

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA E MEDICINA LEGAL
PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA MÉDICA

THEODORA THAYS PRADO ARRUDA

PERFIL DE SENSIBILIDADE DE CEPAS
PLANCTÔNICAS E BIOFILMES DE *Enterococcus faecalis*
FRENTE A DESAFIOS ANTIMICROBIANOS.

FORTALEZA-CE

2007

THEODORA THAYS PRADO ARRUDA

PERFIL DE SENSIBILIDADE DE CEPAS
PLANCTÔNICAS E BIOFILMES DE *Enterococcus faecalis*
FRENTE A DESAFIOS ANTIMICROBIANOS.

Dissertação submetida à
Coordenação do Curso de Pós-
graduação em Microbiologia
Médica da Universidade Federal do
Ceará como requisito parcial para
obtenção do grau de Mestre em
Microbiologia Médica.

Orientadora

Profa. Dra. Cibele Barreto Mano de Carvalho

FORTALEZA-CE

2007

THEODORA THAYS PRADO ARRUDA

PERFIL DE SENSIBILIDADE DE CEPAS
PLANCTÔNICAS E BIOFILMES DE *Enterococcus faecalis*
FRENTE A DESAFIOS ANTIMICROBIANOS.

Aprovada em: 7 de fevereiro de 2007

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Cibele Barreto Mano de Carvalho

Universidade Federal do Ceará - UFC

Profa. Dra. Mônica Sampaio do Vale

Universidade Federal do Ceará – UFC

Prof. Dr. Eduardo Diogo Gurgel Filho

Universidade de Fortaleza - UNIFOR

Profa. Dra. Márcia Maria Negreiros Pinto Rocha

Universidade de Fortaleza - UNIFOR

À minha família, forte alicerce, a meu companheiro, inigualável presença em todos os momentos e a meus verdadeiros amigos que compreendem cada etapa do meu crescimento.

AGRADECIMENTOS

A todos os pacientes que gentilmente disponibilizaram-se a participar da pesquisa.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de pessoal de Nível Superior – CAPES, pelo apoio financeiro com a manutenção da bolsa de auxílio.

Ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia Médica, representado pelos professores e demais funcionários, pelo empenho na formação científica de seus pós-graduandos.

À Profa. Dra. Cibele Barreto Mano de Carvalho pela orientação e atenção dispensadas durante todos os momentos da pesquisa.

Ao Prof. Dr. Eduardo Diogo Gurgel Filho pela preciosa colaboração durante toda a pesquisa, ensinamentos e estimada participação na banca examinadora.

À Profa. Dra. Brenda Paula Gomes pelo estágio no Laboratório de Endodontia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba – FOP (UNICAMP).

Ao Dr. Cláudio Maniglia Ferreira pela inestimável colaboração e compromisso durante os procedimentos de coleta de material clínico.

Ao Prof. Ricardo Santos pela colaboração no processamento e análise das imagens de Microscopia de Força Atômica.

Ao Prof. Benildo Souza Cavada pelo auxílio tecnológico através da utilização do Microscópio de Força Atômica.

À Faculdade de Odontologia da Universidade de Fortaleza-UNIFOR, no nome do Dr. Luis Augusto Noro, pela anuência do desenvolvimento do estudo.

À aluna de iniciação científica e bolsista do CNPq Waleska Ramos Belchior pelo auxílio no processamento das amostras e amizade incondicional durante todo o período de desenvolvimento da pesquisa.

À aluna da graduação em Odontologia da UNIFOR-Universidade de Fortaleza, Thiane Elys Prado Arruda pelo auxílio nos procedimentos de coleta.

Ao doutorando do curso de Doutorado em Ciências Médicas Marcos Botelho Lage pelo fornecimento do óleo essencial da *Lippia sidoides*.

Ao mestrando Vítor Alves Carneiro pelo imenso apoio no desenvolvimento dos experimentos com óleo essencial da *Lippia sidoides* e pela amizade fraterna.

Aos colegas mestrandos Sílvia Donato, Bráulio Matias, Jacó, Rafaela e Mariana pelo apoio e amizade compartilhada durante as disciplinas do mestrado.

Aos amigos Cíntia, Alexandre, Luana e Jones por compartilharem comigo seus momentos de aprendizado científico.

Aos técnicos laboratoriais Terezinha de Jesus dos Santos Rodrigues e José Olavo de Moraes pelo apoio e auxílio incansável.

À Marta Maria de Vasconcelos pela solicitude em ajudar sempre que preciso.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para a concretização deste trabalho, a minha sincera gratidão.

“Cada dia é uma nova chance de aprender mais sobre nós mesmos, de se importar mais com os outros, de rir mais do que riamos, de realizar mais o que pensávamos ser possível, de ser mais do que éramos antes.”

(Autor desconhecido)

RESUMO

Enterococcus faecalis foi sugerido como sendo um importante agente etiológico do insucesso endodôntico. Foi encontrado no sistema de canais radiculares em um percentual de 22% a 77% e foi associado com a formação de estruturas chamadas biofilmes. O objetivo do presente estudo foi avaliar, *in vitro*, a efetividade de cimentos endodônticos, hipoclorito de sódio a 2,5% e solução do óleo essencial da *Lippia sidoides* a 0,5% na eliminação de biofilmes de *E. faecalis*. Material clínico foi coletado de 37 pacientes com infecções crônicas do canal radicular e 14 cepas de *Enterococcus faecalis* foram isoladas (37,8%). Biofilmes de uma cepa de coleção de cultura (ATCC) e de uma cepa clínica multiresistente (Isolado 12) foram incubados por 8 dias. Esse período foi selecionado baseado em estudo cronológico do desenvolvimento de biofilmes de *Enterococcus faecalis* através de Microscopia de Força Atômica. Foi verificado que houve uma redução significativa no número de bactérias quando os biofilmes foram expostos aos cimentos endodônticos em relação ao controle para as duas cepas testadas ($p < 0.001$). Analisando a cepa ATCC, foi verificado que o cimento endodôntico Epiphany[®] apresentou ação similar ao cimento Endofill[®] ($p > 0.05$); resultado semelhante foi encontrado para o isolado 12. Quando a susceptibilidade das cepas frente aos cimentos endodônticos foi comparada verificou-se que o Isolado 12 foi menos susceptível comparado à cepa ATCC ($p < 0.001$). Observou-se que a solução do óleo essencial de *Lippia sidoides* a 0,5% apresentou ação similar ao hipoclorito de sódio a 2,5% quando os biofilmes das duas cepas foram expostos por 10 minutos a essas substâncias ($p < 0.001$). Comparando a susceptibilidade das duas cepas às soluções testadas, não houve diferença entre elas ($p > 0.05$).

Palavras-chave: *Enterococcus faecalis*, biofilme, Cimentos endodônticos

ABSTRACT

Enterococcus faecalis has been suggested to be an important etiological agent in endodontic failure. It has been found in the root canal system in a perceptual ranging from 22% to 77% and it has been associated to organisms structured in biofilms. The aim of the present study was to evaluate, *in vitro*, the effectiveness of endodontic sealers, 2.5% sodium hypochlorite, and 0.5% *Lippia sidoides* essential oil in eliminating *E. faecalis* biofilms. Clinical material was collected from 37 patients with root canal chronic infections and 14 *Enterococcus faecalis* strains were isolated (37.8%). Biofilms from a reference (ATCC) and a clinical multiresistant strain (isolate 12) were grown for 8 days. This period was selected based on a chronological study of the *Enterococcus faecalis* biofilm development through Atomic Force Microscopy. It was verified that there was a significant reduction of the bacteria number when the biofilms were exposed to the endodontic sealers related to the control for the two tested strains ($p < 0.001$). Analyzing the ATCC strain, it was seen that the Epiphany[®] endodontic sealer presented similar action compared to Endofill[®] ($p > 0.05$), similar result was found for Isolate 12. When the strains susceptibilities against the sealers was compared it was verified that the isolate 12 was less susceptible than the ATCC strain ($p < 0.001$). It was verified that the 0.5% essential oil solution of *Lippia sidoides* presented a similar action to 2.5% sodium hypochlorite when the biofilm of ATCC strain and isolate 12 were exposed for 10 minutes to this substances ($p < 0.001$). Comparing the susceptibility of the two strains to the solutions tested, there was no difference between them ($p > 0.05$).

Key words: *Enterococcus faecalis*, biofilm, endodontic sealers

Lista de Figuras

FIGURA 1	Modelo de desenvolvimento do biofilme segundo Stoodley <i>et al.</i> (2002)	31
FIGURA 2	Formação do biofilme: crescimento celular, divisão e produção de polissacarídeo extracelular (PEC) (Rickard <i>et al.</i> , 2003)	33
FIGURA 3	Co-adesão de células individuais, co-agregadas e grupo de células (Rickard <i>et al.</i> , 2003)	34
FIGURA 4	a -Membranas de nitrocelulose 13 mm de diâmetro dispostas sobre BHIA+S; b-Inoculação das membranas com pipeta automática em câmara de fluxo laminar; c-Membranas inoculadas com <i>E.faecalis</i> em suspensão; d-Incubação em estufa a 35°C e-Visualização do crescimento de 8 dias (192 horas) do biofilme de <i>E. faecalis</i> .	53
FIGURA 5	Imagens de MFA da amostra MNC. Varredura de 30 x 30 µm (a) e 10 x 10 µm (b). O gráfico de secção (c) mostra um (b) corte transversal de 30 µm na membrana.	57
FIGURA 6	Imagens de MFA da amostra MNC-BHIA + S. Varredura de 30 x 30 µm (a) e 10 x 10 µm (b). As setas (b) indicam estruturas globulares oriundas do meio de cultura. O gráfico de secção (c) mostra alteração na topografia da membrana devido à presença do BHIA+S.	58
FIGURA 7	Imagens de MFA da amostra M24. Varredura de 30 x 30 µm (a) e 10 x 10 µm (b). Os asteriscos (b) indicam células (b) bacterianas, enquanto as setas apontam septos transversais. O gráfico de secção (c) mostra alteração da topografia (c) da membrana devido à presença de células bacterianas.	59
FIGURA 8	Imagens de MFA da amostra M36. Varredura de 30 x 30 µm (a) e 10 x 10 µm (b). Um círculo (a) indica a presença de (b) microcolônia. O gráfico de secção (c) mostra uma redução clara da rugosidade superficial.	60
FIGURA 9	Imagens de MFA da amostra M72. Varredura de 30 x 30 µm (a) e 10 x 10 µm (b). Os asteriscos, setas e sinais de soma (+) (b) indicam células bacterianas jovens, canais e espaços	61

intersticiais no conteúdo de PEC, respectivamente. O gráfico de secção (c) indica esse perfil de superfície.

- FIGURA 10 Imagens de MFA da amostra M8d. Varredura de 30 x 30 μm (a) e 10 x 10 μm (b). O círculo (a) indica a presença de uma das ilhas de microcolônias presentes na superfície e as setas, a presença de alguns espaços intersticiais no PEC. O perfil de superfície é mostrado no gráfico de secção (c). 62
- FIGURA 11 Imagens de MFA da amostra M15d. Varredura de 30 x 30 μm (a) e 10 x 10 μm (b). As setas (b) indicam a presença de projeções na superfície. O gráfico de secção (c) mostra um aumento significativo da irregularidade superficial. 63
- FIGURA 12. Média da rugosidade R_a da superfície das amostras MNC-BHIA+S e M24-M15d. As mensurações de rugosidade distinguiram as diferentes alterações na topografia superficial da membrana de nitrocelulose: adesão de estruturas globulares do BHIA+S (a); adesão bacteriana (b); formação de PEC (c); aumento no conteúdo de PEC (d); crescimento bacteriano sobre o PEC (e); biofilme desenvolvido (f). 65
- FIGURA 13 Susceptibilidade de biofilmes de duas cepas *E. faecalis*, ATCC e isolado 12 (IL12), incubados por 8 dias submetidos aos cimentos endodônticos Endofill e Epiphany por 24 horas 66
- FIGURA 14 Susceptibilidade de biofilmes de duas cepas de *E. faecalis*, ATCC e isolado 12 (IL12), incubados por 8 dias submetidos ao NaOH a 2.5% e a solução de óleo essencial de *Lippia sidoides* a 0.5% por 10 minutos 67

Lista de Tabelas

TABELA 1	Percentual e número de cepas resistentes aos antimicrobianos testados.	55
TABELA 2.	Média e desvio padrão (σ) da rugosidade superficial (R_a) para MNC, MNC-BHIA+S, e M24-15d. Varredura de 30 x 30 μm e escala de altura de 2000 nm.	64

Lista de Abreviaturas e Símbolos

ATCC	American Type Culture Collection
BHI	Brain Heart Infusion
BHIA + S	Brain Heart Infusion + 5% de sangue desfibrinado de carneiro
Ca(OH) ₂	Hidróxido de Cálcio
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSM	Confocal Laser Scanning Microscope
DMSO	Dimetil sulfóxido
<i>esp</i>	Proteína de superfície enterocócica
-HN	Grupamento Amina
I12	Isolado 12
M15d	Biofilme incubado por 15 dias
M24	Biofilme incubado por 24 horas
M36	Biofilme incubado por 36 horas
M72	Biofilme incubado por 72 horas
M8d	Biofilme incubado por 8 dias
MET	Microscopia Eletrônica de Transmissão
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MFA	Microscopia de Força Atômica
MNC	Membrana de Nitrocelulose
MNC- NaOCL	Membrana de Nitrocelulose + BHIA + S Hipoclorito de Sódio
NaOH	Hidróxido de Sódio
-NCl	Cloramina
OELS	Óleo Essencial de <i>Lippia sidoides</i>
OZE	Óxido de Zinco e Eugenol
PEC	Polissacarídeo Extracelular
PMN	Polimorfonucleares
SA	Substância de Agregação
-SN	Grupamento Sulfidríla
TSA	Teste de Sensibilidade a Antimicrobianos
UFC	Unidades Formadoras de Colônia
<i>algC</i>	gene codificador do alginato
UNIFOR	Universidade de Fortaleza

SUMÁRIO

1-Introdução	18
1.1-Falha do tratamento endodôntico	18
1.2-Microbiota do canal radicular tratado	19
1.3-Gênero <i>Enterococcus</i> : características gerais	20
1.4-Resistência do gênero <i>Enterococcus</i> aos antimicrobianos	23
1.5- Gênero <i>Enterococcus</i> e a cavidade bucal	23
1.6- <i>Enterococcus faecalis</i> versus medidas de desinfecção do sistema de canais radiculares	25
1.6.1-Hipoclorito de sódio	25
1.6.2-Óxido de zinco e eugenol	26
1.6.3-Epiphany®	28
1.6.4-Hidróxido de Cálcio	29
1.7-Uso de Substâncias naturais com ação antimicrobiana em endodontia	30
1.8-Biofilmes: generalidades	31
1.8.1-Mecanismos de formação dos biofilmes	32
1.9-Por que as bactérias formam biofilmes?	35
1.10-Resistência dos biofilmes a agentes antimicrobianos	36
1.11- <i>E. faecalis</i> e sua capacidade de formar biofilmes	39
1.12-Métodos “ <i>in vitro</i> ” para estudar biofilmes bacterianos e desafios antimicrobianos	41
1.13-Métodos de visualização de biofilmes microbianos	41
1.13.1-Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)	41
1.13.2-Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	42
1.13.3-CLSM (Confocal Laser Scanning Microscope)	42
1.13.4-Microscopia de Força Atômica (MFA)	43
2-Objetivos	44
2.1-Objetivo Geral	44
2.2-Objetivos Específicos	44

3-Materiais e Métodos	45
3.1-Local e período de desenvolvimento da pesquisa	45
3.2-Seleção de pacientes	45
3.2.1-População	45
3.2.2-Entrada do voluntário no estudo	45
3.3-Coleta do espécime clínico	46
3.3.1-Examinador	46
3.3.2-Coleta do material	46
3.4-Identificação bacteriana	47
3.4.1.Processamento das amostras	47
3.4.2-Provas bioquímicas	47
3.5-Teste de sensibilidade a antimicrobianos	47
3.6-Experimento de difusão em ágar dos cimentos endodônticos e soluções de óleo essencial de <i>Lippia sidoides</i> a 1% e 10% para a cepa ATCC e isolado 12	48
3.7-Estudo cronológico do desenvolvimento de biofilmes monomicrobianos de <i>Enterococcus faecalis</i>	48
3.7.1-Preparação de biofilmes monomicrobianos de <i>Enterococcus faecalis</i>	48
3.7.2-Preparo do inóculo	48
3.7.3-Formação do biofilme	49
3.7.4-Processamento de imagens no microscópio de força atômica	49
3.7.5-Gráficos de secção	49
3.7.6-Analise da rugosidade	50
3.8-Avaliação da inibição de biofilmes monomicrobianos de <i>Enterococcus faecalis</i> frente a desafios antimicrobianos	50
3.8.1-Cepas bacterianas	50
3.8.2-Substâncias testadas	50
3.8.3-Amadurecimento do biofilme	51
3.8.4-Desafios antimicrobianos	51
3.9-Análise estatística	54

4-Resultados	56
4.1-Prevalência e perfil de sensibilidade antimicrobiana de <i>Enterococcus faecalis</i> isolados de canais radiculares com necessidade de retratamento	56
4.2-Experimento de difusão em ágar dos cimentos endodônticos e soluções de óleo essencial de <i>Lippia sidoides</i> a 1% e 10% para a cepa ATCC e isolado 12	57
4.3-Estudo cronológico do desenvolvimento de biofilmes de <i>Enterococcus faecalis</i>	58
4.4-Avaliação da inibição de biofilmes de <i>Enterococcus faecalis</i> frente a desafios antimicrobianos	66
4.4.1-Inibição dos biofilmes de <i>E. faecalis</i> frente aos cimentos endodônticos	66
4.4.2-Inibição dos biofilmes de <i>E. faecalis</i> frente à solução de <i>Lippia sidoides</i> a 0,5% e hipoclorito de sódio a 2,5%	67
5-Discussão	69
5.1-Prevalência e perfil de sensibilidade antimicrobiana de <i>Enterococcus faecalis</i> isolados de canais radiculares com necessidade de retratamento	69
5.2-Experimento de difusão em ágar dos cimentos endodônticos e soluções de óleo essencial de <i>Lippia sidoides</i> a 1% e 10% para a cepa ATCC e isolado 12	71
5.3-Estudo cronológico do desenvolvimento de biofilmes de <i>Enterococcus faecalis</i>	72
5.4-Avaliação da inibição de biofilmes de <i>Enterococcus faecalis</i> frente a desafios antimicrobianos	73
5.4.1-Inibição dos biofilmes de <i>E. faecalis</i> frente aos cimentos endodônticos	73
5.4.2-Inibição dos biofilmes de <i>E. faecalis</i> frente à solução de <i>Lippia sidoides</i> a 0,5% e hipoclorito de sódio a 2,5%	76
6-Conclusões	78
7-Referências Bibliográficas	79
8-Anexos	92
Anexo I – Termo de Consentimento	93
Anexo II – Ficha de Anamnese	95

Anexo III – Ficha de Exame Dentário	96
Anexo IV – Aprovação do comitê de Ética em Pesquisa	98
Anexo V – Meios de Cultura, Soluções e Reagentes	99
Anexo VI – Provas Bioquímicas	103
Anexo VII – Composição Química do óleo essencial da <i>Lippia sidoides</i>	105
Apêndice I – Artigo 1	106
Apêndice II– Artigo 2	124

1-Introdução

1.1-Falha do tratamento endodôntico

No Brasil, existem milhões de desdentados, e mesmo com os avanços dos procedimentos preventivos e técnicos não se têm obtido êxito suficiente para evitar um grande número de perdas dentárias. Muitas dessas perdas acontecem pela falha ou insucesso de técnicas empregadas corriqueiramente na clínica odontológica. Quando elementos dentais acometidos por cárie não são tratados precocemente, os microrganismos causadores desta patologia além de atingirem os tecidos duros da estrutura dental propagam-se até o complexo dentino-pulpar podendo levar a inflamações irreversíveis da polpa e em seqüência à necrose do tecido pulpar.

A necrose pulpar é a morte da polpa, significando a cessação dos processos metabólicos desse órgão, com a conseqüente perda da sua estrutura, bem como de suas defesas naturais (KUTTLER, 1961, p.70). Nestes casos o canal radicular transforma-se em ambiente propício à proliferação microbiana, pela presença de nutrientes e restos orgânicos oriundos do próprio tecido pulpar necrótico (LEONARDO *et al.*, 1998, p.125).

Quando da realização do tratamento endodôntico objetiva-se a morte e remoção da maior quantidade e qualidade de espécimes microbianos, seja através da utilização de soluções irrigantes, curativos de demora (medicação intracanal) ou de materiais obturadores com propriedades antimicrobianas.

Em alguns casos, o tratamento endodôntico pode vir a falhar. Essa falha geralmente ocorre quando o tratamento não é realizado em um padrão aceitável (SELTZER *et al.*, 1963; ENGSTRÖM *et al.*, 1964a).

Estudos que investigaram a etiologia da falha em Endodontia bem realizada revelaram cinco fatores que podem contribuir para a persistência de radiolucência periapical após o tratamento (EVANS *et al.*, 2002): infecção intra-radicular (NAIR *et al.*, 1990a); infecções extra-radulares por bactérias das espécies *Actinomyces israelii* e *Propionibacterium propionicum* (NAIR e SCHROEDER, 1984; SJÖGREN *et al.*, 1988); reação de corpo estranho (KOOPANG *et al.*, 1989; NAIR *et al.*, 1990b); cistos, especialmente aqueles contendo cristais de colesterol e tecido fibroso de cicatrização após tratamento convencional (NAIR *et al.*, 1999).

Estudos de microscopia e cultivo de microrganismos têm relatado a ocorrência de infecções extra-radulares tanto em elementos dentais submetidos à terapia endodôntica quanto naqueles não tratados (TRONSTAD *et al.*, 1987; TRONSTAD *et al.*, 1990; IWU *et al.*, 1990; WAYMAN, 1992; LONÇALI *et al.*, 1996; SIQUEIRA JUNIOR e VENTURIM, 1997).

Os microorganismos que se estabelecem nos tecidos perirradiculares são inacessíveis aos procedimentos de desinfecção endodôntica, por esse motivo, a infecção extra-radicular pode ser considerada um fator a concorrer para a falha da terapia endodôntica (SIQUEIRA JUNIOR, 2001). Esses organismos apresentam a capacidade de escapar da ação de células e moléculas de defesa defendendo-se do sistema complemento, evitando a destruição por fagócitos, causando imunossupressão, realizando mudança de cobertura antigênica e induzindo proteólise de anticorpos (SIQUEIRA JUNIOR e VENTURIM, 1997).

No entanto, poucos microorganismos apresentam a capacidade de sobreviver aos mecanismos de defesa do hospedeiro e dessa forma induzir infecção persistente extra-radicular. *Actinomyces spp* e *Propionibacterium propionicum* possivelmente estão envolvidos nesta patologia (NAIR *et al.*, 1990a).

Na maioria dos casos, a falha do tratamento endodôntico é o resultado da persistência de microorganismos na porção apical do sistema de canais radiculares, mesmo em dentes aparentemente bem tratados (SIQUEIRA JUNIOR, 2001). Estudos têm demonstrado que parte do espaço do canal radicular frequentemente permanece intocada durante o preparo químico-mecânico, independente da técnica e instrumentos empregados. (LIN *et al.*, 1991; SIQUEIRA JUNIOR e VENTURIM, 1997). Áreas não tocadas podem conter bactérias e tecido necrótico mesmo quando a obturação apresenta-se radiograficamente adequada (NAIR *et al.*, 1990a; LIN *et al.*, 1991)

Os microrganismos em tais locais podem estar arrançados em biofilmes que não foram removidos pela instrumentação e irrigação. Visualizando a grande complexidade anatômica do sistema de canais radiculares (HESS, 1921) e a organização ecológica da flora em biofilmes (COSTERTOM *et al.*, 2003; NAIR, 1987), é muito improvável que um sistema de canais absolutamente livre de microrganismos possa ser conseguido por qualquer uma das técnicas atuais de preparação dos canais, limpeza e procedimento de obturação (NAIR, 2006).

1.2-Microbiota do canal radicular tratado

A microbiota associada aos casos de falha difere marcadamente daquela associada ao dentes não tratados (infecção primária do canal radicular). Enquanto a última está tipicamente associada a infecções mistas, nas quais bastonetes Gram-negativos anaeróbios são dominantes, a primeira é composta por poucas espécies bacterianas (GOMES *et al.*, 1996).

Muitos são os indicativos de que ocorre seleção na microbiota endodôntica, por fatores nutricionais, baixo potencial de oxido redução, pH, temperatura, interações positivas

e/ou antagonismos entre os microrganismos e os mecanismos de defesa do hospedeiro no decorrer da patologia endodôntica (GOMES *et al.*, 1996).

Apenas um pequeno número de espécies tem sido encontrado no canal de dentes que foram submetidos a tratamento endodôntico e que, no período de preservação, revelou radiolucências periapicais persistentes (NAIR, 2006). Para sobreviver no canal radicular tratado, microrganismos devem resistir a medidas de desinfecção intra-radulares e adaptarem-se ao ambiente no qual existe pouca disponibilidade de nutrientes. As poucas espécies microbianas que tem essa habilidade podem estar envolvidas na recidiva da patologia endodôntica, e nesses casos são predominantemente cocos Gram-positivos, bastonetes e filamentosos (SIQUEIRA JUNIOR, 2001). Em técnicas de isolamento através de cultivo microbiano, espécies pertencentes aos gêneros *Actinomyces*, *Enterococcus* e *Propionibacterium* são frequentemente isolados de canais radulares com essas características (MÖLER, 1966, SUNDQVIST e REUTERVING, 1980). Dentre esses, o *Enterococcus faecalis* é um organismo que, apesar de apresentar-se em pequena proporção na infecção endodôntica primária, tem importante papel na etiologia das infecções persistentes após tratamento do canal radicular (DAHLEN *et al.*, 2000; PINHEIRO *et al.*, 2003a; PINHEIRO *et al.*, 2003b, KAUFMAN *et al.*, 2005; STUART, *et al.*, 2006).

Ao contrário da maioria dos patógenos endodônticos frequentemente encontrados em infecções primárias, o *E. faecalis* pode colonizar canais radulares em infecções monomicrobianas e tem uma relativa independência de sobrevivência sem precisar de nutrientes derivados do metabolismo de outras bactérias. Condições ambientais podem regular a expressão de genes no *E. faecalis*, que podem permitir sua adaptação a diferentes condições externas. Isso inclui a habilidade de sobreviver em locais com escassez de nutrientes com a possibilidade de recolonização quando o aporte nutritivo for restabelecido. Todas essas propriedades ajudam a explicar uma prevalência significativamente alta em casos de falha endodôntica (PINHEIRO *et al.*, 2003b).

1.3-Gênero *Enterococcus*: características gerais

Bactérias do gênero *Enterococcus* caracterizam-se como células Gram-positivas, ovóides e não-esporuladas, arranjando-se em células individuais, pares ou cadeias curtas, podendo ou não apresentar motilidade. São anaeróbios facultativos, quimiorganotróficos, com necessidades nutricionais complexas e um metabolismo que apresenta o ácido lático como principal produto da fermentação da glicose. Apresentam-se como microrganismos não produtores de catalase, mas algumas cepas produzem pseudo-catalase (HARDIE e WHILEY, 1997).

Os *Enterococcus* foram originalmente classificados como cocos entéricos gram-positivos e posteriormente incluídos no gênero *Streptococcus* (SCHLEIFER e KILPPER-BALZ, 1984). Nos anos 30, com o estabelecimento do sistema de tipagem sorológica de Lancefield, foram classificados como estreptococos do grupo D e diferenciados dos estreptococos não-enterocócicos deste grupo como o *Streptococcus bovis* através de características bioquímicas (MOELLERING JUNIOR, 1992). Posteriormente foi recomendado que o termo *Enterococcus* fosse utilizado especificamente para *Streptococcus* que crescessem entre 10°C e 45°C, a um pH de 9.6, em NaCl 6,5% e sobrevivesse a 60°C por 30 minutos (SIQUEIRA JUNIOR E GONÇALVES, 1996).

Nos anos 80, baseado em diferenças genéticas, os enterococos foram removidos do gênero *Streptococcus* e colocados em um gênero próprio (SIQUEIRA JUNIOR *et al.*, 1997). As designações usadas previamente para as espécies relacionadas ao enterococos tais como *faecalis*, *faecium*, *durans* entre outras foram mantidas, mas a partir de então foram precedidas pelo nome do gênero *Enterococcus*. Atualmente 38 espécies já foram identificadas (<http://www.bacterio.cict.fr/e/enterococcus.html>), mas apenas duas são responsáveis pela maioria das infecções enterocócicas humanas; o *Enterococcus faecalis* relaciona-se a 80 a 90% dessas infecções enquanto o *E. faecium* a apenas 5 a 15%. Outras espécies (*E.gallinarum*, *E.casseliflavus*, *E. durans*, *E. avium*, *E. raffinosus*, dentre outras) pouco frequentemente são isoladas e contribuem com menos de 5% dos isolados clínicos (SHERMAN, 1937; MOELLERING JUNIOR E WEINBERG, 1971; UTTLEY *et al.*, 1988; MURRAY, 1992; PATTERSON *et al.*, 1995).

Enterococos são tipicamente encontrados no trato intestinal e fezes do homem e outros animais (MURRAY, 1990). Algumas espécies têm sido isoladas do solo, água e plantas, e sua habilidade de crescer em uma grande variedade de condições ambientais, incluindo extremos de temperatura e concentrações de sal, deve ser levada em consideração para entender-se a ubiquidade de distribuição das espécies do gênero (HARDIE e WHILEY, 1997).

São organismos comensais que tem potencial de causar doença, e além de serem encontrados no trato intestinal, podem ser isolados do trato geniturinário, corrente sanguínea, lesões intra-abdominais, feridas de queimaduras, endocárdio, trato biliar e artifícios protéticos *in situ*. Especialmente a espécie *Enterococcus faecalis* pode estar ligada a uma significativa proporção de casos de endocardite bacteriana em um percentual de 5% a 20% dos casos (HARDIE e WHILEY, 1997).

Desde a metade dos anos 70 são também reconhecidos como causa de infecções hospitalares em pacientes que foram submetidos à antibioticoterapia de largo espectro ou que

foram hospitalizados por longos períodos de tempo. Cepas isoladas de pacientes com esse perfil têm apresentado multi-resistência a antimicrobianos comumente utilizados na clínica médica (COSTERTON *et al.*, 1999).

E. faecalis são patógenos oportunistas que podem causar infecções severas em diferentes sistemas do corpo, particularmente em pacientes imunossuprimidos (BALDASSARI *et al.*, 2004). Esses organismos apresentam a capacidade de translocar-se através da barreira intestinal sendo este um dos principais meios pelo qual podem espalhar-se para outros sítios distantes no corpo. Gentry-Weeks e colaboradores. (1999) mostraram que *E. faecalis* foi capaz de sobreviver no interior de macrófagos peritoneais, o que pode contribuir para sua patogênese por evitar a ação da terapia antimicrobiana; Baldassari *et al.* (2004) atribuem essa habilidade à capacidade de produção de polissacarídeo extracelular por parte da célula bacteriana.

Uma vez que esse organismo consiga ultrapassar a barreira da mucosa intestinal e caia na corrente sanguínea pode colonizar outros sítios no organismo (GENTRY-WEEKS *et al.*, 1999). Sedgley *et al.* (2006), pesquisaram a prevalência de *E. faecalis* em diferentes sítios intra-orais de 41 pacientes e o encontraram em 42% das amostras de língua, 14% das amostras de sulco gengival e 10% dos lavados orais. Em 1964, Engström postulou a existência de uma ligação direta entre a ocorrência do *E. faecalis* na cavidade bucal e no canal radicular.

Essa bactéria apresenta a capacidade de ligar-se ao colágeno da dentina e de invadir os túbulos dentinários, podendo assim permanecer no interior do sistema de canais mesmo após preparo químico-mecânico. Aliado a essa característica, possui uma série de fatores de virulência que permitem sua sobrevivência intra-canal, incluindo aderência às células do hospedeiro (KREFT *et al.*, 1992) expressão de proteínas que favorecem a sobrevivência celular como resultado da alteração do suprimento nutritivo de determinado ambiente (GIARD *et al.*, 1996) a habilidade de competir com outras células bacterianas (GÁLVEZ *et al.*, 1991) e de alterar a resposta imunológica do hospedeiro (MAYAZAKI *et al.*, 1993); consegue ainda suportar longos períodos de depleção nutricional fator que contribui para que a bactéria permaneça no interior do canal radicular levando à cronicidade da infecção endodôntica.

E. faecalis são bactérias comumente encontradas em canais radiculares submetidos à retratamento e sabendo-se do seu potencial patológico em outros sítios do corpo humano e ainda devido ao aumento de cepas multi-resistentes é indicado a realização de diagnóstico microbiológico em infecções endodônticas focando tais bactérias (DAHLÉN *et al.*, 2000).

1.4-Resistência do gênero *Enterococcus* aos antimicrobianos

A resistência bacteriana a agentes antimicrobianos pode ser dividida em dois tipos gerais: uma na qual a característica de resistência apresenta-se como uma propriedade intrínseca e outra que pode ser adquirida. Os termos resistência intrínseca ou inerente são usados para indicar uma resistência que é uma característica usual, presente em todas ou quase todas as cepas da espécie (TOCARS *et al.*, 1999). Os genes para resistência intrínseca, como outras características da espécie, parecem residir em cromossomo (MURRAY, 1990). Resistência adquirida pode resultar tanto de mutações no DNA existente quanto da aquisição de novo DNA.

Essas transferências genéticas ocorrem geralmente no trato gastrointestinal de homens e animais, local onde outras bactérias também estão expostas a pressões seletivas pelo uso terapêutico e subterapêutico de antimicrobianos (MUNDY, *et al.*, 2000).

As várias características intrínsecas expressadas pelos enterococcus incluem resistência à penicilina semi-sintética penicilinase-resistente, cefalosporinas, baixos níveis de aminoglicosídeos e baixos níveis de clindamicina. Exemplos de resistência adquirida ao cloranfenicol, eritromicina, altos níveis de clindamicina, tetraciclina, altos níveis de aminoglicosídeos, penicilina através da produção de penicilinase, fluoroquinolonas e vancomicina são encontrados na literatura (MASCHIETO *et al.*, 2004). Resistência a altos níveis de penicilina sem a produção de penicilinase e resistência a fluoroquinolonas ocorrem presumivelmente por mutações (MURRAY, 1990). Existe uma preocupação atual com a emergência de cepas multi-resistentes isoladas principalmente de pacientes hospitalizados por longos períodos e/ou que receberam terapia antimicrobiana de amplo espectro.

Foi demonstrado que *E. faecalis* é capaz de translocar-se do sistema de canais radiculares para linfonodos submandibulares de ratos “germ-free”, sugerindo que essa rota de infecção pode apresentar papel importante na patogênese de infecções oportunistas (RIBEIRO SOBRINHO *et al.*, 1998; DE MELO MALTOS *et al.*, 2003).

Sendo assim a associação de bactérias possivelmente isoladas na cavidade bucal com patologias sistêmicas é de grande interesse e conseqüentemente a avaliação do perfil de sensibilidade destas espécies bacterianas a antimicrobianos de uso sistêmico é de grande valia.

1.5-Gênero *Enterococcus* e a cavidade bucal

Em 1964, Engström postulou a correlação direta entre a ocorrência de enterococos na cavidade oral e na cavidade pulpar (ENGSTRÖM, 1964b). Na cavidade oral o enterococos tem sido associado com lesões mucosas em pacientes imunocomprometidos e superinfecções

periodontais. De acordo com Wahlin e Holm (1988) as infecções persistentes do sistema de canais radiculares associam-se especialmente ao *E. faecalis*.

E. faecalis tem sido apontado como a espécie mais comumente isolada de dentes com falha endodôntica em estudos utilizando métodos de cultivo microbiano e técnicas moleculares (RÔÇAS *et al.*, 2004a; RÔÇAS *et al.*, 2004b; SIQUEIRA JUNIOR e RÔÇAS, 2004), sendo identificado em 24% a 77% dos casos (SIQUEIRA JUNIOR e RÔÇAS, 2004). A grande variação na prevalência deste microorganismo entre os diferentes estudos pode ser atribuída a diferentes técnicas de identificação, diferenças geográficas, ou no tamanho da amostra (BAUMGARTNER *et al.*, 2004; FOUAD *et al.*, 2005). Em alguns casos tem sido encontrado como o único microorganismo (culturas puras) presente em elementos dentais obturados que apresentam lesões periradiculares (SUNDQVIST *et al.*, 1998; PINHEIRO *et al.*, 2003b). Foi sugerido que a virulência do *E. faecalis* pode estar relacionada à sua capacidade de resistir a medicações intracanal, e a sua habilidade de sobreviver no canal radicular como único organismo sem o suporte de outras bactérias (FABRICIUS *et al.*, 1982).

Tal microorganismo apresenta a capacidade de tolerar pH acima de 11.5, o que pode ser uma razão pela qual esse organismo sobrevive ao tratamento antimicrobiano com curativo de hidróxido de cálcio (BYSTRÖM *et al.*, 1985a; ESTRELA *et al.*, 2001; EVANS *et al.*, 2002). Essa resistência ocorre provavelmente em virtude de sua habilidade de regular seu pH interno com uma eficiente bomba de prótons (EVANS *et al.*, 2002).

Essa espécie do gênero *Enterococcus* apresenta ainda a habilidade de sobreviver em ambientes desfavoráveis, fator muito importante para a maioria das bactérias por comumente experimentarem períodos de falta de nutrientes. Vários sistemas regulatórios apresentam papel essencial na habilidade das bactérias de resistirem à depleção nutricional. Esses sistemas estão sob o controle de determinados genes, cuja transcrição é ativada em tais condições (SIQUEIRA JUNIOR, 2001).

E. faecalis apresenta também a capacidade de suprimir a ação de linfócitos, essa característica pode potencialmente contribuir para sua persistência na patologia endodôntica (LEE *et al.*, 2004). Tem sido demonstrado que este organismo expressa proteína de ligação ao colágeno (*Ace*) o que auxilia na sua adesão ao colágeno tipo I da dentina, na presença de conteúdo oriundo do osso alveolar e ligamento periodontal circunjacente (HUBBLE *et al.*, 2003).

As várias características exibidas pelo *E. faecalis* vêm a contribuir para sua permanência no sistema de canais radiculares após o uso de medidas para sua erradicação

durante a terapia endodôntica. Dessa forma o entendimento das propriedades dessas substâncias e seus mecanismos de resistência devem ser estudados.

1.6-*Enterococcus faecalis* versus medidas de desinfecção do sistema de canais radiculares

Alguns estudos têm analisado a capacidade do *E. faecalis* em resistir aos procedimentos terapêuticos endodônticos. (BYSTRÖM e SUNDQUIVIST, 1995; SIQUEIRA JUNIOR *et al.*, 1997; FUSS *et al.*, 1997; HELING e CHANDLER, 1998; SIQUEIRA JUNIOR *et al.*, 1998; ESTRELA *et al.*, 2001; SPRATT *et al.*, 2001; GOMES *et al.*, 2001; BUCK, *et al.*, 2001; DISTEL *et al.*, 2002; MICKEL *et al.*, 2003; RADCLIFFE *et al.*, 2004; SALEH *et al.*, 2004; ABDULLAH, *et al.*, 2005; PIZZO *et al.*, 2006; MELKER *et al.*, 2006)

1.6.1-Hipoclorito de sódio

O hipoclorito de sódio é um composto halogenado e registra-se o seu primeiro uso em 1792 com o nome de “água de Javele”, uma mistura de hipoclorito de sódio e potássio. Em 1820, Labarraque obteve o hipoclorito de sódio (NaOCl) a uma concentração de 2,5% de cloro ativo sendo utilizado inicialmente para realização de desinfecção de feridas. Durante a primeira guerra mundial, Dakin propôs a concentração de 0,5% para a solução de hipoclorito de sódio associada a sua neutralização com ácido bórico para o tratamento das feridas dos soldados (DAKIN, 1915; HAUMAN e LOVE, 2003).

Em 1936, Walker introduziu o uso do NaOCl na Endodontia. Desde então, em diferentes concentrações, tornou-se a solução auxiliar da instrumentação mais utilizada na terapia endodôntica (SIQUEIRA JUNIOR *et al.*, 1997).

O NaOCl apresenta excelente atividade antimicrobiana frente a microbiota endodôntica (BYSTRÖM e SUNDQVIST, 1983; FOLEY *et al.*, 1983; HAUMAN e LOVE, 2003) atividade esta que relaciona-se com a formação de compostos contendo cloro ativo, como o ácido hipocloroso e o íon hipoclorito (LOPES e SIQUEIRA JUNIOR, 1999).

O cloro ativo, liberado pelo ácido hipocloroso, ao entrar em contato com as proteínas tissulares forma nitrogênio, formaldeído e acetaldeído. Como conseqüência ocorre a quebra da cadeia de peptídios resultando na dissolução das proteínas. Durante este processo, hidrogênio do grupamento amina (-HN) é substituído por cloro (-NCL) formando cloraminas, compostos de alta toxicidade, os quais interferem no metabolismo celular (ESTRELA *et al.*; 2000; HAUMAN e LOVE, 2003).

Algumas enzimas bacterianas possuem cadeias laterais que terminam em grupamentos sulfidríla (SH). Essas enzimas somente exercem suas funções quando este grupamento se encontra livre e reduzido; o cloro age promovendo a oxidação irreversível do grupamento sulfidríla causando inativação das enzimas essenciais e conseqüentemente a morte celular (ESTRELA *et al.*; 2000; HAUMAN e LOVE, 2003).

A capacidade solvente tecidual do hipoclorito de sódio é atribuída ao hidróxido de sódio oriundo da reação do NaOCl com água. O NaOH (hidróxido de sódio) promove a hidrólise das proteínas convertendo-as em aminoácidos, e a dos lipídios em ácidos graxos livres, que são solúveis e facilmente removidos do interior do canal radicular (ABOU-RASS e PICCININO, 1982; BAUMGARTNER e CUENIN, 1992; VIANNA *et al.*, 2004). Tem sido descrito também os efeitos deletérios dessa substância no DNA bacteriano que envolve a formação de derivados clorados de bases nucleotídicas (SHIH e LEDERBERG, 1976; DENNIS *et al.*, 1979; DUKAN e TOUATI, 1996).

Como conseqüência das propriedades de dissolução tecidual e atividade antimicrobiana, o NaOCl é altamente tóxico em altas concentrações causando danos ao tecido periapical quando em contato com o mesmo. Estes danos são causados pelo seu efeito oxidativo aos tecidos vitais da região periapical (SPANGBERG *et al.*, 1973; BECKING, 1991; HÜLSMANN e HAHN, 2000; FERRAZ *et al.*, 2001). Outras características negativas são o odor e gosto desagradáveis, tendência a manchar roupas, potencial corrosivo (NEAL *et al.*, 1983; BAUMGARTNER e CUENIN, 1992) e capacidade de causar reações alérgicas (KAUFMAN e KEILA, 1989).

1.6.2-Óxido de zinco e eugenol

O objetivo do selamento do sistema de canais radiculares é prevenir que o exudato periapical se difunda para a parte não obturada do canal, evitar a infiltração e recolonização bacteriana e prevenir que bactérias residuais tenham acesso aos tecidos periapicais (MICKEL *et al.*, 2003).

De acordo com Grossman, cimentos endodônticos devem ser biocompatíveis, fornecer um selamento hermético e ter efeito antimicrobiano (GROSSMAN, 1980).

A atividade antimicrobiana do cimento obturador de canais é importante para evitar a contaminação durante a fase de manipulação, completar o efeito antimicrobiano das medidas de desinfecção do sistema de canais e inibir o crescimento de microrganismos que possivelmente permaneceram no canal após preparo químico-mecânico (MICKEL *et al.*, 2003).

Cimentos endodônticos que apresentam em sua constituição substâncias tais como paraformaldeído, eugenol e timol auxiliam na eliminação de bactérias remanescentes no sistema de canais (PUMAROLA *et al.*, 1992).

Os cimentos à base de óxido de zinco e eugenol (OZE) são cimentos tipo Grossman, compostos por prata e resina pulverizadas, óxido de zinco, solução de cloreto de zinco e eugenol.

Hume (1998) demonstrou que o eugenol confere propriedades farmacológicas aos cimentos, pois é capaz de eliminar bactérias. No entanto sua quantidade não pode ser muito elevada para não ocorrer aumento na citotoxicidade do cimento do qual é constituinte. O eugenol possui alto poder bactericida, e dados de Hume (1984) demonstraram que a concentração de eugenol que se difunde pela dentina não é citotóxica. Sua alta toxicidade pode ser atribuída à sua afinidade por membranas citoplasmáticas, devido a sua lipossolubilidade (MARKOWITZ *et al.*, 1984).

O zinco também possui atividade antimicrobiana indireta, pois funciona como ativador ou constituinte de muitas enzimas, sendo necessário para o metabolismo de várias células inflamatórias (PIZZO *et al.*, 2006).

O Endofill[®], um cimento endodôntico à base de óxido de zinco e eugenol, tem demonstrado boa estabilidade de volume, impermeabilidade, aderência e dissolução (HOLLAND *et al.*, 1974; BENATTI *et al.*, 1978), mas é considerado por Barbosa e colaboradores (2003) como irritante aos tecidos periapicais. Quando comparado com os cimentos à base de hidróxido de cálcio e à base de resina-epóxica tem apresentado maior atividade antimicrobiana (SIQUEIRA JUNIOR e GONÇALVES, 1996).

Saleh *et al.*, (2004) estudaram a ação de diferentes cimentos endodônticos, incluindo aqueles à base de óxido de zinco e eugenol (OZE), em modelos *in vitro* de contaminação dentinária com *E. faecalis*. Os resultados encontrados demonstraram que o uso de cimento à base de OZE levou a morte de tais bactérias em um diâmetro de 300 µm ao redor da luz do canal.

Existem poucos estudos focados na possível explicação da resistência que o *E. faecalis* apresenta à terapia endodôntica. Essa espécie é facilmente destruída quando cultivada *in vitro*, mas torna-se resistente quando presente no ambiente do sistema de canais radiculares (DISTEL *et al.*, 2002).

Sendo assim, acredita-se que o *E. faecalis* deve sofrer algum tipo de mudança quando dentro do canal radicular, possivelmente ativando alguns fatores de virulência que o fazem mais resistentes.

1.6.3-Epiphany®

Recentemente, a Resilon Research LLC (Madson, CT) introduziu no mercado pontas para obturação (Resilon®) e um cimento endodôntico resinoso (Epiphany®). Esses produtos são usados em combinação com um primer auto-condicionante para criar um monobloco sólido que preenche o sistema de canais radiculares. Resilon® é uma resina termoplastificável baseada em polímeros de poliéster e contém metacrilato bifuncional, vidro bioativo, e agentes de radiopacidade. O cimento resinoso, Epiphany Root Canal Sealer® (Pentron Clinical Technologies, Wallingford, CT), contém bisfenol-A dimetacrilato diglicidil (BisGMA), BisGMA etoxilado, dimetacrilato uretano, metacrilato difuncional hidrofílico, bário silanizado, sulfato de bário, sílica, hidróxido de cálcio, oxicloreto de bismuto com aminas, peróxido, foto iniciador, estabilizador e pigmentos (ONAY *et al.*, in press).

Epiphany® é um cimento resinoso foto e quimicamente ativado que precisa de 40 segundos de fotopolimerização para que ocorra polimerização em 2 mm da extensão do canal, ocorrendo presa química no restante do material em 15-30 minutos (VERSIANI *et al.*, 2006).

A atividade antimicrobiana tem um papel muito importante na eficácia de um cimento endodôntico durante a obturação do canal, e por essa razão muitos estudos tem sido feitos com o objetivo de avaliar essa característica em cimentos obturadores a disposição no mercado.

Estudos enfocando a capacidade antimicrobiana dos cimentos endodônticos já foram realizados, principalmente com cimentos a base de óxido de zinco e eugenol, hidróxido de cálcio e resina-epóxica (DISTEL *et al.*, 2002; PIZZO *et al.*, 2006). Embora o Epiphany® seja um cimento resinoso que apresenta em seu conteúdo hidróxido de cálcio, não se deve fazer induções de sua atividade antimicrobiana a partir do estudo de outros cimentos à base de hidróxido de cálcio, pois apresenta dentre os seus constituintes moléculas de Bis-fenóis que, de acordo com MACDONNEL e RUSSEL (1999), apresentam amplo espectro de eficácia frente a bactérias sendo também esporostático bacteriano.

Suas características juntamente com as pontas obturadoras Resilon® em formar um monobloco podem trazer vantagens no que diz respeito a um melhor selamento do canal. Assim, a análise da possível atividade antimicrobiana do Epiphany® e o estudo da ação de seus componentes como os Bis-fenóis e o hidróxido de cálcio são de grande importância no campo endodôntico.

1.6.4-Hidróxido de Cálcio

O hidróxido de cálcio (Ca(OH)_2) é o medicamento intracanal mais usado, discutido, e estudado. Pesquisas têm tentado estabelecer um critério para seu uso, incluindo limites e implicações. É uma substância alcalina poderosa e tem sido recomendada para uso intracanal por seus efeitos biológicos (EVANS *et al.*, 2002; DISTEL, *et al.*, 2002).

Apresenta uma pronunciada atividade antimicrobiana frente a algumas das espécies bacterianas encontradas nas infecções endodônticas (BYSTRÖN *et al.*, 1985a). No entanto, não é efetivo contra todas as bactérias encontradas na flora do canal radicular (CHONG e PITT FORD, 1992). Essa informação é embasada em estudos que mostram a ineficiência do Ca(OH)_2 frente ao *E. faecalis* (STEVANS e GROSSMAN, 1983; HAAPASALO e ORSTAVIK, 1987). Essa ineficiência ocorre especialmente quando o pH alto não é mantido por um período suficiente de tempo (HAAPASALO *et al.*, 1987; LIN *et al.*, 2003). As seguintes razões têm sido propostas para explicar tal resistência: 1) *E. faecalis* mantém passivamente à homeostase de seu pH. Isso ocorre como resultado da penetração de íons na membrana, assim como pela capacidade de tamponamento citoplasmática; 2) *E. faecalis* apresenta uma bomba de prótons que fornece meios adicionais de manter o pH intracelular (McHUGH *et al.*, 2004).

Dois importantes propriedades desta medicação intracanal são: a inibição de enzimas bacterianas causando um efeito antimicrobiano e a ativação de enzimas teciduais, tal como fosfatase alcalina, causando um efeito de mineralização. Seu alto pH inibe a atividade de enzimas essenciais de metabolismo, crescimento e divisão celular. Alterações do pH levam a danos na integridade da membrana citoplasmática através da ruptura de componentes orgânicos (proteínas, fosfolipídios) afetando o transporte de nutrientes (ESTRELA *et al.*, 1995).

Para ser efetivo frente a bactérias nos túbulos dentinários, íons hidroxil devem difundir-se na dentina e permanecer em níveis de pH suficientes para serem letais às bactérias. A baixa solubilidade e difusibilidade do Ca(OH)_2 , assim como a capacidade tampão da dentina, podem dificultar a obtenção de um alto pH capaz de eliminar bactérias localizadas nos túbulos dentinários ou abrigadas nas variações anatômicas do sistema de canais (LOPES e SIQUEIRA JUNIOR, 1999).

De acordo com Haapasalo e colaboradores (2000), em experimentos *in vitro*, a dentina apresentou a capacidade de abolir completamente a ação do hidróxido de cálcio frente ao *E. faecalis*. Desta forma, sua ação como componente do cimento Epiphany[®] frente ao *E. faecalis* pode não influenciar de forma pronunciada a ação desse cimento endodôntico.

1.7-Uso de Substâncias naturais com ação antimicrobiana em endodôntia

O uso de plantas aromáticas (inteiras ou suas partes como folhas, cascas, sementes e seus produtos extrativos como as resinas), é tão antigo quanto a história da humanidade, sendo empregadas na medicina, na cosmética e em cerimônias religiosas.

O Egito parece ser o berço da arte de obtenção de óleos essenciais através da destilação, apesar de existirem poucas referências atuais sobre isto. Estes conhecimentos espalharam-se para os antigos gregos e destes para os romanos, que eram ótimos perfumistas (CARVALHO *et al.*, 2003).

O uso de plantas e óleos aromáticos na terapêutica pelos chineses é muito antigo, há relatos em obras de 2700 a.C. Mas foi somente durante os séculos XVI e XVII que os óleos essenciais receberam suas primeiras aplicações e sua introdução no comércio. Os óleos essenciais também exercem uma função ecológica na espécie que o produz, especialmente como inibidor de germinação de outras espécies vegetais que venham a competir pelo solo, luz e água; na proteção contra predadores, na proteção contra a perda de água, entre outras funções (CARVALHO *et al.*, 2003).

Os óleos essenciais são produtos de extração de uma espécie vegetal e, portanto, mais concentrados, apresentam toxicidade mais elevada que a da planta de origem. O uso abusivo e sem orientação não é aconselhado. A toxicidade pode ser aguda ou crônica e ainda pode existir também a interação medicamentosa entre os inúmeros componentes do óleo com certos medicamentos utilizados pelo indivíduo (CRAVEIRO *et al.*, 1974).

Lippia sidoides Cham. (família das *Verbenaceae*), popularmente conhecida como “Alecrim-pimenta”, é uma vegetação comumente encontrada no nordeste brasileiro. Essa espécie produz um óleo essencial rico em timol e carvacrol, que apresenta uma potente atividade antimicrobiana frente a fungos e bactérias (LEMOS *et al.*, 1990). É uma das substâncias mais usadas na medicina popular brasileira, especialmente por uma parcela pobre da população no nordeste para feridas de pele, dor de garganta e para prevenção de doenças bucais (LACOSTE *et al.*, 1996; BOTELHO *et al.*, in press).

Estudos anteriores descreveram as propriedades larvicidas do óleo essencial da *Lippia sidoides* (OELS) (CARVALHO *et al.*, 2003). Recentemente, propriedades citotóxicas referentes às quinonas isoladas do OELS foram descritas (COSTA *et al.*, 2001). No campo odontológico, seu uso para higiene oral e prevenção de distúrbios tais como cárie e gengivite tem sido estudado (MORAIS *et al.*, 1996; FERNANDES FILHO E MORAIS, 1998).

1.8-Biofilmes: generalidades

Costerton e colaboradores (1999) definem biofilme como sendo uma comunidade estruturada de células bacterianas embebidas em uma matriz polimérica e aderida a uma superfície inerte ou viva. Elder e colaboradores (1996) descreveram biofilme em termos mais cooperativos como um consórcio funcional de microrganismos organizados em uma matriz exopolissacarídica, enquanto Carpentier e Cerf (1993) simplificaram o conceito como sendo uma comunidade de micróbios embebidos em uma matriz polimérica orgânica, aderida a uma superfície.

De uma forma geral, formação de biofilmes é uma estratégia importante usada por um grande número de microrganismos em um ambiente natural (CALDWELL e LAWRENCE, 1986; COSTERTON *et al.*, 1987). Em essência, representam uma existência interdependente em comunidade; pode ser composto por uma população que se desenvolveu a partir de uma única espécie ou uma comunidade derivada de múltiplas espécies microbianas (DAVEY e O'TOOLE, 2000).

Até recentemente, os conglomerados de bactérias denominados biofilmes eram reconhecidos por sua capacidade de cobrir e “degradar” superfícies. Mas muitas evidências surgiram nesses últimos anos que remetem a essas comunidades como causa de várias patologias. Biofilmes podem colonizar implantes tais como válvulas cardíacas, cateteres e atacam tecidos corpóreos, como dentes e gengivas, pulmões, ouvidos, e o trato urogenital (STEWART e COSTERTON, 2001).

A primeira suspeita de que os biofilmes poderiam ser um problema de saúde apareceu na metade dos anos 60 quando os pesquisadores na área odontológica Johannes Van Houte e Ronald Gibbons do Forsyth Dental Center em Boston, Massachusetts, reconheceram que bactérias que vivem na boca sintetizam adesinas e são capazes de aderir às gengivas, dentes e língua, o que pode resultar em placa dental, cárie e doença gengival (STEWART e COSTERTON, 2001).

Evidências que suportam a idéia de que bactérias ligam-se a superfícies no corpo humano começaram a aparecer cerca de uma década depois quando Thomas Marrie da Universidade de Dalhousie em Halifax, Nova Escócia, usando o então recentemente desenvolvido Microscópio Eletrônico de Varredura, detectou um biofilme cobrindo um marcapasso cardíaco removido de um paciente (STEWART e COSTERTON, 2001).

Na metade dos anos 80, Joseph Lam da Universidade de Calgary em Alberta, usando Microscópio Eletrônico de Transmissão, confirmou que biofilmes estão presentes nos pulmões de pacientes com fibrose cística. Biofilmes de longa permanência, não detectáveis

por métodos de cultura tradicionais, podem ainda causar algumas infecções recorrentes (STEWART e COSTERTON, 2001).

Estudos indicam que esses filmes biológicos são pontos estáveis em um ciclo de vida que inclui iniciação, maturação, manutenção e dissolução (ABDULAH *et al.*, 2005).

As bactérias são submetidas a uma transição de uma existência de vida livre a uma existência dentro de uma comunidade na qual devem interagir com um grande número de bactérias sejam estas da mesma espécie, no caso de biofilmes monomicrobianos, ou com uma grande diversidade de espécies nos polimicrobianos. As mudanças funcionais acontecem na fisiologia, superfície celular, resistência a insultos ambientais e outras propriedades das células vivendo neste tipo de arranjo o que as diferenciam de células da mesma espécie vivendo livremente, de forma planctônica (DAVEY e O'TOOLE, 2000).

1.8.1-Mecanismos de formação dos biofilmes

A formação do biofilme pode ocorrer por meio de três mecanismos (STOODLEY *et al.*, 2002) (figura 1). O primeiro é pela redistribuição de células fixas através da motilidade de sua superfície. O segundo mecanismo ocorre por divisão binária das células fixas à superfície. Após a divisão, células filhas se expandem externamente e para cima, se ligando à superfície e formando aglomerados de células, de forma similar à formação de colônias em placas de ágar (HEYDORN *et al.*, 2000). O terceiro mecanismo de agregação ocorre pelo recrutamento de células presentes no meio externo para o desenvolvimento do biofilme (TOLKER-NIELSON *et al.*, 2000).

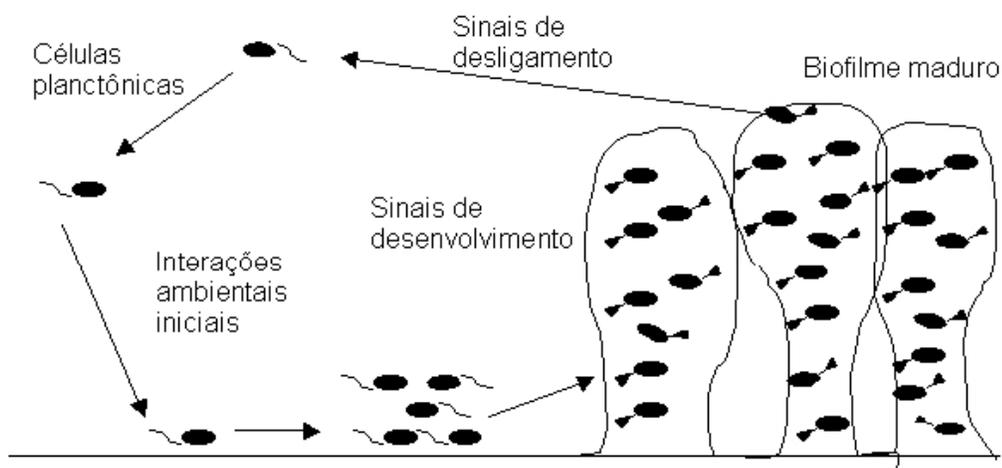


FIGURA 1. Modelo de desenvolvimento do biofilme segundo Stoodley *et al.* (2002)

A formação do biofilme tem início quando os microrganismos recebem estímulos que podem causar a transição da vida livre (planctônica) para uma vida aderida a uma superfície (CARLSSON, 1997; PRATT e KOLTER, 1998; STOODLEY *et al.*, 1999). Estes sinais variam de acordo com cada microrganismo. Alguns microrganismos requerem exigências nutricionais, tais como *Escherichia coli* K-12 que necessita de um meio com a presença de aminoácidos (PRATT e KOLTER, 1998).

O processo de formação do biofilme dá-se da seguinte forma:

Adesão inicial: Sinais ambientais são necessários para que ocorra a inicialização dos processos de adesão. Esse processo é ditado por um grande número de variáveis, incluído espécies bacterianas, composição da superfície a qual a bactéria está realizando a adesão, fatores ambientais e produtos gênicos essenciais (O'TOOLE *et al.*, 2000).

A adesão bacteriana pode ser dividida em dois estágios: a fase primária e a secundária. A adesão primária acontece nos momentos iniciais de interação entre o substrato e as células de vida livre (planctônicas). Este momento inicial de aderência do microrganismo a superfícies abióticas é geralmente mediado por interações não específicas (forças hidrofóbicas), enquanto a adesão a superfícies vivas ou tecidos desvitalizados é realizada através de mecanismos moleculares específicos (lectinas, adesinas) (CARPENTIER e CERF, 1993). Primeiro o microrganismo aproxima-se da superfície, de forma aleatória (por exemplo, através da corrente sanguínea que passe nas proximidades da superfície ou de forma direta via quimiotaxia e motilidade). Uma vez que o microrganismo alcance uma proximidade crítica (geralmente $< 1\text{nm}$) o início da adesão depende da geração de forças atrativas ou repulsivas entre as duas superfícies, celular e do substrato de adesão. Essas forças incluem interações eletrostáticas e hidrofóbicas, forças de Van Der Waals e forças hidrodinâmicas (CARPENTIER e CERF, 1993; DUNNE JUNIOR, 2002). Interações eletrostáticas tendem a favorecer a repulsão, porque a maioria das bactérias e superfícies apresentam cargas negativas; interações hidrofóbicas provavelmente têm uma maior influência na adesão primária (CARPENTIER e CERF, 1993).

O segundo estágio do processo de adesão é a fase de ancoragem e emprega ligações mediadas por moléculas entre adesinas específicas e a superfície (DUNNE JUNIOR, 2002). Neste momento microrganismos frouxamente aderidos consolidam o processo de adesão produzindo exopolissacarídeo que complementa a ação de ligantes como fímbrias e pili. Na conclusão do segundo estágio, a adesão torna-se irreversível na ausência de intervenções químicas e/ou físicas, o organismo liga-se firmemente ao substrato. Durante esse estágio, microrganismos planctônicos podem fixar-se uns aos outros ou a diferentes organismos, formando agregados (DUNNE JUNIOR, 2002).

Durante o período de desenvolvimento do biofilme ocorre um importante evento fisiológico responsável pela adesão dos colonizadores secundários à estrutura do biofilme, que é o aumento da produção de polissacarídeo extracelular (PEC). Esta substância envolve as células no interior do biofilme, fortalece a adesão entre as células, promove o suporte estrutural do biofilme e pode agir como receptor para novas interações. O PEC é composto principalmente de polissacarídeos, proteínas e ácidos nucléicos (STOODLEY *et al.*, 2002) (figura 2).

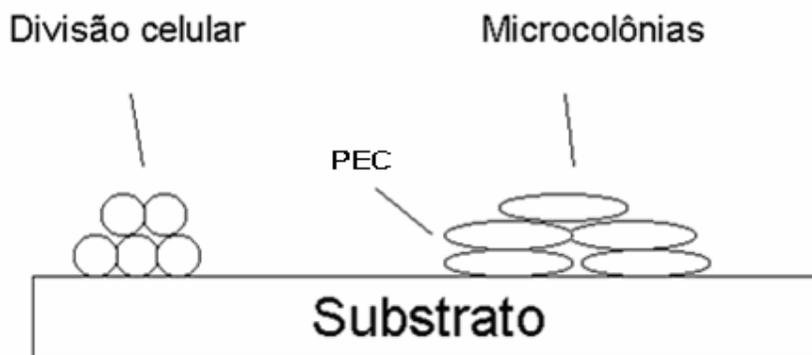


FIGURA 2. Formação do biofilme: crescimento celular, divisão e produção de polissacarídeo extracelular (PEC) (RICKARD *et al.*, 2002).

Maturação do biofilme: Uma vez que a adesão bacteriana seja irreversível, o processo de maturação do biofilme inicia-se. A densidade e complexidade do biofilme aumentam (figura 3) à medida que os organismos aderidos iniciam sua replicação e os componentes extracelulares gerados por esses organismos interagem com moléculas orgânicas e inorgânicas do ambiente circunjascente criando o glicocálix (DUNNE JUNIOR, 2002).

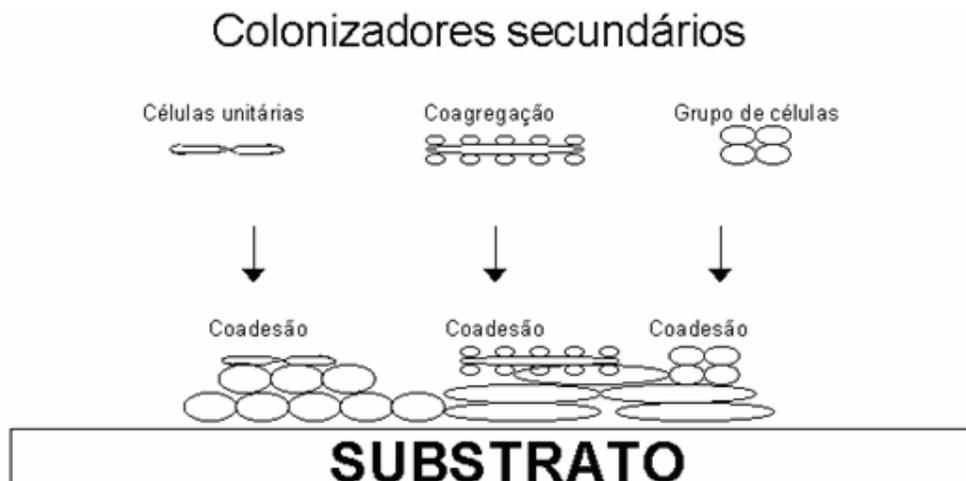


FIGURA 3. Co-adesão de células individuais, co-agregadas e grupo de células (RICKARD *et al.*, 2002).

Outros fatores regulam a maturação dos biofilmes tais como pH, perfusão de oxigênio, fonte de carbono, e osmolaridade (CARPENTIER e CERF, 1993; O'TOOLE e KOLTER, 1998). Em certo momento, o biofilme alcança uma massa crítica e um equilíbrio dinâmico é criado de forma que as camadas mais externas do biofilme começam a gerar células planctônicas, ou seja, inicia-se a liberação de células da estrutura formada e madura. Esses microorganismos são agora livres para colonizar outras superfícies. (LA TOURETT PROSSER *et al.*, 1987)

1.9-Por que as bactérias formam biofilmes?

De acordo com a teoria da evolução de Darwin, a única força verdadeira orientando o curso de vida de qualquer organismo é a adaptação reprodutiva. Parece natural induzir-se que o modo de crescimento em um biofilme pode fornecer vantagens adaptativas considerando-se que os organismos comumente enfrentam condições ambientais não muito favoráveis para a sua sobrevivência como depleção nutricional, diferentes graus de acesso ao oxigênio, fontes de carbono, dentre outras condições (JEFFERSON, 2004).

Adaptações genéticas podem originar-se a partir de mutações e recombinações genéticas, aquisição de novo material gênico, ou da expressão regulada de material genético já existente na célula. Flexibilidade na expressão gênica bacteriana permite a sobrevivência em

ambientes com rápidas mudanças nas condições tornando as bactérias particularmente adaptáveis a quase todos os ambiente do planeta (JEFFERSON, 2004).

A formação de biofilmes pode se dar como um mecanismo de defesa dos organismos a condições de estresse ambiental. Biofilmes são resistentes a forças físicas como as produzidas, por exemplo, pela corrente sanguínea ou a ação de lavagem que a saliva realiza sobre as superfícies na cavidade bucal. Organismos vivendo em comunidades podem também suportar mudanças de pH, a ação de radicais de oxigênio, desinfetantes e antibióticos de uma forma mais favorável à vida do que as células vivendo de forma planctônica. Biofilmes são resistentes à fagocitose, e as células de defesa que tentam fagocitar os microrganismos em biofilme podem causar mais danos aos tecidos circunvizinhos que ao biofilme propriamente dito (JEFFERSON, 2004).

A vulnerabilidade dessas comunidades microbianas não é completamente entendida, mas provavelmente depende de características específicas de cada tipo de biofilme. Independente de seus mecanismos para “escapar” da morte, esses arranjos bacterianos favorecem sua sobrevivência; podendo permanecer em locais onde o aporte nutritivo favorece seu crescimento ou mesmo em ambientes onde células de defesa não têm um acesso facilitado (MUNDY *et al.*, 2000).

1.10-Resistência dos biofilmes a agentes antimicrobianos

Quando se lida com doenças infecciosas que sabidamente são causadas por biofilmes, devemos entender a terapêutica desta patologia de uma forma diferenciada. Particularmente, essas estruturas são de longe mais resistentes aos agentes antimicrobianos do que microrganismo em suspensão (em vida livre). Em alguns casos extremos, a concentração de antimicrobiano necessária para exercer atividade bactericida frente a filmes biológicos pode ser maior de três ou quatro ordens de magnitude comparado a quantidade necessária para ter ação sobre organismos planctônicos, dependendo da combinação espécie-droga (CERI *et al.*, 1999; SCHIERHOLZ *et al.*, 1999)

Resistência é a habilidade que um microrganismo apresenta de crescer na presença de um nível elevado de antimicrobiano. Resumidamente, uma cepa para qual a concentração inibitória mínima (CIM) é aumentada é considerada uma cepa resistente. Por esse critério, células que compõem um biofilme não necessariamente demonstram maior resistência. Com algumas exceções, células agrupadas em comunidades não crescem melhor do que células planctônicas na presença de uma grande variedade de antimicrobianos. Isso se torna evidente

avaliando-se dados de susceptibilidade de biofilmes na literatura. Dessa forma, a resistência relatada em estudos anteriores descreve um aumento na resistência dessas células agrupadas de serem totalmente eliminadas (LEWIS, 2000).

De acordo com Lewis (2001), Três fatores podem ser considerados para explicar a resistência dos biofilmes à morte por antimicrobianos: a penetração restrita da droga no interior das comunidades microbianas, a característica de crescimento lento apresentada por algumas células presentes no biofilme e ainda a expressão de alguns genes biofilme-específicos.

Biofilmes estão embebidos em uma matriz polimérica composta por proteínas, carboidratos e DNA (CARNIOL E GILMORE, 2004) que pode restringir a penetração de substâncias e ligar-se a antimicrobianos. Isso poderá fornecer resistência efetiva às células em comunidades frente a grandes moléculas como as do sistema complemento e proteínas antimicrobianas. A barreira de difusão é provavelmente efetiva também frente a pequenos peptídeos antimicrobianos. A carga negativa do PEC também apresenta importante função na proteção do biofilme frente a moléculas positivamente carregadas dos aminoglicosídios, restringindo sua penetração através de ligações com as moléculas da matriz (LEWIS, 2001). A difusão retardada de um antimicrobiano na matriz polimérica irá diminuir a sua concentração adentrando a estrutura do biofilme, auxiliando na ação de enzimas tais como β -lactamase. Esse sinergismo entre difusão retardada e degradação fornece uma resistência efetiva a biofilmes de *Pseudomonas aeruginosa* que têm a capacidade de expressar a enzima β -lactamase. (GIWEREMAN *et al.*, 1991).

A matriz do biofilme é tipicamente composta de polissacarídeos que podem conter um ou mais ácidos aniônicos urônicos; é densamente concentrada ao redor das micro-colônias que a produz e menos densa nos espaços intercoloniais, que se apresentam mal-definidos, com distribuição dispersa. Nestes espaços, existe um sistema circulatório formado por canais que permitem escoamento e rápido equilíbrio iônico e molecular dentro da massa fluida. Através desses canais de água, que funcionam como um sistema circulatório primitivo, acontecem trocas metabólicas importantes dentro da massa do biofilme (COSTERTON *et al.*, 2003).

Quando é considerada a ação dos antimicrobianos sobre os microrganismos em geral se observa que virtualmente todos são mais efetivos em matar células em crescimento. Alguns como, por exemplo, as penicilinas só exercem sua função sobre células em crescimento. Outros agentes mais modernos tais como cefalosporinas, aminoglicosídios e fluoroquinolonas podem matar células que não estão em fase de crescimento, mas são evidentemente mais efetivos frente a células durante essa fase do seu ciclo de vida (JEFFERSON, 2004).

O crescimento lento indubitavelmente contribui para que os filmes biológicos resistam à morte por antimicrobianos e pode ser apontado como principal fator para uma possível resistência de células planctônicas à morte (ADAMS e MELED, 1999).

Uma pequena população de células em uma comunidade microbiana pode apresentar-se quiescente ou em estado de dormência, dessa forma encontra-se em uma fase metabólica que não favorece a ação da maioria dos antimicrobianos. Por essa razão, não são atingidas nas terapias medicamentosas corriqueiramente utilizadas (ANWAR *et al.*, 1992)

Um outro fator a concorrer para a sobrevivência dos organismos em comunidade é a possibilidade de expressão gênica diferente de algumas células presentes nos biofilmes conferindo-lhes vantagens metabólicas, adaptativas e de defesa, em seu microambiente de desenvolvimento. Um exemplo dessa característica é quando em filmes polimicrobianos encontra-se uma espécie bacteriana com bagagem genética para expressar β -lactamase e outras espécies que não podem produzir tal substância vêm a se beneficiar quando submetidas à terapia medicamentosa com β -lactâmicos (COSTERTON *et al.*, 2003).

Os membros de biofilmes, sejam estes polimicrobianos ou de espécie única, têm diferentes necessidades e realizam diferentes funções metabólicas fazendo do comensalismo um fenômeno comum nessas comunidades (JEFFERSON, 2004). Essa heterogeneidade traz consigo uma outra consequência: a “divisão de trabalho”. De acordo com Jefferson (2004), essa divisão das atividades metabólicas dentro da comunidade microbiana é coordenadamente regulada através de “comunicação intercelular” ou sinais auto-indutivos. Sinais auto-indutivos são pequenas moléculas, geralmente lactonas em bactérias Gram-negativas e peptídeos nas Gram-positivas, que são constitutivamente liberadas pelas bactérias e que, quando presentes em uma concentração crítica irão induzir a expressão de alguns genes. Esses sinais são frequentemente referidos como sinais “quorum-sensing”.

Nesse processo, bactérias monitoram a presença de outras bactérias ao seu redor produzindo e respondendo a sinais através da síntese de moléculas auto-indutoras. A resposta a essas moléculas através da expressão de genes fornece meios às bactérias para executar um comportamento particular quando vivendo em comunidade, comportamento este que não é desenvolvido por microrganismo de vida livre (TAGA e BASSLER, 2003).

A maioria dos comportamentos controlados através de sinais “quorum-sensing” é realizada apenas quando um grupo de bactérias os executa em sincronia; eles incluem bioluminescência, secreção de fatores de virulência, processo de formação de biofilme, esporulação, conjugação e produção de pigmento (TAGA e BASSLER, 2003).

Outro conceito importante no que se refere à capacidade dos biofilmes de sobreviverem é a presença de células persistentes na massa microbiana que são geralmente preservadas pela presença de um antibiótico que inibe seu crescimento. Paradoxalmente o antibiótico auxilia que estas células sejam preservadas. Células com características de persistência também são encontradas vivendo de forma planctônica, mas é possível que biofilmes produzam mais persistentes que a população de células de vida livre (LEWIS, 2001).

Um ponto de grande relevância em relação à susceptibilidade de células persistentes a antimicrobianos é a capacidade que o sistema imunológico apresenta de contribuir para debelar infecções recorrentes. Dessa forma, células persistentes tornam-se um problema de maior dificuldade de resolução quando o sistema imunológico não está exercendo adequadamente suas funções. Um exemplo é a meningite causada por *Streptococcus pneumoniae* que causa meningites recalcitrantes devido à inacessibilidade do fluido cérebro-espinhal aos componentes do sistema imunológico. E ainda que células do sistema imunológico tenham acesso ao local onde o biofilme encontra-se, a presença de polissacarídeo extracelular protege fisicamente suas células dos componentes do sistema imune (LEWIS, 2001).

Se a concentração do antimicrobiano cai temporariamente ou se os sintomas desaparecem devido à erradicação das células planctônicas e a terapia é descontinuada, as células persistentes irão refazer a estrutura do biofilme que começará a liberar novas células de vida livre. Essa dinâmica explica a natureza recalcitrante das infecções causadas por biofilmes e a necessidade de uma terapia antimicrobiana prolongada (LEWIS, 2001).

1.11-E. faecalis e sua capacidade de formar biofilmes

Costerton e colaboradores (1999) relataram que biofilmes crescem, desenvolvem-se preferencialmente em superfícies inertes ou em tecido necrótico, tais como os restos de tecido que podem permanecer em irregularidades anatômicas presentes no sistema de canais radiculares (canais laterais, túbulos dentinários e espaços entre a parede do canal e o material obturador). Desta forma, mesmo que se realize um bom preparo químico-mecânico com soluções irrigantes potencialmente eficazes microrganismos podem permanecer no canal radicular em uma arquitetura e funções bastante peculiares que o fazem mais resistentes a medidas de limpeza na tentativa de sanificar totalmente o ambiente.

Um estudo realizado por Abdullah e colaboradores em 2005 mostrou a potencial diferença na suscetibilidade a soluções irrigantes de uso comum na clínica endodôntica entre dois diferentes fenótipos de *E. faecalis*. Os autores concluíram baseado no modelo que utiliza apenas uma espécie para formação de biofilme, que a efetividade antimicrobiana dos agentes

testados foi dependente do fenótipo bacteriano (microrganismos crescido em biofilme ou de forma planctônica), agente antimicrobiano e tempo de contato com o agente. O hipoclorito de sódio a 3% matou 100% dos microrganismos crescidos de forma planctônica quando houve uma exposição de 1 minuto. Um tempo de 2 minutos foi necessário para matar 100% das células bacterianas quando estas foram crescidas em biofilme. As diferenças observadas na suscetibilidade entre biofilme e suspensão planctônica de *E. faecalis* à clorexidina e iodo povidine estavam em concordância com a hipótese de que bactérias arranjadas em biofilmes são mais difíceis de eliminar.

Assim como grande parte dos microrganismos causadores de patologias infecciosas nos seres humanos o *E. faecalis*, bacteria envolvida na patologia endodôntica persistente tem capacidade de expressar-se em arranjos bacterianos aderidos à superfície dentárias embebidos em uma matriz exopolissacarídica. Sua capacidade de resistir à tentativa de removê-lo do sistema de canais radiculares pode estar ligada à sua resistência intrínseca a um grande número de antimicrobianos, sejam estes de uso sistêmico ou local, assim como à sua capacidade de formar biofilme. Uma vez incluso nessa estrutura estes microrganismos, através de uma série de mecanismos terão a habilidade de resistir e permanecer no canal levando à falha do tratamento endodôntico (ABDULAH *et al.*, 2005).

O especialista ou mesmo o clínico ao se deparar com casos de difícil tratamento e falha devem estar cientes da possibilidade da presença de microrganismos estruturados em comunidades para adotar as medidas corretas objetivando debelar a infecção e obter sucesso na terapia.

E. faecalis é um importante patógeno em muitas infecções, entretanto pouco se sabe sobre o mecanismo de formação de seu biofilme e dos mecanismos de virulência utilizados por esta espécie, apesar de que alguns supostos fatores de virulência já foram descritos. Paralelo às proteínas de superfície e aos polissacarídeos que estão relacionados com sua virulência, a habilidade de *E. faecalis* de sobreviver no interior de leucócitos polimorfonucleares (PMN) e macrófagos tem sido examinada. Substância de Agregação (SA) tem sido indicada como responsável pela internalização do *E. faecalis* para o interior dos PMN, aumentando assim sua resistência à morte por enzimas digestivas presentes em lisossomos destas células (O'TOOLE *et al.*, 2000; DISTEL *et al.*, 2002; BALDASSARRI *et al.*, 2004).

Tanto a proteína de superfície enterocócica (*esp*), quanto as suas adesinas de superfície estão relacionadas com a agregação desses microrganismos, e tais fenótipos são expressos principalmente em cepas com grande capacidade de formar biofilme (O'TOOLE *et al.*, 2000).

1.12-Métodos “*in vitro*” para estudar biofilmes bacterianos e desafios antimicrobianos

Para avaliar a ação antimicrobiana de substâncias utilizadas na clínica odontológica alguns pode-se utilizar a técnica de contaminação de túbulos dentinários. Esta técnica apresenta a vantagem de estar mais próxima da realidade *in vivo* onde microorganismos estão alojados nos túbulos dentinários muito provavelmente estruturados em biofilmes. Apesar de segmentos de dentina ou dentes extraídos impregnados com bactérias fornecerem uma boa simulação do cenário clínico, variáveis tais como morfologia do canal radicular; propriedades da dentina (conteúdo orgânico e de colágeno da dentina, grau de calcificação e densidade e conteúdo dos túbulos dentinários); quantidade do inóculo bacteriano; grau de invasão bacteriana aos túbulos dentinários; e quantidade dos agentes usados é difícil de padronizar (ABDULLAH *et al.*, 2005).

Experimentos de susceptibilidade antimicrobiana de biofilmes bacterianos têm sido realizados através da técnica de manipulação de comunidades microbianas estruturadas sobre membrana de nitrocelulose (SPRATT *et al.*, 2001; ABDULLAH *et al.*, 2005).

Quando da utilização desse modelo, a estrutura pode ser removida intacta de seu meio de crescimento e ser submetida a diferentes tipos de desafios antimicrobianos. Spratt *et al.* (2001) padronizaram a manipulação de biofilmes utilizando como substrato de crescimento membranas de nitrocelulose com 0,22 μm de porosidade e 13 mm de diâmetro, onde um inóculo de 50 μl ajustado em turbidez a 7 da escala MacFarland é semeado sobre a membrana e esta é incubada em condições atmosféricas e de temperatura específicas para cada microorganismo por um período de tempo de 48 horas.

Esta técnica pode ser empregada para vários microorganismos ajustando-se o inóculo, condições de crescimento e tempo de incubação, assim como para testar várias substâncias. No caso da endodontia, este método tem sido utilizado para testar soluções químicas auxiliares do preparo químico-mecânico do sistema de canais radiculares (SPRATT *et al.*, 2001; ABDULLAH *et al.*, 2005).

1.13-Métodos de visualização de biofilmes microbianos

1.13.1-Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

A utilização desta técnica permite examinar estruturas celulares como: morfologia, disposição e ultraestruturas. Com o uso de alguns corantes, a estrutura da substância polimérica extracelular pode ser determinada. Por exemplo, com o vermelho rutênio pode-se

observar os polissacarídeos, enquanto que o anticorpo "goldlabelled" identifica estruturas celulares específicas (NYVAD e FEJERSKOV, 1997; WIMPENNY *et al.*, 2000).

1.13.2-Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A MEV vem sendo utilizada no estudo da localização de microrganismos no sistema de canais radiculares, na superfície externa do ápice radicular e região periapical (SEN *et al.*, 1999; GUTIÉRREZ *et al.*, 1999). É um importante instrumento para o estudo diagnóstico de patologias periapicais, permitindo avaliar a topografia e o limite das obturações endodônticas (FERLLINI FILHO, 1999; ROSA NETO, 1997). Através do MEV é possível obter informações da estrutura da superfície do biofilme, como células e suas disposições. A presença de PEC poderá ser observada como uma fina camada. Caso o MEV seja equipado com acessórios de baixo vácuo o espécime a ser analisado pode ser observado sem nenhum tratamento adicional (WIMPENNY *et al.*, 2000).

A principal desvantagem do uso do MEV de alto vácuo para observação de biofilmes microbianos é a necessidade de realização de preparação da amostra através de carbonização e metalização. Tal preparação pode vir a descaracterizar a estrutura e arquitetura das comunidades microbianas.

1.13.3-CLSM (Confocal Laser Scanning Microscope)

A aplicação do microscópio confocal à pesquisa com biofilmes alterou a percepção da estrutura e função dessas comunidades microbianas (LAWRENCE *et al.*, 1991). Antes do advento do CLSM o microscópio eletrônico era o método de escolha para realizar estudos de alta resolução com biofilmes. A principal vantagem do confocal sobre a microscopia eletrônica é a possibilidade da visualização da estrutura do biofilme em amostras completamente hidratadas, o que revela a arquitetura tridimensional desses agregados microbianos (DE BEER *et al.*, 1994; COSTERTON, *et al.*, 1995; DE BEER e STOODLEY, 1995). O CLSM emite feixes de luz que se difundem através do biofilme, detectando sua estrutura formando uma imagem em duas dimensões. A geometria do sistema pode ser alterada de modo que o plano focal possa ter diferentes profundidades no espécime, até o mais profundo que a luz difusora possa penetrar. Utilizando técnicas de processamento de imagens, as imagens em duas dimensões podem ser sobrepostas e fotos em três dimensões podem ser produzidas do espécime analisado. Marcadores fluorescentes, como a resazurina podem ser adicionados para detecção e identificação de microrganismos, assim como podem ser usados para determinar aspectos bioquímicos, físico-químicos do meio ao seu redor e diferenciar microrganismos Gram-positivos dos Gram-negativos (WIMPENNY *et al.*, 2000).

1.13.4-Microscopia de Força Atômica (MFA)

Na última década, houve grande progresso na utilização do MFA para visualizar a estrutura e propriedades físicas das superfícies microbianas, indicando que esse instrumento vem se estabelecendo no estudo microbiológico (DUFRÊNE, 2002; DUFRÊNE, 2003). Existem duas vantagens em utilizar o MFA em microbiologia: a habilidade de gerar imagens tridimensionais de superfícies celulares hidratadas com resolução nanométrica e a possibilidade de mensurar localmente interações biomoleculares através de força espectroscópica. As imagens no MFA são formadas através do registro das mudanças de força à medida que a amostra é varrida nas direções x e y (DUFRÊNE, 2004).

A amostra é montada em um scanner piezoelétrico, que assegura a leitura com alta resolução. A força é monitorada através de uma sonda presa a um cantilever. A maioria dos instrumentos utilizados hoje usa um método óptico para mensurar a deflexão do cantilever com alta resolução. Um feixe de raio laser é focado na extremidade livre do cantilever e a posição do feixe refletido é detectada por um fotodiodo (DUFRÊNE, 2003).

Mais recentemente, MFA foi utilizada por pesquisadores para visualizar a arquitetura de superfície de células, incluindo bactérias (CAMESANO *et al.*, 2000; CHADA *et al.*, 2003), leveduras, esporos fúngicos (AHIMOU *et al.*, 2003), e vírus (MALKIN *et al.*, 2003). Biofilmes também têm sido visualizados, fornecendo dados complementares àqueles obtidos com técnicas convencionais de microscopia (KOLARI *et al.*, 2002).

Devido à possibilidade de trabalhar em meio aquoso, tem se levantado a possibilidade de utilizar MFA para observar os processos dinâmicos envolvidos no metabolismo dos biofilmes em tempo real (DUFRÊNE, 2004).

2-Objetivos

2.1-Objetivo Geral

- Investigar a atividade antimicrobiana de substâncias utilizadas no tratamento endodôntico e do óleo essencial de *L. sidoides* a 0.5% frente a biofilmes de *E. faecalis* manipulados a partir de uma cepa de origem clínica e uma de coleção de cultura (ATCC).

2.2-Objetivos Específicos

- Avaliar a prevalência de *E. faecalis* em pacientes com infecções endodônticas crônicas recidivantes e determinar o perfil de sensibilidade a antimicrobianos
- Manipular e analisar cronologicamente biofilmes de *E. faecalis*
- Determinar atividade antimicrobiana dos cimentos endodônticos Endofill[®] e Epiphany[®], hipoclorito de sódio a 2.5% e óleo essencial de *L. sidoides* a 0.5% frente a biofilmes de uma cepa clínica e uma ATCC de *E. faecalis*
- Comparar a susceptibilidade da cepa de origem clínica e ATCC frente aos desafios antimicrobianos testados

3-Materiais e métodos

3.1-Local e período de desenvolvimento da pesquisa

A parte experimental do trabalho foi realizada no Laboratório de Anaeróbios do Setor de Microbiologia do Departamento de Patologia e Medicina Legal da Universidade Federal do Ceará-UFC, e Laboratório de Mecânica Atômica (LMA-UFC). Os procedimentos de coleta foram realizados na Clínica Integrada da Faculdade de Odontologia da Universidade de Fortaleza -UNIFOR, no período de fevereiro a agosto de 2005. Foi realizado estágio no Laboratório de Endodontia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba (FOP-UNICAMP) para aprendizado de técnica de manipulação de biofilmes bacterianos em junho de 2005.

3.2-Seleção de pacientes

3.2.1-População

Procedimentos clínicos e coleta de material foram realizados em 37 (trinta e sete) elementos dentais de 37 (trinta e sete) pacientes triados a partir do banco de dados da Faculdade de Odontologia da Universidade de Fortaleza - UNIFOR. Para seleção dos pacientes foram levados em consideração os seguintes critérios de inclusão: normosistêmicos, com idade entre 18 e 65 anos, com perfil de necessidade de retratamento endodôntico de qualquer elemento dental, estando esse ou não associado à lesão periapical radiograficamente evidente; pacientes que não tivessem sido submetidos à terapia antimicrobiana em um período de três meses antes da coleta, que estivessem devidamente cadastrados no projeto e que tivessem concordado e assinado o termo de consentimento livre e esclarecido (ANEXO I).

Os pacientes que foram selecionados através de seu perfil, mas que durante a anamnese foi detectada a presença de doenças sistêmicas ou congênitas ou faziam uso crônico de medicamentos foram excluídos do estudo. Foram também excluídos da pesquisa aqueles pacientes nos quais a realização da completa desobturação do conduto radicular foi impossibilitada e os que se recusaram a assinar o termo de consentimento informado.

3.2.2-Entrada do voluntário no estudo

-Anamnese: Os pacientes que se enquadraram nos critérios citados anteriormente foram submetidos ao preenchimento de ficha de anamnese (ANEXO II) onde foram obtidas informações concernentes ao seu estado geral de saúde atual e progresso.

-Termo de consentimento livre e esclarecido: todos os pacientes selecionados foram esclarecidos quanto à pesquisa e assinaram termo de consentimento livre e esclarecido (ANEXO I). Os voluntários receberam tratamento para todas as suas necessidades odontológicas.

-Exame dentário: Foi realizado acurado exame dentário com preenchimento de ficha clínica odontológica (ANEXO III), observando-se aspectos de toda a cavidade bucal e do elemento dental do qual se realizou a coleta de material clínico, considerando-se sua história atual e progressão de patologia endodôntica. Após realização da coleta, foi dada continuidade ao retratamento endodôntico em cada um dos pacientes.

-Comitê de ética em pesquisa: A presente pesquisa obteve aprovação no COETICA -Comitê de Ética em Pesquisa (UNIFOR), registro 06-019 (ANEXO IV).

3.3-Coleta do espécime clínico

3.3.1-Examinador

Os procedimentos clínicos e coleta de material foram realizados pelo mesmo operador de forma a evitar qualquer tipo de variação que pudesse vir a afetar os resultados finais.

3.3.2-Coleta do material

A coleta do material foi realizada de acordo com a técnica preconizada por LOPES e SIQUEIRA JUNIOR (1999), com algumas modificações no que diz respeito à anti-sepsia do lençol de borracha e parte externa da coroa dental, que no presente trabalho foi realizada com solução de clorexidina a 2% ao invés de álcool a 70%, como na metodologia original.

Inicialmente procedeu-se a remoção de restaurações, coroas ou outros artifícios protéticos, pinos intracanal, núcleos metálicos fundidos e tecido cariado, se existentes. Em seguida realizou-se o isolamento absoluto, desinfecção do lençol de borracha e superfície externa da coroa dental com solução de clorexidina a 2%. A remoção do material obturador foi executada com brocas Gattes-Gliden (Dentsply) em ordem crescente de numeração (2, 3, 4 e 5) de acordo com o diâmetro do canal. Não foi utilizado nenhum tipo de solvente. Irrigação com soro fisiológico (Brasmédica) foi realizada para remoção de restos de material obturador e foi preenchido com soro o conduto do qual foi feita coleta. No caso de dentes multiradiculares, coletou-se material do conduto de maior diâmetro e cuja remoção do material obturador tivesse sido realizada em toda sua extensão. Para captar os microrganismos em suspensão no soro, foram utilizados cones de papel absorvente (Tanari) introduzidos no canal e transferidos para tubos tipo

“ependorf” contendo 2 ml de BHI (Brain Heart Infusion-Difco) para transporte. Foi utilizada a quantidade de cones de papel necessária para secar completamente o canal.

3.4-Identificação bacteriana

3.4.1.Processamento das amostras

Os procedimentos foram realizados de acordo com técnica preconizada por Koneman e colaboradores (2001). Os tubos tipo “ependorf” contendo material clínico foram levados ao laboratório em um prazo de 4 a 8 horas após a coleta. Após incubação por 24-48 horas em estufa a 35°C em aerobiose, foi realizada bacterioscopia do meio de cultura líquido inoculado com os cones.

Em seguida, a amostra foi semeada em BHI ágar (Difco) contendo 5% de sangue desfibrinado de carneiro (BHIA+S) e ágar CLED (Difco) e as placas incubadas por 24-48h a 35°C em atmosfera convencional. Após este período foi realizada bacterioscopia e caracterização morfológica das colônias. As que apresentaram características morfotintórias sugestivas de enterococos foram identificadas através de provas bioquímicas.

3.4.2-Provas bioquímicas

Foram realizadas para identificação das cepas ao nível de gênero e espécie *E. faecalis* as seguintes provas bioquímicas: catalase, crescimento em caldo hipercloretado, hidrólise da esculina, produção de gás, produção de pigmento, fermentação dos açúcares arabinose, sorbitol e manitol, hidrólise da arginina e tolerância ao Telurito (FACKLAM e COLLINS, 1989; MURRAY, 2003, p.98). A descrição das provas bioquímicas encontra-se no ANEXO VI.

3.5-Teste de sensibilidade a antimicrobianos

Para todas as cepas de *faecalis* isoladas foi realizado teste de sensibilidade a antimicrobianos (TSA) através da técnica de difusão do disco no ágar (NCCLS, 2004). Os antimicrobianos utilizados foram: Penicilina G, Linezolida, Vancomicina, Cloranfenicol, Eritromicina, Tetraciclina, Rifampicina, Imipenem, Ciprofloxacina, Teicoplanina, Nitrofurantoína, Quinupristim-dalfopristim (Discos CECON). Foi realizado ainda teste para verificação da produção de β -lactamase (PROBAC) (NCCLS, 2004).

Após a realização dos procedimentos de coleta, identificação e teste de sensibilidade, as cepas isoladas foram estocadas em freezer a uma temperatura em torno de -80°C.

3.6-Experimento de difusão em ágar dos cimentos endodônticos e soluções de óleo essencial de *Lippia sidoides* a 1% e 10% para a cepa ATCC e Isolado 12

Foram perfurados orifícios de 5 mm de diâmetro e 4 mm de altura em Mueller-Hinton ágar em placas de 80 mm. Realizou-se ajuste do inóculo bacteriano para a escala 0.5 MacFarland, e, em seguida com um swab semeou-se a suspensão sobre o meio de cultura. Os dois cimentos endodônticos recém manipulados (Endofill[®] e Epiphany[®]) foram testados e especificamente para o Epiphany[®], testou-se em separado as duas pastas componentes. Duas cepas foram utilizadas para os testes de difusão: uma padrão (American Type Culture Collection-ATCC) e outra cepa de origem clínica selecionada a partir das amostras coletadas de canais radiculares (Isolado 12) (GOMES, *et al.*, 2004).

Soluções de *L. sidoides* nas concentrações de 10% e 1% foram testadas. A preparação do inóculo seguiu a mesma seqüência utilizada para os cimentos; discos de papel absorvente de 5 mm de diâmetro foram embebidos em 5 µl de cada solução testada e dispostos sobre o meio de cultura sólido semeado. Como controle positivo utilizou-se discos de vancomicina para antibiograma. Discos de papel absorvente com 5 mm de diâmetro foram embebidos em DMSO (Dimetil sulfoxido) e usados como controle negativo (NCCLS, 2004).

Realizou-se a mensuração dos halos de inibição formados após 24 horas de incubação das placas em atmosfera convencional a 35°C.

3.7-Estudo cronológico do desenvolvimento de biofilmes monomicrobianos de *Enterococcus faecalis*

3.7.1-Preparação de biofilmes monomicrobianos de *Enterococcus faecalis*

A metodologia empregada para manipulação dos biofilmes foi baseada na técnica preconizada por SPRATT *et al.*, 2001 e ABDULAH *et al.*, 2005. Todas as etapas de manipulação dos biofilmes desde a preparação do inóculo até a inoculação da membrana de nitrocelulose foram realizadas em capela de fluxo laminar.

3.7.2-Preparo do inóculo

Culturas puras de *E. faecalis* (ATCC 29212 / Culti-loops-OXOID) em BHI foram subcultivadas em placas de BHIA+S e incubadas por 24 horas a 35°C em aerobiose.

Após crescimento em meio sólido, colônias isoladas foram suspensas em tubos contendo 5 mL de BHI. Após agitação mecânica em vórtex, a suspensão foi ajustada até atingir a concentração equivalente a 7.0 da escala McFarland.

3.7.3-Formação do biofilme

Biofilmes de espécie única foram formados sobre filtros de membranas de nitrocelulose (Membrana Millipore GV-Durapore-em PVDF, hidrofílica, 0,22 μm de porosidade, 13 mm de diâmetro). As membranas foram posicionadas sobre placas de BHIA + S (figura 4a). Em seguida, 50 μl da suspensão bacteriana foram inoculados sobre cada membrana (figura 4b) de forma a cobrir toda a sua superfície (figura 4c). Para a realização do estudo cronológico as placas foram incubadas durante os seguintes intervalos de tempo: 24, 36, 72, 192 (8 dias) e 360 (15 dias) horas em aerobiose a 35°C (figura 4d). Os biofilmes que foram incubados por 8 (figura 4e) e 15 dias foram transferidos a cada 3 dias para placas contendo novo BHIA + S.

3.7.4-Processamento de imagens no microscópio de força atômica

Para realizar imagens no microscópio de força atômica, amostras de membrana de nitrocelulose (MNC), membrana de nitrocelulose em contato com BHIA + S (MNC-BHIA+S) e membranas de nitrocelulose inoculadas e incubadas por 24, 36, 72, 192 (8 dias) e 360 (15 dias) horas foram deixadas no ambiente por 5 minutos para secagem, cortadas aleatoriamente cuidadosamente para evitar destruição do biofilme e colocadas em discos de aço cobertos com fita adesiva dupla face. A superfície das amostras foi varrida com um Microscópio de Força atômica (MFA) Nanoscope IIIa Multimode (Digital Instruments, Santa Barbara, CA, U.S.A.) em modo tapping com um scan de 0.400 Hz, frequência de ressonância de ca. 200 to 380 kHz, com cantilevers de silicone cristalino (Digital Instruments) com uma constante de spring de aproximadamente 40 N/m, e ponta radius de 15 nm.

Foram realizadas varreduras de 30 x 30 μm e 10 x 10 μm . Os controles de varredura foram apropriadamente ajustados (força de contato adequada e elevados ganhos) para evitar artefatos provocados pela sonda durante a varredura. Para as visualizações em duas e três dimensões dos dados de altura (imagem), foi utilizado o software Nanoscope versão 5.12 r3 da Digital Instruments.

3.7.5-Gráficos de seção

Foi utilizado o software Nanoscope para construir gráficos de seção das imagens de altura bidimensionais. No gráfico de seção, um “corte” por meio de uma linha reta pode ser realizado sobre qualquer parte da imagem e o perfil de altura ao longo deste “corte” pode ser visualizado (Digital Instruments, 2001). O limite de altura da imagem foi ajustado para 550 nm e as seções foram feitas na região central da imagem, paralelo ao eixo horizontal (eixo x).

3.7.6-Analise da rugosidade

Foi utilizado o software Nanoscope para calcular a rugosidade da superfície para as imagens de altura na varreduras de 30 x 30 µm e 10 x 10 µm. As imagens foram suavizadas para a análise. Trinta regiões por amostra foram aleatoriamente escolhidas para a determinação do valor médio da rugosidade média quadrática (RMS). RMS é o desvio padrão dos valores de altura (Z), em relação ao plano central de referência, em uma dada região, conforme a seguinte relação.

$$\text{RMS} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (Z_i - Z_{\text{ave}})^2}{N}},$$

onde Z_{ave} é o valor médio de Z dentro de uma dada área, Z_i é o valor pontual de Z e N é o número de pontos dentro de uma dada área.

3.8-Avaliação da inibição de biofilmes monomicrobianos de *Enterococcus faecalis* frente a desafios antimicrobianos

3.8.1-Cepas bacterianas

Foram utilizadas para a formação de biofilmes monomicrobianos duas cepas de *Enterococcus faecalis*, uma padrão (ATCC 29212) e outra obtida de espécime clínico, selecionada através do perfil de sensibilidade a antimicrobianos traçado para 37 cepas isoladas de pacientes com necessidade de retratamento endodôntico. O isolado 12 (de origem clínica) foi selecionado por apresentar perfil de multiresistência (PAUL *et al.*, 1997) (Penicilina, Linezolida, Eritromicina, Rifampicina, Tetraciclina e Quinupristin-dalfopristin).

3.8.2-Substâncias testadas

-Cimento endodôntico à base de óxido de zinco e eugenol (Endofill[®]): Cimento endodôntico a base de Óxido de Zinco e Eugenol (Endofill[®]-DENTSPLY,Maillefer).

-Cimento endodôntico Epiphany[®]: Epiphany[®] (Petron Clinical Technologies, Wallingford CT) é um cimento endodôntico resinoso foto e quimicamente ativado que contém hidróxido de cálcio em sua composição.

-Hipoclorito de sódio: Foi utilizado na concentração de 2,5% (Evidence-Farmácia de Manipulação).

-Óleo essencial da *Lippia sidoides* (OELS): Foi utilizado na concentração de 0,5% manipulado a partir do óleo a 100% diluído em DMSO. A composição química do óleo essencial

(ANEXO VII) foi determinada no Centro de Desenvolvimento tecnológica (PADETEC-UFC) por cromatografia gasosa através de espectroscopia de massa (GC-MS) usando aparelho Hewlett-Packard 5971 GC/MS sob as seguintes condições: coluna de capilaridade (30 m x 0.25 mm) de polimetilsiloxano DB-1 fundido à sílica com espessura de filme de 0.10 µm; foi utilizado gás Hélio como carreador (1 ml/min), a temperatura de injeção foi de 250°C enquanto a temperatura do detector foi de 200°C. A temperatura da coluna variou de 35 °C à 180°C/min, à 4°C V/min, e então de 180 à 280°C, a 20°C V/min; espectros de massa foram obtidos através de impacto eletrônico de 70 eV. A identificação dos constituintes foi realizada através de busca em biblioteca virtual, com índices de retenção e interpretação visual do espectro de massa (NCCLS, 2003) (ANEXO VII).

3.8.3-Amadurecimento do biofilme

Os biofilmes foram manipulados de acordo com a técnica descrita para estudo cronológico (SPRATT *et al.*, 2001; ABDULAH *et al.*,2005) e submetidos aos desafios antimicrobianos após um período de 8 dias (192 horas) de incubação a 35°C em aerobiose.

3.8.4-Desafios antimicrobianos

Após o período de incubação, as membranas contendo os biofilmes foram retiradas assepticamente das placas de BHIA + S e transferidas cuidadosamente, evitando destruição da estrutura do biofilme, para dentro de tubos contendo 5 mL de Mueller-Hinton (Merck KgaA) caldo, no caso dos testes com os cimentos endodônticos, ou ainda para a mesma quantidade de hipoclorito de sódio a 2,5% ou óleo essencial de *L. sidoides* a 0,5%.

Durante todas as etapas, foi realizada bacterioscopia para certificação da pureza das colônias crescidas.

-Biofilme versus cimentos endodônticos

Inicialmente preparou-se os corpos de prova de cada cimento manipulados de acordo com as instruções dos fabricantes e vazados em orifícios de 5 mm de diâmetro e 4 mm de altura em placas de Petri de 80 mm contendo 80 ml de ágar bacteriológico. As placas contendo os cimentos recém manipulados foram colocadas em estufa a 35°C por 30 minutos. Após esse período de tempo as membranas contendo os biofilmes foram transferidas para dentro de tubos contendo 5 mL de Mueller-Hinton caldo juntamente com o corpo de prova por 24 horas em aerobiose 35°C (KURZYNSKI *et al.*, 1976). Para controle realizou-se a imersão de biofilme de *E. faecalis* em 5 ml de Mueller-Hinton caldo, sem a presença de corpo de prova, pelo mesmo período de tempo.

A neutralização da ação dos cimentos endodônticos foi realizada após o tempo de incubação. O corpo de prova foi removido do tubo e 5 ml de D/E caldo neutralizador (Acumedia) foram adicionados; o tubo foi deixado à temperatura ambiente por 30 minutos. D/E ágar foi utilizado como meio sólido para realização da contagem bacteriana (DEY e ENGLELY, 1983). O mesmo protocolo foi utilizado para o biofilme imerso em Mueller-Hinton sem o corpo de prova (controle). Este protocolo foi utilizado para evitar ação residual dos cimentos e foi selecionado de acordo com os componentes da substância em teste.

Para verificação da viabilidade bacteriana realizou-se agitação do tubo em vórtex por 60 segundos para o desprendimento bacteriano da membrana de nitrocelulose. Após esse procedimento, uma alíquota de 100 µl foi transferida para um tubo tipo “ependorf” contendo 900 µl de solução salina. Diluições em série de 10^{-1} a 10^{-12} foram realizadas e alíquotas de 10 µL foram plaqueadas em triplicata em D/E ágar. A contagem de unidades formadoras de colônias foi feita após 24 horas de incubação a 35°C em aerobiose.

-Biofilme versus óleo essencial de *L. sidoides* a 0,5%

Inicialmente realizou-se verificação da concentração inibitória mínima (CIM) da solução de *L. sidoides* em relação à cepa ATCC do *E. faecalis*. Uma microplaca com 12 colunas e 8 linhas foi utilizada para o cálculo da CIM; a primeira coluna foi utilizada para os controles. O primeiro poço foi preenchido com 100 µl de BHI caldo utilizado como controle para verificar se houve contaminação do meio, o segundo desta mesma coluna foi preenchido com 100 µl de BHI e 100 µl de solução do óleo essencial a 0,5%, e o terceiro preenchido com 100 µl de BHI e 100 µl de cefalexina 50 mg; estes últimos foram utilizados para controle de turbidez. Um quarto poço foi preenchido com 100 µl de BHI e 5 µl de suspensão bacteriana ajustada para 0.5 da escala MacFarland para controle do crescimento bacteriano. A segunda e a terceira coluna foram utilizadas para realizar as diluições com o óleo essencial e a cefalexina respectivamente. O primeiro poço da segunda coluna foi preenchido com 100 µl de BHI + 100 µl de solução do OELS a 0.5% + 5 µl de suspensão bacteriana ajustada para 0.5 da escala MacFarland, e o primeiro poço da terceira coluna preenchido com 100 µl de BHI + 100 µl de cefalexina 50 mg + 5 µl de suspensão bacteriana ajustada para 0.5 da escala MacFarland. A diluição foi realizada retirando-se 100 µl do primeiro poço de cada coluna passando para o segundo e assim respectivamente até o oitavo poço de cada coluna. A microplaca foi incubada por 24 horas a 35°C em condições convencionais de atmosfera. Foi realizada leitura visual da presença de sedimento, o que caracterizava a não inibição do crescimento bacteriano.

Para o experimento frente ao biofilme crescido por 8 dias foi preparado 5 ml de solução de óleo essencial de *L. sidoides* a 0,5% adicionando-se 25 µl de óleo essencial à 100% a 4,975 µl de DMSO, resultando assim em uma solução com concentração de 0,5%. Em seqüência realizou-se a imersão do biofilme na solução por 10 minutos. Para controle realizou-se a imersão de biofilme de *E. faecalis* em 5 ml de solução salina pelo mesmo período de tempo.

A neutralização da ação do óleo essencial foi feita após o período de contato adicionando-se ao tubo 5 ml de D/E caldo neutralizador; os tubos foram deixados à temperatura ambiente por 30 minutos. D/E ágar foi utilizado como meio sólido para realização da contagem bacteriana (DEY e ENGLELY, 1983). O mesmo protocolo foi utilizado para o controle imerso em salina. O procedimento de verificação da viabilidade bacteriana foi realizado da mesma forma como para os testes dos cimentos endodônticos.

-Biofilme versus hipoclorito de sódio a 2,5%

A solução de hipoclorito de sódio (NaOCl) foi manipulada a 2,5% e mantida protegida da luz e do calor.

A imersão do biofilme no NaOCl a 2,5% foi realizada nas mesmas condições que para o óleo essencial, incluindo o controle imerso em solução salina. Após o período de contato, adicionou-se 5ml de tiosulfato de sódio aos tubos, deixando-os a temperatura ambiente por 30 minutos. O D/E ágar foi utilizado como meio sólido para realização da contagem bacteriana (DEY e ENGLELY, 1983).

O procedimento de verificação da viabilidade bacteriana foi realizado como nos experimentos anteriormente descritos.

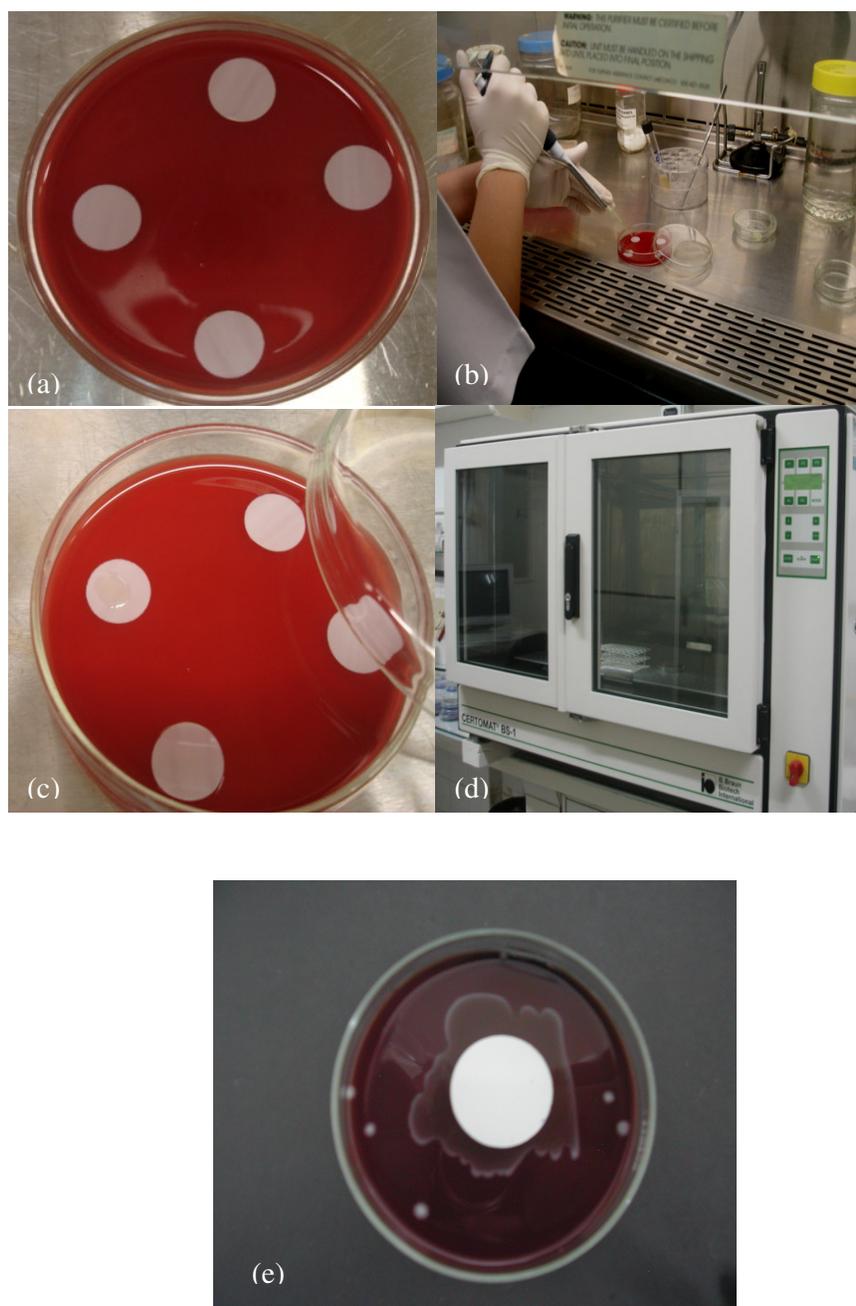


FIGURA 4: a -Membranas de nitrocelulose 13 mm de diâmetro dispostas sobre BHIA+S; b- Inoculação das membranas com pipeta automática em câmara de fluxo laminar; c-Membranas inoculadas com *E.faecalis* em suspensão; d-Incubação em estufa a 35°C; e-Visualização do crescimento de 8 dias (192 horas) do biofilme de *E. faecalis*.

3.9-Análise estatística

A análise estatística das medidas de rugosidade no estudo cronológico dos biofilmes foi baseada em estatística descritiva (tendência central e dispersão), teste de Shapiro-Wilk (para determinar se uma amostra aleatória segue ou não uma distribuição

normal) e teste de hipótese (para verificar a existência ou não de diferenças significativas entre grupos amostrais). O nível de significância usado foi de 5%. Todo o tratamento estatístico referente às mensurações realizadas em Microscópio de Força Atômica foi realizado usando os softwares Excel 2002 e Origin 7.0.

Os resultados dos testes de susceptibilidade foram demonstrados através de gráficos e tabelas. A diferença entre médias de replicatas foi verificada através da aplicação do teste One-way ANOVA com Bonferroni post-test executados com o auxílio do programa GraphPad Prism® versão 4.00 para Windows, Software GraphPad®, San Diego California USA. Para esses testes foram considerados estatisticamente significativos valores de $p < 0.001$.

4-Resultados

4.1-Prevalência e perfil de sensibilidade antimicrobiana de *Enterococcus faecalis* isolados de canais radiculares com necessidade de retratamento

Foi realizada coleta de material clínico proveniente do canal radicular de 37 pacientes submetidos à retratamento endodôntico. Após processamento das amostras 14 *E. faecalis* foram isoladas, perfazendo uma prevalência de 37,8%.

Testes de sensibilidade a antimicrobianos foram realizados em todas as cepas isoladas. Os percentuais de resistência aos antibióticos testados estão dispostos na tabela 1.

TABELA 1: Percentual e número de cepas resistentes aos antimicrobianos testados.

ANTIMICROBIANOS	Resistência (%/n)
Eritromicina	21,4(3)
Rifampicina	14,28(2)
Penicilina G	7,14(1)
Ciprofloxacina	7,14(1)
Linezolida	7,14(1)
Tetraciclina	35,7(5)
Quinupristim.Dalfopristim	42,85(6)
Nitrofurantoína	0(0)
Vancomicina	0(0)
Cloranfenicol	0(0)
Imipenem	0(0)
Teicoplanina	0(0)

Todas as cepas isoladas nesse estudo foram susceptíveis ao Cloranfenicol, Nitrofurantoína, Teicoplanina, Imipenem e Vancomicina. Apenas um isolado foi resistente à Linezolida. Resultado similar foi encontrado para a Penicilina G e para a Ciprofloxacina. Nenhuma das cepas produziu β -lactamase, nem mesmo a cepa que apresentou resistência à Penicilina G.

Dentre os isolados seis apresentaram resistência à associação Quinupristim-dalfopristim. Quando foi avaliada a sensibilidade das cepas à Eritromicina 3 das 14 cepas foram resistentes a esse antimicrobiano. Observando-se os resultados relativos à Rifampicina

e à Tetraciclina verificou-se que 2 e 5 dos isolados apresentaram resistência aos respectivos antibióticos.

A cepa isolada do paciente com prontuário de numero 12 apresentou um perfil de multi-resistencia (PAUL *et al.*, 1997), não sendo sensível à Quinupristin-dalfopristin, Linezolida, Penicilina G, Rifampicina, Eritromicina e à Tetraciclina.

4.2-Experimento de difusão em ágar dos cimentos endodônticos e soluções de óleo essencial de *Lippia sidoides* a 1% e 10% para a cepa ATCC e isolado 12

Para o cimento Endofill[®] não houve formação de halo de inibição, tanto para a cepa ATCC quanto para o Isolado 12. O cimento Epiphany[®] formou um halo de inibição de 20 mm para as duas cepas, e testando as duas pastas componentes em separado frente à cepa ATCC, encontrou-se um halo de 34 mm para a pasta branca e de 18 mm para a pasta rosa.

Um halo de 15 mm foi encontrado para a cepa de coleção de cultura (ATCC) quando uma solução do OELS a 10% foi testada; para solução a 1% houve formação de um halo de 7 mm. Para o isolado 12, halos de 12 mm e 10 mm foram formados para as concentrações testadas, respectivamente. DMSO foi usado como controle negativo, para o qual não houve formação de halo em nenhum experimento e discos de vancomicina como controle positivo com a formação de halo de 24 mm para a cepa ATCC e 22 mm para o isolado 12.

4.3-Estudo cronológico do desenvolvimento de biofilmes de *Enterococcus faecalis*

Biofilmes da cepa ATCC foram manipulados e incubados por 24, 36, 72, 192 (8 dias) e 360 (15 dias) horas. Leituras em MFA foram realizadas e imagens de cada filme biológico foram registradas.

Imagens da membrana de nitrocelulose (MNC) (Figura 5) e da membrana após contato direto com BHIA+S (figura6) , meio de cultura sobre o qual os biofilmes foram gerados, foram utilizadas como controle para verificação das características superficiais e de rugosidade (figuras 5 e 6).

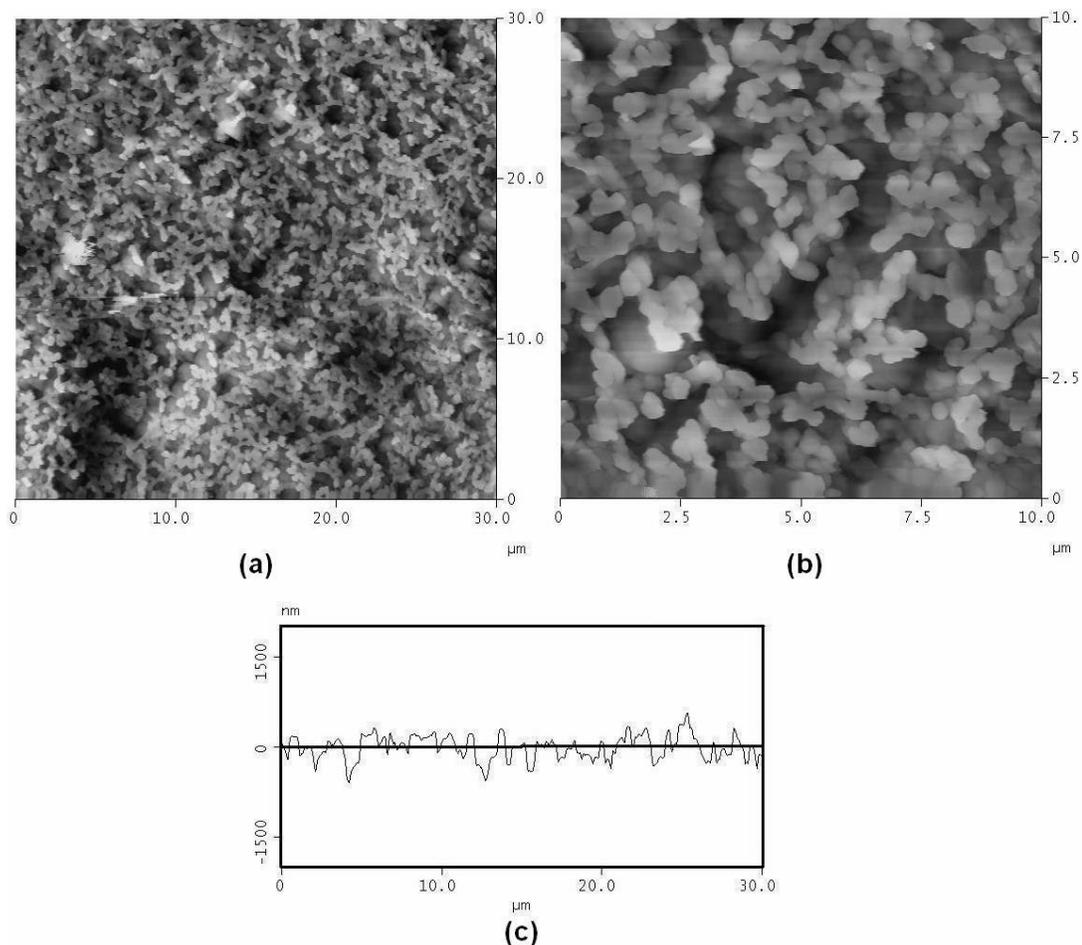


FIGURA 5. Imagens de MFA da amostra MNC. Varredura de 30 x 30 μm (a) e 10 x 10 μm (b). O gráfico de secção (c) mostra um corte transversal de 30 μm na membrana. Escala de altura: 1408 nm (a), 1324 nm (b) e 1500 nm (c).

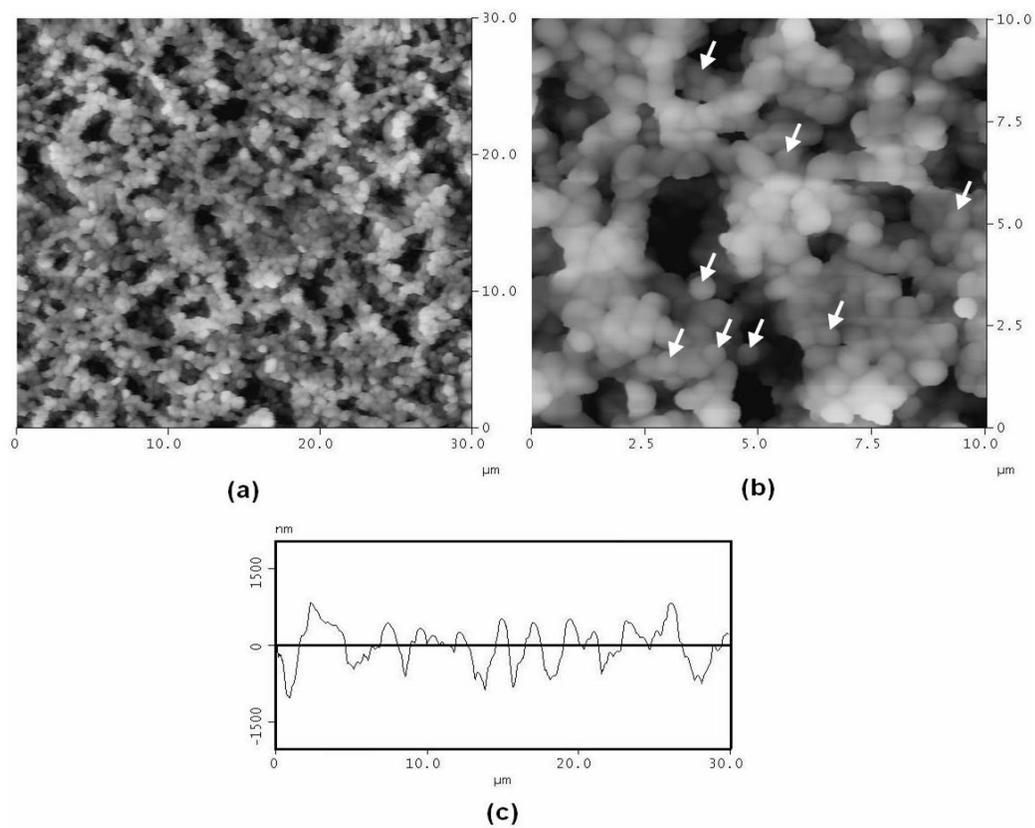


FIGURA 6. Imagens de MFA da amostra MNC-BHIA+S. Varredura de 30 x 30 μm (a) e 10 x 10 μm (b). As setas (b) indicam estruturas globulares oriundas do meio de cultura. O gráfico de secção (c) mostra alteração na topografia da membrana devido à presença do BHIA+S. Escala de altura: 1687 nm (a), 1457 nm (b) e 1500 nm (c).

Após 24 horas de crescimento bacteriano (M24), várias células de *E. faecalis* cobriam a superfície da membrana (figura 7a). Células bacterianas em vários estágios de desenvolvimento (asteriscos na figura. 7b) e com a presença de septo transversal (setas na figura 7b), característica de divisão celular.

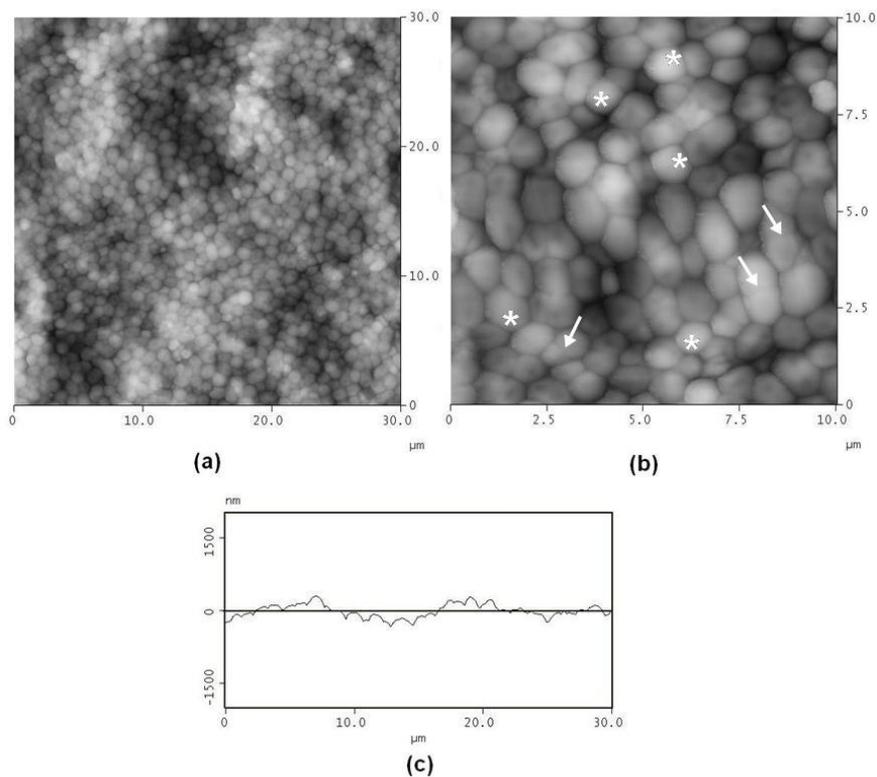


FIGURA 7. Imagens de MFA da amostra M24. Varredura de 30 x 30 μm (a) e 10 x 10 μm (b). Os asteriscos (b) indicam células bacterianas, enquanto as setas apontam septos transversais. O gráfico de secção (c) mostra alteração da topografia da membrana devido à presença de células bacterianas. Escala de altura: 837.7 nm (a), 510.9 nm (b) e 1500 nm (c).

Com 36 horas de crescimento (M36), as imagens da membrana inoculada foram parcialmente obscurecidas (figura 8a e 8b) pela presença de PEC uniformemente distribuído. Depressões associadas com a formação de microcolônias (círculo na figura 8a) foram também observadas. Houve uma redução na rugosidade superficial do biofilme comparado com aquele incubado por 24 horas (figura 8c).

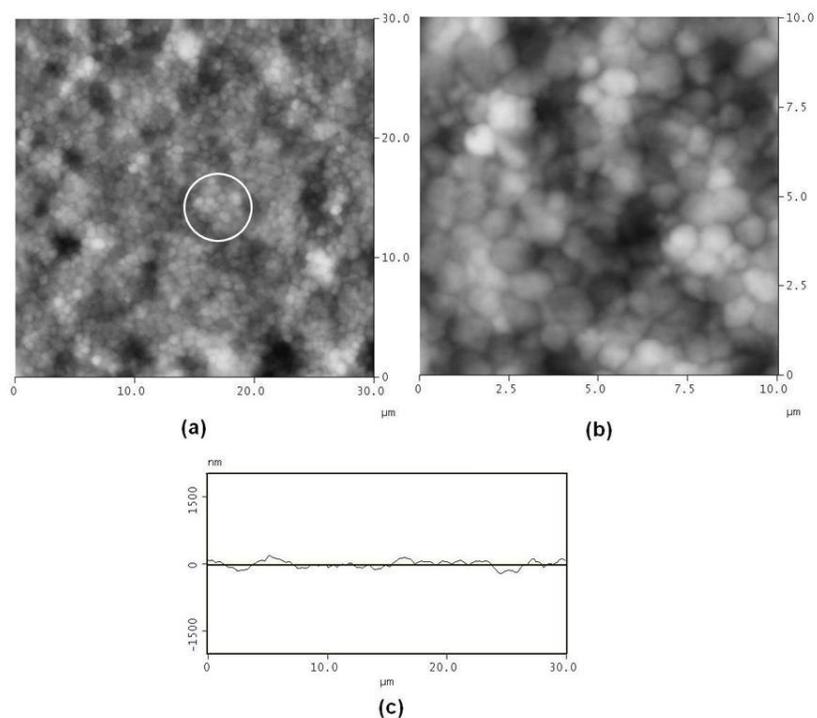


FIGURA 8. Imagens de MFA da amostra M36. Varredura de 30 x 30 μm (a) e 10 x 10 μm (b). Um círculo (a) indica a presença de microcolônia. O gráfico de secção (c) mostra uma redução clara da rugosidade superficial. Escala de altura: 900.2 nm (a), 461.9 nm (b) e 1500 nm.

Foi observada com 72 horas (M72) de crescimento uma imagem referente à presença de PEC cobrindo as células desde estágios anteriores de maturação (< 72 horas) (figura 9a). Poucas células bacterianas foram visualizadas na superfície. A presença de canais de água (setas na figura 9b) e espaços intersticiais (sinal de soma (+) na figura 9b) são claros e evidentes como parte da estrutura do biofilme.

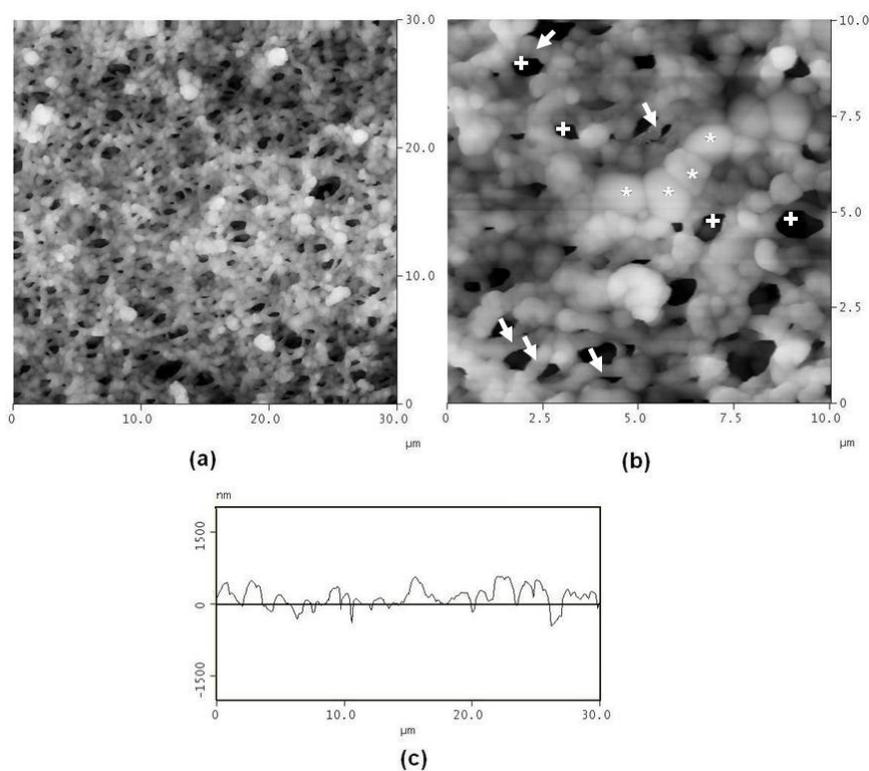


FIGURA 9. Imagens de MFA da amostra M72. Varredura de 30 x 30 μm (a) e 10 x 10 μm (b). Os asteriscos, setas e sinais de soma (+) (b) indicam células bacterianas jovens, canais e espaços intersticiais no conteúdo de PEC, respectivamente. O gráfico de secção (c) indica esse perfil de superfície. Escala de altura: 2585 nm (a), 1416 nm (b) e 1500 nm (c).

Com 8 dias de crescimento (M8d), ilhas de agregados bacterianos (microcolônias) e depressões são observadas na superfície. Várias células podem ser vistas sobre o conteúdo de PEC, que apresenta regiões mais visíveis (setas na figura 10a). O aspecto de “bolas de algodão” das células bacterianas representa a grande quantidade de material extracelular depositada na sua superfície (figura 10b). O gráfico de secção (figura 10c) mostra poucas diferenças daquele com 72 horas de crescimento.

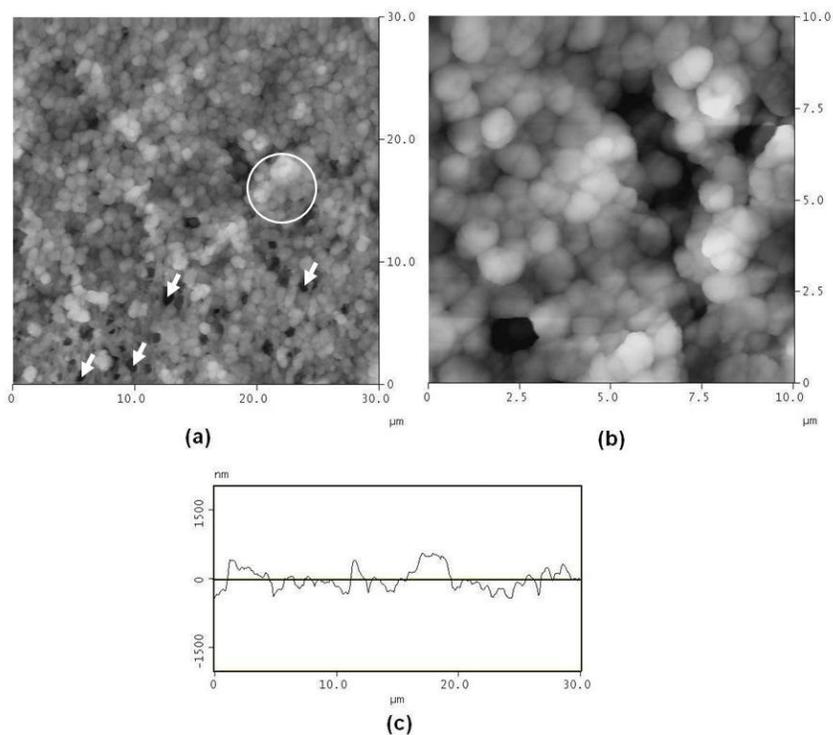


FIGURA 10. Imagens de MFA da amostra M8d. Varredura de 30 x 30 μm (a) e 10 x 10 μm (b). O círculo (a) indica a presença de uma das ilhas de microcolônias presentes na superfície e as setas, a presença de alguns espaços intersticiais no PEC. O perfil de superfície é mostrado no gráfico de secção (c). Escala de altura: 2268 nm (a), 1234.3 nm (b) e 1500 (c).

Quando o biofilme foi incubado por 15 dias (M15d), uma estrutura altamente complexa formou-se sobre a superfície (figura 11a). Células bacterianas não puderam ser distinguidas, pois se apresentaram cobertas por uma grande quantidade de PEC. Uma superfície com projeções do conteúdo extracelular pode ser observada (figura 11b), tornando difícil a obtenção de dados de altura.

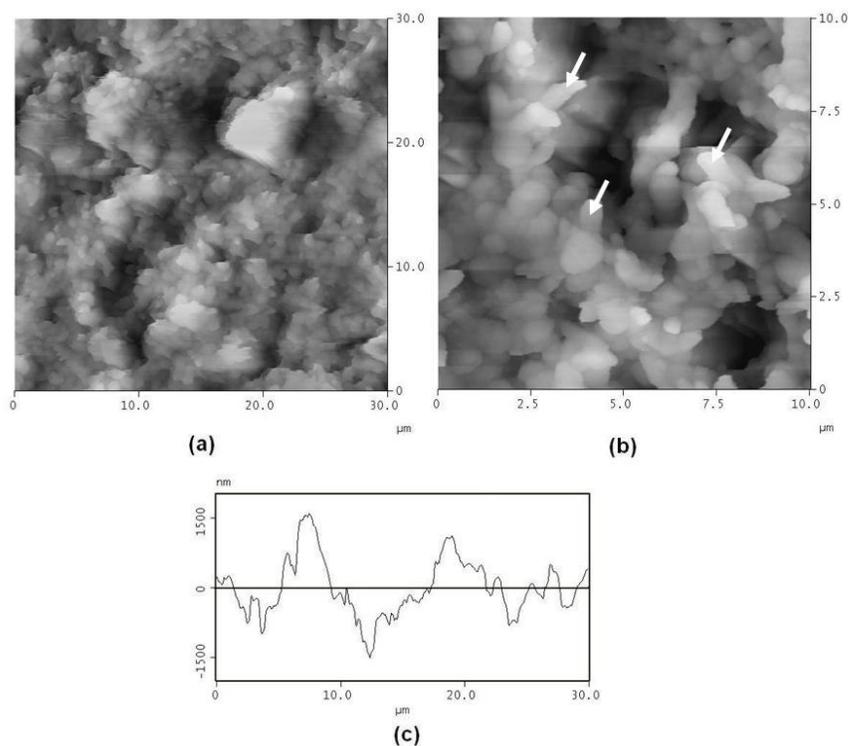


FIGURA 11. Imagens de MFA da amostra M15d. Varredura de 30 x 30 μm (a) e 10 x 10 μm (b). As setas (b) indicam a presença de projeções na superfície. O gráfico de secção (c) mostra um aumento significativo da irregularidade superficial. Escala de altura: 5159.6 nm (a), 2732.8 nm (b) e 1500 nm.

Os valores médios e desvios padrão (σ) da R_a para cada intervalo de crescimento estão apresentados na tabela 2. A aplicação do teste Shapiro Wilk resultou em distribuição normal para todos os grupos experimentais. O teste ANOVA (Turkey pad hoc) foi usado para verificar a significância das diferenças entre médias. Houve diferença estatisticamente significativa entre as médias de todos os grupos exceto entre MNC e M72.

TABELA 2. Média e desvio padrão (σ) da rugosidade superficial (R_a) para MNC, MNC-BHIA+S, e M24-15d. Varredura de 30 x 30 μm e escala de altura de 2000 nm.

	MNC	MNC-BHIA+S	M24	M36	M72	M8d	M15d
Média R_a (nm)	188.77	254.68	88.23	76.28	186.57	166.83	541.14
σ	4.24	6.57	5.63	9.99	10.38	10.41	35.6

A figura 12 mostra o gráfico de barra dos valores médios de R_a dos grupos MNC-BHIA+S e M24-M15d. Dessa forma, as mensurações de rugosidade foram usadas para caracterizar os vários estágios envolvidos no estabelecimento e estruturação dos biofilmes:

- 24 horas – Pouco ou nenhum PEC. Os limites celulares e septos são distinguíveis (rugosidade é determinada pela posição bacteriana na superfície). Fase de adesão (figura 12 b);
- 36 horas – Biofilme jovem consolidado. Células bacterianas estão parcialmente obscurecidas (pouca redução da rugosidade devido à formação de PEC) (figura 12 c);
- 72 horas – Conteúdo de PEC, com poucas bactérias na superfície (aumento na rugosidade causado pela grande quantidade de espaços intersticiais por todo o conteúdo) (figura 12 d);
- 8 dias – Estabelecimento de microcolônias bacterianas sobre o PEC. Células com aspecto de “bola de algodão” aparecem em consequência da deposição de PEC sobre sua superfície (a rugosidade diminuiu devido à cobertura dos espaços intersticiais pelo PEC) (figura 12 e);

- 15 dias – Biofilme rico em PEC, formando projeções. Nesse caso é impossível distinguir células bacterianas (aumento expressivo da rugosidade). Biofilme completamente desenvolvido (figura 12 f).

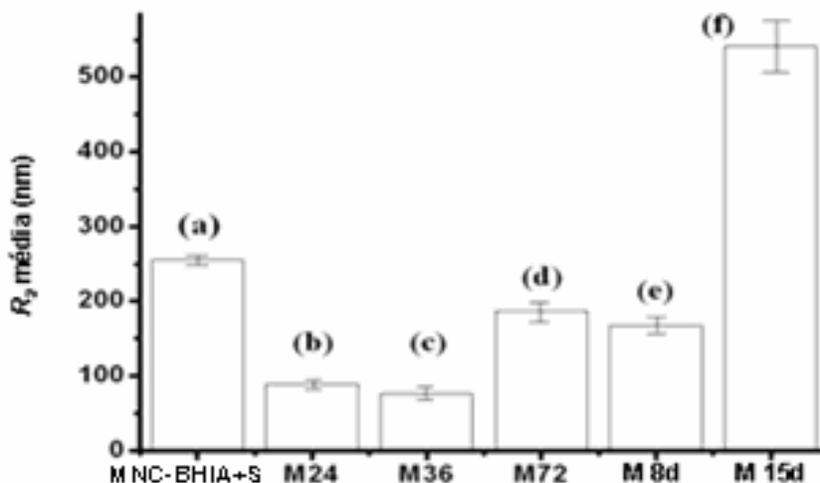


FIGURA 12. Média da rugosidade R_a da superfície das amostras MNC-BHIA+S e M24-M15d. As mensurações de rugosidade distinguiram as diferentes alterações na topografia superficial da membrana de nitrocelulose: adesão de estruturas globulares do BHIA+S (a); adesão bacteriana (b); formação de PEC (c); aumento no conteúdo de PEC (d); crescimento bacteriano sobre o PEC (e); biofilme desenvolvido (f).

4.4-Avaliação da inibição de biofilmes de *Enterococcus faecalis* frente a desafios antimicrobianos

4.4.1-Inibição dos biofilmes de *E. faecalis* frente aos cimentos endodônticos

Quando os biofilmes das duas cepas, de coleção de cultura (ATCC) e de origem clínica (isolado 12), foram submetidos aos cimentos testados, foi verificado que o número de UFC diminuiu comparado com o controle ($p < 0.001$) (Figura 13).

Através da avaliação dos dois cimentos testados frente à cepa ATCC observou-se que não houve diferença estatisticamente significativa ($p > 0.05$), ou seja, para esta cepa o Epiphany® apresentou ação semelhante ao Endofill® (Figura 13).

Verificando-se a susceptibilidade do isolado 12, essa comparação também revelou a não existência de diferença significativa ($p < 0.05$) entre os dois materiais levando-se em consideração um intervalo de confiança de 99.99% (figura 13).

Nos experimentos de susceptibilidade dos biofilmes aos cimentos foi demonstrada a existência de diferença de susceptibilidade entre as duas cepas usadas para gerar os biofilmes ($p < 0.001$). A cepa de origem clínica (Isolado 12) apresentou-se menos susceptível aos dois cimentos testados quando comparada à cepa padrão (figura 13).

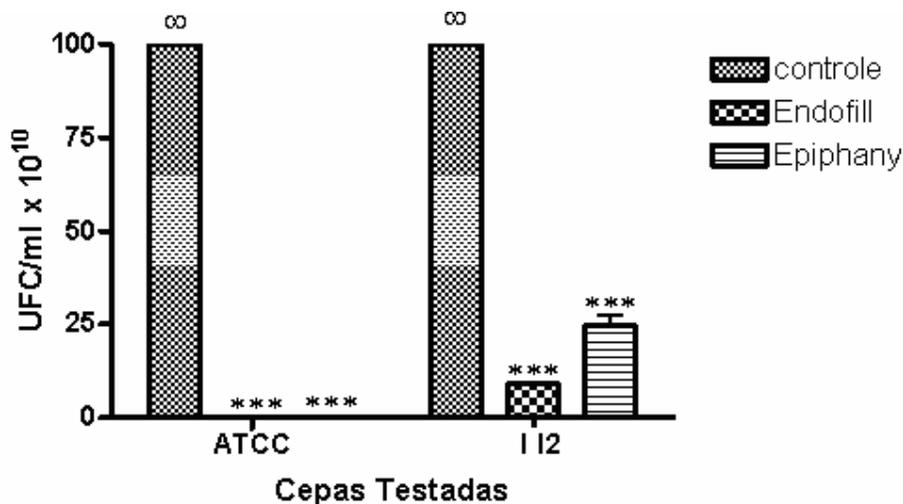


FIGURA 13: Susceptibilidade de biofilmes de duas cepas de *E. faecalis*, ATCC e isolado 12 (I12), incubados por 8 dias submetidos aos cimentos endodônticos Endofill® e Epiphany® por 24 horas.

∞-Quantidade de UFC incontável

***-Grande poder de significância estatística

4.4.2-Inibição dos biofilmes de *Enterococcus faecalis* frente à solução de *Lippia sidoides* a 0,5% e hipoclorito de sódio a 2,5%

Biofilmes da cepa ATCC e Isolado 12 crescidos por 8 dias foram submetidos à ação da solução de *L. sidoides* a 0.5% e o NaOCl 2.5% por 10 minutos utilizando-se como controle a solução salina. O NaOCl a 2.5% eliminou completamente as bactérias presentes no biofilme no intervalo de tempo utilizado. O OELS reduziu significativamente o número de bactérias quando comparado ao controle ($p < 0.001$). Estes resultados foram encontrados para as duas cepas.

Não houve diferença estatisticamente significativa na contagem de UFC para os biofilmes da cepa ATCC quando submetidos à solução de OELS a 0.5% e hipoclorito de sódio a 2.5% ($p > 0.05$). Resultado semelhante foi encontrado para o isolado 12 ($p > 0.05$).

Ao contrário do que foi encontrado para os testes realizados com os cimentos endodônticos, quando os biofilmes das cepas ATCC e isolado 12 foram submetidos às

soluções testadas não houve diferença de susceptibilidade entre as duas cepas ($p>0.05$). (figura 14)

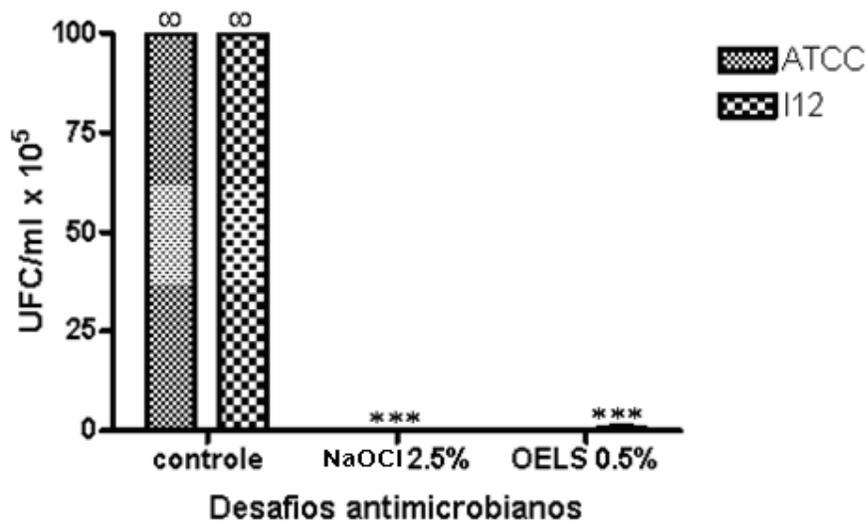


FIGURA 14: Susceptibilidade de biofilmes de duas cepas de *E. faecalis*, ATCC e isolado 12 (I12), incubados por 8 dias submetidos ao NaOCl a 2.5% e a solução de óleo essencial de *Lippia sidoides* a 0.5% por 10 minutos.

∞-Quantidade de UFC incontável

***-Grande poder de significância estatística

5-Discussão

5.1-Prevalência e perfil de sensibilidade antimicrobiana de *Enterococcus faecalis* isolados de canais radiculares com necessidade de retratamento

Stuart e colaboradores (2006) revisaram a prevalência do *E. faecalis* em canais radiculares obturados levando em consideração o número de elementos dentais onde houve crescimento bacteriano e o método utilizado para detecção de microrganismos em pesquisas realizadas de 1964 a 2004. O percentual observado no presente estudo (37,8%) encontra-se em concordância com os achados relativos aos estudos que utilizaram técnicas de cultura como método de detecção dos microrganismos a partir de material coletado do canal radicular de dentes submetidos a retratamento.

Foi realizado teste de sensibilidade antimicrobiana das cepas isoladas para reconhecimento do perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos corriqueiramente utilizados na clínica odontológica e àqueles empregados na clínica médica.

A Penicilina G, um antibiótico do grupo dos β -lactâmicos, tem sido considerada primeira escolha para tratamento de infecções odontogênicas. No presente estudo verificou-se que 1 isolado apresentou resistência a esse antimicrobiano apesar de tal resistência já ter sido reportada anteriormente em cepas de *E. faecalis* isoladas de canais radiculares (DAHLÉN *et al.*, 2000). Com base nesse resultado conclui-se que a Penicilina G ainda pode ser usada como opção quando da necessidade de uso de antimicrobiano sistêmico durante tratamento de patologias endodônticas secundárias. Mas deve-se levar em consideração o limitado número de cepas investigadas.

Pinheiro *et al.* (2003a) verificaram a presença de 2 cepas de *E. faecalis* resistentes à Eritromicina dentre 11 avaliadas perfazendo um percentual de 18,18%, semelhante ao percentual de 21,4% encontrado no presente estudo. A maior relevância da presença de cepas com esse perfil de sensibilidade está relacionada ao uso desse antimicrobiano como escolha na terapia de infecções odontogênicas para pacientes alérgicos à penicilina.

Recentemente bastante atenção tem sido dada às cepas de *Enterococcus* multi-resistentes. Essa multi-resistência pode também incluir a vancomicina, o que pode gerar problemas devido à falta de alternativas de tratamento. Mesmo com todas as cepas de *E. faecalis* examinadas nesse estudo sendo susceptíveis à vancomicina, estudos anteriores registraram a relação entre a presença de genes de resistência e sua expressão em cepas de *E. faecalis* com características de multi-resistência (POETA *et al.*, 2006).

No presente estudo o Isolado 12 mostrou resistência a 6 dos 12 antibióticos testados, sendo estes de classes diferentes com diferentes mecanismos de ação. Microrganismos com perfil de sensibilidade como o encontrado para o Isolado 12 são

possivelmente selecionados pela ação de substâncias químicas auxiliares do preparo químico mecânico e outros tipos de materiais como o hidróxido de cálcio e cimentos endodônticos.

Devido aos resultados de resistência encontrados para o Isolado 12, esta cepa foi testada frente a substâncias utilizadas na clínica endodôntica, como o hipoclorito de sódio e os cimentos Endofill® e Epiphany®, e ainda frente a um óleo essencial com ação antimicrobiana comprovada (BOTELHO *et al.*, *in press*) para verificação da possibilidade de uma maior resistência a essas substâncias quando comparada com uma cepa oriunda de coleção de cultura, que não sofreu pressões seletiva *in vivo*.

Nenhum isolado apresentou-se resistente ao Cloranfenicol, Nitrofurantoína, Teicoplanina, Imipenem. Em estudo realizado por Maschieto e colaboradores (2004) em cepas hospitalares de *E. faecalis*, foi encontrado um alto percentual de resistência ao Cloranfenicol, o que contribuiu, além dos possíveis efeitos colaterais, para a restrição de seu uso em ambiente hospitalar.

Apesar de na literatura haver registro da ineficiência da associação Quinupristim-dalfopristim frente ao *E. faecalis*, no presente estudo tal característica foi encontrada em 6 das 14 cepas. A resistência a essa droga é atribuída a uma bomba de efluxo relacionada à espécie (D'AZEVEDO, 2004). Nossos resultados demonstram que essa característica pode não estar presente em todas as cepas, mas que o emprego dessa associação na clínica deve ser cuidadoso haja vista o alto percentual de resistência encontrado (42,85%) para isolados do canal radicular.

A Ciprofloxacina é um antimicrobiano bastante empregado no tratamento de infecções do trato urinário, infecções estas que podem envolver organismos do gênero *Enterococcus*. Apenas 1 cepa apresentou-se resistente a esse antimicrobiano.

A Tetraciclina há algumas décadas atrás foi bastante empregada para tratar quadros infecciosos relacionados à cavidade bucal. Isso se reflete no alto percentual (35,7%) de cepas resistentes a essa droga, demonstrando uma possível seleção de microrganismos capazes de sobreviver à terapia com esse medicamento.

O diagnóstico microbiológico das cepas isoladas de canais radiculares, através da realização de testes de susceptibilidade antimicrobiana, tem relevância principalmente quando existe o risco de complicações sistêmicas, pois prioritariamente medidas locais devem ser empregadas para debelar infecções associadas ao sistema de canais radiculares.

5.2-Experimento de difusão em ágar dos cimentos endodônticos e soluções de óleo essencial de *Lippia sidoides* a 1% e 10% para a cepa ATCC e isolado 12

A atividade antimicrobiana dos cimentos Endofill® e Epiphany® e das soluções do óleo essencial de *L. sidoides* a 10% e 1% foi testada frente à cepa ATCC e ao Isolado 12 crescidos de forma planctônica através de teste de difusão em ágar anteriormente aos experimentos com biofilmes.

Estudos objetivando a verificação da atividade antimicrobiana de materiais utilizados em odontologia vêm sendo realizados há muitas décadas. Na Endodontia, testes com soluções irrigantes, medicações intracanal e cimentos endodônticos já foram realizados utilizando-se vários métodos, mas a técnica de difusão em ágar parece ser bastante difundida (GOMES *et al.*, 2004).

A análise da atividade antimicrobiana de cimentos endodônticos frente ao *E. faecalis* fornece informações sobre a efetividade desses cimentos em prevenir a reinfecção bacteriana no sistema de canais radiculares. As falhas em Endodontia são parcialmente devido a espaços no canal que não foram obturados adequadamente. Quando existe comunicação entre os ambientes externo e interno ou quando bactérias residuais remanescem devido a um preparo inadequado, a atividade antimicrobiana dos vários componentes dos cimentos endodônticos tem um importante papel no sucesso do tratamento (MICKEL *et al.*, 2003).

Na presente pesquisa verificou-se a ação anti-bacteriana do cimento Epiphany®, e ainda evidenciou-se uma maior ação dos componentes presentes na pasta branca desse cimento. Não foi verificada a formação de halo de inibição nos testes realizados para o Endofill® frente às duas cepas testadas. Da mesma forma, Gomes e colaboradores (2004) também não encontraram zona de inibição testando o cimento Endofill® frente ao *E. faecalis*. Experimentos de difusão em ágar podem não refletir a real atividade antimicrobiana de algumas substâncias, pois pode não estar ligada apenas à toxicidade do material à bactéria, mas também a sua difusibilidade no meio de cultura sólido fato que depende diretamente do tamanho de suas moléculas.

Baseado nos experimentos de difusão para as soluções de *L. sidoides* a 10% e 1% foram feitos experimentos de microdiluição e foi verificado que a menor concentração da solução capaz de inibir o crescimento bacteriano da cepa ATCC foi de 0,0078%. Deve-se ressaltar que tal concentração está relacionada com a inibição de microrganismos vivendo de forma planctônica. Desta forma, para os experimentos com biofilmes utilizou-se uma concentração de 0,5%, maior que a CIM, para que fosse utilizada frente a um inóculo bacteriano arranjado em um biofilme.

5.3-Estudo cronológico do desenvolvimento de biofilmes de *Enterococcus faecalis*

Características dos biofilmes com 24 horas de incubação como aspecto uniforme das células bacterianas (devido à presença superficial dos peptidoglicanos das bactérias Gram-positivas), a distinção clara dos limites celulares e a presença de septo transversal em algumas bactérias são evidências da reduzida quantidade de PEC sobre a superfície. Esse achado é provavelmente uma consequência da formação de biofilme em seu estágio inicial, a fase de adesão.

Os estágios iniciais da formação dos biofilmes compreendem eventos de interação entre as células de vida livre e a superfície, tais eventos de adesão inicial desencadeiam a expressão de genes com papel importante na continuidade da formação do filme levando à sua maturação. Muitas estruturas especializadas e interações complexas estão envolvidas no reconhecimento de superfícies e conseqüente formação dos biofilmes de células procariontes (DUNNE JUNIOR, 2002).

A fase de maturação provavelmente corresponde às imagens vistas com uma incubação de 36 horas do biofilme, por apresentar microcolônias com a produção de PEC. A redução na rugosidade superficial (comparado ao biofilme com 24 horas de crescimento) demonstrada no gráfico de secção (figura 9c) é indicativa da presença de um biofilme jovem e da pequena influência das irregularidades da superfície do biofilme.

De acordo com Davey e O'Toole (2000), com o tempo microcolônias desenvolvem-se em um biofilme maduro que está frequentemente associado com a produção de PEC. Em *Pseudomonas aeruginosa*, a transcrição de *algC*, um gene chave na biosíntese de alginato, é induzida logo após a adesão da bactéria à superfície. Recentemente foi demonstrado que a baixa regulação (downregulation) da síntese de flagelo está relacionada com aumento na produção (upregulation) de alginato, mostrando a sinalização da passagem do estágio de adesão para o de maturação do biofilme (GARRETT *et al.*, 1999).

Nos filmes com 72 horas de crescimento a superfície não obscurecida e os contornos bem definidos das poucas bactérias presentes indicam uma baixa quantidade (ou ausência) de PEC sobre sua parede celular (peptidoglicano). Isso é uma característica de células jovens provavelmente originadas daquelas abaixo do conteúdo extracelular depositado previamente, como em camadas. O Aumento da irregularidade superficial do filme com 72 horas de incubação comparada ao com 36 horas é consequência da maior complexidade da estrutura e a presença de espaços intersticiais presentes no conteúdo de PEC. Dessa forma, dentro dos limites experimentais desse estudo, verificou-se que a partir de 72 de crescimento pode-se considerar o biofilme maduro e desenvolvido.

Pôde-se observar no biofilme incubado por 8 dias, assim como no de 72 horas a

arquitetura do biofilme provavelmente formado por camadas de PEC e células entremeadas, umas mais profundamente localizadas (com aspecto de “bolas de algodão”) e outras mais superficiais indicando o início de uma nova fase no desenvolvimento: o desprendimento de células que irão colonizar outras superfícies distantes do filme do qual se originou.

Analisando-se as membranas inoculadas incubadas por 15 dias, verificou-se que as irregularidades superficiais aumentaram substancialmente quando comparadas com as estruturas formadas com 8 dias de incubação, como pôde ser visto no gráfico de secção (figura 10c). Nesse momento o biofilme além de estar completamente desenvolvido, já produziu uma quantidade abundante de PEC.

Através da mensuração dos valores de rugosidade verificou-se o aumento de 65.91 nm no valor médio de MNC a MNC-BHIA+S. Esse achado é decorrente da presença de glóbulos no meio de cultura (BHIA+S). Com a presença de uma camada de células sobre a membrana após 24 horas de crescimento houve uma redução de 165.77 nm da MNC-BHIA+S para M24; já a redução de 11.95 nm da M24 para M36, pode ser atribuída à formação de PEC. A presença de canais no PEC levou ao aumento de 110.92 nm da M36 para a M72.

Devido à presença de crescimento bacteriano sobre o PEC houve uma redução de 19.74 nm da M72 para M8d. E, finalmente, verificou-se um aumento de 374.31 nm da M8d para M15d devido ao desenvolvimento completo do biofilme, com presença de projeções de PEC.

A igualdade estatística entre as médias para MNC e M72 não é relevante, desde que representam estados qualitativamente diferentes (com e sem bactérias). As alterações aconteceram sobre a membrana de nitrocelulose com BHIA+S e as modificações comparadas com sua topografia é que são consideradas importantes.

5.4-Avaliação da inibição de biofilmes de *Enterococcus faecalis* frente a desafios antimicrobianos

Biofilmes com 8 dias de crescimento foram utilizados na realização dos desafios antimicrobianos por representarem uma comunidade bacteriana de *E. faecalis* madura e desenvolvida, o que ocorre a partir de 72 horas de incubação, sendo que quando crescidos por 8 dias a quantidade de PEC é maior, como ficou demonstrado através das medidas de rugosidade. Essa característica tem importância, pois a estrutura do PEC pode também ser responsável pela resistência dessas bactérias à morte pela ação antimicrobiana.

5.4.1-Inibição dos biofilmes de *Enterococcus faecalis* frente aos cimentos endodônticos

Muitas técnicas para verificar a susceptibilidade bacteriana a substâncias com ação antimicrobiana têm sido empregadas; estudos *in vitro* que utilizam biofilmes gerados sobre

membranas de nitrocelulose, apesar de não simularem completamente a realidade *in vivo*, conseguem fornecer biofilmes maduros através de uma técnica de fácil execução e manejo além de possibilitar a realização de testes com inúmeras soluções e materiais com capacidade de difundirem-se.

Vários estudos investigaram a susceptibilidade do *E. faecalis* às medidas de desinfecção do canal, medicações e cimentos endodônticos, embora os mecanismos utilizados por esse organismo não sejam completamente entendidos. (KAMARAN *et al.*, 1990; BYSTRÖM e SUNDQVIST, 1995; SIQUEIRA JUNIOR e UZEDA, 1996; SIQUEIRA JUNIOR *et al.*, 1997; FUSS *et al.*, 1997; SIQUEIRA JUNIOR *et al.*, 1998; HELING e CHANDLER, 1998; BUCK *et al.*, 2001; GOMES *et al.*, 2001; RADCLIFFE *et al.*, 2004).

Um mecanismo que algumas bactérias podem desenvolver para sobreviver aos desafios ambientais e antimicrobianos é organizarem-se em comunidades funcionais metabolicamente heterogêneas e interdependentes (ABDULLAH *et al.*, 2005).

Essas comunidades bacterianas funcionam como importante estratégia de sobrevivência em ambientes naturais, aonde condições nutricionais adversas vêm a estimular alguns microrganismos a alterar sua fisiologia (CALDWELL e LAWRENCE, 1986; COSTERTON *et al.*, 1987). Por exemplo, o cultivo de *Pseudomonas aeruginosa* sob condições de depleção de magnésio resultará em aumento na resistência desse microorganismo à polimixina B, EDTA e Aminoglicosídeos (ANWAR, *et al.*, 1992).

O *E. faecalis* parece ser altamente resistente aos medicamentos usados durante o tratamento endodôntico, e sabe-se que pode apresentar a capacidade de resistir ao efeito antibacteriano de curativos com hidróxido de cálcio (BYSTROM *et al.*, 1985a).

Vários estudos observando a atividade antimicrobiana de cimentos endodônticos frente a células planctônicas de alguns microrganismos tais como *E. faecalis* (MICKEL *et al.*, 2003; PIZZO *et al.*, 2006) têm relatado atividade de cimentos à base de óxido de zinco e eugenol através da ação do eugenol, substância bactericida que age provavelmente através da coagulação de proteínas. Quando é misturado com o óxido de zinco, ocorre uma reação química formando-se o eugenolato de zinco. Ao ser exposto ao meio aquoso, como a saliva ou fluido dentinário, ocorre hidrólise resultando em eugenol e hidróxido de zinco. O eugenol então pode difundir-se pelas irregularidades anatômicas do sistema de canais e ter ação sobre possíveis bactérias remanescentes (MICKEL *et al.*, 2003).

Baseado nos testes de difusão em ágar para os cimentos endodônticos e o OELS testes com biofilmes das duas cepas foram feitos para verificar se esse padrão de maior resistência do Isolado 12 também se apresentava quando essas bactérias estruturavam-se em comunidade.

No presente estudo, ao analisar-se a atividade antimicrobiana dos cimentos Endofill[®] e Epiphany[®], foi verificado que não houve diferença estatisticamente significativa na ação dos dois cimentos frente à cepa ATCC ($p > 0.05$) e Isolado 12 ($p < 0.05$).

Os cimentos à base de óxido de zinco e eugenol já foram testados anteriormente frente ao *E. faecalis* e verificou-se que apresentam melhor atividade antimicrobiana quando comparado aos cimentos resinosos como Sealer 26[®] (MICKEL *et al.*, 2003). Nossos resultados mostraram que a ação do cimento Epiphany[®] foi semelhante à do Endofill[®], o que pode ser atribuído à atividade bactericida de amplo espectro das suas moléculas de Bis-fenóis. Embora o Epiphany[®] possua em sua composição o hidróxido de cálcio, estudos constataram sua baixa ou ausente efetividade frente ao *E. faecalis* (BYSTROM e SUNDQVIST, 1985b). Os resultados encontrados em nossos experimentos contradizem o que já foi demonstrado em outros estudos com respeito a pouca ou ausente atividade antimicrobiana dos cimentos resinosos outras marcas que não o Epiphany[®] (PIZZO *et al.*, 2006;).

No que diz respeito à diferença de susceptibilidade antimicrobiana entre as duas cepas testadas vários estudos relatam que quando bactérias se deparam com situações adversas potencialmente letais, o que pode acontecer quando estas colonizam algum órgão ou região do corpo humano, tanto pela ação do sistema imunológico quanto por antimicrobianos, uma resposta ao estresse é montada desta forma permitindo que o microorganismo suporte tais desafios e sobreviva (PARSSEL e LINDQUIST, 1993; WELCH, 1993). Quando respostas às condições de estresse são induzidas, esse estado confere uma proteção geral frente a uma série de outras condições de estresse, por exemplo, uma resposta induzida por depleção nutricional fornece proteção contra estresses de temperatura. (LOUPER-JAN *et al.*, 1992). O *E. faecalis* demonstrou sintetizar uma variedade de proteínas de estresse quando exposto a condições ambientais adversas, (HARTKE *et al.*, 1998) incluindo altas concentrações de sais biliares (FLAHAUT *et al.*, 1996a), ácido, calor (FLAHAUT *et al.*, 1996b) depleção de glicose (GIARD *et al.*, 1996) e hipoclorito de sódio (LAPLACE *et al.*, 1997)

Se condições nutricionais adversas ou exposição a alguns medicamentos intracanal ou irrigantes induzem o *E. faecalis* a exibir um estado de resposta a condições de estresse, esse estado poderia conferir a esse microrganismo uma proteção cruzada quando submetido a outros agentes com atividade antimicrobiana.

5.4.2-Inibição dos biofilmes de *Enterococcus faecalis* frente à solução de *Lippia sidoides* a 0,5% e hipoclorito de sódio a 2,5%

Muitos diferentes extratos de plantas têm sido avaliados ao longo dos anos devido a seus efeitos antimicrobianos frente a patógenos orais (DIDRY *et al.*, 1998; PAI *et al.*, 2004, YATSUDA *et al.*, 2005). Recentemente um estudo em modelo animal indicou que um colutório a base de *L. sidoides* reduziu a severidade da inflamação gengival, placa bacteriana e infiltrado inflamatório observado histologicamente em cães (GIRÃO *et al.*, 2003). Outros artigos têm descrito a eficácia clínica do OELS frente ao *S. mutans* ao nível salivar após o uso de colutório (BOTELHO *et al.*, in press).

L. sidoides é uma planta que pode crescer em qualquer lugar da região nordeste do Brasil. Devido ao seu baixo custo, o uso de seu óleo essencial na prevenção e tratamento de condições orais pode beneficiar comunidades urbanas e rurais de baixo poder aquisitivo. Essa formulação pode também ser vantajosa em regiões onde a *L. sidoides* é culturalmente aceita (GIRÃO *et al.*, 2003).

Na presente pesquisa, foi verificado que para ambas as cepas, ATCC e isolado 12, houve uma redução bacteriana significativa ($p < 0.001$) quando os biofilmes foram submetidos à solução do OELS a 0,5% em relação ao controle (solução salina). Foi observado ainda que para as duas cepas não houve diferença estatística entre a ação do NaOCl a 2,5% e a solução de OELS a 0,5% ($p > 0.05$).

O hipoclorito de sódio ao longo dos anos vem sendo indicado como solução irrigante no preparo químico-mecânico de canais radiculares apresentando uma boa ação antimicrobiana frente ao *E. faecalis* na concentração utilizada nesse estudo. No entanto sua alta citotoxicidade, odor, gosto desagradável e possibilidade do desenvolvimento de reações de sensibilidade podem restringir seu uso na clínica odontológica.

Substâncias de origem natural como a *L. sidoides*, vêm sendo testadas para sua possível ação antimicrobiana frente a diferentes patógenos envolvidos em patologias orais como *S. mutans*. A eficácia dessa planta tradicional foi demonstrada através de testes que observaram atividade bactericida e fungicida com o óleo essencial das folhas. Essa atividade foi atribuída a seus constituintes timol e cavacrol. O timol é um potente anti-séptico do grupo fenol e tem uma forte atividade contra bactérias e fungos (BOTELHO *et al.*, in press).

Agentes antimicrobianos fenólicos têm sido usados há muito tempo por suas propriedades anti-sépticas e desinfetantes. Os compostos pertencentes a este grupo químico como é o caso do timol apresentam propriedades de ação sobre membranas, o que contribui para sua atividade frente a microrganismos em geral (McDONELL e RUSSEL, 1999).

Induzem perda progressiva de constituintes intracelulares, incluindo a liberação de k^+ , o primeiro sinal de dano à membrana (LAMBERT e HAMMOND, 1973). De acordo com Pulvertaft e Lumb (1948), podem causar lise de culturas em crescimento de *E. coli*, *Staphylococcus spp* e *Streptococcus spp* sem o envolvimento de enzimas autolíticas.

Houve uma redução no número de células viáveis comparado ao controle quando os biofilmes das duas cepas testadas crescido por 8 dias foram submetidos à solução do OELS a 0,5% por 10 minutos. Analisando numericamente a quantidade de UFC viáveis após a imersão dos biofilmes das duas cepas na solução verificou-es que o crescimento de 570 UFC para a cepa ATCC e 40 UFC para o isolado 12 em uma diluição de 10^{-1} , demonstrando uma menor susceptibilidade do isolado 12 embora essa diferença não seja estatisticamente significativa ($p>0.05$).

É importante ressaltar que a solução de óleo essencial obteve ação semelhante ao hipoclorito de sódio em uma concentração cinco vezes menor.

A possibilidade da utilização de produtos naturais que não apresentam as características não desejáveis presentes no hipoclorito de sódio serve de estímulo para realização de novos estudos para futuro emprego de tal substância como solução química auxiliar ao preparo do sistema de canais.

6-Conclusões

- A prevalência de *E. faecalis* encontrada no presente estudo foi de 37,8%
 - Foram detectadas 6 cepas dentre as isoladas resistentes à associação Quinupristim-dalfopristim
- Quinupristim-dalfopristim
- Não houve formação de halo de inibição quando testouse o cimento Endofill®
 - O Cimento Epiphany® inibiu o crescimento das cepas clínica e ATCC em experimentos de difusão em ágar
- Foi verificado que a pasta branca apresentou um halo de inibição maior que a pasta componente branca do cimento Epiphany®
 - Nas condições experimentais realizadas o biofilme maduro de *E. faecalis* foi verificado a partir de 72 horas de incubação
 - Houve uma redução do número de bactérias em relação ao controle quando os biofilmes de 8 dias foram expostos aos cimentos endodôntico Endofill® e Epiphany® por 24 horas
 - Não houve diferença estatisticamente significativa entre a ação do cimento Endofill® e Epiphany® para as duas cepas testadas
 - O óleo essencial da *L. sidoides* a 0.5% levou a uma redução bacteriana semelhante a encontrada para o hipoclorito de sódio a 2.5% quando em contato por 10 minutos com biofilmes das cepas ATCC e de origem clínica
 - Novos testes devem ser realizados com a solução do óleo essencial da *Lippia sidoides* para verificar seu possível uso como solução irrigante do sistema de canais radiculares
 - Testes de susceptibilidade antimicrobiana devem ser realizados também com cepas clínicas já que estas podem comporta-se de forma diferente da cepa padrão (ATCC) frente a diferentes desafios antimicrobianos

7-Referências Bibliográficas

ABDULLAH, M. *et al.* Susceptibilities of two *Enterococcus faecalis* phenotypes to root canal medications. **Journal of Endodontics**, v. 31, n. 1, p. 30-36, 2005.

ABOU-RASS, M.; PICCININO, M. V. The effectiveness of four irrigation methods on the removal of root canal debris. **Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology and Endodontic**, v. 54, p. 323-328, 1982.

ADAMS, J. L.; MELED, R. J. Impact of detection on *Escherichia coli* biofilms. **Applied Environ. Microbiol.**, v. 65, p. 4285-4287, 1999.

AHIMOU, F.; TOUHAMI, A.; DUFRÊNE, Y. F. Real-time imaging of the surface topography of living yeast cells by atomic force microscopy. **Yeast**, v. 20, p. 25-30, 2003.

ANWAR, H.; STRAP, J. L.; COSTERTON, J. W. Establishment of aging biofilm: possible mechanism of bacterial resistance to antimicrobial therapy. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 36, n. 7, p. 1347-1351, 1992.

BALDASSARI, L. *et al.* Receptor-mediated endocytosis of biofilm-forming *Enterococcus faecalis* by rat peritoneal macrophages. **Indian Journal of Medical Research**, v. 119, p. 131-135, 2004.

BAUMGARTNER, I. C.; CUENIN, P. R. Efficacy of several concentrations of sodium hypochlorite for root canal irrigation. **Journal of Endodontics**, v. 18, p. 605-612, 1992.

BAUMGARTNER, J. C. *et al.* Geographical differences in bacteria detected in endodontic infections using polymerase chain reaction. **Journal of Endodontics**, v. 30, p. 141-144, 2004.

BECKING, A. G. Complications in the use of sodium hypochlorite during endodontic treatment. **Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology and Endodontic**, v. 71, p. 346-348, 1991.

BENATTI, O.; STOLF, W. L.; RUHNKE, L. A. Verification of the consistency, setting time and dimensional changes of root canal filling materials. **Oral Surgery**, v. 46, p. 107-113, 1978.

BOTELHO, M. A. *et al.* Antimicrobial activity of the essential oil from *Lippia sidoides*, carvacrol and thymol against oral pathogens. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, (in press).

BUCK, R. A. *et al.* Effectiveness of three endodontic irrigants at various tubular depths in human dentin. **Journal of Endodontics**, v.27, n. 3, p. 206-208, 2001.

BYSTRÖM, A.; CLAESON, R.; SUNDQVIST, G. The antibacterial effect of camphorated paramonochlorophenol, camphorated phenol and calcium hydroxide in the treatment of infected root canals phenol. **Endodontics and Dental Traumatology**, v. 1, p. 170-175, 1985a.

BYSTRÖM, A.; SUNDQVIST, G. Bacteriological evaluation of the effect of 0.5 percent sodium hypochlorite in endodontic therapy. **Oral Surgery**, v. 55, p. 307-312, 1983.

- BYSTROM, A.; SUNDQVIST, G. The antibacterial action of sodium hypochlorite and edta in 60 cases of endodontic therapy. **International Endodon Journal.**, v. 18, p. 35-40, 1985b.
- BYSTRÖM, A.; SUNDQVIST. The antibacterial action of sodium hypochlorite and EDTA in 60 cases of endodontic therapy. **International Endodontic Journal**, v.18, p. 35-40, 1995.
- CALDWELL, D. E.; LAWRENCE, J. R. Growth kinetics of *Pseudomonas fluorescens* microcolonies within the hydrodinamyc boundary layers of surface microenvironment. **Microbial Ecology.**, v. 12, p. 299-312, 1986.
- CAMESANO, T. A.; NATAN, M.J.; LOGAN, B. E. Observations of changes in bacterial cell morphology using tapping mode atomic force microscopy. **Langmuri.**, v. 16, p. 4563-4572, 2000.
- CARLSSON, J. Bacterial metabolism in dental biofilms. **Advances Dental Research.**, v. 11(1), p. 75-80, 1997.
- CARNIOL, K.; GILMORE, M. Signal transduction, quorum-sensing, and extracellular protease activity in *Enterococcus faecalis* biofilm formation. **Journal of Bacteriology**, v. 186, n. 24, p. 8161-8163, 2004.
- CARPENTIER, B.; CERF, O. Biofilms and their consequences with particular reference to hygiene in the foods industry. **Journal of Applied Bacteriology.**, v. 75, p. 499-511, 1993.
- CARVALHO, A. F. *et al.* Larvicidal activity of the essential oil from *Lippia sidoides* Cham. Against *Aedes aegypti* linn. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, p. 569-571, 2003.
- CERI, H. *et al.* The Calgary biofilm device: new technology for rapid determination of antibiotic susceptibilities of bacterial biofilms. **Journal of Clinical Microbiology.**, v. 37, p. 1771-1776, 1999.
- CHADA, V. G. R. *et al.* Morphogenesis of Bacillus spore surfaces. **Journal of Bacteriology**, v. 185, p. 6255-6261, 2003.
- CHONG, B. S.; PITT FORD, T. R. The role of intracanal medication in root canal treatment. **Internatonal Endodontic Journal.**, v. 25, p. 97-106, 1992.
- COSTA, S. M. O. *et al.* Chemical constituents from *Lippia sidoides* and cytotoxic activity. **Journal of Natural Products.**, v. 64, p. 792-795, 2001.
- COSTERTON, J. W. *et al.* Bacterial biofilms in nature and disease. **Annual Review of Microbiology.**, v. 41, p. 435-464, 1987.
- COSTERTON, J. W. *et al.* Microbial biofilms. **Annual Review of Microbiology**, v. 49, p. 711-745, 1995.
- COSTERTON, J. W. *et al.* The application of biofilm science to study to study and control chronic bacterial infection. **Journal of Clinical Investigations**, v. 112, p. 1466-1477, 2003.
- COSTERTON, J. W.; STEWART, P. S.; GREENBERG, E. P. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. **Science**, v. 284, p. 1318-1322, 1999.

- CRAVEIRO, A. A.; MATOS, F. J. A.; ALENCAR, J. W. A simple and inexpensive steam generator for essential oils extraction. **Journal of Chemical Edition**. v. 53, p. 652, 1976.
- D'AZEVEDO, P. A. *et al.* Sensibilidade aos antimicrobianos entre amostras de *Enterococcus* isolados na cidade de Porto Alegre, RS, Brasil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 35, n. 3, p. 1-11, 2004.
- DAHLÉN, G. *et al.* Identification and antimicrobial susceptibility of Enterococci isolated from the root canal. **Oral Microbiology and Immunology**., v. 15, p. 309-312, 2000.
- DAKIN, H. D. On the use of certain substances in the treatment of infected wounds. **Brazilian Medical Journal**, v. 2, p. 318-320, 1915.
- DAVEY, M. E.; O'TOOLE, G. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 64, n. 4, p. 847-867, 2000.
- DE BEER, D.; STOODLEY, P. Relation between the structure of an aerobic biofilm and mass transport phenomena. **Water Science and Technology**, v. 32, p. 11-18, 1995.
- DE BEER, D.; STOODLEY, P.; LEWANDOWSKY, Z. Effects of biofilm structures on oxygen distribution and mass transport. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 43, p. 1131-1138, 1994.
- DE MELO MALTOS, S. M. *et al.* Bacterial concentrations determine the ability to implant in the root canal system and translocate to lymph nodes in germ-free mice. **Journal of Endodontics**, v. 29, p. 24-27, 2003.
- DENNIS, W.; OLIVIERI, V. P.; KRUSE, C. W. The reaction of nucleotides with aqueous hypochlorous acid. **Walter Res.**, v. 63, p. 915-948, 1979.
- DEY, B. P; ENGLEBY, F. B. Methodology for recovery of chemically treated *Staphylococcus aureus* with neutralizing medium. **Applied and Environment Microbiology**, v. 45, n. 5, p. 1533-1537, 1983.
- DIDRY, N. *et al.* Antimicrobial activity of aerial part of *Drosera peltata* Smith on oral bacteria. **Journal Ethnopharmacology**, v. 60, p. 91-96, 1998.
- Digital Instruments Veeco Metrology Group. Command Reference Manual – Software version 5.12 r3, 2001.
- DISTEL, J. W.; HATTON, J. F.; GILLESPIE, M. J. Biofilm formation in medicated root canals. **Journal of Endodontics**, v. 28, n. 10, p. 689-693, 2002.
- DUFRENE, Y. F. Atomic force microscopy: a powerful tool in microbiology. **Journal of Bacteriology**., v. 184, p. 5205-5213, 2002.
- DUFRENE, Y. F. Recent progress in the application of atomic force microscopy imaging and force spectroscopy to microbiology. **Current Opinion in Microbiology**. , v. 6, p. 317-323, 2003.
- DUFRENE, Y. F. Refining our perception of bacterial surfaces with atomic force microscope. **Journal of Bacteriology**, v. 186, n. 11, p. 3283-3285, 2004.

DUKAN, S.; TOUATI, D. Hypochlorous acid stress in *Escherichia coli*: resistance, DNA damage, and comparison with hydrogen peroxide stress. **Journal of Bacteriology**, v. 178, p. 6145-6150, 1996.

DUNNE JUNIOR, W. M. Bacterial adhesion: see any good biofilm lately? **Clinical Microbiology Reviews**, v. 15, n. 2, p. 155-166, 2002.

ELDER, M. J. *et al.* Biofilm-related infections in ophthalmology. *Eye*, v. 9, p. 102-109, 1995. **International Endodontic Journal**, v. 29, p. 235-241, 1996.

ENGSTRÖM, B. *et al.* Correlation of positive cultures with the prognosis for root canal therapy. **Odontologisk Revy**, v. 15, p. 257-269, 1964a.

ENGSTRÖM, B. The significance of enterococci in root canal treatment. **Odontologisk Revy**, v. 15, p. 87-106, 1964b.

ESTRELA, C. *et al.* Mechanism of action of calcium and hydroxyl ions of calcium hydroxide on tissue and bacteria. **Brazilian Dental Journal**, v. 6, p. 85-90, 1995.

ESTRELA, C. *et al.* Two methods to evaluate the antimicrobial action of calcium hydroxide paste. **Journal of Endodontics**, v. 27, n. 12, p. 720-723, 2001.

ESTRELA, C. *et al.* Testing calcium hydroxide antimicrobial potential by different methods. **Journal of Dental Research**, v. 79, p. 529, 2000.

EVANS, M. *et al.* Mechanisms involved in the resistance of *Enterococcus faecalis* to calcium hydroxide. **International Endodontic Journal**, v. 35, p. 211-218, 2002.

FABRICIUS, L. *et al.* Influence of combinations of oral bacteria on periapical tissues of monkeys. **Scandinavian Journal of Dental Research**, v. 90, p. 200-206, 1982.

FACKLAN, R. R.; COLLINS, M. D. Identification of *Enterococcus* species isolated from human infections by conventional test scheme. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 27, n. 4, p. 731-734, 1989.

FERLLINI FILHO, J. Estudo radiográfico e microscópico das reabsorções radiculares na presença de lesões periapicais crônicas (microscopia ótica e MEV). Bauru, 1999. 186 p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo.

FERNANDES FILHO, E. S.; MORAIS, S. M. Preparação e avaliação clínica do óleo essencial da planta medicinal *Lippia sidoides* Cham (alecrim pimenta). **Revista da Associação Brasileira de Odontologia**, v. 6, p. 323-325, 1998.

FERRAZ, C. C. R. *et al.* *In vitro* assessment of the antimicrobial action and mechanical ability of chlorhexidine gel as an endodontic irrigant. **Journal of Endodontics**, v. 7, p. 452-455, 2001.

FLAHAUT, S. *et al.* Defense against lethal treatments and *de novo* protein synthesis induced by NaCl in *Enterococcus faecalis* ATCC 19433. **Achieves of Microbiology**, v. 165, p. 317-324, 1996^a.

- FLAHAUT, S. *et al.* Relationship between stress response towards bile-salts, acid and heat treatment in *Enterococcus faecalis*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 138, p. 49-54, 1996b.
- FOLEY, D. B. *et al.* Effectiveness of selected irrigants in the elimination of *Bacterioides melaninogenicus* from the root canal system: an *in vitro* study. **Journal of Endodontics**, v. 9, p. 236-41, 1983.
- FOUAD, A. F. *et al.* Molecular detection of *Enterococcus* species in root canals of therapy-resistant endodontic infections. **Oral Surgery Oral Medicine, Oral Pathology Oral Radiology and Endodontic**, v. 99, p. 112-118, 2005.
- FUSS, Z.; WEISS, E. I.; SHALHAV, M. Antibacterial activity of calcium hydroxide-containing endodontic sealers on *Enterococcus faecalis* in vitro. **International Endodontic Journal**, v. 30, p. 397-402, 1997.
- GALVEZ, A. *et al.* Permeation of bacterial cells. Permeation of cytoplasmic and artificial membrane vesicles. And channel formation on lipid bilayers of peptide antibiotic AS-48. **Journal of Bacteriology**, v. 173, p. 886-892, 1991.
- GARRETT, E. S.; PERLEGAS, D.; WOZNIK, D. J. Negative control of flagellum synthesis in *Pseudomonas aeruginosa* is modulated by the alternative sigma-factor AlgT. **Journal of Bacteriology**, v. 181, p. 7401-7404, 1999.
- Gênero *Enterococcus*. Disponível em < <http://www.bacterio.cict.fr/e/enterococcus.html>>. Acesso em 22 de julho. 2006.
- GENTRY-WEEKS, C. R. *et al.* Survival of *Enterococcus faecalis* in mouse peritoneal macrophages. **Infection and Immunity**, v. 67, p. 2160-2165, 1999.
- GIARD, J-C. *et al.* Starvation-induced multi-resistance in *Enterococcus faecalis* JH2-2. **Current Microbiology**, v. 32, p. 264-271, 1996.
- GIRÃO, V. C. *Et al.* A clinical trial of the effect of a mouth-rinse prepared with *L. sidoides* Cham essential oil in dogs with mild gingival disease. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 59, p. 95-102, 2003.
- GIWEREMAN, B. *et al.* Induction of β -lactamase production in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 35, p. 1418-1430, 1991.
- GOMES, B. P. F. A.; DRUCKER, D. B.; LILEY, J. D. Association of endodontic symptoms and signs with particular combinations of specific bacteria. **International Endodontic Journal**, v. 29, p. 69-75, 1996.
- GOMES, B. P. F. A. *et al.* In vitro antimicrobial activity of several concentrations of sodium hypochlorite and chlorhexidine gluconate in the elimination of *Enterococcus faecalis*. **International Endodontic Journal**, v. 34, p. 424-428, 2001.
- GOMES, B. P. F. A. *et al.* In Vitro Evaluation of the Antimicrobial Activity of Five Root Canal Sealers. **Brazilian Dental Journal**, v. 15(1), p. 30-35, 2004.
- GROSSMAN, L. I. Antimicrobial effect of root canal cements. **Journal of Endodontics**, v. 6, p. 594-597, 1980.

- GUTIERREZ, J. H.; BRIZUELA, C.; VILLOTA, E. Human teeth with periapical pathosis after overinstrumentation overfilling of root canals: a scanning electron microscopic study. **International Endodontic Journal**, v. 32, p. 40-48, 1999.
- HAAPASALO, M.; ORSTAVIK, D. In vitro infection and disinfection of dentinal tubules. **Journal of Dental Research**, v. 66, p. 1375-1379, 1987.
- HARDIE, J. M.; WHILEY, R. A. Classification and overview of genera *Streptococcus* and *Enterococcus*. **Journal of Applied Microbiology Symposium Supplement**, v. 83, p. 1-11, 1997.
- HARTKE, A. *et al.* Survival of *Enterococcus faecalis* in an oligotrophic microcosm: changes in morphology, development of general stress resistance and analysis of protein synthesis. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, p. 4238-4245, 1998.
- HAUMAN, C. H. J.; LOVE, R. M. Biocompatibility of dental materials used in contemporary endodontic therapy: a review. Part 1. Intracanal drugs and substances. **International Endodontic Journal**, v. 36, p. 75-85, 2003.
- HELING, J.; CHANDLER, N. P. Antimicrobial effect of irrigant combination within dentinal tubules. **International Endodontic Journal**, v. 31, p. 8-14, 1998.
- HESS, W. Formation of root canal in human teeth. **Journal of the National Dental Association**, v. 3, p. 704-734, 1921.
- HEYDORN, A. *et al.* Quantification of biofilm structures by the novel computer program COMSTAT. **Microbio.**, v. 146, p. 2395-2407, 2000.
- HOLLAND, R. *et al.* Sealing properties of some root-canal filling materials evaluated with radioisotope. **Australian Dental Journal**, v. 19, p. 322-325, 1974.
- HUBBLE, T. S. *et al.* Influence of *Enterococcus faecalis* proteases and the collagen-binding protein, Ace, on adhesion to dentin. **Oral Microbiology and Immunology**, v. 18, p. 121-126, 2003.
- HULSMANN, M.; HAHN, W. Complications during root canal irrigation—literature review and case reports **International Endodontic Journal**, v. 33(3), p. 186-193, 2000.
- HUME, W. R. Analysis of the release and the diffusion through dentin of eugenol from zinc oxide-eugenol mixtures. **Journal of Dental Research**, v. 63, p. 881-884, 1984.
- HUME, W. R. The pharmacologic and toxicological properties of zinc oxide-eugenol. **JADA**, v. 113, p. 789-791, 1998.
- IWU, C. *et al.* The microbiology of periapical granulomas. **Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontics**, v. 69, p. 502-505, 1990.
- JEFFERSON, K. K. What drives bacteria to produce a biofilm. **FEMS Microbiology Letters**, v. 236, p. 163-173, 2004.
- KAMARAN, E. *et al.* Root canal dentine tubule disinfection. **Journal of Endodontics**, v. 16, n. 5, p. 207-210, 1990.

- KAUFMAN, A. Y.; KEILA, S. Hypersensitivity to sodium hypochlorite. **Journal of Endodontics.**, v. 15, p. 224-226, 1989.
- KAUFMAN, B. *et al.* *Enterococcus spp.* In endodontically treated teeth with and without periradicular lesions. **Journal of Endodontics**, v. 31, n. 12, p. 851-856, 2005.
- KOLARI, M. *et al.* Firm but slippery attachment of *Deinococcus geothermalis*. **Journal of Bacteriology.**, v. 184, p. 2473-2480, 2002.
- KONEMAN, E. *et al.* **Diagnóstico Microbiológico: texto e Atlas.** 5ª edição. Rio de Janeiro: Editora Médica e Científica, p.p 226, 2001.
- KOPPANG, H. *et al.* Cellulose fibers from endodontic paper points as an etiological factor in postendodontic periapical granulomas and cysts. **Journal of Endodontics**, v. 15, p. 369-372, 1989.
- KREFT, B. *et al.* Aggregation substance of *Enterococcus faecalis* mediates adhesion to cultured renal tubular cells. **Infection and Immunity**, v. 60, p. 25-30, 1992.
- KURZYNSKI, T. A. *et al.* Aerobically incubated thioglycolate broth disk method for antibiotic susceptibility testing of anaerobes. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 10, p.727-732,1976.
- KUTTLER, Y. **Endodoncia práctica.** 1 ed.. México: Alpha, 1961.
- LA TOURETT PROSSER, B. *et al.* Method of evaluating effects of antibiotics on bacterial biofilm. **Antimicrobial Agents Chemotherapy** ., v. 31, p. 1502-1506, 1987.
- LACOSTE, E. *et al.* Antiseptic properties of essential oil of *L. sidoides* Cham .Application to the cutaneous microflora, **Annales Pharmaceutiques Francaises.**, v. 54, p. 228-230, 1996.
- LAMBERT, P. A.; HAMMOND, S. M. Potassium fluxes. First indications of membrane damage in microorganisms. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 54, p. 796-799, 1973.
- LAPLACE, J-M. *et al.* Sodium hypochlorite stress in *Enterococcus faecalis*: influence of antecedent growth conditions and induced proteins. **Current Microbiology**, v. 34, p. 284-289, 1997.
- LAWRENCE, J.R. *et al.* Optical sectioning of microbial biofilms. **Journal of Bacteriology.**, v. 173, p. 6558-6567, 1991.
- LEE, W. *et al.* Sonicated extract of *Enterococcus faecalis* induces irreversible cell cycle arrest in phytohemagglutinin-activated human lymphocytes. **Journal of Endodontics**, v. 30, p. 209-212, 2004.
- LEMOS, T. L. G. *et al.* Antimicrobial Activity of Essential Oil of Brazilian Plants. **Phytherapeutic Researsh.**, v. 4, p. 82-84, 1990.
- LEONARDO, M. R.; LEAL, J. M. **Endodontia: Tratamento de canais radiculares.** 3 ed. São Paulo: Editora médica Panamericana, 1998.

- LEWIS, K. Riddle of biofilm resistance. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 45, n. 4, p. 999-1007, 2001.
- LEWIS, K. Programmed death in bacteria. **Microbiol Mol Biol Rev.**, v. 64, p. 513-514, 2000.
- LIN, L. M. *et al.* Clinical, radiographic, and histopathological study of endodontic treatment failures. **Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontie**, v. 71, p. 603-611, 1991.
- LIN, Y.; MICKEL, A. CHOGLA, S. Effectiveness of selected materials against *Enterococcus faecalis*: Part 3. The antibacterial effect of calcium hydroxide and chlorexidine on *Enterococcus faecalis*. **Journal of Endodontics.**, v. 29, p. 565-566, 2003.
- LONÇALI, G.; SEN, B. H.; ÇANKAYA, H. Scanning electronic microscopic observations of apical root surfaces of teeth with apical periodontitis. **Endodontics and Dental Traumatology**, v. 12, p. 70-76, 1996.
- LOPES, H. P.; SIQUEIRA JUNIOR, J. F. **Endodontia: Biologia e Técnica**. 1. ed. Rio de Janeiro: Medsi, 1999.
- LOUPER-JAN, A.; GODMAN, A.; KJELLEBERG, S. Bacteria starvated for prolonged periods develop increased protection against lethal temperatures. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 101 p. 229-236, 1992.
- MALKIN, A. J.; MACPERSON, A.; GERSHON, P. B. Structure of intracellular mature vaccinia virus visualized by *in situ* atomic force microscopy. **Journal of Virology.**, v. 77, p. 6332-6340, 2003.
- MARKOWITZ, K. *et al.* Biologic properties of eugenol and oxide-eugenol. **Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontie.**, v. 73, p. 250-254, 1984.
- MASCHIETO, A.; MARTINEZ, R.; PALAZZATO, I. C. V.; DARINI, L. C. Antimicrobial resistance of *Enterococcus sp.* isolated from the intestinal tract of patients from a university hospital in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 99, n. 7, 2004.
- MAYAZAKI, S. *et al.* Cytotoxic effect of hemolytic culture supernatant from *Enterococcus faecalis* on mouse polimorphonuclear neutrophils and macrophages. **Microbiology and Immunology**, v. 37, p. 265-270, 1993.
- McDONELL, G.; RUSSEL, A. D. Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 12, n. 1, p. 147-179, 1999.
- McHUGH, C. P. *et al.* pH required to kill *Enterococcus faecalis* in vitro. **Journal of Endodontics.**, v. 30, p. 18-219, 2004.
- MELKER, K. B. *et al.* Antimicrobial efficacy of medicated root canal filling materials. **Journal of Endodontics**, v. 32, n. 2, p. 148-151, 2006.
- MICKEL, A. K.; NGUYEN, T. H.; CHOGLA, S. Antimicrobial activity of endodontic sealers on *Enterococcus faecalis*. **Journal of Endodontics**, v. 29, n. 4, p. 257-258, 2003.

MOELLERING JUNIOR, R. C. Emergence of *Enterococcus* as a significant pathogen. **Clinical Infectious Disease**, v. 14, p. 1173-1178, 1992.

MOELLERING JUNIOR, R. C.; WEINBERG, A. N. Studies on antibiotic synergism against enterococci II; effect of various antibiotics on uptake of ¹⁴C-labelled streptomycin by enterococci. **Journal of Clinical Investigation**, v. 50, p. 2580-2584, 1971.

MÖLLER A. J. R. Microbiological examination of root canals and periapical tissue in human teeth. **Odontologisk Tidskrift**, v. 74, p. 301-308, 1966.

MORAIS, S. M. *et al.* Óleos essenciais de plantas brasileiras: estudo químico, atividade bactericida e possível utilização em cimentos dentários. **Revista Brasileira de Farmacologia**, v. 77, p. 42-44, 1996.

MUNDY, L. M.; SAHM, D. F.; GILMORE, M. Relationship between Enterococcal virulence and antimicrobial resistance. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 13, n. 4, p. 513-522, 2000.

MURRAY, B. E. The Life and time of the *Enterococcus*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 3, n. 1, p. 46-65, 1990.

MURRAY, B. E. β -lactamase-producing enterococci. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 36, p. 2355-2359, 1992.

MURRAY, P. R. **Manual of Clinical Microbiology**. 8 ed. Washington DC: ASM PRESS, 2003.

NAIR, P. *et al.* Intraradicular bacteria and fungi in root-filled asymptomatic human teeth with therapy resistant periapical lesions: a long term light and electronic microscopic follow-up study. **Journal of Endodontics**, v. 26, p. 580-588, 1990^a.

NAIR, P. *et al.* Persistent periapical radioluscencies of root-filled human teeth , failed endodontic treatments, and periapical scars. **Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontic**, v. 87, p. 617-627, 1999.

NAIR, P. *et al.* Therapy-resistant foreign body giant cell granuloma at the periapex of root filled human teeth. **Journal of Endodontics**, v. 16, p. 589-595, 1990^b.

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

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

NAIR, P.; SCHROEDER, H. Periapical actinomycosis. **Journal of Endodontics**, v. 10, p. 567-570, 1984.

National Committee for Clinical Laboratory Standards. **Doc m2A8. Performance standards for antimicrobial Disk Susceptibility Tests**. Approved Standard – Eighth edition Wayne PA 2003.

National Committee for Clinical Laboratory Standards. **Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Testing**. NCCLS Document M100-S14 NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne Pennsylvania 19887 USA; 2004.

- NEAL, R. G.; CRAIG, R. G.; POWERS, J. M. Effect of sterilization and irrigants on the cutting abilities of stainless steel files. **Journal of Endodontics.**, v. 9, p. 93-96, 1983.
- NYVAD, B.; FERJERSKOV, O. Assessing the stage of caries lesion activity on the basis of clinical and microbiological examination. **Community Dentistry and Oral Epidemiology.**, v. 25, p. 69-75, 1997.
- O'TOOLE, G. A.; KOLTER, R. Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 process via multiple, convergent, signaling pathways: a genetic analysis. **Molecular Microbiology**, v. 28, p. 449-461, 1998.
- O'TOOLE, G.; KAPLAN, H. B.; KOLTER, R. Biofilm formation as a microbial development. **Annual Review of Microbiology**, v. 54, p. 49-79, 2000.
- ONAY, E. O.; UNGOR, M.; ORUCOGLU, H. An In Vitro Evaluation of the Apical Sealing Ability of a New Resin-Based Root Canal Obturation System **Journal of Endodontics.** (In press)
- PAI, M. R.; ACHARYA, L. D.; UDUPA, N. Evaluation of antiplaque activity of *Azadirachta indica* leaf extract gel--a 6-week clinical study. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 90, p. 99-103, 2004.
- PARSSEL, D.; LINDQUIST, S. The function of heat-shock proteins in stress tolerance: degradation and reactivation of damaged proteins. **Annual Review of Genetics.**, v. 27, p. 437-496, 1993.
- PATTERSON, J. *et al.* Analysis of 110 series enterococcal infection. **Medicine**, v. 74, p. 191-200, 1995.
- PAUL, S.; BEZBARUAH, R. L.; ROY, M. K. Multiple antibiotic resistance (MAR) index and its reversion in *Pseudomonas aeruginosa*. **Letters Applied. Microbiology**, v.24, p.169-171, 1997
- PINHEIRO, E. T. *et al.* Evaluation of root canal microorganisms isolated from teeth with endodontic failure and their antimicrobial susceptibility. **Oral Microbiology and Immunology**, v. 18, p. 100-103, 2003a.
- PINHEIRO, E. T. *et al.* Microorganisms from canals of root-filled teeth with periapical lesions. **International Endodontic Journal**, v. 36, p. 1-11, 2003b.
- PIZZO, G. *et al.* In vitro antibacterial activity of endodontic sealers. **Journal of Dentistry**, v. 34, p. 35-40, 2006.
- POETA, P. *et al.* Antimicrobial resistance and the mechanism implicated in faecal enterococci from healthy humans, poultry and pets in Portugal. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 27, p. 131-137, 2006.
- PRATT, L. A.; KOLTER, R. Genetic analysis of *Escherichia coli* biofilm formation: roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili. **Molecular Microbiology**, v. 30, p. 285-93, 1998.
- PULVERTAFT, R. J. V.; LUMB, G. D. Bacterial lysis and antiseptics. **Journal of Food and Hygienics.**, v. 46, p. 62-64, 1948.

PUMAROLA, J. *et al.* Antimicrobial activity of seven root canal sealers. **Oral Surgery**, v. 74, p. 216-220, 1992.

RADCLIFFE, C. E. *et al.* Antimicrobial activity of varying concentrations of sodium hypochlorite on the endodontic microorganisms *Actinomyces israelii*, *A. naeslundii*, *Candida albicans* and *Enterococcus faecalis*. **International Endodontic Journal**, v. 37, p. 438-446, 2004.

RIBEIRO SOBRINHO, A. P.; BARROS, M. H. M.; NICOLE, J. R. Experimental root canal infection in conventional and germ-free mice. **Journal of Endodontics**, v. 24, p. 405-408, 1998.

RICKARD, A. H. *et al.* Phylogenetic relationships and coaggregation ability of freshwater biofilm bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, p. 3644-3650, 2002.

RÔÇAS, I. N. *et al.* Polymerase chain identification of microorganisms in previously root-filled teeth in a south Korean population. **Journal of Endodontics**, v. 30, p. 504-508, 2004^b.

RÔÇAS, I. N. SIQUEIRA JUNIOR, J. F.; SANTOS, K. R. N. Association of *Enterococcus faecalis* with different forms of periapical diseases. **Journal of Endodontics**, v. 30, p. 315-320, 2004a.

ROSA NETO, J. J. Estudo MEV do ápice radicular e do limite de obturação em dentes portadores de lesão periapical crônica. Araraquara, 1997. 156 p. Tese (Mestrado) – Faculdade de Odontologia de Araraquara, Universidade Estadual Paulista.

SALEH, I. M. *et al.* Survival of *Enterococcus faecalis* in infected dentinal tubules after root canal filling with different root canal sealers *in vitro*. **International Endodontic Journal**, v. 37, p. 193-198, 2004.

SCHIERHOLZ, J. M. *et al.* Antimicrobial substances and effects on sessile bacteria. **Zentralbl Bakteriologie Mikrobiol Hyg**, v. 289, p. 165-177, 1999.

SCHLEIFER, K. H.; KILPPER-BALZ, R. Transfer of *Streptococcus faecalis* and *Streptococcus faecium* to the genus *Enterococcus* nom. Rev. as *Enterococcus faecalis* comb. nov. and *Enterococcus faecium* comb. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 34, p. 31-34, 1984.

SEDGLEY, C.; BUCK, G.; APPELBE, O. Prevalence of *Enterococcus faecalis* at multiple oral sites in endodontic patients using culture and PCR. **Journal of Endodontics**, v. 32, n. 2, p. 104-109, 2006.

SELTZER, S.; BENDER, I. B.; TURKENKOPF, S. Factors affecting successful repair after root canal therapy: a review. **Journal of American Dental Association**, v. 67, p. 651-652, 1963.

SEN, B. H.; SAFAVI, K. E.; SPANGBERG, L. S. W. Antifungal effects of sodium hypochlorite solution as root canal irrigants. **Journal of Endodontics**, v. 25, p. 235-238, 1999.

SHERMAN, J. M. The streptococci. **Bacteriology Review**, v. 1, p. 3-97, 1937.

- SHIH, K. L.; LEDERBERG, J. Effects of chloramines on *Bacillus subtilis* deoxyribonucleic acid. **Journal of Bacteriology**, v. 125, p. 934-945, 1976.
- SIQUEIRA JUNIOR, J. F. Aetiology of root canal treatment failure: why well-treated teeth can fail. **International Endodontic Journal**, V. 34, p. 1-10, 2001.
- SIQUEIRA JUNIOR, J. F. *et al.* Antibacterial effects of endodontic irrigants on black-pigmented Gram-negative anaerobes and facultative bacteria. **Journal of Endodontics**, v. 24, n. 6, p. 414-416, 1998.
- SIQUEIRA JUNIOR, J. F. *et al.* Evaluation of effectiveness of sodium hypochlorite used with three irrigation methods in the elimination of *Enterococcus faecalis* from the root canal, *in vitro*. **International Endodontic Journal**, v. 30, p. 279-282, 1997.
- SIQUEIRA JUNIOR, J. F.; GONÇALVES, R. B. Antibacterial activities of root canal sealers against selected anaerobic bacteria. **Journal of Endodontics**, v. 22, p. 79-80, 1996.
- SIQUEIRA JUNIOR, J. F.; RÔÇAS, I. N. Polymerase chain reaction-based analysis of microorganisms associated with failed endodontic treatment. **Oral Surgery Oral Medicine, Oral Pathology Oral Radiology and Endodontics**, v. 97, p. 85-94, 2004.
- SIQUEIRA JUNIOR, J. F.; UZEDA, M. Desinfection by calcium hydroxide pastes of dentinal tubules infected with two obligate and one facultative anaerobic bacteria. **Journal of Endodontics**, v. 22, n. 12, p. 674-676, 1996.
- SIQUEIRA JUNIOR, J. F.; VENTURIM, K. Infecção periapical como possível causa de insucesso endodôntico. **Revista Gaúcha de Odontologia**, v. 45, p. 152-154, 1997.
- SJÖGREN, U. *et al.* Survival of *Arachnia propionica* in periapical tissue. **International Endodontic Journal**, v. 21, p. 277-282, 1988.
- SPANGBERG, L.; ENGSTRÖM, B.; LANGELAND, K. Biologic effects of dental materials 3. Toxicity and antimicrobial effect of endodontic antiseptics *in vitro*. **Oral Surgery Oral Medicine, Oral Pathology Oral Radiology and Endodontics**, v. 36, p. 856-870, 1973.
- SPRATT, D. A. *et al.* An *in vitro* evaluation of antimicrobial efficacy of irrigants on biofilms of root canal isolates. **International Endodontic Journal**, v. 34, p. 300-307, 2001.
- STEVENS, R. H.; GROSSMAN, L.I. Evaluation of antimicrobial potential calcium hydroxide as an intracanal medicament. **Journal of Endodontics**, v. 9, p. 372-74, 1983.
- STEWART, P. S.; COSTERTON, J. W. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. **Lancet**, v. 358, p. 135-138, 2001.
- STOODLEY, P. *et al.* Biofilms as complex differentiated communities. **Annual Review of Microbiology**, v. 56, p. 187-209, 2002.
- STOODLEY, P. *et al.* The formation of migratory ripples in a mixed species bacterial biofilm growing in turbulent flow. **Environmental Microbiology**, v. 1, p. 447-455, 1999.
- STUART, C. H. *et al.* *Enterococcus faecalis*: its role in root canal treatment failure and current concepts in retreatment. **Journal of Endodontics**, v. 32, n. 2, p. 93-98, 2006.

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

SUNDQVIST, G.; REUTERVNG, O. Isolation of *Actinomyces israelii* from periapical lesion. **Journal of Endodontics**, v. 6, p. 602-606, 1980.

TAGA, M. E.; BASSLER, B. L. Chemical communication among bacteria. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, p. 14549-14554, 2003.

TOCARS, J. L. *et al.* The prevalence of colonization with vancomycin-resistant *Enterococcus* at a Veterans Affairs institution. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v. 20, p. 171-175, 1999.

TOLKER-NIELSON, T. *et al.* Development and dynamics of *Pseudomonas sp.* Biofilm. **Journal of Bacteriology**, v. 181, p. 6482-6489, 2000.

TROSTAD, L. *et al.* Extraradicular endodontic infections. **Endodontics and Dental Traumatology**, v. 3, p. 86-90, 1987.

TROSTAD, L.; BARNETT, F.; CERVONE, F. Periapical bacterial plaque in teeth refractory to endodontic treatment. **Endodontics and Dental Traumatology**, v. 6, p. 73-77, 1990.

UTTLEY, A. H. C. *et al.* Vancomycin-resistant enterococci. **Lancet**, v. 1, p. 57-58, 1988.

VERSIANI, M. A. *et al.* A comparative study of physicochemical properties of AH PlusTM and EpiphanyTM root canal sealants. **International Endodontic Journal**, v. 39, p. 464-471, 2006.

VIANNA, M. E. *et al.* In vitro evaluation of the antimicrobial activity of chlorhexidine and sodium hypochlorite. **Oral Surgery Oral Medicine, Oral Pathology Oral Radiology and Endodontic**, v. 97, p. 79-84, 2004.

WAYMAN, B. E. A bacteriological and histological evaluation of 58 periapical lesions. **Journal of Endodontics**, v. 18, p. 152-155, 1992.

WELCH, W. How cells respond to stress. **Scientific American**, v. 268, p. 56-64, 1993.

WILSON, M. Susceptibility of oral bacterial biofilms to antimicrobial agents. **Journal of Medical Microbiology**, v. 44, p. 79-87, 1996.

WIMPENNY, J.; MANZ, W.; SZEWZYK, U. Heterogeneity in biofilms. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 24, p. 661-671, 2000.

YATSUDA, R. *et al.* Effects of Mikania genus plants on growth and cell adherence of mutant streptococci. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 97, p. 183-189, 2005.

Anexos

Anexo I

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ-UFC

Departamento de Patologia e Medicina Legal

Laboratório de Microbiologia

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Você está sendo convidado para participar da pesquisa: Perfil de sensibilidade de cepas planctônicas e biofilmes de *Enterococcus faecalis* isolados de canais radiculares de pacientes com necessidade de retratamento frente a desafios antimicrobianos.

Sua participação não é obrigatória. A qualquer momento você pode desistir de participar e retirar seu consentimento. Sua recusa não trará nenhum prejuízo em sua relação com o pesquisador, ou com o serviço no qual você está sendo atendido. Os objetivos deste estudo são os de isolar e identificar os microrganismos envolvidos nas infecções de canais radiculares e observar sua resistência a materiais obturadores de uso na clínica odontológica. Sua participação nesta pesquisa consistirá em ceder uma pequena quantidade de material biológico proveniente da raiz do dente quando do retratamento do canal. A coleta será feita com o auxílio de um cone de papel esterilizado e introduzido no canal radicular, procedimento que já será realizado normalmente durante o seu tratamento. Os riscos relacionados com sua participação não existirão por tratar-se de método não invasivo para a coleta do material. Os benefícios relacionados com a sua participação são os de poder auxiliar a ciência médica a adquirir maiores conhecimentos sobre as bactérias relacionadas às infecções persistentes dos canais radiculares e ao tratamento desta doença.

As informações obtidas através dessa pesquisa serão confidenciais e asseguramos o sigilo sobre sua participação. Os dados não serão divulgados de forma a possibilitar sua identificação.

Você receberá uma cópia deste termo onde consta o telefone e o endereço do pesquisador principal, podendo tirar suas dúvidas sobre o projeto e sua participação, agora ou a qualquer momento.

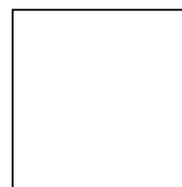
Assinatura do pesquisador

Pesquisadora principal: Theodora Thays Prado Arruda

Avenida Dom Manuel, 289-Centro Fone 32214537.

Comitê de Ética em Pesquisa - Fone: 4009-8338

Declaro que entendi os objetivos, riscos e benefícios de minha participação na pesquisa e concordo em participar.



Digital

Sujeito da pesquisa

Responsável

Testemunha

Anexo II**Ficha de Anamnese**

FICHA DE ANAMNESE – N° Pront: _____

1- Identificação do paciente:

Nome: _____

Data de nascimento: _____ Sexo: _____

Endereço: _____

Fone: _____

2- História médica:

• Presença de patologia sistêmica: _____

• Uso de medicamento: _____

• Apresenta alergia: _____

• Fumante: Sim () Não () Quanto tempo? _____

Que tipo de fumo? _____ Ex-fumante? _____

• Alcoolismo: Sim () Não () Ex-alcoólatra? _____

• Uso de drogas: Sim () Não () Que tipo? _____

Ex-dependente? _____

• Foi submetido a procedimento cirúrgico em nível hospitalar?

Fez uso de anestesia geral? Sim () Não ()

Apresentou complicações? Sim () Não ()

Que tipo de complicação? _____

Anexo III

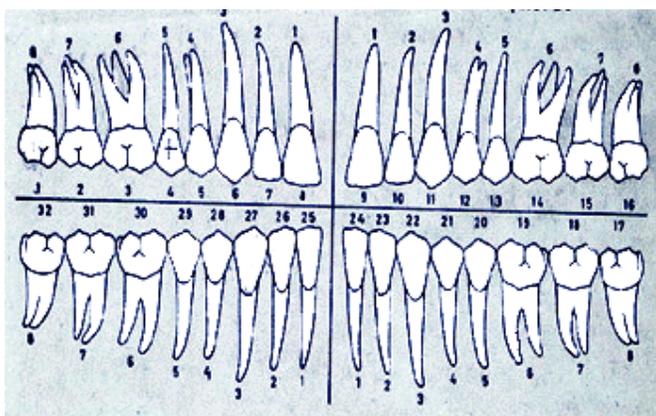
Ficha de exame dentário

FICHA DE EXAME DENTÁRIO-Nº Pront: _____

1) Lesões de tecidos moles intra-orais.

Sim () Não ()

2) Odontograma



3) Sensibilidade pulpar – elemento dental: _____

Positivo () Negativo ()

4) Sensibilidade à percussão

Positivo () Negativo ()

5) Sensibilidade à palpação

Positivo () Negativo ()

6) Evidência radiográfica de lesão periapical

Sim () Não () Possível diagnóstico: _____

Tempo de evolução da lesão: _____

7) Presença de mobilidade

Sim () Não () Grau _____

8) Histórico de cirurgia parendodôntica

Sim () Não ()

9) Histórico de retratamento

Sim () Não ()

- a) Qual a solução irrigante utilizada no tratamento anterior?
- b) Qual o cimento obturador utilizado no tratamento anterior?
- c) Utilizou curativo? Qual? Por quanto tempo?

10) Apresenta sintomatologia atualmente

Sim () Não ()

Anexo IV**Aprovação do COÉTICA- Comitê de Ética em Pesquisa**

FUNDAÇÃO EDSON QUEIROZ UNIVERSIDADE DE FORTALEZA
ENSINANDO E APRENDENDO

**UNIVERSIDADE DE FORTALEZA
VICE-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
Comitê de Ética em Pesquisa – COETICA**

PARECER N.º. 033/2006

Projeto de Pesquisa: Perfil de sensibilidade de cepas plactônicas e biofilmes de enterococcus faecalis isolados de canais radiculares de pacientes com necessidade de retratamento frente a desafios antimicrobianos

Pesquisador Responsável: Eduardo Diogo Gurgel Filho

Data de apresentação ao COETICA: 13/02/06

Registro no COETICA: 06-019

Parecer: APROVADO na data de 21/02/06

*Prol. Dr. Haroldo Rodrigues de Albuquerque Júnior
Presidente do Comitê de Ética em Pesquisa da UNIFOR - COETICA*

Anexo V

Meios de cultura, soluções e reagentes

BHI caldo (Brain Heart Infusion broth)

BHI	37g
Água Destilada	1000ml

Ágar sangue de carneiro

BHI ágar	52 g
Água Destilada	1000ml
Sangue desfibrinado de carneiro	5ml

O pH foi ajustado para 7,4 com NaOHN. Em seguida, após o resfriamento do meio a 50 °C acrescentou-se sangue desfibrinado de carneiro para uma concentração final de 2%.

BHI + glicerol (para estoque das cepas)

BHI	37g
Glicerol	2%
Água Destilada	1000ml

Agar Cled

Ágar Cled pó	36g
Água destilada	1000ml

BHI suplementado para transporte

BHI	37g
Extrato de levadura	5g
Água destilada	1000ml
Após fundir, adicionar:	
Cisteína hidrocloreídrica	0,5g

Solução de rezazurina	4ml
Solução de hemina/menadione	10ml

Mieller-Hinton caldo

Ágar Müller-Hinton	38g
Água destilada	1000ml

Após misturar o pó com o líquido em suas devidas proporções, realizou-se a filtração (Filtro para Seringa Acrodisc GHP) da mistura para que as partículas de agar fossem retidas; após esse procedimento realizou-se a esterilização à 121°C por 15 minutos.

D/E caldo neutralizador

D/E caldo neutralizador	34g
Polisorbato 80	5g
Água destilada	1000ml

D/E agar

D/E caldo neutralizador pó	34g
Agar bacteriológico	6,8g
Polisorbato 80	5g
Água destilada	1000ml

Ágar Bile-esculina

Composição:

Caldo de infusão de coração (HIB)	25g
Agar	16ml
Cloreto férrico	0,5g
Água destilada	900ml
Solução de esculina á 1%:	
Esculina	1g

Água destilada	100ml
----------------	-------

Após a dissolução da esculina realizou-se filtração da mistura utilizando filtro milipore 0,22 µm de porosidade.

Preparo do meio:

Pesar o HIB, o agar e o cloreto férrico e adicionar 100ml de água destilada. Esterilizar em autoclave a 121°C por 15 minutos. Deixar esfriar até a temperatura de 50 °C e adicionar 10 ml da solução de esculina a 1%, homogeneizar e distribuir em alíquotas de 1,5 ml em tubos de vidro com tampa rosqueável de 3x100mm. Deixar solidificar em posição inclinada, de modo a obter-se uma superfície de 3 cm de comprimento.

Telurito de potássio

Composição:

Ágar Mueller-Hinton	3,8g
Água destilada	100ml
Telurito de potássio (0,4g em 10ml)	1ml ou 0,04g

Solução Salina

NaCl	9,0g
Água Destilada	1000ml

Caldo base para açúcares para Gram-positivos

Os açúcares empregados foram: GLICOSE, MANITOL, SORBITOL, ARABINOSE.

- Meio Básico:

Solução do Carboidrato à 10%	10ml
Brain Heart Infusion (BHI)	2,5g
Púrpura de Bromocresol 1%	0,1ml

(Pesou-se 1,0g de púrpura de bromocresol e dissolveu-se em 50ml de álcool etílico P.A.; em seguida adicionou-se mais 50ml de água destilada)

Água destilada	90ml
----------------	------

Caldo para Desaminação da Arginina

Composição:

Peptona	5,0g
Extrato de Carne	5,0g
Glicose	0,5g
Solução A (Púrpura de Bromocresol)	2,0ml
Solução B (Vermelho Cresol)	2,0ml
Solução C (Piridoxina B ₆)	1,0ml
Água Destilada	1000ml
L-Arginina	10g
L-Ornitina	10g
L-Lisina	10g
pH final	6,0

Caldo hipercloretado á 6,5%:

Composição:

Caldo BHI (BrainHeart Infusion)	2,5g
Cloreto de sódio	6,5g
Glicose	0,1g.... 0,15g
Solução de púrpura de bromocresol à 1,6%	0,1ml
Água destilada	100ml

Os meios de cultura e soluções foram esterilizados em autoclave a 121°C, com pressão de 1 atm por 20 minutos. Vidrarias por 40 minutos. Todo material contaminado foi esterilizado em autoclave antes do descarte. Métodos diferenciados de esterilização foram citados no item em questão.

Anexo VI

Provas Bioquímicas

-Classificação ao nível de gênero:

- Prova da catalase: A prova foi realizada sobre uma lâmina de vidro colocando-se peróxido de hidrogênio (H_2O_2) a 3% sobre colônias características crescidas no ágar sangue, observando-se a ausência de formação de bolhas de gás (prova negativa).
- Prova do caldo hipercloretado a 6,5%: Com o auxílio de alça de platina coletaram-se colônias sugestivas de *Enterococcus sp*, colônias com diâmetro entre 3.9 e 4.0, brilhantes, branco-acinzentadas, não aderentes, achatadas, com superfície irregular e hemólise variável quando cultivado em ágar sangue. (87)e repicou-se para o caldo hipercloretado a 6,5%. Após 24 horas de incubação em estufa à 37°C em aerobiose, havendo crescimento, tal cepa era considerada pertencente ao gênero *Enterococcus*. A prova foi considerada positiva quando houve mudança de cor do meio da púrpura para amarelo, confirmando o crescimento bacteriano.
- Prova da bile-esculina: Foi semeado 0,1ml de cultura pura em Ágar Esculina inclinado. Após incubação a 37°C em aerobiose por 24 horas o crescimento e desenvolvimento de coloração negra determinaram a positividade da prova.
- Prova da produção de pigmento: Pigmentação foi observada após incubação overnight em ágar tripticase soja. Se a cepa produzisse pigmento, a cor amarela era observada no swab de algodão quando passado sobre as colônias crescidas.
- Prova da produção de gás: O teste foi considerado negativo quando não houve a formação de ar no interior do tubo de Durham, o que significa que não houve fermentação da glicose do meio.
- Prova da motilidade em meio SIM: As bactérias eram inoculadas no meio semi-sólido (SIM) com agulha bacteriológica e incubadas por 24 horas a 35°C. Caso houvesse crescimento apenas no ponto de inoculação a cepa era considerada imóvel.

-Classificação ao nível de espécie:

- Prova da fermentação de açúcares (arabinose, sorbitol e manitol): Foi adicionado 0,1ml de cultura pura do microrganismo a um meio base para açúcares contendo arabinose, manitol ou sorbitol a 10% e indicador de pH (púrpura de bromocresol). Incubação a 37°C em aerobiose por 48horas. A prova foi considerada positiva quando ocorreu a mudança da cor do indicador de pH, de roxo para amarelo.

- Prova da descarboxilação da arginina: Inicialmente, o meio muda para amarelo devido à acidificação do indicador de pH pela fermentação da glicose presente no meio. Se a arginina é descarboxilada, pela presença da enzima dihidrolase, um produto final alcalino reverte o indicador para coloração púrpura, indicando reação positiva.

- Prova da tolerância ao telurito: A tolerância ao telurito é determinada em tubo ou placa contendo meio de Müller-Hinton com 0,04% de telurito de potássio. O meio é inoculado com uma cultura nova de *Enterococcus sp* e incubado à 37 °C por 24 horas. O resultado positivo é dado pela formação de colônias escuras na superfície do meio.

Anexo VII

Composição Química do óleo essencial da *Lippia sidoides*

Componentes ^a	Tr ^b	Concentração (%)
Timol	23,84	56,67
Carvacrol	29,45	16,73
<i>p</i> -cimeno	9,42	7,13
Timol metil éter	9,61	5,06
Aromadendrene	10,88	2,79
1.8-cineol	23,99	2,39
Gama-elemeno	7,99	2,28
Gama-terpineno	19,75	1,42
α -terpineno	5,76	1,12
β -mirceno	5,95	0,86
α -tujeno	30,26	0,78
Octa- 3- ol	7,37	0,51

^a Componentes listados em ordem de eluição de uma coluna DB-1.

^b Tr: Tempo de retenção (min).

Apêndice I

Topographical alterations and antimicrobial effect of *Lippia sidoides* essential oil against *Enterococcus faecalis* biofilms.

Yahoo! Mail - cibelebmc@yahoo.com.br

Yahoo! Mail	Buscar: j	Buscar na Web
Olá, cibelebmc [Sair, Minha conta]		
E-mail	Endereços	Opções
Verificar e-mail	Escrever	Buscar no Yahoo! Mail
Anterior Próxima Voltar às mensagens		
Pastas [Adicionar - Editar]	Apagar j Responder] Encaminhar ; Spam j : Transferir j	Imprimir
Entrada	Mensagem não sinalizada. [Sinalizar - Marcar como não lida]	
Rascunho	De: "Journal of Ethnopharmacology" <jethnoph@lacdr.leidenuniv.nl> fte Adicionar endereço	
Em massa [Limpar]	Para: cibelebmc@yahoo.com.br	
Lixeira [Limpar]	Assunto: Editor handles JEP-D-06-01719R1	
Data: Mon, 08 Jan 2007 10:21:06 -0000		

Atalhos para buscas

Minhas fotos

Meus anexos

DVD O Código Da
Vinci! Compre aqui!

BUSCAPÉ Nike Shox

a partir de R\$499

Chegou e-mail? Nós
avisamos você

Ref.: Ms. No. JEP-D-06-01719R1

Topographical alterations and antimicrobial effect of *Lippia sidoides* essential oil against *Enterococcus faecalis* biofilms.
Journal of Ethnopharmacology

Dear Dr.Carvalho,

Anneke Poels, Mft handles your manuscript JEP-D-06-01719R1 .

Regards

Anneke Poels, MA. Editorial
Office Journal of
Ethnopharmacology

Apagar j | Responder] | Encaminhar ; Spam j : Transferir j

[Anterior](#) | [Próxima](#) | [Voltar às mensagens](#)

[Salvar texto da mensagem](#) |

[Cabeçalhos](#)

Buscar no Yahoo! Mail

Abstract

To evaluate and compare the effects of a topical essential oil-based formulation (*Lippia sidoides*) against two strains of *Enterococcus faecalis* grown as biofilm using an atomic force microscope the study was done. The *E. faecalis* biofilms were grown at 8 days on cellulose nitrate membrane placed on agar medium. The biofilms were immersed in the *Lippia sidoides* 0,5% essential oil for 10 minutes. Sterile saline was used as a control. After the time tested aliquots of the dilution were plated on D/E agar plates and incubated in conventional atmosphere. Colony-forming units were then calculated. Biofilm topography changes were evaluated by atomic force microscopy . There was significant alteration on *Enterococcus faecalis* biofilm structure after the treatment in comparison with the control . These results demonstrated topographical alterations of *E. faecalis* 8-day biofilm and a statistically significant cells reduction after the treatment with the essential oil-based formulation of *L. sidoides* .

1. Introduction

Several intrinsic characteristics of the genus *Enterococcus* allow them to grow and survive in harsh environments and to persist almost everywhere (Murray 1990). Enterococci are important causes of dental and medical acquired infections. A number of infections caused by *E. faecalis* strains have proven to be particularly difficult to treat with current antibiotic therapies, partly owing to their intrinsic antibiotic resistance, their promiscuity in acquisition and dissemination of genetically mobile antibiotic resistance elements and their capacity of growing in a biofilm (O'Toole et al. 2000).

Enterococcus faecalis has gained notoriety as a persistent organism that can survive as a monoculture in root canals (Spratt et al. 2001). It is also has been suggested that persistent endodontic and many other infections are often caused by *E. faecalis* biofilms (Distel et al. 2002, Mohamed et al. 2004). This group of bacteria has been found in HIV seropositive periodontitis lesions (Nakou et al. 1997).

A number of laboratory studies have compared the effectiveness of several irrigant solutions in eliminating *E. faecalis* grown as biofilm or planktonic suspension phenotype. *E. faecalis* has been demonstrated *in vitro* some resistance to these solutions (sodium hypochlorite, chlorhexidine, etc) and dressing medication (calcium hydroxide) used in the endodontic treatment (Abdullah, et al. 2005, Gomes et al. 2001, Lima et al. 2001).

In vitro antimicrobial sensitivity testing revealed subgingival enterococci resistant to therapeutic levels of penicillin G, tetracycline, clindamycin and metronidazole, Enterococci may populate periodontal pockets as superinfecting organisms and, in heavily infected patients, contributing to periodontal breakdown (Rams et al. 1992).

Recently, essential oil derivatives have been investigated more thoroughly as promising agents for novel dentistry devices preventing skin and oral diseases (Lacoste et al. 1996, Girão et al. 2003) Unfortunately, information regarding to novel topical formulation based on essential oil-containing solutions used to control enterococcal infections in dentistry is almost non existent.

Lippia sidoides Cham. (Family of *Verbenaceae*), popularly known as “*Alecrim-pimenta*”, is a typical shrub commonly grown in the Northeast of Brazil. This species produces an essential oil (EO) rich in thymol and carvacrol, which has a potent antimicrobial activity against fungi and bacteria (Lemos et al. 1990). It is one of the widely used substances in Brazilian traditional medicine, especially by poor local communities in the Northeast of Brazil for skin cuts, sore throat and for dental caries prevention (Lacoste et al. 1996, Botelho et al 2006).

Previous studies have described the larvicidal property of *Lippia sidoides* essential oil (LSEO) (Carvalho et al. 2003). Recently, isolated quinones from *Lippia sidoides* EO have been described to possess cytotoxic activity (Costa et al. 2001).

In the dental field authors have described a novel approach using *Lippia sidoides* essential oil (LSEO) as dental cement (Morais et al. 1996), Popular and scientific evidence also suggest that the essential oil may be useful for oral hygiene and in the prevention of dental disorders such as caries and gingivitis (Fernandes Filho et al. 1998). However, the LSEO *in vitro* activity against pathogens grown as biofilm and related to periodontal and endodontic infections has not been so far reported.

Any treatment that would eliminate or substantially reduce colonization by *Enterococcus faecalis* would likely have a strong impact preventing dental disorders (Distel et al. 2002, Gilbert et al. 1997).

These groups of bacteria are important causes of hospital-acquired infections, and treatment of infections due to these opportunistic pathogens is becoming increasingly difficult because of their resistance to multiple antibiotics (Costerton et al. 1999). One of the mechanisms by which these pathogens have developed to alleviate the influences of harsh environment is the biofilm mode of living, which plays a critical role in the *Enterococcus faecalis* virulence (Carniol & Gilmore 2004).

AFM has emerged as a powerful tool not only to image the surface topography of biological specimens with nanometer resolution, but also to measure their local structural changes under physiological conditions (Canetta et al. 2006). It is only recently that this technique has been employed to investigate the structure of microbial surfaces (Pelling et al. 2005).

The aim of this study was to investigate and to compare the effectiveness of a novel irrigant solution and/or a dressing medication against a multiresistant *E. faecalis* endodontic clinical isolate and *E. faecalis* reference strain susceptible to all antimicrobials agents and grown as biofilm. In addition, we studied the ultra structural alterations caused by LSEO on the *Enterococcus faecalis* biofilm by AFM using the biofilm model challenge against *E. faecalis* strains related to endodontic infections.

2. Material and methods

Plant material

The leaves of *Lippia sidoides* were collected in august 2004 at the Medicinal Plants Garden Prof. Francisco José de Abreu Matos – Fortaleza, Brazil, with the authorization of Federal University of Ceará Ethical Committee (#551/04). Taxonomic identification of

plants was performed by botanists of the *Prisco Bezerra* Herbarium, Department of Biology – Federal University of Ceará where voucher specimen is deposited (# 25149).

Essential oil extraction and compounds tested

The leaf essential oil was extracted using a modified Clevenger apparatus (Craveiro et al. 1976) by the hydro-distillation technique. After extraction, the volume of essential oil obtained in both extractions was measured and the essential oil conditioned in hermetically sealed glass containers with rubber lids, covered with aluminum foil to protect the contents from light and kept under refrigeration at 8 °C until used. NaOCl were purchased from Sigma-Aldrich Chemical Corporation – USA.

Gas Chromatography – Mass Spectrum analysis

The chemical composition of the essential oil was determined at the Technological Development Center (PADETEC) at the Federal University of Ceará by Gas Chromatography coupled to mass spectroscopy (GC-MS) using a Hewlett-Packard 5971 GC/MS apparatus under the following conditions: polydimethylsiloxane DB-1 fused silica capillary column (30 m x 0.25 mm), with film thickness 0.10 µm; the carrier gas was helium (1 ml/min), the injector temperature was 250°C whilst the detector temperature was 200°C. The column temperature ranged from 35 to 180°C/min, at 4°C V/min, and then from 180 to 280°C, at 20°C V/min; mass spectra were obtained by electronic impact 70 eV. The identification of the constituents was performed by computer-based library search, with retention indices and visual interpretation of the mass spectra (Craveiro et al. 1984).

Antimicrobial assay

Microbial strains

Two *Enterococcus faecalis* strains were used in this study: the first one was isolated from an infected root canal associated with chronic periapical disease and it was resistant to all antimicrobials tested (except to vancomycin) and named multiAD strain or multiresistant strain. The second one was a reference *Enterococcus faecalis* strain (ATCC 29212 / Culti-loops-OXOID) and uniformly susceptible to all the antimicrobials agents.

The multiAD strain was isolated in Brain Heart Infusion blood agar(BHI) plate and it was identified using conventional biochemical tests and automated identification (VITEK system). Antimicrobial susceptibility tests were performed by the reference agar diffusion method recommended by the National Committee for Clinical Laboratory Standards

(NCCLS, 2003) using Mueller-Hinton agar (DIFCO) and by the VITEK system. *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212 / Culti-loops-OXOID) was used as the susceptible strain and for control of the antimicrobial tests.

Determination of minimal inhibitory concentration

A broth dilution method was used to determine the minimum inhibitory concentration (MIC) (NCCLS, 2000). A serial doubling dilution of LSEO (80-0.625 mg/mL) and sodium hypochloride (10-0,078 mg/mL) was prepared. The BHI broth (Merck) was supplemented with DMSO (Merck, Germany) at a concentration of 2% in order to enhance LSEO sample solubility. Overnight broth cultures were prepared in Brain Heart Infusion broth (DIFCO) and the final concentration in each well was adjusted to 5×10^5 cfu/ml following inoculation. Positive and negative growth controls were included in the test. The tray was incubated aerobically at 35°C. The MIC is defined as the lowest concentration of the essential oil at which the microorganism tested does not demonstrate visible growth. The bacteria growth was indicated by the turbidity.

Biofilm susceptibility assay

Single species biofilms of *E. faecalis* were generated on sterile cellulose nitrate membrane filters (CNM) (0.2µm pore size, 13mm diameter; Millipore Industria e Comercio LTDA). The inoculum was prepared in a liquid medium as follow described elsewhere (Abdullah et al. 2005). A volume of 50 µl of freshly grown bacterial in BHI broth and adjusted to the turbidity of 6 MacFarland (optical density at 600 - 2.27 nm) was inoculated onto the membranes placed on BHI agar blood plates (5% defibrinated sheep blood) and incubated for 24 hours aerobically. The bacterial suspension (50µl) was inoculated onto the membranes placed on Brain Heart Infusion agar blood plates and incubated aerobically for 8 days. . Each three days the Brain Heart Infusion agar blood plates were changed. After the incubation time of 8 days membrane filters were removed aseptically from the agar plate and transferred carefully, so as to avoid the disruption of the biofilm, into 5ml of the essential oil (0.5%) and NaOCl 2.5% and incubated for 10 min. Sterile saline was used as a control group. After the designated contact time, the membrane filters were then carefully transferred to 5ml of neutralizing broth (D/E Neutralizing Broth, Acumedia Manufactures, Michigan 48912) to stop the antimicrobial action of the test agent and vortexed for 30s to re-suspend the organisms. Ten-fold serial dilutions were generated in D/E Broth. Each dilution was plated in triplicate onto D/E agar plates. The plates were then incubated for 24/48h in aerobiosis at 35°C and colony forming units (CFU) was calculated.

Biofilm preparation to AFM images.

At first, biofilms were generated and the aspects of its topography were analyzed at 8 days using atomic force microscope. The membranes were placed on BHI agar blood plates (5% defibrinated sheep blood) and incubated aerobically until the day of the experiment. Biofilms were generated on sterile cellulose nitrate membrane filters and were handled under sterile conditions until just prior to imaging. To AFM height data, samples of CNM, CNM in BHI agar blood plates (CNM-BHI), inoculated CNM in BHI agar blood plates at 8 days (CB8d), inoculated CNM in BHI agar blood plates at 8 days immersed in sterile saline solution (CB8d-SS) and LSEO (CB8d-O) for 10 minutes without mechanical agitation were air-dried for 5 min, cut, and put on steel sample disks covered with double-side adhesive. Sample surfaces were scanned in air with a Nanoscope IIIa Multimode AFM (Digital Instruments, Santa Barbara, CA, U.S.A.) by tapping mode at a scan of about 0.400 Hz, resonance frequencies of ca. 200 to 380 kHz, with crystal silicon cantilevers (Digital Instruments) at spring constant of approximately 40 N/m, and tip radius of 15 nm. The scan sizes performed were 10 x 10 μm . AFM scan controls were properly adjusted (sufficient contact force, and high gains) to avoid tip artifacts during the scanning of the samples. To 3D-visualization the height data were processed with Nanoscope software (Digital Instruments), version 5.12 r3.

We used Nanoscope software to calculate the surface roughness for the CNM-BHI, CB8d, CNM-BHI8d-SS, and CNM-BHI8d-O AFM height data with scan size of 10 x 10 μm . Thirty regions (per sample) were randomly chosen to the determination of the mean roughness (R_a). The R_a represents the arithmetic average of the deviations from the center plane, conform the following relation (Digital Instruments, 2001; Sayles, 1992):

$$R_a = \frac{\sum_{i=1}^N |z_i - z_{cp}|}{N},$$

Where Z_{cp} is Z value of the center plane, and Z_i is the current Z value, and N is the number of points within a given area.

Statistical analysis

The microbiology data are presented as the mean: SEM as medians, where appropriate. Univariate analysis of variance (ANOVA) followed by Bonferroni's test was used to compare means and Kruskal Wallis and Mann-Whitney tests were used to compare medians. A probability value of $P < 0.05$ was considered to indicate significant differences,

performed with GraphPad. Prisma Version 3.0 software (San Diego, California, USA).

3. Results

Inhibition of *E. faecalis* 8-day biofilm

The results show that after 10 min the essential oil 0.5% and NaOCl 2.5% EO produced statistically significant 99.99% reductions of both planktonic strains, compared with control. Figure 1 shows the susceptibility of 8-day *E. faecalis* multiresistant and ATCC strains biofilm to *Lippia sidoides* essential oil 0.5% and NaOCl 2.5% over 10min. *Lippia sidoides* oil at 0.5% produced statistically significant 99.99% reductions ($p < 0.0001$) in both ATCC and multiresistant clinical 8-day biofilm compared to the control. *L. sidoides* produced much smaller reductions in *E. faecalis* multiresistant 8-day biofilm than in the reference and antimicrobial susceptible *E. faecalis* 8-day biofilm.

AFM images

Figures 2 and 3 show 3D AFM height images on CNM, CNM-BHI, CB8d, CB8d-SS, and CB8d-O performed with scan sizes of 10 x 10 μm . It can be observed the uneven and porous structure of the cellulose nitrate membrane (CNM) (Fig.1a) and BHI (nutritious solution) on the CNM-BHI surface (Fig.1b). BHI globular structures around 500 nm sizes stuck in the CNM formed a complex net organized by the membrane porous structure. The pores of the membrane are responsible for the diffusion of the nutritious solution to the CNM superficial regions. After 8 days (CB8d), 3D AFM height images showed bacterial cells partial and uniformly obscured by the presence of EPS, indicating the presence of a consolidated biofilm (Fig. 3a). Islands of bacterial aggregates (micro colonies) and valleys were observed on the surface. Surface projections, presumably exopolysaccharide and significant thickness were seen. The same ones characteristic were observed in the membrane inoculated after immersion in the sterile solution (CB8d-SS). The saline solution did not have any effect on the topography of the biofilm grown after 8 days (Fig..3b). In contrast, 8-day *E. faecalis* biofilm after the essential oil treatment (CB8d-O) showed a cellulose surface with most of the bacteria attaching to the membrane surface as single cells or diplococcal and surface projections were not seen (Fig. 3c). The oil treatment removed partial or totally the EPS of the biofilm surface, without seemingly to damage the bacterial surface (in the observed scale).

Figure 4 shows R_a frequency distributions for CNM-BHI, CB8d, CB8d-SS, and CB8d-O. The Shapiro-Wilk test indicated that the sample distributions adjusted conveniently to a normal at 0.05 level. Mean R_a (\pm SE) to the CNM conditions different were: (224.72 \pm

1.11) nm to CNM-BHI, (159.73 ± 1.21) nm to CB8d, (157.15 ± 1.32) nm to CB8d-SS, and (97.96 ± 1.70) nm to CB8d-O, as represented in Figure 5. It was performed the ANOVA test to verify the existence or not of significant differences between mean sample distributions. After one-way ANOVA, mean values of R_a were compared using a post-hoc Tukey test for equal samples sizes. Mean R_a did not vary significantly between the CB8d and CB8d-SS samples ($p \geq 0.05$), indicating which the saline solution did not have any effect on the biofilm roughness after 8 days. Significant differences among the others R_a mean values ($p \leq 0.05$) were founded. This indicated topographical changes in the CNM-BHI due to presence of a consolidated biofilm and action of the essential oil.

4. Discussion and conclusions

Enterococci are important inhabitants of the oral cavity specially in periodontal and endodontic infections (Nakou et al. 1997, Distel, et al. 2002), Biofilm formation is presumed to play an important role in a number of enterococcal infections (Costerton et al. 1999). While a number of colonization and adhesion factors have been studied, the ability of Enterococci to effectively colonize the root canals is not well understood. Several studies have investigated biofilm formation of Enterococci, which is thought to be a multifactorial event (Carniol & Gilmore 2004).

The Biofilms assays are particularly important since *in vitro* testing, has traditionally utilized assays involving bacteria in planktonic form (Addy & Moran 2000). It is not surprising that test results did not always correlate results *in vivo* antiplaque trials in which the formulations were confronted with biofilms. The *in vitro* biofilm models have been developed to screen oral antimicrobial formulations in an effort to produce findings more predictive of clinical activity. Perhaps the clearest demonstration of biofilms effect on organism's susceptibility to antimicrobial agents could be achieved if the tests were performed in a microorganism in both planktonic and biofilm form (Fine et al. 2001).

Many different extracts plants have been evaluated over the years with respect to their antimicrobial effects against oral pathogens and dental disorders. (Didry et al. 1998, Pai et al. 2004, Yatsuda et al. 2005). Recently an animal study indicated that an *Lippia sidoides*-based mouthrinse reduced the severity of gingival inflammation, bacterial plaque and histological inflammatory infiltrate in dogs (Girao et al. 2003). Other reports have described the clinical efficacy of LSEO against *S.mutans* salivary levels after use LSEO mouthrinse. (Botelho et al 2006). *L. sidoides* is a plant that grows virtually anywhere in northeastern Brazil. Due to its low cost, the use of *L. sidoides*-based essential oil in the prevention and

treatment of oral conditions could be of benefit for low socio-economic urban and rural communities. This formulation may also be advantageous in regions where *L. sidoides* is a culturally accepted plant.

The increased resistance conferred by the biofilm form is thought to result from a number of factors including phenotypic differences in sessile bacteria compared to planktonic, differential rates of bacterial metabolism at various sites within the biofilm, and matrix inhibition of diffusion of charged antimicrobial agents, (Gilbert et al. 1997).

The results indicated that *L. sidoides* essential oil 0.5% effectively inhibited the 8-day multiresistant *E. faecalis* biofilm and the 8-day susceptible *E. faecalis* biofilm. On the other hand 8-day *E. faecalis* ATCC biofilm showed significantly more lost bacterial cells than 8-day multiADbiofilm.

The finding that the antimicrobial formulations killed virtually all the organisms in planktonic form while having very different activities in killing organisms in biofilm form provides additional support for employing tests using biofilms to more accurately assess the relative activities of antiplaque agents in vitro.

Biofilms are bacterial communities attached to a biotic or an abiotic substrate and encased in an extra cellular matrix of secreted proteins, carbohydrates and/or DNA that assume phenotypes distinct from those of planktonic cells (Carniol & Gilmore 2004). The EPS matrix where the cells are embedded is one of the most distinctive features of biofilms when compared to planktonic populations. This is in large part due to its dynamic nature. The composition of EPS varies depending upon the organisms present and environmental conditions. Presumably, under the proper circumstances, cells can and will attempt to influence their surrounding chemical and physical environment by secreting specific biological macromolecules. However this environment can also harbor components of abiotic origin as well as matrix nonspecific biological molecules derived from the lyses of the cells. The challenge is determining when, why and how a community regulates EPS composition and the ultimate functional consequence of this behavior (Parsek & Fuqua 2004). Regardless of its origin EPS is implicated in many processes such as biocorrosion, antimicrobial resistance and protection from a variety of environmental stresses and these characteristics are present at the old biofilms.

In this study, the surface structure of *E. faecalis* biofilm on CNM-BHI at 35°C was characterized perfectly by AFM height images and roughness measurements. AFM height images differentiated qualitatively a membrane without and with biofilm of 8 days, as well as the surface treated with oil essential at 2.5% after 10 min. Topographical changes were

quantified by means of roughness measurements. The reduction of 64.99 nm in the R_a mean value of CNM-BHI to CB8d went due to presence of EPS, and bacterial cells on the membrane surface; and the reduction of 61.77 nm of CB8d to CB8d-O, due to retreat of partial or total of EPS of the consolidated biofilm surface. It is important to point out that this last effect was only attributed the action of the oil on surface; since the biofilm of 8 days treated with saline solution (sterile solution) did not modify its topography.

Theoretically any alteration of biofilm may alter its functioning. It has been said that the efficacy of any antiseptic mouthwash depends not just on its microbial properties but also on its ability to penetrate the plaque biofilm. Recent studies have shown that essential oil mouthwashes kill microorganisms by disrupting their cell walls and by inhibiting their enzyme activity and that they are capable of penetrating the plaque biofilm (Ouhayoun 2003). In our work, the LSEO had as action the retreat of EPS and significant reduction of the bacterial viability, without disrupting of the cellular wall.

In conclusion 0.5% LSEO did change the *Enterococcus faecalis* biofilm structure following up to 10 min exposure. These results demonstrated distinct structural conformation of *E. faecalis* 8-day biofilm and a statistically significant cells reduction after the treatment with *L. sidoides* essential oil.

Acknowledgements

We gratefully acknowledge the financial support of CAPES (Conselho de Aperfeiçoamento e Pesquisa de Ensino Superior) and FUNCAP - Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico.

The authors are grateful to the PADETEC on behalf of Prof. Ary Marques, Telma L.G. Lemos for providing the essential oil sample analysis. José Olavo Moraes and Terezinha de Jesus for technical support.

REFERENCES

- Abdullah, M., Yuan-Ling Ng., Gulabivala, K., Moles D.R. & Spratt D.A. (2005) Susceptibilities of two *Enterococcus faecalis* phenotypes to root canal medications. *Journal of Endodontics* 31, 30-36.
- Addy, M. & Moran J.M. (2000) Clinical indications for the use of chemical adjuncts to plaque control: chlorhexidine formulations 1997. *Periodontology* 2000 15, 52-54.
- Botelho, M.A., Lemos T.L.G., Matos F.J.A., Brito G.A.C. & Rao V.S. (2006) Antimicrobial activity of the essential oil from *Lippia sidoides*, carvacrol and thymol against oral pathogens. *Brazilian Journal Medical and Biological Research* (Submitted and Revised).
- Canetta, E., Walker, G.M., Adya, A.K. (2006) Correlating yeast cell stress physiology to changes in the cell surface morphology: atomic force microscopic studies, *Scientific World Journal* 6, 777-780.
- Carniol, K. & Gilmore, M.S. (2004) Signal transduction, Quorum-sensing, and extracellular protease activity in *Enterococcus faecalis* biofilm formation. *Journal of Bacteriology* 186, 8161-8163.
- Carvalho, A.F., Melo, V.M., Craveiro, A., Machado, M.I.L., Bantim, M.B. & Rabelo, E.F. (2003) Larvicidal activity of the essential oil from *Lippia sidoides* Cham. against *Aedes aegypti* linn. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 98, 569-571.
- Costa, S.M.O., Lemos, T.L.G., Pessoa, O.D.L., Pessoa, C., Montenegro, R.C., Braz-Filho, R. (2001) Chemical constituents from *Lippia sidoides* and cytotoxic activity. *Journal Natural Products* 64, 792-795.
- Costerton, J.W., Stewart, P.S. & Greenberg, E.P. (1999) Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 284, 1318–1322.
- Craveiro, A.A., Matos, F.J.A. & Alencar, J.W. (1976) A simple and inexpensive steam generator for essential oils extraction. *Journal of Chemicals Edition* 53, 652.
- Craveiro, A.A., Matos, F.J.A. & Alencar, J.W. (1984) Kovats indices as pre-selection routine in mass spectra library search of volatiles. *Journal of Natural Products* 47, 890-892.
- Didry, N., Dubreuil, L., Trotin, F. & Pinkas, M. (1998) Antimicrobial activity of aerial parts of *Drosera peltata* Smith on oral bacteria. *Journal of Ethnopharmacology* 60, 91-96.
- Digital Instruments Veeco Metrology Group. 2001. In: Command Reference Manual – Software version 5.12 r3.
- Distel, J.W., Hatton, J.F. & Gillespie M.J. (2002) Biofilm formation in medicated root canals. *Journal of Endodontics* 28, 689-693.

- Fernandes Filho, E.S. & Morais, S.M. (1998). Preparação e avaliação clínica do óleo essencial da planta medicinal *Lippia sidoides Cham* (alecrim pimenta). *Revista da Associação Brasileira de Odontologia* 6, 323-325.
- Gilbert, P.J., Das, J., Foley, I., (1997). Biofilms susceptibility to antimicrobials. *Advances in Dental Research*. 11, 160-167
- Girão, V.C., Nunes-Pinheiro D.C., Morais S.M., Siqueira, J.L. & Gioso, M.A. (2003) A clinical trial of the effect of a mouth-rinse prepared with *L. sidoides Cham* essential oil in dogs with mild gingival disease, *Preventive Veterinary Medicine* 59, 95-102.
- Gomes, B.P.F.A., Ferraz, C.C.R., Vianna, M.E., Berber, V.B., Teixeira, F.B. & Souza-Filho F.J. (2001) In vitro antimicrobial activity of several concentrations of sodium hypochlorite and chlorhexidine gluconate in the elimination of *Enterococcus faecalis*. *International Endodontic Journal* 34, 424-428.
- Lacoste, E., Chaumont J.P., Mandin, D., Plumel, M.M. & Matos FJ. (1996) Antiseptic properties of essential oil of *L. sidoides Cham*. Application to the cutaneous microflora, *Annales Pharmaceutiques Francaises* 54, 228-230.
- Lemos, T.L.G., Craveiro, A.A., Alencar, J.W., Matos F.J.A., Clarck, A.M. & MacChesney J.D. (1990) Antimicrobial Activity of Essential Oil of Brazilian Plants. *Phytotherapy Research* 4, 82-84.
- Lima, K.C., Fava, L.R.G., Siqueira Jr, J.F. (2001) Susceptibilities of *Enterococcus faecalis* biofilms to some antimicrobial medications. *Journal of Endodontics* 27, 616-619.
- Mohamed, J.A., Huang, W., Nallapareddy, S.R., Teng, F. & Murray B.E. (2004) Influence of origin of isolates, especially endocarditis isolates, and various genes on biofilm formation by *Enterococcus faecalis*. *Infection and Immunity* 72, 3658-3663.
- Morais, S.M., Fernandes Filho, E.S., Matos, F.J.A., MACHADO, M.L.L., Soares, J.B. & Andrade, A.P.S. (1996) Óleos essenciais de plantas brasileiras: estudo químico, atividade bactericida e possível utilização em cimentos dentários. *Revista Brasileira Farmácia* 77, 42-44.
- Murray, B.E. (1990) The life and times of the *Enterococcus*. *Clinical Microbiological Review* 3, 46-65.
- Nakou, M., Kamma, J., Gargalianos, P., Laskaris G. & Mitsis, F. (1997) Periodontal Microflora of HIV Infected Patients with Periodontitis. *Anaerobe* 3, 97-102.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved standard, 5th ed., M100-S10 (M7), Wayne PA: NCCLS 2000.

National Committee for Clinical Laboratory Standards. Doc m2A8. Performance standards for antimicrobial Disk Susceptibility Tests. Approved Standard – Eighth edition Wayne PA 2003.

O'Toole, G., Kaplan, H.B. & Kolter, R. (2000) Biofilm formation as microbial development. *Annual Review Microbiology* 54, 49-79.

Ouhayoun, J.P. (2003) Penetrating the plaque biofilm: impacting of essential oil mouthwash. *Journal of Clinical Periodontology* 30 (Suppl 5), 10-12.

Pai, M.R., Acharya, L.D. & Udupa, N. (2004) Evaluation of antiplaque activity of *Azadirachta indica* leaf extract gel a 6-week clinical study. *Journal of Ethnopharmacology* 90, 99-103.

Parsek MR, Fuqua C. (2004) Biofilms 2003: Emerging themes and challenges in studies of surface-associated microbial life. *Journal of Bacteriology* 186, 4427-4440.

Pelling, A.E., Li, Y., Shi, W. & Gimzewski, J.K. (2005) Nanoscale visualization and characterization of *Myxococcus xanthus* cells with atomic force microscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 6484-6489.

Rams, T.E., Feik, D., Young, V., Hammond, B.F. & Slots, J. (1992) Enterococci in human periodontitis. *Oral Microbiology Immunology* 7, 249-252.

Sayles, R. S. 1992. The profile as a random process. In T. R. Thomas (ed.), *Rough surfaces*. Longman, London, England.

Spratt, D.A., Pratten J., Wilson M. & Gulabivala, K. (2001) An in vitro evaluation of the antimicrobial efficacy of irrigants on biofilms of root canal isolates. *International Endodontic Journal* 34, 300-307.

Tanzer, J.M., Reid, Y. & Reid, W. (1972) Method for preclinical evaluation of antiplaque agents. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 1, 376-380.

Yatsuda, R., Rosalen, P.L., Cury, J.A., Murata, R.M., Rehder, V.L. & Melo, L.V. (2005) Effects of Mikania genus plants on growth and cell adherence of mutans streptococci. *Journal of Ethnopharmacology* 97, 183-189.

Figure Legends:

Figure 1: Susceptibility of 8-day *E. faecalis* multiresistant and ATCC strains biofilm to *Lippia sidoides* essential oil 0.5% and NaOCl 2.5% over 10min.

Figure 2: AFM height images of (a) non-inoculated CNM, and (b) non-inoculated CNM in BHI agar blood plates (CNM-BHI)

Figure 3: AFM height images of (a) inoculated CNM in BHI agar blood plates at 8 days biofilm (CB8d), (b) CB8d after exposure to 10 min sterile solution, and (c) CB8d after exposure to 10 min 2.5% LSEO.

Figure 4: Frequency graphs and fit Gaussian for the R_a measurements of surface samples: (a) CNM-BHI, (b) CB8d, (c) CB8d-SS, and (d) CB8d-O.

Figure 5: Mean R_a of the surface of CNM-BHI, CB8d, CB8d-SS, and CB8d-O surface. Asterisks indicate that the mean values are not significantly different at 0.05 level.

Figure 1

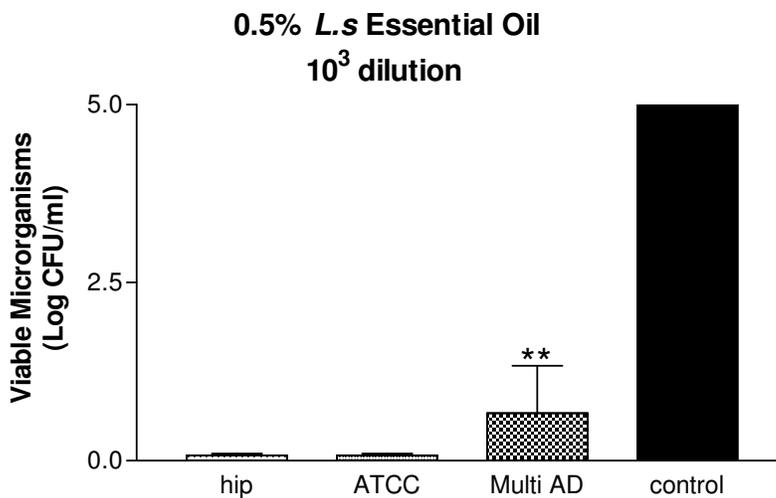


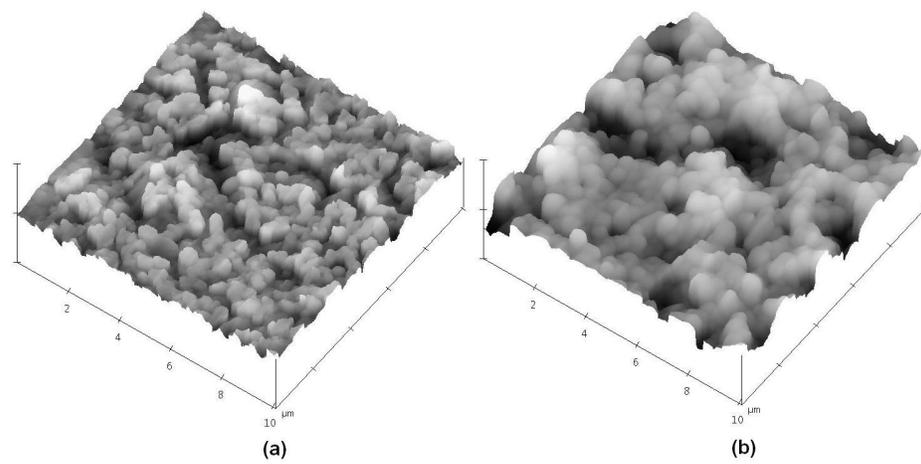
Figure 2:

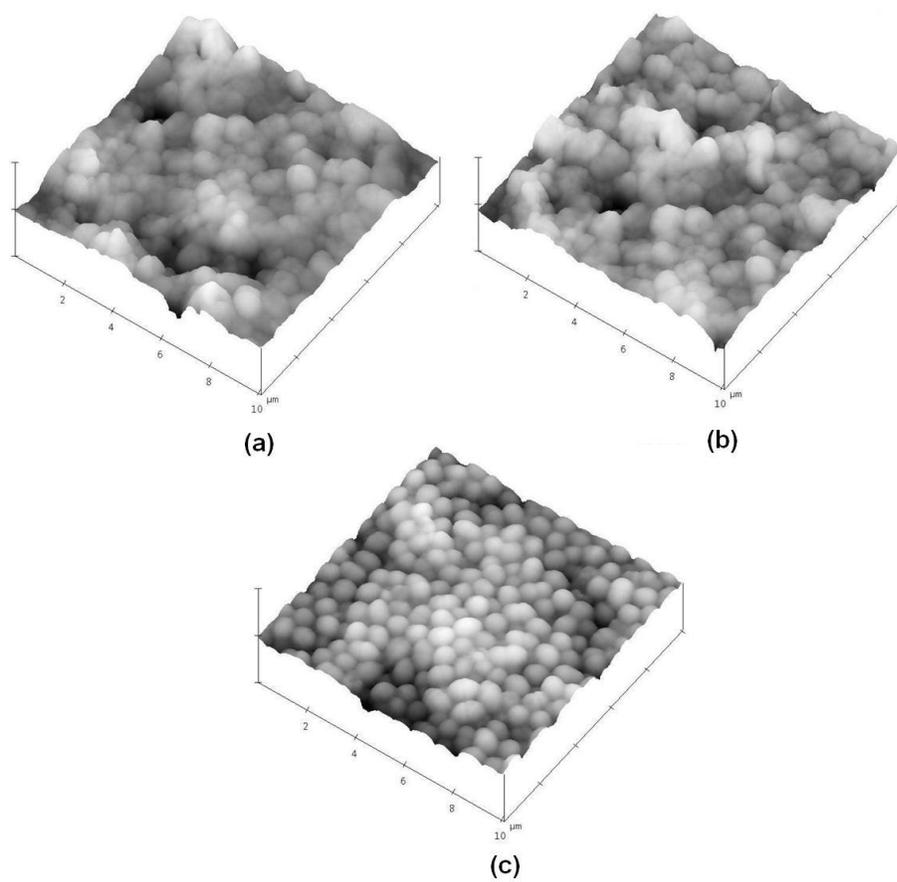
Figure 3:

Figure 4:

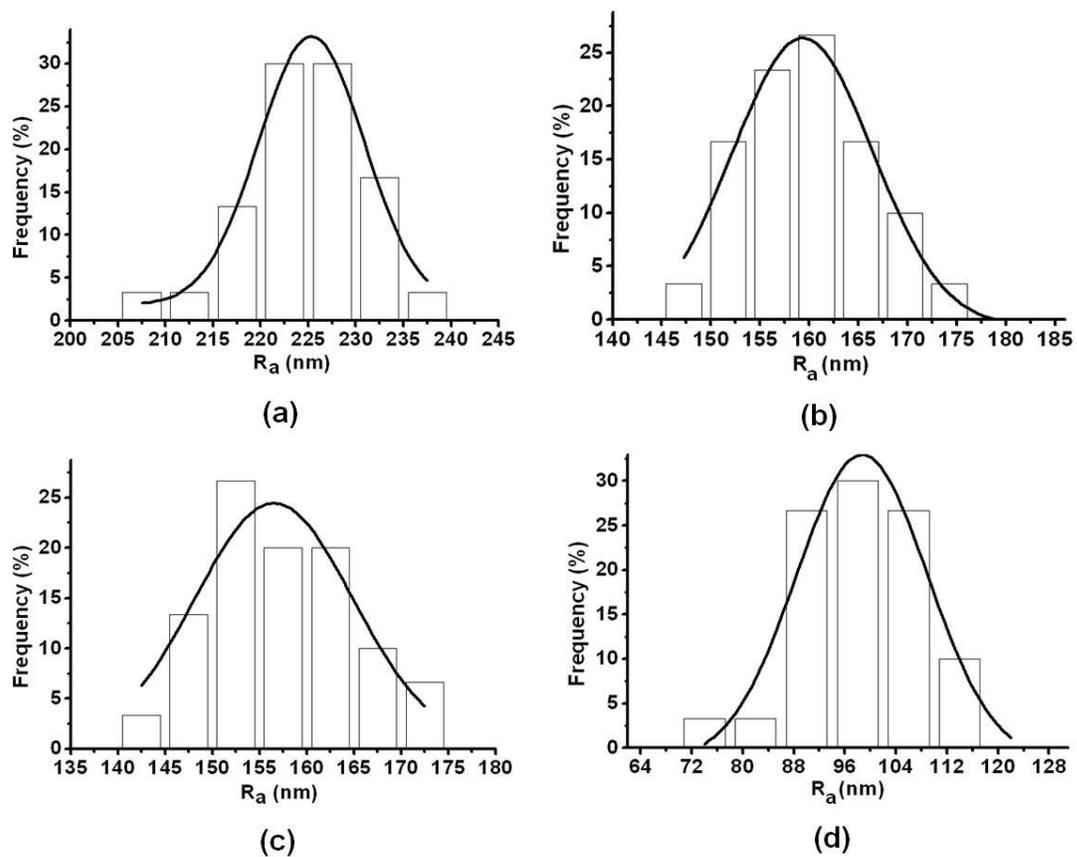
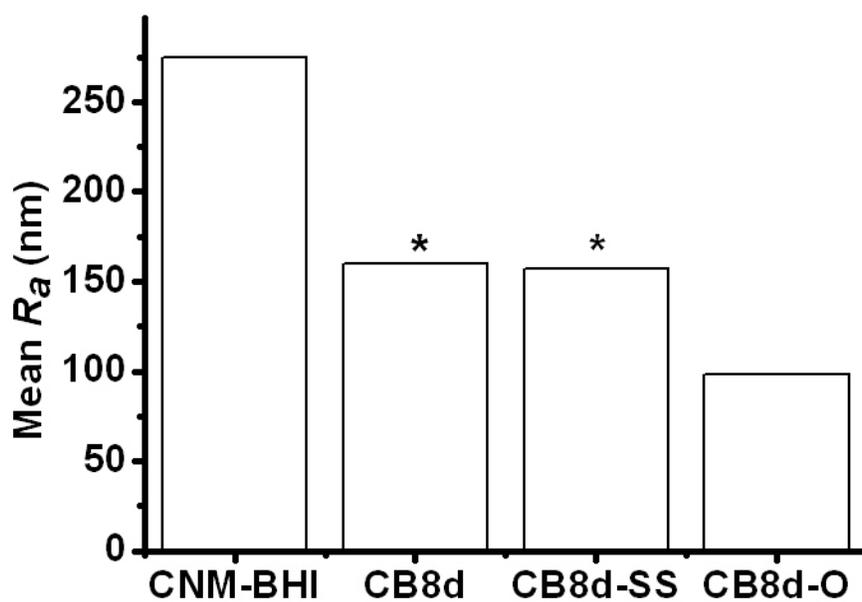


Figure 5:



Apêndice II

Aging of *Enterococcus faecalis* biofilms: observation of topographical changes by Atomic Force Microscopy

Ricardo P. Santos^{a,*}, Theodora T. P. Arruda^b, Cibele B. M. Carvalho^b, Victor A. Carneiro^c, Lara Q. V. Braga^c, Edson H. Teixeira^d, Benildo S. Cavada^c, Alexandre Havt^c, Taianá M. de Oliveira^c, Gustavo A. Bezerra^c, Valder N. Freire^{a,*}

^aDepartamento de Física, Universidade Federal do Ceará, Caixa Postal 6030, Campus do Pici, 60455-900 Fortaleza, Ceará, Brazil

^bDepartamento de Patologia e Medicina Legal, Universidade Federal do Ceará, Caixa Postal 6030, Campus do Pici, 60455-900 Fortaleza, Ceará, Brazil

^cLaboratório de Moléculas Biologicamente Ativas (Biomol-Lab), Universidade Federal do Ceará, Caixa Postal 6020, Campus do Pici, 60455-900 Fortaleza, Ceará, Brazil

^dFaculdade de Medicina/Sobral, Universidade Federal do Ceará, Av. Gerardo Rangel s/n, Campus do Derby, 62041-180 Sobral, Ceará, Brazil

* Corresponding author: Tel.: +55-85-3217-1551; Fax: +55-85-4008-9450
E-mail address: rpsantos2000@yahoo.com (Ricardo P. Santos) or valder@fisica.ufc.br (Valder N. Freire)

ABSTRACT

Biofilms are assemblages of microorganisms and their associated extracellular products at an interface and typically to an abiotic or biotic surface. The study of biofilm morphology is important because they are associated with processes of biofouling, corrosion, catalysis, pollutant transformation, dental caries, drug resistance, etc. Biofilms have been visualized by atomic force microscopy (AFM), which was proven to be a potent tool to characterize qualitative and quantitatively the aspects of biofilm/substratum interactions. In this work, we have used AFM to investigate topographical changes due to the aging process of *Enterococcus faecalis* biofilms, which were generated on sterile cellulose nitrate membrane (CNM) filters in brain heart infusion (BHI) broth agar blood plates, after 24, 36, 72, 192, and 360 hours. AFM height images showed topographic changes with aging, which were used to characterize several aspects of the bacterial surface such as the presence of extracellular polymeric substance, and the biofilm age. The mean roughness (R_a) was shown to quantify the general topographic changes in the biofilm surface due to aging, highlighting the AFM technique power for a quantitative and qualitative non destructive study of the *Enterococcus faecalis* biofilm surface.

Keywords: AFM, biofilm, cellulose nitrate membrane, *Enterococcus faecalis*, EPS, Mean roughness, topographical behavior.

INTRODUCTION

A biofilm is a complex aggregation of microorganisms marked by the excretion of a protective and adhesive matrix, which is composed of excreted polymeric compounds called EPS (extracellular polymeric substance or exopolysaccharide), that protects the cells within it and facilitates communication among them through biochemical signals. EPS forms water channels that help distribute nutrients and signaling molecules. Biofilms are characterized by surface attachment, structural heterogeneity, genetic diversity, complex community interactions, and the EPS presence (Allison et al, 2000).

Bacteria have more than one way to make a biofilm. It seems likely that the particular environmental stimuli (growth media or the substratum, etc) trigger different developmental pathways, all culminating with the same end point, a mature biofilm (O'Toole, 2003).

Several studies have focused on the process of biofilm formation of single species. This process, in general, may be subdivided in the following steps (Fig. 1): (a) initial adherence to the surface, (b) microcolony formation, (c) maturation of microcolonies into a biofilm containing the EPS matrix, (d) biofilm growth (Beveridge and Grahan, 1991).

Biofilms were perceived as unstructured accretions of bacterial cells, surrounded by the cells exopolysaccharide matrices for the first decade (1978 to 1990) following the discovery of their importance and ubiquity. These perceptions were based on flawed techniques for direct biofilm observation, in that electron microscopy required complete dehydration of the highly hydrated biofilm matrices, and in that light microscopy was badly distorted by out-of-focus effects. The confocal laser scanning microscope (CLSM) was invented in 1950's, but it was never used to study bacteria because the whole field was fixated on the planktonic phenotype. CLSM produces optical slices of complex structures, so that out-of-focus effects hardly happen. It requires no sample preparation, so that living organisms can be observed if fluorescence is used in order to visualize the cells. The first examination of living biofilms using CLSM produced a whole series of revelations that are the basis of current biofilm concepts (Donlan and Costerton, 2002).

Kristich et al. (2004) analyzed by scanning electron microscopy the biofilm development by an esp-negative *E. faecalis* strain in the chemostat-based biofilm fermentor and described the biofilm characteristics in 4, 8, and 24 hours. The results showed that biofilm formation progresses through each of the following stages: initial attachment of individual cells (2.4 hours); microcolony formation (2.8 hours); and development into a mature biofilm with complex architecture containing void spaces, presumably corresponding to water channels (20 hours).

Atomic force microscope (AFM) has enabled researchers to visualize the cell surface architecture from several organisms, including bacteria, yeasts and viruses (Morris et al, 1999; Camesano et al, 2000; Ahimou, et al, 2002). AFM images are generated by sensing the force between a sharp tip and sample surface, supplying surface morphological and physical information in a nondestructive manner (Bustamante and Keller, 1995; Hansma and Pietrasanta, 1998; Dufrêne, 2002). Two main techniques, contact and tapping modes, are available to AFM imaging of surfaces. Contact measures topography by sliding the probe tip across the sample surface. The tapping mode measures topography by tapping the surface with an oscillating tip. Tapping is more used in biologic surfaces because it eliminates shear forces, which can damage soft samples (Binnig et al., 1986; Jena and Horber, 2002). The major advantages of the use of AFM are the ability to cover the magnification range of both optical and electron microscopy, but under natural imaging conditions with minimal sample preparation, and the production of quantifiable 3D images of the surfaces.

Biofilms have been visualized by AFM, which has been proved to be a potent tool to characterize, qualitative and quantitatively, several aspects of biofilm/substratum interactions (Beveridge and Graham, 1991; Beech et al., 2002; Dufrêne, 2004; Parsek and Fuqua, 2004). Razatos and co-workers (1998) showed that the adhesion force measured by AFM is affected by the length of core lipopolysaccharide molecules on the *E. coli* cell surface. Auerbach and collaborators (2000) studied physical morphology and surface properties of unsaturated *Pseudomonas putida* biofilms by AFM, determining roughness and adhesion forces in the outer and basal cell layers of fresh and desiccated biofilms. Camesano and Abu-Lail (2002) analyzed the heterogeneity in bacterial surface macromolecules of *Pseudomonas putida* KT2442 via single-molecule force spectroscopy (SMFS), using AFM. Junior and Teschke (2005) monitored the dynamics of the antimicrobial peptide PGLa action on *Escherichia coli* through AFM analyses: height images, roughness, and force curves measurements.

Enterococci are Gram-positive cocci which often occur in pairs (diplococci) and are difficult to distinguish from *Streptococci* on physical characteristics alone (Fischetti et al, 2000). They are widespread in nature and can be found in soil, water, food, plants and animals. Several intrinsic characteristics of the genus *Enterococcus* allow them to grow almost everywhere and survive in harsh environments. Important clinical infections caused by *Enterococcus* include urinary tract infections, bacteremia, bacterial endocarditis, diverticulitis, and meningitis (Pelletier,1996). Among the enterococcal species described so far, *Enterococcus faecalis* is usually the most frequent in human clinical specimens. A number of infections caused by *E. faecalis* strains have been proved to be particularly difficult to treat

with current antibiotic therapies, partly due to their intrinsic antibiotic resistance, their promiscuity in acquisition and dissemination of mobile genetic antibiotic resistance elements, and their capacity of growing in a biofilm (O'Toole et al., 2000, George et al, 2005).

In clinical studies, biofilms have been implicated as etiological agents of chronic infections. *E. faecalis* biofilms have been described on dental root canals, urethral catheters and stents and heart valves (Carniol and Gilmore, 2004; Mohamed et al, 2004).

The purpose of this work was to investigate, by atomic force microscopy, the topographical changes of *Enterococcus faecalis* biofilms surface during the aging process after 24, 36, 72, 192, and 360 hours. Height images, section graphics, and roughness analyses were performed on biofilms grown in cellulose nitrate membrane.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Sample preparation. *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212 / Culti-loops-OXOID) was inoculated onto brain heart infusion (BHI) broth from stock at 2-8°C and incubated at 37°C. Biofilms were generated on sterile cellulose nitrate membrane filters (CNM) of 0.22 µm pore size, 13 mm diameter size (Millipore), and were handled under sterile conditions until prior to imaging. The inoculum was prepared in a liquid medium as follow described. A volume of 50 µl of fresh BHI broth grown bacteria was adjusted to the turbidity of 6 MacFarland (optical density at 600 - 2.27 nm) and inoculated onto the membranes placed on BHI agar blood plates (5% defibrinated sheep blood). The plates were incubated aerobically for 24 hours (Abdullah et al., 2005). In order to study the aspects of aging of the biofilm, the inoculated membrane filters (ICNM) were placed on BHI agar blood plates (5% defibrinated sheep blood) and incubated aerobically at 24, 36, 72, 192, and 360 hours, and used in the AFM measurements.

AFM operation. To perform AFM height images, samples of CNM, CNM in solid agar medium and BHI (CNM-BHI) for 24, 36, 72, 192 and 360 hours (M24, M36, M72, M192 and M360, respectively) were air-dried for 5 min, cut, and putted on steel sample disks covered with double-side adhesive. Sample surfaces were scanned in air with a Nanoscope IIIa Multimode AFM (Digital Instruments, Santa Barbara, CA, U.S.A.) by tapping mode at a scan of about 0.400 Hz, resonance frequencies of ca. 200 to 380 kHz, with crystal silicon cantilevers (Digital Instruments) at spring constant of approximately 40 N/m, and tip radius of 15 nm. The scan sizes performed were 30 x 30 µm and 10 x 10 µm. AFM scan controls were properly adjusted (sufficient contact force and high gains) to avoid tip artifacts during the scanning of the samples. The images were processed with Nanoscope software (Digital Instruments) version 5.12 r3.

Section graphics. We have used Nanoscope software to plot section graphics for the height images with scan size of 30 x 30 μm . In the section graphics, a cross-section line can be drawn across any part of the image, and the vertical profile along that line is displayed (Digital Instruments, 2001). The z-size image was scaled up to 1500 nm and the sections were made in the image central region, parallel to the x-axes.

Roughness analysis. We have used Nanoscope software to calculate the surface roughness for the AFM height data with scan size of 30 x 30 μm . Thirty regions (per sample) were randomly chosen to the determination of the mean roughness (R_a). The R_a represents the arithmetic mean of the deviations from the center plane, conform the following relation (Digital Instruments, 2001; Sayles, 1982):

$$R_a = \frac{\sum_{i=1}^N |z_i - z_{ref}|}{N},$$

where Z_{cp} is Z value of the center plane, and z_i is the current z value, and N is the number of points within a given area.

Statistical analysis. Statistic data analysis was based on the descriptive statistic - mean value, standard deviation (SD), and standard error (SE); the Shapiro-Wilk test, to determinate whether or not a random sample of values follows a normal distribution; and hypotheses test, to verify the existence or not of significant differences between groups (Lindman, 1974; Lehman, 1975; Mendenhall, 1990). The significance level used was 0.05. All the statistic treatment was performed using Excel 2002 software.

RESULTS AND DISCUSSION

Figures 2a and 2b depict the AFM images obtained on CNM with two different resolutions. They show the rough topography formed by projections similar to polipos of polymer material. The porous and irregular surface of the nitrocelulose membrane is evidenced in the section graphic (Fig. 2c).

The solution used as culture medium (BHI) may be observed over the CNM-BHI surface on Figures 3a and 3b in the form of globular structures with average diameter of 500 nm (arrows on Fig. 3b) adhered to the CNM. The section graphic on Figure 3c shows alterations on the transversal cut of the membrane, due to the presence of BHI. These alterations can be seen as an enhancement of peak heights on the tranversal cut. BHI has formed a complex and organized net throughtout the porous structure of the membrane, which permits diffusion of the nutritive medium to surface regions.

After 24 hours of bacterial growth (M24), several *E. faecalis* cells covered the surface of the membrane (Fig. 4a). Spheroid bacteria cells (asterisks on Fig. 4b) in many

growth stages and the presence of some transversal septa (arrows on Fig. 4b), characteristic of cell division processes, could be observed. The homogenous and smooth aspect of the bacterial cells (characteristic of peptidoglycan of Gram-positive bacteria), the clear distinction of the cell limits, and transversal septa are evidences of the reduced amount of EPS over the surface, which is likely a consequence of the biofilm formation being at really early stage, the adhesion phase.

After 36 hours of growth (M36), AFM images of the inoculated membrane (Fig. 5a and 5b) were partially obscure due to presence of EPS uniformly distributed, consolidating the biofilm formation. Depressions associated to the presence of microcolonies (circle on Fig. 5a) were also observed. The reduction on the surface roughness (when compared to the one submitted to 24 h-growth), showed in the section graphic (Fig. 5c) is indicative of a young biofilm and the little influence of the porosity on the irregularity of the biofilm surface. Probably this stage corresponds to the maturation of the microcolonies with EPS production.

After 72 hours of growth (M72), it was observed the appearance of an EPS net (Fig. 6a) that covered cells from earlier stages (< 72 hours). Very few bacteria were observed at the surface. The presence of channels (arrows on Fig. 6b) and interstitial spaces (plus signs on Fig. 6b) are evident and clearly seen as part of the biofilm structure. The non obscure surface and well-defined contours of the few bacteria present on it indicates a low amount (or absence) of EPS over its cell wall (peptidoglycan). This is a characteristic feature of young cells probably originated from those below the extra cellular net. The section graphic shows the profile of this biofilm development stage (Fig. 6c), with increase of the irregularity when compared to the one with 36 hours growth, due to the interstitial spaces presented by the EPS net. This phase may represent early stages of biofilm growth.

After 192 hours of growth (M192), islands of bacterial aggregates (microcolonies) and depressions are observed over the surface. Several cells can be seen over the EPS net, which presents even more visible regions (arrows on Fig. 7a). The aspect of “cotton balls” of the bacterial cells is accounted for the great amount of extracellular material deposited over the surface (Fig. 7b). The graphic section (Fig. 7c) shows few differences from the one with 72 hours of growth.

After 360 hours of growth (M360), a highly complex biofilm formed over the surface (Fig. 8a). Bacterial cells cannot be distinguished, because they are covered by large quantity of EPS. Spine-like structures can be noticed (Fig. 8b), making difficult to acquire height data. Irregularity of surface increased substantially when compared to the one with 192 hours growth, as it can be seen in the section graphic (Fig. 8c). At this point, the biofilm is completely developed and has full potential to grow.

Figure 9 shows graphics with the distribution of the mean roughness values frequency to CNM, CNM-BHI and M24-M360 (experimental groups) with scan size of 30 x 30 μm . The mean value and standard deviation (σ) of R_a are presented at Table 1. Shapiro Wilk tests resulted in normal distributions for all experimental groups. The ANOVA test (Turkey pad hoc) was used to verify significant differences among the means. All groups, except CNM and M72, presented significant differences means. The increase of 65.91 nm on R_a mean value from CNM to CNM-BHI was due to the presence of globules in the growth solution (BHI); the reduction of 165.77 nm from CNM-BHI to M24, to the presence of bacterial cells over the surface; the reduction of 11.95 nm from M24 to M36, to the formation of EPS; the increase of 110.92 from M36 to M72, to the presence of the EPS net, with interstices and channels; the reduction of 19.74 nm from M72 to M192, to the bacterial growth above the EPS net and, finally; the increase of 374.31 nm from M192 to M360 was due to biofilm growth. The statistical equality between CNM and M72 means is not relevant, since they represent qualitatively different states (with and without bacteria). The alterations were happened over the nitrocellulose membrane with BHI (CNM) and the modifications compared to its topography are the ones considered important.

Figure 10 shows the mean R_a bar graphic of CNM-BHI and M24-360. Accordingly, the roughness measurements can be used to characterize unequivocally the several stages involved in biofilm establishment and its structure:

- 24 hours - Little or non EPS. Cell limits and septa are distinguishable (roughness is determined bacterial disposition over the surface). Adhesion phase;
- 36 hours - Young biofilm consolidated. Bacterial Cells are partially obscured (little roughness reduction on account of EPS formation).
- 72 hours – EPS net, with few bacteria at the surface (roughness enhancement caused by great amount of interstitial spaces all over the net);
- 192 hours - Establishment of bacterial microclonies above the EPS net. Cotton ball-like cells appear in consequence of EPS deposition over their surfaces (roughness diminishes since the interstices are coated by EPS);
- 360 hours – EPS-rich biofilm, forming sine-like structures. Impossibility to distinguish bacterial cells (expressive roughness enhancement). Biofilm with full growth potential.

CONCLUSIONS

Biofilm investigations are very important in modern medicine, because they may have high impact over the treatment of infectious diseases through antibiotics. Pathogenic bacteria rarely exist in the form of pure planktonic cultures. They prevail adhered to surfaces within a highly complex ecosystem represented by a structured biofilm established inside the host. Bacterial biofilms can be more resistant to antibiotics than the pure culture (Gilbert et al., 1997). Thus, any investigation involving clinical infections caused by bacteria should take into account the formation of biofilm. A complete understanding of biofilms requires a deep knowledge of their structures and physical properties. In this work, we have discussed the development of *Enterococcus faecalis* biofilm using atomic force microscopy as a tool to characterize its microstructure. We have shown that AFM is a powerful and non destructive technique to perform qualitative studies (height images), as well as quantitative studies (roughness measures) on the evolution of the biofilm surface, permitting a distinction between different development stages and topographic structures. This study opens the possibility of studying the effect on antibacterial agents over biofilm topography, providing relevant data to treatment of bacterial infection.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to thank the professors, technicians and students of the, Laboratories of Microbiology, Atomic Microscopy and Biologically Active Molecules (BIOMOL-Lab), of the Federal University of Ceará, CE, Brazil, for the physical infrastructure, technical support and important suggestions for the elaboration of this work. We would also like to thank the National Council of Research (CNPq) for the financial support. Benildo S. Cavada and Valder N. Freire are senior investigators of CNPq (Brazil). This work received partial financial support from CNPq - Rede NanoBioestruturas 555183/2005-0.

REFERENCES

- Abdullah, M., McClintock, Yuan-Ling Ng, Gulabivala K, Moles D.M., Spratt D.A. (2005). Susceptibilities of two *Enterococcus faecalis* phenotypes to root canal medications. *Journal of Endodontics* 31, 30-36.
- Ahimou, F., Denis, F.A., Touhami, A., Dufrière, Y.F. (2002). Probing microbial cell surface charges by atomic force microscopy. *Langmuir* 18, 9937-9941.
- Allison, D. G.; Gilbert, P.; Lappin-Scott, H. M.; and Wilson, M. (eds) (2000). *Community Structure and Co-operation in Biofilms*. Cambridge, UK: Cambridge University Press.
- Auerbach, I.D., Sorensen, C., Hansma, H.G., Holden, P.A. (2000). Physical Morphology and Surface properties of unsaturated *Pseudomonas putida* biofilms. *J. Bacteriol.* 182, 3809-3815.
- Beech, I.B. Smith, J.R., Steele A.A., Penegar, I., Campbell, S.A. (2002). The use of atomic force microscopy for studying interactions of bacterial biofilms with surfaces. *Coll. Surf. Biointerfaces* 23, 231-247.
- Beveridge, T.J., Grahan, L.L. (1991). Surface layers of bacteria. *Microbiol. Rev.* 55, 684-705.
- Binnig, G., Quate, C.F., Gerber, C. (1986). Atomic Force Microscope. *Phys. Rev. Lett.* 56, 930-933.
- Bustamante, C., Keller, D. (1995). Scanning force microscopy in biology. *Phys. Today* 48, 32-38.
- Camesano, T.A., Natan, M.J., Logan, B.E. (2000). Observation of changes in bacterial cell morphology using tapping mode atomic force microscopy. *Langmuir* 16, 4563-4572.
- Camesano, T.A., Abu-Lail, N.I. (2002). Heterogeneity in bacterial surface polysaccharides, probed on single-molecule basis. *Biomacromolecules* 3, 661-667.
- Carniol, K., Gilmore, M.S. (2004). Signal transduction, quorum – sensing and extracellular protease activity in *Enterococcus faecalis* biofilm formation. *J. bacterial* 186, 8161-8163.
- Casemano, T.A., Natan, M.J., Logan, B.E. (2000). Observation of changes in bacterial cell morphology using tapping mode atomic force microscopy. *Langmuir* 16, 4563-4572.
- Digital Instruments Veeco Metrology Group. (2001). *Command Reference Manual – Software version 5.12 r3*.
- Donlan, R.M., Costerton, J.W. (2002). Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin. Microbiol. Rev.* 15, 167-193.
- Dufrière, Y.F. (2002). Atomic Force Microscopy, a Power Tool in Microbiology. *J. Bacteriol.* 184, 5205-5213.
- Dufrière, Y.F. (2004). Refining our perception of bacterial surfaces with the atomic force microscope. *J. Bacteriol.* 186, 3283-3285.

- Fischetti, V. A.; Novick, R. P.; Ferretti, J. J.; Portnoy, D. A.; Rood, J. I. (editors) (2000). Gram-Positive Pathogens. ASM Press.
- George, S., Kisben, A., Song, K.P. (2005). The role of environmental changes on monospecies biofilm formation on root canal wall by *Enterococcus faecalis*. J. Endodon 31, 867-872.
- Gilbert, P.J., Das, J., Foley, I. (1997). Biofilms susceptibility to antimicrobials. Adv. Dent. Res. 11, 160-167.
- Hansma, H.G., Pietrasanta (1998). Atomic force microscopy and others scanning probe microscopies. Curr. Opin. Chem. Biol. 2, 579-139.
- Jena, B.P., Horber, J.K.H. (editors) (2002). Methods in Cell Biology: Atomic Force Microscopy Cell Biology, Academic Press, California, USA 68.
- Junior, A.S., Teschke, O. (2005). Dynamics of the antimicrobial peptide PGLa action on *Escherichia coli* monitored by atomic force microscopy. World Journal of Microbiology & Biotechnology 21, 1103-1110.
- Kristich, C.J., Li Yung-Hua, Cvitkovitch, D.G., Dunny, G.M. (2004). Esp-independent biofilm formation by *Enterococcus faecalis*. J. Bacteriol. 186, 154-163.
- Lehman, E.L. (1975). Nonparametrics: Statistical Methods Bases on Ranks. Holden-Day, Inc., San Francisco.
- Lindman, H.R. (1974). Analysis of Variance in Complex Experimental Designs. W. H. Freeman Company, San Francisco.
- Mendenhall, W., Wackerly, D.D., Scheaffer, R.L. (1990). Mathematical Statistics with Applications. PWS-Kent Publishing Company, Boston.
- Mohamed, J.A., Huang, W., Nallapareddy, S.R., Teng, F., Murray, B.E. (2004). Influence of origin of isolates, especially endocarditis isolates, and various genes on biofilm formation by *Enterococcus faecalis*. Infect. Immun. 72, 3658-3663.
- Morris, V.J., Kirby, A.R., Gunning, A.P. (ed.) (1999). Atomic force microscopy for biologists. Imperial College Press, London, United Kingdom.
- O'Toole, G. (2003). To build a biofilm. J. Bacteriol. 185, 2687-2689.
- O'Toole, G., Kaplan, H.B., Kolter, R. (2000). Biofilm formation as microbial development. Annu. Rev. Microbiol. 54, 49-79.
- Parsek, M.R., Fuqua, C. (2004). Biofilms 2003: emerging themes and challenges in studies of surface-associated microbial life. J. Bacteriol. 186, 4427-4440.
- Pelletier, L.L.Jr. (1996). Microbiology of the Circulatory System. In: Baron's Medical Microbiology (Barron S et al, eds.), 4th ed., Univ of Texas Medical Branch. (via NCBI Bookshelf).

Razatos, A., Ong, Y., Sharma, M.M., Georgiou, G. (1998). Molecular determinants of bacterial adhesion monitored by atomic force microscopy. Proc. NBatl. Acad. Sci. USA 95, 11059-11064.

Sayles, R.S. (1982). The profile as a random process: rough surfaces. Longman, London, England.

Tables

Table 1. Mean value and standard deviation (σ) of R_a to CNM, CNM-BHI, and M24-360 surfaces. Scan size of 30 x 30 μm and height scale of 2000 nm.

	CNM	CNM-BHI	M24	M36	M72	M192	M360
Mean R_a	188.77	254.68	88.23	76.28	186.57	166.83	541.14
σ	4.24	6.57	5.63	9.99	10.38	10.41	35.60

Figure legends

Figure 1. Schematics of biofilm formation over a solid substrate.

Figure 2. AFM images of CNM samples with scanning of 30 x 30 μm (a) and 10 x 10 μm (b). The section graphic in (c) shows a transversal cut of 30 μm on the membrane. Height scale: 1408 nm (a), 1324 nm (b) and 1500 nm (c).

Figure 3. AFM images of CNM-BHI samples with scanning of 30 x 30 μm (a) and 10 x 10 μm (b). The arrows in (b) indicate globular structures deriving from culture media. The section graphic in (c) shows alteration of the membrane topography due to the presence of BHI. Height scale: 1687 nm (a), 1457 nm (b) and 1500 nm (c).

Figure 4. AFM images of M24 samples with scanning of 30 x 30 μm (a) and 10 x 10 μm (b). The asterisks in (b) indicate bacterial cells, while the arrows point to transversal septa. The section graphic in (c) shows the alteration of the membrane topography on account of the presence of bacterial cells. Height scale: 837.7 nm (a), 510.9 nm (b) and 1500 nm (c).

Figure 5. AFM images of M36 samples with scanning of 30 x 30 μm (a) and 10 x 10 μm (b). A circle in (a) indicates the presence of a microcolony. The section graphic in (c) show a clear reduction of the roughness of the surface. Height scale: 900.2 nm (a), 461.9 nm (b) and 1500 nm.

Figure 6. AFM images of M72 samples with scanning of 30 x 30 μm (a) and 10 x 10 μm (b). The asterisks, arrows and plus sign (b) indicate young bacterial cells, channels and interstitial

spaces in the EPS net, respectively. The section graphic in (c), indicates this surface profile. Height scale: 2585 nm (a), 1416 nm (b) and 1500 nm (c).

Figure 7. AFM images of M192 samples with scanning of 30 x 30 μm (a) and 10 x 10 μm (b). The circle in (a) indicates the presence of one of the microcolonies “islands” present in the surface and the arrows, the presence of some EPS net interstitials. The surface profile is shown in the section graphic (c). Height scale: 2268 nm (a), 1234.3 nm (b) and 1500 (c).

Figure 8. AFM images of M360 samples with scanning of 30 x 30 μm (a) and 10 x 10 μm (b). The arrows in (b) indicate the presence of some spine-like in the surface. The section graphic in (c) shows a significant increase of the surface irregularity. Height scale: 5159.6 nm (a), 2732.8 nm (b) and 1500 nm.

Figure 9. Frequency graphics of R_a values from the surfaces of CNM (a), CNM-BHI (b), M24 (c), M36 (d), M72 (e), M192 (f) and M360 (g) membrane samples.

Figure 10. Mean value of $R_a (\pm SE)$ from the surface of CNM-BHI and M24-M360 membrane samples. The roughness measures distinguished the different alterations in the surface topography of nitrocellulose membrane: BHI globular structures adhesion (a); bacterial adhesion (b); EPS formation (c); EPS net (d); bacterial growth over EPS net (e); and biofilm growth (f).

Figures

Figure 1

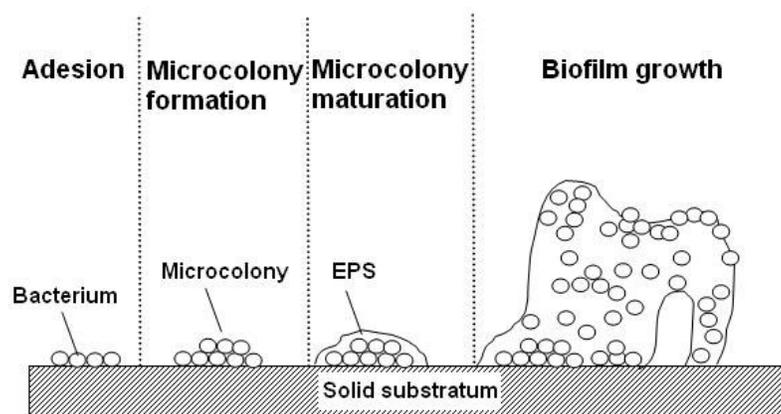


Figure 2

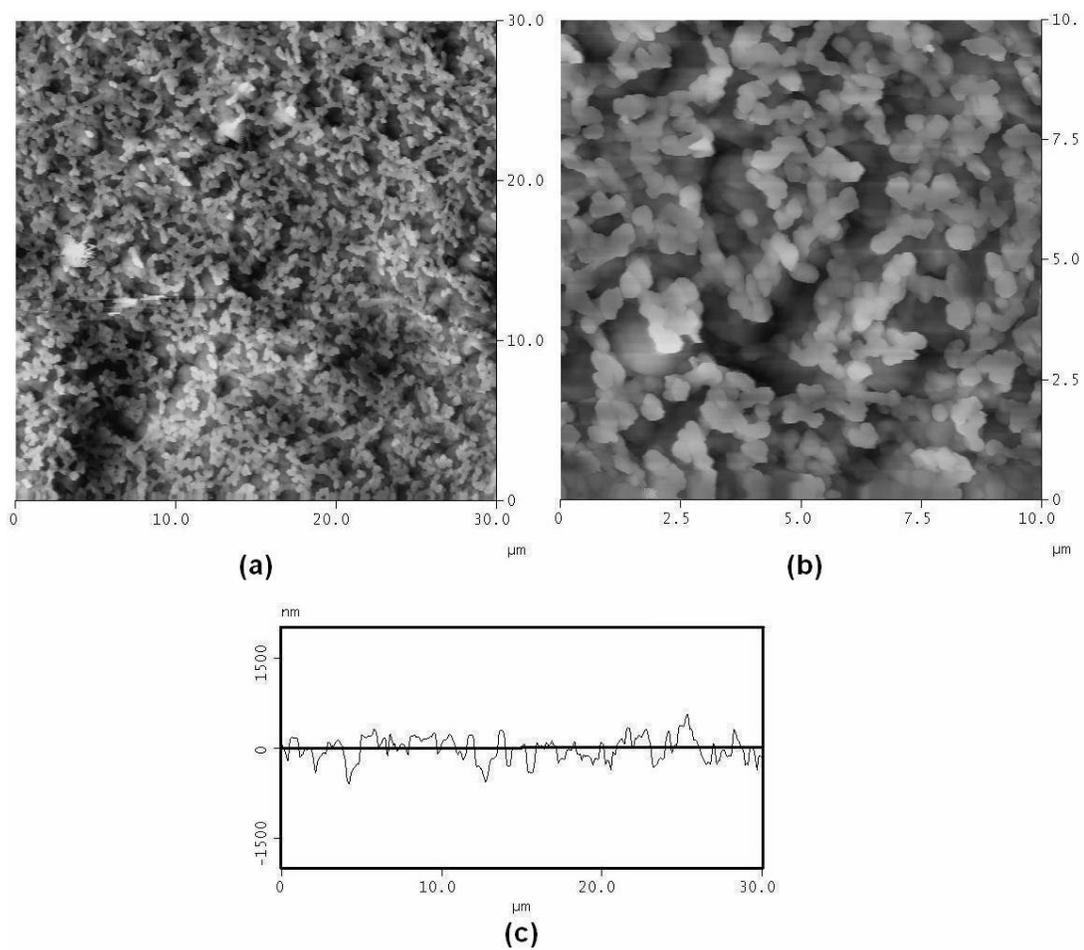


Figure 3

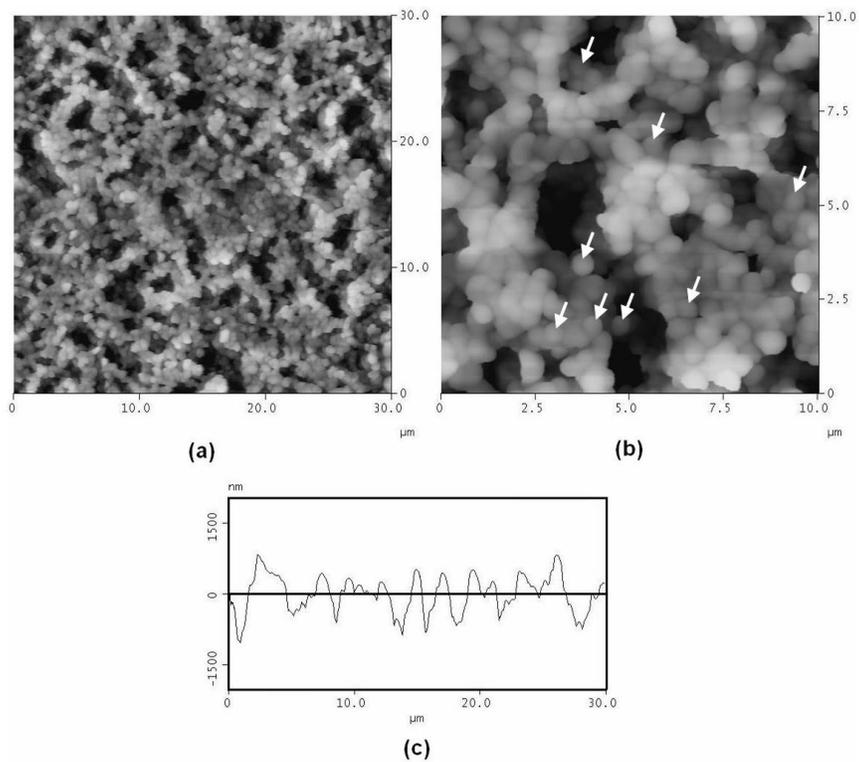


Figure 4

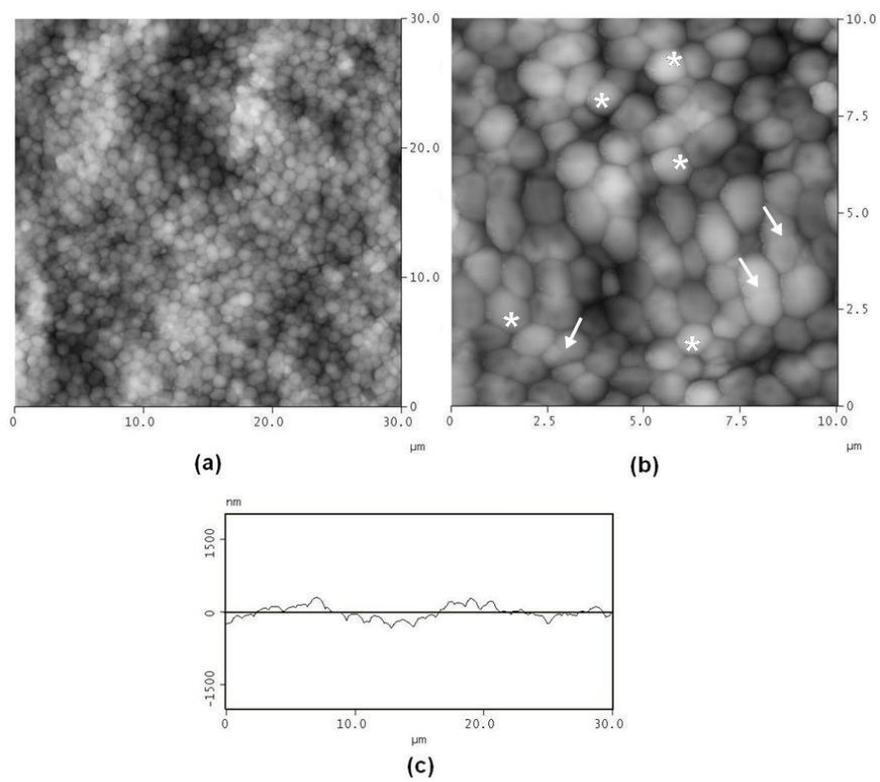


Figure 5

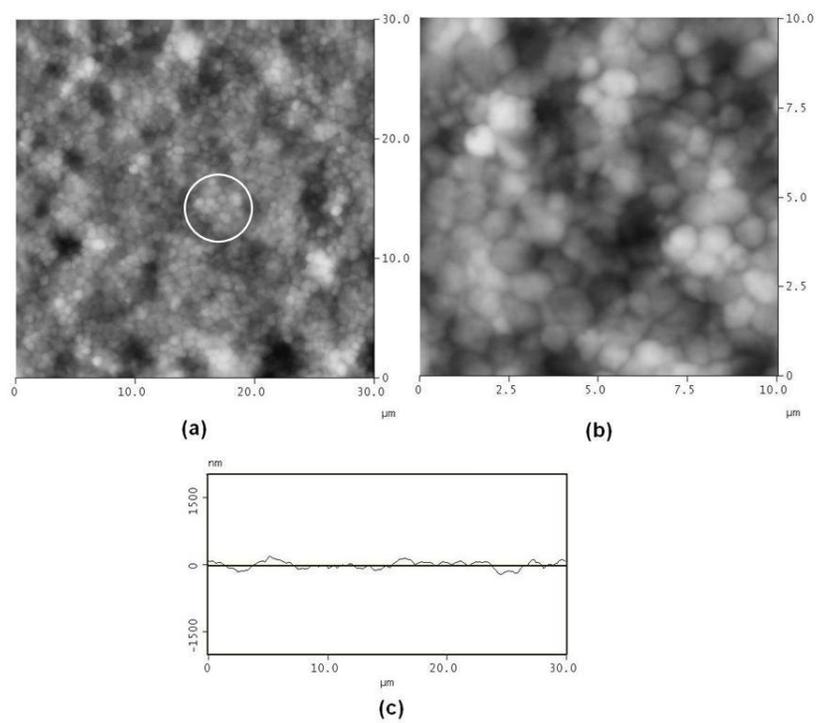


Figure 6

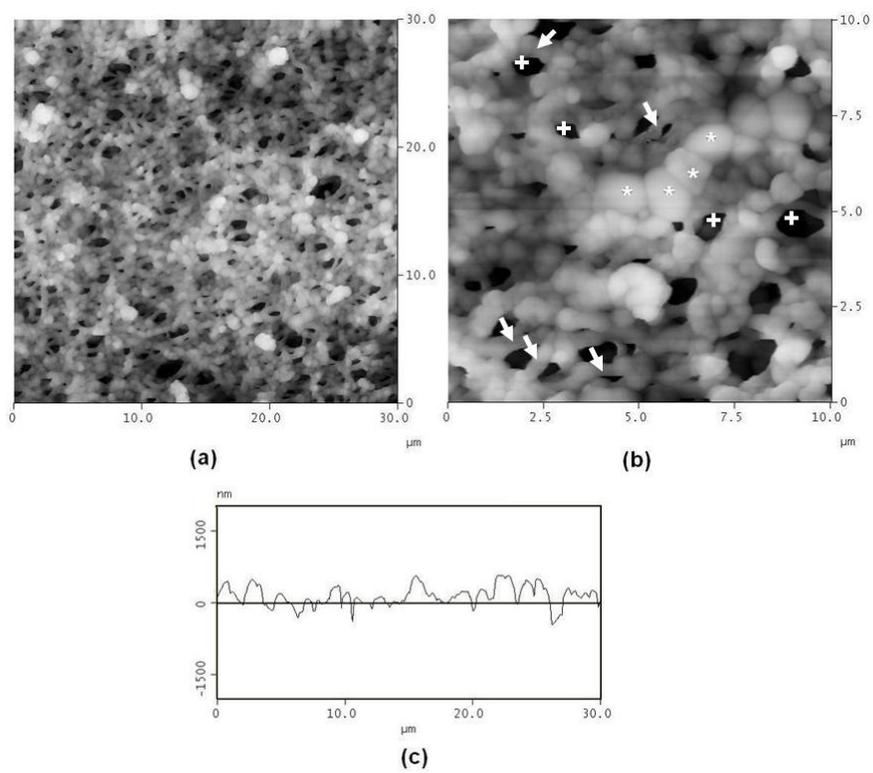


Figure 7

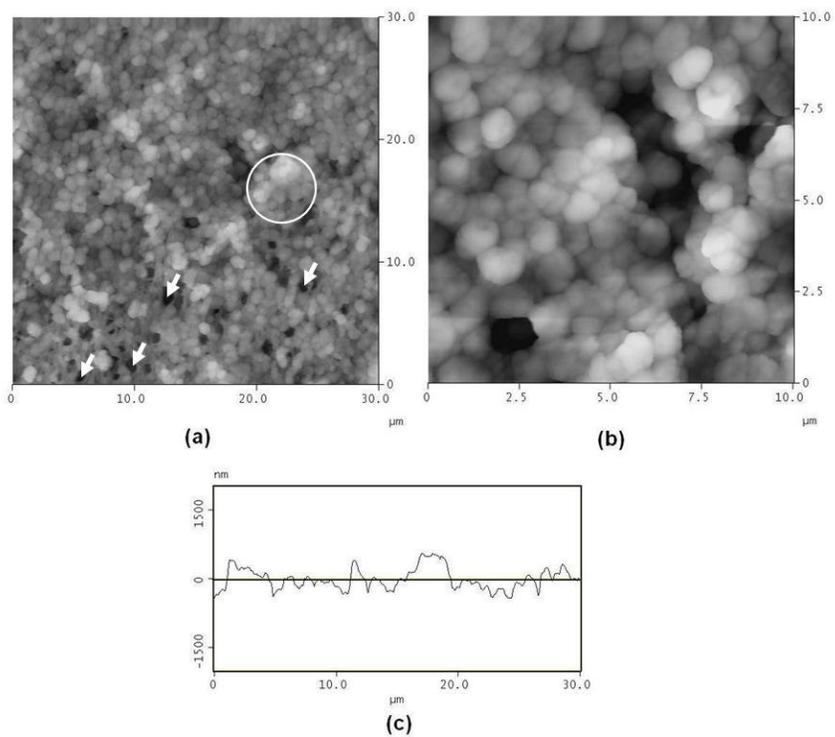


Figure 8

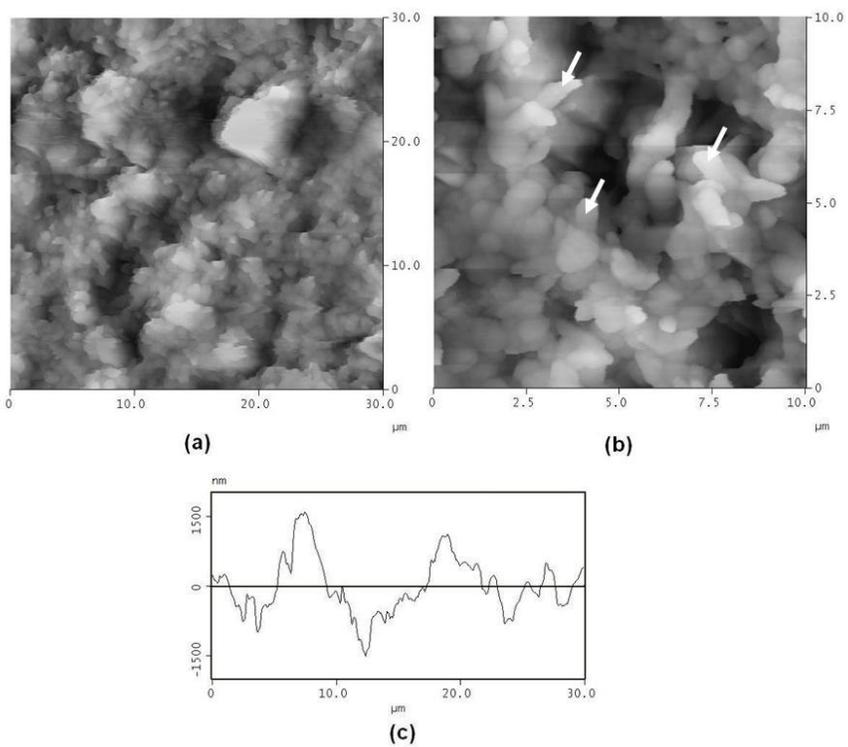


Figure 9

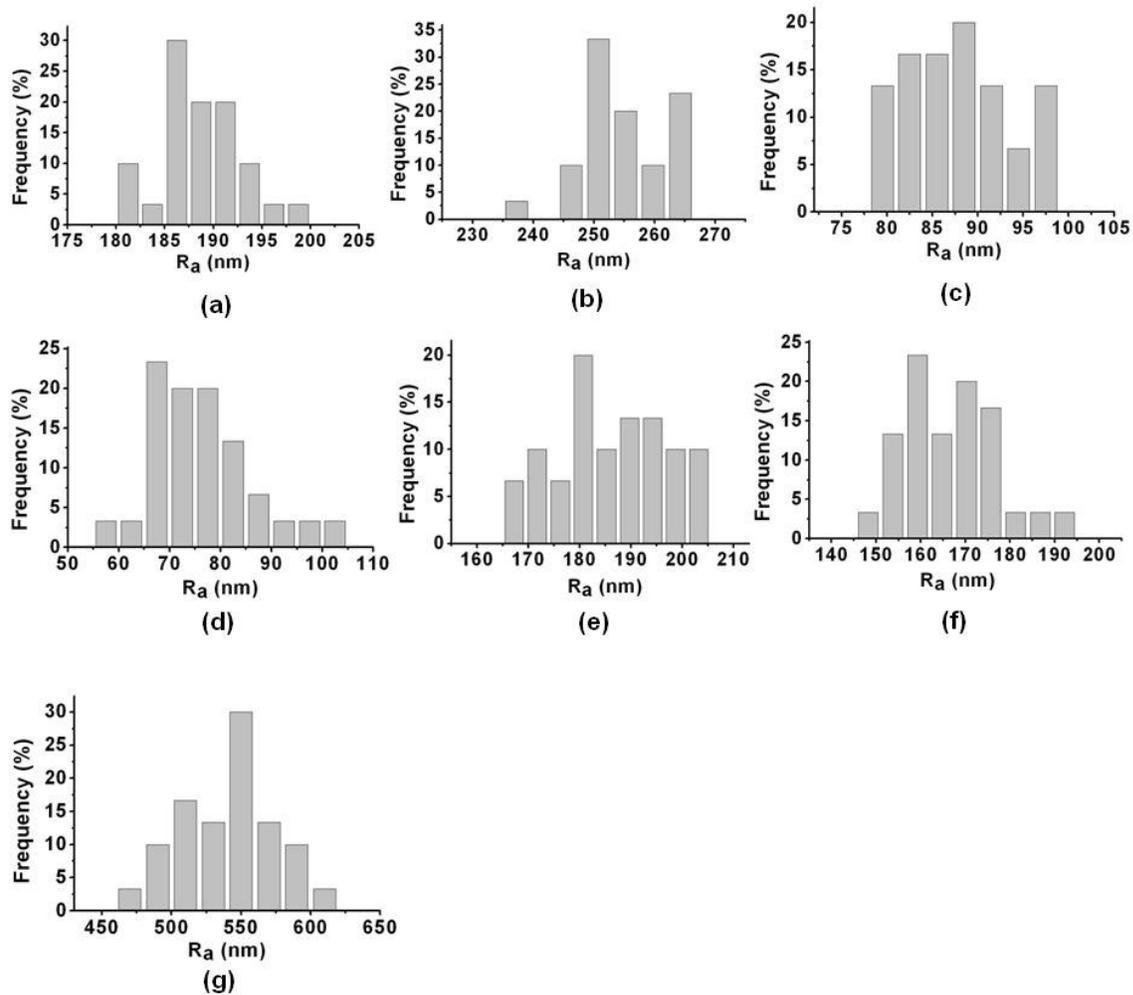


Figure 10

