



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE FARMACIA, ODONTOLOGIA E ENFERMAGEM
DEPARTAMENTO DE CLÍNICA ODONTOLÓGICA
CURSO DE ODONTOLOGIA

ANA TÁSSIA ALMEIDA DA SILVA

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO
COMPLEXO DE RUTÊNIO $\text{RuCl}(\text{dppb})\text{NO}_2$ FOTOATIVADO
CONTRA BACTÉRIAS RELACIONADAS ÀS INFECÇÕES
ENDODÔNTICAS

FORTALEZA

2022

ANA TÁSSIA ALMEIDA DA SILVA

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO COMPLEXO
DE RUTÊNIO $\text{RuCl}(\text{dppb})\text{NO}_2$ FOTOATIVADO CONTRA
BACTÉRIAS RELACIONADAS ÀS INFECÇÕES ENDODÔNTICAS

Monografia apresentada ao curso de Odontologia do Departamento de Clínica Odontológica da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharela em Odontologia.

Orientador: Prof. Dr. Edson Holanda Teixeira.
Coorientador: Me. Alexandre Lopes de Andrade

FORTALEZA

2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Sistema de Bibliotecas
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

S578a Silva, Ana Tássia Almeida da.
Avaliação da atividade antimicrobiana do complexo de rutênio RuCL(dppb)NO₂ fotoativado contra bactérias relacionadas à infecções endodônticas : estudo experimental / Ana Tássia Almeida da Silva. – 2022.
51 f. : il. color.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, Curso de Odontologia, Fortaleza, 2022.

Orientação: Prof. Dr. Edson Holanda Teixeira.

Coorientação: Prof. Me. Alexandre Lopes de Andrade.

1. Enterococcus faecalis . 2. Tratamento endodôntico. 3. Complexo de rutênio. 4. Terapia fotodinâmica.
I. Título.

CDD 617.6

ANA TÁSSIA ALMEIDA DA SILVA

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE COMPLEXOS
DE RUTÊNIO FOTOATIVÁVEIS CONTRA BACTÉRIAS
RELACIONADAS ÀS INFECÇÕES ENDODÔNTICAS

Monografia apresentada ao curso de
Odontologia do Departamento de Clínica
Odontológica da Universidade Federal do Ceará,
como requisito parcial à obtenção do título de
Bacharela em Odontologia.

Aprovada em 15/07/2022.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Edson Holanda Teixeira (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Ma. Aryane de Azevedo Pinheiro
Universidade Federal do Ceará (UNINTA)

Prof. Me Ricardo Souza Martins
Universidade Estadual do Ceará (UFC)

A meus avós maternos, Manoel e Antônia

Maria, in memoriam.

A minha mãe, Maria Emília.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

À minha mãe Maria Emília, fonte imensurável de apoio, cuidado e dedicação a quem agradeço tudo que fui, sou e serei. Agradecida por me permitir ir sempre além.

À minha avó materna, Dona Preta, in memoriam por sua força e desejo de viver ainda que quase tudo ao seu redor lhe desmotivasse.

À minha tia Izabel, pelo apoio no momento em que saí da “barra da saia” de minha mãe.

Ao mestre Francisco Oliveira, por todo apoio e por me fazer acreditar que tenho capacidade de conquistar os meus sonhos.

Ao meu amigo, Rafael Vidal e às minhas amigas Beatriz Rodrigues, Ivone Uchoa, Jéssica Josiane Ferreira, Laís Sousa e Laryssa Chaves frutos dessa graduação tão sonhada. Poder compartilhar a vida com vocês é uma dádiva.

As minhas companheiras de clínica. A Hislana, pelo amparo e carinho. À Elis Cristina, “tampa da minha panela” nesse final de curso, por toda paciência e serenidade na corre-corre diário.

Aos meus colegas de curso pelos momentos vividos.

Ao LIBS, pelo acolhimento como bolsista de Iniciação Científica e por mostrar que fazer ciência no Brasil é um grande desafio, mas também que pode ser apaixonante.

Ao meu coorientador prof. Me. Alexandre Lopes Andrade por toda assistência, paciência e auxílio durante a produção desse trabalho.

Ao Prof. Dr. Edson Holanda Teixeira, pela oportunidade em participar do grupo de pesquisa.

Aos professores participantes da banca examinadora. À Ma. Aryane Pinheiro a quem admiro por seu entusiasmo e empenho em cada atividade desenvolvida na iniciação científica. Ao querido professor Ricardo Martins, por sua paciência e dedicação na realização de seu trabalho como professor. Muitíssimo agradecida pelo tempo, pelas valiosas colaborações e sugestões.

Aos funcionários da FFOE/UFC, em especial o Carlinhos, o Ruy, a Dedê, a Lu, Júlio, Ribamar, Evandro, Fernando ... e a todos que direta ou indiretamente contribuíram com minha formação.

“A ciência, como qualquer atividade da vida social é indissociável da política.”

Simone Kropf

RESUMO

As bactérias têm uma tendência natural a desenvolver comunidades de células rodeadas por uma matriz de polissacarídeo chamada de biofilme. Biofilmes são formados nas superfícies dos dentes (placa dentária) e são o principal fator etiológico para a maioria dos problemas dentários como a cárie, gengivite, periodontite e infecções endodônticas. Com relação as infecções endodônticas, as bactérias são os principais agentes causadores de alterações pulpare e periapicais, sendo responsáveis pela alta incidência de retratamento de canal na clínica odontológica, sendo a espécie *Enterococcus faecalis*, o principal agente causador deste tipo de comprometimento. Neste contexto, a pesquisa de novos compostos capazes de prevenir ou erradicar biofilmes orais foi intensificada junto a essa bactéria. Este estudo teve como objetivo avaliar a atividade antimicrobiana do complexo de rutênio [RuCl(dppb)(NO)₂] com e sem irradiação de luz de led azul (463 nm) sobre as bactérias *Enterococcus faecalis* ATCC 10100 e *Enterococcus faecalis* ATCC 19433. A atividade antibacteriana foi estabelecida através da determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (MBC). O efeito antibiofilme foi determinado através do método de coloração cristal violeta (CV) e contagem de células viáveis (UFC), tanto para inibição da formação de biofilmes, quanto para biofilmes pré-formados. Em placas de 96 poços de microtitulação, as bactérias foram semeadas em diferentes concentrações do complexo (125 a 1,9 µg/mL), e incubadas durante 24h a 37°C sob pressão atmosférica, com 5% de CO₂. Os resultados mostraram que complexo [RuCl(dppb)(NO)₂] quando irradiado por luz, apresentou CIM de 3,9 µg/mL, e CBM entre 3,9 e 7,8 µg/mL, para ambas as bactérias, no entanto, na ausência de luz, os valores da CIM foram entre 7,8 e 15,6 µg/mL e da CBM entre 15,6 e 31,2 µg/mL. No que diz respeito a formação de biofilme, em geral, o complexo inibiu entre 81 a 100% a formação de biomassa e o número de células viáveis foi reduzido entre 1 e 4,7 log UFC/mL. Para biofilmes pré-formado, observou-se redução da biomassa entre 15 a 97% e diminuição no número de UFCs entre 1 a 2 log. Concluiu-se que complexo [RuCl(dppb)(NO)₂] é um possível antimicrobiano com potencial de controle do crescimento microbiano e da redução de biofilmes orais envolvendo a espécie *Enterococcus faecalis*

Palavras-chave: *Enterococcus faecalis*; tratamento endodôntico; complexo de rutênio; terapia fotodinâmica.

ABSTRACT

Bacteria have a natural tendency to develop communities of cells surrounded by a polysaccharide matrix called a biofilm. Biofilms are formed on the surfaces of teeth (dental plaque) and are the main etiologic factor for most dental problems such as caries, gingivitis, periodontitis and endodontic infections. Regarding endodontic infections, bacteria are the main agents causing pulp and periapical alterations, being responsible for the high incidence of root canal retreatment in the dental clinic, with the species *Enterococcus faecalis*, the main agent causing this type of impairment. In this context, the search for new compounds capable of preventing or eradicating oral biofilms was intensified with these bacteria. This study aimed to evaluate the antimicrobial activity of the ruthenium complex [RuCl(dppb)(NO)₂] with and without irradiation of blue LED light (463 nm) on the bacteria *Enterococcus faecalis* ATCC 10100 and *Enterococcus faecalis* ATCC 19433. Antibacterial activity was determined by determining the minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC). The antibiofilm effect was determined using the crystal violet (CV) and viable cell count (CFU) method, both for inhibition of biofilm formation and for preformed biofilms. In 96-well microtiter plates, the bacteria were seeded at different concentrations of the complex (125 to 1.9 µg/mL), and incubated for 24 h at 37°C under atmospheric pressure, with 5% CO₂. The results showed that [RuCl(dppb)(NO)₂] complex, when irradiated by light, presented MIC of 3.9 µg/mL, and CBM between 3.9 and 7.8 µg/mL, for both bacteria, in the however, in the absence of light, MIC values were between 7.8 and 15.6 µg/mL and CBM between 15.6 and 31.2 µg/mL. With regard to biofilm formation, in general, the complex inhibited between 81 and 100% the formation of biomass and the number of viable cells was reduced between 1 and 4.7 log CFU/mL. For pre-formed biofilms of both species, there was a reduction in biomass between 15 and 97% and a decrease in the number of CFUs between 1 and 2 log. It was concluded that the complex [RuCl(dppb)(NO)₂] is a possible potential antimicrobial in the control of microbial growth and in the reduction of oral biofilms involving the species *Enterococcus faecalis*.

Keywords: *Enterococcus faecalis*; endodontic treatment; ruthenium complex; photodynamic therapy.

RESUMEN

Las bacterias tienen una tendencia natural a desarrollar comunidades de células rodeadas por una matriz de polisacáridos llamada biopelícula. Las biopelículas se forman en la superficie de los dientes (placa dental) y son el principal factor etiológico de la mayoría de los problemas dentales como caries, gingivitis, periodontitis e infecciones endodónticas. En cuanto a las infecciones endodónticas, las bacterias son los principales agentes causantes de alteraciones pulpares y periapicales, siendo las responsables de la alta incidencia de retratamiento de conductos en la clínica odontológica, siendo la especie *Enterococcus faecalis* el principal agente causante de este tipo de afectación. En este contexto, se intensificó la búsqueda de nuevos compuestos capaces de prevenir o erradicar las biopelículas orales con estas bacterias. Este estudio tuvo como objetivo evaluar la actividad antimicrobiana del complejo de rutenio [RuCl(dppb)(NO)₂] con y sin irradiación de luz LED azul (463 nm) sobre las bacterias *Enterococcus faecalis* ATCC 10100 y *Enterococcus faecalis* ATCC 19433. La actividad antibacteriana se determinó determinando la concentración inhibitoria mínima (MIC) y la concentración bactericida mínima (MBC). El efecto anti biopelícula se determinó utilizando el método de cristal violeta (CV) y recuento de células viables (CFU), tanto para la inhibición de la formación de biopelículas como para biopelículas preformadas. En placas de microtitulación de 96 pocillos, las bacterias se sembraron a diferentes concentraciones del complejo (125 a 1,9 µg/mL), y se incubaron durante 24 h a 37° C bajo presión atmosférica, con 5 % de CO₂. Los resultados mostraron que el complejo [RuCl(dppb)(NO)₂], al ser irradiado con luz, presentó MIC de 3.9 µg/mL, y CBM entre 3.9 y 7.8 µg/mL, para ambas bacterias, sin embargo, en ausencia de luz, los valores de MIC estuvieron entre 7,8 y 15,6 µg/mL y CBM entre 15,6 y 31,2 µg/mL. Con respecto a la formación de biopelículas, en general, el complejo inhibió entre un 81 y un 100% la formación de biomasa y el número de células viables se redujo entre 1 y 4,7 log UFC/mL. Para las biopelículas preformadas de ambas especies, hubo una reducción en la biomasa entre 15 y 97 % y una disminución en el número de UFC entre 1 y 2 log. Se concluyó que el complejo [RuCl(dppb)(NO)₂] es un posible antimicrobiano potencial en el control del crecimiento microbiano y en la reducción de biopelículas orales que involucran a la especie *Enterococcus faecalis*.

Palabras clave: Enterococo faecalis; tratamiento de endodoncia; complejo de rutenio; terapia fotodinámica.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	– Etapas do desenvolvimento do biofilme bacteriano.....	21
Figura 2	– Sequência de evolução da cárie dentária.....	27
Figura 3	– Sequência de tratamento endodôntico.....	28
Figura 4	– Exemplo de complexo de rutênio.....	30
Figura 5	– Estrutura do complexo de rutênio RuNO ₂	33
Figura 6	– Efeito do complexo de rutênio RuNO ₂ sobre a formação de biofilmes de E. faecalis.	37/8
Figura 7	– Efeito do complexo de rutênio RuNO ₂ sobre biofilmes pré-formados de E. faecalis.	39

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Quantificação da biomassa de <i>E. faecalis</i> ATCC 19433.....	33
Gráfico 2 – Quantificação da biomassa de <i>E. faecalis</i> ATCC 10100.....	34
Gráfico 3 – Quantificação das unidades formadoras de colônias de <i>E. faecalis</i> ATCC 19433.....	35
Gráfico 4 Quantificação das unidades formadoras de colônias de <i>E. faecalis</i> ATCC 10100.....	36

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Atividade antimicrobiana de RuNO ₂ contra <i>Enterococcus faecalis</i> . As concentrações variaram de 125 a 1,9 µg/mL.....	36
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

NIH	National Institutes of Health
CPOD	Dentes Cariados, Perdidos e Obturados
ATCC	American Type Culture Collection
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CBM	Concentração Bactericida Mínima
BHI	Brain Heart Infusion
UFC	Unidade Formadora de Colônias
CV	Cristal Violeta
SPE	Substâncias Poliméricas Extracelulares
ERO	Espécie Reativa de Oxigênio
GPx	Glatationa Peroxidase
PDT	Terapia Fotodinâmica

LISTA DE SÍMBOLOS

°C	Grau Celsius
%	Porcentagem
mL	Mililitro
nm	Nanômetro
µg	Micrograma
µL	Microlitro
Log	Logaritmo
®	Marca Registrada

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	19
2.1	Biofilmes bacterianos	19
2.1.1	<i>Aspecto histórico</i>	19
2.1.2	<i>Formação do biofilme</i>	21
2.1.3	<i>Biofilmes e patologias associadas</i>	23
2.2	Cárie dentária e tratamento endodôntico	25
2.3	Complexos de rutênio	29
2.4	Terapia fotodinâmica	31
3	OBJETIVOS	32
3.1	Objetivo geral	32
3.2	Objetivos específicos	32
4	MATERIAIS E MÉTODOS	33
4.1	Obtenção dos complexos de rutênio	33
4.2	Micro-organismos e condições de cultivo	33
4.3	Ensaio de atividade sobre o crescimento planctônico dos microrganismos...	34
4.4	Ensaio de atividade sobre a formação de biofilme	34
4.4.1	<i>Quantificação da biomassa</i>	34
4.4.2	<i>Contagem das Unidades Formadoras de Colônias (UFC)</i>	35
4.5	Biofilme pré-formado	35
4.6	Análise estatística	36
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES	36
5.1	Atividade antibiofilme: inibição da formação de biofilmes e contagem de células viáveis	37
5.2	Atividade sobre biofilmes pré-formados: quantificação da biomassa e contagem de células viáveis	38
6	CONCLUSÃO	43
	REFERÊNCIAS	44
	ANEXOS	50

1 INTRODUÇÃO

A cavidade oral apresenta-se como um local favorável ao desenvolvimento e proliferação de diversos microrganismos. Sua morfologia contempla nichos que possuem diferentes concentrações de oxigênio que favorece o crescimento de bactérias, arqueas, fungos, vírus e protozoários (GERMANO, 2018). Ademais, possui diferentes concentrações de pH, osmolaridade e nutrientes o que contribui para interações da microbiota (AAS et al., 2005; XU et al., 2015).

Assim, a cavidade oral se transforma em um local ideal para crescimento e interações entre microrganismos o que favorece a disseminação de doenças, como a cárie (PASTER et al., 2001). Considerada uma das doenças de maior incidência na população humana e um dos maiores desafios da Odontologia, é responsável pela maioria das indicações de tratamentos endodônticos e exodontias (LOE e & BROWN, 1993).

Classificada como uma doença biofilme açúcar dependente de alta prevalência, onerosa e que compromete a saúde e bem-estar de adultos e crianças (KLEIN et al., 2015), a cárie está associada à fatores socioeconômicos, comportamentais, educacionais, ambientais, físicos e biológicos (SELWITZ; ISMAIL; PITTS, 2007). Assim, configura-se como um problema de saúde pública possuindo custos para o tratamento e por afetar a socialização dos indivíduos (BOING et al., 2014).

O desenvolvimento da lesão cariosa começa com a presença de bactérias acidogênicas na superfície dentária. Essas bactérias, como o *Streptococcus mutans*, tem a capacidade de produzirem ácidos orgânicos a partir do metabolismo dos carboidratos (LEMOS et al., 2013). Essa produção de ácidos provoca uma redução no pH e como consequência há uma perda de cálcio e íons fosfato da estrutura de hidroxiapatita do esmalte do dente (SOET; NYVAD; KILIAN, 2000; TAKAHASHI; NYVAD, 2008; CUMMINS, 2013).

Iniciado o processo de desmineralização e consequente progressão da perda de estrutura do esmalte do dente, se não tratada, a cárie avança, ultrapassa a dentina e alcança a polpa dentária, provocando alterações pulpares e periapicais. Desse modo, os dentes que deixaram de ser restaurados em um determinado momento necessitam de um tratamento menos conservador, como o tratamento endodôntico ou até mesmo exodontia (NACIF; ALVES, 2010; SOUSA, 2013).

O tratamento endodôntico, em específico, consiste no preparo químico-mecânico e selamento do canal com a finalidade de proporcionar eliminação total ou significativa de microrganismo patogênicos visando evitar sua posterior recontaminação (SANTI, 2015;

LEONARDO; LEAL, 1998). Dentre os patógenos comuns nas infecções endodônticas as bactérias são os principais agentes causadores de alterações pulpares e periapicais, seja como agentes causais primários ou como agentes secundários (NACIF; ALVES, 2010).

As técnicas empregadas na Endodontia incluem desbridamento mecânico, modelagem dos sistemas de canais radiculares (SCR), irrigação intracanal com agentes antimicrobianos e medicações intracanaís (SIQUEIRA, 2001). Assim, a remoção do conteúdo dos canais infectados é essencial, porém pode ser dificultada pela morfologia complexa do SCR, ou seja, canais laterais, acessórios e deltas apicais, resultando na persistência de bactérias no interior desses canais (REIS *et al.*, 2018).

Dentre as bactérias que prevalecem após o tratamento endodôntico temos a *Fusobacterium nucleatum*, *Propionibacterium* e a *Enterococcus faecalis* que mantém o foco de infecção sendo necessário uma reintervenção, ou seja, um retratamento endodôntico (NARAYANAN; VAISHNAVI, 2010). Esses microrganismos conseguem escapar das medidas de desinfecção do SCR porque possuem a capacidade de formar biofilme, conseguem se localizar em áreas inacessíveis às técnicas de instrumentação do canal radicular, podem se associar (sinergismo), apresentam a capacidade de expressar genes de sobrevivência e ativar vias metabólicas alternativas (PASSOS, 2014).

Embora as infecções endodônticas tenham causas polimicrobianas, *Enterococcus faecalis* é o principal microrganismo associado ao insucesso endodôntico. É considerada como a principal espécie envolvida nesse processo, uma vez que está associada a uma alta prevalência nos casos de insucesso de tratamentos endodônticos (NACIF; ALVES, 2010). A manutenção da infecção por essa espécie bacteriana está diretamente relacionada à sua resistência aos procedimentos intracanaís de desinfecção, sendo predominantes em infecções refratárias ou persistentes (PASSOS, 2014).

Nesse contexto, os principais fatores associados à espécie *E. faecalis*, que contribuem para sua elevada prevalência de fracasso de tratamentos endodônticos são principalmente a resistência ao hidróxido de cálcio e a outros antimicrobianos utilizados como medicação intracanal, a adaptação a condições de estresse ambiental e à baixa disponibilidade de nutrientes, além de seus fatores de virulência (NACIF; ALVES, 2010).

Ademais, outro importante fator de virulência é a formação de biofilmes pelas bactérias que sobrevivem ao preparo químico-mecânico e persistem mesmo após a obturação do canal estimulando a manutenção da contaminação (PRABHAKAR; HADAKAR; RAJU, 2012). Essas infecções persistentes derivam de tratamentos primários inadequados ou agentes químicos ineficientes (TZANETAKIS *et al.*, 2015; ZAKARIA *et al.*, 2014; SAKAMOTO *et al.*,

2008).

Neste cenário, a busca por outros agentes antimicrobianos mais eficazes, que exerçam algum controle sobre a proliferação microbiana, é de suma importância, tendo em vista sua utilização em processos endodônticos com maiores chances de sucesso, evitando-se assim o retratamento. O elemento rutênio (Ru) apresenta-se como uma fonte potencial para o desenvolvimento de complexos (compostos) com várias propriedades biológicas incluindo atividade antimicrobiana (SILVA *et al.*, 2010; SOUSA *et al.*, 2016; ABREU *et al.*, 2017; SOUSA *et al.*, 2018; da SILVEIRA CARVALHO *et al.*, 2017).

O Rutênio é classificado com um elemento de transição, ou seja, está localizado entre os metais alcalinos-terrosos e os semimetais, além disso, apresenta boa estabilidade, possui propriedades biológicas com ação antimicrobiana, antiparasitária e anticancerígena. Essas propriedades são permitidas em virtude da sua capacidade de ligar-se fortemente a ácidos nucleicos e proteínas. Apresenta ainda capacidade de liberar NO por irradiação quando submetido a presença de luz. Nessa discussão, é importante salientar que os complexos de metal tendo o rutênio como elemento central, possuem a capacidade de terem seus efeitos biológicos potencializados quando irradiados por luz, algo também conhecido como fototerapia dinâmica (ABREU *et al.*, 2017).

A terapia fotodinâmica (PDT, do inglês *Photodynamic Therapy*) é uma técnica que utiliza uma fonte de luz associada a um agente fotossensibilizador e ao oxigênio para a eliminação de microrganismos. O uso da PDT mostra-se promissor em diversas áreas da saúde humana. Em Odontologia, a grande maioria dos processos patológicos estão associados a microrganismos e a PDT apresenta-se como uma terapia com inúmeras vantagens (EDUARDO, 2015).

Nesse contexto, buscam-se novas alternativas como forma de controlar/eliminar esses microrganismos envolvidos nesse tipo de infecção. Assim, podemos lançar mão das técnicas já existentes associadas a produtos e terapias que permitam um maior alcance e eficácia para impedir recontaminações do SCR. Este trabalho consistiu em analisar a ação do **complexo de rutênio [Ru(dppb)NO₂]**, quando irradiado por luz azul, sobre as células planctônicas e de biofilmes formados e pré-formados das cepas *Enterococcus faecalis* ATCC 10100 e *Enterococcus faecalis* ATCC 19433.

Para isso, além da pesquisa bibliográfica que fundamentou este trabalho, os resultados foram obtidos através de análises laboratoriais que consistiram nas seguintes etapas: cultivo dos microrganismos; uso da terapia fotodinâmica na avaliação da atividade antibacteriana de células planctônicas; determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

e concentração bactericida mínima (CBM). O efeito antibiofilme foi analisado através do método de coloração cristal violeta (CV) e contagem de células viáveis (UFC), tanto para inibição da formação de biofilmes, quanto para biofilmes pré-formados.

Os complexos de rutênio possuem eficácia comprovada como agentes antimicrobianos (ALLARDYCE, DYSON, 2001) e a PDT possui características vantajosas quando comparada aos fármacos tradicionais, surgindo como uma possibilidade promissora em Endodontia, visto que possui potencial antimicrobiano comprovado, não promove resistência microbiana como os tratamentos com antimicrobianos tradicionais, é uma técnica de fácil aplicação, baixo custo e indolor para o paciente (SILVA, 2010; EDUARDO, 2015).

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Biofilmes bacterianos

2.1.1 Aspectos históricos

A compreensão dos problemas de saúde humana ao longo da história evolutiva passou por diversas limitações de explicações. No entanto, as percepções e compreensões das doenças a partir da evolução da ciência e da produção científica, permitiu uma busca e aquisição de novos conhecimentos que contribuíram para o bem-estar da humanidade. Assim, entender a dinâmica da relação do homem com os microrganismos se caracteriza como um sistema contínuo de investigação na busca de prevenção e controle de enfermidades.

A associação entre doenças e contaminação por microrganismos é reconhecida como um problema de saúde pública e um desafio global pela Organização Mundial da Saúde (OMS). Do mesmo modo que os humanos evoluíram, se adaptaram e ampliaram sua área distribuição, as espécies de patógenos/microrganismos também passaram por adaptações que lhes permitiram explorar diversos ambientes, inclusive o corpo humano e as bactérias são pioneiras em se relacionar com quase todos os seres vivos (UJVARI, 2008; BARBOSA, 1999).

As bactérias são organismos unicelulares que habitam diversos ecossistemas. No corpo humano, algumas agem como promotoras de saúde, como as do gênero *Lactobacillus*, contudo há as causadoras de processos infecciosos, a exemplo o gênero *Enterococcus* (BARBOSA, 1999). Por muitos anos, acreditou-se que esses microrganismos viviam sob a forma planctônica, ou seja, como células de vida livre, dispersas no meio, todavia, no contexto contemporâneo, sabe-se que a maioria vive agrupados em forma de biofilmes (GIAOURIS et al., 2015).

Esse modo de organização bacteriana na forma de biofilme foi registrado pela primeira vez por Antonie van Leeuwenhoek no século XVII, por meio de um microscópio de lentes simples ao examinar a diversidade de microrganismos em placas dentárias. Ao realizar essa observação Leeuwenhoek verificou que as bactérias predominavam de forma agrupada ao invés de planctônica (COSTERTON; STEWART; GREENBERG, 1999; COSTERTON; WILSON, 2004). Condições semelhantes foram observadas por Claude Zobell, em 1943, ao demonstrar que agregados microbianos marinhos se associavam a superfícies de cascos de navios, vidros, metais e plásticos (MENOITA et al., 2012).

Além disso, em 1964, Ralph Mitchell observou pela primeira vez os estágios iniciais da formação do biofilme. Essas evidências motivaram o microbiologista canadense John William Bill Costerton, a estudar os agregados bacterianos e então em 1978 foi utilizado

o termo biofilme pela primeira vez para explicar essa associação das bactérias a superfícies bióticas de abióticas (MENOITA et al., 2012).

Na literatura acadêmica, a partir da década de 1980, apontava que, aproximadamente, 95% a 99% dos microrganismos presentes em ambientes naturais apresentavam-se organizados formando estruturas agregadas mergulhados em um meio que funcionava como uma matriz. No entanto, persistia a ideia de que a formação do biofilme ocorria a partir da incorporação de células de forma casual nessa matriz polimérica extracelular (COSTERTON; WILSON, 2004).

O entendimento do padrão de formação do biofilme só foi possível nos anos 1990 devido a introdução da microscopia confocal de varredura a laser. Essa técnica possibilitou novos estudos no campo dos biofilmes bacterianos compreendendo desde sua formação e regulação, bem como os mecanismos envolvidos na sua resistência (COSTERTON; WILSON, 2004; POST *et al.*, 2011).

Diversos são os estudos sobre a caracterização morfológica e bioquímica dos biofilmes e sua associação com infecções humanas. Essa associação é marcada por enfermidades crônicas e pela resistência bacteriana aos agentes antimicrobianos. Ainda na década de 1990 muitas pesquisas foram realizadas com o intuito de investigar a etiologia, prognóstico e eficiência dos tratamentos das infecções crônicas a partir de análises da formação de biofilmes (COSTERTON; STEWART; GREENBERG, 1999; COSTERTON; WILSON, 2004). Assim, os resultados dos estudos evidenciaram que apesar dos biofilmes de diferentes ecossistemas apresentarem semelhança estrutural básica, cada biofilme pode ser considerado único, uma vez que suas características físicas, químicas e biológicas estão intimamente relacionadas ao microrganismo que a compõem (DAVEY; OTOOLE, 2000).

Nesse contexto, o conceito estabelecido de biofilme o define como comunidades microbianas complexas, compostas por células fortemente aderidas a um substrato ou entre si, embebidas em uma matriz polimérica extracelular produzida pelo metabolismo dos próprios microrganismos. Fenotipicamente, esses microrganismos apresentam características distintas em relação à taxa de crescimento e a transcrição de genes quando comparados aos microrganismos em estado planctônico (XU; MCFETERS; STEWART, 2000; FLEMMING; WINGENDER, 2010; ABEE *et al.*, 2011; ERRIU *et al.*, 2014).

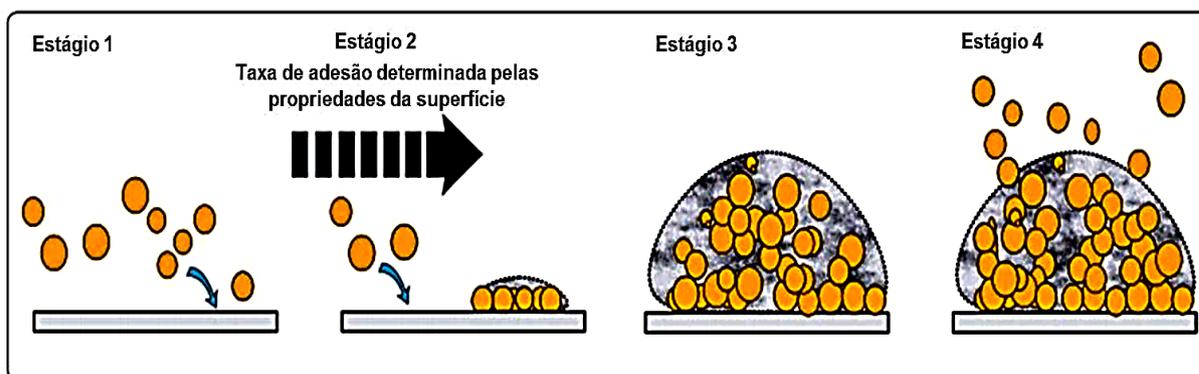
2.1.2 Formação de biofilme

Essa organização das bactérias em comunidade estruturada de células embebidas em uma matriz polimérica autoproduzida e aderente a uma superfície inerte ou viva se forma a partir de um alto nível de associação microbiana e essa agregação depende da dinâmica das bactérias com o ambiente e seu habitat. O processo de desenvolvimento dos biofilmes é complexo e apresenta uma cronologia de formação criteriosa (DANNE; DRAMSI, 2012).

As células bacterianas podem ser encontradas na forma livre ou agrupadas. Quando encontradas de modo disperso são classificadas de células planctônicas e as que estão agregadas na forma de biofilme são identificadas como sésseis. Na natureza, a disposição predominante é a forma sésseis, ou seja, organização em comunidades microbianas. Desta feita, considera-se que aproximadamente 99% dos microrganismos do planeta vivam em comunidades (DONLAN, 2002; COSTERTON; WILSON, 2004; COGAN, 2006).

A formação do biofilme é determinada por quatro etapas bem definidas e que segue uma sequência: Estágio 1 – Adesão à superfície: relacionada as interações físico-químicas não específicas do microrganismo com a superfície. Estágio 2 – Formação de microcolônias: fase que ocorre a multiplicação de células somadas a agregação célula-célula, produção de mais matriz polimérica extracelular resultando na formação de colônias organizadas em multicamadas e desenvolvimento da arquitetura do biofilme maduro. Estágio 3 – Formação de macrocolônias: fase onde há o desenvolvimento da espessura máxima do biofilme com toda sua organização estrutural funcionando como um sistema de troca de nutrientes, oxigênio e metabolitos. Estágio 4 – Dispersão: estágio onde as células ou microcolônias são liberadas a porque biofilme maduro não é mais favorável à sua manutenção (SALWICZEK *et al.*, 2014; DAVIES, 2003).

Figura 1 – Etapas do desenvolvimento do biofilme bacteriano.



Fonte: Adaptado de Zhang *et al.* (2017). Sequência de desenvolvimento do biofilme bacteriano. Estágio 1: Adesão à superfície; Estágio 2: Formação de microcolônias; Estágio 3: Formação de macrocolônias; Estágio 4: Dispersão.

O modo como o microrganismo se adere à superfície é um estágio essencial para a formação do biofilme (DUNNE, 2002). A característica da superfície é um fator que pode favorecer o processo de adesão inicial, visto que superfícies sólidas e com maior rugosidade aumentam a extensão da colonização microbiana. Isso ocorre porque há uma maior superfície de contato em áreas irregulares e também as forças de cisalhamento são diminuídas (CHARACKLIS; MCFETERS; MARSHALL, 1990; DONLAN, 2002).

As características das superfícies rígidas e rugosas diferem do meio aquoso. O meio aquoso apresenta fatores, como pH, temperatura, interações iônicas e disponibilidade de nutrientes que se relacionam diretamente com a taxa de ligação microbiana comprometendo o processo de adesão (COWAN; WARREN; FLETCHER, 1991; DONLAN; PIPES; YOHE, 1994).

A fase de adesão também sofre interferência dos fatores físico-químicos. Quando um microrganismo se fixa a uma superfície abiótica uma interação do típico inespecífica é formada por meio das ligações eletrostática de Van der Waals. Em contrapartida, os microrganismos que se aderem as superfícies bióticas participam de mecanismo moleculares específicos possibilitado por moléculas de adesão celular, como as adesinas, pili ou fimbrias (DUNNE, 2002; DONLAN, 2002; AGARWAL; SINGH; JAIN, 2010).

Após a adesão inicial as células bacterianas apresentam uma predisposição a se agruparem e então começam a produzir matriz de substâncias poliméricas extracelulares hidratadas que podem variar as propriedades físicas e químicas. Essa matriz é composta sobretudo por polissacarídeos, proteínas, ácidos nucleicos, lipídios e água (DONLAN, 2002; BATONI *et al.*, 2011; FLEMMING; WINGENDER, 2010; (KLEIN *et al.*, 2015).

A função dessa matriz extracelular é garantir estabilidade mecânica, proteção, adesão e coesão microbiana para os microrganismos que formam o biofilme. Ajuda a moldar a heterogeneidade espacial, metabólica e microambiental do biofilme. Ademais, a água dessa matriz faz canais no interior do biofilme que hidrata os nutrientes e facilita a ação de enzimas que promovem a degradação de compostos tóxicos que podem afetar de modo negativo os microrganismos da comunidade (FLEMMING; WINGENDER, 2010; HOURY *et al.*, 2012; WILKING *et al.*, 2013).

Conforme o biofilme se desenvolve outros microrganismos se aderem, movimento este chamado de coadesão ou coagregação. Esses microrganismos que se agregaram de modo secundário podem ser de outras espécies e então esse biofilme se caracteriza como multiespécie, a exemplo são os biofilmes da cavidade oral (RICKARD *et al.*, 2006; KOLENBRANDER, 2010; ELIAS; BANIN, 2012; RØDER; SØRENSEN; BURMØLLE, 2016). A correlação entre as diferentes espécies em um biofilme permite algumas vantagens, como o aumento da

resistência a antimicrobianos e o aumento da virulência (MAH; O'TOOLE, 2001; ELIAS; BANIN, 2012; PASTAR et al., 2013; RØDER; SØRENSEN; BURMØLLE, 2016).

No decorrer do processo de formação do biofilme as bactérias mantêm um sistema de comunicação com atuação intra e intercelular, definido como *quorum sensing*. Esse mecanismo potencializa a efetividade do biofilme, garantindo adaptação rápida a mudanças ambientais, a nutrição e a adesão celular. Além disso, promove um sistema de comunicação por meio de autoindutores (LI; TIAN, 2012; READING; SPERANDIO, 2006).

Essa comunicação controlada por moléculas químicas denominadas de autoindutores favorece a comunicação célula a célula. Quando os autoindutores atingem um limiar crítico, as bactérias alteram a expressão gênica como resposta ao sinal (READING; SPERANDIO, 2006; KELLER; SURETE, 2006). Entre as vias de sinalização, Reading e Esperanto (2006) indicam três vias, uma utilizada por bactérias Gram-positivas, outras por Gram-positivas e uma terceira via que seria universal.

Por conseguinte, com base na literatura apresentada é notória a organização do processo de formação do biofilme e como os fatores físico-químicos operam de forma conjunta para regular os mecanismos de cada fase de formação. Na última etapa, quando o biofilme atinge seu ápice de desenvolvimento, acontece uma dispersão, isso significa que há uma liberação dos microrganismos mais superficiais para sua forma planctônica. Assim, essas bactérias estão livres para colonizar novos ambientes e superfícies, reiniciando a formação de novos biofilmes (DUNNE, 2002; DAVIES, 2003).

2.1.3 Biofilme e patologias associadas

A doença faz parte da dinâmica vital e se inscreve em todos os setores da relação do homem com a natureza e dos homens ente si (ALBUQUERQUE, 2007). Há microrganismos instalados em diversas partes do corpo humano. Para Jenkinson e Lamont (2005) a maioria desses microrganismos que habitam o corpo humano são bactérias, cuja população é dez vezes maior que o número de células humanas.

As bactérias podem ser encontradas em um conjunto de variedades de superfícies, habitats, tecidos vivos, ambientes marinhos, sistema de tubulação de água e também em dispositivos odontológicos, médicos e/ou industriais. Desse modo, se há bactérias há produção de biofilmes AKCALI et al., 2013; O'DONNELL et al., 2015; WILLCOX, 2013; LOPÉZ; VLAMAKIS; KOLTER, 2010).

Nesse sentido, os biofilmes possuem capacidade de colonizar o organismo humano

e uma vez instalados são agentes causadores de diversas patologias, como infecções do trato urinário, otite média, cárie, gengivite, periodontite, estomatite associada a prótese, peri-implantite, endocardite microbiana e fibrose cística, entre outras enfermidades (DONLAN; COSTERTON, 2002; DAVIES, 2003; KOLENBRANDER et al., 2010; YASSIN et al., 2016; ZHENG et al., 2015). Assim, por apresentarem relação direta com a etiologia de diversas infecções, os biofilmes possuem grande importância clínica devido aos danos causados a saúde (HØIBY, 2011).

Segundo o centro de pesquisa biomédica National Institutes of Health (NIH), mais de 80% das infecções microbianas são associadas com biofilmes (COGAN, 2006; WIDGEROW, 2008; HØIBY, 2011; MURPHY *et al.*, 2013). Os dispositivos de uso médico, como os cateteres, prótese dentais e aparelhos ortodônticos fixos são comumente associados como fontes de infecções relacionadas aos biofilmes (SIMÕES; SIMÕES; VIEIRA, 2010; BATONI *et al.*, 2011; KHOROUSHI; KACHUIE, 2017).

Entre os microrganismos comumente encontrados e identificados nestes dispositivos médicos podemos citar as bactérias Gram-positivas *Streptococcus sp*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* e as bactérias Gram-negativas *Escherichia coli*, *Klebsiella sp*, *Proteus mirabilis* e *Pseudomonas aeruginosa* (DONLAN, 2001; HOLBAN et al., 2016).

Burmolle et al., (2006) classifica os biofilmes relacionados a infecções desses dispositivos, como multiespécie e os microrganismos que compõem esses biofilmes encontram-se em sinergismo o que favorece o aparecimento de mecanismo intrínsecos de resistência aos agentes antimicrobianos. Esse mecanismo dificulta o diagnóstico e os tratamentos das infecções com as terapias convencionais (BENNETT, 2009; COX; WRIGTH, 2013).

Para Luppens et al., (2002) depois que uma bactéria se agrega ao biofilme consegue se tornar de 10-1000 vezes menos susceptível aos agentes antimicrobianos quando comparada a sua forma planctônica. Essa capacidade das bactérias adquirirem resistência devido a associação aos biofilmes, pois a taxa metabólica e o crescimento bacteriano dos microrganismos associados são reduzidos (DUNNE, 2002; DAVIES, 2003).

2.2 Cárie dentária e lesões endodônticas

De acordo com o dicionário médico Merriam-Webster, os primeiros dados sobre a doença Cárie Dental foram registrados na literatura científica por volta de 1676. A palavra cárie tem origem do latim “caries” que significa decair, apodrecimento ou queda; e do antigo irlandês “ara-chrinn” que significa ele decai. Essa palavra era usada para se referir aos orifícios que apareciam nos dentes sem quaisquer conhecimentos prévios ou critérios da etiologia ou patogênese da doença em si.

No entanto, o termo cárie foi utilizado de forma generalizada para descrever todas as lesões cavitadas na estrutura dentária e em quaisquer estados de desenvolvimento (BOWEN, 2015). Assim, Appleton, em 1944, salientou a necessidade de estabelecer critérios para uso da palavra cárie. Assim, definiu duas fases: a formação da lesão e a cavidade. Sendo assim, o termo Cárie Dental deve ser utilizado para a doença cárie, compreendendo os aspectos etiológicos e patogênicos, ao passo que as cavidades oriundas do processo foram definidas como lesões cariosas (BOWEN, 2015; SIMÓN-SORO; MIRA, 2015).

Para Lima (2007) a cárie dentária é uma doença multifatorial, infecciosa e dieta dependente, que provoca um processo de desmineralização das estruturas dentárias de forma gradual. Neste sentido, é necessário compreender os diversos fatores etiológicos envolvidos no processo de formação da cárie para que se possa estabelecer técnicas de prevenção mais eficientes, sem que se corra o risco de promover algum desequilíbrio com consequências piores do que a própria “doença” (KLEIN et al., 2015).

As bactérias da cavidade oral estão organizadas na forma de biofilme. Esse tipo de disposição se configura como um mecanismo de virulência, visto que se desses microrganismos estivessem em sua forma livre, isto é, na forma planctônica seriam facilmente deglutidos devido ao fluxo salivar constante (KOLENBRANDER *et al.*, 2010). Assim, na cavidade oral, a coadesão das bactérias é crucial para o processo de colonização e persistência em biofilmes (KOO; BOWEN, 2014).

Após o processo inicial de formação do biofilme por meio de interações específicas, diferentes espécies de bactérias se aderem secundariamente agregação bacteriana através dos mecanismos de coadesão e coagregação. Dessa forma, esses mecanismos possibilitam a formação do biofilme por diferentes espécies de microrganismos (LOESCHE, 1986; BOS; MEI; BUSSCHER, 1996; KOLENBRANDER *et al.*, 2010).

A cárie dentária é considerada uma doença de alta prevalência por afetar aproximadamente 80-90% da população mundial e apresenta bactérias sacrolíticas

fermentativas como agentes etiológicos, a exemplo o *Streptococcus mutans* (SIMÓN-SORO; MIRA, 2015; HASIBUL *et al.*, 2017). Embora seja uma doença que requer preocupação a nível mundial, a doença cárie pode ser evitada por meio de intervenções adequadas nas fases iniciais de desenvolvimento (GURAV; JADHAV, 2011).

O desenvolvimento das lesões de cárie ocorre a partir de um processo dinâmico, complexo, e como supracitado, multifatorial. Para se entender a formação, a progressão e definição das lesões cariosas, é necessário compreender a composição da estrutura dentária, bem como os mecanismo desmineralização e remineralização, conhecido como des-re (CURY; TENUTA, 2009).

A cavidade bucal é um ambiente que apresenta uma dinâmica constante, pois sua condição natural permite diversas funções, como fala, alimentação e também é o local onde inicia o processo digestivo. Assim, por participar de diferentes funções passa por variações constantes de pH seja devido a alimentação ou ao refluxo gástrico. Essas variações de pH promovem alterações químicas e bioquímicas nas nanoestruturas que constituem o esmalte e a dentina. Quando esses constituintes sofrem agressões ácidas, os íons de cálcio e fosfato responsáveis pela mineralização dos cristais de hidroxiapatita são solubilizados no meio oral (FEATHERSTONE, 2008; SILVA, 2016). FIGURA

No entanto, esse processo de des-re ocorre constantemente e de maneira rápida na cavidade oral, dado que a saliva apresenta capacidade tampão e o pH é reestabelecido a condição de fisiológico e a remineralização se inicia. Nesse estágio os íons de cálcio e fosfato que foram perdidos na desmineralização são recuperados e incorporados ao dente. (FEATHERSTONE, 2008).

Para que se tenha cárie é necessário um desequilíbrio nas etapas de desmineralização e remineralização. Esse desequilíbrio inicia com o metabolismo de carboidratos por bactérias acidogênicas que produzem ácidos. Esses ácidos reduzem o pH, o processo de desmineralização é intensificado, ocorre a solubilização dos diversos minerais que compõem a estrutura dentária e há dissolução dos cristais de hidroxiapatita que são os principais componentes do esmalte dentário causando as lesões cariosas (CURY; TENUTA, 2009; PINHEIRO, 2017).

Após o estabelecimento das primeiras lesões na superfície dentária pelos colonizadores iniciais, como *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus oralis* e *Streptococcus parasanguinis*, *Streptococcus mutans* o biofilme envelhece e a composição bacteriana muda. Nessa nova fase temos a presença do gênero *Actinomyces*. No entanto, o *Streptococcus mutans* é dominante. Há ainda a presença dos Lactobacilos que associados aos *Streptococcus* não-

mutans exacerbam o poder acidogênico do biofilme sendo essa fase chamada de acidogênica (TAKAHASHI, 2011; NYVAD, 2011; SILVA, 2016).

Assim, a composição do biofilme muda, o pH cai drasticamente, o processo cariioso avança, alcança a dentina, as agressões continuam, acometem a polpa provocando lesões endodônticas e periapicais. À medida que a cárie se desenvolve a microbiota é alterada dando lugar a novas espécies e grupos de bactérias que agredem os tecidos dentais, como afirma Fabregas (2003).

Figura 2 – Sequência de evolução da cárie dentária.



Fonte: Blog Oraldents. Sequência de desenvolvimento da cárie dentária e o comprometimento dos tecidos dentários.

A polpa dentária pode ser acometida de forma direta pela cárie, ou seja, o processo cariioso destrói a estrutura dentaria e expõe a polpa estabelecendo comunicação com a cavidade oral. A polpa também pode ser acometida de modo indireto quando os microrganismos penetram nos túbulos dentinários e alcançam o tecido pulpar. Uma vez lesada, a polpa responde com um processo inflamatório chamado de pulpíte (TASCHIERI et al., 2014).

Depois de estabelecida a pulpíte é necessário identificar se é um quadro reversível ou irreversível. Segundo, Park (2015), caso seja reversível significa que a inflamação não necrosou vasos e nervos e a condição pode ser revertida. Caso seja irreversível, isto é, quando a infecção se difundiu e não é possível reparar os danos evoluindo para necrose pulpar. Nesse estado temo uma disseminação de microrganismos pelo canal radicular e pelo SCR (SILVA, 2016).

Para realizar o tratamento para as infecções endodônticas a Odontologia dispõe da Endodontia que é uma especialidade que estuda a cavidade pulpar e propõe procedimentos para tratamento das afecções pulpares e perirradiculares. Desse modo, conforme estabelece Plotino (2016), o tratamento endodôntico é uma técnica que utiliza instrumentos, medicamentos e produtos que remove o tecido pulpar contaminado e descontamina o canal radicular e o SCR.

Figura 3: Sequência de tratamento endodôntico.



Fonte: Implart. Sequência operatória do tratamento endodôntico com ilustrações do acesso, abertura do dente para remoção de todo o tecido contaminado e exposição da câmara pulpar, instrumentação e obturação dos canais.

Dentre as indicações para a realização de tratamento de canal a literatura apresenta as infecções microbianas de origem cariosa como causa principal desenvolvimento de pulpites e lesões endodônticas (ZEHNDER; BELIBASAKIS, 2015; ANDREASEN; KAHLER, 2015; TASCHIERI et al., 2014). Outros fatores podem indicar a necessidade de tratamento endodôntico, como os traumatismos dento-alveolares.

Em relação as pesquisas sobre as taxas de prevalência e incidência de lesões endodônticas os dados existentes não se difundem de modo equivalente, pois há dificuldades no estabelecimento de um padrão de estudo e identificação dos dados da população mundial. Para Silva (2016), no Brasil, as pesquisas sobre a necessidade de tratamento endodôntico em diversas faixas etárias da população ainda são limitadas.

Entretanto, em 2010 o Ministério da Saúde (MS) divulgou o estudo sobre as condições de saúde bucal SB Brasil que em média, 0,4% da população apresentava necessidade de tratamento endodôntico. Apesar do índice nacional relativamente baixo, as regiões Norte e Nordeste do país apresentaram as maiores médias (1% e 0,5% respectivamente) (BRASIL, 2011; SILVA, 2016). Um fator importante para se compreender essa porcentagem simplória é a cultura mutiladora da odontologia, a qual predomina a prática da exodontia.

Nesse sentido, quando o diagnóstico inicial e o planejamento do tratamento endodôntico são realizados as chances de sucesso, de acordo com Kojima et al., (2004) são 82,8%. Nesse momento, a infecção endodôntica está em estágio dinâmico, isto é, os diversos microrganismos da infecção mudam de acordo com a evolução da doença. A microbiota sofre alterações porque as fontes de nutrientes, níveis de oxigênio e pH são diferentes em cada segmento do SCR (SANTOS et al., 2011).

A fase primária da infecção endodôntica compreende microrganismos anaeróbios

facultativos e aeróbios, pois existe uma comunicação direta entre da cavidade oral com SCR. Tais dentes são considerados mais “resistentes” ao tratamento em virtude da alta concentração de bactérias entéricas no canal radicular (SIREN et al., 1997). Vale ressaltar, segundo Tzanetakis et al., (2015) que ainda que os dentes que apresentam comunicação da polpa com a cavidade oral possuam bactérias do gênero *Enterococcus* esse grupo é predominante nas infecções tardias ou secundária, em outros termos, promovem infecções após o tratamento endodôntico, sendo necessário um retratamento.

Em geral, a progressão da infecção decorre de tratamentos primários inadequados ou agentes químicos ineficientes (TZANETAKIS et al., 2015; ZAKARIA et al., 2014; SAKAMOTO et al., 2008). Uma das espécies de bactérias dominantes nessas infecções persistentes é a *Enterococcus faecalis*, que apresenta alta prevalência, sendo encontrada em até 90% dos casos de infecção persistente no interior dos canais radiculares ou na região perirradicular dos dentes tratados e obturados (TZANETAKIS et al., 2015). Isso significa que esse grupo de bactérias resistiram ao preparo químico-mecânico ou a medicação intracanal.

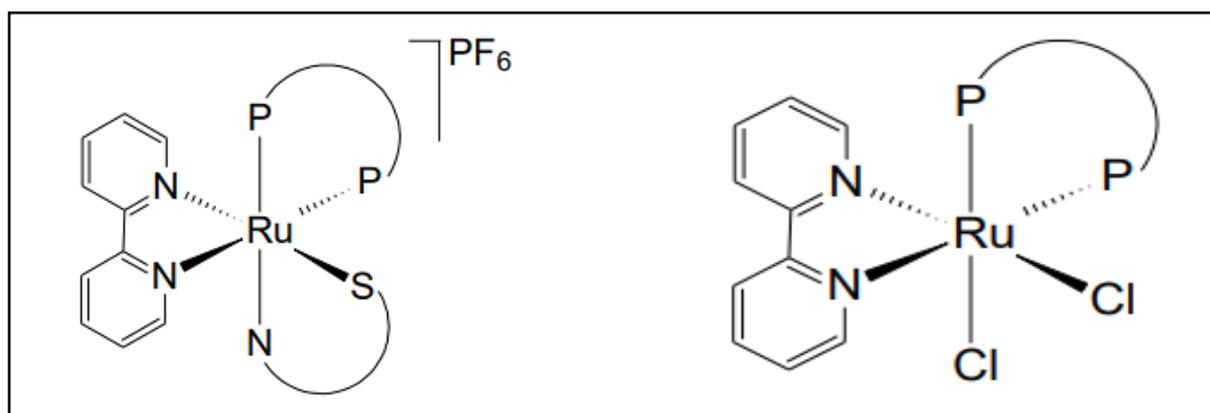
2.3 Complexos de rutênio

O elemento rutênio (Ru) é um metal raro, duro, lustroso, brilhoso e prateado e muito resistente a temperatura ambiente. Com um número atômico de 44 possui uma massa atômica relativa de 101,07, e está no Grupo 8, período 5 da Tabela Periódica. De acordo com Poole (2017), os primeiros relatos da descoberta do rutênio datam do século 18, no entanto, em 1825, Gottfried Osann, da Universidade de Dorpat (agora Tartu) no Báltico, investigou a platina das Montanhas Urais e relatou encontrar três novos elementos, que ele chamou de plurânio, polínio e rutênio, assim, enquanto os dois primeiros nunca foram verificados, o terceiro foi genuíno e, em 1840, Karl Karlovich Klaus na Universidade de Kazan extraiu, purificou e confirmou que era um novo metal em 1844, o qual manteve o nome de rutênio, derivado de "Ruthenia", o nome latino para a Rússia.

Segundo Aminov (2010), o emprego de compostos à base de metal como agentes antimicrobianos não é um novo conceito, pois há registros do uso destes complexos metálicos antes mesmo da aplicação dos antibióticos clássicos, já que no início do século XX, a busca de Paul Ehrlich por uma "bala mágica" que seria seletivamente alvo do agente causador da sífilis, *Treponema pallidum*, sobre células hospedeiras, levou ao desenvolvimento do composto organoarsênico comercializado como Salvarsan ou composto 606. O Salvarsan tornou-se o mais frequente fármaco prescrito para o tratamento de infecções antimicrobianas até sua substituição

pela penicilina na década de 1940, resultante dos trabalhos de Fleming, Florey e Chain (CHAIN *et al.*, 2005). Na década de 1960, a descoberta serendípica de Rosenberg que os complexos de platina inibiram a divisão celular de *E. coli*, eventualmente, levaram a aplicação clínico da cisplatina como quimioterápico antitumoral na década de 1970. Após o sucesso da penicilina e outros antibióticos nas décadas de 1940 a 1960, os compostos orgânicos substituíram os antimicrobianos à base de metal.

Figura – 4: Exemplos de complexos de rutênio.



Fonte: Lima (2015). Estruturas químicas dos compostos de rutênio: $[\text{Ru}(\text{NS})(\text{bipy})(\text{PP})]\text{PF}_6$; $\text{cis-}[\text{RuCl}_2(\text{bipy})(\text{PP})]$.

O interesse pelos biólogos no rutênio pode ser atribuído a uma das mais conhecidas aplicações na medicina contemporânea: o câncer, que inicialmente era tratado pelo diamino-dicloro-platina que foi originalmente identificado como um agente antimicrobiano potencial na década de 1960 por Rosenberg e colaboradores. Mais tarde, demonstrou-se que a cisplatina era um agente quimioterápico anticancerígeno altamente eficaz especialmente no tratamento de tumores sólidos primários da bexiga, pulmão, testículos, ovários, cabeça e pescoço (SIDDIK, 2003). Estudos posteriores, demonstraram que a cisplatina liga-se ao resíduo N7 de purinas de DNA, resultando em reticulação intracelular que bloqueia a replicação do DNA, evita a divisão celular e resulta em morte por apoptose (DASARI, TCHOUNWOU, 2014).

Como pode se ver, a utilização de compostos sintéticos à base de metais precede ao uso de antibióticos clássicos (SOUTHAM, 2017). Neste cenário, complexos de rutênio são vistos como compostos com potencial antimicrobiano, visto que existem mais de 200 artigos na literatura científica abordando a atividade antimicrobiana de diferentes compostos que possuem o elemento rutênio como base. Sua estrutura é baseada em um centro metálico contendo o átomo do elemento rutênio (Ru) em um de seus estados de oxidação, possuindo

geralmente de dois a três ligantes dos tipos piridina, fosfina, difenilfosfina, entre outros. (LI; COLLINS; KEENE, 2015; SOUTHAM, 2017; ANDRADE, 2018).

2.4 Terapia fotodinâmica

A terapia fotodinâmica (TFD) é uma importante estratégia contra diversas patologias porque é uma intervenção não invasiva que usa luz para aumentar a ação de um fármaco fotossensibilizador no região de interesse (KNOLL *et al.*, 2015). Uma estratégia promissora que pode ser soamda as terapias antimicrobiana com complexos de metais é a terapia fotodinâmica (TFD), que através da fotogeração de EROs, contribui para o controle do crescimento microbiano. Segundo a literatura, esse processo causaria danos em muitas biomoléculas (por exemplo, DNA), levando à morte microbiana (SPAGNUL, TURNER e BOYLE, 2015). Uma série de complexos à base de rutênio foi relatado para ter atividade antibacteriana aumentada sob luz irradiação, que está associada à geração de ERO. Os complexos de polipiridina de rutênio podem ser ajustados para exibir propriedades ópticas adequadas (por exemplo, bandas de comprimento de onda longo, forte absorvidade) juntamente com alto rendimento quântico para a formação de 1O_2 , permitindo seu possível uso em TFD (ABREU *et al.*, 2017).

Destaca-se que o princípio da terapia fotodinâmica é baseado na combinação de 3 elementos: uma molécula não tóxica, fotossensitizador (luz em um espectro que apropriado para causar excitação no fotossensitizador) e oxigênio molecular (CIEPLIK *et al.*, 2018)

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar a atividade antimicrobiana *in vitro* do complexo de rutênio [RuCl(dppb)NO₂] contra o crescimento de células planctônicas e o desenvolvimento de biofilmes de *Enterococcus faecalis*.

3.2 Objetivos Específicos

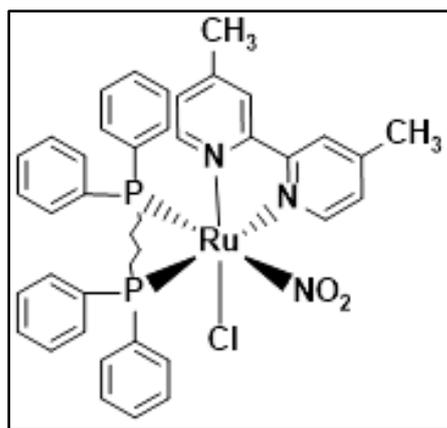
- Avaliar o efeito do complexo de rutênio [RuCl(dppb)NO₂] sobre o crescimento planctônico de *Enterococcus faecalis* ATCC 19433 e *Enterococcus faecalis* ATCC 10100;
- Avaliar a atividade do complexo de rutênio [RuCl(dppb)NO₂] sobre a formação de biofilmes e a redução no número de células viáveis de *Enterococcus faecalis* ATCC 19433 e *Enterococcus faecalis* ATCC 10100;
- Avaliar a atividade do complexo de rutênio [RuCl(dppb)NO₂] sobre biofilmes pré-formados de *Enterococcus faecalis* ATCC 19433 e *Enterococcus faecalis* ATCC 10100;

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Obtenção dos complexos de Rutênio

O complexo de rutênio utilizado nesse estudo foi sintetizado e gentilmente cedido pela Profa. Dra. Alda Karine Holanda da Universidade Federal do Ceará (UFC). O complexo de rutênio de nome $[\text{RuCl}(\text{dppb})\text{NO}_2]$ foi designado de RuNO_2 e sua fórmula estrutural está mostrada na figura 5.

Figura 5 – Estrutura do complexo de rutênio RuNO_2



Fonte: Imagem cedida pela Profa. Dra. Alda Karine Holanda – UFC.

4.2 Microrganismos e condições de cultivo

Os micro-organismos utilizados no estudo foram: *Enterococcus faecalis* ATCC 19433 e *Enterococcus faecalis* ATCC 10100, obtidos da American Type Culture Collection (ATCC). A partir da suspensão estoque armazenada a -80°C em caldo Brain Heart Infusion (BHI; Himedia, Índia) com 20% de glicerol, as cepas bacterianas foram coletadas e estriadas em placas de petri contendo meio BHI Ágar, em seguida incubadas a 37°C em 5% de CO_2 por 24 horas.

Após o crescimento em meio sólido as colônias foram transferidas para 5 mL de caldo BHI suplementado com 1% de sacarose e incubadas novamente a 37°C em 5% de CO_2 por 24 horas. Depois da fase de ativação, a concentração de células de cada espécie bacteriana foi ajustada para 2×10^6 células/mL através da diluição em caldo BHI suplementado com 1% de sacarose e com auxílio de um leitor de placas por análise de turbidimetria (620 nm).

4.3 Ensaio de atividade sobre o crescimento planctônico dos microrganismos

A análise do efeito do complexo RuNO₂ sobre o crescimento planctônico foi realizada por meio do teste de microdiluição em placas de poliestireno de 96 poços de fundo chato. O complexo foi diluído em meio BHI suplementado com 1% de sacarose nas concentrações de 125 a 1.9 µg/mL. Cada poço da microplaca foi preenchido com 100 µL do meio de cultura contendo o complexo em suas diferentes concentrações. Posteriormente, foram adicionados 100 µL de uma suspensão de bactérias ajustadas a 2×10^6 células/mL obtendo um volume final em cada poço de 200 µL, em seguida submetidas a irradiação com luz azul (463nm) por uma hora e logo depois as placas foram incubadas a 37°C durante 24 horas a 37°C com 5,0 % de CO₂.

Após incubação foi feito a determinação da Concentração Mínima Inibitória (CIM) através da análise visual das placas e a medida de turbidez de cada poço com o auxílio do leitor de microplacas (Spectramax) a 620 nm. Foi considerado CIM a menor concentração do composto capaz de inibir o crescimento bacteriano. Para determinar a Concentração Bactericida Mínima (CBM) 10 µL da suspensão contida nos poços em que não houve um crescimento bacteriano visível foi transferido para placas de petri com meio BHI Ágar. Foi considerada CBM a menor concentração da substância testada capaz de inibir completamente o crescimento bacteriano nas placas de Petri.

4.4 Ensaio de atividade sobre a formação de biofilme

A verificação da atividade do complexo RuNO₂ sobre a formação de biofilmes foi realizada segundo a metodologia descrita por Stepanovic *et al.* (2000) com base no teste de placa de microtitulação. As placas de poliestireno de 96 poços de fundo chato foram preparadas por meio de um procedimento semelhante ao utilizado para determinação dos efeitos do composto sobre o crescimento planctônico e sendo também submetidas a irradiação com luz azul (463nm). A formação do biofilme foi avaliada quanto à quantificação da biomassa e pela contagem das Unidades Formadoras de Colônias (UFC).

4.4.1 Quantificação da biomassa

As placas foram encubadas por 24 horas a 37°C com 5,0 % de CO₂, para desenvolvimento do biofilme. Após o crescimento do biofilme, o sobrenadante dos poços foi

removido e cada poço foi submetido a três lavagens com 200 μL de água destilada estéril. Para quantificar a biomassa do biofilme foi utilizado o método colorimétrico cristal violeta (CV).

Para realização da coloração por CV os poços foram secos, posteriormente adicionou-se 200 μL de metanol a 100% por 15 minutos com o objetivo de fixar o biofilme. Em seguida o metanol foi removido e adicionado 200 μL de CV a 1% em cada poço por 5 minutos. Logo após os poços foram novamente lavados com água estéril para retirar o excesso do CV e adicionaram-se 200 μL de ácido acético 33% por 5 minutos e a absorbância foi medida com o auxílio do espectrofotômetro (Spectramax) à 590 nm.

4.4.2 Contagem das Unidades Formadoras de Colônias (UFC)

As placas foram incubadas por 24 horas a 37°C com 5,0 % de CO_2 para crescimento do biofilme. Posteriormente os poços foram lavados com 200 μL de água destilada estéril por três vezes sendo que na última lavagem a água foi deixada nos poços e as placas foram levadas para o banho ultrassônico (Sonicor/SC-52) por 6 minutos para a liberação das bactérias aderidas ao biofilme. Todo o experimento foi realizado em quintuplicata, dessa forma, o volume dos cinco poços foi reunido em um microtubo estéril perfazendo um volume final de 1mL. Esse procedimento foi realizado para todas as diferentes concentrações da substância testada.

O conteúdo foi colocado no microtubo foi redistribuído em uma placa de 96 poços onde se realizou diluições na base dez. Em seguida, 10 μL da suspensão dos poços foram transferidos para uma placa de petri com meio BHI Ágar que foram incubadas a 37°C durante 24 horas com 5,0 % de CO_2 . Posteriormente foi realizada a contagem das unidades formadoras de colônias em cada placa de petri. O valor foi expresso em \log_{10} UFC/mL.

4.5 Biofilme pré-formado

Os ensaios também foram realizados em placas de 96 poços (200 μL com 1×10^6 UFC/mL) e foram incubadas durante 24 h a 37°C em 5,0 % de CO_2 . Após 24 h, 200 μL de meio foi removido de cada poço, e um volume igual do complexo RuNO_2 em concentrações que variaram de 125 a 1.9 $\mu\text{g/mL}$ foi adicionado. Após 24 h, o sobrenadante novamente foi retirado e todos os poços foram lavados três vezes com água destilada estéril para remoção das células fracamente aderidas. Em seguida, os biofilmes foram avaliados quanto a formação de biomassa e número de células viáveis como descrito anteriormente.

4.6 Análise estatística

Todos os experimentos foram realizados em quintuplicata com os respectivos resultados categorizados em Microsoft Excel® (Versão 2010 para Windows) e posterior análise estatística no Software GraphPad Prism® (Versão 5.0 para Windows). Para a análise de diferenças intergrupos foi realizado análise de variância ANOVA com pós-teste de Bonferroni e nível de significância de $p < 0,05$.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados da atividade antimicrobiana do complexo de rutênio sobre o crescimento planctônico dos microrganismos testados, foram avaliados através dos ensaios de determinação de CIM e CBM, com e sem irradiação de luz de led azul. De modo geral, o complexo de rutênio [RuCl(dppb)NO₂] obteve ação bacteriostática e bactericida e conseguiu reduzir o número de UFCs, a partir das primeiras horas de contato com os microrganismos (Tabela 1).

Tabela 1. Atividade antimicrobiana de RuNO₂ contra *Enterococcus faecalis*. As concentrações variaram de 125 a 1,9 µg/mL.

Composto	Irradiação com LED azul		Bactérias	
			<i>E. faecalis</i> ATCC 19433	<i>E. faecalis</i> ATCC 10100
RuCl(dppb)NO ₂	Com	MIC	3,9	3,9
		MBC	3,9	7,8
	Sem	MIC	7,8	15,6
		MBC	15,6	31,2

Fonte: elaborada pela autora.

Observou-se que o complexo RuNO₂ quando irradiado por luz, apresentou valores de CIM para as cepas de *E. faecalis* 19433 e *E. faecalis* 10100 de 3,9 µg/mL e de CBM de os valores foram de 3,9 e 7,8 µg/mL respectivamente. No entanto, na ausência de luz, o complexo apresentou valores de CIM entre 7,8 e 15,6 µg/mL e de CBM entre 15,6 e 31,2 µg/mL para ambas as cepas, conforme está mostrado na tabela 1.

Como os menores valores da CIM e da CBM foram observados quando o complexo foi irradiado por luz azul, seguiu-se com os demais ensaios da atividade antibiofilme apenas nesta condição.

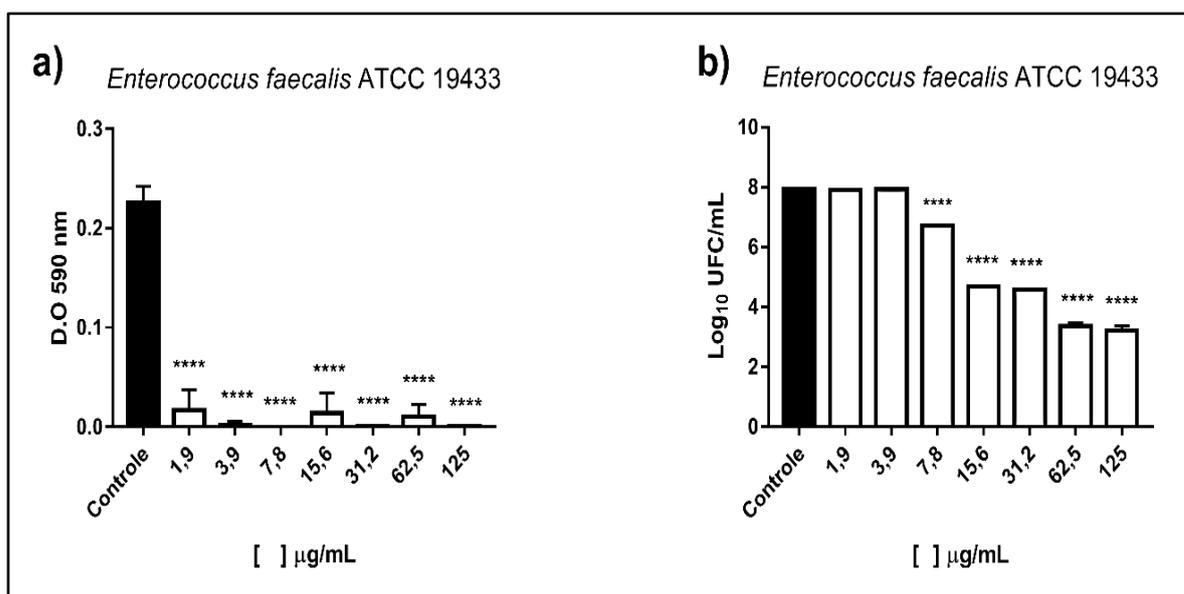
5.1 Atividade antibiofilme: inibição da formação de biofilmes e contagem de células viáveis

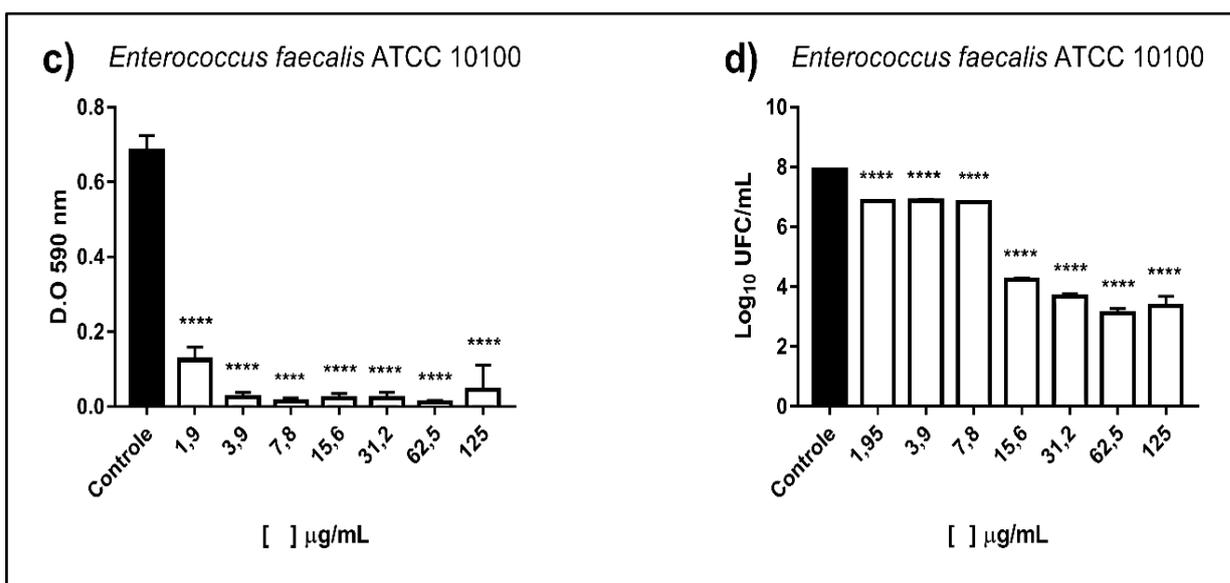
Na figura 6 encontram-se os resultados do complexo de rutênio em relação a avaliação sobre inibição da formação de biofilmes, quantificados pelo método colorimétrico CV e da enumeração de células viáveis do biofilme, pelo método de contagem das UFCs.

Como pode se observar na figura 6, complexo RuNO₂ inibiu a formação da biomassa em todas as concentrações, com níveis de redução entre 92 e 100% (figura 6 - a) para a cepa *E. faecalis* ATCC 19433. Para a cepa *E. faecalis* ATCC 10100 observou-se inibição da biomassa entre 81 a 98% (figura 6 - c).

Em relação ao número de células viáveis no biofilme, percebeu-se também uma redução significativa no número de UFCs dos biofilmes das cepas de *E. faecalis* (figuras 6 - b e d). Como se pode notar, tanto para a cepa *E. faecalis* ATCC 19433 quando para *E. faecalis* ATCC 10100, houve redução do número de células viáveis entre 1,2 a 4, 7 logs. Interessante como para *E. faecalis* ATCC 10100, observou-se redução de 1 log para as mesmas concentrações da CBM (figura 6 - d).

Figura 6 – Efeito do complexo de rutênio RuNO₂ sobre a formação de biofilmes de *E. faecalis*.





Fonte: Próprio autor. Quantificação da biomassa (a, c) e número de células viáveis (b, d). Barras brancas representam bactérias tratadas com RuNO₂, barras pretas representam bactérias sem tratamento. *** $p < 0,001$ em relação ao controle.

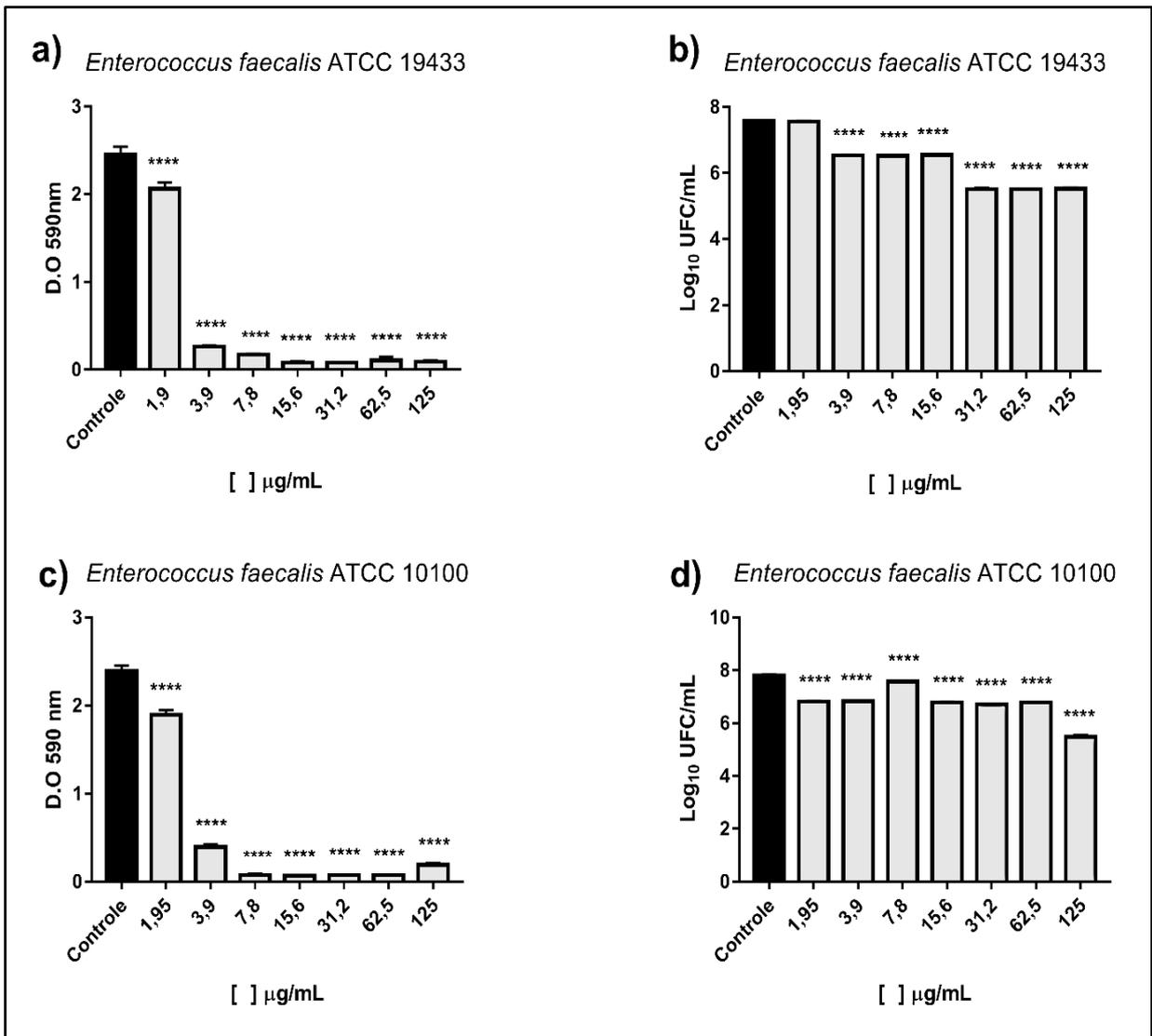
5.2 Atividade sobre biofilmes pré-formados: quantificação da biomassa e contagem de células viáveis

Além dos ensaios sobre a avaliação da inibição da formação de biofilmes na presença do complexo de rutênio, este composto também foi adicionado para tratar os biofilmes pré-formados, no intuito de verificar sua ação na redução da biomassa e no número de células viáveis.

Para este ensaio, os resultados mostraram que o complexo RuNO₂ foi capaz de reduzir a biomassa dos biofilmes em mais de 83% na concentração de 3,9 $\mu\text{g/mL}$ para ambas as cepas de *E. faecalis*. Observou-se que a cepa *E. faecalis* ATCC 10100 se mostrou mais sensíveis ao tratamento com o complexo, já que exibiu redução da biomassa do biofilme pré-formado entre 20 e 97%, desde a menor até a maior concentração (figura xx c).

Em relação ao número de células viáveis dos biofilmes pré-formados (figura 7 - b, d), RuNO₂ reduziu o número de UFCs entre 1 e 2 logs em quase todas as concentrações testadas para as cepas. A cepa *E. faecalis* ATCC 10100 mostrou níveis de redução de quase 1 log para a concentração de 1,9 $\mu\text{g/mL}$ (figura 7 - d).

Figura 7 – Efeito do complexo de rutênio RuNO₂ sobre biofilmes pré-formados de *E. faecalis*.



Fonte: Próprio autor. Quantificação da biomassa (a, c) e número de células viáveis (b, d). Barras brancas representam bactérias tratadas com RuNO₂, barras pretas representam bactérias sem tratamento. *** $p < 0,001$ em relação ao controle.

6 DISCUSSÃO

Sousa *et al.*, (2018), avaliou a atividade antimicrobiana de três complexos de rutênio do tipo $\text{cis-}[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{clbzpy})(\text{Cl})](\text{PF}_6)$ tanto com a irradiação como na ausência de luz. Como resultado, os pesquisadores verificaram que dois dos complexos apresentaram atividade moderada contra as bactérias Gram-positivas *S. aureus* e *S. epidermidis*, sendo que o terceiro complexo não, e que nenhum dos três complexos mostrou atividade contra a bactéria Gram-negativa *P. aeruginosa*, sendo que a irradiação de luz não promoveu nenhuma alteração importante na atividade antimicrobiana, o que levou esses pesquisadores a relacionarem atividade antimicrobiana à ruptura da membrana bacteriana e não a danos do DNA, como imaginavam.

Os resultados obtidos em nossa pesquisa, estão em concordância com os resultados apresentados por Sousa *et al.*, (2018). Em nosso estudo, foram avaliadas as atividades antibacteriana, antibiofilme do complexo de rutênio RuNO_2 sobre *E. faecalis*. Para a atividade antibacteriana sobre células planctônicas, conforme dados mostrados na tabela 1, o complexo exibiu tanto efeito bacteriostático (CIM) quanto bactericida (CBM a partir das concentrações de 3,9 e 7,8 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente.

Um estudo realizado por Da Silveira Carvalho *et al.*, (2017), que também avaliou a atividade antimicrobiana do complexo $\text{cis-}[\text{RuCl}(\text{CO})(\text{dppb})(\text{dppz})]^+$ com e sem a irradiação de luz azul, sobre bactérias e leveduras, apresentou resultados contra Gram-positivo *S. aureus* e *S. epidermidis*, cujas CIMs variaram de 1,23 a 9,82 mmol/L, bem próximos das CIMs da amicacina, um agente antimicrobiano de referência, e uma excelente atividade que inibiu a cepa *Candida albicans*. No entanto, este complexo não apresentou atividade contra bactérias Gram-negativas mesmo em sua maior concentração de 39 mmol/L, e nenhuma alteração da atividade antimicrobiana foi verificada com a irradiação da luz. Abreu *et al.*, (2017) em contrapartida, obteve resultados similares, mas a atividade antimicrobiana foi aprimorada pela irradiação de luz azul.

Assim como nos resultados dos estudos mencionados, nossos resultados apontaram uma aparente preferência do complexo RuNO_2 , em agir sobre cepas de bactérias Gram-positivas, apresentando CIMs em torno de 3,9 $\mu\text{g/mL}$. Esse fenômeno pode estar relacionado ao fato dos complexos de rutênio geralmente serem carregados positivamente, o que pode ajudá-los a interagir com muitos alvos bacterianos como os fosfolipídios (por exemplo, fosfatidil-glicerol, ácidos teicóicos e lipoteicóicos) na membrana bacteriana e na parede celular

de bactérias Gram-positivas (DA SILVEIRA CARVALHO *et al.*, 2017).

Baseados nas características catiônicas que os complexos de rutênio RuNN, RuNN-F e RuNN-Br exibem, e isto associado a propriedade lipofílicas conferidas pelos ligantes fosfina e quinona, nossa hipótese é que estes complexos, são absorvidos pela células bacterianas Gram-positivas, acumulados no citoplasma e, à medida que permanecem inalterados *in vivo*, podem interagir de forma reversível com alvos intracelulares como DNA, RNA, proteínas, membranas ou outros metabólitos, agindo sobre o metabolismo bacteriano, de modo a exercer uma atividade bacteriostática ou bactericida.

Corroborando com essa hipótese, Keene, Collins e colaboradores, ao reexaminarem o complexo de $[Ru(Me_4phen)_3]^{2+}$ observaram que este, apresentava alta atividade bactericida em relação a bactérias Gram-positivas, e atividade moderada contra bactérias Gram-negativas (LI *et al.*, 2011), e concluíram que o complexo foi acumulado pela bactéria, com a extensão da acumulação mais ou menos correlacionada com a atividade bactericida (*S. aureus* > MRSA > *E. coli* > *P. aeruginosa*) (LI, FETERL *et al.*, 2012). Como $[Ru(Me_4phen)_3]^{2+}$ mostrou-se ser mais facilmente acumulado por células Gram-positivas, concluíram que a extensão dos efeitos antimicrobianos seja dependente da extensão da acumulação intracelular e consequente ligação reversível a alvos moleculares (LI; COLLINS, *et al.*, 2015).

Enterococcus faecalis é um patógeno oportunista gram-positivo conhecido por formar biofilmes *in vitro*, Além disso, esse organismo é frequentemente isolado de biofilmes nas superfícies de vários dispositivos médicos residentes e o principal agente causador de infecções endodônticas (KRISTICH *et al.*, 2004). De acordo com Flemming e Wingender (2010), um dos eventos fundamentais durante o desenvolvimento dos biofilmes bacterianos é a produção de substâncias poliméricas extracelulares (SPE) que compõem o espaço intercelular de agregados microbianos e forma a estrutura e arquitetura da matriz do biofilme, e é justamente essa matriz extracelular que proporciona estabilidade mecânica e proteção para os microrganismos (HOURY *et al.*, 2012; WILKING *et al.*, 2013).

As SPE geram a incapacidade dos agentes antimicrobianos de penetrarem no biofilme. Dessa forma, através de uma molécula capaz de inibir a formação ou ainda reduzir a matriz do biofilme, possibilitaria uma intervenção no biofilme já instalado barrando o processo de desmineralização do esmalte dentário. Assim, destacamos os efeitos antibiofilme do complexo RuNO₂ que se mostrou capaz de inibir a formação quase completa para ambas as cepas de *E. faecalis* nas concentrações de 3,9 a 15,6 µg/mL, o que levanta a possibilidade de associar o complexo avaliado neste à outra droga, com ação direta na célula bacteriana, por exemplo, com objetivo de ter um sinergismo de mecanismos de ação contra os microrganismos

formadores de biofilme.

Em nosso estudo observamos que a redução do número de UFCs expressou diferenças estatísticas significativas ($p < 0,001$), onde em alguns casos, a redução no número de células viáveis chegou a quase 4 logs em relação ao controle, o que representou uma diminuição de 10.000 vezes no número de células viáveis no biofilme. Estudos reportados na literatura fazem a relação entre a contagem de células viáveis no biofilme, para determinar se a morte celular bacteriana contribuiu para mudanças na produção e estabilidade da matriz de SPE do biofilme (MURRAY et al., 2012), assim, os resultados encontrados em nosso estudo sugerem que a diminuição no número de UFCs, provavelmente ocasionada pela CIM ou mesmo pela CBM, interfere na densidade celular e conseqüentemente na produção da matriz de SPE do biofilme.

Em relação aos biofilmes pré-formados, os complexos também exibiram atividade antibiofilme com reduções estatisticamente significativas ($p < 0,001$) em relação ao controle de bactérias sem tratamento, mesmo diante dos microrganismos em biofilmes que podem ser até 1000 vezes mais resistentes do que as bactérias planctônicas, para terapias antimicrobianas convencionais, tais como antibióticos (KARYGIANNI *et al.*, 2014). Do mesmo modo, a atividade metabólica que sofre variações na superfície e no interior do biofilme e o número de células viáveis que mesmo estando protegidas no interior da matriz contra a dessecação, a ação de biocidas oxidantes, alguns antibióticos, (FLEMMING; WINGENDER, 2010).

7 CONCLUSÃO

No estudo em questão, conclui-se que o complexo de rutênio RuNO₂ apresentou marcante atividade bacteriostática e bactericida contra as cepas de *Enterococcus faecalis*. Também observou-se efeito antibiofilme, dessa forma, o complexo aqui avaliado pode representar uma alternativa em potencial para a prevenção de biofilmes orais envolvendo *Enterococcus faecalis* e infecções endodônticas. Sugere-se que estudos adicionais sejam realizados com o objetivo de elucidar os mecanismos de ação dos compostos estudados neste trabalho.

REFERÊNCIAS

AAS, J. A. et al. Defining the Normal Bacterial Flora of the Oral Cavity. *Journal Of Clinical Microbiology*, v. 43, n. 11, p. 5721-5732, nov. 2005.

ABEE, T. *et al.* Biofilm formation and dispersal in Gram-positive bacteria. **Curr Opin Biotechnol.**, v. 2, n. 22, p. 172-179, Apr. 2011.

AMINOV, R. I. *Front. Microbiol.*, v. 1, p. 134, 2010.

ANDRADE, A. L. Atividade antibacteriana e antibiofilme de complexos de rutênio do tipo cis-[RuCl₂(dppb)(NN-R)]²⁺ sobre bactérias resistentes e o efeito destes combinados aos antibióticos ampicilina e tetraciclina. 103f. Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia de Recursos Naturais. Fortaleza, 2018.

ANDREASEN, F.M.; KAHLER, B. Pulpal response after acute dental injury in the permanent dentition: clinical implications—a review. **Journal of endodontics.**, v. 41, n. 3, p. 299-308, mar. 2015.

ABREU, F. D *et al.* Aryl-Substituted Ruthenium(II) Complexes: A Strategy for Enhanced Photocleavage and Efficient DNA Binding. n. 2, 2017.

AGARWAL, A.; SINGH, K. P.; JAIN, A. Medical significance and management of staphylococcal biofilm. **FEMS Immunol. Med. MIC.**, v. 58, n. 2, p. 147-160, 2010.

ALLARDYCE, C.S. DYSON, P.J. (2001) Ruthenium in Medicine: Current Clinical Uses and Future Prospects. *Platinum Metals Review*, 45, 62-69. 2001.

APPLETON, J.L. Bacterial infection with Special Reference to Dental Practice. *The American Journal of the Medical Sciences.*, v. 208, n. 3, p. 416, sep. 1944.

BATISTA AA, GONDIM ACS; PAULO, TF, Lopes LGF, Sousa EHS. 2017. A biphosphinic ruthenium complex with potent anti-bacterial and anti-cancer activity. **New J Chem.** 41:13085–13095

BARBOSA, J. O.; ROSSONI, R. D.; VILELA, S. F. G.; DE ALVARENGA, J. A.; VELLOSO, M.; DOS S., PRATA, M. C. DE A.; JUNQUEIRA, J. C. Streptococcus mutans Can Modulate Biofilm Formation and Attenuate the Virulence of C. albicans. *PLoS ONE*, v. 11, n. 3, 16 p, 2016.

BENNETT, P. M. Plasmid encoded antibiotic resistance: acquisition and transfer of antibiotic resistance genes in bacteria. **British Journal Of Pharmacology**, v. 153, n. 1, p.347-357, 29 jan. 2008.

BOING, A. F. et al. Social determinants of health and dental caries in Brazil: a systematic review of the literature between 1999 and 2010. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 17, n. 2, p.102-115, 2014.

BOWEN WH, KOO H. 2011. Biology of Streptococcus mutans-derived glucosyltransferases: role in extracellular matrix formation of cariogenic biofilms. *Caries Res.* 45(1):69-86. doi: 10.1159/000324598.

BOWEN WH. 2015. Dental caries - not just holes in teeth! A perspective. *Mol Oral Microbiol.* 31:228- 233. doi: 10.1111/omi.12132.

BOS, R.; MEI, H.C.; BUSSCHER, H.J. Co-adhesion of Oral Microbial Pairs under Flow in the Presence of Saliva and Lactose. **Journal Of Dental Research**, v. 75, n. 2, p.809-815, fev.1996.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de atenção à saúde. Projeto SB-Brasil: Resultados Principais. Brasília, DF, 2011.

CHAIN E., Florey H. W., Gardner A. D., Heatley N. G., Jennings M. A., Orr-Ewing J., Sanders A. G. (2005). The classic: penicillin as a chemotherapeutic agent. 1940. *Clin. Orthop. Relat. Res.* 439, 23–26.

CIEPLIK et al. Antimicrobial photodynamic therapy—what we know and what we don't. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 44, n. 5, p. 571-589, 2018.

COGAN, N. G. Effects of persister formation on bacterial response to dosing. **J. Theor. Biol.**, v. 238, n. 3, p. 694-703, fev. 2006.

COSTERTON, J. W.; WILSON, M.. Introducing Biofilms. **Biofilms**, v. 1, n. 1, p.1-4, jan.2004.

CHARACKLIS, W. G.; MCFETERS, G. A.; MARSHALL, K.C. Physiological ecology in biofilm systems. **Biofilms**, p. 341–94, 1990.

COX, G.; WRIGTH, G. D. Intrinsic antibiotic resistance: Mechanisms, origins, challenges and solutions. **Int. J. Med. Microbiol.**, v. 303, n. 6-7, p. 287-292, aug. 2013.

COWAN, M. M.; WARREN, T. M.; FLETCHER, M. Mixed species colonization of solid surfaces in laboratory biofilms. **Biofouling**, v. 3, p. 23–34, 1991.

CURY, J. A.; TENUTA, L. M. A. Enamel remineralization: controlling the caries disease or treating early caries lesions?. *Braz Oral Res.*, v. 23, n. 1, p. 23-30, fev. 2009.

DANNE, C.; DRAMSI, S. Pili of gram-positive bacteria: roles in host colonization. *Res Microbiol.*, v. 163, n. 9, p. 645-658, dez. 2012.

DASARI, S.; TCHOUNWOU, P. B. Cisplatin in cancer therapy: Molecular mechanisms of action. **European Journal of Pharmacology.**, v. 740, p. 364–378, 2014.

Dynamics and the Caries Process. **Caries Research**, v. 42, n. 6, p.409-418, 2008.

DONLAN, R. M. Biofilms and device-associated infection. **Emerg Infect Dis.** v. 7, n. 2, p. 277 - 281, 2001.

DUNNE, W. M. Bacterial adhesion: Seen any biofilms lately?. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 15, n. 2, p. 155-166, abr. 2002.

DAVEY, M. E.; OTOOLE, G. A. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics.

Microbiol. Mol. Biol. Rev., v. 64, n. 4, p. 847-867, dez. 2000.

DAVIES, D. Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. **Nat Rev. Drug Discov.**, v. 2, p. 114-122, fev. 2003.

DONLAN, R. M. Biofilms: Microbial Life on Surfaces. **Emerging Infectious Diseases.**, v. 9, n. 8, p. 881-890, 2002.

DONLAN, R. M.; PIPES, W. O.; YOHE, T. L. Biofilm formation on cast iron substrata in water distribution systems. **Water Research**, v. 28, n. 6, p.1497-1503, jun. 1994.

EDUARDO, C. P et al. A terapia fotodinâmica como benefício complementar na clínica odontológica. **Rev. Assoc. Paul. Cir. Dent.** v. 69, n. 3, p. 226 - 235, 2015.

ELIAS, S.; BANIN, E. Multi-species biofilms: living with friendly neighbors. **Fems Microbiology Reviews**, v. 36, n. 5, p. 990-1004, set. 2012.

EFTEKHARI A, MOGHADDAM AB, SOLATI-HASHJIN M. Electrochemical properties of LiMn₂O₄ cathode material doped with an actinide. **J Alloys Compd** 2006;424:225–30.

FABREGAS, L.R.; RUBINSTEIN, J. A mathematical model for the progression of dental caries. **Mathematical Medicine and Biology.**, jun. 2013.

FEATHERSTONE, J. D. B. Dental caries: a dynamic disease process. **Aust Dent J.**, v. 52, p. 286-291, fev. 2008.

FLEMMING, H. C.; WINGENDER, J. The biofilm matrix. **Nat. Rev. Microbiol.**, v. 8, p. 623-633, set. 2010.

GURAV, A.; JADHAV, V. Periodontitis and risk of diabetes mellitus. **J. Diabetes** v. 3, p.21-28, 2011.

HASIBUL, K. et al. D-Tagatose inhibits the growth and biofilm formation of streptococcus mutans. **Molecular Medicine Reports**, p. 843-851, nov. 2017.

KHOROUSHI, M.; KACHUIE, M. Prevention and Treatment of White Spot Lesions in Orthodontic Patients. **Contemp Clin Dent.**, v. 8, n. 1, p.11-19, 2017

KLEIN, A.M.; MAZUTIS, L.; AKARTUNA, I.; TALLAPRAGADA, N.; VERES, A.; LI, V.; PESHKIN, L.; WEITZ, D.A.; AND KIRSCHNER, M.W. Droplet barcoding for single-cell transcriptomics applied to embryonic stem cells. **Cell**, v. 161, n. 5, p. 1187-1201, 2015.

LI, F.; COLLINS, J. G.; KEENE, F. R.; Ruthenium complexes as antimicrobial agents. **Chem Soc Rev.** v. 44, n.8, p. 2529 - 2542, 2015

KNOLL, J. D.; TURRO, C. Control and Utilization of Ruthenium and Rhodium Metal Complex Excited States for Photoactivated Cancer Therapy. **Coord. Chem. Rev.** 2015, 282-283, 110–126.

KOLENBRANDER, P. E. *et al.* Oral multispecies biofilm development and the key role of cell-cell distance. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, n. 7, p.471-480, 1 jun. 2010.

LEMOS, J. A.; QUIVEY, J. R., R. G.; KOO, H.; ABRANCHES, J. Streptococcus mutans: a new Gram-positive paradigm?. **Microbiology**, v. 159, n. 3, p. 436-445, 2013.

LOESCHE, W. J. Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. **Microbiological Reviews**, v. 50, n. 4, p. 353-380, 1986.

MAH, T. F.; O'TOOLE, G. A. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. **Trends Microbiol.**, v. 9, n. 1, p. 34-39, jan. 2001.

MERRIAM-WEBSTER. **Caries**. Disponível em:<Merriam-webster.com>. Acesso em: 15 jnl. 2022.

MENOITA, E., SANTOS, V., TESTAS, C., GOMES, C., SANTOS, A. (2012) Biofilms: Knowing the Entity. **Journal of Aging & Innovation**, 1 (2): 23-32.

NACIF, M. C. A. M; ALVES, F. R. F. Enterococcus faecalis na Endodontia: um desafio ao sucesso. **Revista Brasileira de Odontologia**. v. 67, n. 2, p. 209 - 214, 2010.

NARAYANAPERUMAL, S. Ionic liquid & organochalcogenolates: an efficient reaction media for the synthesis of organochalcogen derivatives, 2010. 148 f. Tese (Doutorado) - Curso de Química, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, 2010.

PASSOS, S. M. **Microbiologia das infecções endodônticas**. 2014. 32f. Monografia (Especialização em Endodontia) – Faculdade de Odontologia, Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, 2014.

PASTER, B. J. *et al.* Bacterial Diversity in Human Subgingival Plaque. **Journal Of Bacteriology**, v. 183, n. 12, p.3770-3783, jun. 2001.

PARK, S.H.; YE L.; LOVE, R.M.; FARGES, J.C.; YUMOTO, H. Inflammation of the Dental Pulp. Mediators of inflammation., 2015.

PLOTINO, G.; CORTESE, T.; GRANDE, N.M.; LEONARDI, D.P.; DI GIORGIO, G.; TESTARELLI, L.; GAMBARINI, G. New Technologies to Improve Root Canal Disinfection. **Brazilian dental journal.**, v. 27, n. 1, p. 3-8, feb. 2016.

PRABHAKAR, A; HADAKAR, G; RAJU, O. Comparative evaluation of pH and antibacterial effect of various calcium hydroxide combinations on E. faecalis and its effect on root strength: an in vitro study. **Contemporary Clinical Dentistry**, v. 3, n. 1, p. 42, 2012.

POST, J. C. *et al.* The role of biofilms in otolaryngologic infection: update 2007. **Curr. Opin. Otolaryngol. Head Neck Surg.**, v. 15, n. 5, p. 347-351, out. 2007.

RØDER, H. L.; SØRENSEN, S. J.; BURMØLLE, M. Studying Bacterial Multispecies Biofilms: Where to Start?. **Trends In Microbiology**, v. 24, n. 6, p.503-513, jun. 2016.

POOLE, ROBERT, K. (edt). Advances in the microbial physiology. v. 71, San Diego. 1ª ed, 268p. 2017.

SELWITZ, R. H.; ISMAIL, A. I.; PITTS, N. B. Dental caries. **The Lancet**, v. 369, n. 9555, p.51-59, jan. 2007.

REIS, A. C. S. *et al.* Nova Tendência da Medicação Intracanal para Atuação sobre

Enterococcus faecalis: Revisão de literatura. **Brazilian Journal Of Surgery And Clinical Research – Bjsr**. v. 24, n. 1, p. 115-121, 2018.

SANTOS, A.L.; SIQUEIRA JR, J.F.; RÔÇAS, I.N.; JESUS, E.C.; ROSADO, A.S.; TIEDJE, J.M. Comparing the bacterial diversity of acute and chronic dental root canal infections. *Plos one.*, v. 6, n. 11, p. e28088, nov. 2011.

SAKAMOTO, M.; SIQUEIRA JR, J.F.; RÔÇAS, I.N.; BENNO, Y. Molecular analysis of the root canal microbiota associated with endodontic treatment failures. *Oral microbiology and immunology.*, v. 23, n. 4, p. 275-81, aug. 2008.

SILVA JN, GUEDES PMM, ZOTTIS A, BALLIANO TL, SILVA FON, LOPES LGF, ELLENA J, OLIVA G, ANDRICOPULO AD, FRANCO DW, SILVA JS. 2010. Novel ruthenium complexes as potential drugs for Chagas's disease: enzyme inhibition and *in vitro/in vivo* trypanocidal activity. **Br J Pharmacol**. 160:260–269.

SILVA BR, FREITAS VAA, NASCIMENTO-NETO LG, CARNEIRO VA, ARRUDA FVS, AGUIAR ASW, et al. 2012. Antimicrobial peptide control of pathogenic microorganisms of the oral cavity: A review of the literature. *Peptides*. 36:315-21. doi: 10.1016/j.peptides.2012.05.015.

SIMÕES, M. Antimicrobial strategies effective against infectious bacterial biofilms. **Curr.Med. Chem.**, v.18, n. 14, p. 2129-2145, may. 2011.

SIMÕES, M.; SIMÕES, L. C.; VIEIRA, M. J. A review of current and emergent biofilm control strategies. **LWT – Food Sci. Technol.**, v. 43, n. 4, p. 573-583, maio 2010.

SIMÓN-SORO, A.; MIRA, A. Solving the etiology of dental caries. *Trends in microbiology.*, v. 23, n.2, p. 76-82, feb. 2015.

SIQUEIRA J. F J. Aetiology of root canal treatment failure: why well-treated teeth can fail (Literature review). **Int Endod J**. v. 34: p. 1–10, 2021.

SIREN, E. K.; HAAPASALO, M. P.; RANTA, K.; SALMI, P.; KEROSUO, E. N. Microbiological findings and clinical treatment procedures in endodontic cases selected for microbiological investigation. *International Endodontic Journal.*, v. 30, n. 2, p. 91-5, mar. 1997.

SOET, J. J.; NYVAD, B.; KILIAN, M. Strain-Related Acid Production by Oral Streptococci. **Caries Research**, v. 34, n. 6, p.486-490, 2000.

SOUSA EHS, RIDNOUR LA, Gouveia FS, Silva CD, Wink DA, Lopes LGF, Sadler PJ. 2016. Thiol-Activated HNO Release from a Ruthenium Antiangiogenesis Complex and HIF-1 α Inhibition for Cancer Therapy. **ACS Chem Biol**. 11(7):2057-2065. doi: 10.1021/acscchembio.6b00222

SOUSA AP, Ellena J, Gondim ACS, Lopes LGF, Sousa EHS, Vasconcelos MA, Teixeira EH, Ford PC, Holanda AKM. 2018. Antimicrobial activity of cis -[Ru(bpy) 2 (L)(L')] n+ complexes, where L=4-(4-chlorobenzoyl)pyridine or 4-(benzoyl)pyridine and L'= Cl - or CO. **Polyhedron**. 144(1):88-94. doi:10.1016/j.poly.2018.01.002.

SOUTHAM, H. M.; BUTLER, J. A.; CHAPMAN, J. A.; POOLE, R. K. The Microbiology of

- Ruthenium Complexes. **Advances in Microbial Physiology**. v. 71, p. 1-96, 2017.
- SPAGNUL, C.; TURNER, L. C.; BOYLE, R. W. Immobilized Photosensitizers for Antimicrobial Applications. *J. Photochem. Photobiol., B* 2015, 150, 11–30.
- SIDDIK, Z. H. Cisplatin: Mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. **Oncogene.**, v. 22, p. 7265–7279, 2003.
- TASCHIERI, S.; DEL FABBRO, M.; SAMARANAYAKE, L.; CHANG, J.W.; CORBELLA, S. Microbial invasion of dentinal tubules: a literature review and a new perspective. *Journal of investigative and clinical dentistry.*, v. 5, n. 3, p. 163-70, aug. 2014.
- TZANETAKIS, G.N.; AZCARATE-PERIL, M.A.; ZACHAKI, S.; PANOPOULOS, P.; KONTAKIOTIS, E.G.; MADIANOS, P.N.; DIVARIS, K. Comparison of bacterial community composition of primary and persistent endodontic infections using pyrosequencing. **Journal of endodontics.**, v. 41, n. 8, p. 1226-1233, 2015.
- WIDGEROW, S. Persistence of the chronic wound – implicating biofilm. **Wound Healing Southern Africa**, v. 1, n. 2, p. 5-7, 2008.
- XU, K. D.; MCFETERS, G. A.; STEWART, P. S. Biofilm resistance to antimicrobial agents. **Microbiology**, v. 146, n. 3, p.547-549, mar. 2000.
- ZAKARIA, M.N.; TAKESHITA, T.; SHIBATA, Y.; MAEDA, H.; WADA, N.; AKAMINE, A.; YAMASHITA, Y. Microbial community in persistent apical periodontitis: a 16S rRNA gene clone library analysis. *International endodontic journal.*, v. 48, n. 8, p. 717-28, aug. 2015.
- ZEHNDER, M.; BELIBASAKIS, G.N. On the dynamics of root canal infections—what we understand and what we don't. *Virulence.*, v. 6, n. 3, p.216-22, apr. 2015.
- ZOBELL, C. E. The effect of solid surfaces upon bacterial activity. *J. Bacteriol.*, v. 46, n. 1, p. 39, 1943.

