

UNESP – Universidade Estadual Paulista  
“Júlio de Mesquita Filho”  
Faculdade e Odontologia de Araraquara

**ESTHER GOMES SAADE**

**Avaliação da ação bactericida e bacteriostática das nanopartículas TiO<sub>2</sub> e Ag aplicadas em pinos intraradiculares.**

**Araraquara  
2012**

UNESP - UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARARAQUARA

**ESTHER GOMES SAADE**

**Avaliação da ação bactericida e bacteriostática das  
nanopartículas TiO<sub>2</sub> e Ag aplicadas em pinos intra-  
radiculares.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação  
em Ciências Odontológicas - Área de Dentística  
Restauradora, da Faculdade de Odontologia de  
Araraquara, da Universidade Estadual Paulista  
para a obtenção do título de Doutor em Ciências  
Odontológicas.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Ferrarezi de Andrade

**Araraquara**

**2012**

**ESTHER GOMES SAADE**

**Avaliação da ação bactericida e bacteriostática das nanopartículas TiO<sub>2</sub> e Ag aplicadas em pinos intraradiculares.**

COMISSÃO JULGADORA

TESE PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR

Presidente e Orientador: Prof. Dr Marcelo Ferrarezi de Andrade

2º Examinador: Prof. Dr Vitor Obergoso Flores

3º Examinador: Prof. Dr Carlos Eduardo Francischone

4º Examinador: Prof. Dr Sizenando de Toledo Porto Neto

5º Examinador: Prof. Dr Jose Roberto Cury Saad

Araraquara, 27 de fevereiro de 2012.

## **DADOS CURRICULARES**

### **ESTHER GOMES SAADE**

NASCIMENTO	16.11.1974 – CAMPINAS/SP
FILIAÇÃO	Celso Edmar Gomes Elza Mota Gomes
1993/1996	Curso de Graduação na Faculdade de Odontologia da Pontifca Universidade Católica de Campinas-PUCC/SP.
2001/2002	Curso de Especialização em Dentística Restauradora da Associação dos Cirurgiões Dentistas de Campinas.
2004/2006	Curso de Especialização em Periodontia na Associação Paulista dos Cirurgiões Dentistas - Regional de São Bernardo do Campo.
2007/2009	Curso de Pós-graduação em Ciências Odontológicas, nível Mestrado, Área de Dentística Restauradora, na Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP.

2009/2012      Curso de Pós-graduação em Ciências Odontológicas,  
nível Doutorado, Área de Dentística Restauradora,  
na Faculdade de Odontologia de Araraquara –  
UNESP

**DEDICO ESSE TRABALHO...**

A **Deus**, pela bênção da vida... por dar-me fé, coragem e  
sempre estar presente em minha vida.

Obrigado!

Ao **Jorge**, meu maior incentivador, pelo constante  
apoio e companheirismo para que eu continue a cada  
dia na busca dos meus sonhos. Obrigada por tornar os  
meus dias melhores nessa jornada! Amo Você!

Aos meus pais, **Elza e Celso**, pelo amor incondicional,  
a quem devo minha formação humana e profissional.  
Compartilho com vocês os méritos desta conquista,  
porque ela nos pertence!

## **AGRADECIMENTOS ESPECIAIS**

Ao meu orientador, **Prof. Dr. Marcelo Ferrarezi de Andrade** pelas orientações, pelo incentivo e ajuda sempre dispensada para o enriquecimento desta pesquisa, pelas oportunidades durante esses anos de convivência. Muito obrigado!

Ao **Prof. Dr. Sizenando de Toledo Porto Neto** que sempre será meu orientador, agradeço pelo projeto inicial dessa pesquisa, pela colaboração e orientação durante esses anos, que me fizeram crescer científica e pessoalmente, pelas oportunidades profissionais, pela confiança e por sua amizade.

Ao **Prof. Dr. Celso Luis de Angelis Porto** por ser um incansável professor e profissional, que pelo seu exemplo me faz cada dia mais admirar e querer buscar novos horizontes e aprimoramento na Odontologia Restauradora. Muito obrigada pela sua valiosa participação na minha vida!

A **Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Denise M. Palomari Spolidorio** pela receptividade no laboratório de microbiologia, minha imensa gratidão pela sua contribuição à realização desta pesquisa, na busca de melhorar a qualidade desse trabalho e pela agradável convivência.

# **AGRADECIMENTOS**

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Unesp, na  
pessoas de seu Magnífico Reitor **Prof. Dr. Prof. Dr. Julio Cezar Durigan.**

À Faculdade de Odontologia de Araraquara – FOAr, da Universidade  
Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, nas pessoas de seu Diretor,  
**Prof. Dr. José Cláudio Martins Segalla**, e de sua Vice-Diretora **Andréia  
Affonso Barreto Montandon.**

Ao programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas da Faculdade  
de Odontologia de Araraquara – UNESP, coordenado pela **Prof<sup>a</sup> Dra Josimeri  
Hebling Costa** e pelo vice-coordenador **Prof Dr. Edson Alves de  
Campos.**

Ao Departamento de Dentística Restauradora da Faculdade de  
Odontologia de Araraquara – Unesp, representado pelo chefe de Departamento,  
**Prof. Dr. Osmir Batista de Oliveira Junior**, e pelo vice **Prof. Dr.  
Fábio Luiz Camargo Vilela Berbert.**

Ao **Prof. Dr José Roberto Cury Saad** pelas oportunidades que me deste desde o início do meu caminho nessa Faculdade, pela confiança, incentivo e apoio. Muito Obrigada!

Ao **Prof. Dr Osmir Batista de Oliveira Junior** pela colaboração em minha formação em Dentística Restauradora, pela atenção durante esses anos de convivência, por propiciar e incentivar novos rumos a pós-graduação.

Ao **Prof. Dr. Edson Alves de Campos** por esses anos de convivência agradável, pelo apoio e por ser sempre gentil e prestativo.

A **Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Alessandra Nara de Souza Rastelli** pelas oportunidades, ensinamentos e atenção dispensada no decorrer desse curso.

A querida **Amanda Fontana** pela atenção, amizade e ajuda desde o início no laboratório para conclusão dessa pesquisa. Muito obrigada, você é uma pessoa muito especial!

A minha amiga **Desirée**, pela sua amizade, incentivo e conselhos, por fazer parte de momentos tão especiais e importantes na minha vida, pelas suas palavras de conforto e apoio sempre. Muito Obrigada!

Ao colega de pós-graduação **Matheus** que deixou saudades no final dessa jornada, obrigado pela sua ajuda científica e seu companheirismo, enriquecendo meu aperfeiçoamento como ser humano e pelos bons momentos de amizade.

A todos os colegas da Pós-Graduação pela amizade, pelo apoio e pela convivência descontraída no transcorrer do curso. Obrigado!

A todos os meus **familiares** pelo apoio e incentivo dispensados durante toda a minha vida. Muito obrigado pelo carinho!

Aos funcionários da Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP, **Mara, Rosângela, José Alexandre e Flávia** pela atenção e disponibilidade sempre quando precisei.

Aos funcionários do Departamento de Dentística **Cida, Wanderlei, Marinho e Creusa** pela ajuda e pelo carinho com que sempre atenderam as minhas solicitações durante esses anos de pós-graduação.

Aos funcionários da Biblioteca, pela atenção que sempre me receberam principalmente a **Ceres Maria Carvalho Galvão de Freitas** pela correção, paciência e revisão dessa tese.

A todos que, embora não estejam aqui citados, tenham contribuído direta ou indiretamente para a realização deste trabalho. Muito Obrigado!

**“Há pessoas que nos falam e nem as escutamos,  
há pessoas que nos ferem e nem cicatrizes deixam.**

**Mas há pessoas que, simplesmente, aparecem em  
nossas vidas e que marcam para sempre.”**

***Cecília Meirelles***

**“Bem aventurado o homem que o seu prazer está na lei do Senhor, e na sua lei medita de dia e noite. Ele é como a árvore plantada junto à corrente de águas, que, no devido tempo, dá seu fruto, e cuja folhagem não murcha; e tudo quanto ele faz será bem sucedido...”**

***(Salmos 1:2,3)***

# SUMÁRIO

Resumo.....	18
Abstract .....	19
1 INTRODUÇÃO.....	20
2 PROPOSIÇÃO.....	40
3 CAPÍTULO 1.....	41
4 CAPÍTULO 2.....	64
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	87
6 REFERÊNCIAS.....	89

Saade EG. Avaliação da ação bactericida e bacteriostática das nanopartículas  $TiO_2$  e Ag aplicadas em pinos intra-radulares [Tese de Doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2012.

## RESUMO

O objetivo desta pesquisa foi avaliar *in vitro* através de experimentos microbiológicos a ação bactericida e bacteriostática das nanopartículas  $TiO_2$ ,  $TiO_2$  e Ag e somente Ag no recobrimento de pinos intra-radulares metálicos fundidos e de fibra de vidro. Foram utilizados 120 pinos intra-radulares, 60 metálicos fundidos confeccionados em laboratório especializado, e 60 pinos pré-fabricados de fibra de vidro. Esses materiais foram recobertos pelo processo de *dip coating*, e tratados termicamente com nanopartículas de dióxido de titânio ( $TiO_2$ ), com um composto de titânio/prata ( $TiO_2/Ag$ ) e somente prata (Ag). Os pinos recobertos apenas com nanopartículas de dióxido de titânio ( $TiO_2$ ) foram submetidos a fotocatalise heterogênea com o auxílio de uma luz ultravioleta (lâmpada Starlux 25w-F). Os pinos intra-radulares sem nenhum tratamento de nanopartículas foram imersos na solução de clorexidina 2% por 5 minutos, devido à eficácia conhecida desse antimicrobiano, para podermos comparar com os demais grupos, sendo nosso controle positivo. No grupo controle negativo os pinos intra-radulares foram removidos do dispositivo e diretamente testados. Para os experimentos realizados utilizamos o meio de cultura BHI (Brain Heart Infusion) e a bactéria *Enterococcus Faecalis*. O primeiro experimento realizado foi para avaliar a descontaminação dos pinos intra-radulares através do teste de turvação no meio BHI caldo. As amostras (n=6) foram colocadas em estufa a 37°C, e as leituras foram realizadas após 24hs e 48hs. A análise foi através da presença ou não de turvação, sendo positivo: presença de turvação igual a crescimento bacteriano e negativo: ausência de turvação. Em seguida foi avaliada a ação antimicrobiana dos pinos intra-radulares sob a *Enterococcus Faecalis* em meio BHI Agar. Os pinos foram inseridos no meio com a bactéria semeada, e as amostras foram colocadas em estufa a 37°C. As leituras foram realizadas após 24hs e 48hs, observando a presença ou ausência de halo antimicrobiano.

**PALAVRAS CHAVES:** Nanopartículas; prata; clorexidina; bactérias.

Saade EG. Evaluation of the bacteriostatic and bactericidal action of TiO<sub>2</sub> and Ag nanoparticles applied in endodontic post [Tese de Doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2012.

## **ABSTRACT**

The objective of this research was to evaluate in vitro experiments using microbiological bacteriostatic and bactericidal action of TiO<sub>2</sub> nanoparticles, TiO<sub>2</sub> and Ag and only Ag in the coating of the intraradicular molten metal and fiberglass post. 120 posts were used intraradicular, and 60 posts made of cast metal, made in a specialized laboratory, and 60 posts prefabricated fiberglass. These materials were coated by the process of dip coating and heat-treated with nanoparticles of titanium dioxide (TiO<sub>2</sub>) with a composite of titanium / silver (TiO<sub>2</sub>/Ag) and only silver (Ag). The posts covered with only nanoparticles of titanium dioxide (TiO<sub>2</sub>) were submitted to heterogeneous photocatalysis with the aid of an ultraviolet light (lamp 25w Starlux-F). The intraradicular pins without any treatment of nanoparticles were immersed in 2% chlorhexidine solution for 5 minutes due to the known efficacy of that antibiotic, in order to compare with the other groups, as our positive control. In the negative control group intraradicular posts were removed from the device and directly tested. For the experiments we performed using the BHI (Brain Heart Infusion) culture medium and the bacteria *Enterococcus faecalis*. The first experiment was conducted the decontamination of intraradicular were evaluated by testing turbidity in the BHI broth. The samples (n = 6) were placed in an incubator at 37 ° C, and the readings will be made after 24 hours and 48 hours. The analysis was through the presence or absence of turbidity, if positive: the presence of turbidity equal to bacterial growth and negative: the absence of turbidity. Antimicrobial activity of intraradicular posts were assessed next under the *Enterococcus faecalis* in BHI Agar. The pins were inserted in the contaminated atmosphere with the bacteria, and the samples were placed in an incubator at 37 ° C. Readings were made after 24 hours and 48 hours, observing the presence or absence of antimicrobial halo.

**KEY WORDS:** Nanoparticles; silver; chlorhexidine; bacteria.

## 1 INTRODUÇÃO

Atualmente em odontologia os conceitos de prevenção são indicados como o melhor tratamento para a saúde bucal. As restaurações minimamente invasivas, preparos conservadores e procedimentos adesivos dominam a clínica diária e as pesquisas científicas. Entretanto ainda temos muitos casos onde o tratamento endodôntico se faz necessário, e posteriormente o dente necessita ser restaurado para devolvermos sua forma e função. A escolha da técnica restauradora depende da estrutura coronária remanescente, da posição do dente no arco dental, da oclusão e da anatomia radicular. Métodos de restaurações de dentes não vitais têm sido descritos por mais de 100 anos<sup>46</sup>. A restauração de dentes com tratamento endodôntico merece especial atenção de clínicos e pesquisadores por apresentarem predisposição às falhas biomecânicas em relação a dentes vitais. Para suprir essa necessidade surgiram os pinos intra-radulares. O pino ideal deve promover o mínimo estresse aos remanescentes dentais; fornecer retenção e estabilidade adequada ao núcleo de preenchimento; ser de fácil remoção se houver necessidade, propiciar uma distribuição de tensões mais homogênea nas estruturas dentárias e transferir forças oclusais de maneira estratégica ao remanescente dental, para não ocasionar fraturas<sup>17</sup>.

Ao longo dos anos o pino intra-radicular mais utilizado foi o núcleo metálico fundido, que, apesar de algumas desvantagens como rigidez e falta de estética, tem considerável documentação científica comprovando sua efetividade<sup>21</sup>. A busca por estética é uma exigência da sociedade atual e novas pesquisas e tecnologias foram aplicadas na odontologia surgindo materiais

restauradores livres de metal. A partir do final da década 80, foram desenvolvidos os pinos cerâmicos e depois os sistemas de pinos de fibra, com coloração semelhante à estrutura dental<sup>5</sup>. Os pinos intra-radulares de fibra de vidro são compostos basicamente por fibras longitudinais de dióxido de silício e alumina envolta em uma matriz de Bis-GMA juntamente com partículas de carga inorgânicas. São estéticos, resilientes, não sofrem corrosão, e são compatíveis com compósitos e sistemas adesivos<sup>64</sup>, apresentam resistência flexural<sup>32,64</sup> e módulo de elasticidade semelhante ao da dentina, minimizando a transmissão de tensões nas paredes da raiz e diminuindo a possibilidade de fraturas<sup>32</sup>.

Do ponto de vista biológico a desinfecção do canal radicular tem sido uma busca constante das pesquisas, visando eliminar não apenas os microrganismos localizados na luz do canal, mas também aqueles localizados em todo o sistema de canais radulares. Nos casos de insucessos no tratamento endodôntico a bactéria mais predominante é a *Enterococcus faecalis*. Este microrganismo tem demonstrado a capacidade de sobreviver no interior dos canais radulares, mesmo após a utilização de determinadas medicações intracanaís com comprovada ação antimicrobiana<sup>33,45,62</sup>. A *Enterococcus faecalis* é comumente associada à infecções persistentes periapicais<sup>41</sup>. No entanto, essas espécies correspondem a uma porcentagem muito pequena da microbiota bacteriana inicial de dentes com polpas necróticas sem tratamento<sup>61</sup>.

As bactérias do grupo *Enterococcus faecalis* são cocos gram-positivos entéricos facultativos, estão presentes em casos de infecções persistentes que não respondem positivamente ao tratamento endodôntico convencional contribuindo

assim para a perpetuação da infecção, infecções secundárias e pelos casos de retratamento endodôntico<sup>23,55,59,70</sup>. Esse microrganismo é uma bactéria anaeróbia facultativa comensal e é capaz de realizar a colonização e proliferação nas infecções dos canais radiculares, sendo bastante prevalente em periodontite apical pós-tratamento. A patogenicidade do *Enterococcus faecalis* está muito bem documentada na literatura<sup>16</sup>. Diferente de todas as espécies bacterianas, estudos in vitro, demonstraram a capacidade dessa bactéria em penetrar nos túbulos dentinários<sup>53,70</sup>.

Diferentes exames bacteriológicos em culturas mostraram que *Enterococcus faecalis* está presente em 30-48% de dentes com infecção pós-tratamento<sup>54</sup>. Ela é isolada em dentes com tratamento endodôntico sem lesão apical em torno de 81,5% dos casos e em infecções pulpares e periapicais recorrentes. Essa espécie bacteriana impede a liberação de enzimas hidrolíticas por células polimorfonucleadas, o que pode explicar o seu domínio em infecções pulpares<sup>70</sup>. Em um estudo foram coletadas amostras de 32 adultos submetidos a retratamento de lesões periapicais após tratamento endodôntico realizado, pelo menos há dois anos antes. A prevalência de *Enterococcus faecalis* foi de 18% na saliva e 40,6% em canais radiculares<sup>69</sup>.

A seleção da bactéria para esta pesquisa baseou-se na observação de que alguns microrganismos prevalentes na cavidade oral e relacionados às infecções do sistema de canais radiculares têm recebido atenção especial, sendo amplamente estudados, como ocorre com o *Enterococcus faecalis*<sup>15,23,55</sup>. Este projeto pesquisou pinos intra-radulares que entram em contato direto com o sistema de

canais radiculares do elemento dental, sendo assim, a seleção dessa bactéria se deve ao fato dela estar sempre presente em infecções recorrentes dos tratamentos endodônticos.

Como uma alternativa temos o uso da clorexidina é classificada terapeuticamente como uma substância antimicrobiana, antisséptico tópico e também na categoria de desinfetante. É uma base antisséptica forte e estável na forma de sal (gluconato, acetato ou hipocloreto) e foi introduzida na medicina em 1950 como desinfetante de amplo espectro bacteriano. A partir de 1954 é empregada rotineiramente no tratamento de feridas na pele<sup>19</sup>. Em odontologia ela vem sendo amplamente utilizada no controle de placa bacteriana no tratamento das infecções periodontais e como medicação intracanal<sup>24</sup>. Na periodontia ela é considerada o padrão ouro para o controle químico da placa bacteriana<sup>1</sup>, pois tem atividade antibacteriana ampla, baixa toxicidade e forte afinidade com o tecido epitelial e membranas mucosas<sup>58</sup>. A clorexidina 0,12% esta sendo utilizada como substância irrigadora durante o tratamento endodôntico de dentes com lesão apical, com resultados bem sucedidos reduzindo significativamente o número das bactérias nos canais radiculares infectados<sup>52</sup>. Em forma de gel pode ser utilizada como medicação intracanal entre sessões para eliminar os microorganismos que não são alcançados pelos preparos biomecânicos<sup>10</sup>. Ela é efetiva contra um grande número de microrganismos gram-positivos, gram-negativos, leveduras, anaeróbios facultativos, e aeróbios<sup>18,24</sup>.

Nanotecnologia refere-se a qualquer material, dispositivo ou processo cuja principal propriedade derive da nanoescala, que compreende tamanhos de 0,1 a

100 nanômetros (nm). A manipulação de átomos em uma escala um bilhão de vezes menor que o metro ou um milhão de vezes menor que o milímetro representa um espaço suficiente para, no máximo, dez átomos. A nanotecnologia é, essencialmente, transdisciplinar, envolvendo químicos, físicos, biólogos, engenheiros e farmacêuticos, entre outros profissionais. As nanociências e as nanotecnologias englobam projeto, manipulação, produção e montagem no nível atômico e molecular. Nanociência é “o estudo dos fenômenos e a manipulação de materiais nas escalas atômica, molecular e macromolecular, onde as propriedades diferem significativamente daquelas em uma escala maior”, enquanto nanotecnologias são “o design, a caracterização, a produção e a aplicação de estruturas, dispositivos e sistemas controlando forma e tamanho na escala nanométrica”<sup>47</sup>.

As aplicações da nanotecnologia nas áreas biomédicas é uma realidade, a obtenção de estruturas em nanoescala através da divisão de objetos micrométricos é importante e tem sido realizado em diferentes áreas. O encapsulamento de várias drogas através de micro e nanoestruturas complexas é um exemplo dos progressos significativos no tratamento do diabetes. Várias empresas já estão se preparando para aplicar insulina através da inalação de aerossóis que alcance os alvéolos pulmonares e se espalhem para a corrente sanguínea. Mas o sucesso de uma droga requer não só o transporte adequado de medicamentos para os órgãos e tecidos, mas também controlar o tempo de administração. Na área gastrointestinal, alterações na acidez, a ação de enzimas proteolíticas e presença de ácidos biliares que diminuem a tensão superficial, requer encapsulamento de drogas, onde o

tamanho da cápsula deve ser inferior a 400 nanômetros para não alertar o sistema imunológico. No tratamento do câncer o objetivo é identificar células cancerosas utilizando cápsulas que contêm radionuclídeos, toxinas e quimioterapia. Cada cápsula deve identificar células cancerígenas, ligar, entrar e liberar o seu conteúdo. Outra alternativa é o uso de nanopartículas vidro, 100 nm, recobertas por uma fina folha ouro para anexar anticorpos específicos contra as células cancerígenas. O paciente é submetido à radiação infravermelha (seguro para ele) que é absorvida pelos átomos de ouro, a temperatura da superfície da cápsula aumenta e mata as células cancerosas. As propriedades de nanomateriais e nanotecnologia para a sua implementação e difusão nas áreas de biomedicina, eletrônica e mecânica nos permitem vislumbrar uma realidade promissora em áreas interdisciplinares da química, física, biologia e medicina<sup>6</sup>.

Diferentes tipos de nanomateriais como cobre, zinco, titânio<sup>51</sup>, magnésio, ouro<sup>26</sup>, alginato e prata têm surgido, mas nanopartículas de prata provaram ser mais eficazes, uma vez que têm uma boa atividade antimicrobiana contra bactérias, vírus e outros microrganismos<sup>25</sup>. Esses materiais usados em escala nanométrica reagem com as células através de mecanismos antimicrobianos e inibem a atividade enzimática envolvida na síntese de DNA. As nanopartículas podem interagir diretamente com as células microbianas, interrompendo a transferência eletrônica transmembrana, rompendo a membrana ou a parede celular, ou do componente celular oxidante, ou ainda produzir produtos secundários como espécies reativas de oxigênio (ROS), causando danos<sup>40</sup>.

Há muito tempo é conhecida a ação bactericida de alguns íons metálicos, entre eles a prata e o cobre. O efeito bactericida possui o poder de aniquilar a bactéria, impedindo sua proliferação através da assepsia de efeito oligo-dinâmico do íon prata, sem prejuízo ao ser humano. Em 1929, na Alemanha, o Dr. Krausel conseguiu tornar prático o uso destes íons metálicos para ação bactericida. Desde então, muitos avanços tecnológicos ocorreram nessa área. É importante salientar que estes produtos atuam por meio da ionização dos elementos metálicos bactericidas, evitando que metais puros sejam liberados ao meio ambiente de maneira a não prejudicar o ser humano. Historicamente a prata foi amplamente utilizada em várias áreas da medicina. Em 1700, o nitrato de prata foi utilizado para o tratamento de doenças venéreas, fístulas das glândulas salivares, e óssea e abscessos perianais<sup>35,37</sup>. Concentrações variadas de nitrato de prata foram utilizadas para tratar queimaduras<sup>7,35</sup>. Na década de 1940, após a introdução da penicilina, a utilização de prata para o tratamento de infecções bacterianas reduziu-se drasticamente<sup>8,11,30</sup>. Recentemente, devido ao aparecimento de bactérias resistentes e limitações ao uso de antibióticos os médicos tem voltado à prata, fazendo curativos contendo diferentes níveis de prata<sup>8,20</sup>.

A propriedade antimicrobiana da prata está relacionada à quantidade e a taxa de prata liberadas. A prata em seu estado metálico é inerte, mas ela reage com a umidade da pele e do fluido da ferida ficando ionizada e altamente reativa, uma vez que se liga a proteínas dos tecidos e traz mudanças estruturais na parede da célula bacteriana e membrana nuclear provocando distorção celular e morte. A prata também se liga ao DNA e RNA bacteriano por desnaturação e inibe a

replicação bacteriana<sup>37</sup>. Os íons de prata interagem com grupo tióis em proteínas, resultando em inativação de enzimas respiratórias e levando à produção de espécies reativas de oxigênio<sup>43</sup>.

Vários mecanismos de ação têm sido indicados para a propriedade antimicrobiana da prata. As formas iônicas da prata carregam uma forte carga positiva, portanto elas têm uma grande afinidade pelos grupos carregados negativamente de moléculas biológicas. Dentre essas moléculas, podemos destacar os grupos sulfidril, carboxila, fosfatos dentre outros comumente encontrados nas estruturas macromoleculares distribuídas ao longo das células microbianas. A reação de ligação altera a estrutura da macromolécula, fazendo com que esta se torne inútil à célula. Este ataque desativa funções como síntese de parede celular, transporte de membrana e translação e síntese de ácidos nucléicos como o RNA e DNA de maneira eficiente. Em geral, propriedades físico-químicas desempenham um papel importante na atividade antimicrobiana da prata. As partículas de menos de 10 nanômetros são mais tóxicas para bactérias como a *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*<sup>22,66</sup>.

Recentemente, as nanopartículas de prata têm chamado a atenção por sua atividade antimicrobiana oferecer a possibilidade de uso com propósitos médicos e de higiene. Estas nanopartículas de prata em diferentes formulações, com diferentes formas e tamanhos, exibem atividades antimicrobianas diferentes. Entretanto, os mecanismos da atividade antimicrobiana de íons e de nanopartículas de prata, assim como sua toxicidade em tecidos humanos não estão totalmente esclarecidos. É preocupante os possíveis riscos para a saúde humana

decorrentes de nanopartículas de prata em diversos produtos no mercado que levam a um aumento de prata no ambiente, e disseminação da resistência bacteriana. Portanto mais estudos são necessários para melhor caracterizar a toxicidade e os mecanismos envolvidos com a atividade antimicrobiana dessas partículas<sup>13</sup>.

Nos últimos anos, tem havido um interesse renovado pelos pesquisadores, empresas farmacêuticas, empresas produtoras de alimentos, embalagens e indústrias de revestimento em pó para investigar novos e seguros materiais com efeito antimicrobiano<sup>9</sup>. Em um estudo foram avaliados dois tipos de prata, a Novaron (N) e a Amenitop (AM), com eficácia antibacteriana, incorporadas em uma resina composta a base de TEGDMA-UDMA testando sua atividade antibacteriana, as propriedades mecânicas desse compósito, e a liberação de íons prata. Os dois materiais inibiram o crescimento do principal patógeno oral o *S. Mutans*, não houve nenhuma ou pequena liberação de íons de prata após um dia ou após seis meses. O compósito com a prata N não apresentou diferença significativa em sua resistência flexural ou a compressão. No entanto o compósito incorporado com prata AM apresentou diferença nos parâmetros de resistência. Estes resultados indicam que a prata Novaron pode ser incorporada na resina composta sendo útil clinicamente devido ao efeito de longa duração inibitória contra o *S. Mutans*, sem alterar as propriedades mecânicas do material<sup>67</sup>.

As propriedades antibacterianas de nanopartículas quitosana sozinha e misturada em cimento de óxido de zinco e eugenol foram estudadas. A incorporação de nanopartículas no cimento endodôntico não alterou suas

características de selamento, melhorou diretamente a propriedade antibacteriana e a capacidade de expelir componentes antibacterianos. Houve uma redução significativa na aderência de *Enterococcus faecalis* na dentina<sup>34</sup>. Questões relativas à eliminação eficaz e rompimento da estrutura do biofilme bacteriano na desinfecção endodôntica permanecem pouco esclarecidas. As nanopartículas quitosana e óxido de zinco são conhecidas por possuir importantes propriedades antibacterianas. Biofilmes de *Enterococcus faecalis* foram tratados com nanopartículas de quitosana e óxido de zinco para avaliar a eficácia das nanopartículas na desinfecção e desestruturação do biofilme bacteriano em longo prazo. O tratamento com nanopartículas reduziu as bactérias do biofilme, rompendo a sua estrutura, e mantiveram a propriedade antibacteriana mesmo após o envelhecimento, apresentando assim um potencial para desinfecção de biofilme no tratamento endodôntico<sup>57</sup>.

As nanopartículas de  $\text{TiO}_2$  e Ag foram utilizadas para a fabricação de produtos têxteis de seda multifuncional. As nanopartículas são impregnadas em um substrato da seda através de ligações covalentes, devido à forte ligação química, o tecido de seda fibroína e as nanopartículas formam um sistema composto estável. A atividade antimicrobiana das amostras tratadas e não tratadas com nanopartículas foi avaliada utilizando o teste de difusão em placa de ágar. Foram selecionados as bactérias *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. Amostras circulares de tecido foram colocadas de maneira uniforme sobre a superfície das placas inoculadas e incubadas a  $37 \pm 1$  C por 24h. A avaliação de incubação foi baseada na ausência ou presença de crescimento de

bactérias nas amostras testadas e na zona de contacto entre os ágaros. Os resultados do teste da capacidade antibacteriana mostraram que o tecido não tratado não possui atividade antibacteriana, mostrando a ausência de uma zona de inibição e crescimento bacteriano no meio sob as amostras. Em comparação, os tecidos com  $\text{TiO}_2$  apresentam capacidade antibacteriana limitada, mostrando pequeno crescimento bacteriano nas amostras. No entanto, no caso dos tecidos com nanopartículas  $\text{TiO}_2$  e Ag, não houve crescimento bacteriano nas amostras, e ocorreu uma zona de inibição contra os três tipos de bactérias, ilustrando que tecido tratados com nanopartículas possui atividade antibacteriana excelente. Comparando-se as atividades antibacteriana das nanopartículas  $\text{TiO}_2$  e  $\text{TiO}_2/\text{Ag}$  pode-se concluir que o aumento da capacidade anti-bacteriana  $\text{TiO}_2/\text{Ag}$  está diretamente relacionada com a presença de nanopartículas  $\text{Ag}$ <sup>39</sup>. Segundo a literatura, os íons Ag pode lentamente liberar partículas de prata no meio ao redor das amostras para suprimir o crescimento de bactérias, como expressando a zona de inibição em torno das amostras<sup>63</sup>. Vários mecanismos antibacterianos de íons prata foram propostos: (a) íons prata entram na membrana celular e aderem às paredes celulares de bactérias danificando-as; (b) a ocorrência de efeito de desnaturação; (c) inibição da respiração<sup>56</sup>. Este material de seda multifuncional satisfaz a demanda do mercado por produtos “naturais inteligentes”, e é um material promissor para uso prático na indústria têxtil, na esterilização hospitalar e limpeza ambiental<sup>56,63</sup>.

Os implantes dentários são amplamente utilizados na clinica diária, entretanto algumas vezes complicações como infecções pós-operatórias. Uma

superfície ostentando em longo prazo a capacidade antibacteriana é altamente desejável, a fim de prevenir infecções associadas a implante. Foram testados implantes de titânio revestidos com nanotubos de titânio ( $\text{TiO}_2$ -NTs) incorporados com prata (Ag). A quantidade de Ag apresentado ao NTs foi variada alterando a concentração  $\text{AgNO}_3$  e tempo de imersão. As nanopartículas de Ag foram preparadas por imersão em uma solução de nitrato de prata seguido pela radiação da luz ultravioleta aderindo firmemente à parede dos nanotubos de titânio. Os implantes de  $\text{TiO}_2$  carregados com nanopartículas de Ag (NT-Ag) apresentaram a capacidade de matar as bactérias planctônicas suspensas durante os primeiros dias, a capacidade para impedir a adesão bacteriana foi mantida por 30 dias, o que normalmente é o suficiente para evitar a infecção pós-operatória nas fases iniciais, intermediárias e talvez tardia ao redor do implante. Somente o grupo que apresentava NT-Ag 0.5 %, a menor concentração de Ag, não apresentou resultado satisfatório. Sendo as condições utilizadas nesse experimento mais graves do que aquelas encontradas normalmente in vivo, os materiais deverão ser eficaz por um tempo muito mais longo na situação normal. Os materiais NT-Ag também apresentam osteocondutividade satisfatória, além do bom desempenho biológico esperado de  $\text{TiO}_2$ -NTs. Embora a estrutura NT-Ag mostra alguma citotoxicidade, pode ser reduzida através do controle da taxa de liberação Ag, e as propriedades podem ser ainda mais adaptadas para realizar tanto a capacidade antibacteriana em longo prazo e a bio-integração. Esta estrutura de nanopartículas NT-Ag que fornece relativamente a longo prazo a capacidade antibacteriana e boa integração dos tecidos tem aplicações promissoras

em ortopedia, odontologia, e outros dispositivos biomédicos. Os materiais são, portanto, muito atraentes para implantes biomédicos, devido à prevenção da infecção de implantes associados e promoção da osseointegração<sup>68</sup>.

As nanopartículas possuem excepcionais propriedades físicas e químicas que levou à rápida comercialização. Devido ao seu potencial antimicrobiano as nanopartículas de prata (Ag-np) estão entre as mais comercializadas. As nanopartículas de prata são à base de cosméticos, agentes terapêuticos e produtos domésticos amplamente utilizados, o que levantou uma preocupação pública em relação à sua segurança associada à utilização humana e ambiental. Na prática não existe regulamentação de segurança para a utilização desses nanomateriais. Ainda não foram bem esclarecidos às interações de nanomateriais com as células, os mecanismos de absorção, distribuição, excreção, toxicológicos e mecanismo de ação<sup>3</sup>.

Os filmes finos de dióxido de titânio ( $\text{TiO}_2$ ) são o fotocatalisadores mais pesquisados, são quimicamente estáveis, possuem alto índice de refração, têm excelente transmissão na região infra-vermelha e visível<sup>31,44</sup>. Filmes de dióxido de titânio têm o potencial de fornecer energia limpa, sustentável e renovável, sob a ação da luz solar podem formar um fotodiodo que pode dividir a água em oxigênio e hidrogênio<sup>36,38</sup>. Estas propriedades extraordinárias funcionais surgem porque o dióxido de titânio sob luz UV gera um par elétron-buraco móveis que podem migrar para a superfície onde geram foto-oxidação a qualquer espécie orgânica e os foto-elétrons gerados reduzem o oxigênio da água mediada por formações de radicais de oxigênio<sup>44</sup>.

A fotocatalise heterogênea é um processo oxidativo que tem demonstrado uma promissora tecnologia para o processo de oxidação/degradação de contaminantes orgânicos. Muitos catalisadores têm sido testados, entre eles o dióxido de titânio ( $\text{TiO}_2$ ), que é encontrado em várias formas cristalinas<sup>50</sup>. O óxido de titânio na fase cristalina anatase, possui a propriedade de absorver o comprimento de onda UV-A, o qual eficientemente exhibe a atividade fotocatalítica. A ação bactericida da fotocatalise heterogênea UV-A/ $\text{TiO}_2$  vem sendo testada em microrganismos com diferentes fotossensibilidades e alta eficiência foi encontrada em todos os casos estudados, particularmente no mais resistente, o *Enterobacter cloacal*. Este microrganismo normalmente é encontrado no solo e na água, e devido a um eficiente sistema defensivo antioxidante, não é inativado pela irradiação UV-A. Entretanto, em todos os casos estudados, doses subletais de UV-A na presença de  $\text{TiO}_2$  foram eficientes na eliminação microbiana<sup>4</sup>. A desinfecção por fotocatalise de bactérias patogênicas em água foi avaliada através da aplicação de uma irradiação de luz visível sobre uma película de óxido de titânio/prata. A fotocatalise mostrou-se um método efetivo para eliminar bactérias tais como, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*<sup>29</sup>.

O dióxido de titânio ( $\text{TiO}_2$ ) tem sido amplamente utilizado como um fotocatalizador devido à sua alta eficiência fotocatalítica, resistência à corrosão e custo relativamente baixo. Sobre a irradiação com luz UV, os elétrons na banda de valência  $\text{TiO}_2$  estão excitados na banda de condução criando um par elétron-buraco. Os pares elétrons buraco migram para a superfície para produzir poderosas espécies oxidantes ou radicais superóxido<sup>28</sup>. Estas espécies oxidantes

possuem efetivamente uma ampla ação sob uma variedade de espécies orgânicas, incluindo moléculas de contaminantes, fungos e bactérias. A abertura da faixa de  $\text{TiO}_2$  ( $\sim 3.2$  eV) limita o uso do catalisador por condições de irradiação à luz ultravioleta. Numerosos estudos visam aumentar a eficiência de fotos de  $\text{TiO}_2$  e desenvolver atividade a luz visível. A melhoria no desempenho funcional, com incorporação de Ag na matriz de  $\text{TiO}_2$  pode ser explicada por uma carga modelo de separação e maior taxa de produção de pares foto gerados<sup>27,42</sup>. À medida que o nível de  $\text{TiO}_2$  é maior do que o de Ag, os depósitos de Ag se comportam como sites de acumulação para os elétrons foto gerados derivado  $\text{TiO}_2$ , levando a uma melhor separação de elétrons e buracos. Isso resulta em um maior número de portadores de carga e portanto, um aumento de espécies reativas<sup>48</sup>.

A fotocatalise heterogênea só ocorre quando a superfície que recebeu o recobrimento com nanopartículas de  $\text{TiO}_2$  permanece ativada constantemente com a luz ultravioleta. Uma limitação do uso do catalisador  $\text{TiO}_2$  é que ele requer uma radiação na faixa (sub) 385nm para funcionar. Pesquisas têm sido direcionadas para mudar a banda de absorção no visível. Isto permitirá uma melhor absorção solar que poderiam melhorar a eficácia global do fotocatalisador e, além disso, permitir uma superfície ativada por luz visível, utilizada em ambiente de saúde<sup>12, 42</sup>.

Foram preparados filmes antimicrobianos contendo nanopartículas de prata em um substrato de titânio e testados com luz visível suas propriedades fotocatalíticas. Os filmes poderiam ser transformados de roxo (prata óxido) para laranja (prata) por 254 nm, 365 nm ou radiação de luz branca e o processo

invertido quando os filmes foram armazenados no ar e no escuro. Os filmes foram caracterizados por DRX, Raman, AFM, SEM, EDX, Espectroscopia UV-Vis e XPS, bem como testados para a funcionalidade usando uma variedade de técnicas, incluindo a atividade antimicrobiana contra bactérias *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* em condições de iluminação de hospital. XRD e Raman indicaram que os filmes foram anatase, X-ray de fotoelétrons confirmou a presença de carregamento de prata na superfície de titânio e EDX mostraram prata doping na camada de  $\text{TiO}_2$ . Amostras foram testadas para a foto-degradação do ácido esteárico em três diferentes condições de iluminação: UVA - 365 nm, a luz branca (comumente encontrados em hospitais do Reino Unido) e UVA filtrada luz branca. Os filmes de Ag e óxido de titânio se comportaram como fotocatalisadores ativos sob condições de luz visível. Estas superfícies demonstraram uma redução de 99,99% no número de bactérias *Escherichia coli* viável devido à presença de íons de prata, e 99,99% redução do número de bactérias *Staphylococcus aureus* devido à fotocatalise reforçada. Os filmes Ag- $\text{TiO}_2$  provaram ser fotocatalisadores excepcionais sob luz visível, mesmo na presença de um filtro UV. Essa dupla abordagem envolvendo um fotocatalisador e a prata é benéfica, a prata como uma superfície fotocatalítica acrescenta um grau de adesão ao substrato permitindo que os íons de prata se relacionem melhor com a superfície. A união da Ag com o  $\text{TiO}_2$  utiliza menor quantidade de prata, o que é bom dado ao alto custo desse precioso metal. Uma dupla abordagem para mecanismo antimicrobiano consistindo de uma relação sinérgica entre o fotocatalisador ( $\text{TiO}_2$ ) e a superfície ligada a nanopartículas de prata. O efeito sinérgico permite que mais bactérias

morrem por um curto período de tempo, e o mecanismo de ação multidirecional faz uma superfície com potente ação antimicrobiana a todos os tipos de bactérias. Isto é importante porque as bactérias têm diferentes susceptibilidade e abordagens anti-microbiana. Essa associação proporciona uma superfície multi-funcional que é eficaz contra mais tipos de bactérias. As amostras de prata mostraram a maior promessa real no campo de revestimentos de auto-limpeza e poderiam ter aplicações importantes em ambientes de saúde nos EUA e Reino Unido<sup>12</sup>.

Ao analisar o mecanismo de inativação de células *Escherichia coli* através da ação oxidativa exercida pelo processo UV/TiO<sub>2</sub>, observou-se que a reação é iniciada por uma decomposição parcial da membrana externa, causada pelas espécies reativas produzidas no processo fotocatalítico. Nessa etapa não existe a perda total da viabilidade da célula. Contudo, há alterações na permeabilidade da membrana externa, o que possibilita que as espécies reativas alcancem a membrana citoplasmática e que ocorra a peroxidação dos lipídeos da membrana citoplasmática, a perda da viabilidade e, finalmente a morte celular<sup>60</sup>.

Filmes finos de dióxido de titânio (TiO<sub>2</sub>) e filmes de TiO<sub>2</sub> contendo prata (Ag-TiO<sub>2</sub>) foram preparados em uma sílica pré-revestido com substratos de vidro através do método por uma sol gel *spin coating*. A atividade bactericida desses filmes foi determinada contra *Staphylococcus epidermidis* em iluminação natural e ultravioleta (UV) por quatro métodos: ensaio de difusão em disco, teste bactericida de UV-induzida, qualitativa liberação de íons Ag em bactérias inoculado em ágar e avaliação da superfície topográfica por *laserscan*. A atividade fotocatalítica dos filmes foi medida através da degradação de ácido

esteárico sob condições de luz UV, solar e visível. Um objetivo específico deste estudo foi determinar as mudanças na atividade bactericida e fotocatalítica, como resultado de alterações estruturais e químicas na superfície do filme com a incorporação de Ag e modificação da temperatura de calcinação. Verificou-se que todas os filmes finos  $\text{TiO}_2$  e  $\text{Ag-TiO}_2$  calcinado a  $450^\circ\text{C}$  foram bactericidas e apresentaram atividade fotocatalítica ativa em todas as condições de iluminação investigados. Sob qualquer condição de iluminação os filmes de  $\text{TiO}_2$  com Ag incorporada apresentaram desempenho superior de atividade bactericida e fotocatalítica quando comparados com filmes somente de  $\text{TiO}_2$ <sup>2</sup>.

Os testes de sensibilidade antimicrobiana de substâncias odontológicas têm se mostrado útil tanto na orientação do tratamento clínico como nos estudos que investigam o efeito antimicrobiano de substâncias odontológicas. O teste de difusão em ágar é amplamente utilizado para avaliar a atividade antimicrobiana de substâncias utilizadas nas pesquisas odontológicas<sup>49</sup>. Este teste oferece as vantagens de ser eficiente em detectar a atividade antimicrobiana no meio de cultura, ser de baixo custo e a técnica, além de reprodutível, é relativamente simples de ser realizada não necessitando de equipamentos complexos para análise dos resultados<sup>65</sup>. O teste de difusão em Agar é realizado em placas de Petri contendo meio de cultura sólido, sobre o qual será semeado o microrganismo indicado para o teste. Os agentes antimicrobianos a serem testados são colocados em discos de papéis ou mesmo em poços realizados no meio de cultura. O raio formado da zona de inibição adjacente aos discos demonstra a difusão do agente antimicrobiano. Contudo, o tamanho da zona de inibição estará diretamente

relacionada à solubilidade e a difusibilidade da substância testada, podendo não demonstrar o seu total potencial<sup>14,65</sup>.

O meio de cultura BHI (Brain Heart Infusion) é um meio derivado de nutrientes de cérebro e coração, peptona e dextrose. A peptona e a infusão são fontes de nitrogênio, carbono, enxofre e vitaminas. A dextrose é um carboidrato que os microrganismos utilizam para fermentação. É utilizado como meio para cultivo de estreptococos, pneumococos, meningococos, enterobactérias, não fermentadores, leveduras e fungos. Pode ser utilizado na preparação do inóculo para teste de susceptibilidade aos antimicrobianos, para realização de teste de coagulase em tubo, para teste de crescimento bacteriano<sup>14</sup>.

Na avaliação dos fatores que determinam o sucesso endodôntico e restaurador de um elemento dental, deve-se levar em consideração que além da escolha do melhor material para substituir a estrutura perdida, o cuidado para que esse material seja descontaminado antes de ser inserido no interior dos canais é primordial, pois na técnica clínica endodôntica houve a descontaminação e a obturação visando à remoção dos microrganismos presentes. Pelo fato dos pinos intra-radulares ficarem no interior do canal radicular, é prudente que um protocolo de biossegurança deva ser realizado, para que esse material seja efetivo em suas funções e ao mesmo tempo não recontamine o canal radicular ou estimule o crescimento bacteriano. O uso de nanopartículas para o desenvolvimento de estruturas antimicrobianas tem sido amplamente estudado e apresentado resultados satisfatórios em outras áreas. Essa nanotecnologia aplicada a materiais e instrumentos odontológicos pode resultar em produtos com ação antimicrobiana

que podem ajudar os profissionais a combater as infecções e contaminações, sendo uma promissora inovação.

## 2 PROPOSIÇÃO

O objetivo dessa pesquisa foi avaliar a ação bactericida e bacteriostática das nanopartículas TiO<sub>2</sub> e Ag no recobrimento de pinos intradiculares de fibra de vidro e metálicos fundidos através dos seguintes experimentos microbiológicos:

- utilização de meio de cultura BHI caldo estéril para avaliar crescimento bacteriano através da presença ou ausência de turvação após 24 e 48 hs.
- testar a atividade antimicrobiana em meio de cultura BHI ágar inoculado com *Enterococcus faecalis* onde será observada a presença de halo antimicrobiano.

### 3 CAPÍTULO 1

**“Avaliação in vitro da descontaminação dos pinos intra-radiculares  
recobertos com nanopartículas de TiO<sub>2</sub> e Ag”**

**“In vitro evaluation of descontamination endodontic post  
recovered with nanoparticles TiO<sub>2</sub> and Ag”**

Autores: E. G. Saade<sup>a</sup>, M. C. Bandeca<sup>a</sup>, J. L. Saade<sup>b</sup>, A. Fontana<sup>a</sup>, D.M.P.  
Spolidoro<sup>a</sup>, S. T. Porto Neto<sup>a</sup>, M. F. Andrade<sup>a</sup>

<sup>a</sup> University of São Paulo State, Araraquara School of Dentistry, Department of  
Restorative Dentistry, Humaitá St., 1680, Araraquara, SP, 14801- 903 Brazil

<sup>b</sup> School of São Leopoldo Mandic, José Rocha Junqueira St., 13, Campinas,  
13045-755, Brazil.

\* Corresponding author: E. G. Saade, Departament of restorative Dentistry,  
Araraquara School of Dentistry.

Artigo enviado para: Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology

## Resumo

O objetivo desta pesquisa foi avaliar *in vitro* a ação autolimpante das nanopartículas dióxido de titânio ( $\text{TiO}_2$ ) e prata (Ag) no recobrimento de pinos intra-radulares. Foram utilizados 60 pinos intra-radulares, 30 metálicos fundidos e 30 pré-fabricados de fibra de vidro. Esses materiais foram recobertos pelo processo de *dip coating* e tratados termicamente com nanopartículas  $\text{TiO}_2$  com um compósito de  $\text{TiO}_2$  e Ag e somente Ag. Os pinos recobertos apenas com nanopartículas de  $\text{TiO}_2$  foram submetidos a fotocatalise heterogênea com o auxílio de luz ultravioleta por 30 minutos. Os pinos intra-radulares sem nenhum tratamento de nanopartículas foram imersos na solução de clorexidina 2% por 5 minutos, devido à eficácia conhecida desse antimicrobiano. No grupo controle os pinos intra-radulares sem nenhum tratamento foram diretamente testados. As amostras (n=6) foram separadas em grupos de 1 a 10, inseridas em tubos de ensaio contendo o meio BHI caldo estéril e posteriormente incubados a 37°C com leituras após 24hs e 48hs. A comprovação da descontaminação dos pinos intra-radulares foi através da avaliação visual da turvação do meio de cultura BHI. O tipo de material do pino intra-radicular não influenciou o resultado. Os grupos que receberam apenas as nanopartículas de  $\text{TiO}_2$  e posterior ativação por luz UVA (grupos 1 e 6) não apresentaram ação autolimpante, pois o meio ficou turvo, mostrando crescimento bacteriano. Foi comprovada a ação autolimpante nos grupos que receberam tratamento com nanopartículas de  $\text{TiO}_2$  associado a Ag (grupos 2 e 7) e nos grupos com nanopartículas de Ag (grupos 3 e 8). Os grupos apenas com clorexidina (grupos 4 e 9) apresentaram eficácia na descontaminação pois o meio BHI permaneceu límpido. Apesar das limitações desse estudo a nanotecnologia mostrou-se eficiente, principalmente o uso de nanopartículas de Ag, pois as superfícies com essa nanoestrutura se mostraram descontaminadas, entretanto mais estudos devem ser direcionados para a utilização dessa promissora tecnologia em odontologia.

**PALAVRAS CHAVES:** Nanopartículas de dióxido de titânio e prata; pinos intra-radulares; antimicrobianos.

## **Introdução**

Por mais de 100 anos é descrito métodos de restaurações de dentes não vitais [1]. A restauração de dentes com tratamento endodôntico tem merecido especial atenção de clínicos e pesquisadores por apresentarem predisposição às falhas biomecânicas em relação a dentes vitais [2]. Ao longo dos anos o pino intra-radicular mais utilizado foi o núcleo metálico fundido, que apesar de algumas desvantagens como rigidez e falta de estética, tem considerável documentação científica comprovando sua efetividade. A partir do final da década 80, foram desenvolvidos os pinos cerâmicos e posteriormente os sistemas de pinos de fibra, com coloração semelhante à estrutura dental [3]. Os pinos intraradiculares de fibra de vidro são compostos basicamente por fibras longitudinais de dióxido de silício e alumina envolta em uma matriz de Bis-GMA juntamente com partículas de carga inorgânicas [4-6]. A desinfecção do canal radicular é constantemente pesquisada visando eliminar os microrganismos localizados em todo o sistema de canais radiculares [7-9]. Na avaliação dos fatores que determinam o sucesso endodôntico e restaurador de um elemento dental, deve-se levar em consideração que além da escolha do melhor material para substituir a estrutura perdida, o cuidado para que esse material seja descontaminado antes de ser inserido no interior dos canais é primordial.

A nanotecnologia baseia na construção de estruturas e materiais em escala nanométrica, em medidas equivalentes a um milímetro dividido por um milhão de vezes, e tem permitido a fabricação de produtos com características diferenciadas, pois modifica as propriedades dos materiais no seu nível atômico [10].

A ação bactericida de alguns íons metálicos, entre eles a prata é muito conhecida. O efeito bactericida possui o poder de aniquilar a bactéria, impedindo sua proliferação através da assepsia de efeito oligo-dinâmico do íon prata, sem prejuízo ao ser humano. Em 1929, na Alemanha, o Dr. Krausel conseguiu tornar prático o uso de íons prata metálicos para ação bactericida [11,12]. Recentemente, as nanopartículas de prata têm chamado a atenção por suas diferentes atividades antimicrobianas em diferentes formulações formas e tamanhos que tem possibilitado seu uso com propósitos médicos e higiênicos [13]. A fotocatalise heterogênea é um processo oxidativo que tem demonstrado ser uma promissora tecnologia para o processo de oxidação/degradação de contaminantes orgânicos. Muitos catalisadores têm sido testados, entre eles o  $TiO_2$  que é encontrado em várias formas cristalinas [14].

O tratamento endodôntico possui várias etapas e todos os instrumentais e materiais utilizados intracanal, na terapia endodôntica e no tratamento restaurador devem estar livres de microrganismos. O uso de nanopartículas para o desenvolvimento de estruturas antimicrobianas tem sido amplamente estudado e apresentado resultados satisfatórios em outras áreas. Essa nanotecnologia aplicada a materiais e instrumentos odontológicos pode resultar em superfícies autolimpantes e com ação antimicrobiana que podem ajudar os profissionais a combater as infecções e contaminações. O objetivo desse estudo foi avaliar a ação autolimpante das nanopartículas  $TiO_2$  e Ag no recobrimento de pinos intraradiculares metálicos fundidos e de fibra de vidro através da utilização do meio de cultura BHI para análise de crescimento bacteriano.

### **Materiais e Métodos**

Foram utilizados 30 pinos metálicos fundidos Níquel Cromo (NiCro) padronizados e confeccionados em laboratório especializado e 30 pinos pré-fabricados de fibra de vidro (figura 1). Todos os pinos intra-radulares metálicos fundidos foram confeccionados através de um modelo acrílico com conduto radicular preparado de pré-molar inferior. O pino intra-radicular pré-fabricado selecionado foi o White Post (FGM) que é um compósito de fibra de vidro e resina epóxi de alta resistência mecânica.



Figura 1 – pinos de fibra e metálico

Os pinos intra-radulares foram divididos de acordo com o tipo de pino e tratamento realizado em cada grupo apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Grupos experimentais investigados nesse estudo

Grupos (n=6)	Tipo de tratamento
1. Metálico	TiO <sub>2</sub>
2. Metálico	TiO <sub>2</sub> + 5% Ag
3. Metálico	Ag
4. Metálico	Clorexidina 2%
5. Metálico	Controle
6. Fibra de vidro	TiO <sub>2</sub>
7. Fibra de vidro	TiO <sub>2</sub> + 5% Ag
8. Fibra de vidro	Ag
9. Fibra de vidro	Clorexidina 2%
10. Fibra de vidro	Controle

Os pinos intra-radulares dos grupos 1, 2, 3 6, 7 e 8 foram recobertos pelo processo de *dip coating* e tratados termicamente com revestimento de nanopartículas de TiO<sub>2</sub>, com um compósito de TiO<sub>2</sub>/5%Ag e somente Ag. Os materiais foram recobertos por imersão (*dip coating*) em recipiente contendo um polímero precursor dos materiais de TiO<sub>2</sub> e Ag à temperatura ambiente. Após a deposição, as peças foram levadas a um forno para tratamento térmico entre 300° e 400°C, realizado de forma que íons de titânio se transformem em dióxido de titânio. Entre quatro e seis horas, formou-se um filme nanoestruturado na superfície dos pinos intra-radulares, incorporando uma película de recobrimento.

Os grupos 1 e 6 são os pinos recobertos apenas com nanopartículas de TiO<sub>2</sub> e submetidos a fotocatalise heterogênea, sendo removidos com uma pinça estéril, inseridos em uma placa de Petri estéril, que foi colocada dentro de uma caixa de madeira revestida por papel alumínio onde uma luz ultravioleta (lâmpada Starlux 15w-F) incidiu na distância de 10cm por 30 minutos para ativar a propriedade antimicrobiana. Os pinos foram removidos das caixas e levados imediatamente para o BHI estéril.

Os pinos intra-radiculares dos grupos 4 e 9 sem nenhum tratamento de nanopartículas foram imersos na solução aquosa de digluconato de clorexidina 2%, devido a eficácia conhecida desse antimicrobiano. A clorexidina 2% foi colocada em uma placa de Petri estéril e os pinos permaneceram imersos por 5 minutos, e após a secagem com um jato de ar foram imersos nos tubos de ensaio contendo BHI estéril. Nos grupos controle 5 e 10 os pinos foram removidos do dispositivo do fabricante com uma pinça estéril e inseridos em BHI.

Como meio de cultura, foi selecionado o BHI (*Brain Heart Infusion*) caldo que é derivado de nutrientes de cérebro e coração, peptona e dextrose. A dextrose é um carboidrato que os microrganismos utilizam para fermentação e pode ser utilizada na preparação de teste de susceptibilidade aos antimicrobianos, para realização de teste de coagulase em tubo e teste de crescimento bacteriano [15]. Para o preparo do meio de cultura foi utilizado 37 g do meio *Brain Heart Infusion* (BHI - Acumedia/lot 103,109 B), diluído em 1litro de água destilada, e esterilizado em autoclave a 121°C por 15 minutos. Foram utilizados 60 tubos de ensaio com BHI caldo estéril, sendo a cor original do meio amarelo claro e

límpido, sinalizando a descontaminação do meio. Após a visualização límpida do meio, os pinos foram inseridos, com o auxílio de uma pinça estéril, em cada tubo devidamente identificado (figura 2). Para esse experimento foram utilizadas 6 amostras para cada grupo. Os tubos de ensaio foram colocados em estufa a 37°C, e as leituras foram realizadas após 24hs e 48hs para verificar a ocorrência de crescimento bacteriano que causariam a turvação do caldo.

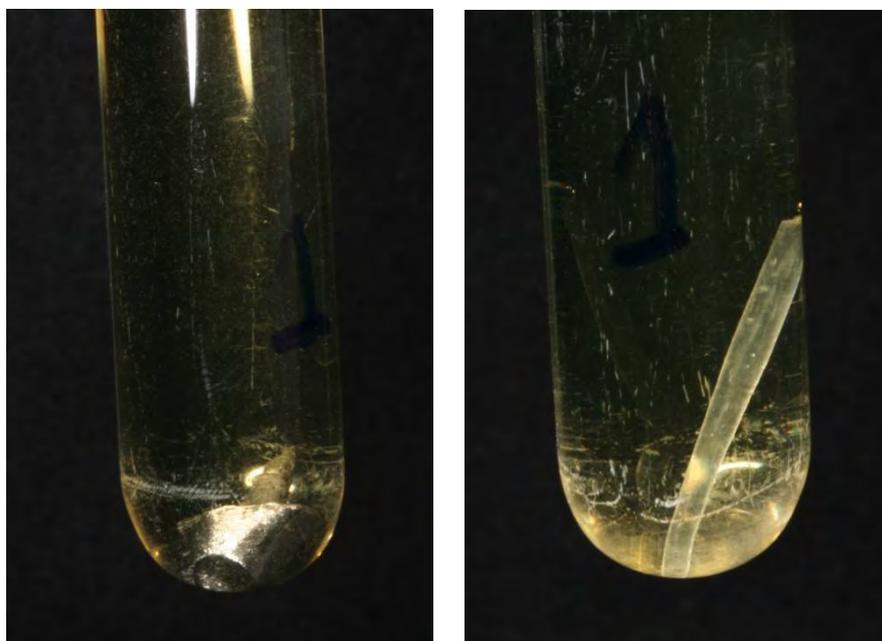


Figura 2 – meio límpido com pino metálico e pino de fibra de vidro

## **Resultados**

A análise dos resultados foi realizada através da presença ou não de turvação no meio de cultura. Foi considerado o resultado positivo quando o meio não estava límpido, com presença de turvação e conseqüentemente crescimento bacteriano. Foi considerado resultado negativo quando havia ausência de

turvação, ou seja, o meio estava límpido não demonstrando crescimento bacteriano (tabela 2). Através desse ensaio microbiológico a ação autolimpante das nanopartículas foi comprovada quando os meios de cultura permaneceram límpidos, portanto sem crescimento microbiano durante 24 e 48 hs de incubação a 37°C.

Tabela 2. Resultados dos grupos experimentais investigados nesse estudo

Grupos	Leituras 24 horas	Leituras 48 horas
1 (TiO <sub>2</sub> )	Positivo	Positivo
2 (TiO <sub>2</sub> + Ag)	Negativo	Negativo
3 (Ag)	Negativo	Negativo
4 (clorexidina)	Negativo	Negativo
5 (controle)	Positivo	Positivo
6 (TiO <sub>2</sub> )	Positivo	Positivo
7 (TiO <sub>2</sub> + Ag)	Negativo	Negativo
8 (Ag)	Negativo	Negativo
9 (clorexidina)	Negativo	Negativo
10 (controle)	Positivo	Positivo

O tempo de incubação em estufa não interferiu no resultado dessa pesquisa, pois todos os grupos mantiveram o mesmo resultado independente da análise após 24 ou 28 horas. A composição do pino intra-radicular não interferiu no resultado, pois tanto os pinos intra-radulares metálicos como os compostos

de fibra de vidro apresentaram resultados iguais entre os mesmos grupos. Os grupos que receberam apenas as nanopartículas de  $\text{TiO}_2$  e posterior ativação por luz ultravioleta (1 e 6) não apresentaram ação autolimpante, pois o meio ficou turvo, sendo positivo para crescimento bacteriano (figura 3). Foi comprovada a ação autolimpante nos grupos que receberam tratamento com nanopartículas de  $\text{TiO}_2$  associado a Ag ( grupos 2 e 7) , e nos grupos que receberam apenas o tratamento com nanopartículas de Ag (3 e 8) (figura 4), pois os tubos de ensaio permaneceram límpidos, sendo negativo para crescimento bacteriano. Os grupos que receberam tratamento apenas com clorexidina (4 e 9) apresentaram descontaminação comprovada com o meio BHI límpido após 24 e 48 horas. Os grupos controle (5 e 10) apresentaram o meio turvo após 24 horas mostrando que esses pinos não são descontaminados no laboratório e na fábrica.



Figura 3 – meio turvo contaminação após 24hs.



Figura 4 – meio não turvo mostrando a descontaminação

### **Discussão**

O tratamento endodôntico só se encerra após a restauração final do elemento dental, e o seu sucesso depende diretamente da descontaminação total da raiz. Todos os instrumentais e materiais utilizados intracanal, na terapia endodôntica e no tratamento restaurador devem estar livres de microrganismos. Os pinos intra-radulares, quando indicados, estão em íntimo contato com o canal radicular devendo estar totalmente livres de microrganismos para não recontaminar esse dente após o seu tratamento [8,9].

A nanotecnologia tem atraído o interesse de inúmeros grupos de pesquisas, devido ao seu enorme potencial de aplicação nos mais variados setores industriais e ao impacto que seus resultados podem dar ao desenvolvimento tecnológico e econômico. Espera-se que o avanço da nanociência e da nanotecnologia

proporcione uma melhor qualidade de vida e na preservação do meio ambiente, estimule não apenas a exploração de novos fenômenos e novas teorias, mas também conduza a uma revolução industrial, se tornando a nova força motora do crescimento econômico do século [16].

Nos últimos anos, tem havido um interesse pelos pesquisadores, empresas farmacêuticas, empresas produtoras de alimentos, embalagens e indústrias de revestimento em pó para investigar novos e seguros materiais com efeito antimicrobiano [17]. Diferentes tipos de nanomateriais como cobre, zinco, titânio [18], magnésio, ouro [19] e prata estão sendo desenvolvidos, mas nanopartículas de prata provaram ser mais eficazes, uma vez que têm uma boa atividade antimicrobiana contra bactérias, vírus e outros microrganismos [20].

Esses materiais usados em escala nanométrica reagem com as células através de mecanismos antimicrobianos e inibem a atividade enzimática envolvida na síntese de DNA. As nanopartículas podem interagir diretamente com as células microbianas, interrompendo a transferência eletrônica transmembrana, rompendo a membrana ou a parede celular, ou do componente celular oxidante, ou podem produzir produtos secundários como espécies reativas de oxigênio (ROS), causando danos as células [21]. A propriedade antimicrobiana das nanopartículas de prata está relacionada à quantidade e a taxa de prata liberadas, uma vez que se liga a proteínas dos tecidos e traz mudanças estruturais na parede da célula bacteriana e membrana nuclear provocando distorção celular e morte. A prata também se liga ao DNA e RNA bacteriano por desnaturação e inibe a replicação bacteriana [22].

A nanotecnologia e a busca por materiais com atividade antimicrobiana também têm sido alvo de pesquisadores na área odontológica. Foram avaliados a eficácia antibacteriana de dois tipos de prata, a Novaron (N) e a Amenitop (AM) incorporadas em uma resina composta a base de TEGDMA-UDMA. Os dois materiais inibiram o crescimento do patógeno oral, *S. mutans*, e não houve nenhuma ou pequena liberação de íons de prata após um dia ou após seis meses. O compósito com a prata N não apresentou diferença significativa em sua resistência flexural ou a compressão. No entanto o compósito incorporado com prata AM apresentou diferença nos parâmetros de resistência. Estes resultados indicam que a prata Novaron pode ser incorporada na resina composta sendo útil clinicamente devido ao efeito de longa duração inibitória contra o *S. mutans*, sem alterar as propriedades mecânicas do material [23].

Os implantes dentários são amplamente utilizados na clinica odontológica, entretanto são comuns complicações como infecções pós-operatórias. A nanotecnologia foi testada em implantes de titânio através do revestimento de nanotubos de titânio ((TiO<sub>2</sub>-NTs) incorporados com prata (Ag). Os implantes de TiO<sub>2</sub> carregados com nanopartículas de Ag (NT-Ag) apresentaram capacidade de matar as bactérias planctônicas suspensas durante os primeiros dias, capacidade para impedir a adesão bacteriana foi mantida por 30 dias, o que normalmente é o suficiente para evitar a infecção pós-operatória nas fases iniciais, intermediárias e talvez tardia ao redor do implante. Esta estrutura de nanopartículas NT-Ag fornece relativamente a longo prazo a capacidade antibacteriana e boa integração dos tecidos tendo aplicações promissoras em ortopedia, odontologia, e outros

dispositivos biomédicos [24]. Neste estudo os pinos intra-radulares que receberam o recobrimento com  $\text{TiO}_2$  e Ag (grupo 2 e grupo 7) e somente Ag (grupo 3 e grupo 8) comprovaram a ação antimicrobiana da Ag. Esses grupo após o tratamento com nanopartículas se comportaram como uma superfície descontaminada, não estimulando o crescimento bacteriano no meio nutriente de BHI estéril em 24 ou 48 hs.

As nanopartículas de prata são as mais comercializadas, são a base de cosméticos, agentes terapêuticos e produtos domésticos, o que levou a uma preocupação em relação à sua segurança associado à utilização humana e ambiental [25]. Na prática não existe regulamentação de segurança para a utilização desses nanomateriais. Entretanto, os mecanismos da atividade antimicrobiana de íons e de nanopartículas de prata, assim como sua toxicidade em tecidos humanos não estão totalmente esclarecidos [13,25]. É preocupante os possíveis riscos para a saúde humana decorrentes de diversos produtos no mercado que levam a um aumento de prata no ambiente e a disseminação da resistência bacteriana. Portanto mais estudos são necessários para melhor caracterizar a toxicidade e os mecanismos envolvidos com a atividade antimicrobiana dessas partículas [13]. Muitos avanços tecnológicos ocorreram para tornar-se prático o uso íons metálicos com ação bactericida. É importante salientar que estes produtos atuam por meio da ionização dos elementos metálicos bactericidas, evitando que metais puros sejam liberados ao meio ambiente de maneira a não prejudicar o ser humano [11,12].

O óxido de titânio na fase cristalina anatase, possui a propriedade de absorver o comprimento de onda UV-A, o qual eficientemente exibe a atividade fotocatalítica. A ação bactericida da fotocatalise heterogênea UV-A/TiO<sub>2</sub> está sendo testada em microrganismos com diferentes fotossensibilidades particularmente no mais resistente o *Enterobacter cloacal*. Entretanto, em todos os casos estudados, doses subletais de UV-A na presença de TiO<sub>2</sub> foram eficientes na eliminação microbiana [26]. Muita atenção tem sido dada a filmes fotocatalíticos pela sua capacidade de destruir bactérias resistentes tais como Methicillin *Staphylococcus aureus* (MRSA) e *Escherichia coli* (*E. coli*) [27-29], que são os principais contribuintes para infecções hospitalares [28,29].

Os filmes finos de TiO<sub>2</sub> são os fotocatalisadores mais pesquisados, são quimicamente estáveis, possuem alto índice de refração, têm excelente transmissão na região infra-vermelha e visível [30,31], possuem alta eficiência fotocatalítica, resistência à corrosão e custo relativamente baixo [32]. Filmes de dióxido de titânio têm o potencial de fornecer energia limpa, sustentável e renovável, sob a ação da luz solar podem formar um fotodiodo que pode dividir a água em oxigênio e hidrogênio [33,34]. Estas propriedades extraordinárias funcionais surgem porque o dióxido de titânio sob luz UV gera os elétrons na banda de valência e estão excitados na banda de condução criando um par elétron-buraco móveis. Os pares elétrons podem migrar para a superfície para produzir poderosas espécies oxidantes ou radicais superóxido, onde geram foto-oxidação a qualquer espécie orgânica e os foto-elétrons gerados reduzem o oxigênio da água mediada por formações de radicais de oxigênio [30,32]. Estas espécies oxidantes

possuem efetivamente uma ampla ação sob uma variedade de espécies orgânicas, incluindo moléculas de contaminantes, fungos e bactérias [35,36]. Nesta pesquisa os pinos intra-radicales cobertos apenas com nanopartículas  $\text{TiO}_2$  (grupo 1 e grupo 6) e irradiado com luz ultravioleta durante 30 minutos apresentaram após 24 e 48 horas o meio BHI turvo, comprovando o crescimento bacteriano. Esse resultado nos mostra que as propriedades antimicrobianas das nanopartículas de  $\text{TiO}_2$  são efetivas somente com a ativação constante da luz ultravioleta, o que não ocorreu durante essa pesquisa. A fotocatalise heterogênea só ocorre quando a superfície que recebeu o recobrimento com nanopartículas de  $\text{TiO}_2$  permanece ativada constantemente com a luz ultravioleta. Uma limitação do uso do catalisador  $\text{TiO}_2$  é que ele requer uma radiação na faixa (sub) 385nm para funcionar. Pesquisas têm sido direcionadas para mudar a banda de absorção no visível. Isto permitirá uma melhor absorção solar que poderiam melhorar a eficácia global do fotocatalisador e, além disso, permitir uma superfície ativada por luz visível, utilizada em ambiente de saúde [35,36,37].

Filmes finos de dióxido de titânio ( $\text{TiO}_2$ ) e filmes de  $\text{TiO}_2$  contendo prata ( $\text{Ag-TiO}_2$ ) foram preparados em uma sílica pré-revestida com substratos de vidro através do método sol gel *spin coating*. A atividade bactericida desses filmes foi determinada contra *Staphylococcus epidermidis* em iluminação natural e ultravioleta (UV). Verificou-se que todas os filmes finos  $\text{TiO}_2$  e  $\text{Ag-TiO}_2$  foram bactericidas e apresentaram atividade fotocatalítica ativa em todas as condições de iluminação investigados. Sob qualquer condição de iluminação os filmes de  $\text{TiO}_2$  com Ag incorporada apresentaram desempenho superior de atividade bactericida e

fotocatalítica quando comparados com filmes somente com nanopartículas de  $\text{TiO}_2$  [38]. Nesta pesquisa os grupos que possuíam apenas nanopartículas de  $\text{TiO}_2$  (grupos 1 e 6) não se comportaram como uma superfície descontaminada, mesmo porque não houve irradiação UV constante nesses grupos. Entretanto os grupos que receberam tratamento com nanopartículas de  $\text{TiO}_2$  e Ag (grupos 2 e 7) não permitiram o crescimento bacteriano. A limitação do fotocatalisador de  $\text{TiO}_2$  devido a necessidade de irradiação, levou a incorporação de Ag na matriz de  $\text{TiO}_2$  ocorrendo uma melhoria no desempenho funcional que pode ser explicada por uma carga modelo de separação e maior taxa de produção de pares foto-gerados [35,36]. À medida que o nível de  $\text{TiO}_2$  é maior do que o de Ag, os depósitos de Ag se comportam como sítios de acumulação para os elétrons foto-gerados derivado  $\text{TiO}_2$ , levando a uma melhor separação de elétrons-buracos, o que resulta em um maior número de portadores de carga e portanto, um aumento de espécies reativas [29].

A clorexidina é classificada terapeuticamente como uma substância antimicrobiana, antisséptico tópico e também na categoria de desinfetante. É uma base antisséptica forte e estável na forma de sal (gluconato, acetato ou hipocloreto). Em odontologia ela é amplamente utilizada no controle de placa bacteriana no tratamento das infecções periodontais e como medicação intracanal [39]. Ela é efetiva contra um grande número de microrganismos gram-positivos, gram-negativos, leveduras, anaeróbios facultativos, e aeróbios [39,40]. Este estudo apenas corroborou com os demais quando comparamos a eficácia desinfetante e bactericida da clorexidina. Apenas com a imersão dos pinos intra-

radiculares em clorexidina aquosa a 2% por 5 minutos, os mesmos apresentaram totalmente descontaminados. Os grupos tratados apenas com clorexidina (grupos 4 e 9) permaneceram com o meio nutriente límpido, sem sinal de turvidez após 24 e 48 horas, comprovando o não crescimento bacteriano e conseqüentemente a eficácia desse antimicrobiano. Os grupos controles mostraram que os pinos intraradiculares metálicos provindos do laboratório de prótese e os pré-fabricados estão contaminados com microorganismos, pois em nosso ensaio os dois grupos após 24 horas apresentaram o meio turvo, mostrando a presença de crescimento bacteriano.

Pelo fato dos pinos intra-radiculares ficarem no interior do canal radicular, é prudente que um protocolo de biossegurança seja realizado, para que esse material seja efetivo em suas funções e ao mesmo tempo não recontamine o canal radicular ou estimule o crescimento bacteriano. Apesar do grande número de trabalhos com nanotecnologia e nanopartículas ainda existe uma carência dessa tecnologia aplicada a materiais e instrumentos odontológicos, o que é um campo promissor para obtermos superfícies autolimpantes e bactericidas diminuindo os insucessos clínicos. Apesar das limitações desse estudo a nanotecnologia mostrou-se eficiente, principalmente o uso de nanopartículas de Ag, pois as superfícies com essa nanoestrutura se mostraram descontaminadas, entretanto mais estudos devem ser direcionados para a utilização dessa promissora tecnologia em odontologia.

## REFERÊNCIAS

- [1] M.M. Morgano, Restoration of pulpless teeth: application of traditional principles in present and future contexts, *J. Prosthet. Dent.*, 75 (1996) 375-380.
- [2] A.S. Fernandes, S. Shetty, I. Coutinho, Factor determining post select: a literature review, *J. Prosthet. Dent.*, 90 (2003) 556-562.
- [3] E. Asmussen, A. Peutzfeldt, T. Heitmann, Stiffness, elastic limit, and strength of newer types of endodontic posts, *J. Dent.*, 27 (1999) 275-278.
- [4] A. Usumez, F.K. Cobankara, N. Ozturk, G. Eskitascioglu, S. Belli, Microleakage of endodontically treated teeth with different dowel systems, *J. Prosthet. Dent.*, 92 (2004) 163-169.
- [5] V.R.G. Clavijo, M.C. Bandéca, L.R. Calixto, M.R. Nadalin, E.G. Saade, O.B. Oliveira-Junior, M.F. Andrade, Factors affecting on bond strength of glass fiber post cemented with different resin cements to root canal, *Laser Physics*. 19 (2009) 1920-24.
- [6] V.R.G. Clavijo, J.M.S.N. Reis, W. Kabbach, A.L.F. Silva, O.B. Oliveira Junior, M.F. Andrade, Fracture strength of flared bovine roots restored with different intraradicular posts, *J. Appl. Oral Sci.* 17 (2009) 574-578.
- [7] A. Molander, C. Reit, G. Dahlen, A. Kvist, Microbiological status of root-filled teeth with apical periodontitis, *Int. Endod. J.* (1998) 1-7.
- [8] G. Sundqvist, D. Fidgor, S. Persson, U. Sjogren, Microbiologic analysis of teeth with failed endodontic treatment and the outcome of conservative re-treatment, *Oral Surg. Oral Med. Oral pathol.*, 85 (1998) 86-93.

- [9] A. Kishen, S. George, R. Kumar, Enterococcus faecalis-mediated biomineralized biofilm formation on root canal dentine in vitro, *J. Biomedical Materl. Research.* 77 (2006) 406-415.
- [10] Nanox Tecnologia S/A em [http://www.nanoxclean.com.br/br\\_tecnologia.html](http://www.nanoxclean.com.br/br_tecnologia.html)
- [11] H.J. Klasen. Historical review of the use of silver in the treatment of burns. Early uses. *Burns*, 26 (2000); 117–130.
- [12] A.B.G. Landsdown. *J. Wound Care.* 11 (2002) 125–138.
- [13] N. Durán, P.D. Marcato, R. De Conti, O.L. Alves, F.T.M. Costa, M. Brocchi, Potential use of silver nanoparticles on pathogenic bacteria, their toxicity and possible mechanisms of action, *J. Braz. Chem. Soc* 21 (2010) 949-959.
- [14] K. M. Reddy, A.R. Manorama, A. R. Reddy, Bandgap studies on anatase titanium dioxide nanoparticlez. *Mat. Chem. Phys.* 78 (2002) 239-245.
- [15] C. Estrela, *Metodologia Científica.* 1<sup>a</sup> ed. Artes médicas, São Paulo, Brasil (2001).
- [16] M.C. Roco, The long view of nanotechnology development: the National Nanotechnology Initiative at 10 years *J. Nanoparticle Res.* 13 (2011) 427-445.
- [17] M. M. Cowan, K. Z. Abshire, S.L. Houk, S.M. Evans, Antibacterial efficacy of a silver zeolite-matrix coating on stainless steel, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 30 (2003) 102-6.
- [18] P.S. Retchkiman-Schabes, G. Canizal G, R. Becerra-Herrera, C. Zorrilla, H.B. Liu, J. A. Ascencio, Biosynthesis and characterization of Ti/Ni bimetallic nanoparticles *Opt. Mater.* 29 (2006) 95–99.

- [19] H. Gu, P.L. Ho, E. Tong, L.Wang, B. Xu, Presenting vancomycin on nanoparticles to enhance antimicrobial activities, *Nano Lett.* 3 (2003) 1261–1263.
- [20] P. Gong, H. Li, X. He, K. Wang, J. Hu, W. Tan et al, Preparation and antibacterial activity of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@Ag nanoparticles, *Nanotechnol*, 18 (2007) art. no. 285604.
- [21] Q. Li, S. Mahendra, D.Y. Lyon, L. Brunet, M.V. Liga, D. Li, P.J.J. Alvarez, Antimicrobial nanomaterials for water disinfection and microbial control: potencial applications and implications, *Water Research*, 42 (2008) 4591-4602.
- [22] J.J. Castellano, S.M. Shafii, F. Ko, G. Donate, T.E. Wright, R.J. Mannari, Comparative evaluation of silver-containing antimicrobial dressings and drugs, *Int. Wound. J.*, 4 (2007) 114–122.
- [23] K. Yoshida, M. Tanagawa, M. Atsuda, Characterization and inhibitory effect of antibacterial dental resin composites incorporating silver-supported materials, *J. Biomed. Mater. Res.*, 47 (1999) 516-522.
- [24] L. Zhao, H. Wangb, K. Huob, L. Cuia, W. Zhang, H. Nib, Y. Zhang, Z. Wu, P.K. Chu, Antibacterial nano-structured titania coating incorporated with silver nanoparticles. *Biomaterials*, 32 (2011) 5706-5716.
- [25] P.V. AshaRani<sup>1</sup>, H.M. Prakash, S. Valiyaveetil, Anti-proliferative activity of silver nanoparticles, *BMC Cell Biology*, 10 (2009) 65.
- [26] T. Ashikaga, M. Wada, H. Kobayashi, M. Mori, Y. Katsumura, H. Fukui, S. Kato, Yamaguchi, T. Takamatsua, Effect of the photocatalytic activity of TiO<sub>2</sub> on plasmid DNA, *Mutat. Res.*, 466 (2000) 1-7.

- [27] C. Hu; J. Guo; J. Qu; X. Hu, Photocatalytic degradation of pathogenic bacteria with AgI/TiO<sub>2</sub> under visible light irradiation, *Langmuir*. 23 (2007) 4982-4987.
- [28] S. Noimark, C.W. Dunnill, M.Wilson, I.P. Parkin, The role of surfaces in catheter-associated infections, *Chem. Soc. Rev.* 38 (2009) 3435–3448.
- [29] K. Page, M. Wilson, I.P. Parkin, Antimicrobial surfaces and their potential in reducing the role of the inanimate environment in the incidence of hospital-acquired infections, *J. Mater. Chem.* 19 (2009) 3819–3831.
- [30] A. Mills, S. Le Hunte, An overview of semiconductor photocatalysis. *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.* 108 (1997) 1–35.
- [31] A. Kafizas, S. Kellici, J.A. Darr, I.P. Parkin, Titanium dioxide and composite metal/metal oxide titania thin films on glass: a comparative study of photocatalytic activity. *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.* 204 (2009) 183–190.
- [32] M.R. Hoffmann, S.T. Martin, W. Choi, D.W. Bahnemann. Environmental applications of semiconductor photocatalysis. *Chem. Rev.* 95 (1995) 69–96.
- [33] A. Kudo, Y. Miseki. Heterogeneous photocatalyst materials for water splitting, *Chem. Soc. Rev.*, 38 (2009) 253–278.
- [34] D. Leung, X. Fu, C. Wang, M. Ni, M. Leung, X. Wang, Hydrogen production over titania-based photocatalysts. *Chem. Sus. Chem.*, 3 (2010) 681–694.
- [35] J.M. Herrmann, H. Tahiri, Y. Ait-Ichou, G. Lassaletta, A.R. Gonzalez-Elipe, A. Fernandez, Characterization and photocatalytic activity in aqueous medium of TiO<sub>2</sub> and Ag-TiO<sub>2</sub> coatings on quartz. *Appl. Catal. B-Environ*, 13 (1997) 219–228.

- [36] S. X. Liu, Z.P. Qu, X.W. Han, C.L. Sun. A mechanism for enhanced photocatalytic activity of silver-loaded titanium dioxide. *Catal Today*, 93 (2004) 877–884.
- [37] C.W. Dunnill, K. Pagea, Z.A. Aikenb, S. Noimarka, G. Hyetta, A. Kafizasa, J. Prattenb, M. Wilson, I.P. Parkin, Nanoparticulate silver coated-titania thin films photo-oxidative destruction of stearic acid under different light sources and antimicrobial effects under hospital lighting conditions, *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.*, 220 (2011)113–123.
- [38] B.A. Akgun, A.W. Wren, C. Durucan, M.R. Towler, N.R. Mellott, Sol–gel derived silver-incorporated titania thin films on glass:bactericidal and photocatalytic activity, *J. Sol-Gel Sci. Technol.* (2011) DOI 10.1007/s10971-011-2488-6.
- [39] B.P. Gomes, E.T. Pinheiro, E.L. Souza, R.C. Jacinto, A.A. Zaia, C.C. Ferraz, F.J. Souza Filho, *Enterococcus faecalis* in dental root canals detected by culture and by polymerase chain reaction analysis, *Oral Surg. Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.* 102 (2006) 247-53.
- [40] C.C.R. Ferraz, B.P.F.A. Gomes, A.A. Zaia, F.B. Teixeira, F.J. Souza-Filho. In vitro assessment of the antimicrobial action and mechanical ability of chlorhexidine gel as an endodontic irrigant. *J Endod.*, 7 (2001) 452-455.

## 4 CAPÍTULO 2

**“Avaliação in vitro da ação antimicrobiana em *E. Feccalis* dos pinos intraradiculares recobertos com nanopartículas TiO<sub>2</sub> e Ag e desinfetados em solução de clorexidina 2%”**

**"In vitro evaluation of antimicrobial activity in *E. Feccalis* of endodontic post recoated with TiO<sub>2</sub> nanoparticles and Ag and disinfected in a solution of 2% chlorhexidine”**

Autores: E. G. Saade<sup>a</sup>, M. C. Bandeca<sup>a</sup>, J. L. Saade<sup>b</sup>, D.M.P. Spolidoro<sup>a</sup>, S. T. Porto Neto<sup>a</sup>, M. F. Andrade<sup>a</sup>

<sup>a</sup> University of São Paulo State, Araraquara School of Dentistry, Department of Restorative Dentistry, Humaitá St., 1680, Araraquara, SP, 14801- 903 Brazil

<sup>b</sup> School of São Leopoldo Mandic, José Rocha Junqueira St., 13, Campinas, 13045-755, Brazil

\* Corresponding author: E. G. Saade, Department of restorative Dentistry, Araraquara School of Dentistry.

Artigo será enviado para: Journal of Endodontics

## Resumo

A proposta deste estudo foi avaliar *in vitro* a atividade antimicrobiana dos pinos intra-radiculares recobertos com nanopartículas dióxido de titânio (TiO<sub>2</sub>) e prata (Ag) no meio BHI (*Brain Heart Infusion*) ágar. A bactéria selecionada foi a *Enterococcus Faecalis* (cepa ATCC 10541) utilizada a 0,65x10<sup>6</sup>. Foram utilizados 30 pinos intra-radiculares metálicos fundidos e 30 pré-fabricados de fibra de vidro. As amostras (n=6) foram separadas em grupos de 1 a 10. Três grupos foram recobertos pelo processo de *dip coating* e tratados termicamente com nanopartículas TiO<sub>2</sub>, outro grupo com composto de TiO<sub>2</sub> e Ag e um grupo somente Ag. Os pinos recobertos apenas com nanopartículas de TiO<sub>2</sub> foram submetidos a fotocatalise heterogênea com o auxílio de uma luz ultravioleta. Um grupo de pinos intra-radiculares sem nenhum tratamento de nanopartículas foi imerso em solução de clorexidina 2% por 5 minutos. No grupo controle os pinos intra-radiculares sem nenhum tratamento foram diretamente testados. Para o ensaio foi utilizado o meio nutriente BHI Agar estéril vertido em placas de Petri e posteriormente contaminado com 100µl *Enterococcus Faecalis*. Após a secagem os pinos intraradiculares foram inseridos delicadamente no centro da placa. As amostras foram colocadas em estufa a 37°C, e as leituras foram realizadas após 24hs e 48hs, observando a presença ou ausência de halo antimicrobiano. A comprovação da ação antimicrobiana das nanopartículas que recobriram os pinos intra-radiculares foi através da avaliação visual da formação do halo de inibição. O período de incubação e o tipo de material do pino intra-radicular não influenciaram no resultado final dos grupos. Nos grupos que receberam apenas as nanopartículas de TiO<sub>2</sub> e posterior ativação por luz UVA (1 e 6) não houve presença do halo antimicrobiano. Foi comprovada a difusão antimicrobiana das nanopartículas nos grupos que receberam tratamento com nanopartículas de TiO<sub>2</sub> associado a Ag ( grupos 2 e 7) , e nos grupos com apenas nanopartículas de Ag (3 e 8), pois ocorreu a presença de halo antimicrobiano. Os grupos apenas com clorexidina (4 e 9) apresentaram halo mostrando sua eficiente ação antimicrobiana. Os grupos controle (5 e 10) não apresentaram ação antimicrobiana. A nanotecnologia e a busca por materiais com atividade antimicrobiana tem sido alvo de pesquisadores, mostra uma promissora tecnologia, entretanto mais estudos devem ser realizados na área odontológica.

**PALAVRAS CHAVES:** Nanopartículas de dióxido de titânio e prata; pinos intra-radiculares; antimicrobianos.

## Introdução

A desinfecção total do canal radicular é uma busca constante que visa eliminar todos os microrganismos localizados no sistema de canais radiculares. Nos casos de insucessos no tratamento endodôntico a bactéria mais predominante é a *Enterococcus faecalis*, o qual tem demonstrado a capacidade de sobreviver no interior dos canais radiculares, mesmo após a utilização de medicações intracanaís com comprovada ação antimicrobiana<sup>1,2,3</sup>. A *Enterococcus faecalis* são cocos gram-positivos entéricos facultativos comumente associada à infecções periapicais persistentes<sup>4,5,6,7,8,9</sup> e patogenicidade bem documentada na literatura<sup>10</sup>. Diferente de todas as espécies bacterianas, estudos in vitro, demonstraram a capacidade dessa bactéria em penetrar nos túbulos dentinários<sup>8,11</sup>.

Na avaliação dos fatores que determinam o sucesso endodôntico e restaurador de um elemento dental, deve-se levar em consideração que além da escolha do melhor material para substituir a estrutura perdida, o cuidado para que esse material seja descontaminado antes de ser inserido no interior dos canais é primordial. Após tratamento endodôntico um elemento dental com pouco remanescente é indicado a colocação de um pino intra-radicular. Por muitas décadas o pino intra-radicular mais utilizado foi o núcleo metálico fundido, porém atualmente os pinos intra-radulares de fibra de vidro são muito indicados, principalmente pela sua estética e resiliência<sup>12</sup>.

A nanotecnologia entende-se a ciência de materiais para o domínio de partículas e interfaces com dimensões extremamente pequenas, da ordem de um a cem nanômetros (nm). Partículas deste tamanho, ou “nano-partículas”, apresentam

uma grande área superficial e, freqüentemente exibem propriedades mecânicas, ópticas, magnéticas ou químicas distintas de partículas e superfícies macroscópicas. A manipulação de átomos em uma escala um bilhão de vezes menor que o metro ou um milhão de vezes menor que o milímetro representa um espaço suficiente para, no máximo, dez átomos<sup>13</sup>. Diferentes tipos de nanomateriais como cobre, zinco, titânio<sup>14</sup>, magnésio, ouro e prata têm surgido, entretanto nanopartículas de prata provaram ser mais eficazes, uma vez que têm uma boa atividade antimicrobiana contra bactérias, vírus e outros microrganismos<sup>15</sup>. Esses materiais usados em escala nanométrica reagem com as células bacterianas através de mecanismos que inibem a atividade enzimática envolvida na síntese de DNA<sup>16</sup>.

O uso de nanopartículas para o desenvolvimento de uma estrutura com proteção antimicrobiana de ação natural e específica contra germes, bactérias e outros microrganismos é amplamente estudado e apresentado resultados satisfatórios. Essa nanotecnologia aplicada a materiais e instrumentos odontológicos pode resultar em superfícies com ação antimicrobiana favorecendo o combate as infecções e contaminações. O objetivo desse estudo foi avaliar a atividade inibitória das nanopartículas TiO<sub>2</sub> e Ag de pinos intra-radiculares metálicos fundidos e de fibra de vidro sobre *Enterococcus faecalis* através do teste de difusão em agar.

### **Materiais e Métodos**

Foram utilizados 30 pinos metálicos fundidos de Níquel Cromo (NiCro) padronizados e confeccionados em laboratório especializado e 30 pinos pré-fabricados de fibra de vidro (White Post - FGM) composto de fibra de vidro e resina epóxi de alta resistência mecânica (figura 1). Todos os pinos intraradiculares metálicos fundidos foram confeccionados através de um modelo acrílico com conduto radicular preparado de pré-molar inferior. Os pinos intraradiculares foram divididos de acordo com o tipo de pino e tratamento realizado em cada grupo (n=6) apresentados na tabela 1.



Figura 1 – pinos de fibra e metálico

Tabela 1. Grupos experimentais investigados nesse estudo

Grupos (n=6)	Tipo de tratamento
1. Metálico	TiO <sub>2</sub>
2. Metálico	TiO <sub>2</sub> + 5% Ag
3. Metálico	Ag
4. Metálico	Clorexidina 2%
5. Metálico	Controle
6. Fibra de vidro	TiO <sub>2</sub>
7. Fibra de vidro	TiO <sub>2</sub> + 5% Ag
8. Fibra de vidro	Ag
9. Fibra de vidro	Clorexidina 2%
10. Fibra de vidro	Controle

Os pinos intra-radulares dos grupos 1, 2, 3, 6, 7 e 8 foram recobertos pelo processo de *dip coating*, e tratados termicamente com revestimento de nanopartículas. Os pinos foram recobertos por imersão (*dip coating*) em recipiente contendo um polímero precursor dos materiais de TiO<sub>2</sub> e Ag à temperatura ambiente. Após a deposição, as peças foram levadas a um forno para tratamento térmico entre 300° e 400°C, realizado de forma que íons de titânio se transformem em dióxido de titânio. Entre quatro e seis horas, formou-se um filme

nanoestruturado na superfície dos pinos intra-radulares incorporando uma película de recobrimento.

Nos grupos 1 e 6 os pinos recobertos com nanopartículas de  $\text{TiO}_2$  e submetidos a fotocatalise heterogênea foram inseridos com auxílio de uma pinça estéril em uma placa petri e posteriormente colocados dentro de uma caixa revestida por papel alumínio onde uma luz ultravioleta (lâmpada Starlux 15w-F) incidiu na distância de 10cm por 30 minutos para ativar a propriedade antimicrobiana (Figura 2). Os pinos foram removidos da placa e levados imediatamente para o teste microbiológico.



Figura 2 - luz ultravioleta (lâmpada Starlux 15w-F)

Os pinos intra-radulares dos grupos 4 e 9 foram submersos na solução aquosa de digluconato de clorexidina 2%, colocada em uma placa petri estéril, e os pinos permaneceram imersos por 5 minutos, após a secagem com um jato de ar

foram inseridos nas placas contaminadas com *E. Faecalis*. Nos grupos controle 5 e 10 os pinos intra-radulares foram removidos do dispositivo do fabricante com uma pinça estéril e inseridos nas placas.

A atividade antibacteriana de cada material foi avaliada contra *E. faecalis* (ATCC 10541) usando o teste de difusão em Agar. A cepa indicadora cresceu em BHI caldo (Brain Heart Infusion – Acumedia 7115 A) por 24 h a 37°C e a concentração final de  $6.5 \times 10^6$  UFC/mL foi obtida pela densidade óptica (DO). Posteriormente em cada placa de Petri (20x100 mm), uma camada base contendo 15 mL de BHI agar foi preparada. Após solidificação do meio de cultura 100 µl de *E. faecalis* ( $6.5 \times 10^6$  UFC/mL) foi semeado em toda a superfície do meio de cultura. Sobre a superfície da placa semeada com *E. faecalis*, os pinos intra-radulares foram inseridos delicadamente com o auxílio de pinça estéril e posteriormente mantidos a 37°C. As leituras foram realizadas após 24h e 48h, observando a presença ou ausência de halo de inibição.

## **Resultados**

Os resultados foram avaliados através da presença ou ausência de halo de inibição, mostrando a ação antimicrobiana das nanopartículas. Através desse ensaio microbiológico a ação antimicrobiana das nanopartículas foi comprovada quando os pinos inibiam o crescimento bacteriano ao redor deles durante 24 e 48 hs de incubação a 37°C.

Tabela 2. Resultados dos grupos experimentais investigados nesse estudo

Grupos	Leituras 24 horas	Leituras 48 horas
1 (TiO <sub>2</sub> )	Ausência	Ausência
2 (TiO <sub>2</sub> + Ag)	Presença	Presença
3 (Ag)	Presença	Presença
4 (clorexidina)	Presença	Presença
5 (controle)	Ausência	Ausência
6 (TiO <sub>2</sub> )	Ausência	Ausência
7 (TiO <sub>2</sub> + Ag)	Presença	Presença
8 (Ag)	Presença	Presença
9 (clorexidina)	Presença	Presença
10 (controle)	Ausência	Ausência

O tempo de incubação em estufa não interferiu nos resultados dessa pesquisa, pois todos os grupos mantiveram o mesmo resultado independente da análise após 24 ou 48 horas. O material do pino intra-radicular não influenciou no resultado, tanto os pinos metálicos quanto os de fibra de vidro apresentaram resultados semelhantes entre os mesmos grupos. Os grupos que receberam apenas as nanopartículas de TiO<sub>2</sub> e posterior ativação por luz ultravioleta (1 e 6) não apresentaram ação antimicrobiana (figura 3). Foi comprovada a ação antimicrobiana nos grupos que receberam tratamento com nanopartículas de TiO<sub>2</sub> associado a Ag ( grupos 2 e 7) (figura 4), nos grupos que receberam apenas o

tratamento com nanopartículas de Ag (3 e 8) (figura 5), e nos grupos que receberam tratamento com clorexidina (4 e 9) (figura 6), onde houve formação de halo antimicrobiano, ocorrendo a inibição do crescimento bacteriano ao redor do pino. Os grupos controle (5 e 10) não apresentaram halo antimicrobiano (figura 8).

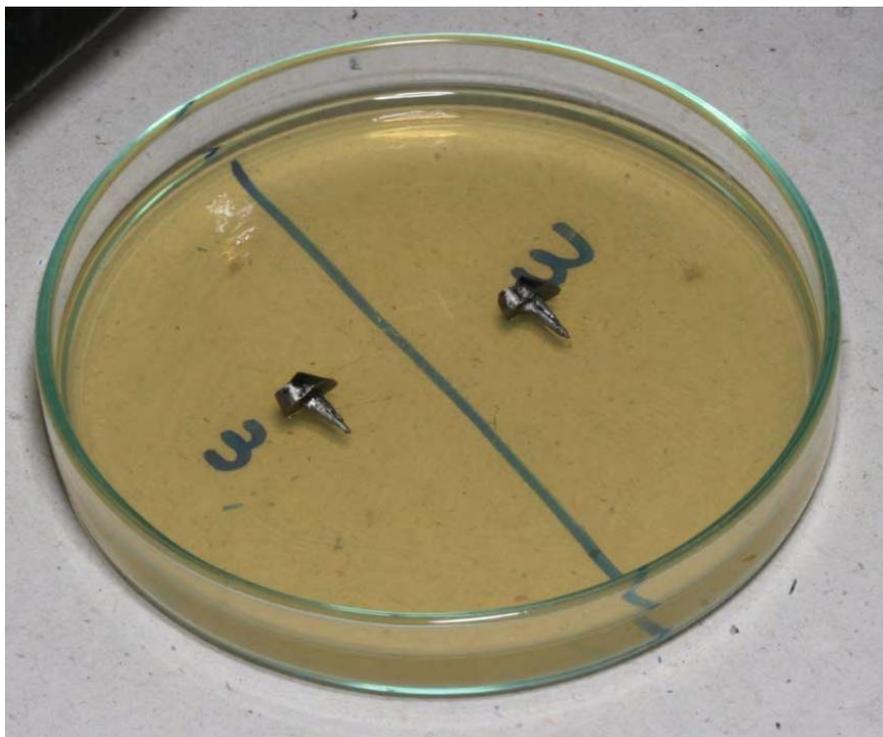


Figura 3 – Pinos com nanopartículas de TiO<sub>2</sub> – ausência de halo antimicrobiano

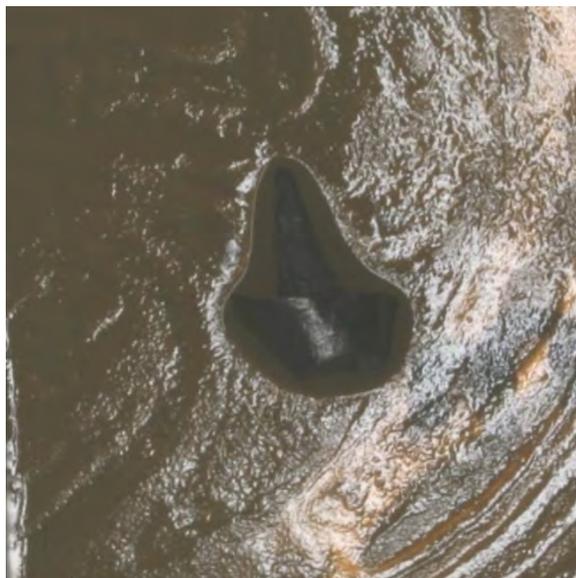


Figura 4 – Pinos com nanopartículas de  $\text{TiO}_2$  e Ag – presença de halo antimicrobiano



Figura 5 – Pinos com nanopartículas de Ag – presença de halo antimicrobiano



Figura 6 – Pinos imersos em clorexidina – presença de halo antimicrobiano



Figura 7 – Pinos sem tratamento – ausência de halo antimicrobiano

## Discussão

Nos casos de insucessos no tratamento endodôntico a bactéria mais predominante é a *Enterococcus faecalis*, a qual tem demonstrado a capacidade de sobreviver no interior dos canais radiculares, mesmo após a utilização de determinadas medicações intracanaís com comprovada ação antimicrobiana<sup>1, 2, 3</sup>. A *Enterococcus faecalis* é comumente associada à infecções persistentes periapicais associadas após tratamento endodôntico<sup>4</sup>. Diferentes exames bacteriológicos em culturas mostraram que *Enterococcus faecalis* está presente em 30-48% de dentes com infecção pós-tratamento<sup>17</sup>. Ela é isolada em dentes com tratamento endodôntico sem lesão apical em torno de 81,5% dos casos e em infecções pulpares e periapicais recorrentes. A seleção da *Enterococcus faecalis* para essa pesquisa baseou-se no fato desse microrganismo ser prevalente na cavidade oral e relacionado às infecções do sistema de canais radiculares, sendo amplamente estudada e bem documentada na literatura<sup>6, 9, 18</sup>. Os pinos intraradiculares estudados nesta pesquisa entram em contato direto com o sistema de canais radiculares do elemento dental devendo estar totalmente descontaminados para não recontaminar esse dente após o tratamento endodôntico. Os grupos controles mostraram que os pinos intraradiculares não possuem ação antimicrobiana, pois em nosso experimento não apresentaram halo antimicrobiano.

As aplicações da nanotecnologia nas áreas biomédicas é uma realidade, a obtenção de estruturas em nanoescala através da divisão de objetos micrométricos é importante e tem sido realizado em diferentes áreas. As propriedades de

nanomateriais e nanotecnologia para a sua implementação e difusão nas áreas de biomedicina, eletrônica e mecânica nos permitem vislumbrar uma realidade promissora em áreas interdisciplinares da química, física, biologia e medicina<sup>19</sup>. Nos últimos anos cresceu o interesse dos pesquisadores, empresas farmacêuticas, empresas produtoras de alimentos, embalagens e indústrias de revestimento em pó para investigar novos e seguros materiais com efeito antimicrobiano<sup>20</sup>. As nanopartículas de prata são eficazes, uma vez que têm uma boa atividade antimicrobiana contra bactérias, vírus e outros microrganismos<sup>15</sup>. Estas podem interagir diretamente com as células microbianas, interrompendo a transferência eletrônica transmembrana, rompendo a membrana ou a parede celular, ou do componente celular oxidante, ou podem produzir produtos secundários como espécies reativas de oxigênio (ROS), causando danos as células<sup>16</sup>. A propriedade antimicrobiana das nanopartículas de prata está relacionada à quantidade e a taxa de prata liberadas, uma vez que a prata se liga a proteínas dos tecidos traz mudanças estruturais na parede da célula bacteriana e membrana nuclear provocando distorção celular e morte. A prata também se liga ao DNA e RNA bacteriano por desnaturação e inibe a replicação bacteriana<sup>21</sup>. Como demonstrado nesta pesquisa os pinos intra-radulares que receberam o recobrimento com composto de TiO<sub>2</sub> e Ag (grupo 2 e grupo 7) e somente Ag (grupo 3 e grupo 8) apresentaram atividade antimicrobiana, pois ocorreu a formação do halo de inibição, comprovando a ação antimicrobiana da Ag.

As nanopartículas de Ag foram testadas em odontologia através da eficácia antibacteriana de dois tipos prata a Novaron (N) e a Amenitop (AM) incorporadas

em uma resina composta a base de TEGDMA-UDMA. Os dois materiais inibiram o crescimento do principal patógeno oral o *S. Mutans* e não houve nenhuma ou pequena liberação de íons de prata após um dia ou após seis meses. O compósito com a prata N não apresentou diferença significativa em sua resistência flexural ou a compressão. Estes resultados indicam que a prata Novaron pode ser incorporada na resina composta sendo útil clinicamente devido ao efeito de longa duração inibitória contra o *S. Mutans*, sem alterar as propriedades mecânicas do material<sup>22</sup>. Neste estudo os pinos que receberam o tratamento com nanopartículas de Ag (3 e 8) também apresentaram excelente atividade antimicrobiana.

As nanopartículas de  $\text{TiO}_2$  e  $\text{TiO}_2/\text{Ag}$  foram utilizadas para a fabricação de produtos têxteis. A atividade antimicrobiana das amostras tratadas e não tratadas com nanopartículas foi avaliada utilizando o teste de difusão em ágar. A avaliação foi baseada na ausência ou presença de crescimento de bactérias ao redor das amostras testadas. Os resultados do teste da capacidade anti-bacteriana mostraram que o tecido não tratado não possui atividade antibacteriana, mostrando a ausência de uma zona de inibição. Em comparação, os tecidos com  $\text{TiO}_2$  apresentam capacidade antibacteriana limitada, mostrando pequeno crescimento bacteriano nas amostras. No entanto, no caso dos tecidos com nanopartículas  $\text{TiO}_2$  e Ag, não houve crescimento bacteriano nas amostras, e ocorreu uma zona de inibição contra as bactérias testadas. Comparando-se as atividades anti-bacteriana das nanopartículas  $\text{TiO}_2$  e  $\text{TiO}_2/\text{Ag}$  pode-se concluir que o aumento da capacidade anti-bacteriana  $\text{TiO}_2/\text{Ag}$  está diretamente relacionada com a presença de nanopartículas Ag<sup>23</sup>. Este trabalho corrobora com

os nossos resultados, pois os pinos intra-radiculares tratados com nanopartículas de  $\text{TiO}_2/\text{Ag}$  apresentaram uma zona de inibição impedindo o crescimento bacteriano, entretanto as amostras tratadas apenas com  $\text{TiO}_2$  não apresentaram a zona de inibição.

A nanotecnologia foi testada em implantes dentários de titânio através do revestimento com titânio ( $\text{TiO}_2$ ) incorporados com prata (Ag). Os implantes de  $\text{TiO}_2$  com nanopartículas de Ag apresentaram capacidade de matar as bactérias planctônicas suspensas durante os primeiros dias e uma capacidade para impedir a adesão bacteriana foi mantida por 30 dias, o que normalmente é o suficiente para evitar a infecção pós-operatória nas fases iniciais, intermediárias e talvez tardia ao redor do implante. Esta estrutura de nanopartículas de Ag fornece relativamente em longo prazo a capacidade antibacteriana e boa integração dos tecidos tendo aplicações promissoras<sup>24</sup>. Em nosso estudo os pinos intra-radiculares que receberam o recobrimento com  $\text{TiO}_2$  e Ag (grupo 2 e grupo 7) e somente Ag (grupo 3 e grupo 8) comprovaram a ação antimicrobiana da Ag.

A fotocatalise heterogênea é um processo oxidativo que tem demonstrado uma promissora tecnologia para o processo de oxidação/degradação de contaminantes orgânicos. Muitos catalisadores têm sido testados, entre eles o dióxido de titânio ( $\text{TiO}_2$ ), que é encontrado em várias formas cristalinas<sup>25</sup>. A ação bactericida da fotocatalise heterogênea UV-A/ $\text{TiO}_2$  vem sendo testada em microrganismos com diferentes fotossensibilidades e alta eficiência foi encontrada particularmente no mais resistente, o *Enterobacter cloacal*<sup>26</sup>. A desinfecção por fotocatalise de bactérias patogênicas em água foi avaliada através da aplicação de

uma irradiação de luz visível sobre uma película de TiO<sub>2</sub>/Ag. A fotocatalise mostrou-se um método efetivo para eliminar bactérias como *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*<sup>27</sup>. Muita atenção tem sido dada a filmes fotocatalíticos pela sua capacidade de destruir bactérias resistentes tais como *Methicillin Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*<sup>27,28,29</sup>, que são os principais contribuintes para infecções hospitalares<sup>28,29</sup>. Os filmes finos de TiO<sub>2</sub> são quimicamente estáveis, possuem alto índice de refração, têm excelente transmissão na região infra-vermelha e visível<sup>30,31</sup>, possuem alta eficiência fotocatalítica, resistência à corrosão e custo relativamente baixo<sup>32</sup>. Nessa pesquisa os pinos intra-radulares cobertos apenas com nanopartículas TiO<sub>2</sub> (grupo 1 e grupo 6) e irradiado com luz ultravioleta durante 30 minutos não apresentaram um halo de inibição, comprovando o crescimento bacteriano no meio. Esses resultados nos mostram que as propriedades antimicrobianas das nanopartículas de TiO<sub>2</sub> são efetivas somente com a ativação constante da luz ultravioleta. A limitação do fotocatalisador de TiO<sub>2</sub> devido a necessidade de irradiação, levou a incorporação de Ag na matriz de TiO<sub>2</sub> ocorrendo uma melhoria no desempenho funcional que pode ser explicada por uma carga modelo de separação e maior taxa de produção de pares fotogerados<sup>33,34</sup>. Por esse motivo os grupos que receberam tratamento com nanopartículas de TiO<sub>2</sub> associado a Ag (grupos 2 e 7) apresentaram ação antimicrobiana.

Este estudo apenas mostrou a eficácia antimicrobiana da clorexidina. Os pinos intra-radulares tratados apenas com clorexidina aquosa 2% por 5 minutos (grupos 4 e 9) apresentaram um excelente halo de inibição, comprovando a sua

atividade antimicrobiana. A clorexidina é classificada terapeuticamente como uma substância antimicrobiana, antisséptico tópico e também na categoria de desinfetante. Em odontologia ela é amplamente utilizada no controle de placa bacteriana no tratamento das infecções periodontais e como medicação intracanal<sup>9</sup>. A clorexidina é considerada o agente padrão-ouro pela sua eficácia clínica no controle químico de placa bacteriana<sup>35,36</sup>. Ela é efetiva contra um grande número de microrganismos gram-positivos, gram-negativos, leveduras, anaeróbios facultativos, e aeróbios<sup>37</sup>, tem baixa toxicidade e forte afinidade para o tecido epitelial e membranas mucosas<sup>35</sup>, além da substantividade o que reduz os níveis de microrganismos na saliva em 90% para várias horas<sup>35,36,38</sup>.

Este estudo comprovou a eficiência antimicrobiana das nanopartículas de Ag e TiO<sub>2</sub>/Ag. Essa nanotecnologia aplicada a materiais e instrumentos odontológicos mostrou eficiente ação antimicrobiana, mostrando superfícies livres de bactérias. As nanopartículas TiO<sub>2</sub> não apresentaram ação fotocatalítica, comprovando assim a necessidade constante da ativação da luz ultravioleta para efetivar a ação antimicrobiana. É de interesse na área de saúde a fabricação de superfícies antimicrobianas evitando contaminações e infecções. O uso de nanopartículas para o desenvolvimento de estruturas antimicrobianas tem sido amplamente estudados e apresentados resultados satisfatórios em outras áreas. A nanotecnologia aplicada a materiais e instrumentais odontológicos pode resultar em produtos com ação antimicrobiana, entretanto mais estudos devem ser realizados para essa promissora inovação.

## REFERÊNCIAS

1. Molander A, Reit C, Dahlen G, Kvist A. Microbiological status of root-filled teeth with apical periodontitis. *Int Endod J.* 1998; 31:1-7.
2. Sundqvist G, Fidgor D, Persson S, Sjogren U. Microbiologic analysis of teeth with failed endodontic treatment and the outcome of conservative retreatment. *Oral Surg Oral Med and Oral Pathol.* 1998; 85:86-93.
3. Kishen A, George S, Kumar R. Enterococcus faecalis-mediated biomaterialized biofilm formation on root canal dentine in vitro. *J Biomedical Materl Research.* 2006; 77:406-415.
4. Liu H, Wei X, Ling J, Wang W, Huang X. Biofilm formation capability of *Enterococcus faecalis* cells in starvation phase and its susceptibility to sodium hypochlorite. *J Endod.* 2010; 36:630-635.
5. Sundqvist G. Associations between microbial species in dental root canal infections. *Oral Microbiol Immunol.* 1992; 7:257-262.
6. Sedgley CM, Molander A, Flannagan SE, Nagel AC, Appelbe OK, Clewell DB, Dahlén G. Virulence, phenotype and genotype characteristics of endodontic Enterococcus spp. *Oral Microbiol Immunol.* 2005; 20:10-19.
7. Stuart CH, Schwartz AS, Beeson TJ, Owatz CB. Enterococcus faecalis: its role in root canal treatment failure and current concepts in retreatment. *J Endod.* 2006; 32: 93-98.

8. Zoletti GO, Siqueira Jr JF, Santos KR. Identification of *Enterococcus faecalis* in root-filled teeth with or without periradicular lesions by culture-dependent and independent approaches. *J Endod.* 2006; 32: 722-726.
9. Gomes BP, Pinheiro ET, Souza EL, Jacinto RC, Zaia AA, Ferraz CC, Souza Filho FJ. *Enterococcus faecalis* in dental root canals detected by culture and by polymerase chain reaction analysis. *Oral Surg Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2006; 102: 247-253.
10. Estrela C, Sydney GB, Figueiredo JAP, Estrela CRA. A model system to study antimicrobial strategies in endodontic biofilm. *J Appl Oral Sci.* 2009; 17: 87-91.
11. Rocas IN, Siqueira JF Jr, Santos KR. Association of *Enterococcus faecalis* with different forms of periradicular diseases. *J Endod.* 2004; 30:315-320.
12. Usumez A, Cobankara FK, Ozturk N, Eskitascioglu G, Belli S. Microleakage of endodontically treated teeth with different dowel systems. *J Prosthet Dent.* 2004; 92: 163-169.
13. Nanox Tecnologia S/A-[http://www.nanoxclean.com.br/br\\_tecnologia.html](http://www.nanoxclean.com.br/br_tecnologia.html)
14. Gu H, Ho PL, Tong E, Wang L, Xu B. Presenting vancomycin on nanoparticles to enhance antimicrobial activities. *Nano Lett.* 2003; 3:1261–1263.
15. Gong P, Li H, He X, Wang K, Hu J, Tan W et al. Preparation and antibacterial activity of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@Ag nanoparticles. *Nanotechnology.* 2007; 18(28): art. no. 285604.

16. Li Q, Mahendra S, Lyon DY, Brunet L, Liga MV, Li D, Alvarez PJJ. Antimicrobial nanomaterials for water disinfection and microbial control: Potencial applications and implications. *Water Research*. 2008; 42:4591-4602.
17. Sedgley CM, Lennan SL, Clewell DB. Prevalence, phenotype and genotype of oral Enterococci. *Oral Microbiol Immunol*. 2004; 19:95–101.
18. Estrela C, Estrela CRA., Pécora, JD. A study of the time necessary for calcium hydroxide to eliminate microorganisms in infected canals. *J Appl Oral Sci*. 2003; 11:133-137.
19. Castagnino JM. Técnicas, materiales y aplicaciones en nanotecnología. *Acta Bioquím Clín Latinoam* 2007; 41:189-191
20. Cowan MM, Abshire KZ, Houk SL, Evans SM. Antibacterial efficacy of a silver zeolite-matrix coating on stainless steel. *J Ind Microbiol Biotechnol*. 2003; 30:102-106.
21. Castellano JJ, Shafii SM., Ko F, Donate G, Wright TE, Mannari RJ. Comparative evaluation of silver-containing antimicrobial dressings and drugs. *Int. Wound. J*. 2007; 4:114–122.
22. Yoshida K, Tanagawa M, Atsuda M. Characterization and inhibitory effect of antibacterial dental resin composites incorporating silver-supported materials. *J Biomed Mater Res*. 1999; 47:516-522.
23. Li G, Liu H, Zhai H, Gao Y, Wang J, Jiang H, Boughton RI. Chemical assembly of TiO<sub>2</sub> and TiO<sub>2</sub> e Ag nanoparticles on silk fiber to produce multifunctional fabrics. *J Colloid Inter Scien*. 2011; 358:307–315.

24. Zhao L, Wangb H, Huob K, Cuia L, Zhang W, Nib H, Zhang Y, Wu Z, Chu P K, Antibacterial nano-structured titania coating incorporated with silver nanoparticles. *Biomaterials*. 2011; 32:5706-5716.
25. Reddy KM, Manorama AR, Reddy AR Bandgap studies on anatase titanium dioxide nanoparticlez. *Mat Chem Phys*. 2002; 78:239-245.
26. Ashikaga T et al. Effect of the photocatalytic activity of TiO<sub>2</sub> on plasmid DNA. *Mutat Res*. 2000; 466:1-7
27. Hu C; Guo J; Qu J; Hu X. Photocatalytic degradation of pathogenic bacteria with AgI/TiO<sub>2</sub> under visible light irradiation. *Langmuir*.2007; 23:4982-4987.
28. Noimark S, Dunnill CW, Wilson M, Parkin IP. The role of surfaces in catheter-associated infections. *Chem. Soc. Rev*. 2009; 38:3435–3448.
29. Page K, Wilson M, Parkin IP. Antimicrobial surfaces and their potential in reducing the role of the inanimate environment in the incidence of hospital-acquired infections. *J. Mater. Chem*. 2009; 19: 3819–3831.
30. Mills A, Le Hunte S. An overview of semiconductor photocatalysis. *J. Photochem. Photobiol. A: Chem*. 1997; 108:1–35.
31. Kafizas A, Kellici S, Darr JA, Parkin IP. Titanium dioxide and composite metal/metal oxide titania thin films on glass: a comparative study of photocatalytic activity. *J. Photochem. Photobiol. A: Chem*.2009; 204:183–190.
32. Hoffmann MR, Martin ST, Choi W, Bahnemann DW. Environmental applications of semiconductor photocatalysis. *Chem Rev*.1995; 95:69–96.

33. Hermann JM, Tahiri H, Ait-Ichou Y, Lassaletta G, Gonzalez-Elipe AR, Fernandez A. Characterization and photocatalytic activity in aqueous medium of TiO<sub>2</sub> and Ag-TiO<sub>2</sub> coatings on quartz. *Appl Catal B-Environ.* 1997; 13:219–228.
34. Liu SX, Qu ZP, Han XW, Sun CL. A mechanism for enhanced photocatalytic activity of silver-loaded titanium dioxide. *Catal Today.* 2004; 9:877–884.
35. Jones CG. Chlorhexidine: Is it still the gold standard? *Periodontol* 2000. 1997; 15:55-62.
36. Addy M, Sharif N, Moran J. A non-staining chlorhexidine mouthwash? Probably not: A study in vitro. *Int J Dent Hyg.* 2005; 3:59-63.
37. Ferraz CCR, Gomes BPFA, Zaia AA, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. In vitro assessment of the antimicrobial action and mechanical ability of chlorhexidine gel as an endodontic irrigant. *J Endod.* 2001; 7:452-455.
38. Arweiler NB, Boehnke N, Sculean A, Hellwig E, Auschill TM. Differences in efficacy of two commercial 0.2% chlorhexidine mouthrinse solutions: A 4-day plaque re-growth study. *J Clin Periodontol* 2006; 33:334-339.

## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os pinos intra-radulares são muito utilizados na clínica diária, pois eles são responsáveis pela retenção e estabilidade adequada das restaurações em dentes com grandes destruições e com tratamentos endodôntico.

Após o tratamento endodôntico realizado com todos os padrões de desinfecção do canal radicular é imprescindível que o tratamento restaurador siga todos os cuidados para não ocorrer a recontaminação do sistema de canais. Os pinos intra-radulares permanecem em íntimo contato com o sistema de canais, sendo assim é necessário a desinfecção dos mesmos antes da cimentação no elemento dental.

É de interesse na área de saúde a fabricação de superfícies antimicrobianas evitando contaminações e infecções cruzadas. Muitos estudos são direcionados para a desinfecção de materiais odontológicos, e o desenvolvimento de “produtos inteligentes”, ou seja, com ação autolimpante seria a resolução de muitos insucessos clínicos.

Atualmente a nanotecnologia é utilizada em diversas áreas e nos últimos anos vem sendo testada nas áreas biomédicas. O uso de nanopartículas para o desenvolvimento de estruturas antimicrobianas é muito estudado e tem mostrado resultados satisfatórios em outras áreas.

As nanopartículas de prata têm chamado a atenção por sua atividade antimicrobiana oferecer a possibilidade de uso com propósitos médicos e de higiene. Estas nanopartículas de prata em diferentes formulações, com diferentes formas e tamanhos, exibem atividades antimicrobianas.

O dióxido de titânio tem sido amplamente utilizado como fotocatalizador devido à sua alta eficiência fotocatalítica, resistência à corrosão e custo relativamente baixo. A fotocatalise heterogênea só ocorre quando a superfície que recebeu o recobrimento com nanopartículas de  $\text{TiO}_2$  permanece ativada constantemente com a luz ultravioleta, o que é uma limitação do uso do catalisador  $\text{TiO}_2$ . As pesquisas nessa área estão sendo direcionadas para mudar a banda de absorção no visível, para ampliar a sua utilização.

Neste estudo os pinos intra-radulares que receberam o recobrimento com nanopartículas de Ag e a associação de  $\text{TiO}_2$  com 5% Ag comportaram-se como superfícies descontaminadas e eficiência atividade antimicrobiana. Comprovando assim a atividade antimicrobiana da Ag.

Os pinos intra-radulares com recobrimento apenas de nanopartículas de  $\text{TiO}_2$  não desempenharam atividade antimicrobiana, pois essa nanopartícula tem a necessidade constante da ativação da luz ultravioleta para efetivar a ação fotocatalítica e se comportar como uma superfície descontaminada.

Apesar do grande número de trabalhos com nanopartículas e nanotecnologia ainda existe uma carência dessa tecnologia aplicada a materiais e instrumentos odontológicos, o que é um campo promissor para obtermos superfícies autolimpantes e bactericidas. Essa nanotecnologia aplicada a materiais e instrumentos odontológicos pode resultar em produtos com ação antimicrobiana que podem ajudar os profissionais a combater as infecções e contaminações, sendo uma promissora inovação.

## 6 Referências\*

1. Addy M, Sharif N, Moran J. A non-staining chlorhexidine mouthwash? Probably not: a study in vitro. *Int J Dent Hyg.* 2005; 3: 59-63.
2. Akgun BA, Wren AW, Durucan C, Towler MR, Mellott NR. Sol-gel derived silver-incorporated titania thin films on glass:bactericidal and photocatalytic activity. *J Sol-Gel Sci Technol.* 2011; DOI 10.1007/s10971-011-2488-6.
3. Asha Rani PV, Prakash HM, Valiyaveetil S. Anti-proliferative activity of silver nanoparticles [art 1471]. *BMC Cell Biology.* 2009; 10: 65.
4. Ashikaga T, Wada M, Kobayashi H, Mori M, Katsumura Y, Fukui H, et al. Effect of the photocatalytic activity of TiO<sub>2</sub> on plasmid DNA. *Mutat Res.* 2000; 466: 1-7.
5. Asmussen E, Peutzfeldt A, Heitmann T. Stiffness, elastic limit, and strength of newer types of endodontic posts. *J Dent.* 1999; 27: 275-8.
6. Castagnino JM. Técnicas, materiales y aplicaciones en nanotecnología. *Acta Bioquím Clín Latinoam.* 2007; 41: 189-91.
7. Castellano JJ, Shafii SM., Ko F, Donate G, Wright TE, Mannari RJ. Comparative evaluation of silver-containing antimicrobial dressings and drugs. *Int Wound J.* 2007; 4: 114–22.
8. Chopra I. The increasing use of silver-based products as antimicrobial agents: a useful development or a cause for concern? *J Antimicrob Chemother.* 2007; 59: 587–90.

\*De acordo com o estilo Vancouver. Disponível no site: <http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform.requirements.html>.

9. Cowan MM, Abshire KZ, Houk SL, Evans SM. Antibacterial efficacy of a silver zeolite-matrix coating on stainless steel. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 2003; 30: 102-6.
10. Delgado RJR, GasparotoTH, Sipert CR, Pinheiro CR, Moraes IG, Garcia RB, et al. Antimicrobial effects of calcium hydroxide and chlorhexidine em *Enterococcus faecals*. *J Endod.* 2010; 36: 1389-93.
11. Demling RH, DeSanti L. The role of silver in wound healing. Part 1: effects of silver on wound management. *Wounds.* 2001; 13: 8-15.
12. Dunnill CW, Pagea K, Aikenb ZA, Noimarka S, Hyetta G, Kafizasa A, et al. Nanoparticulate silver coated-titania thin films photo-oxidative destruction of stearic acid under different light sources and antimicrobial effects under hospital lighting conditions. *J Photochem Photobiol A: Chem.* 2011; 220: 113–23.
13. Durán N, Marcato PD, De Conti R, Alves OL, Costa FTM, Brocchi M. Potential use of silver nanoparticles on pathogenic bacteria, their toxicity and possible mechanisms of action. *J Braz Chem Soc.* 2010; 21: 949-59.
14. Estrela C. Metodologia científica. São Paulo: Artes Médicas; 2001.
15. Estrela C, Estrela CRA, Pécora, JD. A study of the time necessary for calcium hydroxide to eliminate microorganisms in infected canals. *J Appl Oral Sci.* 2003; 11: 133-7.
16. Estrela C, Sydney GB, Figueiredo JAP, Estrela CRA. A model system to study antimicrobial strategies in endodontic biofilm. *J Appl Oral Sci.* 2009; 17: 87-91.

17. Fernandes AS, Shetty S, Coutinho I. Factor determining post select: a literature review. *J Prosthet Dent.* 2003; 90: 556-62.
18. Ferraz CCR, Gomes BPFA, Zaia AA, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. In vitro assessment of the antimicrobial action and mechanical ability of chlorhexidine gel as an endodontic irrigant. *J Endod.* 2001; 7: 452-5.
19. Fidel SR, Marques JLL, Antoniazzi JH. Avaliação da capacidade de penetração dentinária radicular da clorexidina associada a três diferentes veículos. *Rev Pos Grad.* 1995; 2: 121-6.
20. Gemmell CG, Edwards DI, Frainse AP. Guidelines for the prophylaxis and treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) infections in the UK. *J Antimicrob Chemother.* 2006; 57: 589–608.
21. Gervásio AMC, Renner SH, Almeida JV, Mondelli RFL, Valera RC. Análise crítica dos pinos intra-radulares de cerâmica, fibra de carbono e fibra de vidro. *Ibero-Am Odontol Estética Dentística.* 2005; 4: 37-46.
22. Gogoi SK, Gopinath P, Paul A, Ramesh A, Ghosh SS, Chattopadhyay, A. Green fluorescent protein-expressing *Escherichia coli* as a model system for investigating the antimicrobial activities of silver nanoparticles. *Langmuir.* 2006; 22: 9322–8.
23. Gomes BP, Pinheiro ET, Souza EL, Jacinto RC, Zaia AA, Ferraz CC, et al. *Enterococcus faecalis* in dental root canals detected by culture and by polymerase chain reaction analysis. *Oral Surg Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2006; 102: 247-53.

24. Gomes BPFA, Sato CC, Ferraz CCR, Teixeira FB, Zaia AA, Souza-Filho FJ. Evaluation of time required for recontamination of coronally sealed canals medicated with calcium hydroxide and chlorhexidine. *Int Endod J.* 2003; 36: 604-9.
25. Gong P, Li H, He X, Wang K, Hu J, Tan W, et al. Preparation and antibacterial activity of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@Ag nanoparticles. *Nanotechnology.* 2007; 18: 285604.
26. Gu H, Ho PL, Tong E, Wang L, Xu B. Presenting vancomycin on nanoparticles to enhance antimicrobial activities. *Nano Lett.* 2003; 3: 1261–3.
27. Hermann JM, Tahiri H, Ait-Ichou Y, Lassaletta G, Gonzalez-Elipse AR, Fernandez A. Characterization and photocatalytic activity in aqueous medium of TiO<sub>2</sub> and Ag-TiO<sub>2</sub> coatings on quartz. *Appl Catal B-Environ.* 1997; 13: 219–28.
28. Hoffmann MR, Martin ST, Choi W, Bahnemann DW. Environmental applications of semiconductor photocatalysis. *Chem Rev.* 1995; 95: 69–96.
29. Hu C, Guo J, Qu J, Hu X. Photocatalytic degradation of pathogenic bacteria with AgI/TiO<sub>2</sub> under visible light irradiation. *Langmuir.* 2007; 23: 4982-7.
30. Hugo WB, Russell AD. Types of antimicrobial agents. in: principles and practice o disinfection, preservation and sterilization. Oxford, UK: Blackwell Scientific; 1982 p. 106-8.

31. Kafizas A, Kellici S, Darr JA, Parkin IP. Titanium dioxide and composite metal/metal oxide titania thin films on glass: a comparative study of photocatalytic activity. *J Photochem Photobiol A: Chem.* 2009; 204: 183–90.
32. Khaled Al-OM, Mahmoud AA, Rayyan MR, Abu-Hammad O. Fracture resistance of teeth restored with post-retained restorations: an overview. *J Endod.* 2010; 36: 1439–49.
33. Kishen A, George S, Kumar R. Enterococcus faecalis-mediated biomineralized biofilm formation on root canal dentine in vitro. *J Biomed Mater Res.* 2006; 77: 406-15.
34. 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: 1515-20.
35. Klasen HJ. Historical review of the use of silver in the treatment of burns. Early uses. *Burns.* 2000; 26: 117–30.
36. Kudo A, Miseki Y. Heterogeneous photocatalyst materials for water splitting. *Chem Soc Rev.* 2009; 38: 253–78.
37. Lansdown AB, Silver I. Its antibacterial properties and mechanism of action. *J Wound Care.* 2002; 11: 125–30.
38. Leung D, Fu X, Wang C, Ni M, Leung M, Wang X. Hydrogen production over titania-based photocatalysts. *Chem Sus Chem.* 2010; 3: 681–94.
39. Li G, Liu H, Zhai H, Gao Y, Wang J, Jiang H, Boughton RI. Chemical assembly of TiO<sub>2</sub> and TiO<sub>2</sub> Ag nanoparticles on silk fiber to produce multifunctional fabrics. *J Colloid Inter Scien.* 2011; 358: 307–15.

40. Li Q, Mahendra S, Lyon DY, Brunet L, Liga MV, Li D, et al. Antimicrobial nanomaterials for water disinfection and microbial control: potencial applications and implications. *Water Res.* 2008; 42: 4591-602.
41. Liu H, Wei X, Ling J, Wang W, Huang X. Biofilm formation capability of *Enterococcus faecalis* cells in starvation phase and its susceptibility to sodium hypochlorite. *J Endod.* 2010; 36: 630-5.
42. Liu SX, Qu ZP, Han XW, Sun CL. A mechanism for enhanced photocatalytic activity of silver-loaded titanium dioxide. *Catal Today.* 2004; 93: 877-84.
43. Matsumura Y, Yoshikata K, Kunisaki S, Tsuchido T. Mode of bactericidal action of silver zeolite and its comparison with that of silver nitrate. *Appl Environ Microbiol.* 2003; 69: 4278-81.
44. Mills A, Le Hunte S. An overview of semiconductor photocatalysis. *J Photochem Photobiol A: Chem.* 1997; 108: 1-35.
45. Molander A, Reit C, Dahlen G, Kvist A. Microbiological status of root-filled teeth with apical periodontitis. *Int Endod J.* 1998; 31: 1-7.
46. Morgano MM. Restoration of pulpless teeth: application of traditional principles in present and future contexts. *J Prosthet Dent.* 1996; 75: 375-80.

47. Nanoscience and nanotechnologies: opportunities and uncertainties. London: The Royal Society, The Royal Academy of Engineering; 2004 [acesso 2011, nov 15]. Disponível em: [http://www.raeng.org.uk/news/publications/list/reports/Nanoscience\\_nanotechnologies.pdf](http://www.raeng.org.uk/news/publications/list/reports/Nanoscience_nanotechnologies.pdf)
48. Page K, Wilson M, Parkin IP. Antimicrobial surfaces and their potential in reducing the role of the inanimate environment in the incidence of hospital-acquired infections. *J Mater Chem*. 2009; 19: 3819–31.
49. Pereira JV, Bergamo DC, Pereira JO, Franca SC, Pietro RC, Silva-Sousa YT. Antimicrobial activity of *Arctium lappa* constituents against microorganisms commonly found in endodontic infections. *Braz Dent J*. 2005; 16: 192-6.
50. Reddy KM, Manorama AR, Reddy AR. Bandgap studies on anatase titanium dioxide nanoparticlez. *Mat Chem Phys*. 2002; 78: 239-45.
51. Retchkiman-Schabes PS, Canizal G, Becerra-Herrera R, Zorrilla C, Liu HB, Ascencio J.A. Biosynthesis and characterization of Ti/Ni bimetallic nanoparticles. *Opt Mater*. 2006; 29: 95–9.
52. Rôças IN, Siqueira JF. Comparison of the in vivo antimicrobial effectiveness of sodium hypochlorite and chlorhexidine used as root canal irrigants: a molecular microbiology study. *J Endod*. 2011; 37: 143-50.
53. Rocas IN, Siqueira JF Jr, Santos KR. Association of *Enterococcus faecalis* with different forms of periradicular diseases. *J Endod*. 2004; 30: 315-20.

54. Sedgley CM, Lennan SL, Clewell DB. Prevalence, phenotype and genotype of oral Enterococci. *Oral Microbiol Immunol.* 2004; 19: 95–101.
55. Sedgley CM, Molander A, Flannagan SE, Nagel AC, Appelbe OK, Clewell DB, et al. Virulence, phenotype and genotype characteristics of endodontic Enterococcus spp. *Oral Microbiol Immunol.* 2005; 20: 10- 9.
56. Sedlarik V, Galya T, Sedlarikova J, Valasek P, Saha P. The effect of preparation temperature on the mechanical and antibacterial properties of poly (vinyl alcohol)/silver nitrate films. *Polym Degrad Stab.* 2010; 95: 399–404
57. Shrestha A, Zhilong S, Gee NK, Kishen A. Nanoparticulates for antibiofilm treatment and effect of aging on its antibacterial activity. *J Endod.* 2010; 36: 1030-5.
58. Solis C, Santos A, Nart J, Violant D. 0.2% Chlorhexidine mouthwash with an antidiscoloration system versus 0.2% chlorhexidine mouthwash: a prospective clinical comparative study. *J Periodontol.* 2011; 82: 80-5.
59. Stuart CH, Schwartz AS, Beeson TJ, Owatz CB. Enterococcus faecalis: its role in root canal treatment failure and current concepts in retreatment. *J Endod.* 2006; 32: 93-8.
60. Sunada K, Watanabe T, Hashimoto K. Studies on photokilling of bacteria on TiO<sub>2</sub>. *J Photochem Photobiol A: Chem.* 2003; 156: 227-33.
61. Sundqvist G. Associations between microbial species in dental root canal infections. *Oral Microbiol Immunol.* 1992; 7: 257-62.

62. Sundqvist G, Fidgor D, Persson S, Sjogren U. Microbiologic analysis of teeth with failed endodontic treatment and the outcome of conservative retreatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1998; 85: 86-93.
63. Tomsic B, Simonc B, Orel B, Ze M, Schroers H, Simonc A, et al. Antimicrobial activity of AgCl embedded in a silica matrix on cotton fabric. *Carbohydr Polym.* 2009; 75: 618-26.
64. Usumez A, Cobankara FK, Ozturk N, Eskitascioglu G, Belli S. Microleakage of endodontically treated teeth with different dowel systems. *J Prosthet Dent.* 2004; 92: 163-9.
65. Vianna ME, Gomes BP, Sena NT, Zaia AA, Ferraz CC, Souza Filho FJ. In vitro evaluation of the susceptibility of endodontic pathogens to calcium hydroxide combined with different vehicles. *Braz Dent J.* 2005; 16: 175-80.
66. Xu XH, Brownlow WJ, Kyriacou SV, Wan Q, Viola JJ. Real-time probing of membrane transport in living microbial cells using single nanoparticle optics and living cell imaging. *Biochemistry.* 2004; 43: 10400–13.
67. Yoshida K, Tanagawa M, Atsuda M. Characterization and inhibitory effect of antibacterial dental resin composites incorporating silver-supported materials. *J Biomed Mater Res.* 1999; 47: 516-22.
68. Zhao L, Wangb H, Huob K, Cuia L, Zhang W, Nib H, et al. Antibacterial nano-structured titania coating incorporated with silver nanoparticles. *Biomaterials.* 2011; 32: 5706-16.

69. Zhu X, Wang Q, Zhang C, Cheung GSP, Shen Y. Prevalence, phenotype, and genotype of *Enterococcus faecalis* isolated from saliva and root canals in patients with persistent apical periodontitis. J Endod. 2010; 36: 1950-5.
70. Zoletti GO, Siqueira Jr JF, Santos KR. Identification of *Enterococcus faecalis* in root-filled teeth with or without periradicular lesions by culture-dependent and independent approaches. J Endod. 2006; 32: 722-6.

Autorizo a reprodução deste trabalho.  
(Direitos de publicação reservados ao autor)

Araraquara, 27 de fevereiro de 2012

**ESTHER GOMES SAADE**

