meus sonhos. Pelo incentivo, pela paciência, pelas doces palavras nas horas difíceis. A vocês devo tudo o que sou.*

*Ao meu marido, **Gustavo**, por estar presente em todos os momentos. Por viver os meus sonhos e compartilhar comigo esta conquista. Pelo amor, pela paciência, pela compreensão e por tentar me ajudar nos momentos de tristeza e inquietação. Por ser um grande amigo, companheiro de viagens, de estudo, de esporte. Por alegrar minha vida nos momentos triviais do cotidiano. Por acreditar no meu potencial e me incentivar.*

*Ao meu irmão **Marcio**, meu mano! Meu grande incentivador. Agradeço por ser tua maninha, pelo carinho, amor e zelo que tens por mim. Por vibrar e se orgulhar tanto com as minhas conquistas. Por estar sempre ao meu lado.*

*Ao meu orientador, professor **Wilson Tadeu Felipe**, por ser o principal responsável pelo meu crescimento profissional. Por despertar em mim a paixão pela pesquisa e pelo ensino. Por me ensinar as coordenadas e, na hora certa, me deixar seguir o caminho com minhas próprias pernas, para que as dificuldades surgissem e me fizessem crescer ainda mais. Por todas as conversas, todos os ensinamentos. Pelo carinho e pela confiança. Por acreditar na minha capacidade e me incentivar sempre. Vou sentir saudades, professor! Levarei comigo tudo o que aprendi durante este maravilhoso período em que fui sua orientada!*

*Ao meu coorientador, professor **Wim Crielaard**, por permitir que eu desenvolvesse parte da minha pesquisa de doutorado na ACTA, em Amsterdã. Pela acolhida e pelo carinho. Por me fazer sentir parte da equipe. Meu sincero agradecimento.*

À querida amiga, professora e orientadora **Andrea de Lima Pimenta**, por me apresentar o fantástico e grandioso mundo da microbiologia. Pela paciência ao ensinar, por estar sempre presente, pela ajuda constante em todos os meus projetos, inclusive os projetos de vida. Pelo grande incentivo à realização do doutorado sanduíche. Por sempre acreditar que eu conseguiria superar os desafios. Por me fazer entender que, muitas vezes, 99% dos experimentos irão fracassar; mas se não desistirmos haverá o momento em que aquele 1% de sucesso irá acontecer. Obrigada por tudo professora.

Ao anjo **Suzette van der Waal**, pelo carinho que recebi desde o primeiro momento, antes mesmo de nos conhecermos pessoalmente. Por aceitar o meu projeto de doutorado sanduíche, por me acolher em sua casa e apresentar sua família. Por me ensinar algo novo todos os dias, por dividir suas experiências, pela ajuda nas pesquisas. Por ser um exemplo de pesquisadora, com conduta e ética exemplar. Pela disponibilidade e prontidão. Por torcer pelo meu sucesso e acreditar na minha capacidade. Pela confiança. Por ter sido minha professora e orientadora em Amsterdã. Pela sua amizade. Minha gratidão é eterna.

Ao professor **Eduardo Antunes Bortoluzzi**, pelos anos de convívio e ensinamentos. Por ser um grande amigo. Pelas longas conversas, pelas palavras de incentivo, pelo carinho. Por ser um exemplo de pesquisador, de professor, de comprometimento com tudo o que faz. Por mostrar que tudo é possível, basta ir atrás. Obrigada por ter feito parte da minha caminhada durante esses anos.

À professora **Ana Maria Hecke Alves**, pelo carinho e pelo apoio. Por incentivar a busca pelo conhecimento. Por ter sido uma grande incentivadora das minhas pesquisas. Por torcer pelo meu sucesso. Por sempre disponibilizar tempo para uma conversa profissional ou pessoal, tempo para esclarecer minhas dúvidas, para dar conselhos. Por ser um exemplo de caráter e justiça.

À professora **Mara Cristina Santos Felipe**, pelos seus ensinamentos e pela disponibilidade. Pela sua dedicação à profissão. Por demonstrar que os detalhes fazem a diferença e que a busca deve ser sempre pelo melhor que podemos fazer. Obrigada pelas queridas palavras de apoio na conquista dos meus objetivos durante esta caminhada e por estar sempre torcendo por mim.

À professora **Cleonice da Silveira Teixeira**, pela vontade de ajudar, pelo carinho, pela disposição. Pelas boas conversas e risadas. Pela amizade. Por ser um exemplo da busca incansável pela perfeição. Por todos os ensinamentos e discussões sobre pesquisas. Pelo apoio, por sempre acreditar no meu potencial e torcer pelas minhas vitórias.

À professora **Maria Helena Pozzobon**, pelo seu carinho, pelas suas doces palavras em todos os momentos. Pelo incentivo e pelo apoio nesse meu início de carreira. Pelos bons momentos durante os anos de convívio.

Ao técnico de laboratório da ACTA **Michel Hoogenkamp**, por ser mais do que um supervisor das minhas atividades de laboratório, mas um ótimo orientador, pesquisador e, acima de tudo, um grande amigo. Obrigada pelo carinho com que você me recebeu em seu laboratório. Pela paciência ao me ensinar os diversos protocolos de microbiologia, pelas conversas de todas as manhãs. Pelo incentivo constante quando os resultados dos experimentos não saíam como esperado e o baixo astral e a angústia vinham à tona. Pela ajuda nos diversos testes e por sempre buscar uma alternativa para os problemas. Pela confiança no meu trabalho. Pela ajuda nas questões pessoais relativas à minha estada em Amsterdã. Pelas traduções do holandês. Pela torcida pelo meu sucesso. E, com certeza, pelas boas risadas e pelas boas cervejas.

Aos professores externos à UFSC, **Giulio Gavini** (USP) e **Fernando Branco Barletta** (ULBRA), por gentilmente aceitarem o convite para compor a banca da minha defesa de doutorado. Por disponibilizarem tempo para contribuir e enriquecer este trabalho. Obrigada pela atenção, pela disponibilidade e pelo carinho.

À querida **Bruna Casagrande Cechella**, por ter se tornado uma amiga muito especial e por quem tenho um carinho enorme. Obrigada pelas longas conversas, pelas diversas pesquisas que realizamos juntas, pelo crescimento que você me proporcionou. Pelo seu carisma, pelas risadas, pelas viagens. Por sempre me apoiar e torcer pela minha felicidade. Por ter participado de momentos importantes da minha vida.

Aos amigos **Anarela** e **Osni Vassen**, pela dedicação, atenção e carinho com minha Doda durante o tempo em que estive fora do Brasil. Pela amizade, prontidão e disponibilidade. Por estarem presentes em

um momento importante da minha vida. Vocês são pessoas especiais. Sou extremamente grata pela ajuda que recebi.

*Às colegas de mestrado e doutorado **Maybell Tedesco, Cláudia Bosio, Luciane Geanini e Gabriela Felipe**, pelos anos compartilhados e pela troca de experiências. Por todos os momentos de aprendizado, dúvidas, aulas, conversas, diversão, congressos, festas. Por estarem sempre ao meu lado. Obrigada pela amizade de vocês e espero tê-las sempre por perto. Sentirei saudades de todos os momentos que compartilhamos.*

*Aos colegas de pós-graduação em Endodontia, **Cláudia Bosio, Débora Delai, Larissa Fernanda, Daniela Vieira, Morgane Kuntze, Iane Nery, Gabriela Rover, Tamer Schmidt e Nayra Bittencourt**, e às alunas de graduação **Gabriela Santos, Morgana Orsi e Roberta Macarini**, pela oportunidade de conviver com vocês durante algum momento do curso, pelo aprendizado que vocês me proporcionaram e pela amizade.*

*Ao amigo e colega de profissão **Marcio Cercato**, por todo o seu carinho e pela ajuda. Por confiar em mim e no meu trabalho. Por abrir as portas do seu consultório e sempre me querer por perto. Pela amizade especial. Por todas as conversas, pelo apoio e incentivo ao meu desenvolvimento profissional e pessoal. Pelas vezes em que cedeu seu consultório para a realização de algum procedimento que necessitei para as pesquisas. Por acreditar na minha capacidade. Meu sincero agradecimento.*

*Aos funcionários **Sérgio, Jack e Marly**, por estarem sempre presentes durante esses anos. Pelas boas conversas e cafés nos intervalos de estudo, pelos momentos de descontração. **Sérgio**, obrigada pelo carinho especial que sempre recebi de você e por ser uma pessoa tão agradável. Pela ajuda com os meus experimentos. Sentirei muita saudade de chegar ao laboratório e encontrar você mexendo nas plantas, debochando das minhas risadas, assobiando, alegrando o ambiente. **Jack**, obrigada pela ajuda, pelas dicas e por estar sempre disponível. Pelo sorriso dócil e pela expressão tranquila que me acalmavam em vários momentos de estresse. **Marly**, obrigada pela paciência e pela disponibilidade para ensinar diversos procedimentos de laboratório.*

*À **Universidade Federal de Santa Catarina**, por ter me acolhido durante o curso de mestrado e doutorado e por ter propiciado o meu crescimento profissional.*

*À **ACTA** (Academic Centre for Dentistry Amsterdam), por aceitar minha proposta de pesquisa de doutorado e por ceder gentilmente a estrutura e os materiais necessários para a realização da mesma.*

*À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES** – pelo apoio financeiro durante o curso de mestrado e doutorado, e pela oportunidade de realização do doutorado sanduíche fora do Brasil, possibilitando a concretização da maior experiência acadêmica que tive até o momento.*

*Aos **técnicos, funcionários e professores da UFSC e da ACTA**, que diretamente ou indiretamente fizeram parte da minha caminhada, pelo suporte e pela ajuda.*

*Ao **Programa de Pós-Graduação em Odontologia (PPGO) UFSC**, por possibilitar o meu crescimento acadêmico e pelo incentivo ao meu desenvolvimento profissional.*

*À **secretária do PPGO, Ana Maria**, pela disponibilidade em todos os momentos, pela atenção e pelo carinho. Pela ajuda nas questões burocráticas durante o curso. Por estar sempre presente e com um agradável sorriso no rosto.*

*Ao pesquisador **Ulisses Pereira** da Universidade Federal de Viçosa, por gentilmente ceder as lactamas utilizadas em uma das pesquisas desta tese.*

*Aos amigos de Amsterdã **Pedro Vono, Bob e Tamara, Mercedes, Justin e Camilla**, pela amizade sincera e por me acolherem de maneira tão especial. Por serem minha família em Amsterdã. Pelos encontros, pelos momentos de descontração, pelas conversas e risadas. Por abrirem as portas de suas casas. Sem vocês meus dias em Amsterdã não teriam sido tão bons. Espero que a nossa amizade seja para sempre. Minha sincera gratidão por todo o carinho que recebi.*

Obrigada a todos aqueles que participaram de forma direta ou indireta na realizaçãõ deste trabalho.

“Não existe um caminho para a felicidade. A felicidade é o caminho”.

(Mahatma Gandhi)

RESUMO

Os microrganismos provenientes da cavidade oral que invadem o sistema de canais radiculares são capazes de se aderir às paredes dentinárias e formar biofilmes, provocando uma resposta inflamatória nos tecidos perirradiculares. Visto que existe uma relação causal entre a infecção do sistema de canais radiculares e a periodontite apical, o controle da infecção é um dos principais objetivos do tratamento endodôntico. Devido à limitada ação de desinfecção promovida pelas diversas manobras endodônticas, novas alternativas de tratamento têm sido propostas. Esta tese de doutorado é composta por 2 estudos desenvolvidos com os objetivos de: 1) avaliar o efeito do ácido etilendiamino tetra-acético (EDTA) 17% e da Solução Salina Modificada (MSS) na desagregação e eliminação das bactérias do biofilme de *Enterococcus faecalis*; 2) avaliar os efeitos das γ -alquilideno- γ -lactamas 12e, 13e e 13f na inibição da formação de um biofilme multiespécies de *Streptococcus mutans*, *E. faecalis* e *Candida glabrata*. No estudo 1, biofilmes de *E. faecalis* de 48 h foram desenvolvidos em discos de vidro e tratados por 1 h por meio da imersão em EDTA 17% ou MSS. Após os tratamentos, a viabilidade das células bacterianas remanescentes no substrato e das células desagregadas no sobrenadante foi avaliada por meio do método de contagem de unidades formadoras de colônias (UFC). Além disso, também foi realizado o tratamento com propídio monoazida (PMA) juntamente com o teste de reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR) para a detecção da presença do gene RNAr 16S do *E. faecalis*. No estudo 2, biofilmes multiespécies foram estabelecidos em um modelo de adesão ativo. Discos de vidro foram condicionados com as lactamas 12e, 13e e 13f ou DMSO 3,5% (controle) por 1 h, inoculados com as culturas microbianas, e incubados por 48 h. Após, testes foram realizados a fim de avaliar os efeitos das lactamas na inibição da formação do biofilme. Foram avaliados a biomassa do biofilme por meio do ensaio com cristal violeta; o número de células viáveis e totais aderidas ao substrato, por meio do método de contagem de UFCs e qPCR, respectivamente; a quantidade de proteínas pelo método de Bradford; e a quantidade polissacarídeos insolúveis presentes na matriz extracelular. Os dados paramétricos obtidos com os diferentes experimentos foram analisados pelos testes One-way ANOVA e *post hoc* Tukey. Quando a normalidade dos resíduos dos dados foi violada, os testes Kruskal-Wallis e *post hoc* Dunn foram empregados. O teste de correlação R de Pearson analisou o grau de correlação entre UFC e PMA. O nível de significância foi

estabelecido em 5%. Com base nos resultados obtidos nos dois estudos foi possível concluir que: 1) O EDTA e a MSS foram efetivos para promover a desagregação das bactérias do biofilme de *E. faecalis*. A MSS demonstrou excelente atividade antimicrobiana, enquanto o EDTA apresentou baixa efetividade antimicrobiana contra o biofilme de *E. faecalis*; Correlação positiva foi observada entre os resultados de UFC e PMA; 2) As γ -alquilideno- γ -lactamas 12e, 13e e 13f diminuíram a produção de polissacarídeos e proteínas da matriz extracelular do biofilme multiespécies de *S. mutans*, *E. faecalis* e *C. glabrata*.

Palavras-chave: Desinfecção. Solução Salina Modificada. γ -alquilideno- γ -lactamas.

ABSTRACT

Microorganisms from the oral cavity that invade the root canal system are able to adhere to dentine walls and give rise to biofilms, resulting in inflammatory response of the periradicular tissues. Because there is a causal relationship between infection of the root canal system and apical periodontitis, infection control is one of the main objectives of the endodontic treatment. Due to the limited disinfection action promoted by several endodontic procedures, new alternatives of treatment have been proposed. This PhD thesis is composed of 2 studies with the following aims: 1) to evaluate the effect of 17% ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) and Modified Salt Solution (MSS) to detach and kill bacteria from *Enterococcus faecalis* biofilm; 2) to evaluate the effects of γ -alkylidene- γ -lactams 12e, 13e e 13f on inhibition of *Streptococcus mutans*, *E. faecalis* and *Candida glabrata* multispecies biofilm. In the first study, 48-h-old *E. faecalis* biofilms were grown on glass cover slips and then treated for 1 h by immersion in 17% EDTA or MSS. After treatments, the viability of the remaining bacterial cells attached to the substrate and detached cells in the supernatant was assessed by colony forming units (CFU) counting method. In addition, it was also performed treatment with propidium monoazide (PMA) in conjunction with quantitative polymerase chain reaction (qPCR) to detect the presence of 16S rRNA from *E. faecalis*. In the second study, multispecies biofilms were grown in an active attachment model. Glass cover slips were conditioned with lactams 12e, 13e e 13f or 3.5% DMSO (control) for 1 h, inoculated with the microbial cultures, and incubated for 48 h. Then, tests were performed to evaluate the effects of lactams on inhibition of biofilm formation. It was assessed the biofilm biomass using crystal violet; the number of viable and total cells attached to the substrate using CFU counting method and qPCR, respectively; the amount of proteins using Bradford assay; and the quantity of insoluble polysaccharides in the extracellular matrix. The parametric data from different experiments were analyzed using One-way ANOVA and *post hoc* Tukey tests. When the assumption of normality was violated the Kruskal-Wallis and *post hoc* Dunn tests were used. The correlation Pearson's R test analyzed the correlation between CFU and PMA. A significance level of 5% was established. Based on results from both studies it was possible to conclude that 1) EDTA and MSS were effective to promote detachment of bacteria from *E. faecalis* biofilm. MSS showed excellent antimicrobial activity, while EDTA showed low antimicrobial

effectiveness against *E. faecalis* biofilm; 2) γ -alkylidene- γ -lactams 12e, 13e e 13f decreased polysaccharides and proteins production from the extracellular matrix of *S. mutans*, *E. faecalis* and *C. glabrata* multispecies biofilm.

Keywords: Disinfection. Modified Salt Solution. γ -alkylidene- γ -lactams.

LISTA DE FIGURAS

ARTIGO 1

Figura 1. Fotografia da tampa customizada em aço inoxidável do modelo de adesão ativo de Amsterdã (<i>AAA-model</i>), contendo os 24 grampos que sustentam os discos de vidro.....	43
Figura 2. Fotografia da tampa do <i>AAA-model</i> , mostrando os grampos e os discos de vidro que serviram de substrato para o crescimento do biofilme.	43
Figura 3. Fotografia dos discos de vidro recobertos pelos biofilmes de 48 h de <i>E. faecalis</i>	44
Figura 4. Fotografia da placa de cultura de 24 poços mostrando alguns poços contendo os tratamentos e as células bacterianas desagregadas..	45
Figura 5. Resultados do teste de UFC..	47
Figura 6. Resultados do DNA total..	48
Figura 7. Resultados do DNA viável após o tratamento com PMA.....	49

ARTIGO 2

Figura 1. Fotografia da tampa do <i>AAA-model</i> posicionada sobre a placa de cultura de 24 poços contendo o meio de cultura para o pré-condicionamento da superfície dos discos de vidro.	63
Figura 2. Fotografia da tampa do <i>AAA-model</i> mostrando os discos de vidros cobertos pelo biofilme multiespécies de 48 h de <i>S. mutans</i> , <i>E. faecalis</i> e <i>C. glabrata</i>	63
Figura 3. Fotografia dos discos de vidro com os biofilmes remanescentes aderidos e corados com cristal violeta 0.01%.....	64
Figura 4. Gráfico de barras demonstrando o efeito dos diferentes componentes sobre a contagem total de células planctônicas para cada espécie microbiana..	68
Figura 5. Gráfico de barras mostrando a massa do biofilme multiespécies formada sobre os discos de vidro após o condicionamento com as lactamas 12e, 13e e 13f e coloração com cristal violeta..	69
Figura 6. Gráfico de barras indicando os valores de log UFC médios das células viáveis aderidas para cada espécie microbiana após o condicionamento com as lactamas 12e, 13e e 13f.....	70
Figura 7. Gráfico de barras mostrando o efeito das lactamas 12e, 13e e 13f sobre o total de células microbianas presentes no biofilme.	70

Figura 8. Gráfico de barras mostrando a concentração de proteína total nos biofilmes multiespécies de 48 h, após o condicionamento dos discos de vidro com as lactamas 12e, 13e e 13f.....	71
Figura 9. Gráfico de barras demonstrando os polissacarídeos insolúveis totais produzidos pelos microrganismos dos biofilmes multiespécies aderidos aos discos de vidro após o condicionamento com as lactamas 12e, 13e e 13f.....	72
Figura 10. Gráfico de barras mostrando a atividade metabólica das células no período de 4 horas após 24 h de contato com os diferentes tratamentos: lactamas 12e, 13e, 13f, DMSO 3,5%, clorexidina 0,2%, Triton 5% (controle positivo) e DMEM (controle negativo, sem tratamento).....	73

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Sequência dos <i>primers forward</i> e <i>reverse</i> , e das sondas utilizadas no teste qPCR para cada espécie microbiana.....	65
Tabela 2. Componentes e proporções utilizadas na reação em cadeia da polimerase em tempo real para cada espécie microbiana.....	66

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$\mu\text{g/mL}$ – Micrograma por mililitro
 μL – Microlitro
 $\mu\text{mol/L}$ – Micromol por litro
AAA-model – Modelo de adesão ativo de Amsterdã (do inglês *Amsterdam Active Attachment Model*)
BHI – Infusão de cérebro e coração (do inglês *Brain Heart Infusion*)
BPW – Água peptonada tamponada (do inglês *buffered peptone water*)
 Ca(OH)_2 – Hidróxido de cálcio
 Ca^{+2} – Cálcio
CFU – Colony-forming unit
CHX – Clorexidina
cm - Centímetro
 CO_2 – Dióxido de Carbono
Ct – Ciclo limiar (do inglês *threshold cycle*)
DMEM - Meio mínimo essencial de Eagle modificado por Dulbecco (do inglês *Dulbecco's modified Eagle's medium*)
DMEMs - Meio mínimo essencial de Eagle modificado por Dulbecco suplementado com 2% de antibióticos e 10% de soro fetal bovino
DMSO – Dimetilsulfóxido
DNA – Ácido desoxirribonucleico (do inglês *deoxyribonucleic acid*)
DO – Densidade óptica
EDTA – Ácido etilendiamino tetra-acético (do inglês *ethylenediamine tetraacetic acid*)
EPS – Substâncias poliméricas extracelulares (do inglês *extracellular polymeric substances*)
FBS – Soro Fetal Bovino (do inglês *Fetal Bovine Serum*)
g - Grama
h – Horas
 H_2 – Hidrogênio
 H_2SO_4 – Ácido sulfúrico
L – Litro
log - Logaritmo
mg - Miligrama
 mg/mL – Miligrama por mililitro
min - Minutos
mL - Mililitro
mm – Milímetro
mM – Milimolar
 mmol/L – Milimol por litro

MSS – Solução Salina Modificada (do inglês *Modified Salt Solution*)
N₂ – Nitrogênio
NaOCl – Hipoclorito de sódio
ng/mL – Nanograma por mililitro
nm – Nanometro
°C – Grau Celsius
PBS – Tampão fosfato-salino (do inglês *phosphate buffered saline*)
PDL – Ligamento periodontal humano
pH – Potencial hidrogeniônico
PMA – Propídio monoazida
qPCR – Reação em cadeia da polimerase em tempo real (do inglês *quantitative real-time polymerase chain reaction*)
RNAr (rRNA) – RNA ribossômico
rpm – Rotações por minuto
s - Segundos
TRIS – Tris hidroximetil aminometano
TYCBS – do inglês *Trypticase yeast cysteine sucrose bacitracin agar*
U/mL – Unidades por mililitro
UFC – Unidades formadoras de colônias
W – Watt
WST-1 – Sal de tetrazólio solúvel em água (do inglês *water-soluble tetrazolium salt*)

LISTA DE SÍMBOLOS

\emptyset	Diâmetro
γ	Gama
α	Alfa
\approx	Aproximadamente igual a

SUMÁRIO

PREFÁCIO	29
INTRODUÇÃO	31
1.1 OBJETIVOS	36
1.1.1 Objetivo Geral.....	36
1.1.2 Objetivos Específicos	36
2 ARTIGO 1	37
2.1 RESUMO.....	39
2.2 ABSTRACT	39
2.3 INTRODUÇÃO	40
2.4 MATERIAIS E MÉTODOS	41
2.4.1 Cepa Bacteriana e Condições de Crescimento	42
2.4.2 Crescimento do Biofilme	42
2.4.3 Tratamentos e Suspensões Bacterianas.....	44
2.4.4 Teste de Viabilidade.....	45
2.4.5 Tratamento com Propídio Monoazida	45
2.4.6 Extração do DNA e Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real	46
2.4.7 Análise Estatística	46
2.5 RESULTADOS	47
2.5.1 Teste de Viabilidade (UFC).....	47
2.5.2 Análise qPCR sem tratamento com PMA.....	48
2.5.3 Tratamento com PMA	48
2.6 DISCUSSÃO	49
2.7 AGRADECIMENTOS	51
2.8 REFERÊNCIAS	52
3 ARTIGO 2	57
3.1 RESUMO.....	59
3.2 ABSTRACT	59
3.3 INTRODUÇÃO	60
3.4 MATERIAL E MÉTODOS	61
3.4.1 Cepas microbianas e condições de crescimento.....	61
3.4.2 Lactamas.....	62
3.4.3 Teste de atividade antimicrobiana.....	62
3.4.4 Condicionamento com as lactamas e formação do biofilme	62
3.4.5 Biomassa do biofilme	64
3.4.6 Teste de adesão – contagem de UFC	64
3.4.7 Teste de adesão – extração de DNA e qPCR.....	65
3.4.8 Ensaio de Bradford – quantificação de proteínas	66
3.4.9 Análise de polissacarídeos insolúveis.....	66
3.4.10 Teste de citotoxicidade.....	67
3.4.11 Análise estatística	68

3.5 RESULTADOS	68
3.5.1 Teste de atividade antimicrobiana	68
3.5.2 Biomassa do biofilme	68
3.5.3 Teste de adesão – contagem de UFC	69
3.5.4 Teste de adesão – extração de DNA e qPCR	70
3.5.5 Ensaio de Bradford – quantificação de proteínas	71
3.5.6 Análise de polissacarídeos insolúveis	71
3.5.7 Teste de citotoxicidade	72
3.6 DISCUSSÃO	73
3.7 AGRADECIMENTOS	76
3.8 REFERÊNCIAS	76
4 CONCLUSÕES FINAIS.....	83
REFERÊNCIAS.....	85

PREFÁCIO

Esta tese é constituída por uma introdução geral que apresenta as características do biofilme microbiano e o seu papel nas infecções endodônticas, assim como diferentes soluções com potencial para promover a desagregação, eliminação e/ou inibição do biofilme. Na sequência, são apresentados dois artigos científicos resultantes de pesquisas desenvolvidas durante o Curso de Doutorado em Odontologia, área de concentração Endodontia, do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal de Santa Catarina.

Artigo 1: Efetividade do EDTA e da Solução Salina Modificada na desagregação e eliminação das células do biofilme de *Enterococcus faecalis*.

Artigo 2: Efeitos de três γ -alquilideno- γ -lactamas na inibição da formação de um biofilme multiespécies.

INTRODUÇÃO

Microorganismos não vivem na natureza como células individuais dispersas. Ao contrário, se aderem firmemente às superfícies, na interface sólido-líquido, a fim de formar agregados microbianos multicelulares conhecidos como biofilmes, os quais coexistem e interagem entre si (FLEMMING; WINGENDER, 2010). De maneira geral, o estabelecimento de uma comunidade de microrganismos em uma superfície segue uma série de estágios, que incluem a deposição de um filme condicionante, adesão e colonização de microrganismos planctônicos, coadesão de outros microrganismos e descolamento de microrganismos do biofilme para o ambiente circundante (SVENSATER; BERGENHOLTZ, 2004). Cada agregado microbiano desempenha um papel funcional que contribui para toda a comunidade e mantém o balanço ecológico do ecossistema (SIQUEIRA JR; RÔÇAS, 2009). Biofilmes podem formar um consórcio estável, transferir genes horizontalmente e realizar intensa comunicação intercelular (FLEMMING; WINGENDER, 2010). Quando associados em biofilme, os microrganismos possuem atividade metabólica diversificada e mais eficiente, além de serem fenotipicamente e fisiologicamente diferentes dos planctônicos (QUAH et al., 2012), como resultado da transcrição genética alterada e das interações intercelulares (de la FUENTE-NÚÑEZ et al., 2013). Destaca-se o aumento da resistência aos agentes antimicrobianos em até mil vezes (NICKEL et al., 1985; JOHNSON et al., 2002).

Biofilmes são sistemas heterogêneos (ÖZOK et al., 2012). Na maioria dos casos, os microrganismos representam menos de 10% da massa seca e são envoltos em uma matriz de substâncias poliméricas extracelulares (EPS) altamente hidratada, que pode somar mais de 90% do peso do biofilme. Esta matriz extracelular com arquitetura tridimensional preenche os espaços entre as células, mantendo-as em proximidade, permitindo intensas interações (FLEMMING; WINGENDER, 2010). A matriz de EPS consiste essencialmente de água, mas também apresenta produtos metabólicos das bactérias como proteínas, polissacarídeos, DNA extracelular e outros componentes. Polissacarídeos e proteínas são produzidos e secretados pelas células microbianas em grande quantidade para formar a matriz extracelular durante o processo de maturação (FLEMMING; WINGENDER, 2010) e conferem proteção contra as defesas do hospedeiro, agentes antimicrobianos e estresse do ambiente (FLEMMING; WINGENDER, 2010; QUAH et al., 2012). Cátions metálicos, como o cálcio (Ca^{+2}),

também estão presentes e são essenciais na manutenção da estabilidade, arquitetura, viscosidade e resistência do biofilme (KÖRSTGENS et al., 2001). Os cátions divalentes estimulam a adesão intercelular e a agregação através de interações eletrostáticas com a parede celular bacteriana (SARKISOVA et al., 2005).

Diversos sistemas na natureza fornecem condições para a formação de biofilmes microbianos, dentre eles a cavidade oral. Os microrganismos provenientes da cavidade oral que invadem o sistema de canais radiculares em decorrência de cárie, trauma, infiltração coronal, queda ou fratura de restaurações (NAIR, 2004), são capazes de se aderir às paredes dentinárias e formar biofilmes (PRAKASH; VEEREGOWDA; KRISHNAPPA, 2003; JAIN et al., 2007; VERA et al., 2012; RICUCCI; LOGHIN; SIQUEIRA JR, 2013; WANG; SHEN; HAAPASALO, 2014). No entanto, o conhecimento sobre a formação do biofilme nas infecções endodônticas ainda é escasso, uma vez que, sob uma perspectiva ecológica, o canal radicular é considerado um ambiente altamente controlado, com limitado número de nichos e com condições diferenciadas, como menor disponibilidade de oxigênio e nutrientes. Ainda assim, tais condições não impedem a formação do biofilme (GEORGE; KISHEN; SONG, 2005). Está bem documentado que a presença de biofilme no canal radicular influencia diretamente o sucesso do tratamento endodôntico (HAAPASALO et al., 2005; RICUCCI; LOGHIN; SIQUEIRA JR, 2013). O hospedeiro responde aos componentes microbianos presentes no interior do canal, ou mesmo àqueles que ultrapassam o forame apical, por meio de uma resposta inflamatória, a periodontite apical (KAKEHASHI; STANLEY, FITZGERALD, 1965; MÖLLER et al., 1981).

Assim, na endodontia contemporânea, o preparo químico-mecânico do canal radicular tem sido o procedimento mais recomendado para a remoção do biofilme (ALVES et al., 2013). Entretanto, a ação efetiva dos instrumentos e das soluções irrigadoras é comprometida pela complexidade anatômica do sistema de canais radiculares (WU et al., 2000; FAN et al., 2004), que impede o acesso e a desinfecção de determinadas regiões (NAIR et al., 2005; NAIR, 2006; RICUCCI; SIQUEIRA JR, 2010). Outro fator que dificulta a limpeza é o fato de as bactérias prevalecerem na configuração de biofilme (NAIR 1987; RICUCCI; SIQUEIRA JR, 2010). Além da dificuldade de se obter a desinfecção do canal, ainda existe o risco do mesmo ser contaminado ou recontaminado durante e/ou após o tratamento endodôntico, quando ocorre fratura dental, queda da restauração provisória ou definitiva, proporcionando a infiltração coronária (KAMPFER et al., 2007). Assim,

visto que existe uma relação causal entre a infecção do sistema de canais radiculares e a periodontite apical, a desinfecção é um dos principais objetivos do tratamento endodôntico.

Agentes empregados frequentemente para promover a limpeza dos canais radiculares, como o hipoclorito de sódio (NaOCl) de 1% a 6% (CHÁVEZ DE PAZ; BERGENHOLTZ; SVENSÄTER, 2010; WANG; SHEN; HAAPASALO, 2012) e a clorexidina (CHX) (WANG; SHEN; HAAPASALO, 2012), são desinfetantes de superfície e, portanto, falham em alcançar todas as regiões do sistema de canais radiculares.

Em suas diversas concentrações, o NaOCl tem demonstrado maior poder de eliminação do biofilme quando comparado à outras soluções irrigadoras (CASE et al., 2012). Contudo, mesmo após a realização do tratamento endodôntico convencional sob irrigação com NaOCl e aplicação de hidróxido de cálcio [Ca(OH)₂] como medicação intracanal, microrganismos e biofilmes viáveis ainda podem ser detectados na complexidade do sistema de canais radiculares (NAIR, 2006; RICUCCI; SIQUEIRA JR, 2010).

A CHX possui um espectro antimicrobiano amplo e de longa duração (GOMES et al., 2013). Apesar de ser uma alternativa ao uso do NaOCl, a CHX não é capaz de erradicar as bactérias do canal radicular, mesmo quando associada ao uso de aparelhos ultrassônicos (SHEN et al., 2010).

O Ca(OH)₂ é utilizado como medicação intracanal entre as sessões do tratamento endodôntico com o objetivo de contribuir com a desinfecção e prevenir a reinfecção provocada por biofilmes residuais. Entretanto, o Ca(OH)₂ é um agente antimicrobiano de efeito moderado e é pouco efetivo contra biofilmes (ABDULLAH et al., 2005).

Devido à limitada ação de desinfecção promovida pelas diversas manobras endodônticas, novas alternativas de tratamento têm sido propostas. Um desinfetante efetivo deveria ser capaz de penetrar nas partes mais remotas do sistema de canais radiculares e alcançar todos os microrganismos. Além disso, devido à relação íntima entre os tecidos periapicais e o espaço do canal radicular, um desinfetante não deveria ser citotóxico. Os desinfetantes empregados atualmente são seguros apenas quando utilizados no interior do canal radicular, visto que suas concentrações estão bem acima dos limites considerados seguros (BARNHART et al., 2005).

Na tecnologia alimentícia, com o intuito de preservar os alimentos frescos, os microrganismos são frequentemente submetidos a fatores que geram estresse ambiental e funcionam como barreiras ou

desafios para inibir o crescimento microbiano. Estresse ambiental pode ser definido como um fator externo que promove um efeito adverso no estado fisiológico das células microbianas, ocasionando uma redução na taxa de crescimento ou, em circunstâncias mais extremas, a morte celular (ARCHER, 1996). Exemplos de estresse ambiental incluem extremos de temperatura, pH, pressão hipo-osmótica e hiperosmótica, depleção de nutrientes, e o uso de conservantes (ARCHER, 1996). A pressão hiperosmótica pode inativar bactérias em um biofilme (van der WAAL et al., 2011), pois reduz a quantidade de água disponível para os microrganismos (GUTIERREZ; ABEE; BOOTH, 1995). Assim, tecnologias baseadas em múltiplas barreiras combinam uma série de fatores externos, os quais os microrganismos são incapazes de superar. Os microrganismos são expostos aos desafios e tentam se adaptar às alterações ambientais. No entanto, cada adaptação demanda energia. Uma vez que há mais do que um desafio para ser superado, os microrganismos tornam-se exaustos (BEALES, 2004), e são levados à morte.

Recentemente, uma solução foi desenvolvida com o intuito de promover a morte das células microbianas por meio da combinação de múltiplos estresses do ambiente. A solução salina modificada (*modified salt solution* - MSS), composta pelos sais sorbato de potássio e cloreto de sódio, é eficaz em inativar biofilmes (van der WAAL et al., 2012, 2015). Em geral, sua ação pode ser explicada pela hipertonicidade da solução, que estimula as células a armazenarem moléculas e íons com o intuito de evitar a perda de água. Tendo em vista que a membrana dos microrganismos é semipermeável, quando presentes em um ambiente com alta pressão osmótica há redução na quantidade de água no interior das células, e o subsequente acúmulo dos íons potássio e sorbato, e do ácido sórbico, resultando em estresse metabólico, inibição do crescimento e, eventualmente, na morte celular (CSONKA, 1989; GUTIERREZ; ABEE; BOOTH, 1995; WIJNKER; KOOP; LIPMAN, 2006). Quando o sistema de canais radiculares é permeado por sais, esse ambiente pode exercer um estresse hiperosmótico nos biofilmes presentes. Essa modificação no ambiente pode ter ação desinfetante.

Até o momento, a eficácia da MSS tem sido testada em modelos nos quais bactérias formaram biofilmes aderidos à superfície de um substrato. Nesses modelos, a atividade metabólica e a viabilidade dos biofilmes residuais aderidos ao substrato foram avaliadas após o tratamento do biofilme com MSS (van der WAAL et al., 2015). Portanto, permanece incerto se a redução bacteriana ocorre devido à morte das bactérias ou devido à desagregação das células do biofilme

aderido ao substrato, ou ambos.

O ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) é efetivo e amplamente utilizado na terapia endodôntica para reduzir a resistência da dentina ao corte e para a remoção dos componentes inorgânicos da lama dentinária produzida durante a instrumentação (TEIXEIRA; FELIPPE MC; FELIPPE WT, 2005). Agentes quelantes, como o EDTA, também são reconhecidos pelos seus significativos efeitos sobre o biofilme microbiano (ISSAM et al., 2008). A capacidade de desagregação do biofilme através da redução da resistência da matriz extracelular (BANIN; BRADY; GREENBERG, 2006; CAVALIERE et al., 2014) significa que o EDTA também pode ser utilizado para desagregar ou limpar os biofilmes endodônticos, por meio da quelação dos cátions divalentes necessários para a estabilização do biofilme. Sua atividade antimicrobiana parece limitada e provavelmente ocorra devido ao sequestro dos cátions envolvidos no crescimento microbiano e na estabilidade da membrana (BANIN; BRADY; GREENBERG, 2006). Entretanto, há dúvidas quanto à ação antimicrobiana, visto que poucos testes de viabilidade celular com cultura microbiana foram realizados e os dados adquiridos por meio de testes empregando corantes não são totalmente precisos (STIEFEL et al., 2015). Até o momento, na literatura endodôntica, poucos trabalhos têm sido desenvolvidos com o intuito de investigar e quantificar o efeito de desagregação/eliminação das células do biofilme promovido pelo EDTA.

Uma terapia alternativa que poderia garantir o sucesso do tratamento endodôntico seria uma abordagem preventiva com o intuito de inibir a formação do biofilme no canal radicular (JOHNSON et al., 2002; QUAH et al., 2012). Já é sabido que alguns produtos interferem diretamente na formação do biofilme, atuando em moléculas e receptores envolvidos na adesão microbiana à superfície (SPLENDIANI; LIVINGSTON; NICOLELLA, 2006; PEREIRA, 2006), em componentes dos sistemas de secreção microbiana (LEBEIS; KALMAN, 2009), no metabolismo do biofilme e nos sistemas enzimáticos microbianos (OLOFSSON; HERMANSSON, ELWING, 2003; QUAH et al., 2012). Também interferem em fatores de virulência das células e tecidos colonizados (LEBEIS; KALMAN, 2009) e em moléculas ou sistemas sinalizadores e moduladores dos microrganismos organizados em biofilme. Esses sistemas sinalizadores, também conhecidos como *quorum-sensing*, regulam, por exemplo, a produção de polissacarídeos extracelulares (NADELL et al., 2008; PAN; REN, 2009) e a própria formação do biofilme (NADELL et al., 2008). Com este propósito, moléculas bioativas são de especial interesse, uma vez que

possuem o potencial de inibir a infecção sem induzir o desenvolvimento de resistência na população microbiana alvo (PEREIRA et al., 2014a, 2014b; TA et al., 2014; YANG et al., 2014). Investigações recentes demonstraram que análogos aos rubrolídeos, componentes originários do metabolismo secundário de organismos marinhos, e suas correspondentes, as lactamas, estão entre as micromoléculas mais ativas na inibição da formação do biofilme de *Enterococcus faecalis* (PEREIRA et al., 2014a). *E. faecalis* é uma das bactérias mais difíceis de serem eliminadas e está frequentemente envolvida nos casos de infecções persistentes do canal radicular (PORTENIER; WALTIMO; HAAPASALO, 2003). Nesse contexto, a bioatividade potencial dos novos análogos aos rubrolídeos sintéticos tem sido explorada (PEREIRA et al., 2014a, 2014b).

Assim, o desenvolvimento de novos materiais, soluções ou medicações intracanal que influenciem a formação do biofilme por meio da inibição da adesão inicial dos microrganismos, da prevenção do crescimento do biofilme, do distúrbio no metabolismo do biofilme, da eliminação e/ou da desagregação das células microbianas dos biofilmes (WANG; SHEN; HAAPASALO, 2014; van der WAAL et al., 2015) poderia ser uma estratégia efetiva para controlar a infecção do sistema de canais radiculares.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

Avaliar o potencial de diferentes soluções para promover a desagregação, eliminação e inibição do biofilme.

1.1.2 Objetivos Específicos

1) Avaliar a efetividade do EDTA e da MSS na desagregação das bactérias do biofilme de *Enterococcus faecalis*.

2) Avaliar a ação antimicrobiana do EDTA e da MSS contra um biofilme de *Enterococcus faecalis*.

3) Avaliar o efeito de três γ -alquilideno- γ -lactamas na inibição da formação de um biofilme multiespécies de *Streptococcus mutans*, *Enterococcus faecalis* e *Candida glabrata*.

2 ARTIGO 1

Efetividade do EDTA e da Solução Salina Modificada na desagregação e eliminação das células do biofilme de *Enterococcus faecalis*.

Josiane de Almeida, DDS, MSc^{a,b}, Michel Hoogenkamp, Ing^a, Wilson T Felipe, DDS, MSc, PhD^b, Wim Crielaard, PhD^a, Suzette V van der Waal, DDS, PhD^{a,c}.

^a Department of Preventive Dentistry, Academic Centre for Dentistry Amsterdam (ACTA), Amsterdam, The Netherlands.

^b Department of Endodontics, Federal University of Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, SC, Brazil.

^c Department of Endodontics, Academic Centre for Dentistry Amsterdam (ACTA), Amsterdam, The Netherlands.

2.1 RESUMO

Introdução: A desagregação da matriz dos biofilmes endodônticos auxilia na sua remoção dos canais radiculares. O objetivo deste estudo foi investigar a eficácia do ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) e da Solução Salina Modificada (MSS) para desagregar bactérias do biofilme. **Métodos:** Biofilmes de *Enterococcus faecalis* de 48 h foram desenvolvidos em discos de vidro e tratados por imersão de 1 h em EDTA 17% ou MSS. O tampão fosfato-salino serviu como controle negativo. Em seguida, as células do biofilme remanescente no substrato e as células desagregadas no sobrenadante foram coletadas. A viabilidade foi verificada por meio do método de contagem de unidades formadoras de colônias (UFC). O tratamento com propídio monoazida (PMA) juntamente com qPCR foi realizado para a detecção da presença do gene RNAr 16S do *E. faecalis*. Os dados foram analisados pelos testes One-way ANOVA e Tukey ou Kruskal-Walis e Dunn. O teste R de Pearson avaliou a correlação entre os resultados de UFC e PMA ($\alpha = 5\%$). **Resultados:** A qPCR demonstrou que o EDTA desagregou 99% das células do biofilme. A MSS desagregou 94% das células do biofilme (ambos $p < 0,001$). Ao contrário do EDTA, a MSS foi altamente antimicrobiana. A MSS promoveu uma ampla redução, log 7, das células aderidas ($p < 0,001$) e quase nenhuma célula viva foi detectada no sobrenadante ($p < 0,001$). Correlações positivas entre UFC e qPCR com PMA foram observadas ($r = 0,959$ e $r = 0,729$). **Conclusões:** O EDTA desagregou as células do biofilme exercendo menor efeito antimicrobiano. Além do excelente efeito antimicrobiano, a MSS também desagregou as células do biofilme. A desagregação dos biofilmes alcançada fornece informações para novas estratégias na remoção do biofilme endodôntico.

Palavras-chave: Solução Salina Modificada, EDTA, *Enterococcus faecalis*, desinfecção, desagregação do biofilme, desprendimento do biofilme, propídio monoazida, qPCR.

2.2 ABSTRACT

Introduction: Disruption of the matrix of endodontic biofilms will aid in their removal from a root canal. Therefore, the aim of this study was to investigate the efficacy of ethylenediaminetetra-acetic acid (EDTA) and modified salt solution (MSS) to detach bacteria from biofilms. **Methods:** Forty-eight-hours-old *E. faecalis* biofilms were grown on

glass cover slips and then treated for 1 h by immersion in 17% EDTA or MSS. Phosphate buffered saline served as negative control. Then, residual biofilm cells on the substrate and the detached cells in the supernatant were collected. Viability was verified by the colony-forming-unit (CFU) counting method. Propidium monoazide (PMA) treatment in conjunction with qPCR was also performed to detect the presence of *E. faecalis* 16S-rRNA genes. Data were analyzed using One-way ANOVA and Tukey or Kruskal-Wallis and Dunn tests. Pearson's R test evaluated correlation between results from CFU and PMA ($\alpha = 5\%$). **Results:** qPCR showed that EDTA detached 99% of biofilm cells; MSS detached 94% biofilm cells (both $P < .001$). In contrast to EDTA, MSS was highly antimicrobial. The treatment promoted an ample log 7 reduction of the attached cells ($P < .001$) and almost no live cells were detected in the supernatant ($P < .001$). Positive correlations between CFU and qPCR with PMA were observed ($r = 0.959$ and $r = 0.729$). **Conclusions:** EDTA detached cells in biofilms with minor antimicrobial effect. Besides a great antimicrobial effect, MSS also detached biofilm cells. These dispersals of biofilms give insights into new endodontic biofilm-removal strategies.

Key-words: Modified Salt Solution, EDTA, *Enterococcus faecalis*, disinfection, biofilm disruption, biofilm detachment, propidium monoazide, qPCR.

2.3 INTRODUÇÃO

Soluções irrigadoras têm sido utilizadas em combinação com os instrumentos endodônticos durante o preparo dos canais radiculares com o objetivo de propiciar a cura da periodontite apical, uma resposta inflamatória induzida pela presença do biofilme (1). Embora durante o tratamento endodôntico seja possível reduzir a carga bacteriana do canal radicular, a maioria dos irrigantes falha em erradicar os microrganismos (2). Uma das razões é atribuída à reduzida susceptibilidade destes microrganismos quando organizados na forma de biofilme (3); outra razão para a inadequada desinfecção deve-se ao fato de que irrigantes como o hipoclorito de sódio ou a clorexidina são desinfetantes de superfície, os quais falham em penetrar completamente/profundamente nos biofilmes (4,5).

Em geral, biofilmes consistem de comunidades de bactérias aderidas a uma superfície e envoltas em uma substância polimérica extracelular (EPS). EPS é constituído essencialmente de água, mas

também contém proteínas, polissacarídeos, DNA extracelular e outros componentes (6). Metais policatiônicos como o cálcio (Ca^{2+}) também estão presentes e exercem um papel fundamental na manutenção da estabilidade, arquitetura e resistência do biofilme (7).

O quelante ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) tem sido empregado há muito tempo em endodontia no preparo dos canais radiculares para remover os componentes inorgânicos da lama dentinária produzida durante a instrumentação (8). Sua propriedade de dispersão do biofilme (9,10) sugere que o EDTA também é capaz de promover a desagregação ou limpeza dos biofilmes endodônticos. Sua ação antimicrobiana parece limitada, embora testes de viabilidade com cultura não sejam realizados com tanta frequência e os dados obtidos com testes empregando corantes de viabilidade não sejam tão precisos (11). Até o momento, na área endodôntica, poucos estudos têm sido realizados para investigar o efeito de EDTA para promover a limpeza/eliminação do biofilme.

Soluções salinas hipertônicas induzem a morte celular (12) e também reduzem a coesão da matriz do biofilme (13,14). A Solução Salina Modificada (MSS) é hipertônica e sua excelente eficácia na inativação dos biofilmes ocorre devido à aplicação simultânea de três tipos de estresse: o estresse hiperosmótico, o estresse do ácido fraco e do ácido sórbico (5,15). Sua eficácia tem sido testada em modelos nos quais bactérias formaram biofilmes aderidos à superfície de substratos. Nestes modelos, após o tratamento com MSS, a atividade metabólica e a viabilidade das células dos biofilmes residuais aderidos ao substrato foram avaliadas (5,15). Portanto, é desconhecido se a redução bacteriana ocorreu devido à morte das bactérias ou devido à desagregação das células dos biofilmes aderidos ao substrato, ou ambos. Após breve investigação, a MSS pareceu ser capaz de desagregar os biofilmes, o que poderia auxiliar na limpeza do sistema dos canais radiculares.

Resumidamente, o EDTA é conhecido por sua propriedade de desagregação do biofilme, enquanto a MSS é um antimicrobiano. O objetivo deste estudo foi avaliar a efetividade do EDTA e da MSS em desagregar o biofilme formado por *Enterococcus faecalis*. Além disso, a ação antimicrobiana da MSS e do EDTA sobre biofilmes foram reavaliadas.

2.4 MATERIAIS E MÉTODOS

Após os tratamentos, foi avaliada por meio do método de contagem de unidades formadoras de colônias (UFC), a viabilidade das

células bacterianas que permaneceram aderidas ao substrato, assim como as células que se desprenderam do biofilme ou do substrato no sobrenadante. Além disso, a presença do gene RNAr 16S do *E. faecalis* foi detectada nos biofilmes remanescentes e nos sobrenadantes por meio do teste de reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR). Para a distinção entre células vivas e mortas, propídio monoazida (PMA) foi utilizado para bloquear o DNA das células mortas no teste qPCR (16).

2.4.1 Cepa Bacteriana e Condições de Crescimento

Um isolado clínico de *E. faecalis* E2 (17) foi coletado do estoque a -80°C e uma cultura fresca foi obtida por meio da incubação de 500 μL deste estoque em 10 mL de meio caldo semidefinido, pH 7,1, contendo glicose 0,2%, a 37°C , em um jarra com atmosfera de 80% de N_2 , 10% de H_2 e 10% de CO_2 . A uma $\text{DO}_{600} \approx 0,9$, a suspensão continha 5×10^8 células/mL. Biofilmes cresceram em meio caldo semidefinido, pH 7,1, contendo sacarose 0,2%. A composição do meio caldo semidefinido foi previamente publicada (18).

2.4.2 Crescimento do Biofilme

Para o crescimento dos biofilmes, o modelo de adesão ativo de Amsterdã (*AAA-model*) foi utilizado (5,19) (Fig. 1), de acordo com um protocolo previamente publicado (5). Placas de cultura de 24 poços (Greiner Bio-One, Alphen aan den Rijn, The Netherlands) foram inoculadas com 1,5 mL/poço de meio de crescimento contendo aproximadamente 10^8 células/mL de *E. faecalis*. As placas foram fechadas com uma tampa customizada de aço inoxidável contendo 24 grampos. Os grampos serviram para prender os discos de vidro (12 mm diâmetro; Thermo Scientific, Braunschweig, Germany) (Fig. 2), que serviram de substrato para o crescimento do biofilme (Fig. 3). O modelo foi incubado por 48 h em condições anaeróbicas a 37°C , com renovação do meio após 8, 24, 32 e 42 horas.

Figura 1. Fotografia da tampa customizada em aço inoxidável do modelo de adesão ativo de Amsterdã (*AAA-model*), contendo os 24 grampos que sustentam os discos de vidro.

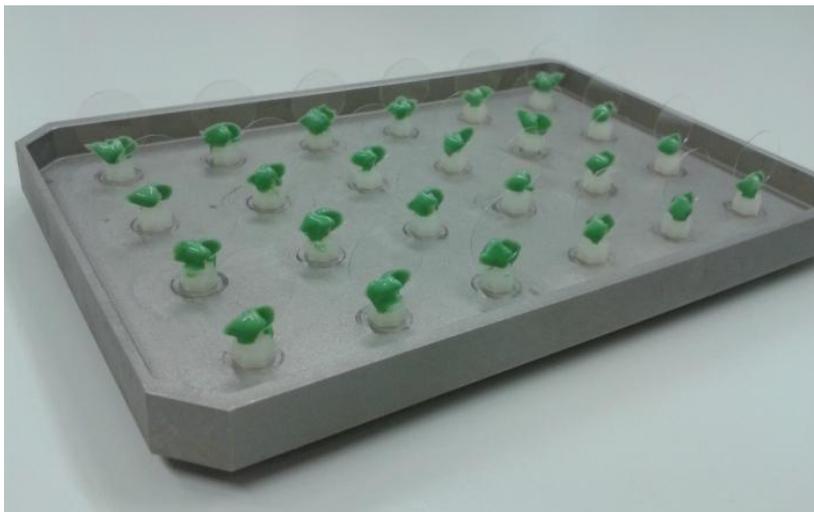


Figura 2. Fotografia da tampa do *AAA-model*, mostrando os grampos e os discos de vidro que serviram de substrato para o crescimento do biofilme.

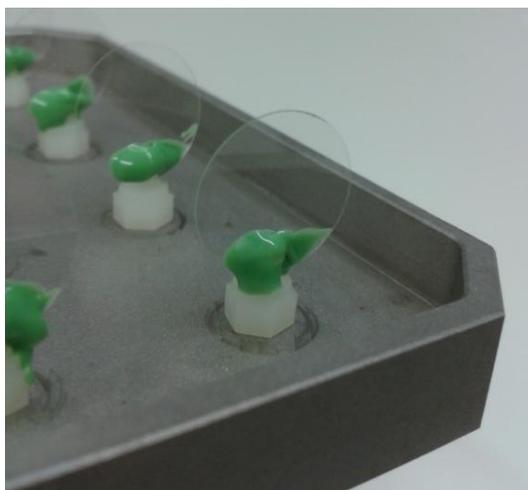
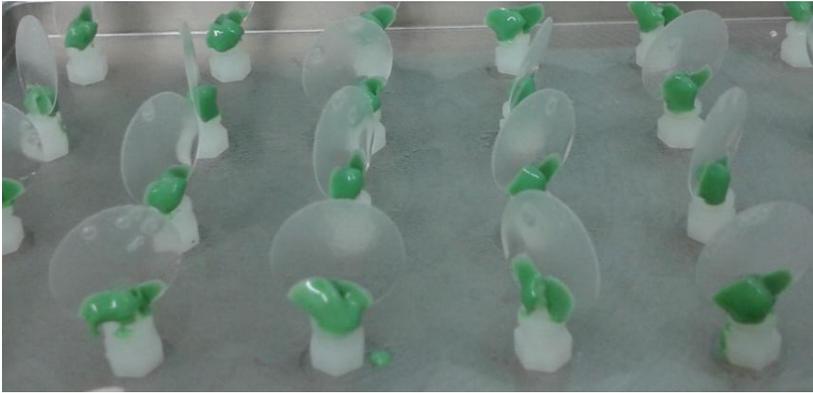


Figura 3. Fotografia dos discos de vidro recobertos pelos biofilmes de 48 h de *E. faecalis*.



2.4.3 Tratamentos e Suspensões Bacterianas

Para a remoção das células não aderentes, a tampa do modelo foi transferida para uma nova placa de 24 poços contendo 1,5 mL/poço de tampão fosfato-salino (PBS). Após, os biofilmes foram tratados durante 1 h por meio da imersão em 1,7 mL/poço de EDTA 17% (Sigma-Aldrich Corp, St. Louis, MO, USA), MSS ou PBS, sob condições anaeróbicas a 37°C. PBS serviu como controle negativo. A MSS foi preparada através da dissolução de cloreto de sódio (Sigma-Aldrich) e sorbato de potássio (Sigma-Aldrich) em água desmineralizada. Imediatamente após o período de 1 h, os tratamentos foram neutralizados por 5 min em água peptonada tamponada 2% (BPW; Oxoid, Basingstoke, United Kingdom) com tiossulfato de sódio 1% (Merck, Darmstadt, Germany). Em seguida, os biofilmes foram lavados por três vezes em PBS. Cada disco de vidro foi coletado em recipientes plásticos contendo 2 mL de PBS. Os biofilmes foram removidos dos substratos através da sonicação em gelo por 45 s a uma amplitude de 40 W (Vibra-Cell; Sonics and Materials, Newtown, CT, USA).

As células que se desagregaram após os tratamentos (Fig. 4) foram removidas por meio da coleta dos sobrenadantes dos tratamentos, do BPW e dos banhos de PBS, e obtidas por meio da centrifugação destas soluções a 4.500 rpm \times 3,395 g por 10 min. [dados não publicados, Maio 2013, Suzette V. van der Waal; adquiridos por meio de análise microscópica (Axiolab, Carl Zeiss Microscopy GmbH,

Munich, Germany; magnificação 1000 x com lentes e óleo de imersão) de uma gota da suspensão].

Figura 4. Fotografia da placa de cultura de 24 poços mostrando alguns poços contendo os tratamentos e as células bacterianas desagregadas.



2.4.4 Teste de Viabilidade

Após agitação no vórtex por 5 s, ambas as suspensões bacterianas das células que permaneceram aderidas ao substrato e das células desagregadas do biofilme foram diluídas e alíquotas de 50 μL foram semeadas em duplicata em placas de agar BHI (*Brain Heart Infusion*) (Bacto, Le Pont-de-Claix, France). As placas foram incubadas a 37°C anaerobicamente por 48 h e o número de UFCs foi contado e transformado logaritmicamente.

O experimento foi desenvolvido três vezes. Em cada repetição foram utilizados seis biofilmes por grupo.

2.4.5 Tratamento com Propídio Monoazida

Um total de 1 mg de PMA (Biotum Inc., Hayward, CA, USA) foi dissolvido em 100 μL de dimetilsulfóxido (DMSO) 20% para fazer uma solução estoque de 20 mmol/L (20). A partir das suspensões bacterianas remanescentes mencionadas acima, duas alíquotas de 500 μL foram dispensadas em tubos Eppendorf. Da solução estoque de PMA, 1,3 μL foi adicionado à amostra de 500 μL a fim de se obter uma concentração final de 50 $\mu\text{mol/L}$ de PMA. A outra amostra não recebeu PMA. Os tubos Eppendorf foram posicionados horizontalmente sobre

gelo e incubados no escuro por 5 minutos. Em seguida, os tubos foram colocados a uma distância de 25 cm de uma lâmpada alógena de 650 W e expostos à luz por 2 minutos. Após, os tubos Eppendorf com as suspensões foram armazenados a -80°C até a próxima análise.

2.4.6 Extração do DNA e Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real

As suspensões congeladas com e sem PMA foram descongeladas em temperatura ambiente. Após, 200 μL foram coletados para a extração do DNA bacteriano de acordo com as instruções do fabricante do kit de isolamento de DNA AGOWA[®] mag (AGOWA, Berlin, Germany). A presença dos genes de *E. faecalis* foi determinada utilizando pares de primers RNAr 16S específicos para *E. faecalis* (Eurogentec Nederland BV, Maastricht, The Netherlands) e previamente descritos (21). A qPCR foi realizada utilizando o aparelho LightCycler[®] 480-II Instrument (Roche Diagnostics, Hofmann La Roche Ltd, Basel, Switzerland) a 40 ciclos, 10 min a 95°C , e após, por ciclo 20 s a 95°C , 15 s a 68°C , 15 s a 72°C . Cada reação foi composta de 10 μL de SybrGreen[®] mix (Roche Diagnostics), 1 μL de cada primer (Eurogentec Nederland BV) e 5 μL de água Mili-Q (Merck).

Para a quantificação, com 100 μL de diluições seriadas decimais de uma cultura de *E. faecalis* V583 na fase exponencial média, curvas padrões foram geradas e quantificadas através do método de UFC. Para a quantificação da carga total bacteriana, uma curva padrão de *Escherichia coli* foi empregada. Água para PCR serviu como controle negativo. Seguindo cada teste qPCR, as curvas de dissociação para os produtos de amplificação de 16S DNA ribonucleico foram avaliadas para artefatos da qPCR ou produtos não específicos. O experimento foi desenvolvido duas vezes. Em cada repetição foram utilizados seis biofilmes por grupo.

2.4.7 Análise Estatística

Dados paramétricos obtidos na qPCR sem tratamento com PMA foram comparados utilizando os testes One-way ANOVA e *post-hoc* Tukey. Quando a normalidade dos resíduos foi violada, o que ocorreu nos teste de viabilidade e qPCR com tratamento de PMA, os testes Kruskal-Wallis e *post-hoc* Dunn foram empregados. O teste de correlação R de Pearson foi utilizado para avaliar a correlação entre os resultados de UFC e do tratamento com PMA. As análises foram

desenvolvidas utilizando o software SPSS versão 21.0 (SPSS Inc, Chicago, IL), e p valores < 0,05 foram considerados estatisticamente significativos.

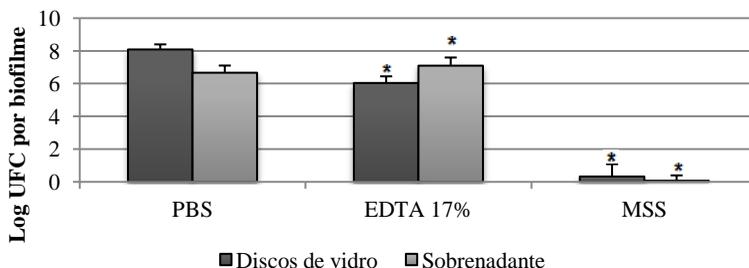
2.5 RESULTADOS

2.5.1 Teste de Viabilidade (UFC)

Os biofilmes do grupo controle aderidos à superfície do vidro continham $1,6 \times 10^8 \pm 1,6 \times 10^7$ UFCs por biofilme (Fig. 5). Comparados aos biofilmes do grupo controle, após o tratamento com EDTA, 1% das células ainda permaneceram aderidas ($p < 0,001$). No grupo da MSS, em média $21,7 \pm 68,8$ UFCs foram recuperadas (removidas) dos discos de vidro. Esta redução de 6 log foi significativa ($p < 0,001$).

Os sobrenadantes do grupo controle continham $7,7 \times 10^6 \pm 1,4 \times 10^6$ UFCs por biofilme (Fig. 5). Após o tratamento com EDTA, o número total de UFCs, ou seja, a soma de células aderidas e desagregadas foi menor do que o número de UFCs do controle; portanto, o EDTA demonstrou leve eficácia antibacteriana (12%) (Fig. 5). No sobrenadante da MSS, praticamente nenhuma célula viva foi detectada; $1,7 \pm 1,7$ UFC por biofilme ($p < 0,001$).

Figura 5. Resultados do teste de UFC. Este gráfico de colunas apresenta a distribuição das células viáveis do biofilme de *E. faecalis* após os tratamentos: ainda aderidas ao substrato (discos de vidro) ou no sobrenadante. Sobre o eixo y, UFCs por biofilme, transformadas em log (log UFC), são apresentadas. Após EDTA 17%, a maioria das células de *E. faecalis* desagregaram dos biofilmes ($p < 0,01$). Após o tratamento com MSS, a maioria das células foi eliminada. As barras de erros mostram o desvio padrão. Os asteriscos apontam diferenças significativas comparadas aos controles não tratados, com PBS.

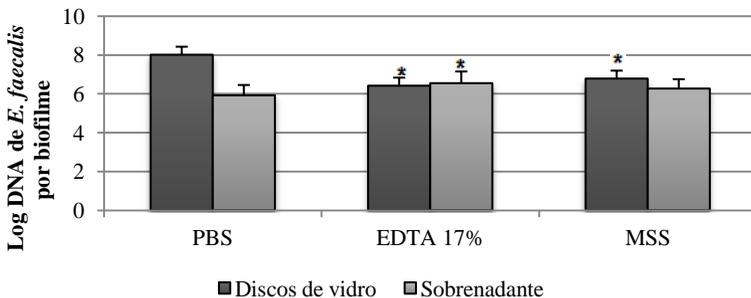


2.5.2 Análise qPCR sem tratamento com PMA

O DNA total (substrato mais sobrenadante) variou entre $1,5 \times 10^8$ para o controle, $1,1 \times 10^7$ para o EDTA e $1,2 \times 10^7$ para a MSS, indicando que os tratamentos danificaram de 7 a 8% do DNA.

A análise dos dados do substrato discos de vidro na Figura 6 demonstra que os tratamentos desagregaram células dos discos de vidro ou biofilmes. Após o tratamento com EDTA, 99% das células foram desagregadas; após MSS, 94% (ambos $p < 0,001$).

Figura 6. Resultados do DNA total. Este gráfico de barras mostra a distribuição do DNA de todas as células de *E. faecalis* após o tratamento de 1 h com EDTA 17% ou MSS. PBS (sem tratamento) serviu como controle negativo. Os resultados são apresentados como log DNA de *E. faecalis* no eixo y. Novamente, o maior número de células desagregadas foi encontrado no sobrenadante do EDTA ($p < 0,05$). Após o tratamento com MSS, é demonstrado que a MSS desagregou 94% das células do biofilme. As barras de erros mostram o desvio padrão. Os asteriscos apontam as diferenças significativas comparadas aos controles não tratados, com PBS.



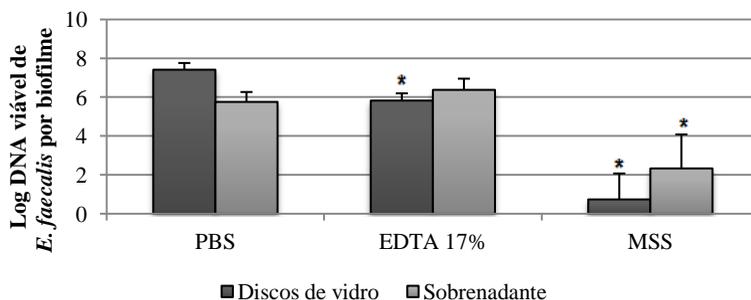
2.5.3 Tratamento com PMA

O EDTA desagregou as células vivas dos biofilmes ($p < 0,05$). A MSS reduziu o número de bactérias vivas aderidas ($p < 0,001$), assim como o número de células vivas desagregadas ($p < 0,01$) (Fig. 7). No grupo da MSS, também foi observado que havia mais células vivas no sobrenadante do que aderidas ao substrato ($p < 0,05$) (Fig. 7).

O tratamento com PMA confirmou os resultados do teste de viabilidade. Foi evidenciada uma forte correlação positiva entre o teste de UFC e o tratamento com PMA tanto para as células que

permaneceram aderidas ao biofilme ($r = 0,959$; $p < 0,001$), quanto para as células desagregadas ($r = 0,729$; $p < 0,001$).

Figura 7. Resultados do DNA viável após o tratamento com PMA. Este gráfico de barras apresenta a distribuição das células de *E. faecalis* vivas após os tratamentos dos biofilmes com EDTA 17% ou MSS. Neste teste, após o tratamento das células do biofilme com PMA, somente as células vivas foram multiplicadas pela qPCR. Os resultados são expressos como log DNA viável de *E. faecalis* (eixo y). As barras de erros mostram os desvios padrões. Os asteriscos apontam as diferenças significativas comparadas aos controles não tratados, com PBS. Estes resultados demonstram forte correlação com os achados do teste de UFC.



2.6 DISCUSSÃO

A desinfecção dos biofilmes baseia-se em duas questões: morte das bactérias do biofilme e remoção química e/ou mecânica das células vivas do biofilme. Uma vez que a limpeza mecânica total dos biofilmes presentes no sistema de canais radiculares é impossível, torna-se necessário recorrer à limpeza química e à desinfecção durante o tratamento endodôntico. No presente estudo, a capacidade de limpeza e desinfecção promovida pelo EDTA e pela MSS foi investigada em um modelo *in vitro*.

Tendo em vista que o modelo de adesão ativo foi empregado previamente para testar a eficácia da MSS (5), permaneceu a dúvida se as células do biofilme foram mortas ou desagregadas. No entanto, este mesmo AAA-model nos permitiu quantificar a possível desagregação das células por meio da análise dos sobrenadantes. Discos de vidro foram utilizados como substrato, pois a estrutura porosa dos discos de dentina

poderia prejudicar a remoção de todas as células do biofilme aderidas ao mesmo.

O presente estudo demonstrou que o EDTA desagregou a maior quantidade de células do biofilme e exerceu pequeno efeito antimicrobiano. Esta desagregação é um importante passo no procedimento de limpeza. O período de tratamento de 1 h utilizado foi escolhido para a obtenção de uma quantidade mensurável de células desagregadas, no caso de as células terem sido desagregadas dos biofilmes (9,10). Isto não significa que baseado nos resultados obtidos, a aplicação clínica do EDTA por 1 h seja recomendada (22). Na literatura, explicações para o efeito de limpeza promovido pelo EDTA podem ser encontradas. O cálcio é essencial para a coaderência das células (23) e estabilização do EPS (24). O sequestro dos íons cálcio pelo EDTA resulta no enfraquecimento da estrutura da matriz polimérica dos biofilmes e na diminuição da adesão (25), da massa (24), da viscosidade (14) e da formação do biofilme (26).

A MSS também foi capaz de desagregar células dos biofilmes, o que é uma ótima propriedade quando o objetivo é a limpeza dos espaços infectados pelo biofilme, como é o caso de um sistema de canais radiculares infectados. Uma reação de troca de íons entre Na^+ ou K^+ e Ca^{2+} explica este efeito de desagregação do biofilme (13,14). A difusão de Na^+ ou K^+ da MSS no interior da matriz do biofilme pode quebrar as pontes de Ca^{2+} (13,24). Consequentemente, a matriz do biofilme se torna enfraquecida e sua remoção é facilitada. A MSS provou novamente ser um potente desinfetante, uma vez que seu efeito sobre as células do biofilme foi predominantemente antibacteriano. Ambas as células aderidas e desagregadas foram mortas com uma redução maior que 7 log. Dados de estudos prévios foram reproduzidos (5,15). Embora biofilmes monoespécies não sejam similares aos biofilmes multiespécies em termos de susceptibilidade à desinfecção, já foi demonstrado previamente que a MSS também reduz biofilmes multiespécies (5).

Em nosso estudo, o método de contagem de UFC foi empregado para verificar a viabilidade das células aderidas e desagregadas. Especialmente em testes com biofilmes multiespécies, a análise baseada no método de cultura pode sobre-estimar a eficácia dos irrigantes, devido à presença de células metabolicamente inativas ou células não cultiváveis (27). O PMA permitiu a detecção seletiva das bactérias viáveis por meio do bloqueio da amplificação do DNA das células com membrana danificada (16,28). Neste estudo, o PMA foi usado em combinação com qPCR para determinar se esse método poderia servir como alternativa ao método de plaqueamento e cultura, o

qual é considerado laborioso e caro. O tratamento com PMA confirmou os resultados da contagem de UFC. Após o tratamento com MSS, células do sobrenadante com membranas intactas foram detectadas por meio da qPCR, porém as mesmas células foram incapazes de realizar a divisão celular e formar colônias nas placas de agar (27,29). Enquanto UFC pode sobre-estimar a eficácia dos antimicrobianos, o PMA tende a subestimar a eficácia. Entretanto, devido à alta correlação com UFC, PMA pode ser considerado um método sensível e de alto desempenho para avaliar a viabilidade celular (28) após o tratamento dos biofilmes. Uma vez que todas as doenças infecciosas orais são causadas por biofilmes multiespécies, das quais muitas espécies não podem ser cultivadas e, portanto, testes com UFC não forneceriam uma avaliação acurada das estratégias de desinfecção, qPCR em combinação com o tratamento de PMA pode ser uma boa alternativa.

Uma vez que o EDTA atua sinergeticamente com os antimicrobianos (9), em endodontia esta ação poderia contribuir e facilitar a atividade antimicrobiana do hipoclorito de sódio (NaOCl). No entanto, atenção deve ser dada quando o EDTA for misturado ao NaOCl, visto que o EDTA reduz consideravelmente o conteúdo de cloro ativo do NaOCl (30). Além disso, o EDTA pode promover a erosão da dentina peri e intertubular (22). A irrigação com MSS pode oferecer uma boa alternativa ao EDTA e NaOCl, sendo um produto único. Sua habilidade para remover a lama dentinária deve ser investigada em estudos futuros. Os interessantes resultados deste estudo conduzem à novas direções para futuras pesquisas sobre o tratamento dos biofilmes endodônticos.

Em conclusão, este estudo forneceu uma percepção para possíveis novas estratégias de desinfecção dos canais radiculares. O EDTA desagregou a maioria das células do biofilme, mas demonstrou pequeno efeito antimicrobiano. Além do excelente efeito antimicrobiano, a MSS também desagregou 94% das células do biofilme.

2.7 AGRADECIMENTOS

Josiane de Almeida recebeu assistência financeira da CAPES (Processo número 11842/13-0), a qual permitiu que a doutoranda conduzisse sua pesquisa como visitante na ACTA – Academic Centre for Dentistry Amsterdam. A autora, SVvdW é coinventora da propriedade intelectual, a qual levou ao desenvolvimento da Solução Salina Modificada (MSS) e é descrita no pedido de patente:

Composition, used e.g. as disinfectant or antimicrobial in dental treatment (e.g. root-canal treatments), comprises at least one tonicity agent (organic acids and/or their salts e.g. sodium acetate) rendering the composition hypertonic. This patent application is owned by the University of Amsterdam, The Netherlands. ACTA is a collaboration of the faculties of dentistry of University of Amsterdam and Free University Amsterdam. Patent Number(s): WO2011102724-A2; NL2004260-C; WO2011102724-A3; US2012328708-A1; EP2536378-A2; CN102985051-A.

Os autores negam qualquer conflito de interesse relacionado a este estudo.

2.8 REFERÊNCIAS

1. Ricucci D, Siqueira JF. Biofilms and apical periodontitis: study of prevalence and association with clinical and histopathologic findings. *J Endod* 2010;36:1277-88.
2. Byström A, Sundqvist G. The antibacterial action of sodium hypochlorite and EDTA in 60 cases of endodontic therapy. *Int Endod J* 1985;18:35-40.
3. Svensater G, Bergenholtz G. Biofilms in endodontic infections. *Endod Top* 2004;9:27–36.
4. Zaura-Arite E, van Marle J, ten Cate JM. Confocal microscopy study of undisturbed and chlorhexidine-treated dental biofilm. *J Dent Res* 2001;80:1436–40.
5. van der Waal SV, Scheres N, de Soet JJ, et al. Cytotoxicity, interaction with dentine and efficacy on multispecies biofilms of a modified salt solution intended for endodontic disinfection in a new in vitro biofilm model. *Int Endod J* 2015;48:153-61.
6. Flemming HC, Wingender J. The biofilm matrix. *Nat Rev Microbiol* 2010;8:623–33.
7. Körstgens V, Flemming HC, Wingender J, et al. Influence of calcium ions on the mechanical properties of a model biofilm of

- mucoïd *Pseudomonas aeruginosa*. *Water Sci Technol* 2001;43:49–57.
8. Teixeira CS, Felipe MCS, Felipe WT. The effect of application time of EDTA and NaOCl on intracanal smear layer removal: an SEM analysis. *Int Endod J* 2005;38:285–90.
 9. Banin E, Brady KM, Greenberg EP. Chelator-induced dispersal and killing of *Pseudomonas aeruginosa* cells in a biofilm. *Appl Environ Microbiol* 2006;72:2064–9.
 10. Cavaliere R, Ball JL, Turnbull L, et al. The biofilm matrix destabilizers, EDTA and DNaseI, enhance the susceptibility of nontypeable *Hemophilus influenzae* biofilms to treatment with ampicillin and ciprofloxacin. *Microbiologyopen* 2014;3:557–67.
 11. Stiefel P, Schmidt-Emrich S, Maniura-Weber K, et al. Critical aspects of using bacterial cell viability assays with the fluorophores SYTO9 and propidium iodide. *BMC Microbiol* 2015;15:36.
 12. Wijnker JJ, Koop G, Lipman LJ. Antimicrobial properties of salt (NaCl) used for the preservation of natural casings. *Food Microbiol* 2006;23:657–62.
 13. Lee S, Elimelech M. Salt cleaning of organic-fouled reverse osmosis membranes. *Water Res* 2007;41:1134–42.
 14. Chen X, Stewart PS. Role of electrostatic interactions in cohesion of bacterial biofilms. *Appl Microbiol Biotechnol* 2002;59:718–20.
 15. van der Waal SV, Jiang LM, de Soet JJ, et al. Sodium chloride and potassium sorbate: a synergistic combination against *Enterococcus faecalis* biofilms: an in vitro study. *Eur J Oral Sci* 2012;120:452–7.
 16. Exterkate RA, Zaura E, Buijs MJ, et al. The effects of propidium monoazide treatment on the measured composition of

- polymicrobial biofilms after treatment with chlorhexidine. *Caries Res* 2014;48:291–8.
17. Duggan JM, Sedgley CM. Biofilm formation of oral and endodontic *Enterococcus faecalis*. *J Endod* 2007;33:815–8.
 18. Deng DM, Hoogenkamp MA, Exterkate RA, et al. Influence of *Streptococcus mutans* on *Enterococcus faecalis* biofilm formation. *J Endod* 2009;35:1249–52.
 19. Exterkate RA, Crielaard W, ten Cate JM. Different response to amine fluoride by *Streptococcus mutans* and polymicrobial biofilms in a novel high-throughput active attachment model. *Caries Res* 2010;44:372–9.
 20. Exterkate RA, Zaura E, Brandt BW, et al. The effect of propidium monoazide treatment on the measured bacterial composition of clinical samples after the use of a mouthwash. *Clin Oral Investig* 2015;19:813–22.
 21. Sedgley CM, Nagel AC, Shelburne CE, et al. Quantitative real-time PCR detection of oral *Enterococcus faecalis* in humans. *Arch Oral Biol* 2005;50:575–83.
 22. Calt S, Serper A. Time-dependent effects of EDTA on dentin structures. *J Endod* 2002;28:17–9.
 23. Chávez de Paz LE, Bergenholtz G, Svensäter G. The Effects of antimicrobials on endodontic biofilm bacteria. *J Endod* 2010;36:70–7.
 24. Chen X, Stewart PS. Biofilm removal caused by chemical treatments. *Water Res* 2000;34:4229–33.
 25. Ramage G, Wickes BL, López-Ribot JL. Inhibition on *Candida albicans* biofilm formation using divalent cation chelators (EDTA). *Mycopathologia* 2007;164:301–6.

26. Sherertz RJ, Boger MS, Collins CA, et al. Comparative in vitro efficacies of various catheter lock solutions. *Antimicrob Agents Chemother* 2006;50:1865–8.
27. Chávez de Paz LE, Hamilton IR, Svensäter G. Oral bacteria in biofilms exhibit slow reactivation from nutrient deprivation. *Microbiology* 2008;154:1927–38.
28. Kim SY, Shin Y, Lee CY, et al. In vivo quantitative evaluation of live and dead bacteria in root canal infection by using propidium monoazide with real-time PCR. *J Endod* 2013;39:1359–63.
29. Jung IY, Choi BK, Kum KY, et al. Molecular epidemiology and association of putative pathogens in root canal infection. *J Endod* 2000;26:599–604.
30. Clarkson RM, Podlich HM, Moule AJ. Influence of ethylenediaminetetraacetic acid on the active chlorine content of sodium hypochlorite solutions when mixed in various proportions. *J Endod* 2011;37:538–43.

3 ARTIGO 2

Efeitos de 3 γ -alquilideno- γ -lactamas na inibição da formação de um biofilme multiespécies

Josiane de Almeida, DDS, MSc^{a,b}, Andrea L Pimenta, MSc, PhD^c, Ulisses A Pereira, MSc, PhD^d, Michel A Hoogenkamp, Ing^a, Suzette V van der Waal, DDS, PhD^{a,c}, Wim Crielaard, PhD^a, Wilson T Felipe, DDS, MSc, PhD^b.

^a Department of Preventive Dentistry, Academic Centre for Dentistry Amsterdam (ACTA), Amsterdam, The Netherlands.

^b Department of Endodontics, Federal University of Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, SC, Brazil.

^c Department of Endodontics, Academic Centre for Dentistry Amsterdam (ACTA), Amsterdam, The Netherlands.

^d Department of Chemistry, Federal University of Viçosa (UFV), Viçosa, MG, Brazil.

3.1 RESUMO

Este estudo avaliou os efeitos das lactamas na inibição da formação de um biofilme multiespécies de *Streptococcus mutans*, *Enterococcus faecalis* e *Candida glabrata*. Foram testadas as γ -alquilideno- γ -lactamas 12e, 13e e 13f [solubilizadas em 3,5% dimetilsulfóxido (DMSO)]. Discos de vidro foram condicionados com as lactamas ou DMSO 3,5% (controle) por 1 h, inoculados com as culturas microbianas, e incubados por 48 h. Após, foram avaliados: a biomassa do biofilme por meio do ensaio com cristal violeta; o número de células viáveis e totais aderidas ao substrato, pelo método de contagem de unidades formadoras de colônias e qPCR, respectivamente; a quantidade de proteínas, pelo método de Bradford; e a quantidade de polissacarídeos insolúveis presentes na matriz extracelular. Os dados foram analisados pelos testes One-way ANOVA e Tukey ou Kruskal Wallis e Dunn ($p < 0,05$). As lactamas reduziram a biomassa do biofilme ($p < 0,01$), mas somente a lactama 13f reduziu o número de *E. faecalis* viáveis ($p < 0,05$). A quantidade de proteínas totais e polissacarídeos extracelulares reduziram significativamente ($p < 0,05$). Os efeitos das γ -alquilideno- γ -lactamas 12e, 13e e 13f na inibição da formação de um biofilme multiespécies foram evidenciados por meio da redução da quantidade de proteínas e polissacarídeos extracelulares.

Palavras-chave: Biofilme multiespécies. Inibição do biofilme. Matriz extracelular. γ -alquilideno- γ -lactamas.

3.2 ABSTRACT

This study evaluated the effects of lactams on inhibition of *Streptococcus mutans*, *Enterococcus faecalis* e *Candida glabrata* multispecies biofilm formation. γ -alkylidene- γ -lactams 12e, 13e and 13f [solubilized in 3.5% dimethyl sulfoxide (DMSO)] were tested. Glass cover slips were conditioned with either the lactams or 3.5% DMSO (control) for 1 h, inoculated with microbial cultures, and incubated for 48 h. Then, it was assessed the biofilm biomass by crystal violet staining; the number of viable and total cells attached to the substrate was determined using colony forming units counting method and qPCR, respectively; the amount of protein was quantified using the Bradford assay; and the amount of insoluble polysaccharides of the extracellular matrix. Data were analyzed by One-way ANOVA and Tukey or Kruskal Wallis and Dunn tests ($P < 0.05$). The lactams reduced the amount of

biofilm biomass ($P < 0.01$), but only lactam 13f reduced the number of attached viable *E. faecalis* ($P < 0.05$). Both total protein content and the amount of extracellular polysaccharides decreased significantly ($P < 0.05$). The effects of γ -alkylidene- γ -lactams 12e, 13e and 13f on inhibition of multispecies biofilm formation were evident by reducing the amount of protein and extracellular polysaccharides.

Key-words: Biofilm inhibition. Extracellular matrix. Multispecies biofilm. γ -alkylidene- γ -lactams.

3.3 INTRODUÇÃO

Microrganismos da cavidade oral que infiltram durante ou após o tratamento endodôntico são capazes de recontaminar o sistema de canais radiculares (1), se aderir às paredes de dentina e dar origem a uma organização ecológica denominada biofilme (2,3), que influencia diretamente o sucesso da terapia endodôntica (4,5). A formação do biofilme inicia com a deposição de um filme condicionante, seguida pela adesão e colonização de microrganismos planctônicos, coadesão de outros microrganismos e descolamento de microrganismos do biofilme para o ambiente circundante (6). Estruturados como biofilme, os microrganismos distinguem-se das células planctônicas através da produção e secreção de uma matriz de substâncias poliméricas extracelulares (EPS) durante o processo de maturação do biofilme (7). Esta matriz, constituída essencialmente de polissacarídeos e proteínas, serve como uma barreira e confere proteção contra as defesas do hospedeiro, estresse ambiental e agentes antimicrobianos (7,8). Dessa forma, a resistência aos agentes antimicrobianos pode aumentar em até mil vezes (9,10).

Uma estratégia para prevenir ou reduzir a reinfecção do sistema de canais radiculares seria o desenvolvimento de tratamentos capazes de inibir a formação do biofilme, atuando em alguma das suas fases de formação. O condicionamento artificial de uma superfície como a dentina, por exemplo, pode interferir na afinidade e adesão dos microrganismos a esta superfície (11). Uma vez que a superfície tenha sido condicionada, suas propriedades físico-químicas tornam-se permanentemente alteradas e a formação do biofilme irá depender consideravelmente das moléculas presentes no filme condicionante (12). Estudos relatam que o pré-condicionamento da superfície com biocidas possui o potencial de prevenir a adesão bacteriana (13,14). Substâncias também podem promover um distúrbio no metabolismo do biofilme e nos sistemas enzimáticos microbianos (8,15), assim como interferir em

moléculas ou sistemas sinalizadores e moduladores das populações microbianas (*quorum-sensing*), que regulam, por exemplo, a produção de polissacarídeos extracelulares (16,17) e a própria formação do biofilme (16).

As γ -alquilideno- γ -lactamas são moléculas bioativas (18–20), frequentemente encontradas como metabólitos de fungos. Também podem ser produzidas por plantas e animais marinhos (21). Devido as suas estruturas únicas e propriedades biológicas, o estudo das lactamas tem se tornado de grande interesse. Abordagens sintéticas têm sido utilizadas para o preparo dessa classe de compostos e seus derivados (19,20). Algumas γ -alquilideno- γ -lactamas tem demonstrado capacidade de inibição da formação de biofilme de diferentes espécies bacterianas (19,20) e estão entre as micromoléculas mais ativas na inibição da formação do biofilme de *Enterococcus faecalis* (20). Neste contexto, a potencial bioatividade destas novas moléculas sintéticas tem sido explorada (19,20).

Os efeitos das lactamas sobre os microrganismos e biofilmes ainda são relativamente desconhecidos, e um melhor entendimento das respostas microbianas às lactamas poderia contribuir para o uso eficiente destes compostos como inibidores do biofilme e, conseqüentemente, no controle da infecção. Portanto, o principal objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos de três diferentes γ -alquilideno- γ -lactamas na inibição da formação de um biofilme multiespécies.

3.4 MATERIAL E MÉTODOS

3.4.1 Cepas microbianas e condições de crescimento

Enterococcus faecalis V583 e *Streptococcus mutans* UA159 cresceram a 37°C em agar sangue, em condições anaeróbias (80% N₂, 10% CO₂, e 10% H₂). *Candida glabrata* CBS 138 cresceu em meio aeróbio, a 30°C, em agar BHI (*Brain Heart Infusion*) (BD, Sparks, MD). As espécies microbianas foram transferidas das placas para o BHI caldo e incubadas individualmente overnight sob condições apropriadas. Previamente a cada teste, a Densidade Óptica (DO) de cada cultura foi calibrada em DO600 \approx 0,5. Os biofilmes cresceram em *half strength* BHI, contendo 50 mM *pipes* (tampão) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) e sacarose 0,2% (Merck, Darmstadt, Germany), pH 7,2.

3.4.2 Lactamas

As γ -alquilideno- γ -lactamas 12e, 13e e 13f foram sintetizadas no Departamento de Química da Universidade Federal de Viçosa (Viçosa, Minas Gerais, Brazil) (20) e solubilizadas a uma concentração final de 175 $\mu\text{g}/\text{mL}$ em dimetilsulfóxido 3,5% (DMSO; Sigma-Aldrich).

3.4.3 Teste de atividade antimicrobiana

Para investigar o possível efeito antimicrobiano das lactamas, um teste antimicrobiano foi realizado. Brevemente, as culturas *overnight* de cada espécie microbiana foram preparadas conforme descrito acima, e lactamas (175 $\mu\text{g}/\text{ml}$ em DMSO 3,5%) ou DMSO (3,5%) foram adicionados. Uma cultura sem adição de qualquer composto também foi preparada (controle). O conjunto foi incubado por 5 minutos. Em seguida, alíquotas de 50 μL destas misturas e do controle foram removidas, serialmente diluídas e plaqueadas em agar BHI para a determinação da quantidade de unidades formadoras de colônias (UFC)/mL. Três experimentos independentes foram realizados em triplicata.

3.4.4 Condicionamento com as lactamas e formação do biofilme

O modelo de Adesão Ativo de Amsterdã (*AAA-model*) foi empregado (22) para o crescimento dos biofilmes. Em resumo, placas de cultura de 24 poços (Greiner Bio One, Alphen aan den Rijn, The Netherlands) foram preenchidas com 1,5 mL de meio de crescimento por poço. Uma tampa customizada de aço inoxidável, prendendo 24 discos de vidro (12 mm diâmetro; Thermo Scientific, Braunschweig, Germany) foi posicionada sobre a placa, com o objetivo de pré-condicionar a superfície do vidro (Fig. 1). Após o período de 1 h a 37°C, a tampa foi transferida para outra placa de 24 poços contendo 1,5 mL/poço de cada lactama (175 $\mu\text{g}/\text{ml}$) ou DMSO 3,5%. O *AAA-model* foi mantido a 37°C por 1 h, permitindo o condicionamento dos discos de vidro com as lactamas. Após, os discos foram lavados com tampão fosfato-salino (PBS). Para iniciar o desenvolvimento dos biofilmes multiespécies, a tampa com os discos de vidro condicionados foi transferida para uma nova placa contendo 1,5 mL de meio para crescimento do biofilme, inoculado com uma cultura de *S. mutans* diluída 1:100 (DO600 \approx 0.5). O modelo foi incubado por 24 h em condições anaeróbicas a 37°C. Em seguida, a tampa foi transferida para

uma nova placa preenchida com 1,5 mL/poço de uma cultura mista (1:100, *E. faecalis* e *C. glabrata*) e incubada por 24 h em condições anaeróbicas (Fig. 2). O meio de cultura foi renovado após 8, 24 e 32 h.

Figura 1. Fotografia da tampa do *AAA-model* posicionada sobre a placa de cultura de 24 poços contendo o meio de cultura para o pré-condicionamento da superfície dos discos de vidro.



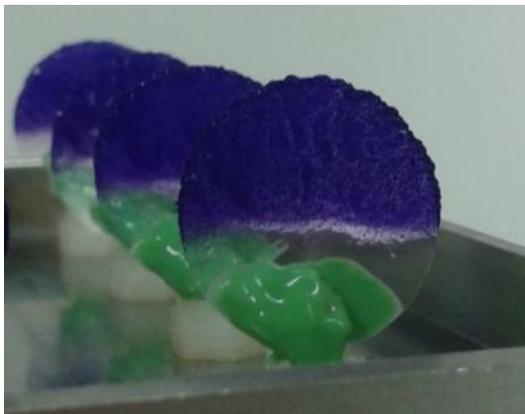
Figura 2. Fotografia da tampa do *AAA-model* mostrando os discos de vidros cobertos pelo biofilme multiespécies de 48 h de *S. mutans*, *E. faecalis* e *C. glabrata*.



3.4.5 Biomassa do biofilme

Após o período de incubação, os biofilmes formados foram lavados por três vezes em PBS e corados com cristal violeta 0,01% por 10 min (Fig. 3), lavados três vezes com PBS e solubilizados em deoxicolato de sódio 2%, de acordo com protocolo descrito previamente (23). A quantificação do biofilme foi realizada por meio da mensuração da absorvância a 608 nm. Três experimentos independentes foram realizados em triplicata.

Figura 3. Fotografia dos discos de vidro com os biofilmes remanescentes aderidos e corados com cristal violeta 0.01%.



Os experimentos seguintes foram realizados para avaliar detalhadamente características específicas do biofilme.

3.4.6 Teste de adesão – contagem de UFC

Para determinar o efeito das lactamas sobre o número de células aderidas viáveis por espécie, os discos de vidro contendo os biofilmes (formados conforme mencionado acima) foram removidos da tampa e transferidos para recipientes plásticos contendo 2 mL de PBS. Os biofilmes foram sonicados e as suspensões resultantes foram serialmente diluídas conforme descrito por Deng et al. (22). As suspensões bacterianas foram plaqueadas em 3 diferentes tipos de meio agar, específicos para cada espécie microbiana, a fim de se obter as contagens totais (UFCs). As UFCs de *S. mutans* foram determinadas usando agar

TYCSB (24), *E. faecalis* em agar Enterococcosal (BD), e agar Biggy (BD) para a quantificação de *C. glabrata*. As placas de *S. mutans* e *E. faecalis* foram incubadas em anaerobiose a 37°C, e as de *C. glabrata* em aerobiose a 30°C, por 48 h. Após, o número de UFC/mL foi determinado. O experimento foi realizado três vezes em triplicata.

3.4.7 Teste de adesão – extração de DNA e qPCR

Para determinar o efeito das lactamas sobre o número total de células aderidas por espécie microbiana, 1,5 mL de cada suspensão do biofilme (obtida conforme descrito anteriormente) foram transferidos para tubos Eppendorf e centrifugados por 10 min a 10.000 rpm. Os *pellets* formados foram imediatamente resuspendidos em um volume final de 200 µL de tampão Tris-EDTA (10 mM TRIS, 1 mM EDTA, pH 8,0) e armazenados a -80°C até a próxima análise. O DNA foi extraído de acordo com Crielaard et al. (25). A quantidade total de células microbianas aderidas por espécie foi determinada utilizando *primers* e sondas específicas (Tab. 1). A reação em cadeia da polimerase foi realizada utilizando uma mistura de componentes, conforme descrito na Tabela 2, por meio de um LightCycler® 480-II Instrument (Roche Diagnostics) a 40 ciclos, 10 min 95°C, e então por ciclo 20 s 95°C, 15 s 68°C, 15 s 72°C. Água para PCR serviu como controle negativo. Seguindo cada teste qPCR, as curvas de dissociação para os produtos de amplificação de 16S DNA ribonucleico foram avaliadas para artefatos da qPCR ou produtos não específicos.

Para a quantificação, valores de ciclo limiar (Ct) foram determinados e extrapolados contra curvas padrões geradas individualmente para cada espécie, conforme descrito em de Almeida et al. (26). O experimento foi realizado três vezes em triplicata.

Tabela 1. Sequência dos *primers forward* e *reverse*, e das sondas utilizadas no teste qPCR para cada espécie microbiana.

Espécie microbiana	Primer e sonda	Sequência
<i>S. mutans</i>	Forward	5'-GGGACGCAAGGAAACACACT-3'
	Reverse	5'-ATAGGCAGGTTACCTACGCTTACTC-3'
	Sonda	5'-6FAM-TGCTTGACACCCG+T+GTTT-BBQ-3'
<i>E. faecalis</i>	Forward	5'-CGCTTCTTTCCTCCCGAGT-3'
	Reverse	5'-GCCATGCGGCATAAACTG-3'
	Sonda	5'-CAATTGAAAAGAGGAGTGGCGGACG-3'
<i>C. glabrata</i>	Forward	5'-TTTCTCCTGCCTGCGCTTAA-3'
	Reverse	5'-ACG CAC ACT CCC AGG TCT TT-3'
	Sonda	5'-FAM-AGAACACCCACCAACCGCGCA-TAMRA-3'

Tabela 2. Componentes e proporções utilizadas na reação em cadeia da polimerase em tempo real para cada espécie microbiana.

	<i>E. faecalis</i>	<i>S. mutans</i>	<i>C. glabrata</i>
qPCR Master Mix (Roche) (µl)	10	10	10
Água Milli-Q (µl)	2.375	4.95	4.6
[<i>Forward primer</i>] (µM)	0.75	0.45	0.5
[<i>Reverse primer</i>] (µM)	0.75	0.45	0.5
[Sonda] (µM)	0.31	0.15	0.2
DNA <i>template</i> (µl)	4	4	3
Volume total (µl)	20	20	20

3.4.8 Ensaio de Bradford – quantificação de proteínas

Para quantificar o total de proteínas presente no biofilme, alíquotas de 400 µL de cada suspensão do biofilme foram processadas de acordo com Hoogenkamp et al. (27). Em resumo, amostras dos biofilmes foram diluídas três vezes em água MilliQ e *bead beated* duas vezes durante 30 s utilizando partículas de vidro ($\emptyset = 0,1$). O sobrenadante foi removido e a concentração de proteínas foi determinada de acordo com o método de Bradford. A quantificação de cada amostra foi realizada em quadruplicata.

3.4.9 Análise de polissacarídeos insolúveis

A fim de determinar a influência das lactamas na produção de substância polimérica extracelular, o conteúdo de polissacarídeos insolúveis foi determinado de acordo com Ludwig et al. (28), com pequenas modificações. Brevemente, alíquotas de 35 µL do sobrenadante preparado para o teste de proteína mencionado acima foram transferidas, em duplicata, para uma placa de PCR. Três microlitros de ácido clorídrico 37% (Sigma-Aldrich) foram adicionados em cada poço e a placa incubada sob agitação constante (800 rpm, Labocat) durante 10 min a 100°C. Após, a placa foi resfriada no gelo por 5 minutos. Em seguida, 80 µL de Antrona 0,1% em H₂SO₄ (Merck) foram adicionados em cada poço e a placa foi novamente incubada por 10 min a 100°C e 800 rpm, e resfriada no gelo por 5 min. Cem microlitros de cada mistura foram transferidos para uma microplaca e a absorvância a 630 nm foi determinada. As concentrações de glicose foram calculadas por meio da extrapolação contra a curva padrão da

glicose (entre 0 – 175 µg de glicose). O experimento foi realizado três vezes em sextuplicata.

3.4.10 Teste de citotoxicidade

Para avaliar a possibilidade do uso das lactamas *in vivo*, sua toxicidade foi testada em fibroblastos do ligamento periodontal humano (PDL). Fibroblastos foram obtidos do ligamento periodontal de dentes extraídos por razões periodontais. Os doadores forneceram consentimento informado escrito, e a coleta e uso das células foi previamente aprovado pelo Comitê de Ética Médica da VU University Medical Center, Amsterdã, Países Baixos (#2011/328). O teste de citotoxicidade foi desenvolvido conforme previamente descrito por van der Waal et al. (29), com pequenas modificações. Os fibroblastos foram cultivados em meio mínimo essencial de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM; Gibco BRL, Paisley, Scotland) suplementado com 2% de antibióticos (solução antibiótica antimicótica; 100 U/mL penicilina, 100 mg/mL estreptomicina e 250 ng/mL anfotericina B, Sigma-Aldrich) e 10% de soro fetal bovino (FBS; HyClone, Logan, UT) (DMEMs) em uma atmosfera umidificada, com 5% CO₂ em O₂ a 37°C. Após 24 h, as células foram lavadas duas vezes com DMEM e incubadas por 24 h com 300 µL de cada lactama (175 µg/ml), clorexidina 0,2% ou DMSO 3,5%. Todas as soluções experimentais foram diluídas em DMEMs. Células em DMEMs foram usadas como controle negativo e células em Triton 5%, como controle positivo. Após o período de incubação, os componentes foram removidos, os poços foram lavados duas vezes com DMEM e 300 µL de sal tetrazólio WST-1 (Roche Diagnostics Nederland BV, Almere, The Netherlands) diluído em DMEM (1:10) foram adicionados. Após 4 h, a conversão de WST-1 em formazana pelas células metabolicamente ativas foi quantificada por meio da mensuração da absorvância a 450 nm (Spectramax M2; Molecular devices, Sunnyvale, CA). Mensurações de referência a 620 nm foram subtraídas para corrigir qualquer variância da microplaca. Os experimentos foram realizados três vezes em quadruplicata. Após a subtração das mensurações de referência, as mensurações do branco foram subtraídas. Em seguida, os valores dos grupos experimentais foram calculados como a porcentagem de atividade metabólica comparado ao controle negativo DMEMs. As médias e o desvio padrão foram calculados.

3.4.11 Análise estatística

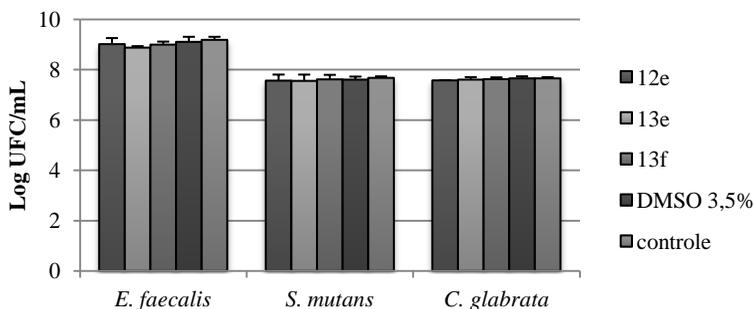
Todos os dados foram analisados utilizando o programa SPSS versão 21.0. Para o teste antimicrobiano e teste de adesão, os dados de UFC foram logaritmicamente transformados. Os dados obtidos com o ensaio de Bradford, para a análise de proteínas, apresentaram a normalidade dos resíduos violada. Portanto, os testes Kruskal-Wallis e *post-hoc* Dunn foram usados. Os dados obtidos com os demais testes apresentaram distribuição paramétrica e foram comparados utilizando os testes One-way ANOVA e *post-hoc* Tukey. Um nível de significância de 5% foi empregado.

3.5 RESULTADOS

3.5.1 Teste de atividade antimicrobiana

Conforme mostra a Figura 4, as lactamas e o DMSO 3,5% não exerceram efeito antimicrobiano sobre as espécies microbianas testadas quando comparadas ao controle (ambos $p > 0,05$).

Figura 3. Gráfico de barras demonstrando o efeito dos diferentes componentes sobre a contagem total de células planctônicas para cada espécie microbiana. Os resultados são expressos em log UFC/mL (eixo y). As barras de erros mostram o desvio padrão.

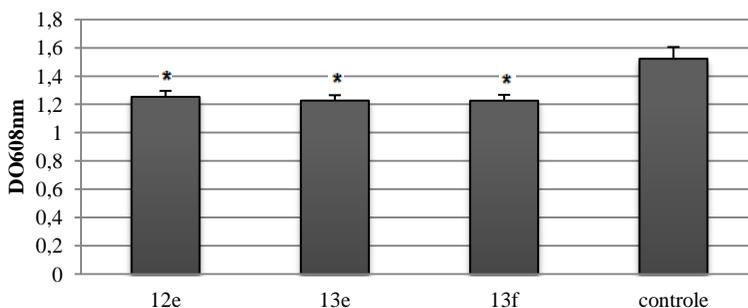


3.5.2 Biomassa do biofilme

A Figura 5 mostra a diferença na biomassa do biofilme entre as lactamas e o controle (DMSO 3,5%). As lactamas 12e, 13e e 13f reduziram significativamente a quantidade de massa do biofilme em

17,68%, 19,41% e 19,34%, respectivamente, comparadas ao controle ($p < 0,01$).

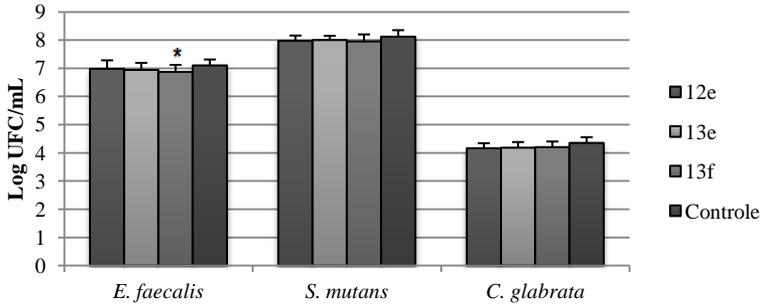
Figura 4. Gráfico de barras mostrando a massa do biofilme multiespécies formada sobre os discos de vidro após o condicionamento com as lactamas 12e, 13e e 13f e coloração com cristal violeta. Os resultados são expressos como densidade óptica a 608 nm (eixo y). As barras de erros mostram o desvio padrão. Os asteriscos apontam as diferenças significativas comparadas ao controle, DMSO 3,5%.



3.5.3 Teste de adesão – contagem de UFC

Na Figura 6 são mostrados os valores de log médios de células viáveis aderidas aos discos de vidro. Em geral, não houve diferença no número de células viáveis presentes no biofilme após o condicionamento do substrato com as lactamas, comparadas ao controle ($p > 0,05$), para cada espécie analisada individualmente. Exceção foi observada para o *E. faecalis*, quando a lactama 13f foi testada ($p = 0,037$).

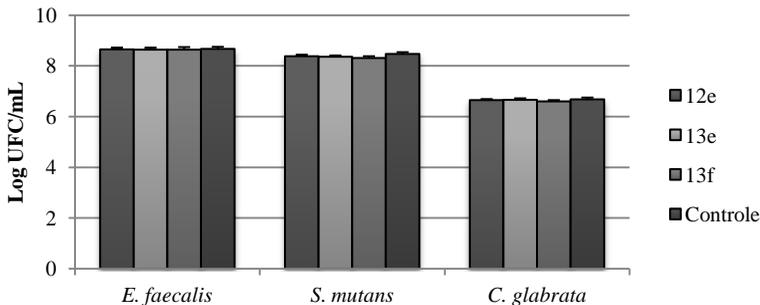
Figura 5. Gráfico de barras indicando os valores de log UFC médios das células viáveis aderidas para cada espécie microbiana após o condicionamento com as lactamas 12e, 13e e 13f. Os resultados são expressos como log UFC/mL (eixo y). As barras de erros mostram o desvio padrão. Os asteriscos apontam as diferenças significativas comparadas ao controle DMSO 3,5%.



3.5.4 Teste de adesão – extração de DNA e qPCR

Conforme mostra a Figura 7, os resultados do teste qPCR não demonstraram diferença no número total de células aderidas aos discos de vidro com e sem condicionamento com lactamas ($p > 0,05$).

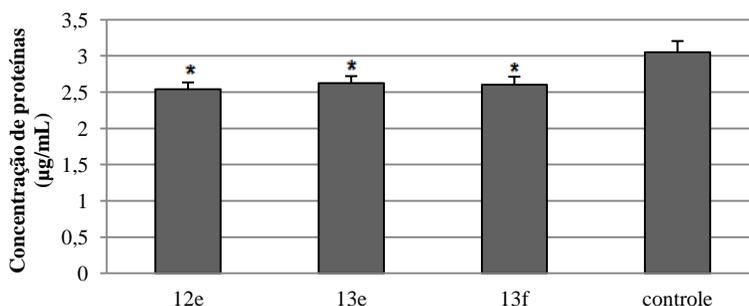
Figura 6. Gráfico de barras mostrando o efeito das lactamas 12e, 13e e 13f sobre o total de células microbianas presentes no biofilme. Os resultados são expressos como log UFC/mL (eixo y). As barras de erros mostram o erro padrão.



3.5.5 Ensaio de Bradford – quantificação de proteínas

Conforme mostra a Figura 8, a quantidade de proteína total do biofilme foi significativamente reduzida após o condicionamento dos discos de vidro com as lactamas, comparada ao controle ($p \leq 0,05$). As lactamas 12e, 13e, e 13f foram capazes de reduzir uma quantidade de 16,7%, 14% e 14,7% de proteínas, respectivamente.

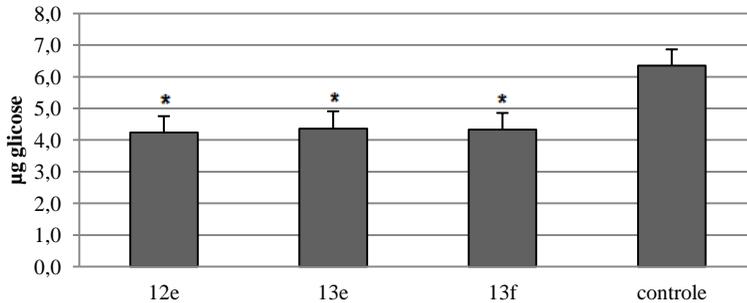
Figura 7. Gráfico de barras mostrando a concentração de proteína total nos biofilmes multiespécies de 48 h, após o condicionamento dos discos de vidro com as lactamas 12e, 13e e 13f. Os resultados são expressos como concentração de proteína em $\mu\text{g/mL}$ (eixo y). As barras de erros mostram o erro padrão. Os asteriscos apontam as diferenças significativas comparadas ao controle DMSO 3,5%.



3.5.6 Análise de polissacarídeos insolúveis

Uma quantidade significativamente menor de polissacarídeos insolúveis produzidos pelas células microbianas foi observada quando os discos de vidro foram condicionados com as diferentes lactamas comparados ao controle ($p < 0,05$) (Fig. 9). O total de carboidratos após o condicionamento com as lactamas foi de 66,80%, 68,72% e 68,16% do controle, respectivamente.

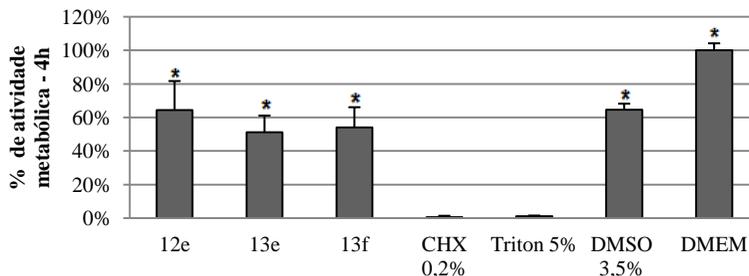
Figura 8. Gráfico de barras demonstrando os polissacarídeos insolúveis totais produzidos pelos microrganismos dos biofilmes multiespécies aderidos aos discos de vidro após o condicionamento com as lactamas 12e, 13e e 13f. Os resultados são expressos como concentração de glicose em μg (eixo y). As barras de erros mostram o desvio padrão. Os asteriscos apontam as diferenças significativas comparadas ao controle DMSO 3,5%.



3.5.7 Teste de citotoxicidade

A atividade metabólica dos fibroblastos após o tratamento com as lactamas 12e, 13e e 13f foi 64,43%, 51,11%, 54,05%, respectivamente, e 65% usando DMSO 3,5% comparado ao controle DMEM. Diferença significativa na atividade metabólica foi evidenciada quando as lactamas e DMSO 3,5% foram comparados com Triton 5% ou CHX 0,2% ($p < 0,01$). Os resultados do experimento são demonstrados na Figura 10.

Figura 9. Gráfico de barras mostrando a atividade metabólica das células no período de 4 horas após 24 h de contato com os diferentes tratamentos: lactamas 12e, 13e, 13f, DMSO 3,5%, clorexidina 0,2%, Triton 5% (controle positivo) e DMEM (controle negativo, sem tratamento). Os resultados são expressos como porcentagem da atividade metabólica no período de 4 h (eixo y). As barras de erros mostram o desvio padrão. Os asteriscos apontam as diferenças significativas comparadas ao controle positivo e clorexidina 0,2%.



3.6 DISCUSSÃO

Estudos bacteriológicos têm identificado a presença de *enterococci*, *streptococci*, *lactobacilli* e *candida* nos casos de recontaminação do canal radicular (30,31). Além de ser o mais importante patógeno causador da cárie dental (32), *S. mutans* também tem sido detectado nas infecções do canal radicular (33), formando biofilmes resistentes (22), o que representa um grande desafio para a sua eliminação. *E. faecalis* e *C. glabrata* são microrganismos frequentemente encontrados nos casos de infecções endodônticas persistentes (34), e facilmente se coagregam com outros microrganismos, como *S. mutans* (22,35–37). A presença de *C. glabrata* no biofilme aumenta a resistência do biofilme aos variados tratamentos (38). Para esta pesquisa estabelecemos uma comunidade multiespécies com *S. mutans*, *E. faecalis* e *C. glabrata* em um sistema que permitiu investigar a atividade antibiofilme de lactamas sintéticas.

É sabido que a concentração das lactamas e os efeitos sobre o biofilme variam de acordo com o tipo de substrato, condições de formação do biofilme (39) e com o número de espécies microbianas presentes (15).

Em concordância com resultados previamente descritos (20), os compostos empregados neste estudo, γ -alquilideno- γ -lactamas 12e, 13e e 13f, não apresentaram atividade antimicrobiana contra a população

plancônica de microrganismos. Assim, qualquer efeito indireto dos compostos na viabilidade microbiana foi excluído.

Por outro lado, a quantificação com cristal violeta mostrou que todas as lactamas reduziram significativamente a quantidade de biofilme. Corroborando este resultado, estudos recentes que também empregaram o ensaio com cristal violeta demonstraram que os compostos 12e, 13e e 13f apresentam alta atividade contra o biofilme de *E. faecalis* (20). Outras lactamas também são capazes de controlar a formação do biofilme de uma ampla variedade de bactérias, como *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus aureus* e *S. mutans* (19,20).

O inconveniente do teste de coloração com cristal violeta é não determinar quais componentes do biofilme (células microbianas e/ou matriz extracelular) foram afetados. Assim, com o objetivo de identificar o possível alvo das lactamas testadas, experimentos foram conduzidos para avaliar alguns dos principais componentes presentes no biofilme multiespécies.

Em geral, as lactamas não exerceram efeito sobre o número de células aderidas, conforme evidenciado nos testes de quantificação de UFC e no teste qPCR. Resultados da contagem de células viáveis mostraram que somente a lactama 13f foi capaz de inibir a adesão de *E. faecalis* na superfície dos discos de vidro, embora essa inibição não tenha sido biologicamente expressiva. Estes achados diferem de alguns estudos que testaram variados compostos e demonstraram ação antibiofilme relacionada à inibição da aderência dos microrganismos (40,41).

Além da lactama 13f ter influenciado a adesão microbiana, o condicionamento da superfície do substrato com as lactamas 12e, 13e e 13f reduziu a quantidade de proteínas e polissacarídeos extracelulares do biofilme multiespécies. Uma investigação prévia também demonstrou diminuição na produção de proteínas (27%) e carboidratos (31%) pelas células bacterianas quando diferentes compostos foram testados como inibidores do biofilme, sem que houvesse diferença significativa no número de células aderidas comparado ao controle (42). Outro estudo envolvendo agentes antibiofilme também demonstrou uma diminuição na produção de EPS de um biofilme multiespécies em aproximadamente 50%, sem comprometimento do crescimento bacteriano (15).

A matriz de EPS é um dos principais componentes dos biofilmes. Portanto, é interessante que haja uma redução significativa na sua produção. Proteínas do *S. mutans* UA 159 envolvidas com o metabolismo de EPS são altamente abundantes em biofilmes mistos

durante as primeiras horas de adesão (43). Podemos especular que o condicionamento da superfície com as lactamas tenha alterado esse metabolismo agindo sobre proteínas específicas. Outra possibilidade é a interferência das lactamas no sistema de controle ou sinalização dos microrganismos (*quorum-sense*) que direciona a produção de EPS, no sistema enzimático e/ou no metabolismo microbiano, reduzindo a produção de matriz extracelular (8,15). Devido à similaridade estrutural das γ -alquilideno- γ -lactamas com as moléculas do *quorum-sense* (19), as lactamas poderiam atuar como antagonistas à formação do biofilme, ligando competitivamente aos reguladores da resposta do *quorum-sense*. Assim, o sistema de comunicação entre os microrganismos sofre interferência e é bloqueado e, conseqüentemente, a formação e o comportamento do biofilme microbiano são alterados.

Interessantemente, o efeito das lactamas na redução da produção de carboidratos foi mais acentuado do que a redução na produção de proteínas, indicando que estes compostos podem ser explorados para o desenvolvimento de agentes antibiofilme, já que polissacarídeos contribuem mais do que proteínas para a formação e estabilidade estrutural dos agregados microbianos (44). De acordo com Khan et al. (45), a inibição de EPS poderia ser um mecanismo plausível de inibição do biofilme. A matriz de EPS serve como uma barreira física que dificulta a penetração e a difusão das moléculas dos agentes antimicrobianos para o interior das células bacterianas (46,47), devido à viscosidade da secreção extracelular, e também por meio de interações eletrostáticas dos componentes da matriz com estes agentes (48). Assim, a habilidade de inibir sua produção torna a comunidade microbiana mais vulnerável/susceptível a outros procedimentos de desinfecção ou agentes antimicrobianos (40). Portanto, o uso dessas lactamas para a modificação da superfície, por exemplo, no condicionamento da dentina radicular, poderia ser uma estratégia efetiva para diminuir a taxa de insucesso endodôntico causado pelas infecções associadas ao biofilme.

Considerando o potencial das lactamas para uso intracanal, a toxicidade destas moléculas às células do ligamento periodontal deve ser a mais baixa possível. De acordo com a classificação proposta por Chuensombat et al. (49), as lactamas avaliadas neste estudo demonstraram efeito moderado (entre 30% e 60%) sobre a viabilidade dos fibroblastos do ligamento periodontal. Quando comparadas com a solução de CHX 0,2%, demonstraram menor citotoxicidade.

Estudos futuros objetivando elucidar o mecanismo detalhado através do qual as lactamas reduziram a matriz extracelular do biofilme e explorar os ingredientes ativos ainda são necessários.

Em conclusão, este estudo mostrou que as γ -alquilideno- γ -lactamas 12e, 13e e 13f diminuíram a produção de proteínas e polissacarídeos de um biofilme multiespécies de *S. mutans*, *E. faecalis* e *C. glabrata*, indicando que estes compostos são potenciais candidatos para o desenvolvimento de agentes inibidores da formação de biofilme.

3.7 AGRADECIMENTOS

Josiane de Almeida recebeu assistência financeira da CAPES (Processo número 11842/13-0), a qual permitiu que a doutoranda conduzisse sua pesquisa como visitante na ACTA – Academic Centre for Dentistry Amsterdam. Os autores agradecem ao Departamento de Química da Universidade Federal de Viçosa que gentilmente cedeu as lactamas utilizadas nesta pesquisa.

Os autores negam qualquer conflito de interesse relacionado a este estudo.

3.8 REFERÊNCIAS

1. NAIR PNR, 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**: 231–252.
2. PRAKASH B, VEEREGOWDA BM, KRISHNAPPA G. Biofilms: a survival strategy of bacteria. *Cur Sci* 2003; **85**: 1299-1307.
3. JAIN A, GUPTA Y, AQRAWAL R, KHARE P, JAIN SK. Biofilms – a microbial life perspective: a critical review. *Crit Rev Ther Drug* 2007; **24**: 393-443.
4. RICUCCI D, LOGHIN S, SIQUEIRA JF. Exuberant biofilm infection in a lateral canal as the cause of short-term endodontic treatment failure: Report of a case. *J Endod* 2013; **39**: 712–718.
5. HAAPASALO M, ENDAL U, ZANDI H, COIL JM. Eradication of endodontic infection by instrumentation and irrigation solutions. *Endod Top* 2005; **10**: 77–102.

6. SVENSATER G, BERGENHOLTZ G. Biofilms in endodontic infections. *Endod Top* 2004; **9**: 27–36.
7. FLEMMING H-C, WINGENDER J. The biofilm matrix. *Nat Rev Microbiol* 2010; **8**: 623–633.
8. QUAH SY, WU S, LUI JN, SUM CP, TAN KS. N-Acetylcysteine Inhibits Growth and Eradicates Biofilm of *Enterococcus faecalis*. *J Endod* 2012; **38**: 81–85.
9. JOHNSON SA, GODDARD PA, ILIFFE C, TIMMINS B, RICKARD AH, ROBSON G, HANDLEY PS. Comparative susceptibility of resident and transient hand bacteria to para-chloro-meta-xyleneol and triclosan. *J Appl Microbiol* 2002; **93**: 336–344.
10. GILBERT P, DAS J, FOLEY I. Biofilm susceptibility to antimicrobials. *Adv Dent Res* 1997; **11**: 160-167.
11. JARAMILLO DE, ARRIOLA A, SAFAVI K, CHÁVEZ DE PAZ LE. Decreased bacterial adherence and biofilm growth on surfaces coated with a solution of benzalkonium chloride. *J Endod* 2012; **38**: 821–825.
12. MURGA R, MILLER JM, DONLAN RM. Biofilm formation by Gram-negative bacteria on central venous catheter connectors : effect of conditioning films in a laboratory model. *J Clin Microbiol* 2001; **39**: 2294–2297.
13. SPLENDIANI A, LIVINGSTON AG, NICOLELLA C. Control of membrane-attached biofilms using surfactants. *Biotechnol Bioeng* 2006; **5**: 15-23.
14. PEREIRA HA. Novel therapies based on cationic antimicrobial peptides. *Curr Pharm Biotechnol* 2006; **7**: 229–234.
15. OLOFSSON A, HERMANSSON M, ELWING H. N-Acetyl- L - Cysteine affects growth, extracellular polysaccharide production,

- and bacterial biofilm formation on solid surfaces. *Appl Environ Microbiol* 2003; **69**: 4814–4822.
16. NADELL CD, XAVIER JB, LEVIN SA, FOSTER KR. The evolution of quorum sensing in bacterial biofilms. *PLoS Biol* 2008; **6**: 0171–0179.
 17. KALORITI D, TILLMANN A, COOK E, JACOBSEN M, YOU T, LENARDON M, AMES L, et al. Combinatorial stresses kill pathogenic *Candida* species. *Med Mycol* 2012; **50**: 699–709.
 18. SUZUKI S, HOSOE T, NOZAWA K, KAWAI KI, YAGUCHI T, UDAGAWA SI. Antifungal substances against pathogenic fungi, talaroconvolutins, from *Talaromyces convolutus*. *J Nat Prod* 2000; **63**: 768–772.
 19. PEREIRA UA, BARBOSA LC, MALTHA CR, DEMUNER AJ, MASOOD MA, PIMENTA AL. γ -Alkylidene- γ -lactones and isobutylpyrrol-2(5H)-ones analogues to rubrolides as inhibitors of biofilm formation by Gram-positive and Gram-negative bacteria. *Bioorganic Med Chem Lett* 2014; **24**: 1052–1056.
 20. PEREIRA UA, BARBOSA LC, MALTHA CR, DEMUNER AJ, MASOOD MA., PIMENTA AL. Inhibition of *Enterococcus faecalis* biofilm formation by highly active lactones and lactams analogues of rubrolides. *Eur J Med Chem* 2014; **82**: 127–138.
 21. NAY B, RIACHE N, EVANNO L. Chemistry and biology of non-tetramic gamma-hydroxy-gamma-lactams and gamma-alkylidene-gamma-lactams from natural sources. *Nat Prod Rep* 2009; **26**: 1044–1462.
 22. DENG DM, HOOGENKAMP MA., EXTERKATE RA, JIANG LM, VAN DER SLUIS LW, TEN CATE JM, CRIELAARD W. Influence of *Streptococcus mutans* on *Enterococcus faecalis* Biofilm Formation. *J Endod* 2009; **35**: 1249–1252.

23. LI X, HOOGENKAMP MA, LING J, CRIELAARD W, DENG DM. Diversity of *Streptococcus mutans* strains in bacterial interspecies interactions. *J Basic Microbiol* 2014; **54**: 97-103.
24. VAN PALENSTEIN HELDERMAN WH, IJSSELDIJK M, HUIS IN 'T VELD JH. A selective medium for the two major subgroups of the bacterium *Streptococcus mutans* isolated from human dental plaque and saliva. *Arch Oral Biol* 1983; **28**: 599-603.
25. CRIELAARD W, ZAURA E, SCHULLER AA, HUSE SM, MONTIJN RC, KEIJSER BJ. Exploring the oral microbiota of children at various developmental stages of their dentition in the relation to their oral health. *BMC Med Genomics* 2011; **4**: 22.
26. DE ALMEIDA J, HOOGENKAMP M, FELIPPE WT, CRIELAARD W, VAN DER WAAL SV. Effectiveness of EDTA and Modified Salt Solution to Detach and Kill Cells from *Enterococcus faecalis* Biofilm. *J Endod* 2016; **42**: 320-323.
27. HOOGENKAMP MA., TEN CATE JM. Determination of arginine catabolism by salivary pellet. *MethodsX* 2014; **1**: 1-5.
28. LUDWIG TG, GOLDBERG JG. The anthrone method for the determination of carbohydrates in foods and in oral rinsing. *J Dent Res* 1956; **35**: 90-94.
29. VAN DER WAAL SV, SCHERES N, DE SOET JJ, WESSELINK PR, CRIELAARD W. Cytotoxicity, interaction with dentine and efficacy on multispecies biofilms of a modified salt solution intended for endodontic disinfection in a new in vitro biofilm model. *Int Endod J* 2015; **48**: 153-161.
30. MOLANDER A, REIT C, DAHLÉN G, KVIST T. Microbiological status of root-filled teeth with apical periodontitis. *Int Endod J* 1998; **31**: 1-7.
31. SUNDQVIST G, FIGDOR D, PERSSON S, SJÖGREN 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.
32. BANAS JA. Virulence properties of *Streptococcus mutans*. *Front Biosci* 2004; 1: 1267-1277.
 33. MUNSON MA, PITT-FORD T, CHONG B, WEIGHTMAN A, WADE WG. Molecular and cultural analysis of the microflora associated with endodontic infections. *J Dent Res* 2002; **81**: 761–766.
 34. WALTIMO TM, SIRÉN EK, TORKKO HL, OLSEN I, HAAPASALO MP. Fungi in therapy-resistant apical periodontitis. *Int Endod J* 1997; **30**: 96–101.
 35. JOHNSON EM, FLANNAGAN SE, SEDGLEY CM. Coaggregation interactions between oral and endodontic *Enterococcus faecalis* and bacterial species isolated from persistent apical periodontitis. *J Endod* 2006; **32**: 946–950.
 36. PEREIRA-CENCI T, DENG DM, KRANEVELD EA, MANDERS EMM, DEL BEL CURY AA, TEN CATE JM, CRIELAARD W. The effect of *Streptococcus mutans* and *Candida glabrata* on *Candida albicans* biofilms formed on different surfaces. *Arch Oral Biol* 2008; **53**: 755–764.
 37. JIANG L-M, HOOGENKAMP MA, VAN DER SLUIS LW, WESSELINK PR, CRIELAARD W, DENG DM. Resazurin metabolism assay for root canal disinfectant evaluation on dual-species biofilms. *J Endod* 2011; **37**: 31–35.
 38. KROM BP, KIDWAI S, TEN CATE JM. *Candida* and other fungal species: forgotten players of healthy oral microbiota. *J Dent Res* 2014; **93**: 445–451.
 39. HANNIG C, HANNIG M. The oral cavity - A key system to understand substratum-dependent bioadhesion on solid surfaces in man. *Clin Oral Investig* 2009; **13**: 123–139.

40. JANSSENS JC, STEENACKERS H, ROBIJNS S, GELLENS E, LEVIN J, ZHAO H, HERMANS K, et al. Brominated furanones inhibit biofilm formation by *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Appl Environ Microbiol* 2008; **74**: 6639–6648.
41. CHUSRI S, JITTANON W, MANEENOON K, VORAVUTHIKUNCHAI SP. An effective antibiofilm agent against *Pseudomonas aeruginosa* biofilm from traditional Thai herbal recipes used for wound treatments. *Microb Drug Resist* 2013; **19**: 337–343.
42. KIM HS, PARK HD. Ginger extract inhibits biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* PA14. *PLoS One* 2013; **8**: 1–16.
43. KLEIN MI, XIAO J, LU B, DELAHUNTY CM, YATES JR, KOO H. *Streptococcus mutans* protein synthesis during mixed-species biofilm development by high-throughput quantitative proteomics. *PLoS One* 2012; **7**: e45795.
44. TAY JH, LIU QS, LIU Y. The role of cellular polysaccharides in the formation and stability of aerobic granules. *Lett Appl Microbiol* 2001; **33**: 222–226.
45. KHAN ST, AHAMED M, ALHADLAQ HA, MUSARRAT J, AL-KHEDHAIRY A. Comparative effectiveness of NiCl₂, Ni- and NiO-NPs in controlling oral bacterial growth and biofilm formation on oral surfaces. *Arch Oral Biol* 2013; **58**: 1804–1811.
46. PROSSER BL, TAYLOR D, DIX BA, CLEELAND R. Method of evaluating effects of antibiotics on bacterial biofilm. *Antimicrob Agents Chemother* 1987; **31**: 1502-1506.
47. MARTIN C, LOW WL, GUPTA A, AMIN MC, RADECKA I, BRITLAND ST, RAJ P, KENWARD KM. Strategies for Antimicrobial Drug Delivery to Biofilm. *Curr Pharm Des* 2015; **21**: 43–66.
48. ARCIOLA CR, CAMPOCCIA D, SPEZIALE P, MONTANARO L, COSTERTON JW. Biofilm formation in

Staphylococcus implant infections. A review of molecular mechanisms and implications for biofilm-resistant materials. *Biomaterials* 2012; **33**: 5967–5682.

49. CHUENSOMBAT S, KHEMALEELAKUL S, CHATTIPAKORN S, SRISUWAN T. Cytotoxic effects and antibacterial efficacy of a 3-antibiotic combination: An in vitro study. *J Endod* 2013; **39**: 813–819.

4 CONCLUSÕES FINAIS

Com base nos resultados obtidos nos diferentes experimentos foi possível concluir que:

1) O EDTA e a MSS foram efetivos para promover a desagregação das bactérias do biofilme de *E. faecalis*.

2) A MSS demonstrou excelente atividade antimicrobiana, enquanto o EDTA apresentou baixa efetividade antimicrobiana contra o biofilme de *E. faecalis*.

3) As γ -alquilideno- γ -lactamas 12e, 13e e 13f diminuíram a produção de polissacarídeos e proteínas da matriz extracelular do biofilme multiespécies de *S. mutans*, *E. faecalis* e *C. glabrata*.

REFERÊNCIAS

- ABDULLAH, M. et al. Susceptibilities of two *Enterococcus faecalis* phenotypes to root canal medications. **Journal of Endodontics**. v. 31, n.1, p. 30-36, Jan 2005.
- ALVES, F.R. et al. Biofilms biomass disruption by natural substances with potential for endodontic use. **Brazilian Oral Research**. v. 27, n. 1, p. 20-25, Jan-Feb 2013.
- ARCHER, D.L. Preservation microbiology and safety: evidence that stress enhances virulence and triggers adaptive mutations. **Trends in Food Science and Technology**. v. 7, n. 3, p. 91-95, Mar 1996.
- ARCIOLA, C.R. et al. Biofilm formation in *Staphylococcus* implant infections. A review of molecular mechanisms and implications for biofilm-resistant materials. **Biomaterials**. v. 33, n. 26, p. 5967–5682, Sep 2012.
- BANAS J.A. Virulence properties of *Streptococcus mutans*. **Frontiers in Bioscience**. v. 1, n. 9, p. 1267-1277, May 2004.
- BANIN, E.; BRADY, K.M.; GREENBERG, E.P. Chelator-induced dispersal and killing of *Pseudomonas aeruginosa* cells in a biofilm. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 72, n. 3, p. 2064–2069, Mar 2006.
- BARNHART B.D. An in vitro evaluation of the cytotoxicity of various endodontic irrigants on human gingival fibroblasts. **Journal of Endodontics**. v. 31, n. 8, p. 613-615, Aug 2005.
- BEALES N. Adaptation of microorganisms to cold temperatures, weak acid preservatives, low pH, and osmotic stress: A review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**. v. 3, n. 1, p. 1-20, Jan 2004.
- BYSTRÖM, A.; SUNDQVIST, G. The antibacterial action of sodium hypochlorite and EDTA in 60 cases of endodontic therapy. **International Endodontic Journal**. v. 18, n. 1, p. 35-40, Jan 1985.

CALT, S.; SERPER, A. Time-dependent effects of EDTA on dentin structures. **Journal of Endodontics**. v. 28, n. 1, p. 17–19, Jan 2002.

CASE, P.D. et al. Treatment of root canal biofilms of *Enterococcus faecalis* with ozone gas and passive ultrasound activation. **Journal of Endodontics**. v. 38, n. 4, p. 523–526, Apr 2012.

CAVALIERE, R. et al. The biofilm matrix destabilizers, EDTA and DNaseI, enhance the susceptibility of nontypeable *Hemophilus influenzae* biofilms to treatment with ampicillin and ciprofloxacin. **Microbiology Open**. v. 3, n. 4, p. 557–567, Aug 2014.

CHÁVEZ DE PAZ, L.E.; BERGENHOLTZ, G.; SVENSÄTER, G. The effects of antimicrobials on endodontic biofilm bacteria. **Journal of Endodontics**. v. 36, n. 1, p. 70–77, Jan 2010.

CHÁVEZ DE PAZ, L.E.; HAMILTON, I.R.; SVENSÄTER, G. Oral bacteria in biofilms exhibit slow reactivation from nutrient deprivation. **Microbiology**. v. 154, n. 7, p. 1927–1938, Jul 2008.

CHEN, X.; STEWART, P.S. Biofilm removal caused by chemical treatments. **Water Research**. v. 34, n. 17, p. 4229–4233, Dec 2000.

CHEN, X.; STEWART, P.S. Role of electrostatic interactions in cohesion of bacterial biofilms. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 59, n. 6, p. 718–720, Sep 2002.

CHUENSOMBAT, S. et al. Cytotoxic effects and antibacterial efficacy of a 3-antibiotic combination: An in vitro study. **Journal of Endodontics**. v. 39, n. 6, p. 813–819, Jun 2013.

CHUSRI, S. et al. An effective antibiofilm agent against *Pseudomonas aeruginosa* biofilm from traditional Thai herbal recipes used for wound treatments. **Microbial Drug Resistance**. v. 19, n. 5, p. 337–343, Jun 2013.

CLARKSON, R.M.; PODLICH, H.M.; MOULE, A.J. Influence of ethylenediaminetetraacetic acid on the active chlorine content of sodium hypochlorite solutions when mixed in various proportions. **Journal of Endodontics**. v. 37, n. 4, p. 538–543, Apr, 2011.

CRIELAARD, W. et al. Exploring the oral microbiota of children at various developmental stages of their dentition in the relation to their oral health. **BMC Medical Genomics**. v. 4, n. 4, p. 22, Mar 2011.

CSONKA, L.N. Physiological and genetic responses of bacteria to osmotic stress. **Microbiological Reviews**. v. 52, n. 1, p. 121-147, Mar 1989.

de ALMEIDA, J. et al. Effectiveness of EDTA and Modified Salt Solution to detach and kill cells from *Enterococcus faecalis* biofilm. **Journal of Endodontics**. v. 42, n. 2, p. 320–323, Feb 2016.

de la FUENTE-NÚÑEZ, C. et al. Bacterial biofilm development as a multicellular adaptation: Antibiotic resistance and new therapeutic strategies. **Current Opinion in Microbiology**. v. 16, n. 5, p. 580-589, Oct 2013.

DENG, D.M. et al. Influence of *Streptococcus mutans* on *Enterococcus faecalis* Biofilm Formation. **Journal of Endodontics**. v. 35, n. 9, p. 1249–1252, Sep 2009.

DUGGAN, J.M.; SEDGLEY, C.M. Biofilm formation of oral and endodontic *Enterococcus faecalis*. **Journal of Endodontics**. v. 33, n. 7, p. 815–818, Jul 2007.

EXTERKATE, R.A. et al. The effect of propidium monoazide treatment on the measured bacterial composition of clinical samples after the use of a mouthwash. **Clinical Oral Investigations**. v. 19, n. 4, p. 813-822, May 2015.

EXTERKATE, R.A. et al. The effects of propidium monoazide treatment on the measured composition of polymicrobial biofilms after treatment with chlorhexidine. **Caries Research**. v. 48, n. 4, p. 291–298, 2014.

EXTERKATE, R.A.; CRIELAARD, W.; TEN CATE, J.M. Different response to amine fluoride by *Streptococcus mutans* and polymicrobial biofilms in a novel high-throughput active attachment model. **Caries Research**. v. 44, n. 4, p. 372–379, 2010.

FAN, B. et al. C-shaped canal system in mandibular second molars: Part II--Radiographic features. **Journal of Endodontics**. v. 30, n. 12, p. 904-908, Dec 2004.

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

GEORGE, S.; KISHEN, A.; SONG, K.P. The role of environmental changes on monospecies biofilm formation on root canal wall by *Enterococcus faecalis*. **Journal of Endodontics**. v. 31, n. 12, p. 867-872, Dec 2005.

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

GOMES, B.P. et al. Chlorhexidine in endodontics. **Brazilian Dental Journal**. v. 24, n. 2, p.89-102, Mar 2013.

GUTIERREZ, C.; ABEE, T.; BOOTH, I.R. Physiology of the osmotic stress response in microorganisms. **International Journal of Food Microbiology**. v. 28, n. 2, p. 233-244, Dec 1995.

HAAPASALO, M. et al. Eradication of endodontic infection by instrumentation and irrigation solutions. **Endodontic Topics**. v. 10, n. 1, p. 77-102, Mar 2005.

HANNIG, C.; HANNIG, M. The oral cavity - A key system to understand substratum-dependent bioadhesion on solid surfaces in man. **Clinical Oral Investigations**. v. 13, n. 2, p. 123-139, Jun 2009.

HOOGENKAMP, M.A.; TEN CATE, J.M. Determination of arginine catabolism by salivary pellet. **MethodsX**. v. 22, n.1, p. 1-5, Jan 2014.

ISSAM, I. et al. The role of chelators in preventing biofilm formation and catheter-related bloodstream infections. **Current Opinion in Infectious Diseases**. v. 21, n. 4, p. 385-392, Aug 2008.

JAIN, A. et al. Biofilms – a microbial life perspective: a critical review. **Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems**. v. 24, n. 5, p. 393-443, 2007.

JANSSENS, J.C.; et al. Brominated furanones inhibit biofilm formation by *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 74, n. 21, p. 6639–6648, Nov 2008.

JARAMILLO, D.E. et al. Decreased bacterial adherence and biofilm growth on surfaces coated with a solution of benzalkonium chloride. **Journal of Endodontics**. v. 38, n. 6, p. 821–825, Jun 2012.

JIANG, L-M., et al. Resazurin metabolism assay for root canal disinfectant evaluation on dual-species biofilms. **Journal of Endodontics**. v. 37, n. 1, p. 31–35, Jan 2011.

JOHNSON, E.M.; FLANNAGAN, S.E.; SEDGLEY, C.M. Coaggregation interactions between oral and endodontic *Enterococcus faecalis* and bacterial species isolated from persistent apical periodontitis. **Journal of Endodontics**. v. 32, n.10, p. 946–950, Oct 2006.

JOHNSON, S.A. et al. Comparative susceptibility of resident and transient hand bacteria to para-chlorometa-xyleneol and triclosan. **Journal of Applied Microbiology**. v. 93, n. 2, p. 336-344, 2002.

JUNG, I.Y. et al. Molecular epidemiology and association of putative pathogens in root canal infection. **Journal of Endodontics**. v. 26, n. 10, p. 599–604, Oct 2000.

KAKEHASHI, S.; STANLEY, H.R.; FITZGERALD, R.J. The effects of surgical exposures of dental pulps in germ-free and conventional laboratory rats. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology**. v. 20. P. 340-349, Sep 1965.

KALORITI, D. et al. Combinatorial stresses kill pathogenic *Candida* species. **Medical Mycology**. v. 50, n. 7, p. 699–709, Oct, 2012.

KAMPFER, J. et al. Leakage of food-born *Enterococcus faecalis* through temporary fillings in a simulated oral environment. **International Endodontic Journal**. v. 40, n. 6, p. 471-477, Jun 2007.

KHAN, S.T. et al. Comparative effectiveness of NiCl₂, Ni- and NiO-NPs in controlling oral bacterial growth and biofilm formation on oral surfaces. **Archives of Oral Biology**. v. 58, n. 12, p. 1804–1811, Dec 2013.

KIM, H.S.; PARK, H.D. Ginger extract inhibits biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* PA14. **PLoS One**. v. 8, n.9, p. 1–16, Sep 2013.

KIM, S.Y. et al. In vivo quantitative evaluation of live and dead bacteria in root canal infection by using propidium monoazide with real-time PCR. **Journal of Endodontics**. v. 39, n. 11, p. 1359–1363, Nov 2013.

KLEIN, M.I. et al. *Streptococcus mutans* protein synthesis during mixed-species biofilm development by high-throughput quantitative proteomics. **PLoS One**. v. 7, n. 9, p. e45795, 2012.

KÖRSTGENS, V. et al. Influence of calcium ions on the mechanical properties of a model biofilm of mucoid *Pseudomonas aeruginosa*. **Water Science Technology**, v. 43, n. 6, p. 49–57, 2001.

KROM, B.P.; KIDWAI, S.; TEN CATE, J.M. *Candida* and other fungal species: forgotten players of healthy oral microbiota. **Journal of Dental Research**. v. 93, n. 5, p. 445–451, May 2014.

LEBEIS, S.L.; KALMAN, D. Aligning antimicrobial drug discovery with complex and redundant host-pathogen interactions. **Cell Host and Microbe**. v. 5, n. 2, p. 114-122, Feb 2009.

LEE, S. Elimelech M. Salt cleaning of organic-fouled reverse osmosis membranes. **Water Research**. v. 41, n. 5, p. 1134–1142, Mar 2007.

LI, X. et al. Diversity of *Streptococcus mutans* strains in bacterial interspecies interactions. **Journal of Basic Microbiology**. v. 54, n. 2, p. 97-103, Feb 2014.

LUDWIG, T.G.; GOLDBERG, J.G. The anthrone method for the determination of carbohydrates in foods and in oral rinsing. **Journal of Dental Research**. v. 35, n. 1, p. 90-94, Feb, 1956.

MARTIN, C. et al. Strategies for antimicrobial drug delivery to biofilm. **Current Pharmaceutical Design**. v. 21, n. 1, p. 43–66, 2015.

MOLANDER, A. et al. Microbiological status of root-filled teeth with apical periodontitis. **International Endodontic Journal**. v. 31, n. 1, p. 1–7, Jan, 1998.

MÖLLER, A.J. et al. Influence on periapical tissues of indigenous oral bacteria and necrotic pulp tissue in monkeys. **Scandinavian Journal of Dental Research**. v. 89, n. 6, p. 475-484, Dec 1981.

MUNSON, M.A. et al. Molecular and cultural analysis of the microflora associated with endodontic infections. **Journal of Dental Research**. v. 81, n. 1, p. 761–766, Jan 2002.

MURGA, R.; MILLER, J.M.; DONLAN, R.M. Biofilm formation by Gram-negative bacteria on central venous catheter connectors : effect of conditioning films in a laboratory model. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 39, n. 6, p. 2294–2297, Jun 2001.

NADELL, C.D. et al. The evolution of quorum sensing in bacterial biofilms. **PLoS Biology**. v. 6, n. 1, p. 0171–0179, Jan 2008.

NAIR, N.R. et al. Microbial status of apical root canal system of human mandibular first molars with primary apical periodontitis after “one-visit” endodontic treatment. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology**. v. 99, n. 2, p. 231–252, Feb 2005.

NAIR, N.R. Light and electron microscopic studies of root canal flora and periapical lesions. **Journal of Endodontics**. v. 13, n. 1, p. 29-39, Jan, 1987.

NAIR, N.R. On the causes of persistent apical periodontitis: a review. **International Endodontic Journal**. v. 39, n. 4, p. 249-281, Apr 2006.

NAIR, N.R. Pathogenesis of apical periodontitis and the causes of endodontic failures. **Critical Reviews in Oral Biology and Medicine**. v. 15, n. 6, p. 348-381, Nov 2004.

NAY, B.; RIACHE, N.; EVANNO, L. Chemistry and biology of non-tetramic gamma-hydroxy-gamma-lactams and gamma-alkylidene-gamma-lactams from natural sources. **Natural Product Reports**. v. 26, n. 8, p. 1044–1462, Aug 2009.

NICKEL, J.C. et al. Tobramycin resistance of *Pseudomonas-aeruginosa* cells growing as a biofilm on urinary catheter material. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 27, n. 4, p. 619-624, Apr 1985.

OLOFSSON, A.; HERMANSSON, M.; ELWING, H. N-Acetyl-L-Cysteine affects growth, extracellular polysaccharide production, and bacterial biofilm formation on solid surfaces. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 69, n. 8, p. 4814–4822, Aug 2003.

OZOK, A.R. et al. Ecology of the microbiome of the infected root canal system: a comparison between apical and coronal root segments. **International Endodontic Journal**. v. 45, n. 6, p. 530-541, Jun 2012.

PAN, J.; REN, D. Quorum sensing inhibitors: a patent overview. **Expert Opinion on Therapeutic Patents**, v. 19, n. 11, p. 1-21, Nov 2009.

PEREIRA, H.A. Novel therapies based on cationic antimicrobial peptides. **Current Pharmaceutical Biotechnology**. v. 7, n. 4, p. 229–234, Aug 2006.

PEREIRA, U.A. et al. Inhibition of *Enterococcus faecalis* biofilm formation by highly active lactones and lactams analogues of rubrolides. **European Journal of Medicinal Chemistry**. v. 82, p. 127–138, Jul 2014b.

PEREIRA, U.A. et al. γ -Alkylidene- γ -lactones and isobutylpyrrol-2(5H)-ones analogues to rubrolides as inhibitors of biofilm formation by Gram-positive and Gram-negative bacteria. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**. v. 24, n. 4, p. 1052–1056, Feb 2014a.

PEREIRA-CENCI, T. et al. The effect of *Streptococcus mutans* and *Candida glabrata* on *Candida albicans* biofilms formed on different surfaces. **Archives of Oral Biology**. v. 53, n. 8, p. 755–764, Aug 2008.

PORTENIER, I.; WALTIMO, T.; HAAPASALO, M. *Enterococcus faecalis* – the root canal survivor and ‘star’ in post-treatment disease. **Endodontic Topics**. v. 6, n. 1, p. 135-159, Nov 2003.

PRAKASH, B.; VEEREGOWDA, B.M.; KRISHNAPPA, G. Biofilms: a survival strategy of bacteria. **Current Science**. v. 85, n.9, p. 1299-1307, Nov 2003.

PROSSER, B.L. et al. Method of evaluating effects of antibiotics on bacterial biofilm. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**. v. 31, n. 10, p. 1502-1506, Oct 1987.

QUAH, S.Y. et al. N-acetylcysteine inhibits growth and eradicates biofilm of *Enterococcus faecalis*. **Journal of Endodontics**. v. 38, n. 1, p. 81–85, Jan 2012.

RAMAGE, G.; WICKES, B.L.; LÓPEZ-RIBOT, J.L. Inhibition on *Candida albicans* biofilm formation using divalent cation chelators (EDTA). **Mycopathologia**. v. 164, n. 6, p. 301-306, Dec 2007.

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

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

SARKISOVA, S. et al. Calcium-induced virulence factors associated with the extracellular matrix of mucoid *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. **Journal of Bacteriology**. v. 187, n. 13, p. 4327–4337, Jul 2005.

SEDGLEY, C.M. et al. Quantitative real-time PCR detection of oral *Enterococcus faecalis* in humans. **Archives in Oral Biology**. v. 50, n. 6, p. 575–583, Jun 2005.

SHEN, Y. et al. The synergistic antimicrobial effect by mechanical agitation and two chlorhexidine preparations on biofilm bacteria. **Journal of Endodontics**. v. 36, n. 1, p. 100-104, Jan 2010.

SHERERTZ, R.J. et al. Comparative in vitro efficacies of various catheter lock solutions. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**. v. 50, n. 5, p. 1865–1868, May 2006.

SIQUEIRA, J.F.; RÔÇAS, I.N. Community as the unit of pathogenicity: an emerging concept as to the microbial pathogenesis of apical periodontitis. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology**. v. 107, n. 6, p. 870-878, Jun 2009.

SPLENDIANI, A.; LIVINGSTON, A.G.; NICOLELLA, C. Control of membrane-attached biofilms using surfactants. **Biotechnology and Bioengineering**. v. 94, n. 1, p. 15–23, May 2006.

STIEFEL, P. et al. Critical aspects of using bacterial cell viability assays with the fluorophores SYTO9 and propidium iodide. **BMC Microbiology**. v. 15, n. 36, Feb 2015.

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

SUZUKI, S. et al. Antifungal substances against pathogenic fungi, talaroconvolutins, from *Talaromyces convolutus*. **Journal of Natural Products**. v. 63, n. 6, p. 768–772, Jun 2000.

SVENSATER, G.; BERGENHOLTZ, G. Biofilms in endodontic infections. **Endodontic Topics**. v. 9, p. 27-36, 2004.

TAY, J.H.; LIU, Q.S.; LIU, Y. The role of cellular polysaccharides in the formation and stability of aerobic granules. **Letters in Applied Microbiology**. v. 33, n. 3, p. 222–226, Sep 2001.

TEIXEIRA, C.S.; FELIPPE, M.S.; FELIPPE, W.T. The effect of application time of EDTA and NaOCl on intracanal smear layer removal: an SEM analysis. **International Endodontic Journal**. v. 38, n. 5, p. 285–290, May 2005.

van der WAAL, S.V. et al. Cytotoxicity, interaction with dentine and efficacy on multispecies biofilms of a modified salt solution intended for endodontic disinfection in a new in vitro biofilm model. **International Endodontic Journal**. v. 48, n. 2, p. 153-161. Feb 2015.

van der WAAL, S.V. et al. Sodium chloride and potassium sorbate: a synergistic combination against *Enterococcus faecalis* biofilms: an in vitro study. **European Journal of Oral Sciences**. v. 120, n. 5, p. 452–457, Oct 2012.

van der WAAL, S.V. et al. The effects of hyperosmosis or high pH on a dual-species biofilm of *Enterococcus faecalis* and *Pseudomonas aeruginosa*: an in vitro study. **International Endodontic Journal**. v. 44, n. 12, p. 1110-1117, Dec 2011.

van PALENSTEIN, W.H.; IJSSELDIJK, M.; HUIS IN 'T VELD, J.H. A selective medium for the two major subgroups of the bacterium *Streptococcus mutans* isolated from human dental plaque and saliva. **Archives in Oral Biology**. v. 28, n. 7, p. 599–603, 1983.

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

WALTIMO, T.M. et al. Fungi in therapy-resistant apical periodontitis. **International Endodontic Journal**. v. 30, n. 2, p. 96–101, Mar 1997.

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

WANG, Z.; SHEN, Y.; HAAPASALO, M. Dental materials with antibiofilm properties. **Dental Materials**. v. 30, n. 2, p. e1-e16, Feb 2014.

WIJNKER, J.J.; KOOP, G.; LIPMAN, L.J. Antimicrobial properties of salt (NaCl) used for the preservation of natural casings. **Food Microbiology**. v. 23, n. 7, p. 657–662, Oct 2006.

WU, M.K. et al. Prevalence and extent of long oval canals in the apical third. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology**. v. 89, n. 6, p. 739-743, Jun 200.

ZAURA-ARITE, E.; VAN MARLE, J.; TEN CATE, J.M. Confocal microscopy study of undisturbed and chlorhexidine-treated dental biofilm. **Journal of Dental Research**. v. 80, n. 5, p. 1436–1440, May 2001.