



CATÓLICA
FACULDADE DE MEDICINA DENTÁRIA

VISEU

Mestrado Integrado em Medicina Dentária

2020-2021

CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA DOS MATERIAIS DERIVADOS DO OSSO DE CHOCO PARA APLICAÇÃO EM ENDODONTIA

Dissertação apresentada à Universidade Católica Portuguesa para obtenção do grau de Mestre em Medicina Dentária

Por:

Maria Teresa Ribeiro Fortuna

Viseu, 2021



CATÓLICA
FACULDADE DE MEDICINA DENTÁRIA

VISEU

Mestrado Integrado em Medicina Dentária

2020-2021

CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA DOS MATERIAIS DERIVADOS DO OSSO DE CHOCO PARA APLICAÇÃO EM ENDODONTIA

Dissertação apresentada à Universidade Católica Portuguesa para obtenção do grau de Mestre em Medicina Dentária

Por:

Maria Teresa Ribeiro Fortuna

Orientador:

Professora Doutora Ana Sofia Duarte

Co-orientador:

Professora Doutora Rita Noites

Viseu, 2021

EPIGRAFE

“Success consists of going from failure to failure without loss of enthusiasm”

{Winston Churchill}

DEDICATÓRIA

Aos Pais e aos Manos.
Foram, são e serão, sempre, os meus pilares!

AGRADECIMENTOS

O fim deste percurso e a obtenção deste nível acadêmico, mestrado, envolveu um grande esforço individual, dedicação e amor. No entanto, todo este caminho não foi percorrido sozinha, todos aqueles que contribuíram para que tudo isto fosse possível, merecem um enorme agradecimento.

À Professora Doutora Ana Sofia Duarte, orientadora desta dissertação, pelo ensinamento, pelas críticas construtivas, disponibilidade, apoio, paciência e carinho. Seria impossível realizar toda esta investigação sem a sua ajuda e dedicação.

À Professora Doutora Rita Noites, coorientadora desta dissertação, pelo seu contributo, sugestões e participação continua ao longo destes 5 anos.

À Professora Doutora Ana Peixoto que sempre que consegui esteve presente, ajudou e esclareceu todas as dúvidas existenciais. Foi um grande apoio!

Ao Professor Doutor José Maria Ferreira pelos esclarecimentos, pelas horas no laboratório, disponibilidade e nos ter recebido tão bem. Obrigada por ter feito parte deste projeto!

À Suelen Pinheiro e Bruna Correia, por todas as gargalhadas no laboratório, pelos desabafos, por me ajudarem, motivarem e ouvirem sempre que precisei e de uma maneira tão amável. Vocês fizeram a diferença, nada disto seria possível, sem a vossa ajuda. Merecem um grande obrigada!

Aos meus pais, os principais responsáveis para que tudo isto fosse possível. Obrigada por acompanharem todos os passos, por apoiarem os sonhos, pelos conselhos, pela educação, pelos valores transmitidos, pela dedicação diária e por fazerem sempre o melhor. Estarei eternamente grata!

À minha irmã, a melhor companheira de todas as horas, por toda a preocupação, motivação e apoio, não só ao longo deste percurso, mas sempre. Obrigada pela presença constante, por lidarmos com os problemas e comemorarmos os sucessos como uma só.

Ao irmão, que mesmo estando longe esteve sempre a meu lado e a prestar o seu apoio.

Ao Rúben, que apareceu durante este percurso, marcou-o, fez a diferença e jamais irei esquecer todo o carinho e amor. Obrigada pela paciência, dedicação, motivação, por todas as alegrias e tristezas, por ter estado sempre presente e, essencialmente, pela felicidade que partilhamos. Foi um verdadeiro apoio!

À minha binómia, Catarina, por durante estes 5 anos ter sido como uma segunda mãe, por me ter feito crescer, pela amizade, pelas horas de estudo a fio, por todos os momentos de “pasmarr” e todas as gargalhadas partilhadas. Por o drama constante, pelas conversas, pelos desabafos, por tudo. Foi a verdadeira companheira desta jornada!

Ao meu grupo de amigas, que são verdadeiramente SUPER. Obrigada por me acompanharem desde sempre e, tenho a certeza, para sempre. Por me motivarem, aconselharem, por partilharmos os melhores momentos e recordações. A vocês, estarei eternamente grata. Somos todas tão diferentes e completamo-nos tão bem!

RESUMO

O osso de choco tem dois componentes principais, o escudo dorsal e matriz lamelar, sendo que esta última é constituída essencialmente por aragonite. A aragonite pode ser convertida hidrotermalmente em fosfatos de cálcio. Os fosfatos de cálcio são utilizados como materiais de enxerto ósseo ou adicionados a materiais dentários, por apresentarem semelhança química com a fase mineral do osso natural e da estrutura dentária. O osso de choco associado a biovidros favorece as respostas biológicas e aumenta a resistência deste material.

Este trabalho tem como objetivo avaliar as propriedades antimicrobianas e citotóxicas de osso de choco associado a biovidros, de forma a selecionar o material de medicação intra-canal com maior potencial de aplicação em endodontia. Protocolos de viabilidade celular e propriedades antimicrobianas contra *Candida albicans*, foram elaborados e testados. Foi perceptível uma inibição do crescimento de *C. albicans* eficaz para a associação osso de choco e biovidros. Tanto o osso de choco como biovidros registam valores de viabilidade superiores a 70%.

A aplicação deste tipo de material é promissora na área da endodontia, e por isso, é necessário aprimorar as propriedades antibacterianas, tendo como opção a incorporação de iões e a realização de ensaios para *Enterococcus faecalis*.

Palavras –chave: osso de choco, biovidros, endodontia, medicação intra-canal; citotoxicidade; antimicroabiano

ABSTRACT

Cuttlefish bone has two main components, the dorsal shield and the lamellar matrix, the latter being essentially made up of aragonite. Aragonite can be hydrothermally converted to calcium phosphates. Calcium phosphates are used as bone graft materials or added to dental materials, as they are chemically similar to the mineral phase of natural bone and tooth structure. The cuttle bone associated with bioglass favors biological responses and increases the resistance of this material.

This work aims to evaluate the antimicrobial and cytotoxic properties of cuttle bone associated with bioglass, in order to select the intracanal medication material with the greatest potential for application in endodontics. Cell viability protocols and antimicrobial properties against *C. albicans* were developed and tested. It was noticeable an inhibition of the growth of *C. albicans* effective for the association of cuttlefish bone and bioglass. Both cuttle bone and bioglass show viability values above 70%.

The application of this type of material is promising in the field of endodontics, and therefore, it is necessary to improve its antibacterial properties, with the option of incorporating ions and carrying out tests for *Enterococcus faecalis*.

Keywords: Cuttlefish bone, bioglasses, endodontics, intracanal medication; cytotoxicity essays; antimicrobial essays.

ÍNDICE

I. INTRODUÇÃO	3
1. OSSO DE CHOCO	4
1.1 TRANSFORMAÇÃO HIDROTHERMAL	5
1.2 MATERIAIS DERIVADOS DO OC E APLICAÇÕES	6
1.4 ACTIVIDADE ANTIMICROBIANA	7
2. FOSFATOS DE CÁLCIO	8
2.1 CaP ASSOCIADOS A BIOVIDROS	9
2.2 APLICAÇÃO CaP EM MEDICINA DENTÁRIA	11
3. MEDICAÇÃO INTRA-CANALAR.....	13
3.1 MICROBIOLOGIA	15
3.2 HIDRÓXIDO DE CÁLCIO	17
3.2.1 Características químicas	17
3.2.2 Veículos	18
3.2.3 Indicações	20
3.2.4 Desvantagens	20
4. OBJETIVO	21
II. MATERIAIS E MÉTODOS.....	25
1. PREPARAÇÃO DO OC	25
2. CULTURA DE CÉLULAS	25
3. CITOTOXICIDADE.....	26
4. ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.....	29
5. ANÁLISE ESTATÍSTICA	31
III. RESULTADOS.....	35
1. OSSO DO CHOCO	35

1.1	ENSAIOS DE CITOTOXICIDADE	35
1.2	ENSAIOS DE ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.....	37
2.	BIOVIDROS	38
2.1	ENSAIOS DE CITOTOXICIDADE	38
2.2	ENSAIOS DE ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.....	39
IV.	DISCUSSÃO	43
V.	CONCLUSÃO.....	49
	BIBLIOGRAFIA	51
	ANEXOS	59
	ANEXO 2: CULTURA DE CÉLULAS VERO:.....	59
	ANEXO 3: ENSAIO DE CITOTOXICIDADE: MÉTODO RESAZURINA.....	61
	ANEXO 4: ENSAIO DE ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.....	65

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - OC, corte transversal e estrutura lamelar. Imagem adaptada de (17)	5
Figura 2 - Transformação hidrotermal do osso do choco. Imagem adaptada de (8).....	6
Figura 3 - Prevalência de microrganismos na falha endodôntica. Imagem adaptada de (52).....	16
Figura 4 - Esquema da diluição de OC e HC.....	27
Figura 5 - Esquema da placa multiwell. Controlo positivo: células + resazurina (100%viabilidade); controlo negativo: Sem células (0%viabilidade).....	27
Figura 6 - Diluição em série de OC com solução salina estéril.	29
Figura 7 - Esquema das diluições decimais em série.	30
Figura 8 - Viabilidade celular do OC e HC. A linhagem celular utilizada foi VERO. O controlo positivo são células com resazurina. Two-way ANOVA, seguida de Tukey's multiple comparison test para a determinação da significância estatística (**p<0,001, *p<0,01, *p<0,05).	35
Figura 9 – Crescimento de <i>C.albicans</i> nas diluições 10 ⁻⁶ , 10 ⁻⁸ , 10 ⁻¹⁰ e 10 ⁻¹² durante 24h na ausência (A) e na presença (B) de OC.	37
Figura 10 - Viabilidade celular do biovidro. A linhagem celular utilizada foi VERO. O controlo positivo são células com resazurina. Two-way ANOVA, seguida de Sidák's multiple comparison test para a determinação da significância estatística. (****p < 0,0001, ***p<0,001) (70).....	39
Figura 11 - Associação do biovidro com OC. Na placa da esquerda encontra-se o controlo positivo e na direita a exposição de <i>C.albicans</i> com a associação de OC com BV.	40
Figura 12 - Crescimento de <i>C.albicans</i> nas diluições 10 ⁻⁶ , 10 ⁻⁸ , 10 ⁻¹⁰ e 10 ⁻¹² durante 24h na ausência (A) e na presença (B) de BV.	40
Figura 13 - Comparação de concentrações de OC e HC. Two.way ANOVA, seguida de Tukey's multiple comparisons test, determinando a significância estatística ente concentrações. (ns = sem significância estatística.....	43

LISTA DE ABREVIATURAS

AA – Anti-micótico

ACP – Fosfato de cálcio amorfo

BCP – Fosfato de cálcio bifásico

BV - Biovidros

CaP – Fosfato de cálcio

CPP - ACP - Fosfopeptídeo de caseína-fosfato de cálcio amorfo

CPP- Fosfopeptídeo de caseína

DMEM - Meio Eagle modificado por Dulbecco

EPS – Matriz polimérica extra-celular

FBS - Soro fetal bovino

HA – Hidroxiapatite

HC – Hidróxido de cálcio

HT – Hidrotermal

MTA – Agregado trióxido mineral

NCS - Nano-quitosana

NHC – Nano-hidróxido de cálcio

OC – Osso de choco

SDA – Meio Sabouraud Dextrose Agar

SDB – Meio Sabouraud Dextrose Broth

TP – Trypan Blue

α -TCP - α - tricálcio fosfato

β -TCP - β -tricálcio fosfato

I. INTRODUÇÃO

I. INTRODUÇÃO

O OC (osso de choco) é composto por dois componentes principais, a camada mais externa, escudo dorsal, e uma camada mais interna, matriz lamelar. A matriz lamelar tem uma porosidade elevada e é essencialmente composta por aragonite, que pode ser convertida hidrotermalmente em fosfatos de cálcio (CaP). Os CaP são utilizados como materiais biomédicos por apresentarem semelhança química com a fase mineral do osso natural e da estrutura dentária. Devido à sua osteocondutividade e à taxa de degradação ajustável os CaP, têm sido adicionados a colutórios orais, pastilhas elásticas, pastas dentífricas, cimentos de ionómero para lesões de cárie e cimentos endodônticos.

A medicação intra-canal é utilizada durante o tratamento endodôntico para auxiliar a desinfecção do sistema canal. O HC é frequentemente utilizado, devido às suas propriedades antibacterianas. No entanto, a sua ação prolongada pode resultar no enfraquecimento da estrutura radicular (1). Por isso, será conveniente a investigação sobre um potencial medicamento intra-canal que nos possa fornecer propriedades antibacterianas, que não interfira com a estrutura dentária e que seja de fácil remoção.

Face ao exposto, este trabalho tem como objetivos avaliar as propriedades antimicrobianas e citotóxicas de osso de choco associado a biovidros, de forma a selecionar o material de medicação intra-canal com maior potencial de aplicação em endodontia.

1. OSSO DE CHOCO

OC é uma concha interna de animais marinhos conhecidos como chocos (género *sepia*), pertencente à filo *Mollusca*, classe *Cephalopoda*, ordem *Seppida* (2). O OC representa 9% do volume total do animal, é oco, dividido por lamelas (3) e funciona tanto como uma estrutura rígida do corpo do choco, como um tanque de flutuação que permite a manutenção da sua posição vertical no mar. O processo osmótico é utilizado para regular a pressão no seu interior, através de uma mistura de gás (principalmente azoto a uma pressão de 0,8 atm (0,08MPa)) e líquido, permitindo a sua flutuabilidade neutra (3,4). O volume do espaço de gás permanece aproximadamente constante com a mudança na pressão externa e, portanto, atuará como um mecanismo de flutuação que é quase independente da profundidade. Este mecanismo permite que a sua flutuabilidade seja mais estável do que nos peixes, visto que estes possuem um estado de equilíbrio instável pela sua bexiga natatória não rígida, permitindo a alteração do volume com a profundidade. Assim, se subir no mar a bexiga expande-se e tende a empurrá-lo para cima, enquanto se afundar a bexiga comprime-se, efetuando-o mais rapidamente (5).

O OC é composto por dois componentes principais, a camada mais externa, escudo dorsal, e uma camada mais interna, matriz lamelar. O escudo dorsal é rígido, denso, não poroso e fornece um substrato de proteção, estrutura e desenvolvimento à matriz lamelar. Consiste em três camadas: uma zona externa calcificada rígida com cerca de 1 mm de espessura, uma zona intermédia transparente com cerca de 0,3 mm de espessura constituída por camadas fibrosas e resistentes de quitina e uma zona calcificada interna fina (3,4,6)

A matriz lamelar tem uma porosidade elevada, até 90%, é essencialmente composta por aragonite (uma forma cristalizada de CaCO_3) envolvida numa camada de material orgânico, essencialmente por β -quitina (3,4,6). A camada orgânica tem a função de iniciar, organizar e inibir a mineralização do material inorgânico, assim como fornecer um efeito de endurecimento ao material (4). A parte inorgânica contém para além de

aragonite, outros minerais, como sódio, magnésio e estrôncio como oligoelementos, e esses minerais desempenham um papel essencial no processo de regeneração óssea (7). As lamelas de carbonato de cálcio formam câmaras que têm interconectividade entre si, dentro de cada câmara individual o gás ou líquido pode-se mover livremente. O espaçamento das lamelas varia entre 200 e 600 μm (3), como mostra na figura 1. A resistência à flexão da matriz lamelar é de $1,8 \pm 0,2$ MPa. No entanto, no escudo dorsal é mais alto 170 MPa (3). A aragonite através de uma transformação hidrotermal, pode ser convertida em CaP, material biocompatível com diversas aplicações médicas.

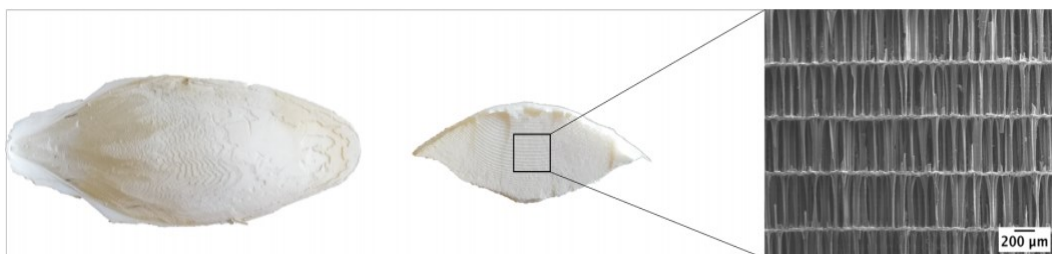


Figura 1 - OC, corte transversal e estrutura lamelar. Imagem adaptada de (17)

1.1 TRANSFORMAÇÃO HIDROTERMAL

A transformação hidrotermal de aragonite em CaP deve ocorrer, de acordo com a seguinte equação química;



O osso é cortado em pequenos pedaços e tratado com solução aquosa de hipoclorito de sódio (NaClO , 13% cloro ativo) por 24 h em temperatura ambiente para remoção dos componentes orgânicos. Os pedaços limpos de OC são selados com o volume necessário (respeitando a razão molar de $\text{Ca} / \text{P} = 10/6$) de uma solução aquosa de $0,6 \text{ mol} / \text{dm}^3$ de di-hidrogenofosfato de amônio ($\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, 99%) num recipiente de aço inoxidável revestido com teflon a uma pressão de 200°C por 48 h. A pressão dentro do reator é gerada por vapor de água e atinge os 5 bar. Após o tratamento hidrotermal, as peças resultantes são

lavadas com água desmineralizada em ebulição e secas a 105°C (8,9). A figura 2, é representativa do processo hidrotérmal do OC.



Figura 2 - Transformação hidrotérmal do osso do choco. Imagem adaptada de (8)

As peças resultantes da transformação hidrotérmal, por exemplo, scaffolds de hidroxiapatite (HA), preservam a estrutura do OC, que exibe tamanho de poro ideal (aproximadamente 80 μm de largura e aproximadamente 100 μm de altura) e interconectividade para permitir atividade biológica, como crescimento de tecido ósseo e vascularização (10).

1.2 MATERIAIS DERIVADOS DO OC E APLICAÇÕES

O OC tem sido utilizado como um material osteocondutor, por exemplo em *scaffolds* para defeitos ósseos, devido à sua alta porosidade e interconectividade entre os poros que potenciam a vascularização e crescimento ósseo (9,10). A aragonite da sua composição pode ser convertida hidrotérmalmente em CaP, como HA e β -TCP (9). Estes compostos têm sido cada vez mais utilizados na área da regeneração óssea por mimetizarem o osso natural, ou seja, são biocompatíveis. O tecido ósseo é composto por uma matriz orgânica, essencialmente colagénio, e uma fase inorgânica mineral semelhante à HA. Os scaffolds de HA apesar de serem biocompatíveis e bioativos, o facto de serem altamente porosos torna-os quebradiços, as propriedades mecânicas são pobres, e por isso, podem ser associados a polímeros sintéticos ou naturais (8).

1.4 ACTIVIDADE ANTIMICROBIANA

As bactérias conseguem desenvolver-se rapidamente em HA, por esta ser bioativa e constituída por cálcio e fosfato, nutrientes favoráveis para o crescimento bacteriano. Portanto, é fundamental avaliar as propriedades antibacterianas deste composto. A HA de tamanho nanométrico pode inibir a atividade antibacteriana, mas somente quando dopada ou com um substituto catiónico (7).

A prata (Ag) tem sido um agente utilizado para controlar a adesão de bactérias e prevenir a formação de biofilme, no entanto, em altas concentrações pode ser tóxica para o organismo. A concentração de Ag superior a 300 ppb no sangue humano pode causar efeitos como leucopenia, danos no fígado ou rins e a sua exposição prolongada pode causar argiria. As propriedades ideais para se utilizar HA dopada com Ag, com excelente citocompatibilidade e propriedades antibacterianas contra *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, podem ser alcançadas quando a concentração está entre 0,27 ppm e 2,2 ppm (11).

Num estudo recente, a HA derivada de OC mostrou um efeito bactericida ideal sobre *E. coli* e *S. aureus* devido ao tamanho (> 50 nm) e morfologia do material. No entanto, essa atividade não foi observada para OC sozinho. Existe um melhor efeito bactericida para *S. aureus* em comparação com *E. coli* (7). Num estudo semelhante, onde foram testadas espécies Gram-positivas (*S. aureus*, *Bacillus cereus*, *Micrococcus luteus*) e Gram-negativas (*Pseudomonas aeruginosa* e *Shigella flexnari*), comparou-se a atividade antibacteriana de HA de tamanho nanométrico puro ou dopado com zinco, revelando que ambas exibiram atividade antibacteriana significativa contra *M. luteus* e *S. aureus* e moderada contra *B. cereus* e *S. flexnari* (12).

2. FOSFATOS DE CÁLCIO

Os CaP, são utilizados como materiais de enxerto ósseo por apresentarem semelhança química com a fase mineral do osso natural e da estrutura dentária. Consequentemente, não são reconhecidos como materiais estranhos ao corpo, são biocompatíveis, não tóxicos, bioativos, osteocondutores, induzem uma resposta biológica idêntica à remodelação óssea, conseguindo apoiar a formação óssea sob a ação de células osteoblásticas (13–15). Resultando, assim, numa ligação físico-química íntima entre o implante e o osso, ocorrendo a osteointegração (15).

Exemplos de CaP são o fosfato de cálcio amorfo (ACP), α -tricálcio fosfato (α -TCP), β -tricálcio fosfato (β -TCP) e HA sinterizada (HA), contudo os mais utilizados são a HA, β -TCP e BCP. A HA é mais estável sob condições fisiológicas, tem solubilidade mais baixa e a taxa de reabsorção é mais lenta (16). Quanto ao β -TCP é mais solúvel e tem uma estabilidade mecânica menor. Portanto, pode-se obter o equilíbrio ideal pela combinação da fase HA mais estável e uma fase β -TCP mais solúvel para obter CaP bifásico (BCP). Portanto, a solubilidade do CaP bifásico é altamente dependente da proporção dos seus componentes; quanto maior o conteúdo de β -TCP, mais rápida será a solubilidade (17). Geralmente, esta propriedade varia com o tipo, porosidade, área superficial (granular ou blocos) e grau de cristalinidade (alta cristalinidade significa baixa degradação) (18). Da combinação de fase β -TCP e HA resultam materiais com bioatividade controlada e um equilíbrio mais adequado entre reabsorção e solubilização, garantindo estabilidade ao material enquanto promove o crescimento ósseo (17).

A principal limitação são as suas propriedades mecânicas, uma vez que são materiais frágeis com uma fraca resistência à fratura. Esta limitação está associada a ligações iônicas de força elevada e podem ser manipuladas por composição, cristalinidade, porosidade e tamanho do grão (15,17).

A estrutura porosa está diretamente relacionada com a formação óssea, permitindo a adesão celular à sua superfície. A interconectividade entre os poros

possibilita a distribuição e migração de células, formação de vasos sanguíneos sustentando o tecido osso neoformado e a remodelação óssea (19).

A HA biológica é nanocristalina e contém vários íons como impurezas, nomeadamente magnésio (Mg^{2+}) e carbonatos (CO_3^{2-}) com outros oligoelementos em quantidades variadas (Zn^{2+} , K^+ , Na^+ , Mn^{2+} , SiO_4^{4-} , Cl^- e F^-). Portanto, a incorporação de íons na estrutura cristalina da HA permite a obtenção de um material com grandes semelhanças com os ossos e dentes. Isto, baseia-se no conceito da biomimética, quanto maior a semelhança entre o material e o tecido circundante, melhor será a integração (20).

O magnésio está intimamente associado à mineralização dos tecidos calcificados e está envolvido indiretamente no metabolismo ósseo. O estrôncio encontra-se na fase mineral do osso, nas regiões onde existe uma alta atividade metabólica. Os íons de Mn^{2+} aumentam a afinidade da ligação das integrinas, uma família de recetores, que medeiam as interações celulares com a matriz extracelular e ativam a adesão celular (21). O zinco possui efeitos estimuladores da formação óssea, bem como um efeito inibidor na reabsorção óssea osteoclástica (22).

2.1 CaP ASSOCIADOS A BIOVIDROS

O conceito de bioatividade é definido como um material bioativo que induz uma resposta biológica específica na interface do material, resultando na formação de uma ligação entre os tecidos e o material (23). Um material bioativo, onde estão incluídos os biovidros (BV), cria um ambiente compatível com a osteogênese, desenvolvendo uma interface de tecido mineralizado, que promove uma ligação entre os materiais vivos e não vivos (24).

Os BV contêm um tipo de vidro $Na_2O-CaO-SiO_2-P_2O_5$ em proporções específicas, com um grande componente de sílica (SiO_2) (25), e surgiram como uma alternativa aos materiais CaP. Possuem a capacidade de se ligarem fortemente aos tecidos vivos, através do desenvolvimento de uma camada de HA na sua superfície (23,24). Além disso, libertam íons Si, P, Ca e Na, que induzem respostas intracelulares e extracelulares favoráveis (26), atuando como

estímulos químicos para a ativação das células osteoprogenitoras e, conseqüentemente, potencializam a formação óssea. A libertação desses íons pode também estimular a neovascularização e a angiogénese e, assim, promover a consolidação óssea (27).

Os BV foram inicialmente sintetizados pela técnica de fusão, seguida de um arrefecimento rápido. No entanto, o método sol-gel, nas últimas décadas, tem ganho mais relevância (28). Os BV derivados de sol-gel são preparados em temperaturas mais baixas e possuem uma área de superfície específica maior, o que aumenta a resposta bioativa (29). Além disso, podem ser preparados com quantidades de SiO₂ até 90% em peso, enquanto teores de SiO₂ superiores a 60% em peso são difíceis de alcançar pela técnica de fusão e arrefecimento rápido (30). O alto número de grupos Si – OH são benéficos para uma funcionalização posterior (31).

A composição de BV derivados de sol-gel é mais facilmente manipulada para atingir propriedades físico-químicas e biológicas desejadas. A tecnologia sol-gel permite a incorporação de biomoléculas, proteínas ou medicamentos que podem ser administrados *in situ*. Geralmente, podem ser manipulados para libertar íons metálicos que têm potencial antimicrobiano ou angiogénico (32).

A incorporação de estrôncio (Sr) aumenta a formação óssea, promovendo a diferenciação dos osteoblastos, inibição da diferenciação dos osteoclastos e, em estudos *in vivo*, demonstraram ligar-se fortemente ao osso, à camada de HA (33). A incorporação de magnésio (Mg) melhora a dissolução do material, promovendo o rompimento da rede de sílica (34). Tanto a incorporação de Mg como de Zn promovem e favorecem a proliferação e diferenciação dos osteoblastos, sendo que este último possui efeitos anti-inflamatórios (35).

A associação dos CaP com biovidro tem recebido um especial interesse na área da engenharia de tecido ósseo, por melhorar as propriedades dos materiais e conseqüentemente as respostas biológicas. Esta associação, aumenta a bioatividade, os BV são mais bioativos, e a resistência mecânica, tornando o material mais denso (35).

2.2 APLICAÇÃO CaP EM MEDICINA DENTÁRIA

Como já referido, devido as propriedades dos CaP, estes têm sido adicionados a materiais dentários, como colutórios e pastas dentífricas. Complexos de fosfopeptídeos de caseína (CPP) e CaP têm sido usados como pastas para o tratamento da sensibilidade dentária após um procedimento endodôntico, raspagem radicular ou branqueamento. Estudos revelam um aumento de fosfato inorgânico e cálcio na placa supragengival após 3 dias de uso de colutórios contendo CPP-ACP (fosfopeptídeo de caseína-fosfato de cálcio amorfo). O complexo CPP-CaP também pode ser incorporado em alimentos e bebidas para potencializar a prevenção da cárie dentária devido à sua origem natural. Os CaP tem sido incorporados em compósitos de polímeros bioativos, utilizados para fortalecer os dentes, através da libertação de íons de cálcio e fosfato. Pastas dentífricas contendo CaP podem ser usados para reduzir a sensibilidade dentária, para promover a remineralização do esmalte desmineralizado e para fins de branqueamento e polimento. Pastas dentífricas contendo HA mostraram um efeito positivo na sensibilidade e branqueamento dentário, e conforme o aumento de HA, o efeito branqueador também aumenta (36).

Na área da endodontia, cimentos endodônticos possuem nos seus constituintes derivados do cálcio, com o objetivo da mineralização. Recentemente, existem evidências de cimentos à base de CaP (CAPSEAL I e II) que apresentam citotoxicidade menor, mediadores inflamatórios e têm a capacidade de promover a regeneração óssea em lesões periapicais e citotoxicidade menor, em relação a outros cimentos, como óxido de zinco eugenol ou resina epóxi (36). Têm a capacidade de facilitar a cicatrização periapical dentoalveolar, através do controlo dos mediadores celulares das células do ligamento periodontal e diferenciação de osteoblastos a partir de células precursoras. Quanto à biocompatibilidade, estes cimentos mostraram resultados favoráveis, uma boa adaptação à parede do canal e infiltração nos túbulos dentinários (37).

Cimentos bioativos, à base de biocerâmica foram recentemente introduzidos como cimentos endodônticos. Apresentam um pH alcalino, atividade

antibacteriana, radiopacidade, biocompatibilidade, não tóxico, sem contração de polimerização e são quimicamente estáveis dentro do ambiente biológico. Uma outra vantagem destes materiais é que eles promovem a formação de HA, facilitando uma ligação entre a dentina e o material durante o processo de presa (38). No entanto, os cimentos convencionais à base de biocerâmica, como MTA, apresentam desvantagens clínicas, como difícil manuseamento, maior citotoxicidade, um pH elevado durante a reação de presa, tempo de presa elevados, o endurecimento requer umidade suficiente e difícil remoção para retratamentos (39). Para superar estas desvantagens surgiram os cimentos endodônticos de obturação à base de BV. Existem dois cimentos comercializados que incluem BV. Um é o *GuttaFlow Bioseal* que possui baixa solubilidade e porosidade, capacidade de alcalinização, penetrabilidade da dentina e citocompatibilidade. No momento, existem poucas evidências sobre o seu mecanismo de endurecimento ou a capacidade de selar o canal e ser removido para retratamento. O segundo produto é *Nishika Canal Sealer BG*, existem evidências convincentes a respeito das suas propriedades físico-químicas, biocompatibilidade, capacidade de selagem e remoção (40)

3. MEDICAÇÃO INTRA-CANALAR

Existem centenas de espécies a colonizar a cavidade oral. As vias de entrada desses microrganismos podem ser cáries, fissuras ou traumas nos tecidos, que facilitam a invasão para os túbulos dentinários e atingimento dos tecidos pulpares. No entanto, apenas um número limitado desses microrganismos pode colonizar e proliferar nos canais radiculares devido à natureza única e seletiva do sistema canalar (41).

Os microrganismos encontram-se organizados em biofilme com uma complexa matriz polimérica extracelular (EPS) derivada de substâncias produzidas pelo hospedeiro e pelos próprios microrganismos. Além disso, substâncias como, polissacarídeos, proteínas, lípidos e ácidos nucleicos, produzidos por microrganismos aumentam a formação e a complexidade da estrutura do biofilme (42).

O tratamento endodôntico visa eliminar completamente os microrganismos ou permitir a sua redução máxima para que o sistema imunológico do hospedeiro cure e regenere os tecidos peri-radulares danificados (43). Vários métodos têm sido utilizados para desinfetar o sistema de canais, que incluem instrumentação, irrigação química, medicação intra-canal e a obturação. (41).

A definição geral de medicação intra-canal é a colocação de medicação, biocompatível, durante um curto período de tempo com a finalidade de inibir a invasão de bactérias da cavidade oral nos canais radiculares. (44)

A medicação intra-canal tem, assim, várias utilizações: (45)

- Eliminar restos bacterianos não destruídos pela preparação biomecânica;
- Tornar o canal inerte e neutralizar restos tecidulares;
- Reduzir a inflamação periradicular e, conseqüentemente, reduzir a dor;
- Ajudar a eliminar o exsudato apical, se existente;
- Prevenir ou estabilizar a reabsorção radicular inflamatória, se existente;

- Prevenir a reinfeção do sistema canalar, atuando como barreira física e química, caso a restauração temporária/provisória falhe.

O sucesso do tratamento endodôntico radicular depende da eliminação completa dos microrganismos, através da preparação e limpeza eficientes do sistema canalar (44,46). No entanto, devido à complexidade da morfologia canalar, as limas manuais ou rotatórias não são capazes de alcançar locais como túbulos dentinários, istmos ou canais laterais (46). Nestas situações, para além de uma irrigação eficaz o uso de medicação intra-canalar pode auxiliar numa desinfeção completa (44,46)

A medicação intra-canalar entre consultas apresenta resultados favoráveis no tratamento de infeções endodônticas. Algumas condições endodônticas exigem várias colocações dependendo do estado pulpar, tecidos periapicais, tecidos duros dentários e o desenvolvimento do forâmen apical (aberto, fechado ou se existe reabsorção). O tempo entre consultas deve ser inferior a 14 dias, uma vez que a inflamação demora pelo menos 10-14 dias para diminuir ou desaparecer. No entanto, períodos de tempo maiores são aconselhados, porque na maioria dos medicamentos o nível de concentração máxima na dentina ocorre entre 3 a 4 semanas. Além disto, se os sinais e sintomas persistirem, o tempo também tem que ser prolongado ou alterado o medicamento. (47)

Atualmente, existem diversas opções como medicação intra-canalar incluindo o hidróxido de cálcio (HC), antibióticos, compostos de iodo e agentes anti-inflamatórios à base de fenol. No entanto, podem estar associadas desvantagens, como formulações à base de formaldeído e fenol não serem recomendadas devido à sua toxicidade e potenciais efeitos cancerígenos. Devido aos seus efeitos antibacterianos, o HC é o mais utilizado, porém não é eficaz contra certas espécies de bactérias ou fungos. (3,4)

3.1 MICROBIOLOGIA

As bactérias são as principais responsáveis pela etiologia das infecções bacterianas (48) . A ausência de selamento coronal e apical, microfiltrações, falha no preparo químico ou mecânico do canal radicular e limitações do material obturador torna o sistema canalar um meio de proliferação de bactérias e formação de biofilme (48,49).

As principais vias de acesso para as bactérias alcançarem o tecido pulpar são os túbulos dentinários e exposição pulpar. No entanto, existem mais 2 vias por infecção retrograda, a partir do periodonto ou através da corrente sanguínea. (50)

O ambiente endodôntico possui uma série de características que podem levar à sobrevivência de bactérias e fungos, como o valor de pH, a concentração de oxigênio, a competição/cooperação com outros organismos e as características ambientais (49). Dois fatores importantes são a concentração de oxigênio e os nutrientes existentes no meio. A concentração de oxigênio é muito reduzida ou nula, o que favorece o desenvolvimento de espécies anaeróbias. Outro fator é a disponibilidade de nutrientes provenientes da cavidade oral, do conteúdo dos túbulos dentinários, do tecido conjuntivo ou de fluidos provenientes dos tecidos apicais (49). Conseqüentemente, a formação do biofilme estimula a adaptação genética e a sua organização favorece a troca de material genético entre bactérias, sendo capaz de conduzir à disseminação de genes resistentes a antibióticos (51).

As espécies associadas à endodontia são diversas e variam dependendo da condição clínica do dente, presença de doenças específicas que afetam a polpa e os tecidos periapicais (cárie, pulpite e necrose da polpa e periodontite apical aguda ou crônica), ou de tratamentos já efetuados para resolução da doença (49). A figura 3, remete para estes últimos casos, em que são necessários retratamentos endodônticos para eliminar por completo os microrganismos.

Os microrganismos mais encontrados em canais previamente obturados foram *E.faecalis*, como mais prevalente (49,51–54) , seguido de *Fusobacterim* e

Propionibacterium (52). Muitos autores afirmam que *E. faecalis* é mais prevalente em infecções secundárias do que primárias (52–54). No entanto, noutros estudos *E. faecalis* não é a principal causa da falha endodôntica, mas está quase sempre presente em percentagens menores (52) .

Os fungos também foram detetados em infecções endodônticas primárias, mas sua presença é mais prevalente em infecções endodônticas secundárias ou persistentes, bem como em dentes com lesões periapicais. O fungo mais comumente encontrado é *Candida albicans* (48,49).

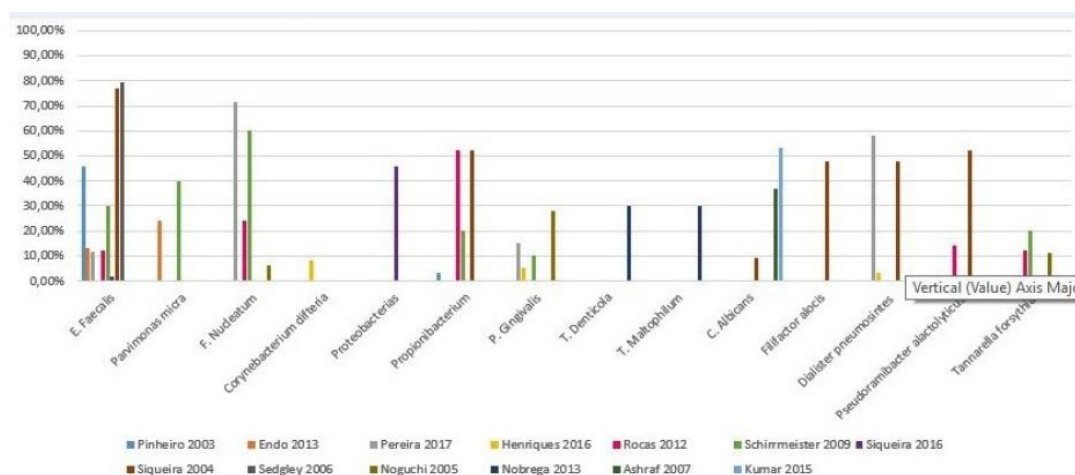


Figura 3 - Prevalência de microrganismos na falha endodôntica. Imagem adaptada de (52)

A bactéria *E. faecalis* possui algumas características que o possibilitam ser tão resistente, entre elas são (51–53):

- São cocos anaeróbios facultativos, gram-positivos e oportunistas;
- Têm a capacidade de crescer num meio alcalino;
- Sobrevivem a temperaturas entre 10-60°C para suprimir a ação dos linfócitos;
- Formam biofilme;
- Vivem em ambientes nutrientes, conseguindo sobreviver com o fluido do ligamento periodontal;
- Sobrevivem a alta salinidade;
- Têm capacidade de penetrar nos túbulos dentinários e de se fixar ao colagénio.

Enterococcus faecalis em meio alcalino, o seu sistema homeostático (bomba de prótons) é ativado, permitindo o transporte ativo de potássio na célula, que reage com os íons OH, formando hidróxido de potássio e regula o pH citoplasmático, baixando-o. (55)

Uma das vantagens da pasta de HC com veículo oleoso (polietilenoglicol e propilenoglicol.) é a capacidade de inibir a adenosina trifosfatase, que é essencial para o funcionamento da bomba de prótons. Num estudo, *in vivo* e com dentes em acrílico, mostrou que esta mesma pasta seria a que oferecia mais vantagens, porque não interferiu com a libertação de íons OH e Ca²⁺, tinha menor solubilidade e melhor ação antimicrobiana. Os níveis de pH atingiram 12,78 ao fim de 7 dias, e registou-se a decomposição em subprodutos reativos (oxigénio reativo e paracloroanilina), que penetram na matriz polimérica, mantando mais facilmente, *E.faecalis*. No entanto estes produtos mostraram-se carcinogénicos em animais e não há evidencias suficientes de efeitos em humanos. (51)

3.2 HIDRÓXIDO DE CÁLCIO

3.2.1 Características químicas

HC tem como formula Ca (OH) e é um pó branco inodoro. Possui baixa solubilidade em água e liberta íons de cálcio (Ca²⁺) e hidroxilo (OH⁻) lentamente. Esta característica é benéfica porque para que HC se torne solúvel nos fluidos teciduais, quando em contato direto com os tecidos vitais, é necessário um período de tempo longo. Ca (OH) possui um pH alto (12,5 - 12,8) e é classificado quimicamente como uma base forte. Dissocia-se em íons cálcio e hidroxilo em contato com uma solução aquosa, e as suas principais propriedades, deposição de tecido duro e antimicrobiano, são atribuídas ao efeito desses íons em tecidos vitais. Os íons hidroxilo são responsáveis pela natureza altamente alcalina do Ca (OH), sendo que a maioria dos seres patogénicos não conseguem sobreviver nessa condição. O principal mecanismo envolvido na morte da bactéria não é evidente, no entanto pode ocorrer por dano

da membrana citoplasmática, desnaturação de proteínas e / ou dano do DNA (56,57).

OH^- difundem-se na dentina por esta ser permeável, devido à sua anatomia tubular - densidade, diâmetro e comprimento - mas também pelas características do soluto, tamanho e carga. Além disso, a difusão dos íons pode ser afetada por a capacidade de tamponamento, adsorção e carga da dentina. Inicialmente, atravessam a dentina circumpulpar, que não possui grande capacidade de tamponamento ou adsorção, mas há medida que avançam o diâmetro dos túbulos diminui e o tamponamento e adsorção aumentam. Ou seja, as propriedades são mais evidentes quando o volume de dentina aumenta. Contata-se que ao fim de 2 a 3 semanas, toda a estrutura dentinária se encontra saturada de íons hidroxilo, sendo assim, o pH elevado na camada mais externa da dentina. (58)

3.2.2 Veículos

O HC sendo em forma de pó, necessita de uma substância, veículo, que permita a sua entrada no sistema de canais e possibilite a sua dissociação iônica (59).

Do ponto de vista antimicrobiano, os veículos podem ser:

- Veículos inertes: caracterizam-se pelas suas propriedades biocompatíveis, que não apresentam interferências com as propriedades antimicrobianas do HC. Como por exemplo: água destilada, soluções anestésicas, soro fisiológico, glicerina, óleo de oliva, polietilenoglicol e o propilenoglicol. (59)
- Veículos biologicamente ativos: são adicionadas propriedades suplementares às obtidos pelo HC. Por exemplo: clorexidina e iodeto de potássio.(59)

Do ponto de vista das características físico-químicas, podem ser:

- Veículos Hidrossolúveis: dividem-se em aquosos ou viscosos. Os aquosos vão potenciar uma dissociação rápida, possibilitando uma maior difusão e, conseqüentemente, maior contacto entre os iões e os tecidos ou microrganismos. É importante salientar a rápida diluição no sistema canalar, especialmente quando utilizado como medicação, em casos de necrose pulpar ou lesão perirradicular, obrigando a várias colocações para ter resultados. Por exemplo: água destilada, o soro fisiológico, soluções anestésicas e solução de metilcelulose. Nos veículos Viscosos a dissociação do HC é mais lenta, devido ao elevado peso molecular, sendo solúveis em água. Por exemplo: a glicerina, o polietilenoglicol e o propilenoglicol. (59)
- Veículos Oleosos: não são solúveis em água, possuem menor solubilidade e difusão da pasta no canal. Por exemplo: azeite, silicone, cânfora e óleo de silicone (57).

Em situações clínicas que requerem uma rápida difusão e libertação iónica no início do tratamento é indicado um veículo aquoso, enquanto que quando se requer uma libertação iónica uniforme e gradual é indicado um veículo viscoso. Os veículos oleosos têm uso restrito e são utilizados quando a dissociação iónica muito baixa é necessária (57).

Um pH entre 8,6 a 10,3 é essencial para a ação biológica das pastas de HC, ativando a enzima fosfatase alcalina. Esta enzima permite que o fosfato reaja com os iões de cálcio da corrente sanguínea, formando CaP, que está envolvido no processo de mineralização. As pastas com uma consistência mais fluida podem levar a um pH alto, assim como a libertação de cálcio nos tecidos periapicais. No entanto um pH, maior que 11 pode promover alta citotoxicidade dos tecidos apicais (51).

3.2.3 Indicações

O HC tem diversas aplicações na estrutura dentária, está indicado em proteções pulpares diretas e indiretas, canais com exsudato, reabsorções radiculares (de origem fisiológica ou idiopática) e apexificação (tratamento de polpa necrótica em dentes com rizogênese incompleta) (60).

3.2.4 Desvantagens

O HC apresenta algumas desvantagens com a sua utilização, apresenta resultados bastante controversos no que diz respeito à capacidade antibacteriana com biofilmes em canais radiculares, juntamente com alguma ineficácia contra a bactéria *E. faecalis*, uma das prevalentes após a realização do tratamento endodôntico e que pode levar ao insucesso. Tem como desvantagens a sua difícil remoção das paredes dos canais, a sua exposição prolongada (1mês) provoca alterações nas propriedades mecânicas da dentina e a penetração nos túbulos dentinários é limitada (60).

O HC influencia negativamente as propriedades físicas da dentina, devido às mudanças na matriz orgânica produzida pela alta alcalinidade do HC. Pode dissolver, desnaturar ou neutralizar componentes orgânicos, como grupos fosfato e carboxilato na dentina, interrompendo assim a ligação entre as fibras de colagénio e cristais de HA. Isto resulta no enfraquecimento da estrutura dentária, levando à propagação de fissuras por fadiga durante tensões cíclicas e um aumento na suscetibilidade à fratura radicular (61).

Materiais que aumentem a resistência dentinária começaram recentemente, a ser explorados, por exemplo, a quitosana, um biopolímero natural, que é biocompatível, biodegradável e possui bioadesão (1). Outra alternativa é a utilização de nanopartículas, que possuem a capacidade de se difundirem nas anatomias mais complexas do sistema canal, devido ao seu tamanho. Um medicamento que penetra mais profundamente nos túbulos dentinários pode não funcionar apenas como um agente bloqueador, evitando a proliferação microbiana, mas também como um inibidor (62). As nanoformas, de quitosana e HC, mostraram uma penetração superior nos túbulos dentinários e maior eficácia

antibacteriana contra *E.faecalis*. A redução na resistência à fratura no intervalo de 1 mês também foi menor nas nanoformas em comparação com partículas de tamanho micro, contudo, são necessários mais estudos (1).

4. OBJETIVO

O osso de choco possui propriedades únicas estruturais e biológicas, como osteocondução, estando envolvido diretamente com a formação e mineralização de tecidos duros. No entanto, este material não possui propriedades antimicrobianas e a sua resistência à fratura é limitada, sendo necessário associar outro material para favorecer estas características, como os biovidros (nanopartículas). Em endodontia, o material mais utilizado para medicação intracanal, que também tem outras aplicações endodônticas, apresenta desvantagens que precisam de ser ultrapassadas.

Neste sentido, este trabalho tem como principal objetivo caracterizar biologicamente, avaliando as propriedades antimicrobianas e a citotóxicas de OC associado a BV, de forma a selecionar o material de medicação intra-canal com mais potencial de aplicação na endodontia.

II. MATERIAIS E MÉTODOS

II. MATERIAIS E MÉTODOS

1. PREPARAÇÃO DO OC

A preparação de OC foi realizada de acordo com o protocolo anexado (anexo 1) (35,63).Primeiramente, pesou-se 6 g de OC, sem a casca, (CaCO_3 – 100.087 g/mol) correspondente a 0,06 moles de cálcio, em seguida colocou-se o material no recipiente de aço inoxidável revestido a teflon e adicionou-se 13,49g de fosfato de amónia ($(\text{NH}_4)_3\text{HPO}_4$ – PM = 132,06 g/mol) de modo a obter uma razão molar Ca/P = 0,33. Colocou-se água até perfazer cerca de dois terços do volume interno e inseriu-se numa estufa a 150 °C durante 3-4 dias. Posteriormente, secou-se e calcinou-se o material a 900 °C durante 1h e, por fim, moeu-se durante 1h em acetona, usando uma razão material/bolas de zircónia (10mm de diâmetro) de 1/10 e uma razão material/acetona 1/1.

2. CULTURA DE CÉLULAS

A cultura de células foi realizada com uma linhagem de células VERO (ECACC 88020401, epitélio renal de um macaco verde Africano, *Cercopithecus aethiops*), sendo cultivada e preservada, de acordo com Ammerman et al (64), o mesmo protocolo encontra-se em anexo (anexo 2).

Primeiramente, as células criopreservadas foram descongeladas. Resumidamente, em ambiente estéril, transferiram-se as células do criotubo para um tubo *falcon* contendo 5 mL de meio de cultura, previamente preparado a 37°C. Cada criotubo contem $1,5 \times 10^6$ células em 1 mL de DMSO a 10%. Realizou-se uma centrifugação a 900 rpm durante 5 minutos, descartou-se o sobrenadante e fez-se a suspensão do *pellet* em 5 mL de meio de cultura, em seguida, transferiu-se a suspensão de células para um frasco de cultura (25 cm²) de células contendo 5mL de meio de cultura e incubou-se a uma temperatura de 37 °C numa atmosfera de 5% de CO₂. Depois de 48 horas, efetuou-se uma nova passagem de células, removeu-se o antigo meio, e adicionou-se 5 mL de PBS (pré-aquecido a 37 °C) para lavar a cultura e de seguida removeu-se o PBS.

Adicionou-se Tripsina-EDTA até cobrir o fundo do frasco, deixando repousar na incubadora por aproximadamente 5 minutos. Por fim, adicionou-se 6 mL de meio de cultura e voltou-se a suspender celular, as quais foram transferidas para novos frascos de cultura com 5 mL de meio e incubadas a 37 °C numa atmosfera de 5% de CO₂.

3. CITOTOXICIDADE

A avaliação da citotoxicidade será avaliada, de acordo com o protocolo padrão ISSO 10993-5:2009 (63,65,66). Foi utilizada a linhagem de células Vero (ECACC 88020401), frequentemente utilizadas para este fim. O protocolo encontra-se anexado (anexo 3). A 80% de confluência, retirou-se o meio das células, adicionou-se PBS para lavar as células, removeu-se o mesmo, adicionou-se a tripsina EDTA e incubou-se durante 2,5 minutos. Seguidamente, adicionou-se 6mL de DMEM (com 10% FBS + 1% AA), transferiu-se a suspensão para um tubo de falcon, retirou-se 30µL para um microtubo de 1,5mL e, por fim adicionou-se 30 µL de Trypan Blue (TB), corante utilizado para avaliar os efeitos citotóxicos através do Método Resazurina.

A seguir, à preparação das células, efetuou-se a contagem das mesmas e preparou-se uma suspensão de células de modo a semear $1,5 \times 10^5$ cel/poço. Incubou-se durante 24h a 37°C e com 5% CO₂, até atingirmos uma confluência celular de no mínimo 80%. Em seguida, preparou-se as suspensões de OC e HC, incubou-se e foi realizou-se uma diluição como representado na figura 5, e pipetou-se 50 µL de cada suspensão (material + PBS) para cada poço. Nos poços da periferia da placa foi incluída água estéril (para evitar perdas de volume durante o ensaio), PBS foi usado como controlo positivo PBS e como controlo negativo foram usados poços sem células.

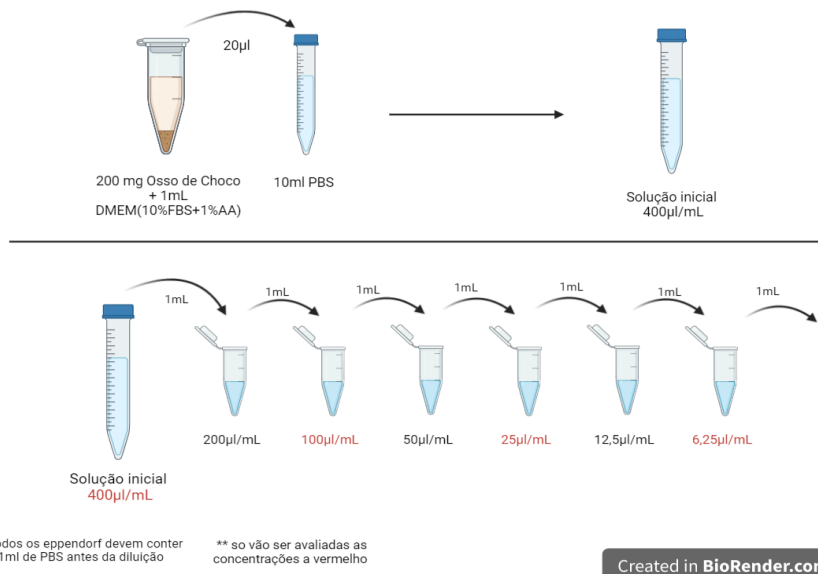


Figura 4 - Esquema da diluição de OC e HC..



Figura 5 - Esquema da placa multiwell. Controlo positivo: células + resazurina (100%viabilidade); controlo negativo: Sem células (0%viabilidade)

Após incubação durante 24h, aspirou-se o meio de cultura, lavou-se os poços com PBS, adicionou-se 50 µL de DMEM com 10% de resazurina e incubou-se a 37°C por 3h, até redução de resazurina em resorufina pelo metabolismo das células viáveis. Removeu-se a placa da incubadora e a absorvância foi medida num espectrofotómetro a 570nm e 600nm. Por fim, calculou-se a percentagem de viabilidade celular de acordo com a seguinte equação:

$$\% \text{ cell viability} = \left(\frac{\left(\frac{OD^{570}}{OD^{600}} \right) - \bar{c}^-}{\bar{c}^+ - \bar{c}^-} \right) \times 100$$

Equação 1: Determinação da viabilidade celular. OD570 – absorvância a 570nm; OD600 – absorvância a 600nm \bar{c}^- - controlo negativo; \bar{c}^+ - controlo positivo.

4. ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Os ensaios de atividade antimicrobiana foram realizados de acordo com o protocolo padrão ASTM E2149-13a com modificações, utilizando a espécie *Candida albicans* (DSM11225) (63,67–69). O protocolo a ser executado encontra-se anexado (anexo4). Inicialmente, preparam-se os meios Sabouraud Dextrose Broth(SDB) e Sabouraud Dextrose Agar (SDA), em seguida preparou-se o inóculo, retirando uma colônia para um tubo de ensaio com meio e colocou-se na incubadora *overnight*. O OC, 200mg, foi adicionado a 1 mL de meio SDB, incubou-se *overnight* e na manhã seguinte centrifugou-se e prepararam-se diluições decimais em série, como mostra a figura 6:

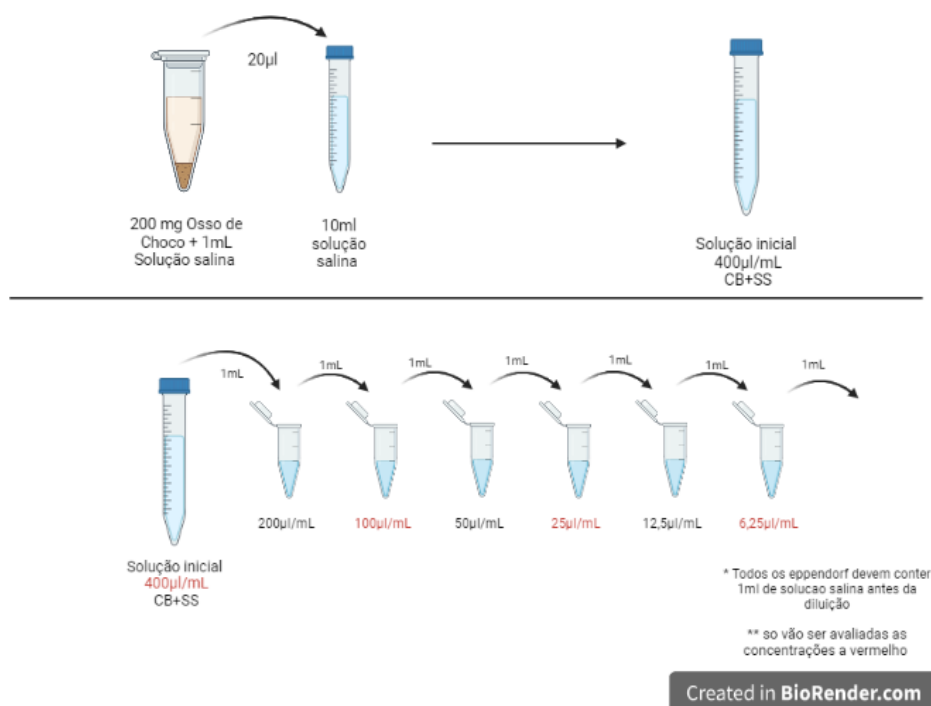


Figura 6 - Diluição em série de OC com solução salina estéril.

Para determinação da atividade antimicrobiana, foi necessário retirar 2,5mL da suspensão microbiana para um tubo de 15mL, centrifugou-se a suspensão, descartou-se o sobrenadante, adicionou-se 5mL de solução salina (NaCl 0,9%) e ressuspendeu-se o *pellet na* solução salina até obter uma mistura homogênea. Seguidamente, fez-se uma leitura da densidade ótica da suspensão celular no espectrofotômetro a 600nm, expectando uma absorvância próxima de 1. Pipetou-se 10µL da suspensão bacteriana, ressuspendeu-se, incubou-se a placa e efetuaram-se as diluições decimais da solução (OC + *Candida albicans*) em condições de assepsia. Retirou-se 50µL de solução (OC + *Candida albicans*) de cada poço e transferir para um microtubo com 450µL de solução NaCl, em seguida retirou-se 10µL da solução anterior e transferiu-se para um microtubo com 90 µL de solução salina, resultando numa diluição de 1:10, sendo esta solução inicial para as restantes diluições. Para as diluições em série foi-se retirando sempre 10µL de um microtubo para o outro, como mostra a figura 7.

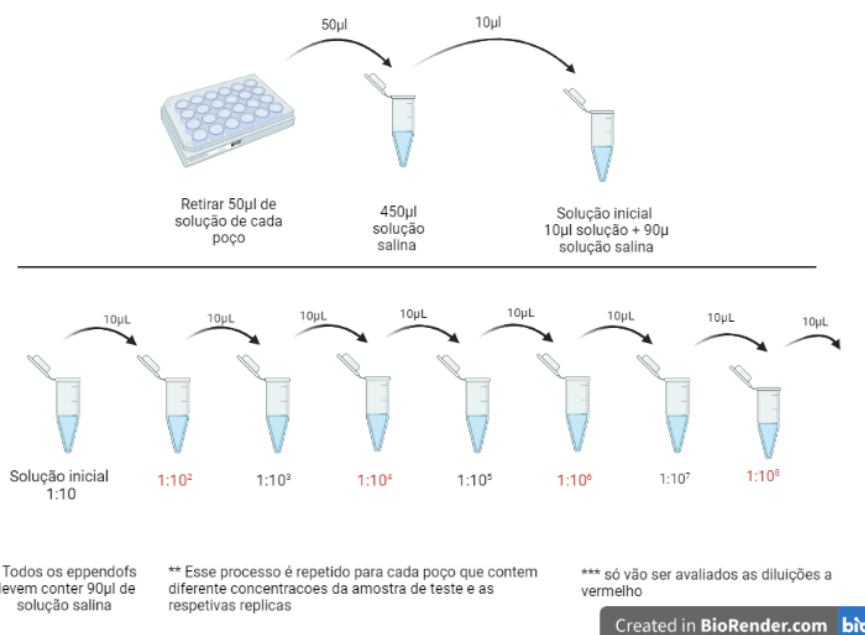


Figura 7 - Esquema das diluições decimais em série.

Após as diluições, retirou-se 10µL das diluições a serem testadas, pipetou-se de forma uniforme uma gota nas placas de Petri com meio SDA e após secagem das gotas, incubou-se as placas com a tampa voltada para baixo. Por fim, analisaram-se os resultados após 24 horas, contando as unidades de

formação de colónias (UFC) e calculando o logaritmo destas por mililitro (Log(UFC/mL)), de acordo com a seguinte formula:

$$UCF/mL = \frac{N^{\circ}colónias}{Volume * Diluição}$$

Equação 2: n° de colonias = n° colónias em cada gota; volume= volume semeado de cada gota em m; diluição=Diluição na qual foram contadas o número de colónias.

5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os valores da viabilidade celular, ensaios de citotoxicidade, foram analisados a partir de testes não paramétricos: ANOVA, tukey's multiple comparisons test, Dunnett's multiple comparisons test e Sidák's multiple comparisons test pelo software Graphpad Prism 9.1.1. Os resultados são apresentados como média \pm desvio padrão. Um valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

III. RESULTADOS

III. RESULTADOS

1. OSSO DO CHOCO

1.1 ENSAIOS DE CITOTOXICIDADE

Determinou-se a citotoxicidade do OC em células VERO, comparando com a citotoxicidade de HC nas mesmas células, através de dois ensaios independentes, ficando com 7 réplicas de ambas as amostras para analisar. Os resultados mostraram viabilidade celular, nas duas amostras, em qualquer concentração testada, como mostra a figura 8.

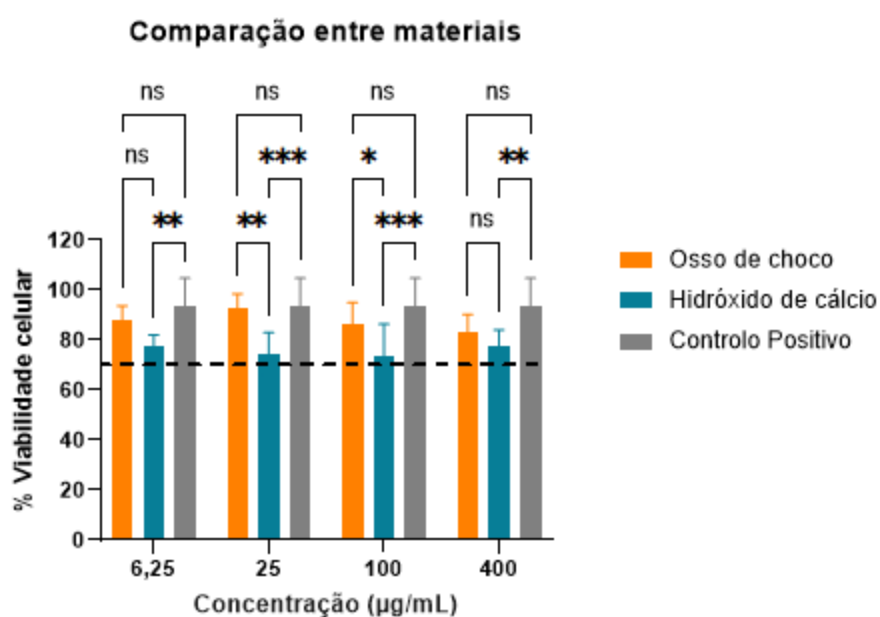


Figura 8 - Viabilidade celular do OC e HC. A linhagem celular utilizada foi VERO. O controlo positivo são células com resazurina. Two-way ANOVA, seguida de Tukey's multiple comparison test para a determinação da significância estatística (**p<0,001, **p<0,01, *p<0,05).

Em relação ao OC, a percentagem de viabilidade celular apresenta o valor maior na concentração de 25µg/mL com 92,68% ± 5,82%, iniciando na concentração de 6,25µg/mL com 88,13% ± 6,81%. Em seguida, decresce até à concentração de 400µg/mL, sendo que em 100µg/mL apresenta uma viabilidade de 86,77% ± 8,23% e em 400µg/mL de 83,59% ± 6,73%. Todas as concentrações de OC apresentam viabilidade celular superior a 70%, sendo este um biomaterial biocompatível.

Quanto ao HC, a percentagem de viabilidade decresceu até à concentração de 100µg/mL para 73,90 ± 12,55%, sendo que em 6,25µg/mL apresentava uma percentagem de viabilidade de 77,62% ± 4,52%, e em 25µg/m de 74,62% ±

8,57%. Por fim, na concentração de 400 µg/mL, a viabilidade aumentou para 77,58% ± 6,55%. O HC apresentou, igualmente, viabilidade celular superior a 70%, no entanto esta foi sempre inferior à viabilidade de OC.

Na concentração de 400µg/mL, não existem diferenças significativas entre OC e HC ou entre OC e o controlo positivo. No entanto, o HC apresenta significância estatística em relação ao controlo positivo, com um valor de $p=0,0058$, ou seja, $p<0,01$.

Na concentração de 100µg/mL, não existe significância estatística entre OC e o controlo. O OC em relação ao HC apresenta significância estatística com um valor de $p=0,0286$ e o HC em relação ao controlo positivo uma significância estatística com um $p=0,0005$, ou seja, respetivamente $p<0,05$ e $p<0,001$.

Na concentração de 25µg/mL, OC em relação ao HC apresenta uma significância estatística com $p=0,0012$, e HC em relação ao controlo positivo tem uma significância estatística com $p=0,0008$, assim $p<0,01$ e $p<0,001$ respetivamente. Portanto, existe um decréscimo mais significativo da viabilidade celular de HC em relação ao controlo, nas concentrações 100µg/mL e 25µg/mL, sendo que na primeira a viabilidade celular é menor.

Por fim, na última concentração 6,25µg/mL só existe significância estatística do HC em relação ao controlo positivo, com valores de $p=0,0059$, ou seja, $p<0,01$. Tanto OC em relação ao HC ou ao controlo positivo, não apresenta significância estatística.

1.2 ENSAIOS DE ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Foram determinadas as propriedades antimicrobianas do OC contra *C. albicans*, o fungo mais predominante em falhas do tratamento endodôntico. O OC foi testado na concentração de 100 µg/mL, por esta apresentar uma viabilidade celular significativamente diferente do HC, como mostram os resultados da figura 9. Os resultados de atividade antimicrobiana foram avaliados pelo método de contagem de colônias em placa. O controlo positivo era *C. albicans* sem exposição a OC. Os resultados obtidos encontram-se na figura 9. Visualmente, é perceptível uma inibição do crescimento de *C. albicans*, sendo mais evidente na diluição 10^{-6} , 10^{-8} e 10^{-12} . Ou seja, o número de colônias formadas no controlo positivo foi maior do que o número de colônias formadas quando *C. albicans* é exposto a OC.

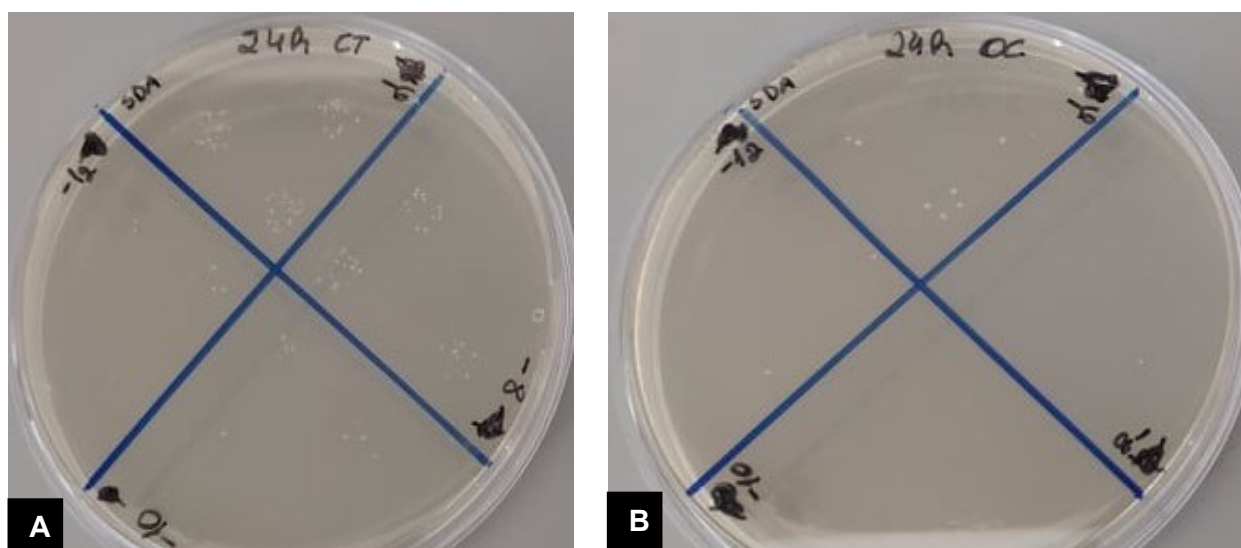


Figura 9 – Crescimento de *C.albicans* nas diluições 10^{-6} , 10^{-8} , 10^{-10} e 10^{-12} durante 24h na ausência (A) e na presença (B) de OC.

2. BIOVIDROS

2.1 ENSAIOS DE CITOTOXICIDADE

Numa investigação em paralelo, realizada pela aluna Bruna Correia para a sua dissertação de mestrado na área de Materiais e Dispositivos Biomédicos, foram produzidos e caracterizados vários tipos de BV com diferentes composições. Realizaram-se testes de citotoxicidade para os mesmos e foi selecionado o biovidro mais promissor. O biovidro selecionado foi produzido pelo método sol-gel, calcinado a 600°C por 2h com uma taxa de aquecimento de 2°C por minuto e moído pelo método da acetona. A sua constituição é a seguinte: 65% SiO₂; 20% CaO; 2% MgO; 4% SrO; 3% ZnO; 2% CuO; 4% P₂O₅ (70).

Os resultados de citotoxicidade para o mesmo estão apresentados na figura 10. Todas as concentrações, exceto a 0,5 mg/mL e 1 mL, apresentaram uma viabilidade celular superior a 70%. O pico de viabilidade celular regista-se na concentração 0,05 mg/mL com uma percentagem de 86,65% ± 9,27%. A percentagem de viabilidade celular regista oscilações com o aumento das concentrações, sendo que na concentração de 0,00625 mg/mL tem um valor de 76,94% ± 7,90%, aumentando ligeiramente na concentração de 0,0125 mg/mL, em seguida diminui em 0,025mg/mL, e por fim, atinge o seu pico. Depois deste valor, a viabilidade, diminui novamente na concentração de 0,1mg/mL para 76,16% ± 20,50%, aumenta ligeiramente nas seguintes concentrações 0,25 mg/mL e 0,5mg/mL, e por fim, regista os valores mais baixos de viabilidade celular nas concentrações de 0,5mg/mL e 1mg/mL, sendo respetivamente 62,23% ± 13,54% e 25,57% ± 10,71%. Quanto a significância estatística, em todas as concentrações a amostra foi comparada com o controlo positivo, e todas apresentaram um valor de $p < 0,0001$, exceto na concentração de 0,05 em que o valor de $p = 0,0002$, ou seja, $p < 0,001$.

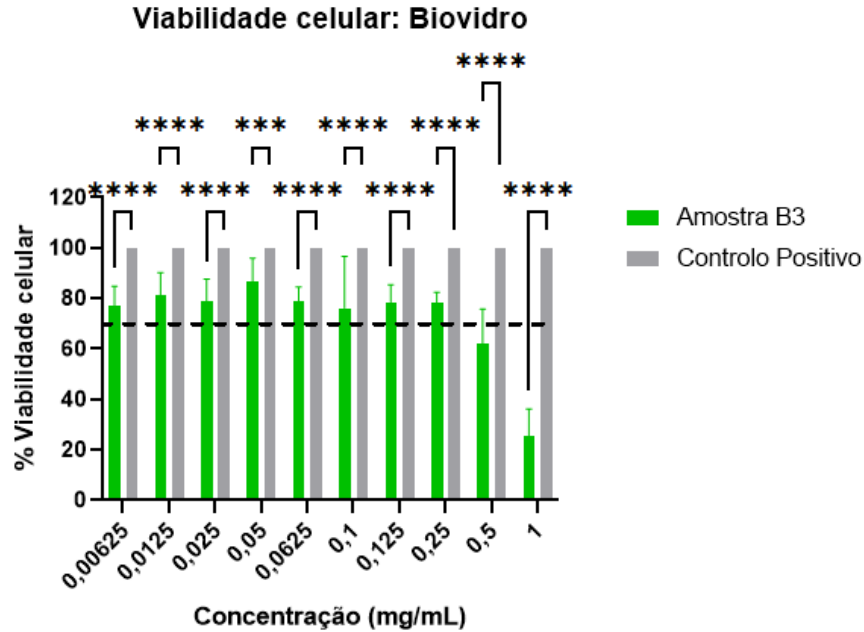


Figura 10 - Viabilidade celular do biovidro. A linhagem celular utilizada foi VERO. O controlo positivo são células com resazurina. Two-way ANOVA, seguida de Sidák's multiple comparison test para a determinação da significância estatística. (**** $p < 0,0001$, *** $p < 0,001$) (70)

2.2 ENSAIOS DE ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Os ensaios de atividade antimicrobiana foram realizados igualmente pelo método de contagem de colónias em placa. O controlo positivo foi o mesmo, *C. albicans* sem exposição à amostra (BV). A concentração escolhida de BV foi 0,05 mg/mL por registar uma viabilidade celular e significância estatística maior, em relação às outras concentrações. Comparando o controlo positivo com a exposição de *C. albicans* a BV figura 11, podemos confirmar uma inibição evidente do crescimento de colónias. No mesmo ensaio, testou-se também a associação do OC com o BV, figura 12, na qual podemos confirmar igualmente uma redução da formação do número de colónia, principalmente na diluição 10^{-6} , comprovando uma associação benéfica entre BV e OC em termos de ação antimicrobiana.

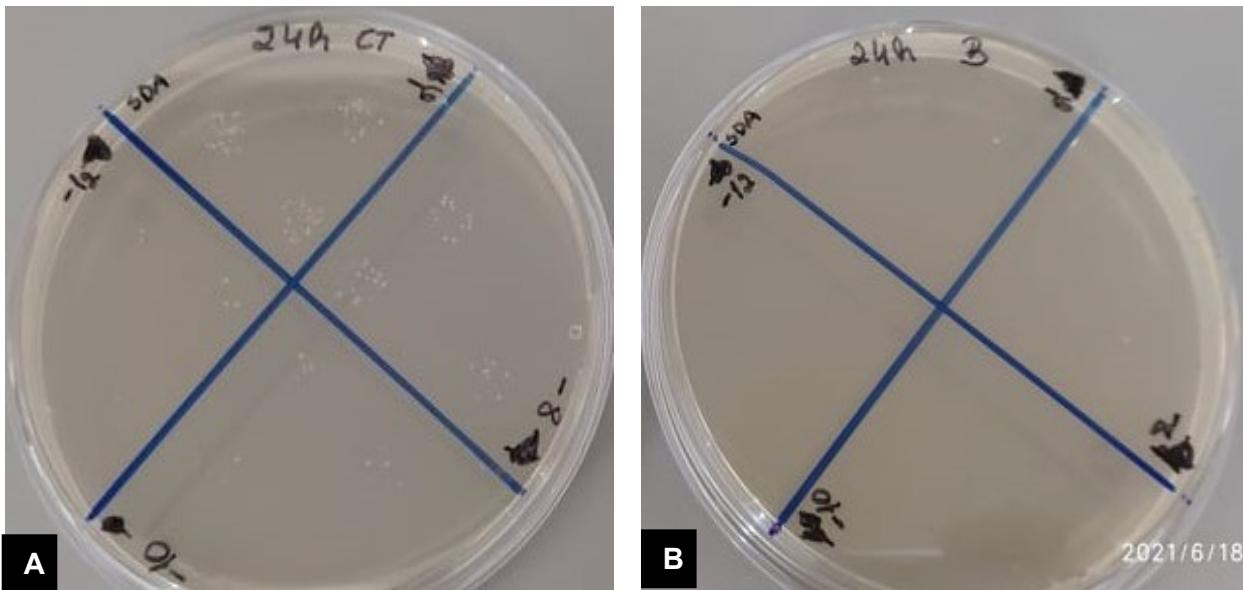


Figura 12 - Crescimento de *C.albicans* nas diluições 10^{-6} , 10^{-8} , 10^{-10} e 10^{-12} durante 24h na ausência (A) e na presença (B) de BV.

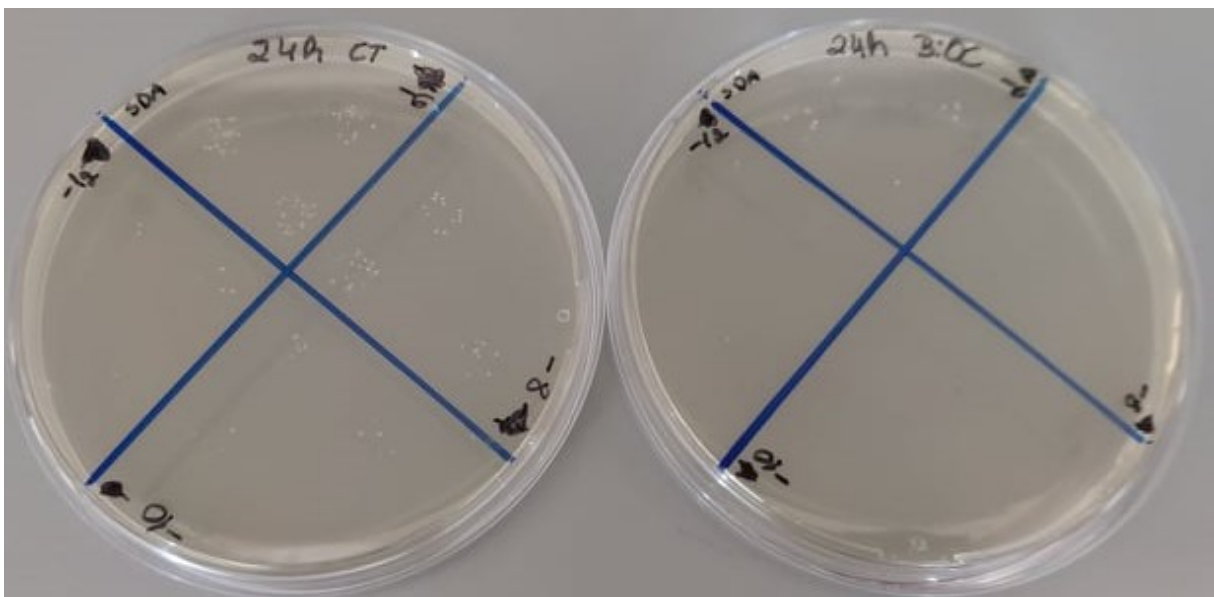


Figura 11 - Associação do biovidro com OC. Na placa da esquerda encontra-se o controlo positivo e na direita a exposição de *C.albicans* com a associação de OC com BV.

IV. DISCUSSÃO

IV. DISCUSSÃO

Para os testes *in vitro*, existem vários tipos de células que podem ser usados, como células de linhas imortalizadas ou de linhas primárias. A *International Organization for Standardization* (ISO) recomenda par uma avaliação primária da citotoxicidade, linhas de células já estabelecidas, tendo como vantagem melhorar a reprodutibilidade dos resultados (65). As células Vero, uma linhagem celular contínua, isolada de células epiteliais renais extraídas do macaco verde africano é frequentemente utilizada em testes de citotoxicidade com aplicações médicas (63,65).

Neste estudo, o OC promoveu uma viabilidade celular sempre superior a 70% e superior ao HC. No entanto, as diferenças só foram significativas entre as amostras, dentro da mesma concentração, em 25 µg/mL e 100 µg/mL, sendo a primeira a concentração em que o OC apresenta maior percentagem de viabilidade, tal como mostra a figura 10. Tanto o HC como o OC, não mostram um crescendo ou decrescendo continuo da viabilidade celular, ambos têm oscilações. Contudo, não existem diferenças significativas da viabilidade celular entre as diferentes concentrações, como mostra a figura 13.

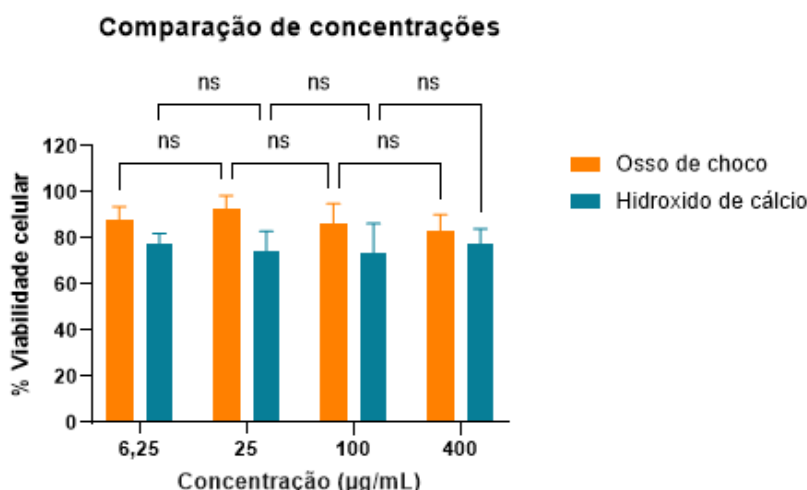


Figura 13 - Comparação de concentrações de OC e HC. Two.way ANOVA, seguida de Tukey's multiple comparisons test, determinando a significância estatística ente concentrações. (ns = sem significância estatística)

Os resultados, na figura 13, mostram uma percentagem de viabilidade celular maior em OC do que em HC, possivelmente devido a este último possuir um pH alcalino, mais tóxico para as células. Alguns estudos mostram que devido ao pH do HC os tecidos periapicais podem ficar danificados e em proteções pulpares diretas, HC puro, provoca uma necrose de 1,5mm de tecido pulpar (51,60).

O OC apresentou uma viabilidade celular elevada, confirmando assim as suas propriedades já conhecidas, não tóxico e biocompatível, podendo ser utilizado como material médico, e assim uma mais valia na formação e mineralização de tecidos duros. Estes resultados estão de acordo com outros estudos recentes, por exemplo, Vajrabhaya *et al.* avaliaram a citotoxicidade e o efeito proliferativo do OC, onde o mesmo mostrou, sempre, viabilidade superior a 80% nas diferentes diluições (0,5 µg/mL, 1 µg/mL, 5 µg/mL, 25 µg/mL, 50 µg/mL, 100 µg/mL e 200 µg/mL, atingindo o seu pico passado 14 dias (66). Um outro estudo, testou o efeito citotóxico do OC, *in vitro* e *in vivo* (em ratinho), como um xeno-enxerto, nas concentrações anteriormente descritas, sendo que a viabilidade celular foi igualmente superior a 80% (71).

A viabilidade celular do biovidro utilizado, registou em quase todas as concentrações percentagens superiores a 70%, as quais estão de acordo com inúmeros estudos já realizados e que comprovam esta biocompatibilidade (25,40). As duas concentrações (0,5mg/mL e 1mg/mL) com valores inferiores são consideradas tóxicas para as células, e por isso sem qualquer aplicação a nível biomédico. Este biocerâmico pelas suas propriedades estruturais e biológicas tem-se mostrado bastante promissor, sendo que atualmente já existem compostos em medicina dentária à base de BV (40).

Nos resultados de citotoxicidade de ambas as amostras, podemos analisar desvios padrões, por vezes, mais aumentados, devido ao facto de a amostra ser uma suspensão, ou seja, uma solução não homogénea, e assim, a dispersão das partículas não é igual entre concentrações.

A associação de OC com os BV mostrou-se mais eficaz nas propriedades antimicrobianas, nomeadamente para *C. albicans*, do que OC sozinho, podendo ser aplicada em casos específicos de infeção por este fungo. Estes resultados

vão de encontro a outros estudos em que mostram que OC sozinho não apresenta atividade antibacteriana contra *S. aureus* e *E. coli* (6), por isso era expectável que semelhante acontecesse para *C. albicans*.

Futuramente, é necessário realizar o mesmo tipo de ensaio para *E. faecalis*, uma vez que é a bactéria mais prevalente em casos de falha endodôntica, e o HC se apresentar ineficaz contra este microrganismo.

Portanto, esta associação não seria benéfica só a nível biológico, mas também a nível estrutural por tornar este material mais denso e mais resistente (35), sendo esta última uma desvantagem do OC. Para aprimorar esta associação, a incorporação de iões para potenciar propriedades antimicrobianas e angionégicas (32), pode ser uma opção para futuras investigações. Existem estudos onde a incorporação de iões zinco em HA proveniente de OC, mostrou ser mais eficaz do que sozinha, nomeadamente para *M. luteus*, *S. aureus*, *B. cereus* e *S. flexnari* (12).

Neste estudo, as nanoparticulas parecem ter especial ênfase, por conseguirem penetrar nos túbulos dentinários, e assim terem um efeito bloqueador, mas também por evitarem a proliferação microbiana, e assim um efeito inibidor (1).

A aplicação em medicina dentária da associação de BV com OC, mostrou ser bastante promissora. Em diversos procedimentos dentários, o objetivo é formar uma barreira mineral de tecido duro (apexificação e revascularização) ou a necessidade de se realizar regeneração óssea (casos de perfuração radiculares), ou mesmo proteções pulpares. Todas estas situações poderiam ser possíveis indicações para a utilização de OC com BV, por apresentarem alta capacidade de regeneração óssea e mineralização dos tecidos, biocompatibilidade, viabilidade celular, ajudar no processo de angiogénese e nas propriedades antibacterianas.

De acordo com a *American Dental association* a avaliação da citotoxicidade através de células são métodos aceites para testar a biocompatibilidade dos materiais dentários. Este tipo de testes através de metodologias precisas, permite a avaliação de novos materiais e compreensão dos seus mecanismos de resposta *in vivo*, aumentando a segurança na sua aplicação, sendo que o

contacto celular com o material pode simular as condições *in vivo*. Comparando as vantagens dos ensaios de citotoxicidade *in vitro* aos estudos em animais e humanos, *in vitro* é possível o controlo do ambiente (pH, temperatura e pressão), condições fisiológicas (concentrações de nutrientes e hormonas), dose, concentração e tempos de exposição. Além destas, a preservação, validação da origem, replicação e variabilidade, um menor custo, resultados mais rápidos, ausência de questões éticas e a padronização da metodologia. No entanto, estes ensaios têm limitações, como o uso de células em monocamadas, não sendo fisiológico e reprodutível da arquitetura tecidual *in vivo*. Assim, estes ensaios são executados sem qualquer contacto com o organismo e as diversas interações, que constituem a resposta biológica, estão ausentes. Além disso, é necessário ter em consideração que um resultado citotóxico *in vitro* pode não ser obrigatoriamente igual *in vivo* (72). Por isso, seria vantajoso numa próxima fase caracterizar biologicamente a associação de OC a BV *in vivo*.

V. CONCLUSÃO

V. CONCLUSÃO

O pó de OC processado hidrotermalmente, em todas as concentrações testadas, não apresenta citotoxicidade para as células VERO. No entanto, o biovidro com a constituição 65% SiO₂; 20% CaO; 2% MgO; 4% SrO; 3% ZnO; 2% CuO; 4% P₂O₅, apresentou citotoxicidade em duas das dez concentrações testadas, 0,5mg/mL e 1mg/mL.

O biovidro mostrou-se mais eficaz na inibição de *C. albicans* do que OC sozinho. Todavia, a associação de OC com BV registou uma redução significativa no crescimento de *C. albicans*.

A aplicação deste tipo de material é, de facto, promissora na área da endodontia, não só em medicação intra-canal, mas também nouro tipo de aplicações como na apexificação, perfurações infra-ósseas.

Novas investigações são necessárias para aprimorar este material a nível biológico, testando outros microrganismos, por exemplo *E. faecalis* ou testando outra associação a BV com composição diferente. Também, de acordo com os resultados obtidos a caracterização deste tipo de material *in vivo* seria promissora.

Este trabalho, que teve como objetivo a caracterização biológica de materiais, foi o primeiro a ser realizado na integra na Faculdade de Medicina Dentária da Universidade Católica de Viseu. Assim, permitiu o desenho e estabelecimento de todos os protocolos que serão úteis para trabalhos futuros com objetivos semelhantes.

BIBLIOGRAFIA

1. Sireesha A, Jayasree R, Vidhya S, Mahalaxmi S, Sujatha V, Kumar TSS. Comparative evaluation of micron- and nano-sized intracanal medicaments on penetration and fracture resistance of root dentin – An in vitro study. *Int J Biol Macromol* [Internet]. 2017;104:1866–73. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.05.126>
2. Palaveniene A, Harkavenko V, Kharchenko V, Daugela P, Pranskunas M, Juodzbaly G, et al. Cuttlebone as a Marine-Derived Material for Preparing Bone Grafts. *Mar Biotechnol*. 2018;20(3):363–74.
3. Birchall JD, Thomas NL. On the architecture and function of cuttlefish bone. *J Mater Sci*. 1983;18(7):2081–6.
4. Cadman J, Zhou S, Chen Y, Li Q. Cuttlebone: Characterisation, Application and Development of Biomimetic Materials. *J Bionic Eng* [Internet]. 2012;9(3):367–76. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S1672-6529\(11\)60132-7](http://dx.doi.org/10.1016/S1672-6529(11)60132-7)
5. Denton EJ, Gilpin-Brown JB, Howarth J V. The Osmotic Mechanism of the Cuttlebone. *J Mar Biol Assoc United Kingdom*. 1961;41(2):351–63.
6. D G, V VJF. The mechanical design of the cuttlebone and its bathymetric implications. *Biomimetics*. 1996;4:37–57.
7. Balu S, Sundaradoss MV, Andra S, Jeevanandam J. Facile biogenic fabrication of hydroxyapatite nanorods using cuttlefish bone and their bactericidal and biocompatibility study. *Beilstein J Nanotechnol*. 2020;11:285–95.
8. Rogina A, Antunović M, Milovac D. Biomimetic design of bone substitutes based on cuttlefish bone-derived hydroxyapatite and biodegradable polymers. *J Biomed Mater Res - Part B Appl Biomater*. 2019;107(1):197–204.
9. Rocha JHG, Lemos AF, Agathopoulos S, Valério P, Kannan S, Oktar FN, et al. Scaffolds for bone restoration from cuttlefish. *Bone*.

2005;37(6):850–7.

10. Rocha JHG, Lemos AF, Agathopoulos S, Kannan S, Valério P, Ferreira JMF. Hydrothermal growth of hydroxyapatite scaffolds from aragonitic cuttlefish bones. *J Biomed Mater Res - Part A*. 2006;77(1):160–8.
11. Shi C, Gao J, Wang M, Fu J, Wang D, Zhu Y. Ultra-trace silver-doped hydroxyapatite with non-cytotoxicity and effective antibacterial activity. *Mater Sci Eng C [Internet]*. 2015;55:497–505. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.msec.2015.05.078>
12. Tank KP, Chudasama KS, Thaker VS, Joshi MJ. Pure and zinc doped nano-hydroxyapatite: Synthesis, characterization, antimicrobial and hemolytic studies. *J Cryst Growth [Internet]*. 2014;401:474–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcrysgro.2014.01.062>
13. Diez-Escudero A, Espanol M, Beats S, Ginebra MP. In vitro degradation of calcium phosphates: Effect of multiscale porosity, textural properties and composition. *Acta Biomater [Internet]*. 2017;60:81–92. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.actbio.2017.07.033>
14. Vallet-Regí M, González-Calbet JM. Calcium phosphates as substitution of bone tissues. *Prog Solid State Chem*. 2004;32(1–2):1–31.
15. Dorozhkin S V. Bioceramics of calcium orthophosphates. *Biomaterials [Internet]*. 2010;31(7):1465–85. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.11.050>
16. Dorozhkin S V, Epple M. Biological and Medical Significance of Calcium Phosphates. *Angew Chemie Int Ed*. 2002;41(17):3130–46.
17. Neto AS, Ferreira JMF. Synthetic and marine-derived porous scaffolds for bone tissue engineering. *Materials (Basel)*. 2018;11(9).
18. Kretlow JD, Young S, Klouda L, Wong M, Mikos AG. Injectable biomaterials for regenerating complex craniofacial tissues. *Adv Mater*. 2009;21(32–33):3368–93.
19. Karageorgiou V, Kaplan D. Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis. *Biomaterials*. 2005;26(27):5474–91.

20. Szurkowska K, Drobniowska A, Kolmas J. Dual doping of silicon and manganese in hydroxyapatites: Physicochemical properties and preliminary biological studies. *Materials (Basel)*. 2019;12(16).
21. Bracci B, Torricelli P, Panzavolta S, Boanini E, Giardino R, Bigi A. Effect of Mg²⁺, Sr²⁺, and Mn²⁺ on the chemico-physical and in vitro biological properties of calcium phosphate biomimetic coatings. *J Inorg Biochem* [Internet]. 2009;103(12):1666–74. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2009.09.009>
22. Martinez-Zelaya VR, Zarranz L, Herrera EZ, Alves AT, Uzeda MJ, Mavropoulos E, et al. In vitro and in vivo evaluations of nanocrystalline zn-doped carbonated hydroxyapatite/alginate microspheres: Zinc and calcium bioavailability and bone regeneration. *Int J Nanomedicine*. 2019;14:3471–90.
23. Hench LL, Splinter RJ, Allen WC, Greenlee TK. Bonding mechanisms at the interface of ceramic prosthetic materials. *J Biomed Mater Res*. 1971;5(6):117–41.
24. Cao W, Hench LL. Bioactive materials. *Ceram Int*. 1996;22(6):493–507.
25. Hench LL. The story of Bioglass®. *J Mater Sci Mater Med*. 2006;17(11):967–78.
26. Xynos ID, Edgar AJ, Buttery LDK, Hench LL, Polak JM. Gene-expression profiling of human osteoblasts following treatment with the ionic products of Bioglass® 45S5 dissolution. *J Biomed Mater Res*. 2001;55(2):151–7.
27. Jones JR. Reprint of: Review of bioactive glass: From Hench to hybrids. *Acta Biomater* [Internet]. 2015;23(S):S53–82. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.actbio.2015.07.019>
28. Palareti G, Legnani C, Cosmi B, Antonucci E, Erba N, Poli D, et al. Bioactive sol-gel glasses: processing, properties and applications. *Int J Lab Hematol*. 2016;38(1):42–9.
29. Zhong J, Greenspan DC. Processing and properties of sol-gel bioactive glasses. *J Biomed Mater Res*. 2000;53(6):694–701.

30. Li R, Clark AE, Hench LL. An investigation of bioactive glass powders by sol-gel processing. *J Appl Biomater*. 1991;2(4):231–9.
31. Treccani L, Yvonne Klein T, Meder F, Pardun K, Rezwan K. Functionalized ceramics for biomedical, biotechnological and environmental applications. *Acta Biomater* [Internet]. 2013;9(7):7115–50. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.actbio.2013.03.036>
32. Islam MT, Felfel RM, Abou Neel EA, Grant DM, Ahmed I, Hossain KMZ. Bioactive calcium phosphate–based glasses and ceramics and their biomedical applications: A review. *J Tissue Eng*. 2017;8.
33. Gentleman E, Fredholm YC, Jell G, Lottfibakhshaiesh N, O'Donnell MD, Hill RG, et al. The effects of strontium-substituted bioactive glasses on osteoblasts and osteoclasts in vitro. *Biomaterials* [Internet]. 2010;31(14):3949–56. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.01.121>
34. Dietrich E, Oudadesse H, Lucas-Girot A, Mami M. In vitro bioactivity of melt-derived glass 46S6 doped with magnesium. *J Biomed Mater Res - Part A*. 2009;88(4):1087–96.
35. Neto AS, Brazete D, Ferreira JMF. Cuttlefish bone-derived biphasic calcium phosphate scaffolds coated with sol-gel derived bioactive glass. *Materials (Basel)*. 2019;12(7).
36. Zhao J, Liu Y, Sun W Bin, Zhang H. Amorphous calcium phosphate and its application in dentistry. *Chem Cent J* [Internet]. 2011;5(1):40. Available from: <http://journal.chemistrycentral.com/content/5/1/40>
37. Tyagi S, Tyagi P, Mishra P. Evolution of root canal sealers: An insight story. *Eur J Gen Dent*. 2013;2(3):199–218.
38. Loushine BA, Bryan TE, Looney SW, Gillen BM, Loushine RJ, Weller RN, et al. Setting properties and cytotoxicity evaluation of a premixed bioceramic root canal sealer. *J Endod* [Internet]. 2011;37(5):673–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.joen.2011.01.003>
39. Silva EJNL, Rosa TP, Herrera DR, Jacinto RC, Gomes BPF, Zaia AA.

- Evaluation of cytotoxicity and physicochemical properties of calcium silicate-based endodontic sealer MTA fillapex. *J Endod.* 2013;39(2):274–7.
40. Washio A, Morotomi T, Yoshii S, Kitamura C. Bioactive glass-based endodontic sealer as a promising root canal filling material without semisolid core materials. *Materials (Basel).* 2019;12(23):17.
 41. Peters LB, Peterson B, Jaramillo DE, van der Sluis L. The Use of Scanning Electron Microscopy (SEM) in Visualizing the Root Canal Biofilm. 2015;87–101.
 42. Flemming HC, Wingender J. The biofilm matrix. *Nat Rev Microbiol* [Internet]. 2010;8(9):623–33. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro2415>
 43. Sunde PT, Olsen I, Debelian GJ, Tronstad L. Microbiota of periapical lesions refractory to endodontic therapy. *J Endod.* 2002;28(4):304–10.
 44. E Nuzzolese, M M Lepore, I Cukovic-Bagic FM, Vella and G Di. Root canal medicaments. *Int Dent J.* 2008;58(2009):342–8.
 45. Chong BS, Ford TRP. The role of intracanal medication in root canal treatment. *Int Endod J.* 1992;25(2):97–106.
 46. Madarati AA, Zafar MS, Sammani AMN, Mandorah AO, Bani-Younes HA. Preference and usage of intracanal medications during endodontic treatment. *Saudi Med J.* 2017;38(7):755–63.
 47. Athanassiadis B, Abbott P V., Walsh LJ. The use of calcium hydroxide, antibiotics and biocides as antimicrobial medicaments in endodontics. *Aust Dent J.* 2007;52(1 SUPPL.).
 48. Zargar N, Marashi MA, Ashraf H, Hakopian R, Beigi P. Identification of microorganisms in persistent/secondary endodontic infections with respect to clinical and radiographic findings: Bacterial culture and molecular detection. *Iran J Microbiol.* 2019;11(2):120–8.
 49. Dioguardi M, Di Gioia G, Illuzzi G, Arena C, Caponio VCA, Caloro GA, et al. Inspection of the microbiota in endodontic lesions. *Dent J.*

- 2019;7(2):1–15.
50. Siqueira J, De uzeda M, Fonseca M. A scanning electron microscopic evaluation of in vitro dentinal tubules penetration by selected anaerobic bacteria. *Journal Endod.* 1996;22(6):308–10.
 51. Zancan RF, Vivan RR, Milanda Lopes MR, Weckwerth PH, de Andrade FB, Ponce JB, et al. Antimicrobial Activity and Physicochemical Properties of Calcium Hydroxide Pastes Used as Intracanal Medication. *J Endod.* 2016;42(12):1822–8.
 52. Prada I, Micó-Muñoz P, Giner-Lluesma T, Micó-Martínez P, Collado-Castellano N, Manzano-Saiz A. Influence of microbiology on endodontic failure. Literature review. *Med Oral Patol Oral y Cir Bucal.* 2019;24(3):e364–72.
 53. Alghamdi F, Shakir M. The Influence of *Enterococcus faecalis* as a Dental Root Canal Pathogen on Endodontic Treatment: A Systematic Review. *Cureus.* 2020;12(3):1–10.
 54. Siqueira JF, Rôças IN. Clinical Implications and Microbiology of Bacterial Persistence after Treatment Procedures. *J Endod.* 2008;34(11).
 55. Evans M, Davies J, Sundqvist G, Figdor D. Mechanisms involved in the resistance of *Enterococcus faecalis* to calcium hydroxide. *Int Endod J.* 2002;35(3):221–8.
 56. Kim D, Kim E. Antimicrobial effect of calcium hydroxide as an intracanal medicament in root canal treatment: a literature review - Part I. In vitro studies. *Restor Dent Endod [Internet].* 2014;39(4):241. Available from: <https://rde.ac/DOIx.php?id=10.5395/rde.2014.39.4.241>
 57. Farhad A, Mohammadi Esfahan Z. Calcium hydroxide: a review. *Int Dent J.* 2005;55:293–301.
 58. Nerwich J, Figdor D MH. Ph changes in root dentine over four weeks period following root canal dressing with calcium hydroxide. *J Endod.* 1993;19(6):302–6.
 59. Lopes H, Siqueira J. *Endodontia: Biologia e Técnica.* 4a ed. Elsevier,

editor. 2015.

60. Mohammadi Z, Dummer PMH. Properties and applications of calcium hydroxide in endodontics and dental traumatology. *Int Endod J*. 2011;44(8):697–730.
61. Rosenberg B, Murray PE, Namerow K. The effect of calcium hydroxide root filling on dentin fracture strength. *Dent Traumatol*. 2007;23(1):26–9.
62. Siqueira JF, Lopes HP. Mechanisms of antimicrobial activity of calcium hydroxide: A critical review. *Int Endod J*. 1999;32(5):361–9.
63. Pereira IC, Duarte AS, Neto AS, Ferreira JMF. Chitosan and polyethylene glycol based membranes with antibacterial properties for tissue regeneration. *Mater Sci Eng C [Internet]*. 2019;96(January 2018):606–15. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.msec.2018.11.029>
64. Ammerman N, Beier-Sexton M, Azad A. Vero cell line maintenance. *Curr Protoc Microbiol*. 2009;1–10.
65. I. Standard. International Organization for Standardization, ISO 10993-5. In: *Biological evaluation of medical devices Tests for in vitro cytotoxicity*. 2009. p. 34.
66. Vajrabhaya L, Korsuwannawong S, Surarit R. Cytotoxic and the proliferative effect of cuttlefish bone on MC3T3-E1 osteoblast cell line. *Eur J Dent*. 2017;11(4):503–7.
67. A. E2149-13a, Standard Test Method for Determining the Antimicrobial Activity of Immobilized Antimicrobial Agents Under Dynamic Contact Conditions. In 2013. p. 11–4.
68. dos Santos R, Sarra G, Lincopan N, Petri D, Aliaga J, Marques M, et al. Preparation, Antimicrobial Properties, and Cytotoxicity of Acrylic Resins Containing Poly(diallyldimethylammonium chloride). *Int J Prosthodont*. 2020;1–7.
69. Harriott MM, Noverr MC. *Candida albicans* and *Staphylococcus aureus* form polymicrobial biofilms: Effects on antimicrobial resistance. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009;53(9):3914–22.

70. Correia B. Fungos marinhos: um recurso sustentável e ecológico para o desenvolvimento de materiais compósitos endodónticos. Universidade de Aveiro;
71. Irianto KA, Limbong S. Cytotoxic effect of natural cuttlefish bone xenograft: In vitro and in vivo study. *Med J Indones*. 2020;29(2):136–42.
72. Freshney R. Cytotoxicity. In: *Culture of animal cells (a manual of basic technique)*. 5th ed. Wiley-Liss; 2010. p. 365–81.

ANEXOS

ANEXO 1: PREPARAÇÃO DO OC

- Pesar 6 g de OC, sem a casca, (CaCO_3 – 100.087 g/mol) correspondente a 0.06 moles de cálcio;
- Colocar o material no recipiente de aço inoxidável revestido com teflon;
- Adicionar ao recipiente a quantidade necessária de fosfato de amónia (+/- 13,49 g) ($(\text{NH}_4)_3\text{HPO}_4$ – PM = 132,06 g/mol) de modo a obter uma razão molar Ca/P = 0,33;
- Colocar água até perfazer cerca de dois terços do seu volume interno;
- Colocar o recipiente numa estufa a 150 °C durante 3-4 dias;
- Secar e calcinar a 900 °C durante 1h;
- Moer durante 1h em acetona, usando uma razão material/bolas de zircónia (10mm de diâmetro) de 1/10 e uma razão material/acetona 1/1;
- Secar os pós moídos e fazer a identificação das fases formadas por DRX (Difração de raio x) e a distribuição granulométrica das partículas.

ANEXO 2: CULTURA DE CÉLULAS VERO:

Descongelamento das células:

- Esterilizar o local de trabalho (câmara de fluxo laminar);
 - Acender a lâmpada UV por 20-30 min;
 - Limpar a câmara e o material com etanol 70%;
- Pipetar 5 mL de meio de cultura a 37 °C, para o frasco de cultura e 5 mL para o tubo Falcon;
- Descongelar o frasco contendo as células a 37 °C (1-2 min) e transferir para a câmara de fluxo laminar;
- Transferir o conteúdo do frasco, gota a gota, para o tubo falcon contendo 5 mL de meio de cultura
- Centrifugar a 900 rpm por 5 min;

- Descarta o sobrenadante e suspender o pellet em 5 mL de meio de cultura, com uma pipeta de Pasteur;
- Transferir a suspensão celular para o frasco de cultura contendo 5 mL de meio de cultura;
- Agitar suavemente o frasco de cultura (movimentos horizontais lentos) antes de colocá-las na incubadora (37 °C, 5% CO₂);

Tripsinização:

- Preparar a câmara de fluxo laminar (acender a lâmpada UV por 20-30 min, acionar a ventilação por 10 min, limpar a câmara e as matérias com etanol 70%);
- Preparar o meio de cultura e incubar a 37 °C durante alguns minutos;
- Remover o meio antigo com uma pipeta sorológica de 10 mL;
- Adicionar gota a gota na parede do frasco de cultura 5 mL de PBS, pré-aquecido a 37 °C, e misturar cuidadosamente para lavar a cultura;
- Remover o PBS;
- Adicionar a Tripsina – EDTA (pré-aquecida a 37 °C) em vários locais do frasco de cultura, próximo da parede
- Girar o frasco até a Tripsina cobrir todo o fundo do frasco;
- Deixa descansar na incubadora por 2 minutos;
- Adicionar 6 mL de meio de cultura e suspender as células
- Transferir a suspensão de células para um tubo falcon estéril de 15 mL;

Subculturas:

- Pipetar o volume apropriado do meio de cultura para um novo frasco de cultura, até a densidade de $1,0 \times 10^5$ células/ mL;
- Adicionar gota a gota na parede do frasco de cultura, o volume apropriado de suspensão de células;
- Agitar suavemente o frasco (movimentos horizontais lentos) e incubar (37 °C, 5% CO₂);

ANEXO 3: ENSAIO DE CITOTOXICIDADE: MÉTODO RESAZURINA

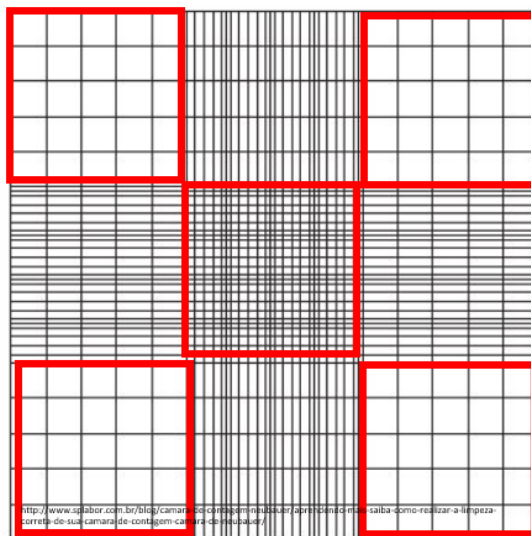
Preparação das células:

- Esterilizar a câmara, com luz ultravioleta durante 20 minutos
- Limpar a superfícies da câmara com e etanol 70%;
- Retirar as células da incubadora e analisá-las ao microscópio invertido, par ver se tem uma boa confluência;
- Retirar o meio (descartar ou com uma pipeta sorológica de 10 mL);
- Utilizando uma pipeta sorológicas, lavar as células com 5 mL de PBS (2 vezes);
- Remover o PBS;
- Adicionar 2 mL de Trypsina EDTA, destacando as células das paredes do frasco de cultura;
- Incubar por 2,5 min (37°C, 5% CO₂), ajudando na atuação da trypsinase;
- Adicionar 6 mL de DMEM (com 10% FBS + 1% AA), parando a tripsinização;
- Transferir a suspensão células para um tubo falcon de 15 mL;
- Retirar 30 µL se suspensão celular para um microtubo de 1,5 mL;
- Adicionar 30 µL de Trypan Blue, o Trypan Blue é um corante que vai corar as células não viáveis;

Contagem das células:

- Num microscópio ótico ou invertido, ver se a grelha do hemocitómetro aparece de forma clara;
- Pipetar 10 µL da suspensão (células + TB) no hemocitómetro (fazendo up&down com a micropipeta para homogeneizar a suspensão);
- Levar ao microscópio;

- Contar as células viáveis (brilhantes) nos quadrantes (delimitados a vermelho) como exemplificado na figura a baixo:

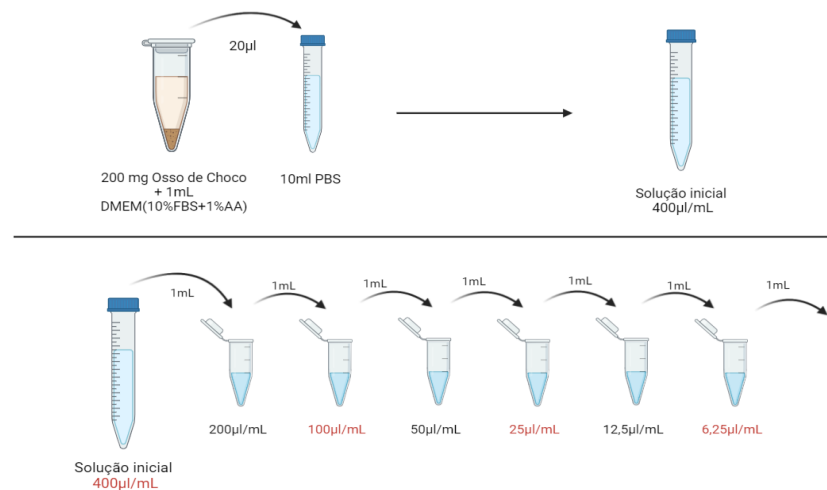


- Fazer a soma do nº de células de cada um dos quadrantes e dividir por 5;
- Determinar a concentração da suspensão inicial;
- Determinar o volume da nova suspensão celular;
- Determinar a concentração da nova suspensão celular;
- Preparar a nova suspensão celular, de acordo com os cálculos obtidos anteriormente;

Preparação para o ensaio:

- Preparar a suspensão celular (X células + X mL DMEM) num tubo falcon; (a quantidade de células e do meio DMEM vai depender da quantidade de células que queremos no ensaio e dos cálculos anteriores);
- Com uma pipeta, pipetar 50 µL da suspensão em cada poço, é recomendado fazer up&down a cada 3 pipetagens para que as células não fiquem depositadas no fundo do tubo de falcon;
- Os poços da periferia devem conter água estéril (nomeadamente, as linhas A e H e as colunas 1 e 12), devido ao líquido dos poços da periferia ter a tendência de evaporar no processo de incubação;
- A coluna 6 é o controlo positivo (células + PBS)

- A coluna 11 é o controlo negativo (sem células, ou seja, poços vazios)
- Incubar a placa durante 24h, 37°C, 5% CO₂ (até uma confluência de 80-90%).
- Preparar a suspensão de OC – 200 mg de OC em 1 mL de DMEM incubar durante 24h, 37°C, 5% CO₂
- Preparar a suspensão de hidróxido de cálcio – 200 mg de hidróxido de cálcio em 1 mL de DMEM incubar durante 24h, 37°C, 5% CO₂
- Fazer a diluição do OC e do hidróxido de cálcio (como esta representado abaixo)

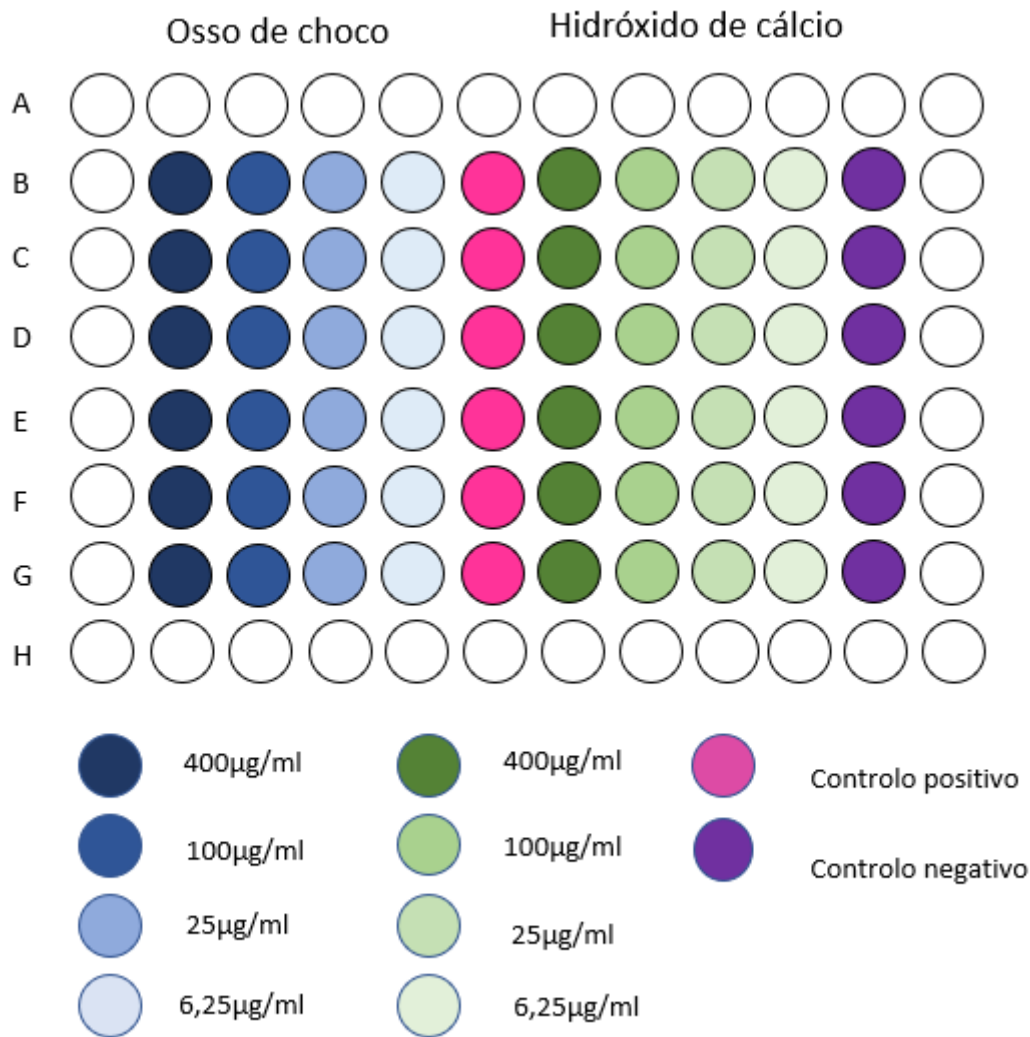


* Todos os eppendorf devem conter 1ml de PBS antes da diluição

** so vão ser avaliadas as concentrações a vermelho

Created in BioRender.com bio

- Pipetar a 50 µL de cada suspensão (material + PBS) para cada poço correspondente a grelha abaixo indicada (figura 3)



- Incubar a placa durante 24h, 37°C, 5% CO₂;
- Retirar a placa da incubadora;
- Aspirar todo o meio de cultura, com a ajuda da bomba de vácuo

(Nota: esterilizar a bomba de vácuo antes e depois da sua utilização)

- Adicionar 50µL de PBS, para a lavagem dos poços;
- Aspirar o PBS;
- Adicionar 50 µL de DMEM com 10% de resazurina;
- Incubar por 2-3h (até a redução da resazurina) (37°C, 5% CO₂);
- Retirar a placa da incubadora e ler a absorbância a 570 e 600 nm, no leitor de microplacas- Varioskan™ Lux multimode microplate reader (Thermo Scientific™)
- Calcular a viabilidade celular de acordo com a equação:

$$\% \text{ Viabilidade celular} = \left(\frac{\left(\frac{OD^{570}}{OD^{600}} \right) - \bar{c} -}{\bar{c} \pm C^-} \right) \times 100$$

ANEXO 4: ENSAIO DE ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Preparação dos meios:

- **Meio Lúria Broth:**
 - Pesar 5g de meio LB e juntar a 200mL de água destilada.
 - Dissolver o meio na água destilada e agitar bem usando agitadores magnéticos e uma placa de agitação para ajudar a dissolver o meio.
 - Colocar na autoclave em frascos de vidro com tampa a meia rosca por 20 minutos à 121°C.
 - Distribuir meio em tubos previamente esterilizados dentro da câmara de fluxo laminar.
 - Ainda sob condições de assepsia, transferir 10mL para um tubo de ensaio, que vai servir para fazer o inóculo microbiano em meio líquido.
- **Meio Lúria Agar:**
 - Pesar 10g de meio LA e juntar a 250mL de água destilada.
 - Dissolver o meio na água destilada e agitar bem usando agitadores magnéticos e uma placa de agitação para ajudar a dissolver o meio.
 - Ferver o meio em micro-ondas, agitando sempre para ajudar a dissolver o meio.
 - Colocar na autoclave em frascos de vidro com tampa a meia rosca por 20 minutos à 121° C.
 - Distribuir o meio em placas de Petri dentro da câmara de fluxo laminar ainda quente para evitar que solidifique dentro da garrafa.

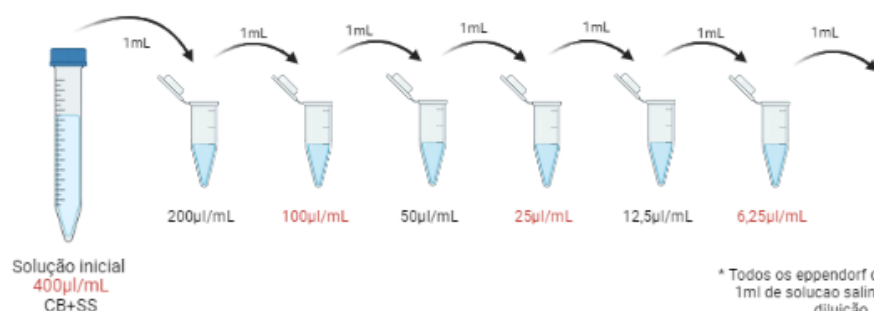
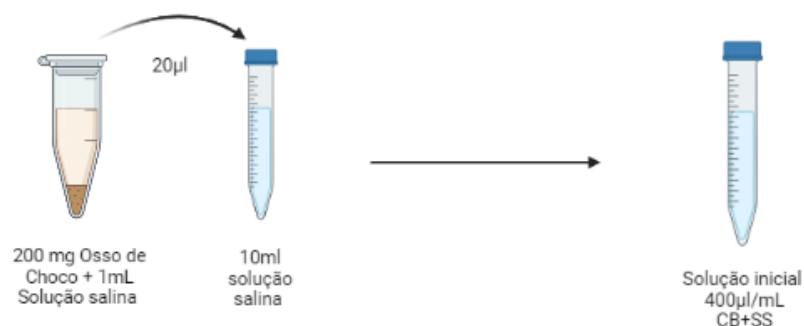
- Deixar as placas meio abertas dentro da câmara para arrefecer sem criar vapor de água na tampa.
 - **Meio Sabouraud Dextrose Broth (SDB):**
 - Pesar 9g de meio LB e juntar a 00mL de água destilada.
 - Dissolver o meio na água destilada e agitar bem usando agitadores magnéticos e uma placa de agitação para ajudar a dissolver o meio.
 - Colocar na autoclave em frascos de vidro com tampa a meia rosca por 20 minutos à 121° C.
 - Distribuir meio em tubos previamente esterilizados dentro da câmara de fluxo laminar.
 - Ainda sob condições de assepsia, transferir 10mL para um tubo de ensaio, que vai servir para fazer o inóculo microbiano em meio líquido.
 - **Meio Sabouraud Dextrose Agar (SDA):**
 - Pesar 9g de meio SDB e juntar a 300mL de água destilada.
 - Pesar 4,5g de Agar e adicionar juntamente com o SDB á água destilada.
 - Dissolver o meio e o agar na água destilada e agitar bem usando agitadores magnéticos e uma placa de agitação para ajudar a dissolver o meio.
 - Ferver o meio em micro-ondas, agitando sempre para ajudar a dissolver o meio.
 - Colocar na autoclave em frascos de vidro com tampa a meia rosca por 20 minutos à 121º C.
 - Distribuir o meio em placas de Petri dentro da câmara de fluxo laminar ainda quente para evitar que solidifique dentro da garrafa.
1. Deixar as placas meio abertas dentro da câmara para arrefecer sem criar vapor na tampa.

Preparação dos inóculos microbianos:

- Com uma ansa esterilizada nas chamas, retirar uma colónia de *Enterococcus faecalis* e de *Candida albicans* da placa previamente preparada, sob condições de assepsia.
- Colocar a colónia num tudo de ensaio com 10mL de meio LB para o *Enterococcus faeclis* e 10 mL de meio SDB para a *Candida albicans*.
- Fechar a tampa do tubo e isolar com parafilme.
- Colocar na incubadora de agitação orbital *overnight* a 37°C e aproximadamente 70rpm.

Preparação do material de teste:

- Pesar 200mg de OC na balança analítica e juntar com 1mL de meio LB num microtubo e 1mL de meio SDB num outro *outro*.
- Incubar *overnight* a 37°C e aproximadamente 70rpm.
- Na manhã seguinte, centrifugar a 3500rpm durante 10 minutos.
- Fazer uma diluição em série do OC de acordo com a Figura 1:



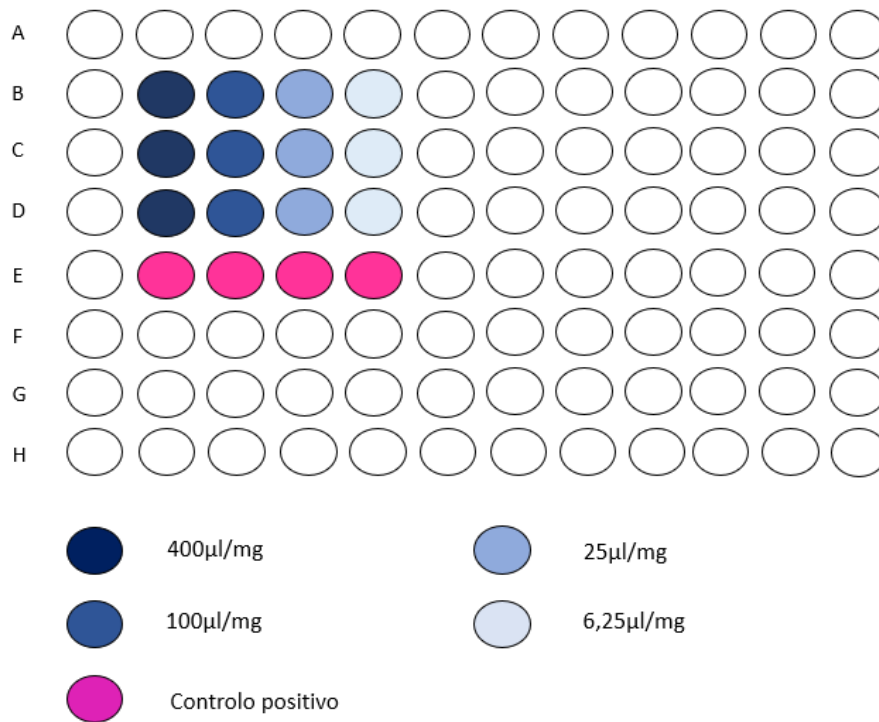
* Todos os eppendorf devem conter 1ml de solução salina antes da diluição

** so vão ser avaliadas as concentrações a vermelho

Ensaio de atividade antimicrobiana:

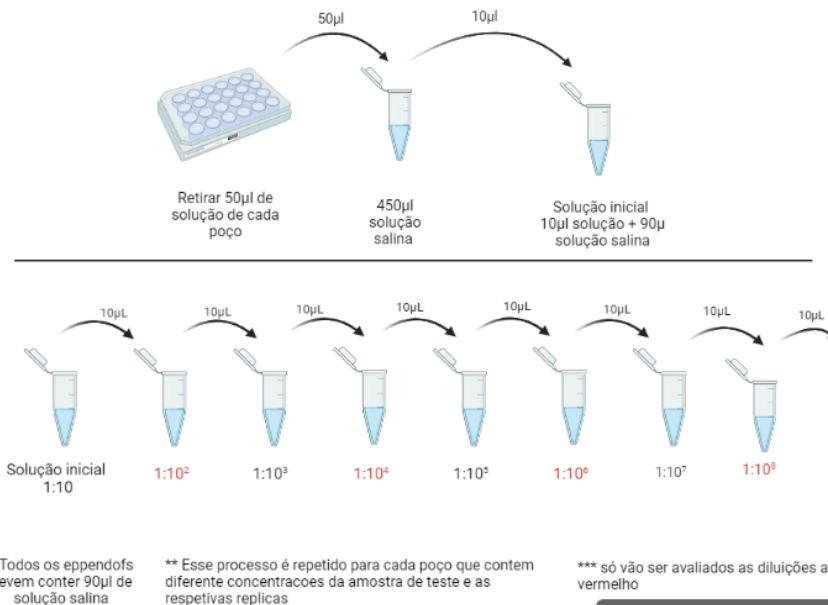
- Retirar 2,5mL da suspensão microbiana previamente preparada no tubo de ensaio e colocar num tubo de 15mL.
- Centrifugar a suspensão bacteriana a 10,000rpm por 5 minutos a 37°C.
- Descartar o sobrenadante e adicionar 5mL de solução salina (NaCl 0.9%) ou PBS ao *pellet* obtido.
- Resuspender o *pellet* na solução salina até obter uma mistura homogénea.
- Fazer a leitura da densidade ótica dessa suspensão celular (+ solução salina) no espectrofotómetro a 600nm.
 - Pipetar 1000µL de meio LB numa cuvette para fazer a leitura do zero.
 - Fazer o vortex da suspensão bacteriana para que as bactérias estejam misturadas uniformemente por toda a solução.
 - Pipetar 1000µL da suspensão bacteriana para uma cuvette sob condições de assepsia.
 - Posicionar a cuvette no local indicado no espectrofotómetro.
- Pipetar 40µL de solução salina estéril em cada poço.
- Pipetar 50µL das concentrações a serem testadas da amostra (OC) em cada poço da placa *Multiwell* de acordo com o esquema abaixo.

Gradiente azul: adicionar 50µL (de cada suspensão OC): 400µg/mL; 100µg/mL; 25µg/mL e 6,25µg/mL; Controlo positivo: suspensão bacteriana sem presença de amostra.



- Pipetar 10µL da suspensão bacteriana que contém a densidade ótica desejada em cada poço e resuspender.
- Incubar a placa *Multiwell* na incubadora de agitação orbital a 37°C e aproximadamente 70rpm por 1 hora.
- Retirar a placa da incubadora após a incubação e fazer diluições decimais da solução (OC + *Enterococcus faecalis* e OC + *Candida Albicans*) em condições de assepsia:
 - Retirar 50µL de solução (OC + *Enterococcus faecalis* e OC + *Candida Albicans*) de cada poço e transferir para um microtubo com 450µL de solução NaCl;
 - Retirar 10µL da solução anterior e transferir para um *microtubo* com 90 µL de solução salina, resultando numa diluição de 1:10 que será denominada se solução inicial para as diluições.

- Retirar 10µL da solução inicial e transferir para o *microtubo* com os 90µL de solução NaCl e prosseguir com a diluição em série, sempre retirando 10µL de um *microtubo* para o outro:



- Após as diluições, retirar 10µL das diluições a serem testadas (10⁻², 10⁻⁴, 10⁻⁶, 10⁻⁸) e pipetar em forma de gota uniforme nas placas de Petri com meio LA previamente preparadas e esperar secar ainda em condições de assepsia.
- Incubar as placas de Petri com a tampa voltada para baixo, de modo a evitar condensação, por 24 horas a 37°C numa estufa.
- Analisar os resultados após as 24 horas, contando a formação de colónias (UFC).
- Calcular o logaritmo das UCG por mL (Log(UCF(mL))), de acordo com a seguinte fórmula:

$$UCF/mL = \frac{N^{\circ}colónias}{Volume * Diluição}$$

Equação 3: n° de colonias = n° colónias em cada gota; volume= volume semeado de cada gota em mL; diluição=Diluição na qual foram contadas o número de colónias.