



PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
MESTRADO EM ODONTOLOGIA

VANESSA PERET JACOB

**AÇÃO ANTIMICROBIANA DO NEOMTA PLUS EM BIOFILMES SIMPLES E
MISTOS DE *Enterococcus faecalis* E *Candida albicans* : UM ESTUDO IN VITRO.**



PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
MESTRADO EM ODONTOLOGIA

VANESSA PERET JACOB

**AÇÃO ANTIMICROBIANA DO NEOMTA PLUS EM BIOFILMES SIMPLES E
MISTOS DE *Enterococcus faecalis* E *Candida albicans*: UM ESTUDO IN VITRO.**

Dissertação apresentada à Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade do Oeste Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Odontologia – Área de concentração: Clínica Odontológica

Orientadora:
Profa. Dra. Graziela Garrido Mori Panucci

Presidente Prudente - SP
2020

D65
J15a

Jacob, Vanessa Peret

Ação antimicrobiana do NeoMTA Plus em biofilmes simples e mistos de *Enterococcus faecalis* e *Candida albicans*: um estudo *in vitro* / Vanessa Peret Jacob ; orientação Graziela Garrido Mori Panucci. – Presidente Prudente, 2020.

38 f.: il.

Dissertação (Mestrado em Odontologia) - Universidade do Oeste Paulista – Unoeste, Presidente Prudente, SP, 2020.

Bibliografia.

1. Biofilmes. 2. Biomateriais. 3. *Candida albicans*. 4. *Enterococcus faecalis* I. Panucci, Graziela Garrido Mori. II. Título.

VANESSA PERET JACOB

AÇÃO ANTIMICROBIANA DO NEOMTA PLUS EM BIOFILMES SIMPLES E MISTOS DE *Enterococcus faecalis* E *Candida albicans*: UM ESTUDO IN VITRO.

Dissertação apresentada à Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade do Oeste Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Odontologia. - Área de Concentração: Clínica Odontológica.

Presidente Prudente, 24 de abril de 2020.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Graziela Garrido Mori Panucci (orientadora)
Universidade do Oeste Paulista – Unoeste
Presidente Prudente-SP

Profa. Dra. Carolina dos Santos Santinoni
Universidade do Oeste Paulista – Unoeste
Presidente Prudente-SP

Prof. Dr. Eloi Dezan Junior
Universidade Estadual Paulista - Unesp
Araçatuba - SP

DEDICATÓRIAS

A minha mãe, Saffira Jalul Peret e ao meu padrasto Célio Lourenço Bartolo, pelo incentivo, confiança e esforço para que eu pudesse concretizar mais esta etapa de minha carreira. Pela educação, amor e carinho doados ao longo de minha vida. Obrigada por tudo.

A minha irmã, Roberta Peret Jacob e meu cunhado Rodrigo Ferreira Vale, pela amizade, companheirismo e carinho.

Aos meus sobrinhos Rodrigo Jacob Vale, Raphael Jacob Vale e Rebeca Jacob Vale por preencherem meus dias com leveza, alegria e amor.

Ao meu marido, Victor Jun Iti Maeda, por estar sempre ao meu lado e por compartilhar mais este momento importante comigo.

Aos meus familiares e amigos que me prestigiam e torcem pelo meu sucesso profissional.

A Deus, pela minha saúde e por abençoar meu caminho sempre.

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora, Profa. Dra. Graziela Garrido Mori Panucci, pelo exemplo de extrema competência, dedicação e perseverança em tudo que faz. Meu reconhecimento e gratidão pela orientação durante o curso de Pós Graduação, pela confiança depositada em mim e pelos conhecimentos e experiências transmitidos. Obrigada!

Ao amigo e estimado colaborador Prof. Dr. Douglas Roberto Monteiro, pelo incentivo e apoio. Você é um grande exemplo de profissionalismo e competência a ser seguido. Obrigada pelas oportunidades proporcionadas, elas foram importantíssimas para o meu amadurecimento pessoal e científico.

À querida Profa. Dra. Christine Men Martins, pelos ensinamentos, dedicação e acolhimento. Por contribuir para meu aprimoramento clínico e científico e me ensinar tanto. Muito obrigada pela convivência e amizade.

À amiga e querida Profa. Dra. Rosana Leal do Prado, pelo incentivo, carinho e conselhos valiosos. Obrigada pelo apoio infinito.

Aos professores da Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual Paulista - Júlio de Mesquita Filho, Unesp, campus de Araçatuba pelos ensinamentos recebidos ao longo da minha vida acadêmica e, em especial, ao amigo e Prof. Dr. José Arlindo Otoboni Filho por ter me encorajado a iniciar minha atuação na área científica, pela participação, amizade e incentivo tão importantes na minha formação. Prof. Otoboni, você é especial.

Ao amigo e Prof. Dr. Valentim Adelino Ricardo Barão, por servir de inspiração, apoio e por todos os gestos de companheirismo oferecidos carinhosamente ao longo dessa jornada. Você é majestosamente especial.

Às alunas e co-orientadas de iniciação científica, Keiko Watanabe, Ana Carolina Gomes Silva, Tais Yukari e Luana Paião, pela receptividade, comprometimento, apoio e participação no trabalho.

À amiga Mariana Zamboni Pinheiro, por sua presteza e colaboração em todas as vezes que necessitei fazer a coleta dos dentes bovinos no frigorífico, tornando tal tarefa mais leve e divertida. Obrigada.

Aos amigos Thiago Augusto dos Santos Carvalho, Renata Junqueira da Fonseca, Juliana Rodrigues, Susi Chimenti, Edmilson Costa, Flávia Rigueira, Bruna Fernanda Barbosa, Eliane Zavatini e Daniel Alves, por sempre me encorajarem, acreditarem no meu potencial e me fornecerem total apoio e estrutura para que eu pudesse percorrer esse longo período com a tranquilidade e compreensão da minha ausência.

A amiga Érika Ribeiro Ramalho pelo fantástico acolhimento e carinho. O meu sincero agradecimento pela amizade e valioso companheirismo

Aos queridos amigos da pós-graduação: Beatriz Díaz Fabregat, Marcela Lucio Caldeira, João Paulo Pelagio Toneto e Érika Ribeiro Ramalho pelos agradáveis momentos de companheirismo vividos e por tudo o mais. Vocês são muito queridos.

Às queridas funcionárias e hoje amigas, Maria do Socorro Alves e Isabella Carolina Rodrigues dos Santos Goes, do Laboratório de Microbiologia e Imunologia da Unoeste, pelo empenho em me ajudar e pela maneira simpática que me receberam. Obrigada por todo carinho doado e por todos os infinitos finais de semana que trabalharam comigo. Vocês arrasam.

Ao técnico do Laboratório de Odontologia da Unoeste, Bruno Carrino Suave, sempre tão gentil e solícito, obrigada pela importante ajuda.

Aos colegas do Laboratório de Microbiologia e Imunologia da Unoeste, Rafael da Silva Rosa e Fernando Nunes Gavioli Boni pelo companheirismo, apoio moral e torcida durante toda a realização da fase experimental.

A Angelus® Indústria de Produtos Odontológicos S/A, Londrina, PR, Brasil, pela doação do biomaterial endodôntico MTA.

A JBS Friboi, Andradina, SP, Brasil, pela doação dos dentes bovinos utilizados no experimento.

“O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – (Brasil) CAPES – Código de Financiamento 001.”

RESUMO

Ação antimicrobiana do NeoMTA Plus em biofilmes simples e mistos de *Enterococcus faecalis* e *Candida albicans* : um estudo *in vitro*

Objetivo: O objetivo do presente estudo foi avaliar a capacidade antimicrobiana do NeoMTA Plus sobre biofilmes simples e mistos de *Enterococcus faecalis* e *Candida albicans*.

Materiais e Métodos: Foram utilizados 171 blocos de dentina medindo 4x4x1mm, os quais foram incubados por 2 dias, em meio contendo 1×10^7 células/mL de *C. albicans* e/ou $3,1 \times 10^8$ células/mL de *E. faecalis*. Na sequência, os blocos foram divididos aleatoriamente em 3 grupos: grupo I - não recebeu biomaterial (controle); grupo II - recebeu uma amostra de MTA após a sua presa, com as mesmas largura e espessura do bloco de dentina; e grupo III - semelhante ao grupo II, diferindo somente o biomaterial utilizado, que neste caso foi o NeoMTA Plus. Os biomateriais permaneceram em contato com os biofilmes por 24 horas. Após o período de contato, foram realizadas as análises de quantificação das unidades formadoras de colônias (UFCs) e da atividade metabólica (XTT), além da análise qualitativa da estrutura dos biofilmes por microscopia eletrônica de varredura (MEV). Os dados foram analisados e submetidos à análise estatística com nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

Resultados: Para todos os grupos houve a presença de atividade metabólica (XTT) e UFCs, não havendo diferença significativa entre os grupos ($p > 0,05$) independentemente do tipo de biofilme analisado (se simples ou misto) e, também, do biomaterial utilizado. A estrutura dos biofilmes mantiveram-se homogênea entre os grupos deste trabalho.

Conclusão: Com base nos resultados obtidos, pode-se concluir que NeoMTA Plus não foi eficaz contra os biofilmes simples ou misto de *E. faecalis* e *C. albicans*.

Relevância Clínica: Novas análises devem ser realizadas incluindo a associação dos citados biomateriais com anti-sépticos e/ou terapias coadjuvantes para remoção de biofilmes.

Palavras-chave: Biofilmes , Biomateriais, *Enterococcus faecalis*, *Candida albicans*.

ABSTRACT

Antimicrobial action of NeoMTA Plus on single and mixed biofilms of *Enterococcus faecalis* and *Candida albicans*: an in vitro study

Objective: The aim of the present study was to evaluate the antimicrobial capacity of NeoMTA Plus on simple and mixed biofilms of *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*) and *Candida albicans* (*C. albicans*).

Materials and Methods: 171 dentin blocks measuring 4x4x1mm were incubated in medium containing 1×10^7 cells/mL of *C. albicans* and/or $3,1 \times 10^8$ cells/mL of *E. faecalis* for 2 days. The blocks were randomly divided into 3 groups: group I - did not receive biomaterial; group II - received a sample of MTA after setting time, with the same width and thickness as the dentin block; and group III - similar to group II, but the biomaterial used was NeoMTA Plus. Biomaterials remained in contact with biofilms for 24 hours. In addition to the qualitative analysis of the structure of biofilms by scanning electron microscopy (SEM). After contact period, colony-forming units (UFCs) and metabolic activity (XTT) quantification analyzes were performed. Furthermore, qualitative analysis of the biofilm structure was performed through scanning electron microscopy (SEM). Data were analyzed and submitted to statistical analysis with a significance level of 5% ($p < 0.05$).

Results: For all groups it was confirmed the presence of metabolic activity (XTT) and UFCs, with no significant difference between groups ($p > 0.05$). Type of biofilm (simple or mixed) and biomaterial used (MTA or NeoMTA Plus) did not interfere the result. The biofilm structure remained homogeneous among the groups.

Conclusion: Based on the present results, it can be concluded that NeoMTA Plus was not effective against simple or mixed biofilms of *E. faecalis* and *C. albicans*.

Clinical relevance: New researches should be carried out – including the association of the aforementioned biomaterials with antiseptics and/or supporting therapies – to remove biofilms.

Keywords: Biofilms, Biomaterials, *Enterococcus faecalis*, *Candida albicans*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - A	Biomateriais utilizados e matriz de silicone para a confecção e padronização do bloco de biomaterial.....	15
Figura 1 - B	Blocos de dentina em contato com biomaterial.....	15
Figura 2- A, B,C	Imagens de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) do biofilme simples de <i>E. faecalis</i>	20
Figura 2 - D,E,F	Imagens de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) do biofilme simples de <i>C. albicans</i>	20
Figura 2 - G,H,I	Imagens de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) do biofilme misto de <i>C. albicans</i> e <i>E. faecalis</i>	20

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Média logarítmica de UFC/mm ² e média de absorvância por mm ² (XTT) para biofilmes simples de <i>C. albicans</i> de acordo com os grupos experimentais.....	18
Tabela 2 - Média logarítmica de UFC/mm ² e média de absorvância por mm ² (XTT) para biofilmes simples de <i>E.Faecalis</i> de acordo com os grupos experimentais.....	18
Tabela 3 - Média logarítmica de UFC/mm ² e média de absorvância por mm ² (XTT) para biofilmes mistos de acordo com os grupos experimentais.....	19

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	MATERIAL E MÉTODOS	13
3	RESULTADOS	18
4	DISCUSSÃO	20
5	CONCLUSÃO	24
	REFERÊNCIAS	25
	ANEXOS	32
	ANEXO A - SOLICITAÇÃO DE DOAÇÃO DE DENTES BOVINOS ENVIADA AO FRIGORÍFICO.	33
	ANEXO B - CERTIFICADO DE ESTERELIZAÇÃO POR ÓXIDO DE ETILENO.	34
	ANEXO C - REFERÊNCIA DA CEPA DE <i>Candida albicans</i> ATCC 10231	35
	ANEXO D - REFERÊNCIA DA CEPA DE <i>Enterococcus faecalis</i> CCCDE 002	37
	ANEXO E - GUIDELINES DE SUBMISSÃO DA REVISTA CLINICAL ORAL INVESTIGATION	38

1 INTRODUÇÃO

Um número significativo de novos cimentos endodônticos bioativos (BECs) vem sendo introduzido no mercado, tendo, a sua grande maioria, composições à base de silicato de cálcio [1]. Esses cimentos têm sido desenvolvidos com o intuito de minimizar os inconvenientes encontrados no seu precursor, o Mineral Trióxido Agregado (MTA), porém mantendo as adequadas propriedades físicas, químicas e biológicas deste [1].

O MTA é um cimento de silicato de cálcio baseado no cimento Portland, que foi desenvolvido na década de 90, como biomaterial endodôntico [2-7]. Possui em sua composição 75% de cimento Portland, 20% de óxido de bismuto e 5% de gesso [8] e após sua manipulação são formados silicato dicálcico e tricálcico, aluminato tricálcico, óxido tricálcico e óxido de silicato [6]. É considerado o padrão ouro de tratamento em diversas intervenções endodônticas, dentre elas: reparo em perfurações radiculares, biomaterial em cirurgias paraendodônticas, capeamento pulpar direto, pulpotomia, tampão coronário após obturação, obturação dos canais radiculares e plug na região apical em casos de revascularização [1].

Apesar de apresentar excelentes propriedades químicas, físicas e biológicas, muitas vezes o MTA deixa de ser utilizado por clínicos devido à sua dificuldade de manipulação e longo tempo de presa [8]. Além disso, possui uma grande desvantagem, que é o manchamento da coroa dos dentes nos quais foi utilizado [8]. As características físicas do MTA também podem ser influenciadas pela umidade do ambiente durante a manipulação pó-líquido e pela sua tendência de dissolução em contato com a saliva, quando já manipulado [1]. Portanto, para suprir as falhas relacionadas ao MTA, modificações têm sido realizadas nestes e novos biomateriais surgem com frequência.

Um cimento bioativo desenvolvido recentemente é o NeoMTA Plus (Avalon Biomed, Houston, TX, USA) [9]. Este baseia-se na formulação do MTA Angelus e MTA Plus (Angelus® Indústria de Produtos Odontológicos S/A, Londrina, PR, Brasil) [10], tidos como seus precursores [11]. É um biomaterial dentário à base de silicato de cálcio, e devido a adição de óxido de tântalo (Ta_2O_5) como radiopacificador, elimina a possibilidade de escurecimento dentário causado pelo MTA [11].

Segundo Tanomaru-Filho et al. [11], a substituição do óxido de bismuto por Ta_2O_5 não afetou a biocompatibilidade e a bioatividade deste material. Em estudo de

2015, Camilleri [12] afirmou que Neo MTA Plus possui radiopacidade adequada e não causa descoloração ou manchamento dentário. Ele produz hidróxido de cálcio, resultante da reação de hidratação do silicato tricálcico, o que é fundamental para a indução e formação de tecido mineralizado. Somado a isso, ainda apresenta potencial de formar fosfato de cálcio, demonstrando alta reatividade quando em contato com fluidos teciduais.

A ação antimicrobiana também representa uma importante propriedade para os biomateriais, visto que a presença de microrganismos no interior da massa dentinária e na região periapical podem interferir decisivamente no sucesso do tratamento [13,14]. Esses microrganismos, em especial *Enterococcus faecalis* e *Candida albicans* [15,16] podem estar organizados em biofilmes microbianos [17], tornando-se relevante avaliar o poder antimicrobiano de novos biomateriais sobre biofilmes [18].

Portanto, a determinação da ação antimicrobiana do NeoMTA Plus sobre biofilmes simples e mistos de *E. faecalis* e *C. albicans*, considerados microrganismos de difícil eliminação, é fundamental para a sedimentação do seu uso clínico ou abordagens diferenciadas durante os protocolos para uso.

Considerando os aspectos abordados acima, o objetivo do presente estudo foi avaliar a capacidade antimicrobiana do Neo MTA Plus sobre biofilmes simples e mistos de *E. faecalis* e *C. albicans*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

A metodologia utilizada neste trabalho foi baseada e adaptada dos trabalhos publicados por Faria-Junior et al. [19], Arias et al. [20], Do Vale et al. [21] e Monteiro et al [22].

2.1 Preparo dos espécimes

Foram utilizados 171 blocos de dentina oriundos de incisivos centrais bovinos com raízes completas. Os dentes foram obtidos por meio de doação feita pelo frigorífico JBS - Friboi, localizado na cidade de Andradina, interior do Estado de São Paulo após o abate dos animais para consumo (Anexo A). Os tecidos moles e possíveis cálculos aderidos na superfície radicular foram removidos com auxílio de curetas periodontais (S.S. White Artigos Dentários Ltda – Juiz de Fora, MG, Brasil).

Posteriormente, os dentes foram colocados em solução fisiológica (Eurofarma, São Paulo, SP, Brasil) e armazenados em geladeira.

As raízes dentárias foram seccionadas com o auxílio de disco diamantado (Isomet, Lake Bluff, IL, EUA), montado em baixa rotação (cortadeira), sob irrigação abundante. Os cortes permitiram a obtenção de blocos de dentina com 4 mm de largura, 4 mm de comprimento e 1mm de espessura; sendo que de cada raiz dentária foi possível confeccionar 2 blocos.

Na sequência, os blocos de dentina obtidos foram distribuídos aleatoriamente e posicionados no interior de placas de 24 poços (Costar, Tewksbury, EUA). Estas foram embaladas em papel gral cirúrgico e esterilizadas com óxido de etileno (Anexo B) para a remoção de qualquer contaminação pré-existente.

2.2 Cepas de microrganismos e condições de crescimento microbiano

As seguintes cepas de referência da *American Type Culture Collection* (ATCC) e *Coleção de Culturas Cefar Diagnóstica* (CCCD), respectivamente foram utilizadas: *C. albicans* ATCC 10231 e *E. faecalis* CCCDE 002. Culturas dos microrganismos mantidas a -70 °C em glicerina foram semeadas em Agar Sabouraud Dextrose (ASD; Difco, Le Pont de Claix, França) e Agar Infusão de Cérebro e Coração (BHI Agar; Difco), respectivamente para *C. albicans* e *E. faecalis*. Cada microrganismo foi cultivado por 24 horas a 37 °C. Para *C. albicans*, uma alçada da cepa obtida das placas de ASD foi suspensa em 10 mL de caldo Sabouraud Dextrose (Difco) e incubada a 37 °C durante a noite, sob agitação de 120 rpm. Colônias de *E. faecalis* foram inoculadas em 10 mL de caldo BHI (Difco) e incubadas estaticamente durante a noite a 37 °C.

Após o período de incubação, as células fúngicas e bacterianas foram recuperadas por centrifugação a 8000 rpm por 5 minutos a 15 °C, e os “pellets” de células foram lavados duas vezes com 10 mL de solução salina tamponada com fosfato (PBS; pH 7). A quantidade de células fúngicas foi ajustada para uma concentração de 1×10^7 células/mL em caldo BHI com auxílio de uma Câmara de Neubauer e um microscópio óptico, enquanto a quantidade de células bacterianas foi ajustada espectrofotometricamente para uma concentração de $3,1 \times 10^8$ células/mL em caldo BHI.

2.3 Contaminação dos espécimes e formação de biofilme

Os blocos de dentina, devidamente esterilizados dentro das placas de 24 poços, receberam 1 mL do inóculo de cada cepa (preparado no item 2.2) em cultura simples (1000 μ L de 1×10^7 células/mL *C. albicans* ou 1000 μ L de $3,1 \times 10^8$ células/mL *E. faecalis*) e mista (500 μ L de 2×10^7 células/mL *C. albicans* + 500 μ L de $6,2 \times 10^8$ células/mL *E. faecalis*). As placas foram incubadas em estufa a 37 °C por 2 dias, permitindo a formação de biofilme sobre os blocos de dentina. O meio de cultura (caldo BHI) foi renovado completamente após 24 horas, sem a adição de novos microrganismos.

2.4 Ação dos biomateriais sobre os biofilmes

Após o período de 2 dias, os biomateriais foram manipulados de acordo com as recomendações do fabricante e inseridos sobre uma matriz feita com Silatec, (Dental Milestones Guaranteed-DMG, Hamburgo, Alemanha) confeccionada a partir da moldagem dos próprios blocos de dentina dispostos na tampa de uma placa de 24 poços (Figura 1A). Desta forma, pode-se padronizar a quantidade de biomaterial compatível com o tamanho dos blocos dentina (4 mm x 4 mm x 1mm).

Após 4 horas da espatulação dos biomateriais e inserção dos mesmos na matriz, o corpo de prova obtido foi deslocado cuidadosamente da matriz e colocado sobre os blocos de dentina contendo os biofilmes (Figura 1B), com auxílio de pinça clínica estéril.

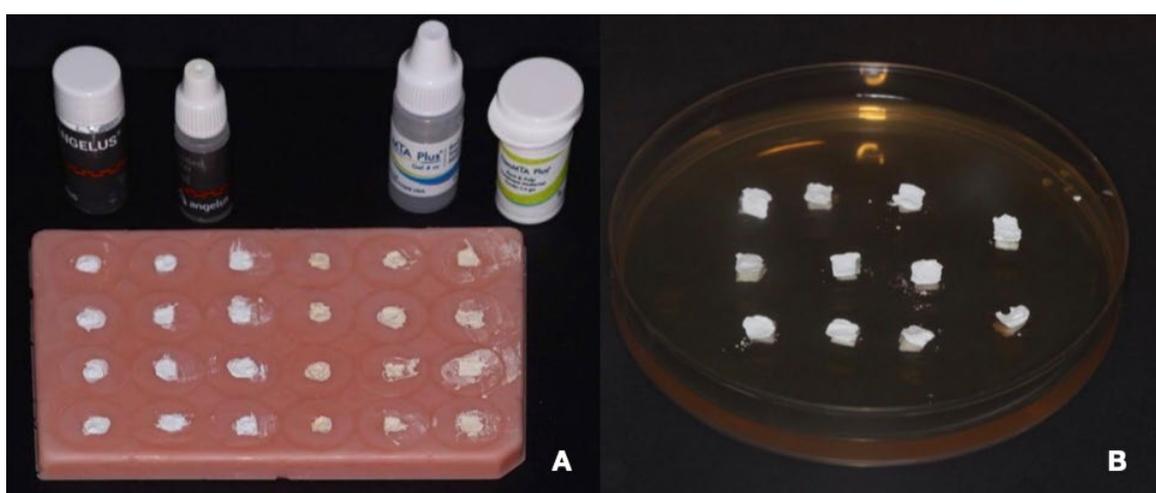


Figura 1: A - Biomateriais utilizados e matriz de silicone para confecção e padronização dos blocos de biomaterial; B - Blocos de dentina em contato com biomaterial.

Assim, pode-se determinar os seguintes grupos de acordo com o biomaterial utilizado:

- Grupo Controle (Grupo C [n= 57]), não recebeu biomaterial;
- Grupo MTA ([n= 57] Angelus® Indústria de Produtos Odontológicos S/A, Londrina, Paraná, Brasil.), recebeu uma amostra padronizada de MTA após a sua presa, com dimensões semelhantes ao bloco de dentina;
- Grupo NeoMTA Plus ([n= 57] Avalon Biomed, Houston, TX, USA), recebeu uma amostra padronizada de NeoMTA Plus após a sua presa, com dimensões semelhantes ao bloco de dentina .

Cada espécime foi inserido em placas de petri estéreis e umidificado com 20 mL de PBS estéril. As placas de petri foram incubadas em estufa a 37 °C por 24 horas.

Após o período de contato do biomaterial com o biofilme (24h), realizou-se análises de quantificação das células cultiváveis, da atividade metabólica dos biofilmes resultantes e da estrutura dos biofilmes.

2.5 Forma de análise dos resultados

2.5.1 Quantificação das células cultiváveis

O número de células cultiváveis foi avaliado pela quantificação das unidades formadoras de colônias (UFCs) [20]. Assim, após o período de contato dos biofilmes com os biomateriais, os blocos de dentina foram transferidos para tubos falcon contendo PBS e vortexados por 90 segundos.

Para a quantificação de UFCs dos biofilmes simples de *C. albicans* e *E. faecalis*, as diluições foram plaqueadas em Agar Sabouraud Dextrose (ASD; Difco) e BHI agar, respectivamente. Para a quantificação de UFCs do biofilme misto, utilizou-se Chromagar *Candida* (Difco) e BHI agar suplementado com anfotericina B (Sigma-Aldrich). Após 24 horas de incubação a 37°C, com exceção do Chromagar *Candida* (Difco) que, por sua vez, permaneceu por 48 horas na incubação, foi realizada a contagem do número de unidades formadoras de colônias.

Os experimentos foram realizados em triplicata, em 3 ocasiões diferentes, e todos os resultados foram representados como $\text{Log}_{10} \text{UFC/mm}^2$.

2.5.2 Avaliação da atividade metabólica

A atividade metabólica foi avaliada através do ensaio de redução do XTT (2,3-bis (2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-5-[(phenylamino)carbonyl]-2H-tetrazolium

hydroxide; Sigma-Aldrich) após o período de contato dos biomateriais com os biofilmes [21].

Os blocos de dentina contendo os biofilmes resultantes, como também os blocos considerados “brancos”, os quais passaram pelo mesmo processo de incubação dos demais grupos, contudo sem entrarem em contato com nenhum tipo de microrganismo ou biomaterial, sendo utilizados apenas com o propósito de eliminação da leitura do comprimento de onda referente a dentina, foram transferidos para placas de 96 poços contendo 200 µL de uma solução de 150 mg XTT/L e 10 mg de metassulfato de fenazina/L em cada poço. As placas foram incubadas a 37 °C no escuro, com agitação de 120 rpm. Após 3 horas, a absorbância foi lida a 490 nm. Os valores de absorbância foram padronizados por unidade de área dos blocos de dentina (absorbância/mm²).

Os experimentos foram realizados em triplicata, em 3 ocasiões diferentes.

2.5.3 Avaliação da estrutura dos biofilmes

A Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) [22] foi utilizada para examinar a estrutura dos biofilmes após contato com os biomateriais. Imagens do grupo controle também foram incluídas nesta análise. Para a análise, os biofilmes resultantes foram desidratados com álcool (usando etanol 70% por 10 minutos, etanol 95% por 10 minutos e etanol 100% por 20 minutos) e secos ao ar por 20 minutos. Posteriormente, as amostras de biofilmes foram montadas em stubs de alumínio, revestidas com ouro e observadas em um microscópio eletrônico de varredura (S-360, Leo, Cambridge, EUA).

2.6 Análise estatística

Os dados obtidos foram organizados em tabelas específicas e o teste de Shapiro-Wilk foi utilizado para a avaliação da normalidade e a homocedasticidade daqueles. Na sequência, os dados foram submetidos à Análise de Variância (ANOVA), com exceção dos dados para o XTT de biofilme simples de *E. faecalis*, os quais foram submetidos ao teste Kruskal-Wallis. Para todos os testes, foi fixado o nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

3 RESULTADOS

As tabelas 1, 2 e 3 mostram as médias logarítmicas de UFCs/mm², bem como as médias de absorvância por mm² obtidas a partir do ensaio de redução do XTT para avaliação quantitativa de viabilidade celular, após 24 horas de contato dos biofilmes de *C. albicans*, *E. faecalis* e misto, respectivamente (Tabelas 1, 2 e 3). A comparação entre os biomateriais revelou que não houve diferença significativa em relação ao grupo controle ($p > 0,05$). Os biofilmes não foram completamente eliminados, independentemente do tipo, se simples ou misto e, também, do biomaterial utilizado.

Tabela 1. Média logarítmica de UFC/mm² e média de absorvância por mL² (XTT) para biofilmes simples de *C. albicans* de acordo com os grupos experimentais.

Grupos	UFC/mL ⁻²	XTT (Absorb/mL ⁻²)
Grupo C	5,91 ± 0,03	0,08 ± 0,011
Grupo MTA	5,72 ± 0,17	0,09 ± 0,014
Grupo NeoMTA Plus	5,49 ± 0,30	0,09 ± 0,009

Tabela 2. Média logarítmica de UFC/mm² e média de absorvância por mL² (XTT) para biofilmes simples de *E. faecalis* de acordo com os grupos experimentais.

Grupos	UFC/mL ⁻²	XTT (Absorb/mL ⁻²)
Grupo C	6,43 ± 0,45	0,11 ± 0,046
Grupo MTA	6,72 ± 0,40	0,09 ± 0,015
Grupo NeoMTA Plus	6,58 ± 0,52	0,11 ± 0,045

Tabela 3. Média logarítmica de UFC/mm² e média de absorvância por mL² (XTT) para biofilmes mistos de acordo com os grupos experimentais.

Grupos	UFC/mL ⁻² <i>C. albicans</i>	UFC/mL ⁻² <i>E. faecalis</i>	XTT (absorb/mL ⁻²)
Grupo C	6,02 ± 0,12	6,94 ± 0,40	0,07 ± 0,003
Grupo MTA	5,97 ± 0,25	7,02 ± 0,56	0,07 ± 0,004
Grupo NeoMTA	5,90 ± 0,35	6,66 ± 0,36	0,07 ± 0,012

Ao analisar as imagens obtidas por meio da MEV, verificou-se a presença de biofilme monocamada de *E. faecalis* recobrando parcialmente a superfície dos espécimes analisados, independente do grupo experimental (Figura 2A a C). O biofilme simples de *C. albicans* revelou uma densa rede de leveduras e hifas interconectadas, cobrindo totalmente a superfície dos espécimes, independente do grupo analisado (Figura 2D a F). A estrutura do biofilme misto manteve-se homogênea entre os diferentes grupos do presente trabalho, evidenciando uma arquitetura robusta composta por multicamadas de leveduras e células bacterianas (Figura 2G a I).

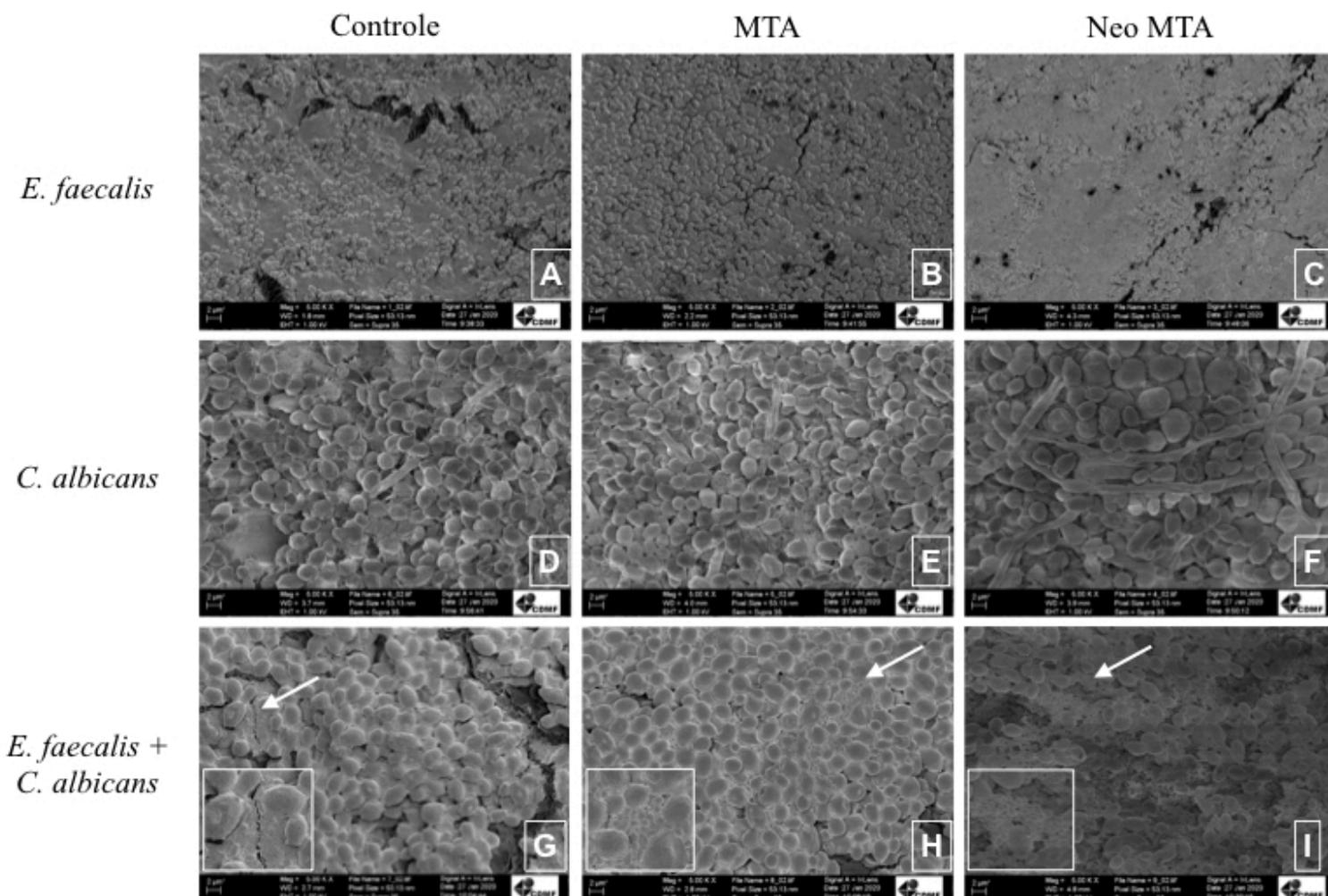


Figura 2 - Imagens de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) dos biofilmes simples de *E. faecalis* (A a C), *C. albicans* (D a F) e misto das duas espécies (G a I) formados na superfície dos blocos de dentina e expostos ou não aos biomateriais estudados. As imagens presentes no canto inferior esquerdo das figuras 2G, 2H e 2I representam a ampliação das áreas identificadas pelas setas brancas. Magnificação: 5000 X. Barras: 2 μ m.

4 DISCUSSÃO

Este estudo analisou a capacidade antimicrobiana do NeoMTA Plus, um novo cimento endodôntico bioativo, comparando-o a um de seus precursores, o MTA Angelus.

Os resultados da avaliação da atividade metabólica e das UFCs mostraram presença de biofilme em todos os grupos experimentais, evidenciando a ausência de

ação antimicrobiana sobre biofilmes simples e mistos de *E. faecalis* e *C. albicans*. Esses resultados estão em linha com a análise qualitativa de MEV, a qual não mostrou diferenças estruturais entre os biofilmes do grupo controle e aqueles expostos aos biomateriais.

Esses achados foram semelhantes aos encontrados por Jardine et al. [17], em 2018. No citado trabalho, os autores avaliaram a ação antimicrobiana do NeoMTA Plus, Biodentine e MTA sobre biofilmes multiespécies. Verificou-se que nenhum dos cimentos testados foi capaz eliminar de maneira efetiva os microrganismos presentes no biofilme, visto que cerca de 50% destes permaneceram viáveis após o contato com os biomateriais.

Outros trabalhos também evidenciaram o poder antibacteriano limitado do MTA sobre *E. faecalis*, demonstrando que ele é menos eficiente quando misturado à água estéril do que versões associadas à partícula de prata, a qual apresentou melhor resultado, seguida pela associação do MTA com clorexidina 2%. [23]. Quando os microrganismos encontram-se organizados em biofilmes, a ação antimicrobiana do MTA também parece não ser tão efetiva [17].

Uma revisão da literatura conduzida por Parirokh e Torabinejad [7], em 2010, mostrou que o MTA tem efeito antibacteriano e antifúngico comprovados. Porém, segundo os vários estudos analisados por estes autores, a redução da proporção pó/líquido, a fonte do material de preparação do MTA e as várias espécies dos microrganismos testados podem afetar de maneira adversa tal propriedade antimicrobiana [24-38].

A ação antimicrobiana do MTA Angelus está fortemente associada à sua capacidade prolongada de liberação de íons hidroxila. Esse íon hidroxila dissociado cria um ambiente de alto pH, inibindo atividades enzimáticas essenciais para o metabolismo microbiano, crescimento e divisão celular [39].

Em estudo recente, ElReash et al. [40], utilizando o método de difusão em ágar para testar a exposição direta de alguns microrganismos (*E. faecalis*, *Enterococcus faecum*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans*, *Porphyromonas gingivalis* e *C. albicans*) aos biomateriais recém manipulados, deixando-os em contato por 48 horas, sendo feitas leituras das zonas de inibição com 12, 24 e 48 horas, evidenciaram que os cimentos à base de silicato de cálcio apresentaram uma potencial atividade antimicrobiana sobre diversas espécies, inclusive, *E. faecalis* e *C. albicans*, principalmente devido à sua alta alcalinidade,

corroborando com o descoberto por Estrela et al. [41] em 1995, que demonstraram que o pH elevado e a alcalinidade obtida mediante liberação dos íons hidroxila afetam a membrana celular e a atividade enzimática dos microrganismos [41]. Investigações anteriores avaliaram o efeito antimicrobiano do MTA Angelus sobre *S. mutans*, *Streptococcus salivarius* e *Streptococcus sanguis*, também utilizando o método de difusão em ágar e mantendo o cimento endodôntico por 24 horas em contato com os microrganismos, sendo feitas leituras dos halos de inibição após 24 e 48 horas, tendo como resultado uma ação antimicrobiana valiosa, porém variável conforme os diferentes estreptococos e menos eficiente que os cimentos à base de hidróxido de cálcio testados durante o mesmo experimento [42]. Uma diferença importante em relação às metodologias desenvolvidas por tais pesquisas e este estudo, é que, exceto no trabalho de Jardine et al.[17], os microrganismos avaliados não foram cultivados com intuito de promover a formação de biofilme, o que pode ser uma justificativa decisiva frente aos diferentes resultados encontrados.

Embora haja poucos estudos publicados sobre as propriedades físico-químicas do NeoMTA Plus, sua composição à base de silicato de cálcio, semelhante ao MTA Angelus e ao MTA Plus, pode permitir inferências entre tais materiais, pois o pó dos mesmos difere apenas no tipo de radiopacificador adicionado [11]. Siboni et al. [43] constataram que o NeoMTA Plus é capaz de elevar consideravelmente o pH do meio e manter essa característica por um período mais prolongado do que o MTA Plus. Tal fato pode estar relacionado à sua maior solubilidade e à formação de uma camada de fosfato de cálcio (CaP) em sua superfície [43,44]. Ainda relatado por Siboni et al. [43], essa capacidade de liberação e difusão ativa de hidróxido de cálcio dos cimentos através da dentina, formando CaP pode estar correlacionada à propriedade antimicrobiana dos mesmos, além de ser interessante para aumentar a estabilidade destes dentro do canal radicular, melhorando assim a vedação e, conseqüentemente, diminuindo as chances de contaminação por novos microrganismos. Entretanto, os autores sinalizam a necessidade de mais estudos a serem conduzidos com intuito de confirmar tal achado.

No presente estudo, a indução à formação dos biofilmes teve como objetivo simular uma situação clínica de infecção secundária ou persistente, considerando os microrganismos mais resistentes: *E. faecalis* e *C. albicans* [45-47].

Enterococcus faecalis trata-se de uma bactéria gram-positiva, anaeróbia facultativa e altamente virulenta, especialmente devido à sua capacidade de aderir

às superfícies e formar comunidades microbianas incorporadas em uma matriz de substâncias poliméricas extracelulares [48]. Por sua vez, *C. albicans* é um fungo considerado aeróbio, no entanto, atualmente já é sabida a sua capacidade como anaeróbio facultativo [49]. Estudos recentes demonstram que a frequência desse microrganismo no interior dos canais radiculares em infecções persistentes pode variar de 18 a 22% [21, 22, 50].

Os microrganismos utilizados nesta pesquisa, para contaminação dos espécimes e formação dos biofilmes, foram originários de cepas obtidas a partir de uma cultura de paciente com broncomiiose, no caso de *C. albicans*, (Anexo C) e de uma cultura com origem em urina, em relação a *E. faecalis* (Anexo D), podendo este fato também ter se comportado como um obstáculo para uma atuação antimicrobiana mais eficiente do cimento endodôntico avaliado, já que a produção de enzimas e o conseqüente poder de virulência de cepas podem ser diferentes dependendo do seu local de extração [51].

Com base nos resultados e métodos utilizados por Jardine et al. [17], NeoMTA Plus não foi eficaz contra biofilmes multi-espécies. Segundo os autores, isso talvez possa ser explicado devido a dentina ter promovido um efeito tampão sobre o pH alcalino do cimento, tendo diminuído a propriedade antimicrobiana deste [52]. Hiremath et al. [53] avaliaram MTA Plus, precursor do NeoMTA Plus, e aquele não apresentou capacidade antibacteriana sobre *E. faecalis*, porém foi eficaz sobre *C. albicans*. Os autores justificam que o poder antibacteriano possa ter sido reduzido devido ao tempo que o biomaterial ficou em contato com os microrganismos (3 dias). Formosa et al. [54] relataram que a liberação de íons hidroxila e o subsequente aumento do pH, levando à natureza alcalina do material, são significativos somente após 7 a 14 dias. Entretanto, a pesquisa de Siboni et al. [43] demonstrou que MTA Plus e NeoMTA Plus induziram a alcalinização do meio logo após 3 horas de imersão e que o pH começou a diminuir depois de 3 dias, mantendo essa característica até os 28 dias de análises. Já a liberação de íons cálcio ocorreu imediatamente após a imersão da amostra, atingindo seu nível máximo após 3 horas, em ambos os materiais, sendo mais significativa para o NeoMTA Plus durante os 3 primeiros dias. Essa liberação foi diminuindo após 7 dias, comportando-se assim até os 28 dias, demonstrando atividade residual a longo prazo.

No presente trabalho, o tempo de contato dos biomateriais com os biofilmes foi de 1 (um) dia, já que nas primeiras 24 horas são esperadas suas atividades

antimicrobianas máximas [55, 56], considerando-se que elas sejam sustentadas pela alcalinização do meio logo após a manipulação [43]. Análises com diferentes tempos de contato do biomaterial com os biofilmes podem ser realizadas para a confirmação dos resultados obtidos.

Sendo desconsideradas as diferenças metodológicas durante a indução da formação de biofilme, nosso estudo vem ao encontro dos resultados obtidos por Jardine et al. [17], visto que naquela investigação, o NeoMTA Plus também não demonstrou capacidade antimicrobiana estatisticamente significativa. Tal fato talvez possa ser explicado pela presença dos biofilmes, que apresentam maior resistência aos agentes antimicrobianos [45-47].

Este estudo, assim como outros presentes na literatura [57-60], chama atenção para a importância da desinfecção química e mecânica durante o preparo do sistema de canais radiculares, como forma de redução da microbiota ali presente e, também, da presença de propriedade antimicrobiana nos biomateriais utilizados na terapia, para que possam ter ação contra microrganismos residuais e resistentes, impedindo a sua proliferação.

Para estabelecer-se completamente a capacidade antimicrobiana do NeoMTA Plus, torna-se interessante a condução de novas investigações com metodologias padronizadas que permitam comparações mais fiéis entre os resultados e auxiliem desta forma a condução tanto de estudos *in vivo*, quanto clínicos.

5 CONCLUSÃO

Com base nos resultados e metodologia utilizada, pode-se concluir que NeoMTA Plus não foi eficaz contra os biofilmes simples ou misto de *E. faecalis* e *C. albicans*.

REFERÊNCIAS

1. Torabinejad M, Parirokh M, Dummer PMH (2018) Mineral trioxide aggregate and other bioactive endodontic cements: an updated overview – part II: other clinical applications and complications. *Int Endod J* 51(3):284–317. <https://doi.org/10.1111/iej.12843>
2. Torabinejad M, Hong CU, McDonald F, Pitt Ford TR (1995) Physical and chemical properties of a new root-end filling material. *J Endod* 21(7):349-353. [https://doi.org/10.1016/S0099-2399\(06\)80967-2](https://doi.org/10.1016/S0099-2399(06)80967-2)
3. Torabinejad M, Hong CU, Pitt Ford TR, Kettering JD (1995) Cytotoxicity of four root end filling materials. *J Endod* 21(10):489-492. [https://doi.org/10.1016/s0099-2399\(06\)80518-2](https://doi.org/10.1016/s0099-2399(06)80518-2)
4. Torabinejad M, Rastegar AF, Kettering JD, Pitt Ford TR (1995) Bacterial leakage of mineral trioxide aggregate as a root-end filling material. *J Endod* 21(3):109-112. [https://doi.org/10.1016/s0099-2399\(06\)80433-4](https://doi.org/10.1016/s0099-2399(06)80433-4)
5. Torabinejad M, Smith PW, Kettering JD, Pitt Ford TR (1995) Comparative investigation of marginal adaptation of mineral trioxide aggregate and other commonly used root-end filling materials. *J Endod* 21(6):295-299. [https://doi.org/10.1016/S0099-2399\(06\)81004-6](https://doi.org/10.1016/S0099-2399(06)81004-6)
6. Naghavi N, Ghoddusi J, Sadengenia HR, Asadpour E, Asgary S (2014) Genotoxicity and cytotoxicity of mineral trioxide aggregate and calcium enriched mixture cements on L929 mouse fibroblast cells. *Dent Mater J* 33(1):64-69. <https://doi.org/10.4012/dmj.2013-123>
7. Parirokh M, Torabinejad M (2010) Mineral trioxide aggregate: a comprehensive literature review--Part I: chemical, physical, and antibacterial properties. *J Endod* 36(1):16-27. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2009.09.006>
8. Kaur M, Singh H, Dhillon JS, Batia M, Saini M (2017) MTA versus Biodentine: Review of Literature with a Comparative Analysis. *J Clin Diagn Res* 11(8):ZG01-ZG05. <https://doi.org/10.7860/JCDR/2017/25840.10374>
9. Avalon Biomed, Houston, TX, USA. Publishing Avalonbiomed <http://avalonbiomed.com/neomta/> Accessed 20 Nov 2019.
10. Angelus® Indústria de Produtos Odontológicos S/A, Londrina, PR, Brasil. <http://angelus.ind.br/MTA-Angelus-10.html> Accessed 20 Nov 2019.

11. Tanomaru-Filho M, Andrade AS, Rodrigues EM, Viola KS, Faria G, Camilleri J, Guerreiro-Tanomaru JM (2017) Biocompatibility and mineralized nodule formation of Neo MTA Plus and an experimental tricalcium silicate cement containing tantalum oxide. *Int Endod J* 50(2):e31-e39. <https://doi.org/10.1111/iej.12780>
12. Camilleri J (2015) Staining Potential of Neo MTA Plus, MTA Plus, and Biodentine Used for Pulpotomy Procedures. *J Endod* 41(7):1139-1145. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2015.02.032>
13. Sen BH, Piskin B, Demirci T (1995) Observation of bacteria and fungi in infected root canals and dentinal tubules by SEM. *Dent Traumatol* 11(1):6-9.
14. Tronstad L, Barnett F, Cervone F (1990) Periapical bacterial plaque in teeth refractory to endodontic treatment. *Endod Dent Traumatol* 6(2):73-77. <https://doi.org/10.1111/j1600-9657.1990.tb00394.x>
15. Evans M, Davies JK, Sundqvist G, Figdor D (2002) Mechanisms involved in the resistance of *Enterococcus faecalis* to calcium hydroxide. *Int Endod J* 35(3):221-8. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2591.2002.00504.x>
16. Safavi KE, Spngberg LS, Langeland K (1990) Root canal dentinal tubule disinfection. *J Endod*. 16(5):207-210. [https://doi.org/10.1016/s0099-2399\(06\)81670-5](https://doi.org/10.1016/s0099-2399(06)81670-5)
17. Jardine AP, Montagner F, Quintana RM, Zaccara IM, Kopper PMP (2018) Antimicrobial effect of bioceramic cements on multispecies microcosm biofilm: a confocal laser microscopy study. *Clin Oral Investig* 23(3): 1367-1372. <https://doi.org/10.1007/s00784-018-2551-6>
18. Cruz MR, Graham CE, Gagliano BC, Lorenz MC, Garsin DA (2013) *Enterococcus faecalis* inhibits hyphal morphogenesis and virulence of *Candida albicans*. *Infect Immun* 81(1):189-200. <https://doi.org/10.1128/IAI.00914-12> *Infect Immun*
19. Faria-Júnior NB, Tanomaru-Filho M, Berbert FL, Guerreiro-Tanomaru JM (2013) Antibiofilm activity, pH and solubility of endodontic sealers. *Int Endod J* 46(8):755-762. <https://doi.org/10.1111/iej.12055>.
20. Arias LS, Delbem AC, Fernandes RA, Barbosa DB, Monteiro DR (2016) Activity of tyrosol against single and mixed-species oral biofilms. *J Appl Microbiol* 120(5):1240-1249. <https://doi.org/10.1111/jam.13070>

21. do Vale LR, Delbem A, Arias LS, Fernandes RA, Vieira A, Barbosa DB, Monteiro DR. (2017) Differential effects of the combination of tyrosol with chlorhexidine gluconate on oral biofilms. *Oral Dis* 23(4):537-541. <https://doi.org/10.1111/odi.12648>
22. Monteiro DR, Silva S, Negri M, Gorup LF, de Camargo ER, Oliveira R, Barbosa DB, Henriques M (2013) Silver colloidal nanoparticles: effect on matrix composition and structure of *Candida albicans* and *Candida glabrata* biofilms. *J Appl Microbiol* 114(4):1175-1183. <https://doi.org/10.1111/jam.12102>
23. Ghatole K, Patil A, Giriappa RH, Singh TV, Jyotsna SV, Rairam S (2016) Evaluation of Antibacterial Efficacy of MTA with and without Additives Like Silver Zeolite and Chlorhexidine. *J Clin Diagn Res* 10 (6) ZC11-4. <https://doi.org/10.7860/JCDR/2016/18014.7913>
24. Holt DM, Watts JD, Beeson TJ, Kirkpatrick TC, Rutledge RE (2007) The antimicrobial effect against enterococcus faecalis and the compressive strength of two types of mineral trioxide aggregate mixed with sterile water or 2% chlorhexidine liquid. *J Endod* 33(7):844–847. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2007.04.006>
25. Stowe TJ, Sedgley CM, Stowe B, Fenno JC (2004) The effects of chlorhexidine gluconate (0.12%) on the antimicrobial properties of tooth-colored ProRoot mineral trioxide aggregate. *J Endod* 30:429–431. <https://doi.org/10.1111/odi.12648>
26. Estrela C, Bammann LL, Estrela CR, Silva RS, Pécora JD (2000) Antimicrobial and chemical study of MTA, Portland cement, calcium hydroxide paste, Sealapex and Dycal. *Braz Dent J* 11:3–9.
27. Torabinejad M, Hong CU, Pitt Ford TR, Kettering JD (1995) Antibacterial effects of some root end filling materials. *J Endod* 21(8):403–406. 10.1016 / s0099-2399 (06) 80824-1
28. Al-Nazhan S, Al-Judai A (2003) Evaluation of antifungal activity of mineral trioxide aggregate. *J Endod* 29(12):826–827. doi:10.1097/00004770-200312000-00010
29. Miyagak DC, de Carvalho EM, Robazza CR, Chavasco JK, Levorato GL (2006) In vitro evaluation of the antimicrobial activity of endodontic sealers. *Braz Oral Res* 20(4):303–306. <https://doi.org/10.1590 / s1806-83242006000400004>
30. Al-Hezaimi K, Al-Hamdan K, Naghshbandi J, Oglesby S, Simon JH, Rotstein I (2005) Effect of white-colored mineral trioxide aggregate in different concentrations on *Candida albicans* in vitro. *J Endod* 31(9):684–686 <https://doi.org/10.1097 / 01.don.0000157983.12835.e0>

31. Al-Hezaimi K, Naghshbandi J, Oglesby S, Simon JH, Rotstein I (2006) Comparison of anti-fungal activity of white-colored and gray-colored mineral trioxide aggregate (MTA) at similar concentrations against *Candida albicans*. *J Endod* 32(4): 365–367. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2005.08.014>
32. Al-Hezaimi K, Al-Shalan TA, Naghshbandi J, Oglesby S, Simon JH, Rotstein I (2006) Anti-bacterial effect of two mineral trioxide aggregate (MTA) preparations against *Enterococcus faecalis* and *Streptococcus sanguis* in vitro. *J Endod* 32(11):1053–1056. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2006.06.004>
33. Mohammadi Z, Modaresi J, Yazdizadeh M (2006) Evaluation of the antifungal effects of mineral trioxide aggregate materials. *Aust Endod J* 32(3):120–122. <https://doi.org/10.1111/j.1747-4477.2006.00032.x>
34. Tanomaru-Filho M, Tanomaru JM, Barros DB, Watanabe E, Ito IY (2007) In vitro antimicrobial activity of endodontic sealers, MTA-based cements and Portland cement. *J Oral Sci* 49(1):41–45. <https://doi.org/10.2334/josnusd.49.41>
35. Asgary S, Kamrani FA (2008) Antibacterial effects of five different root canal sealing materials. *J Oral Sci* 50(4):469–474. <https://doi.org/10.2334/josnusd.50.469>
36. Zhang H, Pappen FG, Haapasalo M (2009) Dentin enhances the antibacterial effect of mineral trioxide aggregate and bioaggregate. *J Endod* 35(2):221–224. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2008.11.001>
37. Reynaud A, Geijersstam A, Culak R, et al. (2007) Comparative analysis of virulence determinants and mass spectral profiles of Finnish and Lithuanian endodontic *Enterococcus faecalis* isolates. *Oral Microbiol Immunol* 22(2):87–94. <https://doi.org/10.1111/j.1399-302X.2007.00327.x>
38. Portenier I, Haapasalo H, Rye A, Waltimo T, Ørstavik D, Haapasalo M (2001) Inactivation of root canal medicaments by dentine, hydroxyapatite and bovine serum albumin. *Int Endod J* 34(3):184–188. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2591.2001.00366.x>
39. Dalmia S, Gaikwad A, Samuel R, Aher G, Gulve M, Kolhe S (2018) Antimicrobial efficacy of different endodontic sealers against *Enterococcus faecalis*: An In vitro study. *J Int Soc Prev Community Dent* 8(2):104–109. https://doi.org/10.4103/jispcd.JISPCD_29_18
40. ElReash AA, Hamama H, Eldars W, Lingwei G, Zaen El-Din AM, Xiaoli X (2019) Antimicrobial activity and pH measurement of calcium silicate cements versus new

- bioactive resin composite restorative material. *BMC Oral Health* 4;19(1):235. <https://doi.org/10.1186/s12903-019-0933-z>
41. Estrela C, Sydney GB, Bammann LL, Felipe Júnior O (1995) Mechanism of action of calcium and hydroxyl ions of calcium hydroxide on tissue and bacteria. *Braz Dent J.* 6(2):85–90.
42. Poggio C, Arciola CR, Beltrami R, et al. (2014) Cytocompatibility and antibacterial properties of capping materials. *ScientificWorldJournal* 181945. <https://doi.org/10.1155/2014/181945>
43. Siboni F, Taddei P, Prati C, Gandolfi MG (2017) Properties of NeoMTA Plus and MTA Plus cements for endodontics. *Int Endod J* 50 (Supl 2):83–94. <https://doi.org/10.1111/iej.12787>
44. Gandolfi MG, Siboni F, Primus CM, Pratti C (2014) Ion release, porosity, solubility, and bioactivity of MTA Plus tricalcium silicate. *J Endod* 40(10):1632–1637. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2014.03.025>
45. Seltzer S, Faber PA (1994) Microbiologic factors in endodontology. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 78(5):634–645. [https://doi.org/10.1016/0030-4220\(94\)90178-3](https://doi.org/10.1016/0030-4220(94)90178-3)
46. Siqueira-Júnior JF, Rôças IN, Souto R, Uzeda M, Colombo AP (2000) Checkerboard DNA-DNA hybridization analysis of endodontic infections. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 89(6):744–748. <https://doi.org/10.1067/moe.2000.106576>
47. Siqueira-Júnior JF (2001) Strategies to treat infected root canals. *J Calif Dent Assoc* 29(12):825–837.
48. Sousa MN, Macedo AT, Santos JR (2017) Interrelation between *Enterococcus faecalis*, *Candida albicans* and the endodontic treatments. *Rev. Investig. Bioméd. São Luís*, 9:49-57.
49. Monteiro DR, Arias LS, Fernandes RA, Deszo da Silva LF, de Castilho MOVF, da Rosa TO, Vieira APM, Straioto FG, Barbosa DB, Delbem ACB (2017) Antifungal activity of tyrosol and farnesol used in combination against *Candida* species in the planktonic state or forming biofilms. *J Appl Microbiol* 123(2):392-400. <https://doi.org/10.1111/jam.13513>
50. Fernandes RA, Monteiro DR, Arias LS, Fernandes GL, Delbem ACB, Barbosa DB (2018) Virulence factors in *Candida albicans* and *Streptococcus mutans* biofilms mediated by farnesol. *Indian J Microbiol* 58(2):138-145. <https://doi.org/10.1007/s12088-018-0714-4>

51. Aggarwal S, Jena S, Panda S, Sharma S, Dhawan B, Nath G, Singh NP, Nayak KC and Singh DV (2019) Antibiotic Susceptibility, Virulence Pattern, and Typing of *Staphylococcus aureus* Strains Isolated From Variety of Infections in India. *Front Microbiol* 10:2763. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02763>.
52. Haapasalo M, Qian W, Portenier I, Waltimo T (2007) Effects of dentin on the antimicrobial properties of endodontic medicaments. *J Endod* 33:917–925.
53. Hiremath GS, Kulkarni RD, Naik BD (2015) Evaluation of minimal inhibitory concentration of two new materials using tube dilution method: An in vitro study. *J Conserv Dent* 18(2):159–162. <https://doi.org/10.4103 / 0972-0707.153056>
54. Formosa LM, Mallia B, Camilleri J (2013) Mineral trioxide aggregate with anti-washout gel properties and microstructure. *Dent Mater* 29(3):294-306. <https://doi.org/10.1016 / j.dental.2012.11.009>
55. Dalmia S, Gaikwad A, Samuel R, Aher G, Gulve M, Kolhe S. (2018) Antimicrobial Efficacy of Different Endodontic Sealers against *Enterococcus faecalis*: An *In vitro* Study. *J Int Soc Prev Community Dent* 8(2):104–109. https://doi.org/10.4103/jispcd.JISPCD_29_18
56. Estrela C, Bammann LL, Pimenta FC, Pécora JD (2001) Control of microorganisms *in vitro* by calcium hydroxide pastes. *Int Endod J* 34:341-345. <https://doi.org/10.1046 / j.1365-2591.2001.00368.x>
57. Bukhary S, Balto H (2017) Antibacterial Efficacy of Octenisept, Alexidine, Chlorhexidine, and Sodium Hypochlorite against *Enterococcus faecalis* Biofilms. *J Endod* 43(4):643-647. <https://doi.org/10.1016 / j.joen.2016.09.013>
58. Yadav P, Chaudhary S, Saxena RK, Talwar S, Yadav S (2017) Evaluation of Antimicrobial and Antifungal efficacy of Chitosan as endodontic irrigant against *Enterococcus Faecalis* and *Candida Albicans* Biofilm formed on tooth substrate. *J Clin Exp Dent* 9(3):e361-e367. <https://doi.org/10.4317 / jced.53210>
59. Savitha A, SriRekha A, Vijay R, Ashwija, Champa C, Jaykumar T (2019) An in vivo comparative evaluation of antimicrobial efficacy of chitosan, chlorhexidine gluconate gel and their combination as an intracanal medicament against *Enterococcus faecalis* in failed endodontic cases using real time polymerase chain reaction (qPCR). *Saudi Dent J* 31(3):360–366. <https://doi.org/10.1016 / j.sdentj.2019.03.003>
60. AlShwaimi E, Bogari D, Ajaj R, Al-Shahrani S, Almas K, Majeed A (2016) In Vitro Antimicrobial Effectiveness of Root Canal Sealers against *Enterococcus faecalis*: A

Systematic Review. J Endod. 42(11):1588–1597. [https://doi.org/10.1016 / j.joen.2016.08.001](https://doi.org/10.1016/j.joen.2016.08.001)

ANEXOS

ANEXO A
SOLICITAÇÃO DE DOAÇÃO DE DENTES BOVINOS ENVIADA AO
FRIGORÍFICO.



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA
MESTRADO EM ODONTOLOGIA
Área de concentração: Clínica Odontológica

Presidente Prudente, 30 de agosto de 2018

À
JBS - Friboi - Andradina/SP

Venho por meio deste, solicitar a doação de dentes bovinos de animais selecionados para abate, com fins de pesquisa laboratorial a ser realizada no Programa de Mestrado em Odontologia da Faculdade de Odontologia de Presidente Prudente , Unoeste. A aluna responsável pela coleta será Vanessa Peret Jacob, e a coleta ocorrerá nas datas sugeridas de 20 e 21 de setembro de 2018

Sem mais para o presente momento, aproveito para reiterar meus votos de estima e consideração.

Profa. Dra. Graziela Garrido Mori Panucci

Coordenadora - Mestrado em Odontologia

ANEXO C

REFERÊNCIA DA CEPA DE *Candida albicans* ATCC 10231



ATCC
Product Sheet
***Candida albicans* (ATCC® 10231™)**

Description

Strain Designation: 3147 [CBS 6431, CCY 29-3-106, CIP 48.72, DSM 1386, IFO 1594, NCPF 3179, NCYC 1363, NIH 3147, VTT C-85161]
Deposited Name: *Candida albicans* (Robin) Berkhout
Antigenic Properties: Serotype A
Product Description: An ampoule containing viable cells (may include spores and mycelia) suspended in cryoprotectant.

Propagation

The information recommended in this section is to assist users in obtaining living culture(s) for their studies. The recommendation does not imply that the conditions or procedures provided below are optimum. Experienced researchers may initiate the growth of a culture in their own way.

ATCC® Medium 200: YM agar or YM broth
ATCC® Medium 28: Emmons' modification of Sabouraud's agar
ATCC® Medium 1245: YEPD

Growth Conditions
Temperature: 24°C to 26°C
Atmosphere: Typical aerobic

Recommended Procedure
For freeze-dry (lyophilized) ampoules:

1. Open an ampoule according to enclosed instructions.
2. From a single test tube of sterile distilled water (5 to 6 mL), withdraw approximately 0.5 to 1.0 mL with a sterile pipette and apply directly to the pellet. Stir to form a suspension.
3. Aseptically transfer the suspension back into the test tube of sterile distilled water.
4. Let the test tube sit at room temperature (25°C) undisturbed for at least 2 hours; longer (e.g., overnight) rehydration might increase viability of some fungi.
5. Mix the suspension well. Use several drops (or make dilutions if desired) to inoculate recommended solid or liquid medium. Include a control that receives no inoculum.
6. Incubate the inoculum at the propagation conditions recommended.
7. Inspect for growth of the inoculum/strain regularly. The sign of viability is noticeable typically after 1-2 days of incubation. However, the time necessary for significant growth will vary from strain to strain.

Colony and Cell Morphology: On YEPD agar after 2 days at 25°C, colonies are cream-colored, shiny, and smooth. Older colonies show filaments-like structure at the margin and may have ridges or foldings. Cells are ovoid (3.0-6.0 x 4.0-8.0 µm), budding, mostly singly and rarely clustered in young culture. Cells will elongate and form chain-like branched pseudohyphae in older culture.

Notes

This strain is recommended by ATCC for use in the tests described in ASTM Standard Test Method E979-91 where only the taxon is specified; For sterility testing, not more than five passages from the ATCC culture should be used; Purified genomic DNA of this strain is available as ATCC 10231D-S™. Additional, updated information on this product may be available on the ATCC® web site at www.atcc.org.

DNA Sequence

18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 26S ribosomal RNA gene, partial sequence
GGTTTCGGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACTGATTGCTTAATTGCACCACATGTGTTTTTCTTT
GAAACAACTTGTCTTTGGCGGTGGGCCAGCCTGCGCCAGAGGTCTAAACTACAACCAATTTTTTAT
CAACTGTGTCACACAGATTAATACTAATAGTCAAACCTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTCGCATCGA
TGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAATATGAAATTGCAGATATTCGTGAATCATCGAATCTTTGAA
CGACATTGGCCCTCTGGTATCCGGAGGGCATGCGTGTGAGCGTGTCTCCCTCAAACCGCTGG
GTTTGGTTGACCAATACGACTGGGTTTGGCTTGAAGACGGTAGTGGTAAGGCGGGATCGCTTTGA
CAATGGCTTAGGTCTAACCAAAACATTGCTTGGCGGGTAACGTCCACCAAGTATATCTTCAAACITTT
GACCTCAAATCAGGTAGGACTACCGCTGAACCTTAAGCATATCAATA

D1D2 region of the 26S ribosomal RNA gene
ATATCAATAAGCGGAGGAAAAACCAACAGGGATTGCCTCAGTAGCGGGAGTGAAGCGGCCAAA

Please read this FIRST

Storage Temp.
Frozen: -80°C or colder
Freeze-Dried: 2°C to 8°C
Live Culture: See Propagation Section

 **Biosafety Level**
1

Intended Use

This product is intended for research use only. It is not intended for any animal or human therapeutic or diagnostic use.

Citation of Strain

If use of this culture results in a scientific publication, it should be cited in that manuscript in the following manner: *Candida albicans* (ATCC® 10231™)

American Type Culture Collection
PO Box 1549
Manassas, VA 20108 USA
www.atcc.org

800 638 6597 or 703 365 2700
Fax: 703 365 2750
Email: Tech@atcc.org

Or contact your local distributor

Page 1 of 2



Product Sheet

Candida albicans (ATCC®) 10231™)

Please read this FIRST



Storage Temp
Frozen: -80°C or
colder
Freeze-Dried: 2°C
to 8°C
Live Culture: See
Propagation
Section



Biosafety Level
1

Intended Use

This product is intended for research use only. It is not intended for any animal or human therapeutic or diagnostic use.

Citation of Strain

If use of this culture results in a scientific publication, it should be cited in that manuscript in the following manner: *Candida albicans* (ATCC® 10231™)

AGCTCAAATTTGAAATCTGGCGTCTTTGGCGTCCGAGTTGTAATTTGAAGAAGGTACTTTGGGCCCGG
CTCTTGCTATGTTCCCTTGGAAACAGGACGTCACAGAGGGTGAGAAATCCCGTGCATGAGATGACCCGG
GTCTGTGTAAGTTCCCTCGACGAGTCGAGTTGTTGGGAATGCAGCTTAAGTGGGTGGTAAATCCA
TCTAAAGCTAAATATTGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAAGTACAGTGATGGAAGATGAAAAGAAC
TTTGAAAAGAGAGTGAAAAAGTACGTGAAATTTGAAAGGGAAGGGCTTGAGATCAGACTTGGTAT
TTTGCATGCTCTCTCGGGGGCGGCCGCTGCGGTTTACCGGGCCAGCATCGGTTTGAGCGCGCAGG
ATAATGGCGGAGGAATGTGCCACGGCTCTGCTGTGTGTTATAGCCTCTGACGACTGCCAGCCTAG
ACCGAGGACTGCGGTTTTAACTAGGATGTGGCATAATGATCTTAA



Isolation

Man with bronchomycosis



References

References and other information relating to this product are available online at www.atcc.org.



Biosafety Level: 1

Appropriate safety procedures should always be used with this material. Laboratory safety is discussed in the current publication of the *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories* from the U.S. Department of Health and Human Services Centers for Disease Control and Prevention and National Institutes for Health.

ATCC Warranty

ATCC® products are warranted for 30 days from the date of shipment, and this warranty is valid only if the product is stored and handled according to the information included on this product information sheet. If the ATCC® product is a living cell or microorganism, ATCC lists the media formulation that has been found to be effective for this product. While other, unspecified media may also produce satisfactory results, a change in media or the absence of an additive from the ATCC recommended media may affect recovery, growth and/or function of this product. If an alternative medium formulation is used, the ATCC warranty for viability is no longer valid.

Disclaimers

This product is intended for laboratory research purposes only. It is not intended for use in humans. While ATCC uses reasonable efforts to include accurate and up-to-date information on this product sheet, ATCC makes no warranties or representations as to its accuracy. Citations from scientific literature and patents are provided for informational purposes only. ATCC does not warrant that such information has been confirmed to be accurate. This product is sent with the condition that you are responsible for its safe storage, handling, and use. ATCC is not liable for any damages or injuries arising from receipt and/or use of this product. While reasonable effort is made to insure authenticity and reliability of materials on deposit, ATCC is not liable for damages arising from the misidentification or misrepresentation of such materials. Please see the enclosed Material Transfer Agreement (MTA) for further details regarding the use of this product. The MTA is also available on our Web site at www.atcc.org.

Additional information on this culture is available on the ATCC web site at www.atcc.org.
© ATCC 2019. All rights reserved. ATCC is a registered trademark of the American Type Culture Collection. [D4/02]

American Type Culture Collection
PO Box 1548
Manassas, VA 20108 USA
www.atcc.org

800.638.6597 or 703.365.2700
Fax: 703.365.2750
Email: Tech@atcc.org

Or contact your local distributor

Page 2 of 2

ANEXO E

GUIDELINES DE SUBMISSÃO DA REVISTA “CLINICAL ORAL INVESTIGATION”



Link para acesso as normas de submissão da revista:

<https://www.springer.com/journal/784/submission-guidelines>