

HÉLIO KATSUYA ONODA

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA AÇÃO ANTIMICROBIANA DE TRÊS
CIMENTOS ENDODÔNTICOS MODIFICADOS COM
NANOPARTÍCULAS DE PRATA**

CAMPO GRANDE
2011

HÉLIO KATSUYA ONODA

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA AÇÃO ANTIMICROBIANA DE TRÊS
CIMENTOS ENDODÔNTICOS MODIFICADOS COM
NANOPARTÍCULAS DE PRATA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região do Centro-oeste da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, para obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Prof^a Dr^a Ângela Antonia Sanches Tardivo.Delben

CAMPO GRANDE
2011

FOLHA DE APROVAÇÃO

HÉLIO KATSUYA ONODA

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA AÇÃO ANTIMICROBIANA DE TRÊS CIMENTOS
ENDODÔNTICOS MODIFICADOS COM NANOPARTÍCULAS DE PRATA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região do Centro-oeste da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, para obtenção do título de Mestre.

Resultado _____

Campo Grande (MS), 08 de julho de 2011.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a Dr^a Ângela Antonia Sanches Tardivo.Delben
Instituição: Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

Prof Dr Danilo Mathias Zanello Guerisoli
Instituição: Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

Prof Dr Odair Pimentel Martins
Instituição: Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

DEDICATÓRIA

Aos meus pais Fugiko e Massao Onoda me deram o milagre da vida, o primeiro sorriso, as primeiras palavras, os primeiros gestos de carinho, a compreensão, o apoio, a segurança, o aprendizado. Investiram tempo, paciência e dinheiro em mim e mais um resultado agora se apresenta.. A vocês pais, ofereço o sonho, o abraço, o beijo e mais esse diploma.

Ao meu irmão Eduardo que esteve comigo nesta caminhada, sempre disponível a me ajudar e me aconselhar nos momentos em que mais precisei. Manteve-se compreensivo quando não puder estar desfrutando junto o que foi uma das suas maiores alegrias: seu casamento.

À minha irmã Kátia que me incentiva e me apoia sempre, dando um colorido a mais, necessário a minha rotina.

Ao Prof Dr Danilo Mathias Zanello Guerisoli precursor de todo esse momento sublime. Suas palavras de incentivo a seguir esse maravilhoso caminho da docência foi fundamental. Mostra-se um pai, ainda importante na minha formação intelectual, científica e humana. Será sempre um ícone que irei espelhar em minhas decisões. Minhas gratidões serão poucas pelos ensinamentos que me deu e pelas portas que estão se abrindo e que ainda serão abertas. Meu eterno reconhecimento por você.

AGRADECIMENTOS

A Deus, que se fez presente em todos os momentos. E, passo a passo, pude sentir Sua mão na minha, transmitindo-me a segurança necessária para enfrentar o meu caminho e vencer mais essa batalha.

À Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, por me abrigar em sua casa, me orgulho muito de ser um filho seu.

À Faculdade de Odontologia Prof Albino Coimbra Filho, por permitir que eu tivesse um ensino de qualidade na graduação e agora como pós-graduado oportunidade de ensinar e formar novos cirurgiões–dentistas.

À Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, que através dos professores e funcionários pude desfrutar das instalações onde meu conhecimento era enriquecido.

Ao Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região do Centro-Oeste, que através de seus professores e funcionários possibilitaram a concretização de mais um projeto.

Ao Laboratório de Pesquisa da Faculdade de Odontologia Prof Albino Coimbra Filho, na pessoa da Prof^a Margareth Coutinho, local onde se iniciou todo esse trabalho.

Ao Laboratório de Microbiologia da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, na pessoa do Prof Odair Martins Pimentel, que me cedeu materiais e instrumentos necessários para realização deste trabalho.

À Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul–FUNDECT, pela bolsa a mim concedida.

À minha orientadora Prof^a Dr^a Ângela Antonia Sanches Tardivo Delben, que sem ao menos me conhecer, depositou total confiança em mim, aceitando-me como orientado, quando não mais esperança eu tinha em encontrar um orientador. Trouxe

consigo sabedoria, diligência, humildade e perpétuo conhecimento, fundamentais para superar esse desafio interdisciplinar. Tornou-se importante para meu crescimento profissional e humano.

Ao Prof Dr Odair Pimentel Martins, que orientou o ensaio microbiológico deste trabalho de forma singular.

Ao Prof Dr Gerson Hiroshi Yoshinari, pelos ensinamentos dos primeiros passos na Endodontia, pelo seu infinito conhecimento na área médica-odontológica. Mostrou-se importante na minha formação acadêmica, intelectual e científica, já que possibilitou a abertura das portas da disciplina de Endodontia.

Ao Prof Dr Key Fabiano Souza Pereira, a quem tenho como um irmão mais velho. Pela enorme confiança a mim dada, a quem devo minha formação de especialista em Endodontia. Minha eterna gratidão por tudo que fez e vem fazendo por mim.

Ao Prof Ms Fábio Nakao Arashiro, pelo seu exemplo de amor a Odontologia, contribui de forma ímpar no meu aprendizado em Endodontia. Pela amizade, convivência adorável e por estar sempre disposto a ensinar e ajudar.

Às professoras responsáveis pela disciplina de Odontologia para Pacientes com Necessidades Especiais e Estágio Obrigatório em Odontologia para Pacientes com Necessidades Especiais, Prof^a Dr^a Fátima Heretier Corvalan e Prof^a Dr^a Nára Rejane Santos Pereira, por abrir as portas e me abrigar na disciplina, confiar em meu trabalho e me ensinar ainda mais, o lado humano da profissão.

Aos professores da disciplina de Dentística Restauradora Prof^a Dr^a Margareth Coutinho e Prof Dr José Luiz Guimarães de Figueiredo, pela amizade e ensinamentos.

À turma de Odontologia UFMS 2010 e 2011, que fizeram presente ao longo desta batalha.

Ao técnico de laboratório do Departamento de Física da UFMS Luiz Felipe Praça, pela paciência e disposição em me ajudar.

Ao meu amigo Felipe Henrique Fassina Domingues, que divide comigo as vitórias e os aborrecimentos de um curso de pós-graduação, seguimos juntos para realização de mais um sonho.

Aos meus amigos de graduação William Cavalcante Godoy e Rivaldo Alves Júnior, a suas amizades ainda hoje se tornam indispensáveis no meu viver.

Às minhas amigas cirurgiãs-dentistas, Natália Carvalho Trevizam e Renata Nakase Takayassu, com vocês vivo bons momentos e com eles os risos, o abraço, o companheirismo. Suas amizades fizeram cada momento especial, inesquecível e eterno como há de ser.

À todos que direta ou indiretamente contribuíram para realização deste trabalho.

“Tudo que um sonho precisa pra ser realizado é alguém que acredite que ele possa ser realizado.”

(Roberto Shinyashiki)

RESUMO

Onoda HK. **Avaliação *in vitro* da ação antimicrobiana de três cimentos endodônticos modificados com nanopartículas de prata.** Campo Grande, 2011[Dissertação – Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região do Centro-Oeste].

Uma das funções da obturação dos canais radiculares é preenchê-lo de forma o mais hermético possível, estimulando o reparo dos tecidos periapicais e evitando que microrganismos consigam reinfetar o sistema de canais radiculares. Assim é preciso que o cimento endodôntico apresente algumas propriedades desejáveis. Dentre estas, destaca-se a necessidade de ser bactericida ou, ao menos, ser desfavorável ao crescimento bacteriano. Este projeto visou avaliar *in vitro* a capacidade antimicrobiana de alguns cimentos endodônticos acrescidos de nanopartículas de prata. Foram utilizados três tipos de cimentos: Grupo A, Endométhasone; Grupo B, Pulp Canal Sealer e no Grupo C, AH Plus. Cada grupo experimental foi subdividido em quatro subgrupos: no subgrupo 1, não foram adicionadas nanopartículas, enquanto o subgrupo 2 recebeu 0,1%, no subgrupo 3, 0,5% e no subgrupo 4, 1% (em peso). Pastilhas cilíndricas de 2 mm de diâmetro por 5 mm de altura foram confeccionadas pela inserção do cimento manipulado em tubos de polietileno com as dimensões supracitadas. Para o ensaio de biodegradação dos compósitos, cada pastilha de cimento endodôntico foi colocada em um Ependorf contendo Fluido Corporal Simulado e inóculo bacteriano. A intervalos regulares de 24 horas, alíquotas de 1 mL eram colhidas e plaqueadas pela técnica *pour plate* para posterior contagem de unidades formadoras de colônias para cultura de *Enterococcus faecalis* ATCC. A análise estatística dos resultados mostrou que, cimentos à base de óxido de zinco e eugenol empregados neste estudo são mais eficazes na eliminação de *Enterococcus faecalis* do que o cimento AH Plus e a adição mínima de 0,1% de nanopartículas de prata àqueles cimentos foi eficaz na melhoria de suas propriedades bactericidas, o que não foi constatado no cimento AH Plus

Palavras chaves: Nanotecnologia, obturação dos canais radiculares, Endodontia

ABSTRACT

Onoda HK. **In vitro evaluation of microbial action of three root canal sealers modified with silver nanoparticles.** Campo Grande, 2011[Dissertation – Post-Graduate Program in Health and Development in the Region of Mid-West].

One of the functions of the filling of root canals is complete it as airtight as possible, stimulating the repair of periapical tissues and preventing microorganisms able to reinfect the root canal system. So it is necessary that the sealer has some desirable properties. Among these, there is the need to be bactericidal, or at least, be detrimental to bacterial growth. This project aimed to evaluate the *in vitro* antimicrobial capacity of some endodontic sealers added silver nanoparticles. Three types of root canal sealers was used: Group A, Endomethasone, Group B, Pulp Canal Sealer and Group C, AH Plus. Each experimental group was divided into four subgroups: subgroup 1, are not added nanoparticles, while subgroup 2 will received 0.1% in subgroup 3, and 0.5% in the subgroup 4, 1% (by weight). Cylindrical tablets of 2 mm in diameter and 5 mm in height were made by inserting the cement manipulated in polyethylene tubes with the dimensions above. For the biodegradation of the composite, each chip sealer is placed in a Ependorf containing Simulated Body Fluid and bacterial inoculum. At regular intervals of 24 hours, aliquots of 1 mL was collected and plated by the pour plate technique for subsequent counting of colony-forming units culture for *Enterococcus faecalis* ATCC. Statistical analysis showed that root canal sealers based zinc oxido and eugenol used in this study are more effective in eliminating *Enterococcus faecalis* than the AH Plus, and the addition of 0,1% silver nanoparticles to root canal sealers based zinc oxido and eugenol in improving its bactericidal properties, wich was not found in the AH Plus Sealer.

Palavras chaves: Nanotechnology, obturation of root canals, Endodontics

LISTA DE TABELAS

Tabela VIII - Reagente para a preparação de SBF (pH 7,4/ 1L)	61
--	----

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fluxograma da metodologia empregada no experimento	38
Figura 2 - Número de UFC encontradas após 24 horas de exposição aos cimentos testados com adição de diferentes concentrações de nanopartículas de prata. Concentração bacteriana em $T_0 = 4,7 \times 10^7$	39
Figura 3 - Número UFC encontradas após 48 horas de exposição aos cimentos testados com adição de diferentes concentrações de nanopartículas de prata. Concentração bacteriana em $T_0 = 4,7 \times 10^7$	40
Figura 4 - Número de UFC encontradas após 72 horas de exposição aos cimentos testados com adição de diferentes concentrações de nanopartículas de prata. Concentração bacteriana em $T_0 = 4,7 \times 10^7$	40
Figura 5 - Número de UFC encontradas após 96 horas de exposição aos cimentos testados com adição de diferentes concentrações de nanopartículas de prata. Concentração bacteriana em $T_0 = 4,7 \times 10^7$	41
Figura 6 - Curva de crescimento bacteriano após exposição ao cimento Endofill® com adição de diferentes concentrações de nanopartículas de prata.....	42
Figura 7 - Curva de crescimento bacteriano após exposição ao cimento Pulp Canal Sealer® com adição de diferentes concentrações de nanopartículas de prata.....	42
Figura 8 - Curva de crescimento bacteriano após exposição ao cimento AH Plus® com adição de diferentes concentrações de nanopartículas de prata.....	43
Figura 9 - Análise da estrutura interna do cimento obturador EndoFill com adição de diferentes concentrações de nanopartículas de prata. A) 0% de nanoprata; B) 0,1% de nanoprata; C) 0,5% de nanoprata; D) 1,0% de nanoprata	44

Figura 10 - Análise da estrutura interna do cimento obturador Pulp Canal Sealer com adição de diferentes concentrações de nanopartículas de prata. A) 0% de nanoprata; B) 0,1% de nanoprata; C) 0,5% de nanoprata; D) 1,0% de nanoprata.....45

Figura 11 - Análise da estrutura interna do cimento obturador AH Plus com adição de diferentes concentrações de nanopartículas de prata. A) 0% de nanoprata; B) 0,1% de nanoprata; C) 0,5% de nanoprata; D) 1,0% de nanoprata46

Figura 12 - Nanopartículas de prata aglomeradas, com medida do diâmetro de algumas delas47

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATCC	American Type Culture Collection
<i>B. atrophaeus</i>	<i>Bacillus. atrophaeus</i>
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CBM	Concentração Bactericida Mínima
<i>C. albicans</i>	<i>Cândida albicans</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>E. faecalis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
G	Grupo
h	Horas
ISO	International Organization Standardization
MTA	Agregado Trióxido Mineral
<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PMCC	Paramonoclorofenol canforado
SG	Subgrupo
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>S. mutans</i>	<i>Streptococcus mutans</i>
BHI-A	Brain Heart Infusion-Ágar
TTC	Cloreto de Trifeniltetrazólico
UFC	Unidades formadoras de colônias
SBF	Simulted Body Fluid
EDX	Energy-dispersive X-ray spectroscopy
ppm	Partes por milhão

LISTA DE SÍMBOLOS

°C	Grau Celsius
%	Por cento
X	Vezes
g	Gramas
<	Menor
>	Maior
mm	Milímetro
pH	Potencial hidrogeniônico
&	E
µg	Miligramas
Ag	Prata
nAg	Nanopartículas de prata
cm ³	Centímetros cúbicos
µl	Microlitros
nm	Nanômetro
p	Probabilidade
±	Mais ou menos

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1 Cimento endodôntico	18
2.2 Nanotecnologia	24
3 OBJETIVO	33
4 MATERIAIS E MÉTODOS	34
4.1 Confeção dos corpos de prova	34
4.2 Testes microbiológicos	35
4.2.1 Preparo e esterilização do material	35
4.2.2 Preparo da suspensão teste	36
4.2.3 Titulação através da técnica do plaqueamento em ágar em <i>Pour Plate</i>	36
5 RESULTADOS	39
6 DISCUSSÃO	48
7 CONCLUSÃO	53
REFERÊNCIAS	54
ANEXOS	61

1 INTRODUÇÃO

A antissepsia favorecida pelas ações mecânica e química na fase de instrumentação radicular e complementada pelo uso da medicação intracanal confere um ambiente favorável ao reparo dos tecidos periapicais.

A literatura sugere que essa condição pode ser perpetuada pela obturação do sistema de canais radiculares que, funcionando como obstáculo físico, dificulta o acesso de novas bactérias e seus produtos metabólicos à região periapical (Leonardo *et al.*, 2008).

Mesmo quando o preparo biomecânico é cuidadosamente executado, a anatomia desfavorável do sistema de canais radiculares favorece a sobrevivência de alguns microrganismos, principalmente em acidentes anatômicos e no interior dos túbulos dentinários.

Os microrganismos mais comumente encontrados em casos de insucesso são bactérias anaeróbias facultativas Gram-positivas, como *Enterococcus faecalis* (Peciulienė *et al.*, 2000; Sundqvist *et al.*, 1998).

Desta forma, para evitar que microrganismos consigam reinfetar o sistema de canais radiculares, é preciso que o cimento endodôntico apresente algumas propriedades desejáveis. Dentre estas, destaca-se a necessidade de ser bactericida ou, ao menos, ser desfavorável ao crescimento bacteriano.

Muitos pesquisadores analisaram a atividade microbiana de vários cimentos endodônticos contra o *E. faecalis* (Çobankara *et al.*, 2004; Mchugh *et al.*, 2004; Saleh, 2004), relatando a pouca efetividade dos cimentos endodônticos, com insuficiente ou nenhuma capacidade de eliminação da bactéria estudada.

A nanotecnologia é o mais promissor campo de geração de novas aplicações na área da saúde (Aoyagi & Iwasaki, 2008), com destaque para a prata (Ag) nanoparticulada. Elas são geralmente menores que 100 nm e contém de 20 a 15.000 átomos de prata (Chen, 2008), sendo que sua atividade antibacteriana é inversamente proporcional ao seu tamanho. Segundo Kishen *et al.* (2008), este fato

se explica tanto pela maior área de superfície apresentada pelas nanopartículas quando comparadas à partículas convencionais como pela carga elétrica que as primeiras apresentam, que favorece a ligação com a parede celular das bactérias.

Em função disso, novos modelos de biomateriais estão sendo desenvolvidos com a incorporação de nanopartículas em suas matrizes. Esta tecnologia permitiu a criação de produtos com propriedades terapêuticas e melhor tolerância tecidual. Dentre as nanopartículas com atividade antimicrobiana, a prata, parece ser a mais utilizada.

Lok (2007) afirma que as propriedades oligodinâmicas das nanopartículas de prata se devem ao fato do íon Ag^+ interagir com os componentes citoplasmáticos e os ácidos nucleicos, inibindo a cadeia enzimática e interferindo na permeabilidade da membrana da bactéria. Existem vários produtos que possuem em sua composição nanopartículas de Ag como ingrediente antimicrobiano (Aymonier *et al*, 2002; Podsiadlo *et al*, 2005, Tian *et al*, 2007). Uma prática muito utilizada é a combinação de nanocristais de Ag^+ à medicamentos contra queimadura, suprimindo infecções de origem microbiana (Olson *et al*, 2000).

Na Odontologia, o estudo de nanopartículas ainda é incipiente. Kishen *et al*. (2008) avaliaram a eficácia de nanopartículas catiônicas de quitosana e ZnO nas propriedades antimicrobianas de um cimento endodôntico à base de óxido de zinco e eugenol. Os autores relatam que essa incorporação não afeta o escoamento do cimento, bem como aumenta as suas propriedades antimicrobianas.

Considerando a possibilidade de aumentar a eficácia terapêutica dos cimentos obturadores endodônticos através da incorporação de prata nanoparticulada à sua composição, bem como a escassez de artigos nesta área do conhecimento humano, torna-se premente a necessidade de maiores estudos focando este assunto.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Cimento endodôntico

Heling *et al.* (1996) investigaram a atividade antimicrobiana dentro dos túbulos dentinários de quatro cimentos endodônticos: Pulp Canal Sealer EWT, Sealapex, Ketac-Endo e AH 26. Os autores utilizaram 33 dentes bovinos, os quais foram seccionados em duas partes totalizando 66 espécimes e contaminados com *Enterococcus faecalis*. Os cimentos foram colocados na luz do canal e seis espécimes de cada grupo foram estocados por 24 horas (h), 48h para o cimento AH Plus e por sete dias. Após o período, as amostras de dentina foram removidas usando brocas ISO 023 a 035. O pó de dentina foi incubado e as bactérias quantificadas através do espectrofotômetro. Os autores concluíram que todos os cimentos endodônticos possuem atividade antimicrobiana no período de 24h, exceto Ketac-Endo. O efeito bactericida do Pulp Canal Sealer EWT foi similar em 24h e 7 dias. Já o Sealapex teve um significativo aumento nas primeiras 24h do que em 7 dias. O AH 26 se mostrou eficaz em ambos os períodos avaliados.

Duarte *et al* (1997) estudaram a ação dos cimentos endodônticos Endométhasone, AH 26, Sealer 26, Sealer 26 acrescido com 5% de hexametilenotetramina, Sealer 26 acrescido com 10% de hexametilenotetramina, Sealapex e pasta aquosa de hidróxido de cálcio. Os autores utilizaram o meio de difusão radial em placas de ágar escavadas e cepas puras de micro-organismos e as leituras foram efetuadas após 24 e 48 horas de incubação em aerobiose e microaerofilia. Os resultados mostraram que o Endométhasone apresentou maiores halos de inibição do crescimento bacteriano e que o acréscimo de hexametilenotetramina acarretou em um aumento nos halos de inibição proporcionados pelo Sealer 26. O cimento Sealapex e a pasta de hidróxido de cálcio não inibiram os micro-organismos testados.

A atividade antimicrobiana de cimentos e pastas utilizadas em endodontia foram avaliadas por Leonardo *et al.* em 2000. Os autores utilizaram quatro diferentes cimentos endodônticos: AH Plus, Sealapex, Ketac-Endo e Fill Canal, duas pastas à base de hidróxido de cálcio (Calen e Calen PMCC) e uma pasta à base de óxido de

zinco e eugenol. Ainda, usaram sete cepas de bactérias: *Micrococcus luteus* ATCC 9341, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Enterococcus faecalis* ATCC 10541 e *Streptococcus mutans*, este isolado as saliva de um paciente adulto. Os autores utilizaram o método de difusão em ágar com ágar infusão cérebro coração e meio caldo Müller-Hinton. Os cimentos e pastas de hidróxido de cálcio foram colocados diretamente em poços de 4x4 mm usando pontas de papel absorventes. Após a incubação dos meios por 24 h e a 37° C, os meios foram otimizados com 0,05g% gel de cloreto de trifeniltetrazóico (TCC) e os halos de inibição foram mensurados. Todas as cepas bacterianas foram inibidas por todos os materiais estudados. Porém, quando aplicados com pontas de papel absorventes, *Enterococcus faecalis* não foram inibidos pelo óxido de zinco e *Pseudomonas aeruginosas* não foi inibida por AH Plus, Fill Canal e pasta de óxido de zinco e eugenol. Os autores concluíram que as pastas e cimentos endodônticos apresentaram atividade antimicrobiana *in vitro* e meio de cultura otimizados com 0,05g% de gel de TTC facilitou a observação de halos de inibição.

Em 2000, Siqueira *et al.*, avaliaram a atividade antimicrobiana e o escoamento dos cimentos endodônticos: Kerr Pulp Canal Sealer EWT, Grossman's Sealer, ThermaSeal, Sealer 26, AH Plus e Sealer Plus. Incluíram no ensaio dez tipos de micro-organismos, dois anaeróbios obrigatórios [*Prevotella nigrescens* (ATCC 33563) e *Porphyromonas gingivalis* (ATCC 33277)], oito aeróbios facultativos: *Streptococcus mitis* (isolado clinicamente), *Streptococcus bovis* (isolado clinicamente), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212 e isolado clinicamente), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 15442), *Lactobacillus casei* (ATCC 4646) e *Escherichia coli* (ATCC 11229), uma amostra de levedura de *Candida albicans* (ATCC 10231)] e *S. mutans* recolhida da saliva do próprio autor. O teste microbiológico foi através da difusão em ágar e o de escoamento sobre duas placas de vidros com um peso de 500 mg em cima de umas delas. Ao final do experimento os autores concluíram que todos os cimentos estudados apresentaram atividade antimicrobiana contra a maioria dos micro-organismos utilizados. Independentemente do material, os efeitos inibitórios foram discretos contra a maioria das cepas microbianas testadas. A análise geral dos dados não mostrou diferenças significativas entre os materiais testados ($p > 0,05$). As avaliações da

soma de pontos atribuídos a cada valor de zonas de inibição demonstraram que, em geral, os mais resistentes micro-organismos testados foram *P. aeruginosa*, *E. faecalis* (ATCC cepa) e *E. coli*. Quanto ao escoamento dos cimentos, os autores concluíram que todos os cimentos endodônticos fluíram sob as condições deste estudo. A análise estatística dos resultados revelou que o AH Plus e Kerr Pulp Canal Sealer EWT apresentaram valores de fluxo significativamente superior aos outros cimentos testados ($p < 0,05$). Não houve diferença significativa quando comparados estes dois cimentos ($p > 0,05$). O teste de Tukey não mostrou qualquer outra diferença significativa entre os materiais ($p > 0,05$).

Lai *et al.* (2001) investigaram as propriedades antimicrobianas de quatro cimentos endodônticos usualmente utilizados na rotina do endodontista (AH Plus, AH 26, N2 e Sealapex) contra cepas de *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Phorfyromonas gengivalis*, *Phorfyromonas endodotalis*, *Fusobacterium nucleatum* e *Prevotella intermerdia*. Os cimentos recentemente manipulados foram inseridos em cavidades feitas nas placas de ágar previamente inoculadas com os micro-organismos. Após o período de incubação, as zonas de inibição de crescimento foram medidas e mensuradas. Os autores concluíram que todos os cimentos foram nitidamente diferentes entre si e sua atividade antimicrobiana. Os cimentos apresentaram diferente efeito inibitório, dependendo do tipo de bactéria e cepas. N2 contendo formaldeído e eugenol, mostrou-se mais eficaz contra os micro-organismos.

Evans *et al.* (2002) procuraram esclarecer os mecanismos que permitem o *E. faecalis* a sobreviver ao alto pH do hidróxido de cálcio. Cepas da bactéria foram submetidas a concentrações subletais de hidróxido de cálcio, com e sem vários pré-tratamentos. Alguns bloqueadores foram adicionados para determinar o papel do estresse da síntese protéica bem como inibidores de bomba de próton relacionados à parede celular. O *E. faecalis* foi resistente ao pH 11, 1 mas não para 11,5. Pré-tratamento com hidróxido de cálcio com pH 10,3 induziu a tolerância à exposição com pH 11,5. Nenhuma diferença foi notada quando a síntese de proteína foi bloqueada, porém quando se adicionou inibidores de bomba de prótons o resultado foi uma drástica redução de células viáveis ao hidróxido de cálcio. Os autores concluíram que sobrevivência de *E. faecalis* em hidróxido de cálcio parece estar

relacionada ao estresse induzido a síntese de proteínas, mas a bomba de prótons é fundamental para a sobrevivência de *E. faecalis* em pH elevado.

McMichen *et al.*(2003) conduziram um trabalho comparando as propriedades físicas, solubilidade, espessura, escoamento, tempo de trabalho e tempo de presa de cinco cimentos endodônticos, Roth 811, TubliSeal, Pulp Canal Sealer EWT, AH Plus, Apexit e Endion. Para o teste de solubilidade foi mensurado a mudança de peso dos espécimes após eles passarem por 3 meses dentro d'água. A espessura do filme foi avaliada na medida provocada quando se colocava placas de vidro entre o cimento testado. O escoamento foi medido através da taxa de extrusão do material por uma cavidade previamente padronizada. Já o tempo de trabalho foi determinado quando a taxa de escoamento do cimento era 10% menor. Por fim, o tempo de presa dos cimentos testados foi analisado através de uma agulha de Gilmore. Os autores concluíram em seu trabalho que o cimento AH Plus apresentou uma grande estabilidade dimensional dentro das soluções e o maior valor para a espessura do filme, e que todos os cimentos testados mostraram-se similares quanto à taxa de escoamento e com um tempo de trabalho superior a 50 minutos.

Em outro trabalho, Schäfer & Zandobigliari (2003) compararam a perda de peso de oito cimentos endodônticos dentro da água e saliva artificial com diferentes valores de pH. Os autores confeccionaram moldes de anéis, os quais foram preenchidos com AH Plus, AH 26, RSA Roeko Seal, Apexit, Sealapex, Aptal–Harz, Ketac–Endo e Diaket. Os espécimes foram mergulhados em água destilada ou saliva artificial com diferentes pH (7,0; 5,7 e 4,5) com diferentes tempos (1, 2, 5, 10, 20 minutos; 1, 2, 10, 24, 48, 72 horas e por fim 14 e 28 dias). Os autores concluíram que o AH Plus mostrou-se com uma menor perda de peso independente dos meios solúveis estudado e o Sealapex, Aptal–Harz e Ketac–Endo apresentaram uma maior perda de peso em todos os líquidos testados.

Mickel *et al.* (2003) avaliaram a atividade antimicrobiana dos cimentos endodônticos Sealapex, Roth 811, Pulp Canal Sealer EWT e AH Plus, contra cepas de *Enterococcus faecalis*. Segundo os autores, são micro-organismos que desempenham papel importante no insucesso da terapia endodôntica e por possuir alto poder de resistência uma vez estabilizada dentro do sistema de canal radicular. Os pesquisadores utilizaram 17 placas de ágar sangue inoculado com *E. faecalis*

usando a técnica de Lawn. Quatro discos de papel absorvente impregnados com os cimentos e um disco controle com ampicilina foram colocados respectivamente em cada placa. Análises usando *one-way* ANOVA e teste de Tukey mostraram que houve diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$), entre os quatro grupos testados. Os autores concluíram que o Roth 811 apresentou uma maior zona de inibição, seguido do Sealapex e Pulp Canal Sealer EWT. No entanto o cimento AH Plus não apresentou atividade antimicrobiana e não houve diferença significativa entre os períodos de 24 h e 48 h.

Kayaoglu *et al.* (2005), analisaram a atividade antimicrobiana de cimentos endodônticos em um período curto de tempo. Os autores imergiram filtros de papel em suspensões com *Enterococcus faecalis* e colocaram um grupo em contato direto com cimentos recentemente manipulados (MCS, AH Plus, cimento de Grossman, Sealapex, Apexit) e outro grupo com uma membrana de restrição, este, simulando *smear layer*, entre o papel filtro contaminado e o cimento endodôntico. Após a exposição, os filtros de papéis foram transferidos para um frasco contendo solução salina tamponada com fosfato e vigorosamente agitados. Com a resuspensão de bactérias na solução, esta foi diluída em séries e gotículas de 25µl foram semeadas nas placas contendo ágar triptico de soja. Posteriormente o tempo de incubação, foram contadas as colônias formadas nas placas e através do teste t de Student, os autores concluíram que no teste de contato direto o cimento MSC e AH plus mataram as bactérias em um nível menor do que detectado pelos outros cimentos em ordem decrescente: cimento de Grossman, Sealapex e Apexit. No teste com a membrana de restrição, o resultado em ordem decrescente de potência antibacteriana foram MCS, AH Plus, o cimento de Grossman, Apexit e Sealapex.

Kopper *et al.* (2007) pesquisaram o efeito antimicrobiano dos cimentos endodônticos AH Plus, Endofill e Sealer 26 imediatamente após a manipulação em contato com as culturas isoladas de *E. faecalis*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* e *C. albicans*. Para tanto foram confeccionados 9 corpos de prova de cada um dos materiais a partir de discos de papel filtro com 5 mm de diâmetro. Oito desses, sendo dois para cada micro-organismo, foram colocados sobre placas de Petri, contendo meio de cultura Brain Heart Infusion-Agar (BHI-A) inoculado. O último foi colocado em meio de cultura estéril (controle de esterilidade). Uma placa com BHI-A não inoculada serviu de controle negativo. As placas foram levadas a estufa

bacteriológica e, 48 h após, realizou-se a medida dos halos de inibição de crescimento microbiano com auxílio de um paquímetro digital. Os autores concluíram que todos os cimentos testados apresentaram atividade antimicrobiana em contato com as culturas estudadas, sendo que para *E. faecalis*, *P. aeruginosa* e *C. albicans* a ordem crescente foi AH Plus, Sealer 26 e Endofill e para *S. aureus* a ordem crescente foi AH Plus, Endofill e Sealer 26.

Carvalho Junior *et al.* (2007) propuseram em seus estudos a diminuição da dimensão das amostras de cimentos endodônticos avaliadas em testes de mudança dimensional e de solubilidade. Para tanto, os pesquisadores determinaram antecipadamente o volume, massa e densidade dos cimentos Endofill e AH Plus. Para o teste de solubilidade, duas amostras foram pesadas e estocadas em água deionizada e destilada por 24 horas, secadas e pesadas novamente. A solubilidade foi mensurada através da perda de peso da amostra em porcentagem. Para a análise de mudança dimensional os espécimes foram pesados antes e depois de estocados em água deionizada e destilada por 30 dias. Ao final do experimento, o cimento Endofill apresentou um encolhimento de 0,56% e o cimento AH Plus uma expansão de 0,62%. Os autores concluíram que dimensões menores para os testes de solubilidade e mudança dimensional são importantes e uma alternativa viável, diminuindo o uso de material obturador para executar os testes.

Goldberg *et al.* (2008) estudaram o efeito antimicrobiano de quatro cimentos endodônticos (AH plus, Apexit Plus, Epiphany SE e RoekoSeal) em contato direto ao *E. faecalis*. Os cimentos foram avaliados imediatamente a sua manipulação e após 1, 2, 7 e 14 dias. Os resultados mostraram que Apexit Plus possui um curto período de ação (1 dia), já o Epiphany SE inibiu o crescimento bacteriano por pelo menos 7 dias. Os autores concluíram que o cimento AH Plus e RoekoSeal não possuem atividade antimicrobiana contra o *E. faecalis*.

Segundo Kreth *et al.* (2008) doenças pulpares e perirradiculares são causadas principalmente pela invasão bacteriana no sistema de canal radicular, como resultado da progressão da cárie. A presença de bactérias residuais no momento da conclusão do canal radicular (obturação) está associada com maior índice de falha no tratamento. Re-infecção de canais radiculares obturados pode ser potencialmente evitada através do reforço na atividade antibacteriana dos materiais

de obturação do canal radicular. Foi avaliada em um modelo *in vitro*, a eficácia antimicrobiana de íons de prata adicionados a um cimento endodôntico comum. Para isso, os pesquisadores realizaram estudos de inibição de crescimento e testes de viabilidade bacteriana. Foram medidos a zona de inibição, densidade óptica e realizado o escaneamento com microscópico confocal. Os resultados mostram que os íons de prata realçam a atividade antimicrobiana do cimento endodôntico contra *Streptococcus mutans*. Os autores concluíram que pode ser promissor o estudo de outras terapias de base biológica e, portanto, aumentando a taxa de sucesso da rotina de tratamento do canal radicular.

Em outro estudo, Mohammadi & Dummer (2011) revisaram a propriedade de pastas à base de hidróxido de cálcio na Endodontia e nos traumatismos dentários. Os autores afirmaram que o medicamento possui uma grande atividade bactericida contra os patógenos endodônticos comuns, mas pouco efeito contra o *Enterococcus faecalis* e *Candida albicans*

Oliveira *et al.* (2011) compararam a infiltração bacteriana nos dentes obturados com cimentos endodônticos convencionais e à base de agregado trióxido mineral (MTA). Os estudiosos utilizaram 130 dentes uniradiculares humanos e dividiram em oito grupos experimentais: AH Plus , Sealer 26, Epiphany SE , Sealapex, Active GP , Endofill Endo CPM Sealer e MTA Sealer e dois grupos controles que não foram preenchidos com cimento endodôntico ou totalmente impermeabilizados. Os canais foram preparados e obturados com guta percha e com os cimentos testados. Em seguida os espécimes foram esterelizados com óxido de etileno e a infiltração bacteriana com *E. faecalis* foram avaliadas a cada 24 horas durante 16 semanas. Os resultados foram submetidos à análise estatística de Kruskal–Wallis com pós-teste de Dunn. Os autores concluíram que todos os cimentos avaliados possuíam infiltração bacteriana, com um maior índice nos cimento endodônticos à base de MTA.

Morgental *et al.* (2011) estudaram a eficiência antibacteriana de soluções irrigadoras e suas combinações contra o *Enterococcus faecalis*. Os autores utilizaram 110 dentes uniradiculares humanos, os quais foram inoculados com a bactéria e armazenados por 21 dias em um ambiente de microaerofilia a 37°C. Após o período, os espécimes foram separados em sete grupos de acordo com a solução

irrigadora a ser testada: Grupo (G) I. Hipoclorito de sódio a 2,5%; Grupo II. Hipoclorito de sódio a 2,5% + Ácido acético a 10%; GIII. Hipoclorito de sódio a 2,5% + Vinagre de maçã; Grupo IV. Vinagre de maçã; Grupo V. Clorexidina a 2%; GrupoVI. Ácido paracético e Grupo VII. Solução salina. Todas as soluções irrigadoras promoveram uma redução dos micro-organismos após a instrumentação, com melhores resultados para o GI, GV e GVI. Os autores concluíram que as soluções irrigadoras podem apresentar atividade antimicrobiana, mas não erradicar o *E. faecalis*.

2.2 Nanotecnologia

Segundo Salata em 2004, os nanomateriais estão na vanguarda no campo de rápido desenvolvimento da nanotecnologia. Sua propriedade única, dependente do tamanho, os torna superiores e indispensáveis em muitas áreas da atividade humana.

De acordo com os estudos de Sondi *et al.* (2004), as nanopartículas de prata possuem uma excelente atividade antimicrobiana contra *Escherichia coli*. Para avaliar o efeito bactericida das nanopartículas de prata, os autores cultivaram aproximadamente 10^5 unidades formadoras de colônias (UFC) de cepas de *Escherichia coli* em placas com ágar Luria Bertani acrescidos de nanopartículas de prata com concentração de 10 a $100 \mu\text{g cm}^{-3}$. Placas livres de nanopartículas de prata foram confeccionadas para o grupo controle. Após serem incubadas por 24 horas a 37°C , as unidades formadoras de colônias foram contadas. Ao final do experimento, os autores perceberam que as células das bactérias *E. coli* foram danificadas, apresentando um significativo aumento na permeabilidade da parede celular, causando assim, sua morte.

O recente surgimento da nanotecnologia tem proporcionado uma nova modalidade terapêutica em nanopartículas de prata para uso em queimaduras. No entanto, os efeitos benéficos de nanopartículas de prata na cicatrização de feridas permanecem desconhecidos. Tian *et al.*,(2007) investigaram as propriedades de cicatrização de nanopartículas de prata em um modelo animal e descobriram que a cura rápida e melhor aparência estética ocorrer de forma dose-dependente. Além

disso, por meio de uma análise quantitativa, imuno-histoquímica, e os estudos de proteômica, mostraram que as nanopartículas de prata exercem efeitos positivos através de suas propriedades antimicrobianas, redução da inflamação da ferida, e modulação de citocinas fibrogênicas. Estes resultados deram perspicácia sobre as ações de prata e uma nova direção terapêutica para o tratamento de feridas na prática clínica.

Em 2007, Lok *et al* estudaram as nanopartículas de prata na forma esférica (diâmetro médio de aproximadamente 9 nanômetros) sintetizados pela redução de íons de Ag^+ do borohidreto. Os autores afirmam que nanopartículas de prata oxidados possuem atividade antimicrobiana, mas nanopartículas com valência zero não.

Segundo Kim *et al.* (2007) o efeito antimicrobiano de íons prata ou sais são bem conhecidos, mas os efeitos da nanopartículas de prata sobre microrganismos e o mecanismo sobre eles ainda não foram revelados claramente. Nanopartículas de prata estáveis foram preparadas e sua forma e distribuição de tamanho de partículas caracterizada por um microscópio eletrônico de transmissão. A atividade antimicrobiana das nanopartículas de prata foi investigada contra as leveduras, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. Nestes testes, os autores utilizaram placas de ágar Muller Hinton contendo nanopartículas de prata com várias concentrações. Como resultados, os pesquisadores encontraram que a levedura e *E. coli* foram inibidas com uma concentração baixa de nanopartículas de prata, e que os efeitos inibitórios sobre o crescimento de *S. aureus* foram leves. Os autores sugerem que as nanopartículas de prata podem ser usadas como eficaz inibidor de crescimento em vários micro-organismos, tornando-as aplicáveis a diversos dispositivos médicos e sistemas de controle de antimicrobianos.

De acordo com Percival *et al.* (2007), biofilmes são comunidades complexas de superfície associadas à micro-organismos agregados e incorporados em uma matriz de polissacarídeo extracelular auto-secretado. Bactérias do biofilme formado, agem como barreiras eficientes contra os agentes antimicrobianos e ao sistema imunológico do hospedeiro, resultando em uma colonização persistente e/ou infecção no local da formação de biofilme. Segundo os autores, as nanopratas são capazes de inibir a formação desses biofilmes.

Lansdown em 2007, concluiu que não há evidência disponível para demonstrar que a prata é uma causa de danos neurotóxicos, embora depósitos de prata fossem identificados na região de nervos cutâneos.

De acordo com Chen & Schluesener em 2008, a nanotecnologia é um campo mais promissor para a geração de novas aplicações na medicina, e apontam a nanop prata como o mais proeminente nanoproduto. Os autores afirmam que as nanopratas são partículas geralmente menores que 100 nm e contêm 20 - 15.000 átomos de prata, e que, devido à sua forte atividade antibacteriana, nanopratas são usados em revestimentos de vários tecidos, mas também como revestimentos em certos implantes. Além disso, é usada para tratamento de feridas e queimaduras ou como um contraceptivo e comercializado como desinfetante da água e *spray* de ambiente.

Segundo Weir *et al* (2008) as nanopartículas têm sido cada vez mais investigadas e incorporadas em matrizes, devido às suas propriedades antibacterianas. Os autores afirmam que as nanopartículas são partículas insolúveis que não sejam superiores a 100 nm de tamanho, são estruturas intermédias entre os materiais a granel (geralmente possuem propriedades físicas constantes) e estruturas atômicas. Devido ao seu pequeno tamanho, as nanopartículas apresentam uma grande superfície e, portanto, maior a atividade química com essa propriedade as nanopartículas oferecem outras vantagens para o campo biomédico como a redução de problemas de biocompatibilidade. Os autores relatam ainda que é pouco provável que os micro-organismos possam adquirir resistência para nanopartículas metálicas em comparação com outros biocidas como antibióticos.

Kishen *et al.* (2008) investigaram a atividade antibacteriana e eficácia do antibiofilme catiônico nanoparticulado para desinfecção do canal radicular. Os experimentos foram conduzidos em duas fases. Na fase 1, os pesquisadores realizaram experimentos para analisar as propriedades físicas de três tipos de nanopartículas. As propriedades antibacterianas de nanopartículas puras e nanopartículas misturadas com cimento à base de óxido de zinco e eugenol foram estudadas. Na fase 2, a capacidade da dentina tratadas com nanopartículas para prevenir aderência bacteriana foi analisada. Nanopartículas de óxido de zinco, nanopartículas de quitosana, uma mistura de nanopartículas de óxido de zinco e

quitosana, e nanopartículas de óxido de zinco com revestimento de várias camadas de quitosana foram testados. Este estudo mostrou que a incorporação de nanopartículas não altera o fluxo característico do cimento, mas melhorou a propriedade antibacteriana e a capacidade de lixiviar para fora componentes antibacteriano. Os resultados mostram que houve uma redução significativa na aderência de *Enterococcus faecalis* de dentina tratada com nanopartículas ($p < 0,05$) e os autores finalizam afirmando que os experimentos destacam o potencial das nanopartículas na desinfecção do canal radicular.

Sierra *et al.* (2008) afirmaram que a cárie dentária é um problema de saúde pública mundial e o *Streptococcus mutans* foi identificado como a possível etiologia infecciosa. Segundo os estudiosos, nos últimos anos a nanotecnologia tem permitido a desenvolvimento de novas propriedades dos materiais. Os autores então compararam os efeitos bactericidas e bacteriostáticos de nanopartículas de prata, óxido de zinco e ouro em *S. mutans*. Foi utilizado o método de diluição de líquido para encontrar a concentração inibitória mínima (CIM) e com as subculturas obtidas, as concentrações bactericidas mínimas (CBM). Para a prata os resultados mostraram CIM uma média de $4,86 \pm 2,71 \mu\text{g/mL}$ e CBM de $6,25 \mu\text{g/mL}$; para o zinco, o CIV foi de $500 \pm 306,18 \mu\text{g/mL}$ e CBM de $500 \mu\text{g/mL}$; nanopartículas de ouro demonstraram um efeito apenas em concentração de $197 \mu\text{g/ml}$. Os autores estabeleceram um maior efeito antimicrobiano das nanopartícula de prata contra *S. mutans* em concentrações mais baixas do que o ouro ou zinco, o que permitiu atingir importantes efeitos clínicos com toxicidade reduzida.

As propriedades antimicrobianas das nanopartículas de prata e cobre foram investigadas por Ruparella *et al.* em 2008, utilizando quatro cepas de *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* e três cepas de *Staphylococcus aureus*. O tamanho médio das nanopartículas de prata e cobre foram de 3 nm e 9 nm, respectivamente, determinada por meio de microscopia eletrônica de transmissão. O efeito bactericida das nanopartículas de prata e cobre foi comparado com base no diâmetro da zona de inibição em ensaios de difusão em disco e concentração inibitória mínima e concentração bactericida mínima de nanopartículas dispersas. Sensibilidade bacteriana a nanopartículas foi encontrada, dependendo da espécie microbiana. Estudos de difusão em disco com *E. coli* e *S. aureus* revelaram uma maior eficácia da prata nanoparticulada em comparação com as nanopartículas de

cobre. *B. subtilis* representado a maior sensibilidade para as nanopartículas em relação aos outras cepas e foi a mais afetada pelas nanopartículas de cobre. Os autores deste estudo concluíram que as nanopartículas de prata e de cobre são uma grande promessa como agente antimicrobiano contra *E. coli*, *B. subtilis* e *S. aureus*. MIC, CBM e teste de difusão em disco sugerem que, para todas as culturas de *E. coli* e *S. aureus*, a ação antimicrobiana da prata nanoparticulada foram superiores.

Vários estudos propuseram que a prata nanoparticulada pode se aderir à superfície da membrana celular influenciando a permeabilidade e respiração da célula. As nanopartículas de prata por possuir uma grande área superficial disponível para a interação, daria mais efeito bactericida. Também é possível que nanopartículas de prata não só interajam com a superfície da membrana, mas também possam penetrar na bactéria (SHARMA, *et al.*, 2009).

Por causa de seu pequeno tamanho, as nanopartículas podem potencialmente passar através das membranas biológicas e alcançar mais órgãos e tecidos diferentes e, no corpo, onde a prata pode exercer seus efeitos antibacterianos. Uma vez que a visão predominante é que a prata é relativamente não tóxica. A geração de estresse oxidativo de nano-prata pode ser atribuído à nano-características da partícula, como a grande superfície e associados alta reatividade. A questão é que se pode fazer uma clara distinção entre prata “regular” e nanoprata. A prata regular, é uma suspensão coloidal de partículas prata de vários tamanhos, incluindo partículas micro e nanométricas. Além disso, nanoprata pode não ser considerada nova, já que a prata coloidal tem sido utilizada há mais de 100 anos como aplicação médica. Os estudos cinéticos e de toxicidade feito até agora, demonstram que as composições da nanopartículas de prata variam amplamente. Também as descrições das formulações de prata usadas divergem muito e são limitadas, em especial ao tamanho, solubilidade e agregação das nanopartículas. Esta informação é altamente relevante, já que uma boa dispersão das partículas de nanoprata é necessária para eficaz atividade antibacteriana e podem influenciar sua subsequente toxicidade. Em conclusão, não há uma forma de nanopratas, e uma mais abordagem sistemática é necessária para a determinação dos efeitos dos diferentes tamanhos dessas nanopartículas, segundo Wijnhoven *et al.*, em 2009.

De acordo com Rai *et al.* (2009) a prata tem sido usada desde tempos imemoriais na forma de prata metálica, de nitrato de prata, a sulfadiazina de prata para o tratamento de queimaduras, feridas e várias infecções bacterianas. Mas, devido ao surgimento de vários antibióticos o uso desses compostos de prata foi recusado notavelmente. A nanotecnologia está ganhando enorme impulso no século atual devido à sua capacidade de modular os metais em seu tamanho nanométrico, o que muda drasticamente as propriedades químicas, físicas e ópticas dos metais. Prata metálica sob a forma de nanopartículas de prata fez um retorno extraordinário como um potente agente antimicrobiano. O uso da prata nanopartículas também é importante, pois várias bactérias patogênicas têm desenvolvido resistência a vários antibióticos. Assim, as nanopartículas de prata têm surgido com diversas aplicações médicas que vão desde curativos à base de prata e dispositivos medicinais revestidos por prata.

Carreira *et al.* (2009) avaliaram a atividade antimicrobiana da solução de nanopartículas de prata na descontaminação de limas endodônticas sobre esporos, levedura e bactérias. Os autores contaminaram por 24h os instrumentos endodônticos acima citados com suspensões de *S. aureus*, *S. mutans*, *E. faecalis*, *E. coli* e *C. albicans* (10^6 células/ mL) e *B. atrophaeus*, na forma esporulada, estes ficaram em contato com a solução de nanopartículas de prata por um período de 5, 10, 15 e 30 minutos. Meios seletivos para cada microrganismo foram utilizados pelos autores para a obtenção do número de UFC/mL. A pesquisa mostra que dentre os micro-organismos testados, o esporo demonstrou ser o mais resistente. As nanopartículas de prata promoveram redução superior a 90% de UFC/mL sobre as leveduras e demais bactérias testadas. Para todos os grupos houve diferença estatisticamente significativa entre o grupo controle com os demais tempos experimentais (teste de Turkey, $p < 0.05$). A solução de nanopartículas de prata foi efetiva na descontaminação de instrumentos e sua eficácia está diretamente relacionada com o tempo de contato.

Zhang *et al.* (2008) estudaram a atividade bactericida de sete diferentes cimentos endodônticos através de um teste de contato direto modificado. Os materiais obturadores testados foram AH Plus, Apexit Plus, iRoot SP, Tubli Seal, Sealapex, Epiphany SE. *Enterococcus faecalis* em suspensão foram colocadas em contato direto com os materiais testados de 2 a 60 minutos logo após a manipulação

e após 1, 3 e 7 dias. Também foram medidos os valores de pH e o ângulo de contato formado na superfície dos cimentos testados com água esterilizada em diferentes tempos após a presa. O cimento iRoot SP, recentemente manipulado matou todas as bactérias em dois minutos, AH Plus em 5 minutos, EndoRez em 20 minutos, e Sealapex e Epiphany em 60 minutos. No entanto Apexit Plus e Tubli Seal não conseguiram matar todas as bactérias em 60 minutos. Para as amostras de um dia e três dias, iRoot SP e EndoRez tiveram atividade antibacteriana mais forte, seguido pelo Sealapex e Epiphany; Tubli Seal e AH Plus não mostraram quaisquer atividade antibacteriano significativa. De todos os materiais testados, Apexit Plus teve a menor atividade antimicrobiana. O pH dos cimentos não poderia explicar por si só seu efeito antibacteriano. Os autores concluem que o imediatamente após manipulado o iRoot SP, AH Plus e EndoRez eliminaram com eficiência *E. faecalis*. IRoot SP e EndoRez continuaram a ser eficazes para 3 e 7 dias após a mistura. Sealapex e EndoRez foram os únicos com atividade antimicrobiana, mesmo em 7 dias após a mistura.

Turk *et al.* (2009) afirmam que por causa da complexa anatomia dental e a habilidade de alguns micro-organismos como sobreviverem em ambientes adversos, o sistema de canais radiculares mesmo depois do preparo biomecânico, pode sofrer uma reinfecção principalmente por *Enterococcus. faecalis* e *Candida. albicans*. Os autores pesquisaram *in vitro* a ação antimicrobiana do hidróxido de cálcio misturado a vários veículos contra o *E. faecalis* e *C. albicans*. Foram utilizados três tipos de veículos diferentes: glicerina (100, 50 e 20%), cetrimide a 2%, digluconato de clorexidina a 2% e água destilada. Após a manipulação do os autores inseriram o medicamento nas placas de ágar previamente preparada. Passado o período de 24 horas, a leitura dos halos de inibição foi realizada. Os autores concluíram que a atividade antimicrobiana pode mudar com o tipo de veículo e contra diferentes micro-organismos. O *E. faecalis* foi mais resistentes que *C. albicans* em todas as misturas do hidróxido de cálcio.

Gomes–Filho *et al.*(2010) avaliaram a reação tecidual da dispersão de nanopartículas de prata como solução irrigante alternativa. Neste estudo os autores avaliaram a resposta tecidual ao implante de tubos de polietileno preenchidos com esponja de fibrina incorporada com dispersão de nanopartículas de prata. Para tanto trinta ratos receberam individualmente quatro tubos de polietileno preenchidos com

esponja embutida com 47 ppm, 23 ppm de dispersão de nanopartículas de prata para avaliar a resposta tecidual ao implante de polietileno, hipoclorito de sódio a 2,5%, ou com não incorporação como controle. Os períodos de observação foram de 7, 15, 30, 60 e 90 dias. Após cada período de tempo, seis animais foram sacrificados e os tubos e tecidos adjacentes foram removidos, fixados e preparados para serem analisados em microscópio de luz com incorporação de metacrilato. Os materiais provocaram reações moderadas em 7 dias. A resposta foi semelhante ao controle no dia 15, com 23 ppm dispersão de nanopartículas de prata e de sódio a 2,5% hipoclorito e no dia 30, com 47 ppm de prata nanopartículas de dispersão. Os autores concluíram que a dispersão de nanopartículas de prata foi biocompatível especialmente com concentração mais baixa.

Nowack *et al.* (2011) afirmam que a nanopartícula de prata é um nanomaterial que está atualmente em um lote de controle. Segundos os autores, grande parte da discussão é baseada no pressuposto de que nanoprata é algo novo que não foi visto até recentemente e que os avanços na nanotecnologia abriu completamente novas áreas de aplicação para a prata. No entanto, as nanopartículas na forma de prata coloidal têm sido utilizadas por mais de 100 anos e foi registrado como um material biocida nos Estados Unidos desde 1954. Os autores perceberam que muitas pesquisas em saúde humana para a prata aconteceram a partir de 1930 e são embasadas em uma análise da ocorrência argiria. Em relação às normas ambientais, os autores afirmaram que os estudos são baseados em prata iônica e talvez precise ser reavaliado fundamentado em descobertas recentes de que a maioria de prata no meio ambiente, independentemente da forma de prata original, está presente na forma de pequenos aglomerados ou nanopartículas.

3 OBJETIVO

Avaliar *in vitro* a capacidade antimicrobiana de alguns cimentos endodônticos acrescidos de nanopartículas de prata.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar *in vitro* a atividade antimicrobiana de dois cimentos endodônticos à base de óxido de zinco e eugenol e um de matriz resinoso, com diferentes concentrações de nanopartículas de prata.

Comparar o efeito bactericida das diferentes concentrações de nanopartículas de prata nos cimentos endodônticos em diferentes tempos.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Para o presente estudo foram utilizados três cimentos endodônticos separados aleatoriamente em grupos (G):

GA. Endofill (Dentsply Indústria e Comércio Ltda, Petrópolis, Brasil);

GB. Pulp Canal Sealer (SybronEndo Corporation, West Collins Orange, EUA);

GC. AH Plus (Dentsply Indústria e Comércio Ltda, Petrópolis, Brasil).

Os materiais obturadores de cada grupo foram divididos em quatro subgrupos (SG) de acordo com a concentração de nanopartículas de prata menores que 100 nm de diâmetro (Sigma Aldrich, Saint Louis, EUA) que receberam:

1. 0%;

2. 0,1%;

3. 0,5% e

4. 1% em peso

4.1 Confeção dos corpos de prova:

Os pós dos cimentos endodônticos (Endofill e Pulp Canal Sealer) e as pastas do cimento AH Plus foram pesados em uma balança de precisão (Ohaus Corporation Pine Brook, New Jersey, EUA), em seguida conhecendo-se a proporção de pó/líquido para Endofill (1/3) e para Pulp Canal Sealer (1/1) através de uma regra de três simples, obteve-se o número de gotas a serem dispensadas e a manipulação dos cimentos foram feitas conforme a instrução do fabricante sobre uma placa de vidro e espátula de aço flexível nº 24 (Hu-Friedy, Carolina do Norte, EUA). As nanopartículas de prata previamente pesadas foram incorporadas no momento da manipulação dos cimentos endodônticos e espatuladas de forma enérgica afim de

homogeneizar o máximo a mistura, encontrando no final, uma massa de cor homogênea e sem grânulos visíveis ao olho nu.

Em seguida, o material foi inserido em tubos de polietileno medindo 2 mm de diâmetro por 7 mm de altura com auxílio de pontas tipo agulha acoplada na seringa Centrix (DFL Indústria e Comércio S.A., Rio de Janeiro, Brasil) para evitar a formação de bolhas no interior do corpo de prova. Os tubos tiveram uma das suas extremidades vedadas com uma fita adesiva para impedir o escoamento do material. Cada subgrupo continha 10 pastilhas cilíndricas, totalizando 120.

Os corpos de prova foram levados à estufa (Quimis Aparelhos Científicos, São Paulo, Brasil) a 37°C e 100% de umidade por sete dias, para que sua presa estivesse completamente formada e conseqüentemente seus subprodutos liberados na reação de polimerização como, por exemplo, o formaldeído (reação de resina bisfenol e hexametilenotetramina) componente responsável pela atividade antimicrobiana do cimento AH Plus nas primeiras 48 horas segundo Moraes *et al* (1984).

Passado o período, os tubos de polietileno foram cortados com um bisturi e os espécimes tiveram seu tamanho ajustado para 2x5 mm com a ajuda de um disco diamantado dupla face acoplado a uma peça de mão em baixa rotação e um paquímetro digital (Black Bull, USA). A metodologia empregada para a realização deste estudo foi separada em subitens, para facilitar a compreensão.

4.2 Testes microbiológicos

Nesta etapa, as pastilhas confeccionadas foram avaliadas no laboratório de microbiologia da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS). Do total de 120 corpos de prova confeccionados foram utilizados 24 para os testes de atividade antibacteriana frente a uma cepa de *Enterococcus faecalis* ATCC 10542 de nossa bacterioteca.

4.2.1 Preparo e esterilização do material

Os corpos de prova foram pesados e 2 unidades por grupo teste com peso médio de 0,2 g, foram acondicionadas em tubos de Ependorf de 3 ml devidamente identificados, para esterilização em autoclave a 120°C por 10 minutos. As etapas seguintes foram realizadas em condições de assepsia em uma capela de fluxo laminar a fim de minimizar os riscos de contaminação.

O veículo líquido para os testes foi a Solução Simulada de Fluido corpóreo, (*Simulated Body Fluid*) ou SBF preparado segundo Kokubo *et al.*, 1990 (Anexo A).

4.2.2 Preparo da suspensão teste

Uma cultura líquida em caldo Muller Hinton (BD, New Jersey, EUA) de *Enterococcus faecalis* ATCC 10542 em fase ativa de crescimento foi inicialmente ajustada a uma concentração inicial de 10^7 /ml de Unidades Formadoras de Colônias/ml (UFC), em SBF. O ajuste foi executado com o auxílio de um espectrofotômetro (Metrolab, modelo 330, Buenos Aires, Argentina) a 660 nm de comprimento de onda, o que correspondeu a uma absorvância de 0,08 a 0,1 unidades de absorvância (UA.). Esta suspensão de bactérias foi adicionada na proporção de 1:10 (peso/volume) aos tubos de Ependorf com os corpos de prova previamente esterilizados. Desta forma, no tempo zero todos os tubos tinham a mesma concentração de bactérias em proporção aos respectivos pesos dos materiais testados.

4.2.3 Titulação através da técnica do plaqueamento em ágar em *Pour Plate*

Seguiu-se a titulação das suspensões de bactérias, a fim de se verificar o tempo de morte das culturas. A intervalos de 24 h, e por um período de 4 dias, alíquotas de 100 µl de cada subgrupo foram retiradas e serialmente diluídas, por

diluições em bases decimais, em solução salina até a sexta potência. A seguir foram imediatamente plaqueadas em placas de Petri de 20 ml, no volume de 100 µl, em ágar Nutriente (Isofar Industrias e Comércio de Produtos Químicos LTDA, Rio de Janeiro, Brasil) acrescido de 0,001% de azul de bromotimol como indicador de pH. Após a solidificação do meio, as placas foram incubadas a temperatura de 35° C por duas noites, quando foram retiradas para a contagem das UFC sob o aumento de 25X, com o auxílio de uma lupa esterioscópica. O título final representa a razão entre o número de UFC pela recíproca da maior diluição onde se pode contar entre 30 e 300 UFC e foi expresso em UFC/ml. Todas as alíquotas foram tituladas em triplicata e os valores obtidos tabulados para posterior análise estatística.

Os resultados foram então submetidos à análise estatística (Two way ANOVA complementada pelo teste de Bonferroni), com o auxílio do *software GraphPad Prism* versão 5.0 .

Um fluxograma, criado para melhor entendimento da metodologia utilizada para o teste, encontra-se na Figura 1.

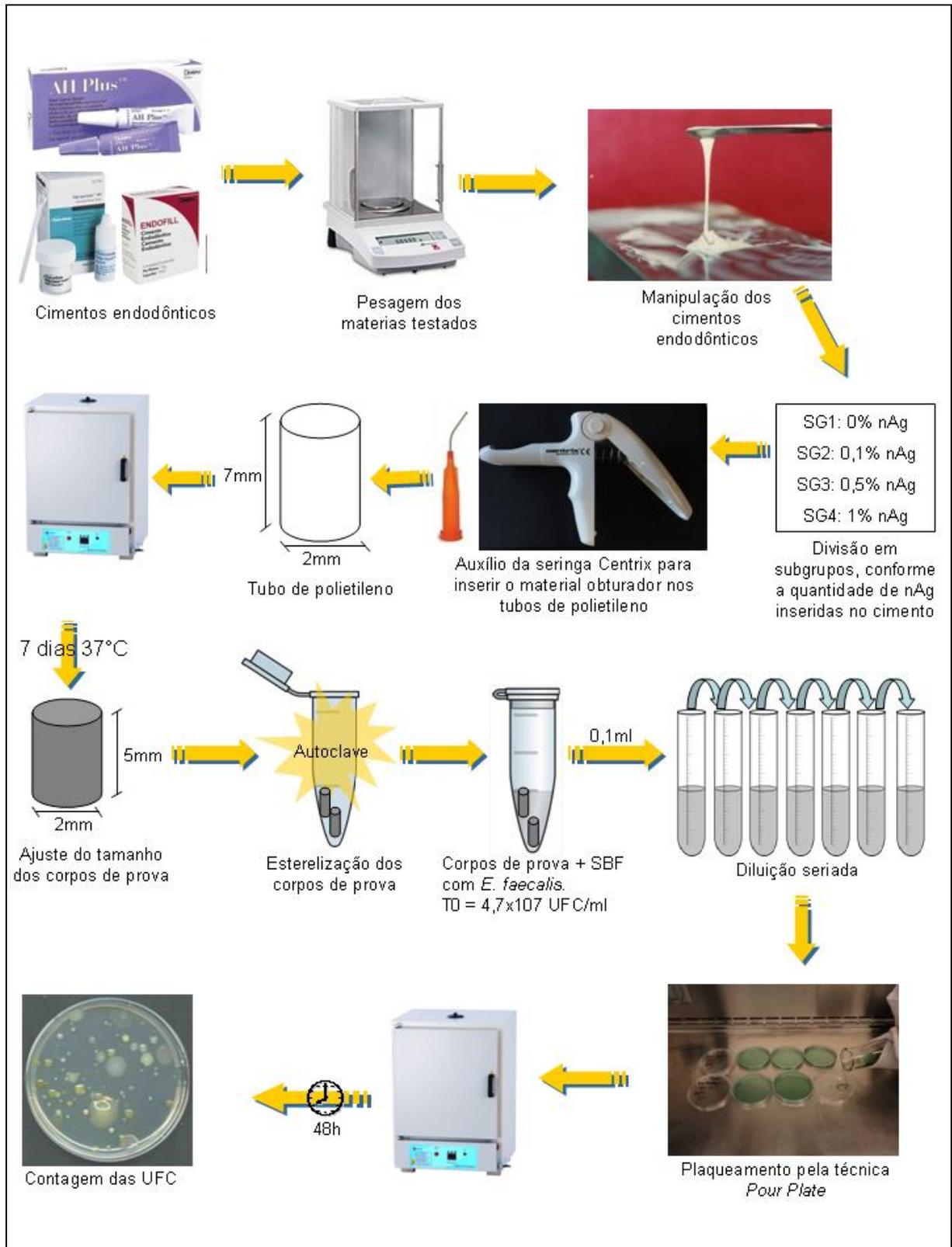


Figura 1. Fluxograma da metodologia empregada no experimento.

5 RESULTADOS

Os resultados completos obtidos no presente experimento encontram-se no Anexo I. As Figuras 2 a 5 apresentam as concentrações bacterianas após diferentes tempos, de acordo com a quantidade de nanopartículas de prata incorporada aos cimentos testados.

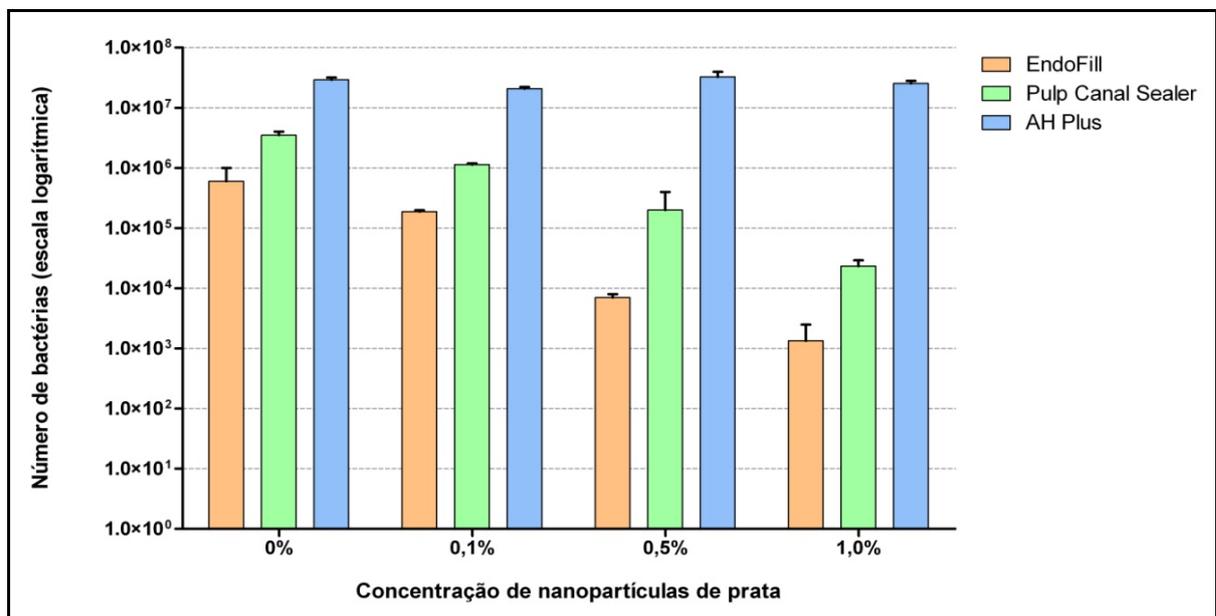


Figura 2. Número de bactérias viáveis encontradas após 24 horas de exposição aos cimentos testados com adição de diferentes concentrações de nanopartículas de prata. Concentração bacteriana em $T_0 = 4,7 \times 10^7$.

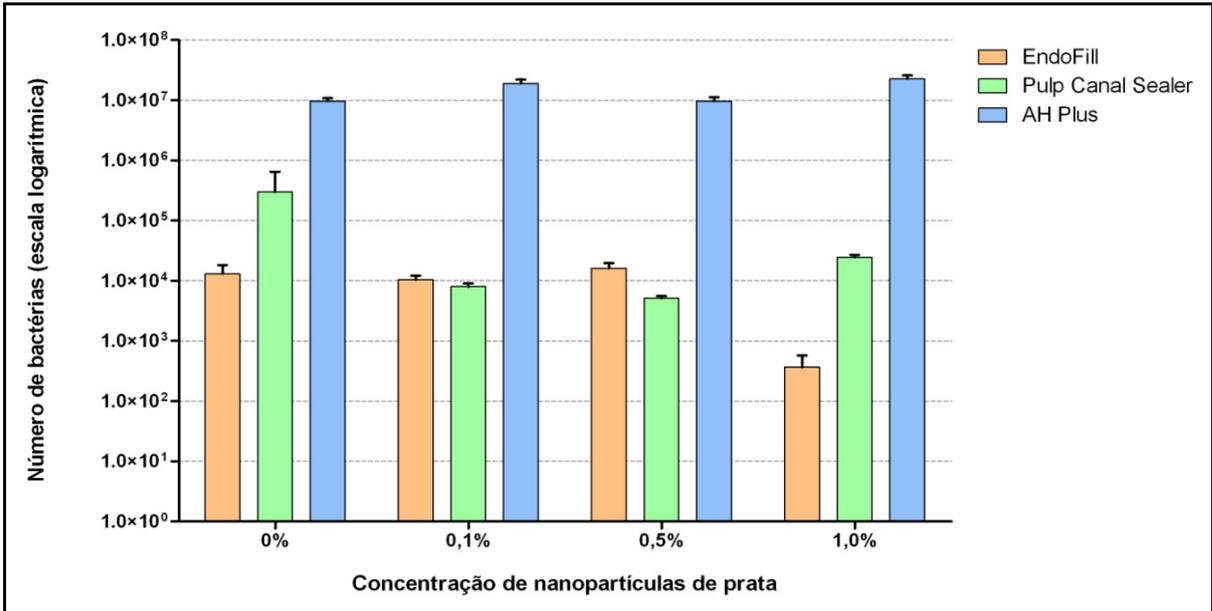


Figura 3. Número de bactérias viáveis encontradas após 48 horas de exposição aos cimentos testados com adição de diferentes concentrações de nanopartículas de prata. Concentração bacteriana em $T_0 = 4,7 \times 10^7$.

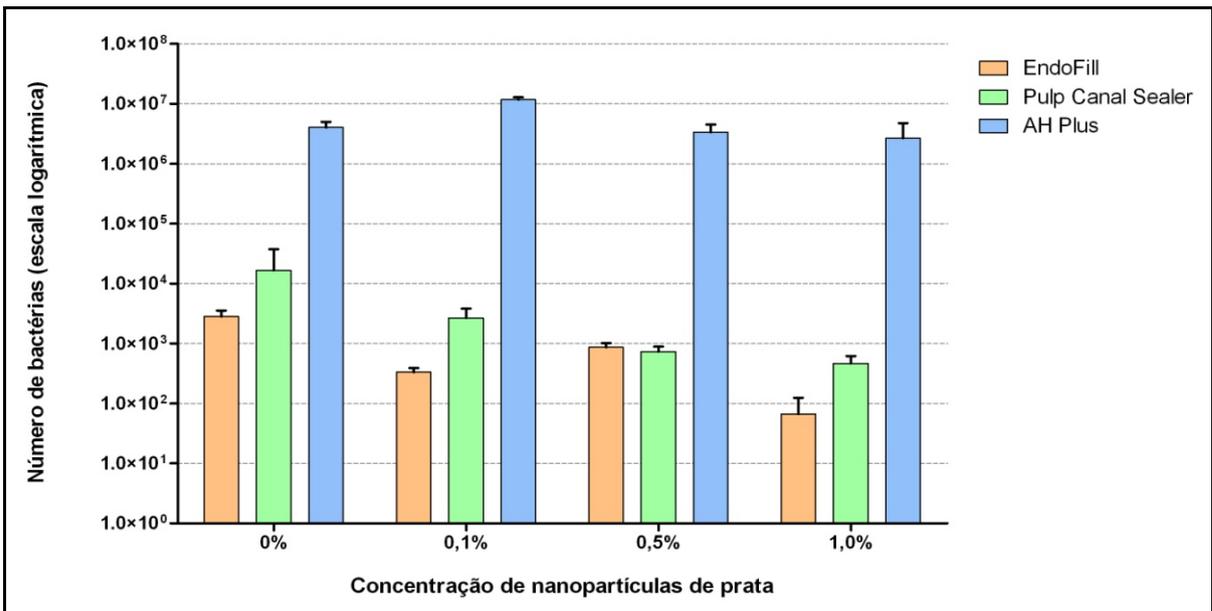


Figura 4. Número de bactérias viáveis encontradas após 72 horas de exposição aos cimentos testados com adição de diferentes concentrações de nanopartículas de prata. Concentração bacteriana em $T_0 = 4,7 \times 10^7$.

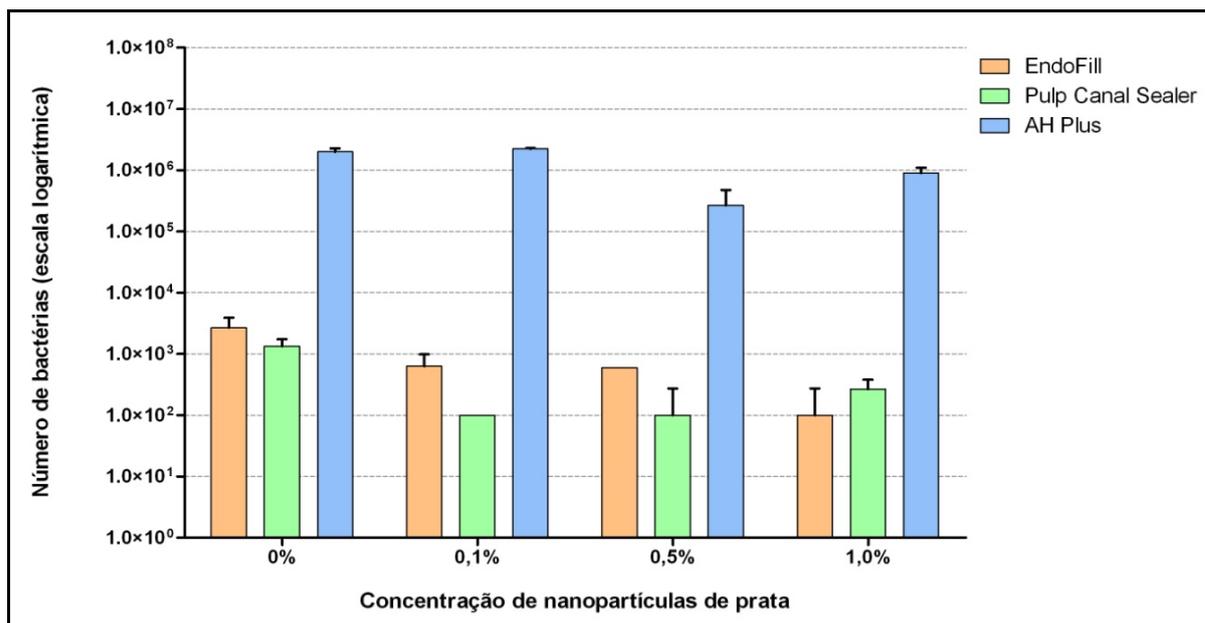


Figura 5. Número de bactérias viáveis encontradas após 96 horas de exposição aos cimentos testados com adição de diferentes concentrações de nanopartículas de prata. Concentração bacteriana em $T_0 = 4,7 \times 10^7$.

A análise estatística paramétrica (2-way ANOVA, $\alpha=0,05$) foi realizada para cada um dos tempos testados, a fim de comparar diferenças entre os cimentos e concentrações de nanopartículas, com teste complementar de Bonferroni para comparação entre as médias dos grupos.

A análise estatística revelou diferenças significantes entre os cimentos testados ($p<0,001$) para todos os tempos experimentais. O teste complementar de Bonferroni indicou que o cimento AH Plus[®] possui capacidade bactericida inferior aos cimentos EndoFill[®] e Pulp Canal Sealer[®], que são estatisticamente similares ($p>0,05$). A incorporação de maiores ou menores quantidades de nanopartículas de prata aos cimentos não foi capaz de alterar estas diferenças entre os mesmos.

As Figuras 6 a 8 apresentam as curvas de crescimento bacteriano após diferentes tempos, de acordo com a quantidade de nanopartículas de prata incorporadas para cada um dos cimentos testados.

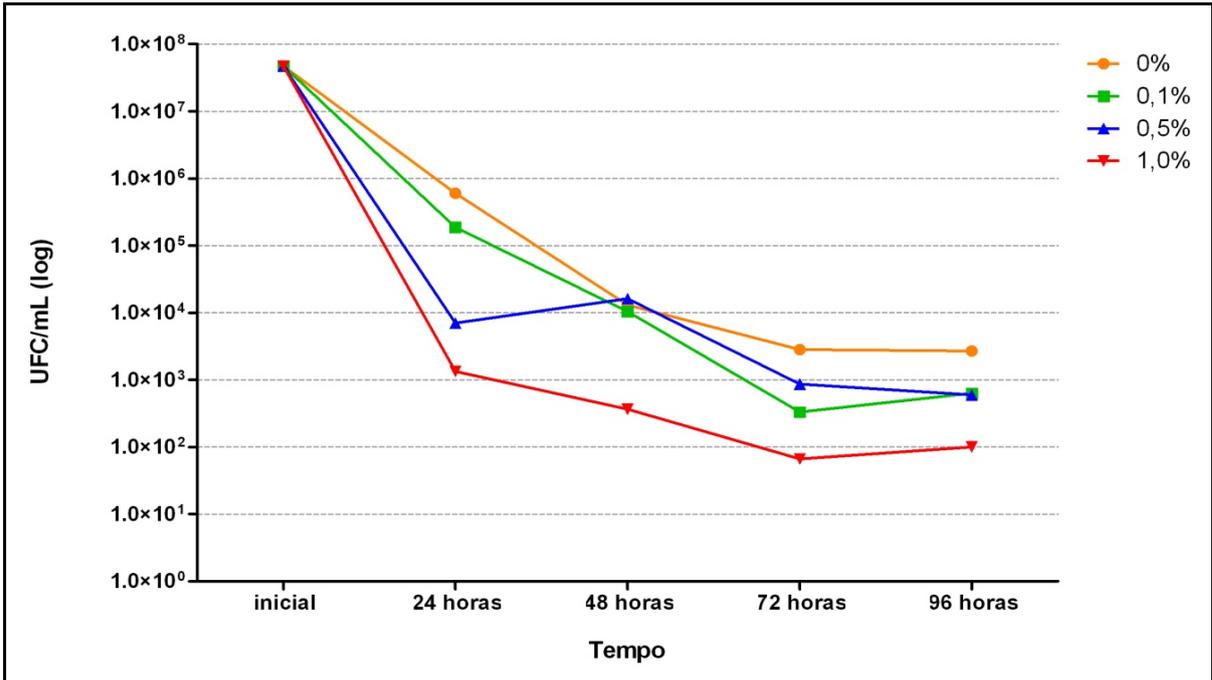


Figura 6. Curva de crescimento bacteriano após exposição ao cimento Endofill[®] com adição de diferentes concentrações de nanopartículas de prata.

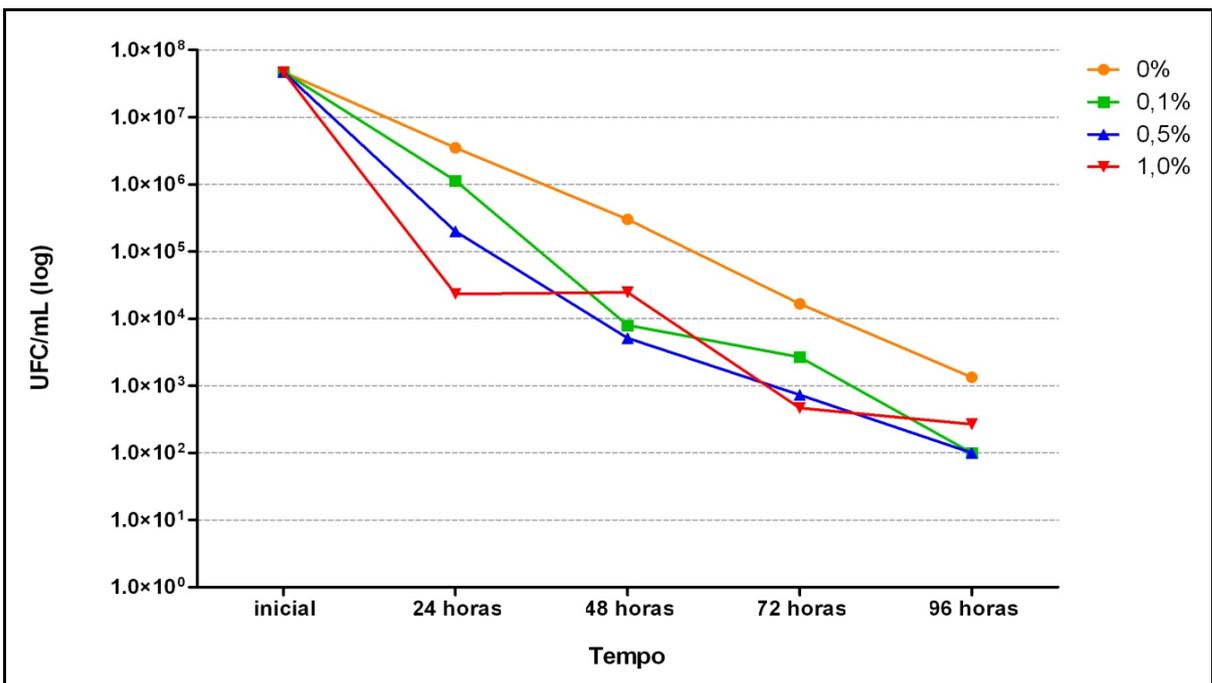


Figura 7. Curva de crescimento bacteriano após exposição ao cimento Pulp Canal Sealer[®] com adição de diferentes concentrações de nanopartículas de prata.

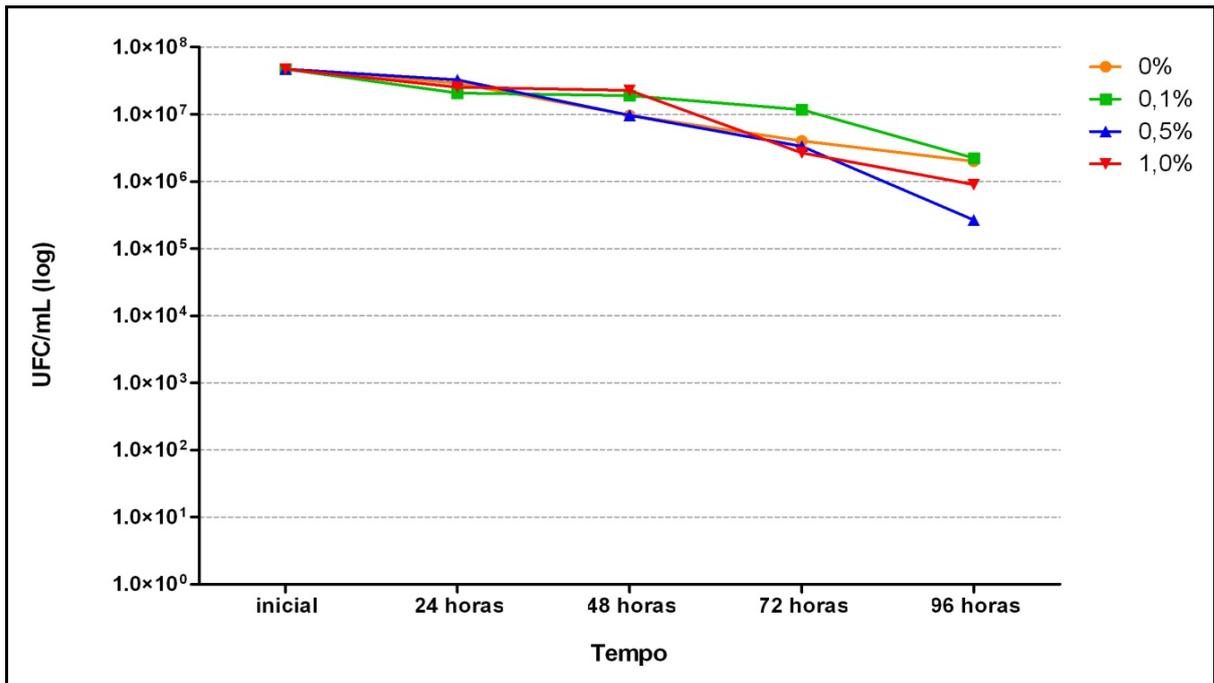


Figura 8. Curva de crescimento bacteriano após exposição ao cimento AH Plus[®] com adição de diferentes concentrações de nanopartículas de prata.

As Figuras 9 a 11 referem-se à análise por microscopia eletrônica de varredura do interior das amostras, mostrando a microestrutura dos cimentos puros e modificados por diferentes concentrações de nanopartículas de prata.

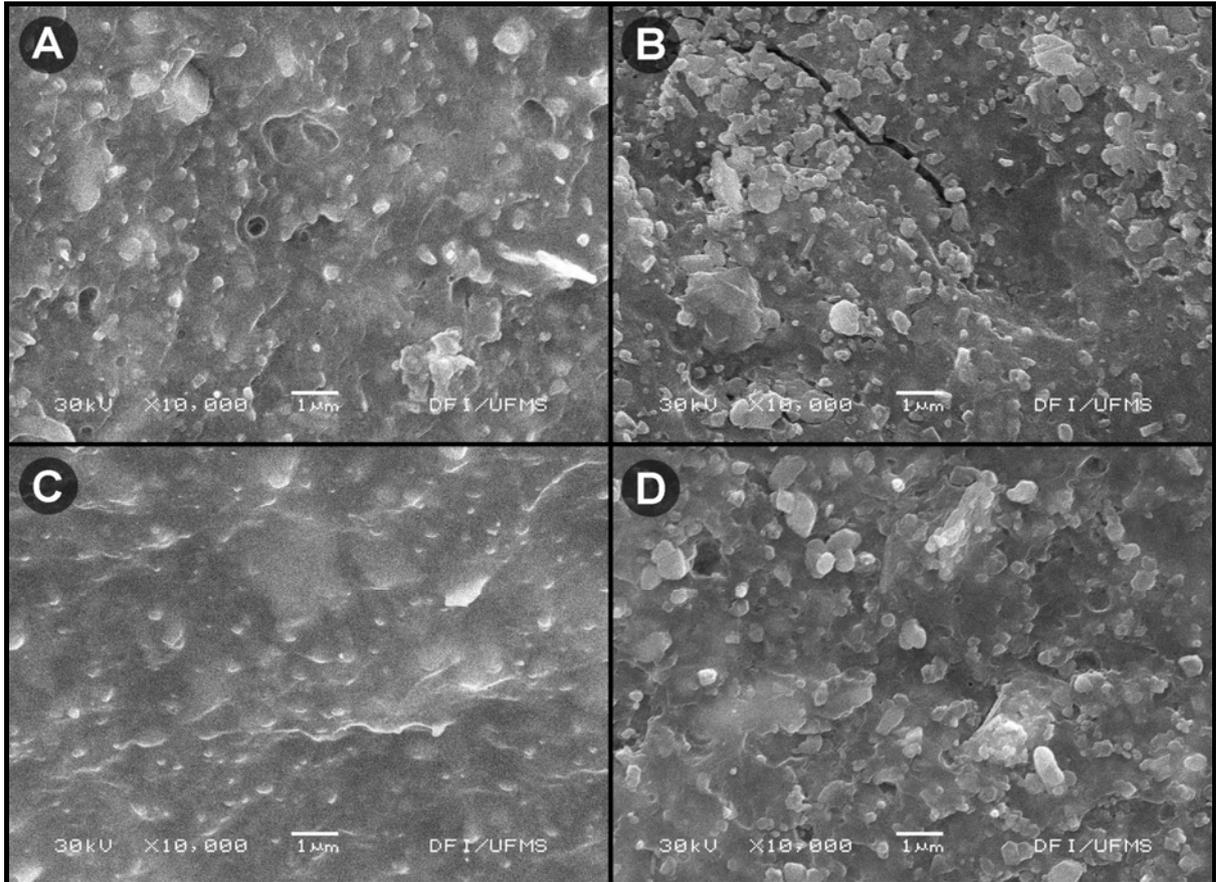


Figura 9. Análise da estrutura interna do cimento obturador EndoFill[®] com adição de diferentes concentrações de nanopartículas de prata. A) 0% de nanoprata; B) 0,1% de nanoprata; C) 0,5% de nanoprata; D) 1,0% de nanoprata.

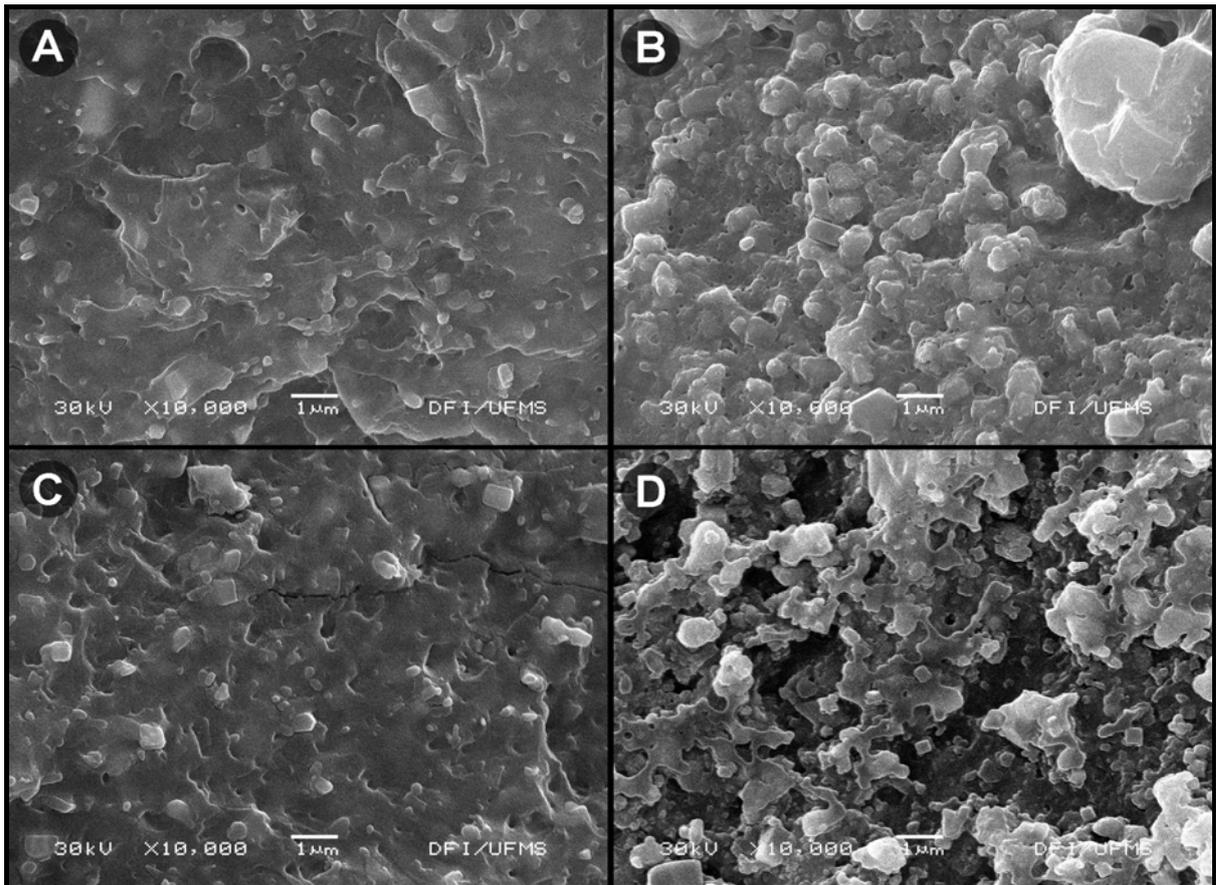


Figura 10. Análise da estrutura interna do cimento obturador Pulp Canal Sealer[®] com adição de diferentes concentrações de nanopartículas de prata. A) 0% de nanoprata; B) 0,1% de nanoprata; C) 0,5% de nanoprata; D) 1,0% de nanoprata.

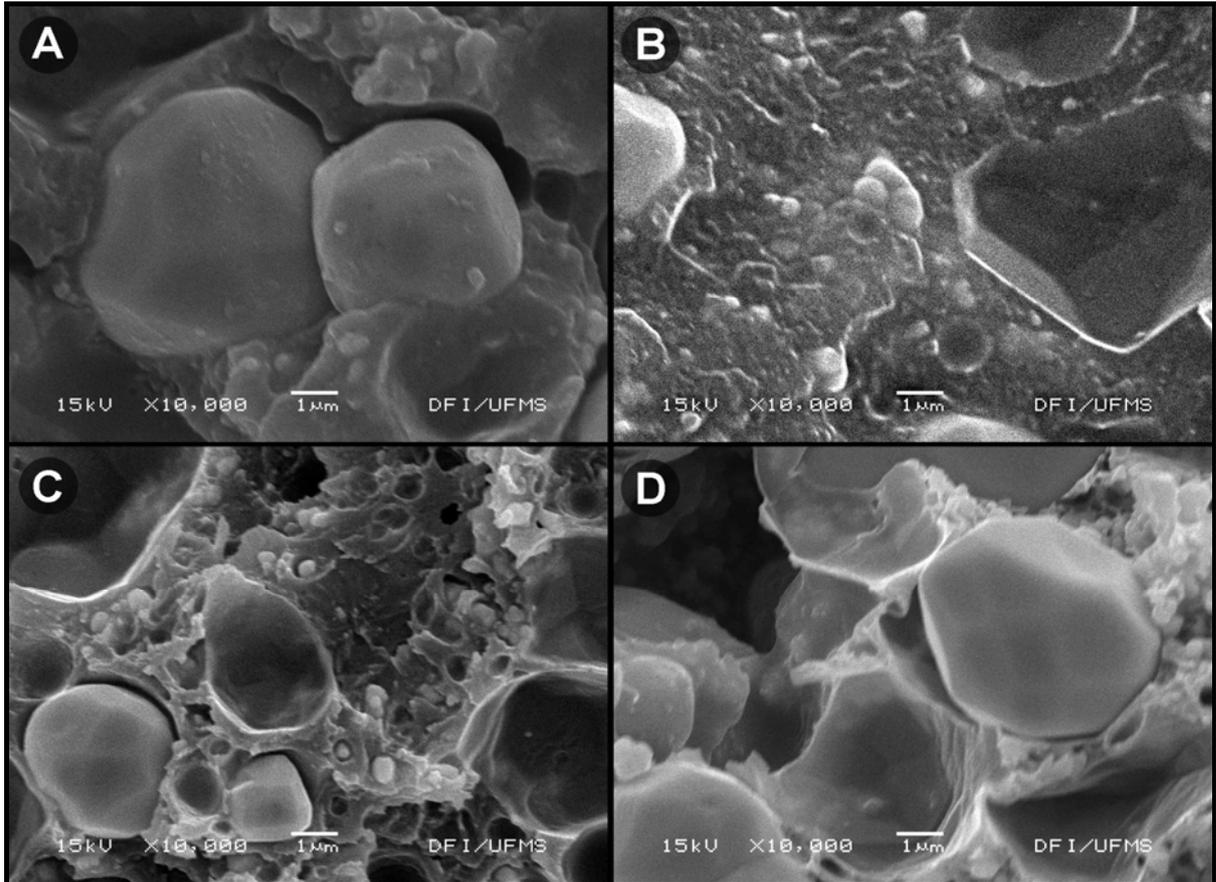


Figura 11. Análise da estrutura interna do cimento obturador AH Plus® com adição de diferentes concentrações de nanopartículas de prata. A) 0% de nanoprata; B) 0,1% de nanoprata; C) 0,5% de nanoprata; D) 1,0% de nanoprata.

A Figura 12 ilustra as nanopartículas de prata utilizadas para modificar os cimentos testados, bem como os diâmetros das mesmas.

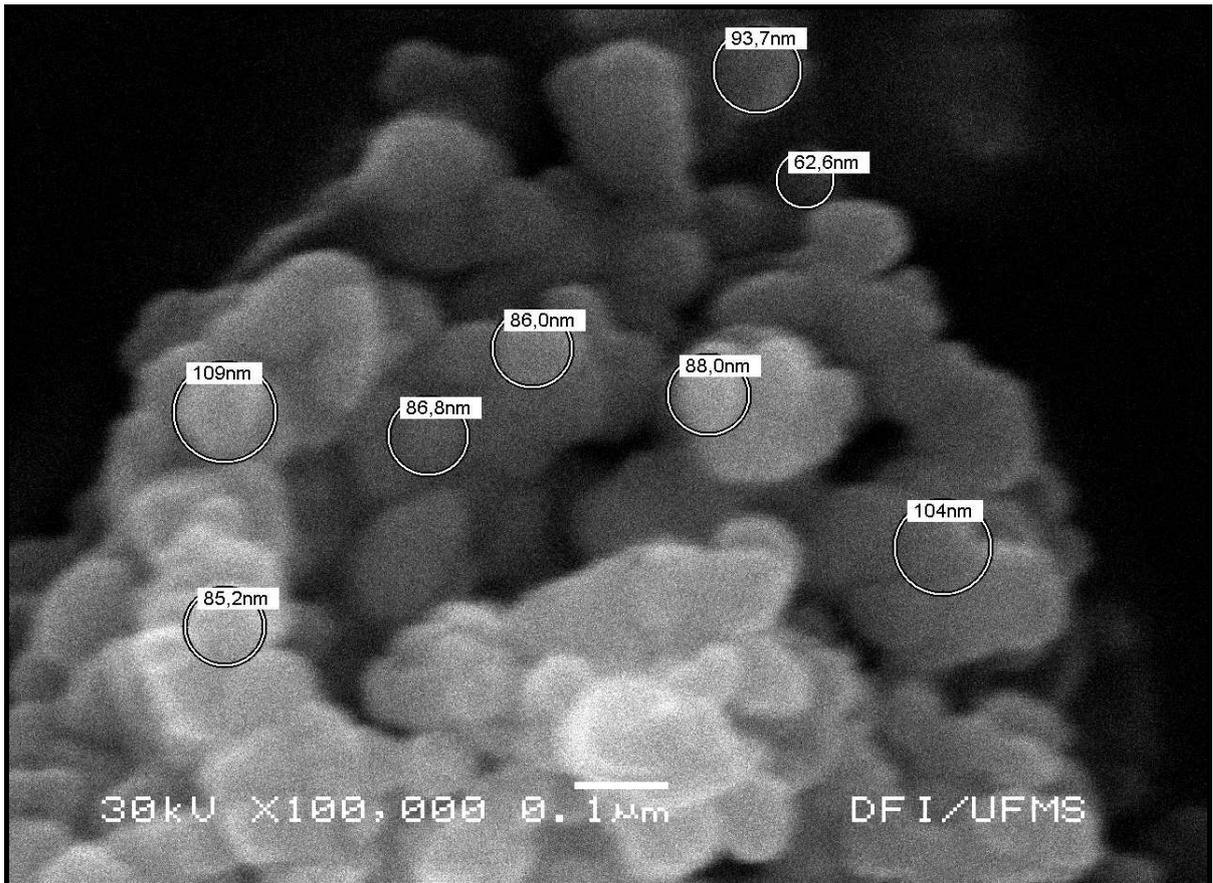


Figura 12. Nanopartículas de prata aglomeradas, com medida do diâmetro de algumas delas.

6 DISCUSSÃO

Nanopartículas de prata, ou simplesmente nanoprata, é um dos materiais mais estudados atualmente com relação aos seus efeitos em várias áreas do conhecimento humano. Produtos contendo prata em nanoescala estão disponíveis comercialmente há mais de 100 anos, sendo utilizados em aplicações tão diversas quanto a fotografia, tratamento de lesões, compostos condutivos e antiestáticos, catalisadores e como agente microbicida. Estes agentes, geralmente adicionados em pequenas quantidades, são comumente utilizados para impedir o crescimento de micro-organismos em superfícies e na estrutura de materiais (SALATA, 2004; NOWACK *et al.*, 2011).

As partículas de nanoprata são geralmente menores que 100 nm e contêm de 20 a 15.000 átomos de prata (CHEN & SCHLUESENER, 2008; WEIR *et al.*, 2008). O presente estudo utilizou-se de nanopartículas com médias de tamanho semelhante aos que os autores citaram (Figura 12).

Sua atividade bactericida ainda é discutida (KISHEN *et al.*, 2008; RUPARELIA *et al.*, 2008; SHARMA, *et al.*, 2009), mas a literatura se baseia na sua propriedade oligodinâmica, ou seja, efeito letal que pequenas quantidades de certos metais exercem sobre as bactérias. A prata em tamanho nanométrico muda drasticamente suas propriedades químicas, físicas e ópticas. Sob a forma de nanopartículas de prata é um extraordinário e potente agente antimicrobiano (RAI *et al.*, 2009).

Devido ao seu pequeno tamanho, as nanopartículas apresentam uma grande superfície de contato em comparação a outros sais e até mesmo a prata particulada, proporcionando assim um maior contato com os micro-organismos, se ligando à membrana celular e também penetrando no seu interior. Têm eficácia contra um amplo espectro de bactérias gram-positivas e gram-negativas, incluindo cepas de bactérias antibiótico-resistentes (PERCIVAL *et al.*, 2007). Um dos mecanismos

sugeridos para explicar a ação das nanopartículas de prata sobre as bactérias gram-negativas é a ligação às suas membranas celulares e o aumento da permeabilidade devido a mudanças estruturais, o que acarretaria a lise celular (SONDI E SALOPEK-SONDI, 2004).

A razão pela qual células eucarióticas, presentes nos mamíferos, parecem ser menos sensíveis a esta ação de prata pode ser explicado pela maior redundância estrutural e funcional, bem como pelo seu tamanho em comparação com células procariotas (bactérias). Outro motivo pode ser pela presença da camada de peptidoglicano, presente apenas em células bacterianas, fato esse que também pode explicar o baixo efeito antimicrobiano contra *S. aureus* (KIM *et al.*, 2007). Isso pode fazer com que a concentração de prata necessária para alcançar efeitos tóxicos sobre células eucarióticas seja muito maior do que para células bacterianas (WIJNHOVEN *et al.* 2009). Desta forma, pode haver uma janela terapêutica em que as células bacterianas são atacadas com sucesso, sem que efeitos nocivos em células eucarióticas sejam observados.

Canais radiculares infectados possuem uma vasta microbiota, bastante variável em número de espécies. Embora grande parte destas bactérias sejam eliminadas durante o preparo químico-mecânico, algumas células podem persistir no interior de túbulos dentinários e anfractuosidades do sistema de canais radiculares, aguardando condições propícias para recontaminar o endodonto (GOMES *et al.*, 2005; OLIVEIRA *et al.*, 2011).

Como uma de suas várias características desejáveis, os cimentos endodônticos deveriam possuir propriedades microbicidas ou, ao menos, configurarem ambiente inóspito ao crescimento de micro-organismos (GROSSMAN, 1980). Além disso, deveriam promover um selamento impermeável à percolação pois, caso contrário, a recontaminação do canal radicular pode determinar no fracasso do tratamento endodôntico a longo prazo (WU; WESSELINK, 1994; DE ALMEIDA *et al.*, 2000; KOPPER *et al.*, 2003; KISHEN *et al.*, 2008).

Estudos revelam que a bactéria gram-positiva *Enterococcus faecalis* é a mais prevalente e, frequentemente, a única a persistir em canais radiculares já instrumentados e obturados, sendo correlacionada com a presença de lesões

refratárias (PORTENIER *et al.*, 2003; DORNELLES-MORGENTAL *et al.*, 2011; OLIVEIRA *et al.*, 2011). Além disso, sua resistência a valores de pH elevados faz com que o uso de medicação intracanal à base de hidróxido de cálcio tenha pouca efetividade frente à mesma (EVANS *et al.*, 2002; TURK *et al.*, 2009; MOHAMMADI; DUMMER, 2011), razão pela qual foi a bactéria de escolha no presente experimento.

Teoricamente, cimentos com maior potencial microbicida seriam capazes de eliminar bactérias mais resistentes a quimioterápicos, tanto a curto como a longo prazo, evitando a persistência do fator etiológico e favorecendo a cura das periapicopatias. Mais ainda, no caso de falha da obturação em decorrência de percolação de fluidos, contribuiriam para retardar ou até mesmo impedir o surgimento de novas lesões de origem endodôntica.

Os cimentos testados neste estudo foram escolhidos por terem características distintas entre si. Os cimentos EndoFill e Pulp Canal Sealer são à base de óxido de zinco e eugenol, apresentando solubilidade maior do que o cimento resinoso AH Plus (SCHÄFER; ZANDBIGLARI, 2003; McMICHEN *et al.*, 2003; CARVALHO JUNIOR *et al.*, 2007). Embora o cimento AH Plus seja considerado o padrão-ouro no que diz respeito às suas propriedades físicas, como baixa solubilidade e boa adesão ao tecido dentinário, é deficiente sob o ponto de vista microbiológico.

Os resultados obtidos no presente experimento corroboram os achados de alguns pesquisadores no que diz respeito às características dos cimentos testados. Enquanto os cimentos endodônticos à base de óxido de zinco e eugenol apresentam acentuada ação bactericida a partir das primeiras 24 horas em contato com os micro-organismos, o cimento AH Plus é inócuo ao *E. faecalis* sob forma planctônica (HELING; CHANDLER, 1996; MICKEL *et al.*, 2003; SLUTZKY-GOLDBERG *et al.*, 2008).

Embora o cimento AH Plus possa apresentar ação microbicida logo após a sua manipulação (ZHANG *et al.*, 2009), o insucesso endodôntico é decorrente de falhas que se apresentam ao longo do tempo, principalmente por infiltração bacteriana entre a interface cimento-dentina, que demandam uma ação microbicida do cimento após sua presa. Por este motivo, optou-se por avaliar a capacidade bactericida dos cimentos testados após sua completa estabilização em condições controladas (10 dias em estufa a 37°C e umidade relativa de 100%).

O cimento AH Plus se apresenta com a superfície diferente em relação aos outros dois cimentos endodônticos testados (Figuras 8 a 10). Fato pode ser explicado pela sua matriz resinosa insolúvel, o qual atrela as suas partículas e também as nanopartículas de prata, não as liberando ao meio externo. Esse material obturador apresenta grandes partículas de tungstênio de cálcio (substância radiopacificador do cimento) com tamanhos variáveis de 1 a 10 μm observados na fotomicrografias (Figura 11).

Desta forma, enquanto os cimentos EndoFill e Pulp Canal Sealer provocaram um decréscimo significativo no número de bactérias em função do tempo, principalmente durante as primeiras 72 horas, o cimento AH Plus foi inócuo às mesmas. Segundo Mickel *et al.* (2003), a ação microbicida dos cimentos à base de óxido de zinco e eugenol se deve às reconhecidas propriedades deste último, que não está presente no cimento resinoso.

A prata convencional (isto é, em escala maior que nanométrica), presente no cimento Pulp Canal Sealer em quantidade variável de 25% a 35% (segundo dados do fabricante) aparentemente possui ação discreta contra bactérias, conforme constatado no presente estudo e corroborado por Siqueira *et al.* 2000 e Kreth *et al.*, 2008. Provavelmente o eugenol, por ser um bactericida bastante potente, mascare a ação da prata presente neste cimento, tornando-o tão eficaz quanto o cimento de Grossman (EndoFill)

A adição de nanopartículas de prata, em qualquer concentração, não foi capaz de melhorar a capacidade bactericida do cimento resinoso AH Plus, porém aumentou significativamente esta propriedade nos cimentos à base de óxido de zinco e eugenol a partir das primeiras 24 horas, mesmo em concentrações baixas (0,1% em peso). Isto pode ser explicado pelo fato do cimento resinoso apresentar solubilidade mínima em meio líquido, o que encapsula a nanoprata e impede que esta seja liberada para que exerça sua capacidade bactericida. Ao contrário, os cimentos EndoFill e Pulp Canal Sealer liberam a nanoprata por possuírem maior solubilidade em meio úmido.

O aumento da concentração de nanoprata nos cimentos testados não determinou em maior capacidade bactericida, exceção feita ao Pulp Canal Sealer,

que revelou menores quantidades de UFC/ml viáveis ao longo de todo período de exposição aos cimentos contendo 0,5% e 1,0% de nanop prata.

Embora o cimento Pulp Canal Sealer contenha uma grande quantidade de prata distribuídas na sua composição (cerca de 30%, segundo o fabricante), o tamanho das partículas deste material não favoreceu sua ação bactericida, pelo menos em curto prazo. A adição de 0,1% de nanop prata tem um impacto significativo nas propriedades microbiológicas deste cimento, o que corrobora a hipótese de que o tamanho da partícula exerce um papel fundamental na interação entre o agente microbicida e as bactérias. A diminuição do tamanho das partículas favorece não apenas a resposta microbicida, mas também contribui para uma diminuição expressiva na quantidade em peso de nanopartículas necessárias para que se obtenha eficácia clínica, o que pode levar a formulações de cimentos endodônticos com características microbiológicas mais favoráveis na eliminação do fator etiológico das periapicopatias. Mais ainda, a possibilidade de reinfecção do sistema de canais radiculares pode ser diminuída caso seja corroborada a hipótese de persistência da ação microbicida de tais cimentos em longo prazo.

7 CONCLUSÕES

Com base na metodologia empregada e nos resultados obtidos, pode-se concluir que:

- Os cimentos à base de óxido de zinco e eugenol empregados neste estudo são mais bactericida na eliminação de formas planctônicas de *Enterococcus faecalis* ATCC do que o cimento AH Plus;
- A adição de 0,1% de nanopartículas de prata aos cimentos à base de óxido de zinco e eugenol foi eficaz na melhoria de suas propriedades bactericidas, o que não foi constatado no cimento AH Plus.
- A adição de 0,5 e 1% de nanopartículas de prata aos cimentos à base de óxido de zinco e eugenol não foi mais nem menos eficaz que a adição de 0,1% de nanopartículas de prata na melhoria de suas propriedades bactericidas.

REFERÊNCIAS

Aoyagi H, Iwasaki SI. Long-term effect of silver powder in vivo. *Dent Mater J*. 2008; 27 (4): 612-25.

Carreira CM. Avaliação in vitro do controle microbiano e da neutralização das endotoxinas presentes em canais radiculares por nanopartículas de prata [Tese]. São Paulo. Faculdade de Odontologia de São Paulo; 2009.

Carvalho-Junior JR, Correr-Sobrinho L, Correr AB, Sinhoreti MA, Consani S, Sousa-Neto MD. Solubility and dimensional change after setting of root canal sealers: a proposal for smaller dimensions of test samples. *J Endod*. 2007; 33 (9): 1110-6.

Chen X, Schluesener HJ. Nanosilver: A nanoparticle in medical application. *Toxicol Lett*. 2008; 176 (1): 1-12.

De Almeida WA, Leonardo MR, Tanomaru Filho M, Silva LA. Evaluation of apical sealing of three endodontic sealers. *Int Endod J*. 2000; 33 (4): 25–7.

Dornelles-Morgental R, Guerreiro-Tanomaru JM, Faria-Júnior NB, Hungaro-Duarte MA, Kuga MC, Tanomaru-Filho M. Antibacterial efficacy of endodontic irrigating solutions and their combinations in root canals contaminated with *Enterococcus faecalis*. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2011. [Epub ahead of print].

Duarte MAH, Weckwerth PH, Moraes IG. Análise da ação antimicrobiana de cimentos e pastas empregados na prática endodôntica. Rev. Odontol. Univ. São Paulo. 1997; 11 (4): 299-305.

Evans M, Davies JK, Sundqvist G, Figdor D. Mechanisms involved in the resistance of *Enterococcus faecalis* to calcium hydroxide. Int Endod J. 2002; 35 (3): 221-8.

Gomes-Filho JE, Silva FO, Watanabe S, Cintra LT, Tendoro KV, Dalto LG, Pacanaro SV, Lodi CS, de Melo FF. Tissue reaction to silver nanoparticles dispersion as an alternative irrigating solution. J Endod. 2010; 36 (10): 1698-702.

Grossman LI. Antimicrobial effect of root canal cements. J Endodon. 1980; 6 (6): 594-7.

Heling I, Chandler NP. The antimicrobial effect within dentinal tubules of four root canal sealers. J Endod. 1996; 6 (5): 257-0.

Hernández-Sierra JF, Ruiz F, Pena DC, Martínez-Gutiérrez F, Martínez AE, Guillén Ade J, Tapia-Pérez H, Castañón GM. The antimicrobial sensitivity of *Streptococcus mutans* to nanoparticles of silver, zinc oxide, and gold. Nanomedicine. 2008; 4 (3): 237-40.

Kayaoglu G, Erten H, Alaçam T, Orstavik D. Short-term antibacterial activity of root canal sealers towards *Enterococcus faecalis*. Int Endod J. 2005; 38 (7): 483-8.

Kim JS, Kuk E, Yu KN, Kim JH, Park SJ, Lee HJ, Kim SH, Park YK, Park YH, Hwang CY, Kim YK, Lee YS, Jeong DH, Cho MH. Antimicrobial effects of silver nanoparticles. Nanomedicine. 2007. 3 (1): 95-101.

Kishen A, Shi Z, Shrestha A, Neoh KG. An investigation on the antibacterial and antibiofilm efficacy of cationic nanoparticulates for root canal disinfection. *J Endod.* 2008; 34 (12): 1515-20.

Kishen A, Shi Z, Shrestha A, Neoh KG. An investigation on the antibacterial and antibiofilm efficacy of cationic nanoparticulates for root canal disinfection. *J Endod.* 2008 Dec;34(12):1515-20.

Kopper PM, Figueiredo JA, Della Bona A, *et al.* Comparative in vivo analysis of the sealing ability of three endodontic sealers in post-prepared root canals. *Int Endod J* 2003;36:857– 63.

Kreth J, Kim D, Nguyen M, Hsiao G, Mito R, Kang MK, Chugal N, Shi W. The Antimicrobial Effect of Silver Ion Impregnation into Endodontic Sealer against *Streptococcus mutans*. *Open Dent J.* 2008; 2: 18-23.

Lai CC, Huang FM, Chan HWYY, Huang MS, Chou MY, Chang YC. Antimicrobial activity of four root canal sealers against endodontic pathogens. *Clin Oral Invest.* 2001; 5: 236–9.

Lansdown AB. Critical observations on the neurotoxicity of silver. *Crit Rev Toxicol.* 2007; 37: 237-50.

Leonardo MR, da Silva LAB, Tanomaru Filho M, Bonifácio KC, Ito IY. In vitro evaluation of antimicrobial activity of sealers and pastes used in Endodontics. *J Endod.* 2000; 6 (7): 391-4.

Lok CN, Ho CM, Chen R, He QY, Yu WY, Sun H, Tam PK, Chiu JF, Che CM. Silver nanoparticles: partial oxidation and antibacterial activities. *J Biol Inorg Chem*. 2007; 12 (4): 527-34.

McMichen FR, Pearson G, Rahbaran S, Gulabivala K. A comparative study of selected physical properties of five root-canal sealers. *Int Endod J*. 2003 ;36(9):629-35.

Mickel AK, Nguyen TH, Chogle S. Antimicrobial activity of endodontic sealers on *Enterococcus faecalis*. *J Endod*. 2003; 29 (4): 257-8.

Mohammadi Z, Dummer PM. Properties and applications of calcium hydroxide in endodontics and dental traumatology. *Int Endod J*. 2011 May 2. doi: 10.1111/j.1365-2591.2011.01886.x.

Nowack B, Krug HF, Height M. 120 years of nanosilver history: Implications of policy markets. *Environ Sci Technol*. 2011. 45: 1177-83.

Oliveira ACM, Tanomaru JMG, Faria-Junior N, Tanomaru-Filho M. Bacterial leakage in root canals filled with conventional and MTA-based sealers. *Int Endod J*. 2011; 44, 370–375.

Olson ME, Wright JB, Lam K, Burrell RE. Healing of porcine donor sites covered with silver-coated dressings. *Eur J Surg*. 2000; 166 (6): 486-9.

Percival SL, Bowler PG, Dolman J. Antimicrobial activity of silver-containing dressings on wound microorganisms using an in vitro biofilm model. *Int Wound J*. 2007; 4: 186-91.

Podsiadlo P, Paternel S, Rouillard JM, Zhang Z, Lee J, Lee JW, Gulari E, Kotov NA. Layer-by-layer assembly of nacre-like nanostructured composites with antimicrobial properties. *Langmuir*. 2005; 21 (25): 11915-21.

Portenier I, Haapasalo H, Orstavik D, Yamauchi M, Haapasalo M. Inactivation of the antibacterial activity of iodine potassium iodide and chlorhexidine digluconate against *Enterococcus faecalis* by dentin, dentin matrix, type-I collagen, and heat killed microbial whole cells. *J Endod* 2002; 28: 634 –7.

Rai M, Yadav A, Gade A. Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. *Biotechnol Adv*. 2009; 27 (1): 76-83.

Ruparelia JP, Chatterjee AK, Duttagupta SP, Mukherji S. Strain specificity in antimicrobial activity of silver and copper nanoparticles. *Acta Biomater*. 2008; 4 (3): 707-13.

Salata O. Applications of nanoparticles in biology and medicine. *J. Nanobiotechnology*. 2004. 2 (1): 1-6.

Schäfer E, Zandbiglari T. Solubility of root-canal sealers in water and artificial saliva. *Int Endod J*. 2003; 36 (10): 660-9.

Sharma VK, Yngard RA, Lin Y. Silver nanoparticles: Green synthesis and their antimicrobial activities. *Adv Colloid Interface Sci.* 2009; 145 (1-2): 83-96.

Siqueira JF Jr, Favieri A, Gahyva SMM, Moraes SR, Lima KC, Lopes HP. Antimicrobial activity and flow rate of newer and established root canal sealers. *J Endod.* 2000; 6 (5): 274-8.

Slutzky-Goldberg I, Slutzky H, Solomonov M, Moshonov J, Weiss EI, Matalon S. Antibacterial properties of four endodontic sealers *J Endod.* 2008; 34 (6): 735-8.

Sondi I, Salopek-Sondi B. Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on *E. coli* as a model for Gram-negative bacteria. *J Colloid Interface Sci.* 2004; 275 (1): 177-82.

Tian J, Wong KK, Ho CM, Lok CN, Yu WY, Che CM, Chiu JF, Tam PK. Topical delivery of silver nanoparticles promotes wound healing. *ChemMedChem.* 2007; 2 (1): 129-36.

Turk BT, Sen BH, Ozturk T. In vitro antimicrobial activity of calcium hydroxide mixed with different vehicles against *Enterococcus faecalis* and *Candida albicans*. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2009 Aug; 108 (2): 297-01.

Weir E, Lawlor A, Whelan A, Regan F. The use of nanoparticles in anti-microbial materials and their characterization. *Analyst.* 2008; 133 (7): 835-45.

Wijnhoven SWP, Peijnenburg WJGM, Herberts CA, Hagens WI, Oomen AG, Heugens EHW, Roszek B, Bisschops J, Gosens I, Meent DV, Dekkers S, Jong

WH, Zijverden MV, Sips AJAM, Geertsma RE. Nano-silver - a review of available data and knowledge gaps in human and environmental risk assessment.

Nanotoxicol. 2009; 3 (2): 109-38.

Wu MK, De Gee AJ, Wesselink PR. Leakage of four root canal sealers at different thickness. Int Endod J 1994; 27 (6): 304–8.

Zhang H, Shen Y, Ruse ND, Haapasalo M. Antibacterial activity of endodontic sealers by modified direct contact test against *Enterococcus faecalis*. J Endod. 2009; 35 (7): 1051-5.

ANEXO A – Protocolo para preparação de Fuido Simulado Corpóreo (SBF), segundo Kokubo *et al.*, 1990:

1. Lavar bem a parede de uma garrafa de polietileno e de um bastão de vidro de 1N-HCl, detergente neutro e água destilada deionizada. Secar bem;
2. Colocar 500 ml de água destilada deionizada da garrafa de polietileno e fechá-la com tampa de vidro;
3. Com a agitação da água em um agitador magnético, dissolver totalmente os reagentes, um a um na ordem dada na tabela abaixo:

Tabela I – Reagente para a preparação de SBF (pH 7,4/ 1L):

Ordem	Reagente	Quantidade
1	NaCl	7.996 g
2	NaHCO ₃	0.350 g
3	KCl	0.224 g
4	K ₂ HPO ₄ . 3H ₂ O	0.228 g
5	MgCl ₂ . 6H ₂ O	0.305 g
6	1M – HCl	40 ml
7	CaCl ₂	0.278 g
8	Na ₂ SO ₄	0.071 g
9	(CH ₂ OH) ₃ CNH ₂	6.057 g

4. Ajustar a temperatura da solução a 36,5°C em banho Maria, e ajustar o pH da solução em 7.4, agitando-a e titulando com uma solução de HCl 1N gota a gota;
5. Transferir a solução da garrafa de polietileno para um frasco volumétrico de vidro. Adicione água usada para lavar a garrafa de polietileno ao frasco de solução;
6. Ajustar o volume total da solução a um litro pela adição de água destilada deionizada, e agite o frasco a 20°C;
7. Transferir a solução do frasco à garrafa de polietileno e estoque a garrafa no refrigerador a 5-10°C (se houver precipitado, não use essa solução nem seu contêiner novamente).

ANEXO B - Resultados obtidos para a contagem de unidades formadoras de colônia para diferentes cimentos, concentrações de nAg e tempos.

Cimentos	% nAg	Tempo					
		0	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas	
EndoFill	0%	$4,7 \times 10^7$	$2,0 \times 10^5$	$1,9 \times 10^4$	$3,6 \times 10^2$	$2,5 \times 10^2$	
		$4,7 \times 10^7$	$6,0 \times 10^5$	$1,1 \times 10^4$	$2,2 \times 10^2$	$4,0 \times 10^3$	
		$4,7 \times 10^7$	$1,0 \times 10^6$	$9,0 \times 10^3$	$2,7 \times 10^2$	$1,6 \times 10^3$	
	0,1%	$4,7 \times 10^7$	$1,8 \times 10^5$	$9,2 \times 10^3$	$4,0 \times 10^2$	$3,0 \times 10^2$	
		$4,7 \times 10^7$	$1,8 \times 10^5$	$9,7 \times 10^3$	$3,0 \times 10^2$	$6,0 \times 10^2$	
		$4,7 \times 10^7$	$2,0 \times 10^5$	$1,24 \times 10^4$	$3,0 \times 10^2$	$1,0 \times 10^3$	
	0,5%	$4,7 \times 10^7$	$7,0 \times 10^3$	$1,33 \times 10^4$	$9,0 \times 10^2$	$6,0 \times 10^2$	
		$4,7 \times 10^7$	$6,0 \times 10^3$	$2,0 \times 10^4$	$1,0 \times 10^3$	$6,0 \times 10^2$	
		$4,7 \times 10^7$	$8,0 \times 10^3$	$1,53 \times 10^4$	$7,0 \times 10^2$	$6,0 \times 10^2$	
	1,0%	$4,7 \times 10^7$	0	$2,0 \times 10^2$	0	0	
		$4,7 \times 10^7$	$2,0 \times 10^3$	$3,0 \times 10^2$	$1,0 \times 10^2$	0	
		$4,7 \times 10^7$	$2,0 \times 10^3$	$6,0 \times 10^2$	$1,0 \times 10^2$	$3,0 \times 10^2$	
	Pulp Canal Sealer	0%	$4,7 \times 10^7$	$3,0 \times 10^6$	$1,0 \times 10^5$	$4,0 \times 10^4$	$1,2 \times 10^3$
			$4,7 \times 10^7$	$3,5 \times 10^6$	$1,0 \times 10^5$	$1,0 \times 10^4$	$1,8 \times 10^3$
			$4,7 \times 10^7$	$4,0 \times 10^6$	$7,0 \times 10^5$	0	$1,0 \times 10^3$
0,1%		$4,7 \times 10^7$	$1,2 \times 10^6$	$9,0 \times 10^3$	$4,0 \times 10^3$	$1,0 \times 10^2$	
		$4,7 \times 10^7$	$1,1 \times 10^6$	$8,0 \times 10^3$	$2,0 \times 10^3$	$1,0 \times 10^2$	
		$4,7 \times 10^7$	$1,1 \times 10^6$	$7,0 \times 10^3$	$2,0 \times 10^3$	$1,0 \times 10^2$	
0,5%		$4,7 \times 10^7$	0	$5,0 \times 10^3$	$6,0 \times 10^2$	0	
		$4,7 \times 10^7$	$4,0 \times 10^5$	$5,6 \times 10^3$	$7,0 \times 10^2$	0	
		$4,7 \times 10^7$	$2,0 \times 10^5$	$4,8 \times 10^3$	$9,0 \times 10^2$	$3,0 \times 10^2$	
1,0%		$4,7 \times 10^7$	$2,0 \times 10^5$	$2,21 \times 10^4$	$6,0 \times 10^2$	$4,0 \times 10^2$	
		$4,7 \times 10^7$	$2,0 \times 10^5$	$2,45 \times 10^4$	$3,0 \times 10^2$	$2,0 \times 10^2$	
		$4,7 \times 10^7$	$3,0 \times 10^5$	$2,7 \times 10^4$	$5,0 \times 10^2$	$2,0 \times 10^2$	
AH Plus		0%	$4,7 \times 10^7$	$4,7 \times 10^7$	$2,7 \times 10^7$	$9,0 \times 10^6$	$3,0 \times 10^6$
			$4,7 \times 10^7$	$4,7 \times 10^7$	$2,8 \times 10^7$	$9,0 \times 10^6$	$4,0 \times 10^6$
			$4,7 \times 10^7$	$4,7 \times 10^7$	$3,2 \times 10^7$	$1,1 \times 10^7$	$5,0 \times 10^6$
	0,1%	$4,7 \times 10^7$	$4,7 \times 10^7$	$1,9 \times 10^7$	$1,6 \times 10^7$	$1,1 \times 10^7$	
		$4,7 \times 10^7$	$4,7 \times 10^7$	$2,1 \times 10^7$	$1,9 \times 10^7$	$1,1 \times 10^7$	
		$4,7 \times 10^7$	$4,7 \times 10^7$	$2,2 \times 10^7$	$2,2 \times 10^7$	$1,3 \times 10^7$	
	0,5%	$4,7 \times 10^7$	$4,7 \times 10^7$	$2,5 \times 10^7$	$1,1 \times 10^7$	$2,0 \times 10^6$	
		$4,7 \times 10^7$	$4,7 \times 10^7$	$3,6 \times 10^7$	$1,0 \times 10^7$	$4,0 \times 10^6$	
		$4,7 \times 10^7$	$4,7 \times 10^7$	$3,7 \times 10^7$	$8,0 \times 10^6$	$4,0 \times 10^6$	
	1,0%	$4,7 \times 10^7$	$4,7 \times 10^7$	$2,8 \times 10^7$	$2,0 \times 10^7$	$1,0 \times 10^6$	
		$4,7 \times 10^7$	$4,7 \times 10^7$	$2,3 \times 10^7$	$2,2 \times 10^7$	$5,0 \times 10^6$	
		$4,7 \times 10^7$	$4,7 \times 10^7$	$2,5 \times 10^7$	$2,6 \times 10^7$	$2,0 \times 10^6$	