

JAQUELINE OLIVEIRA BARBOZA

Análise comparativa da ação antimicrobiana do cimento endodôntico Acroseal associado diferentes concentrações de nanopartícula de prata sobre o biofilme de *Enterococcus faecalis*.

Araçatuba
2018

JAQUELINE OLIVEIRA BARBOZA

Análise comparativa da ação antimicrobiana do cimento endodôntico Acroseal associado a diferentes concentrações de nanopartícula de prata sobre o biofilme de *Enterococcus faecalis*.

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado á
Faculdade de Odontologia de Araçatuba da
Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho” –
UNESP, como parte dos requisitos para a
obtenção do título de Bacharel em Odontologia.

Orientador: Prof. Assoc. Dr. Rogério de Castilho Jacinto

Araçatuba
2018

Dedicatória

A Deus, primeiramente, por me permitir tamanha experiência e superação de todo o processo até aqui. Agradeço a Ele por ter me colocado em uma família amorosa que sempre apoia os meus projetos e sonhos; pelos meus pais que estão sempre presentes em todas as fases da minha vida e, pela minha irmã que desde o nascimento tem sido minha melhor amiga e companheira.

O Senhor foi quem me consolou nos momentos de dificuldade, quem me deu esperança durante as adversidades e, quem me alegrou durante as conquistas. Sou grata a Ele, por ter me ensinado tanto e revelado a mim, durante este processo de crescimento, a minha vocação e chamado, além de moldar meu caráter e me tornar uma pessoa melhor!

A minha família maravilhosa e amada! Ao meu pai Ivan dos Santos Barboza, por me incentivar a fazer boas escolhas desde muito pequena, por me disciplinar com amor, por transmitir tanta sabedoria e me educar com paciência. É a pessoa na qual sempre vou me espelhar e procurar refúgio! É a rocha da nossa família!

A minha mãe Shirlei de Oliveira Barboza, sempre amorosa e paciente, minha grande parceira na vida! A pessoa que sempre esteve ao meu lado, cuidando de cada detalhe do meu curso, e vida. Sempre me ajudando em oração, me apoiando durante os momentos difíceis longe de casa, me mantendo acolhida mesmo a 500km de distância.

A minha irmã Alice Oliveira Barboza, minha melhor amiga e confidente. Me alegrava voltar para casa e saber que a encontraria. É a pessoa que me transmite felicidade em simples momentos, bastava estarmos juntas! Também me apoiou muito durante o curso, me incentivando e sempre preocupada.

Ao meu saudoso avô Antônio Silvino Barboza, que transmitia imensa alegria a me ver, e demonstrava todo o seu orgulho pelo caminho em que eu estava trilhando. Vivenciou uma fase difícil, me viu sair de casa para morar em Araçatuba com 17 anos, me ligava preocupado, e sempre ansiava em rever-me. Sonhou comigo durante esses cinco anos, viveu cada dificuldade! Onde quer que esteja, compartilho este momento com ele!

A minha avó Maria de Lourdes dos Santos Barboza, e ao meu tio Ivo dos Santos Barboza. São pessoas essenciais na minha vida! Estiveram sempre presentes, me deram conselhos, me apoiaram, contiveram as minhas ansiedades, e mantiveram a fé no caminho que percorria na faculdade e ao desenrolar deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, **Prof. Assoc. Dr. Rogério de Castilho Jacinto**, por ter confiado a mim este projeto de Iniciação Científica, e pela disponibilidade. Agradeço pela convivência no 3º ano de faculdade durante a disciplina de Endodontia, e agora durante a monitoria no curso noturno na qual sou imensamente grata pelos conhecimentos que venho adquirindo, pela oportunidade, pela confiança e pela gentileza e carinho que sempre recebo.

A aluna de doutorado e também membro minha banca avaliadora, **Gabriely Cristinni Rezende**, pela disponibilidade e imensa paciência. Esteve comigo durante as clínicas de Endodontia no 3º ano, durante os procedimentos realizados no projeto, e agora, durante a confecção e apresentação deste trabalho. Obrigada por ter sido, acima de tudo uma grande amiga, e por ter me socorrido em meio a tantas dúvidas, me esclarecendo tudo com muita paciência, carinho e dedicação.

Ao Professor **Dr. Paulo Henrique dos Santos**, pelo convívio que tivemos durante o segundo ano de graduação em Materiais Dentários, onde pude conhecê-lo melhor. Agradeço por ser um professor tão gentil e compreensivo com os alunos durante um dos anos mais desgastantes do curso. Me lembro de conselhos e algumas conversas a respeito da profissão. Obrigada pela disponibilidade para ser minha banca avaliadora e presenciar esse momento comigo.

Ao Professor **Dr. Gustavo Sivieri de Araújo**, pelo convívio durante as clínicas de Endodontia da graduação, e durante a monitoria, que nos deu a oportunidade de convivência. Obrigada pelos conselhos e pelas experiências profissionais compartilhadas, sempre me confortando e me levando a pensar em novas perspectivas.

Ao Professor **Dr. Leonardo Faverani**, do Departamento de Cirurgia, pelo convívio durante um projeto humanitário no Mato Grosso do Sul, que nos permitiu longas conversas e conselhos em relação a minha vida profissional, ao meu trabalho de conclusão de curso, e as experiências vividas durante a graduação. Obrigada pelo carinho e apoio!

As amigas maravilhosas que desenvolvi durante a graduação. Cada uma entrou na minha vida de uma forma especial, e proporcionou a mim ótimos momentos que jamais serão esquecidos. Estiveram comigo durante as dificuldades, um ajudando e dando suporte ao outro, de uma forma

tão especial, que fez com que a jornada até aqui se tornasse leve e menos estressante! Obrigada por serem tão amáveis e inesquecíveis, **Thaís, Natália, Mayara, Maria Clara, Paulo, Bianca, Tanga, Gabi Baldessin, Gabi Oliveira, Laura Garcia, Laura Vieira, Amanda, Yasmin, Giovani, Carol Grence, Fer Ribeiro, Valter**, aos amigos que vivenciaram a Missão Unvida comigo, a aluna de pós graduação **Flávia**.

Aos meus amigos e familiares de São Paulo. Muitos convivem comigo desde a infância, outros Deus colocou no meu caminho em outras fases da vida. Mas vivenciei momentos incríveis com todos! Obrigada pelas orações e conselhos. Aos meus melhores amigos **Bruna, Suemi, Carla e Lucas Gouveia**, aos meus amigos **Lucas, Giulia, Tabata, Luyara, Felipe, Cauê**, a minha prima **Byanca, Adailton**, aos meus padrinhos do coração **Jefferson e Suelen**, e aos seus filhos **Júlia, Arthur e Heitor**, a professora e amiga **Priscilla Correia**, a minha tia **Palacy** e seu marido **David**, a minha avó materna **Altamira**, a minha tia **Cris** e tio **Lú**, aos meus amigos da IMeL de Atibaia (**Edilaine, Bruna, Mateus, Wallace, Jaque, Mikaela, Audrey**), ao **Pr. Clóvis** e sua esposa **Duca**, ao **Pr. Wagner** e sua esposa **Célia**, a **Rose** e a **Cida Pristello**.

A aluna de iniciação científica já formada, **Jéssica Coelho Caires**, pelo apoio e conversas durante o desenrolar dos nossos projetos e, pela disponibilidade de ajudar com os procedimentos da minha iniciação.

A **Faculdade de Odontologia de Araçatuba (FOA-UNESP)**, pelo acolhimento e por ter sido de alguma forma meu segundo lar. Foi o estabelecimento que me proporcionou o desenrolar desta pesquisa, cedeu equipamentos e professores capacitados para orientação.

Aos **Professores de Graduação da FOA-UNESP**, por todo conhecimento compartilhado, conselhos, e trocas de experiências durante as aulas.

E mais uma vez, a **Deus e a minha família**, por todo envolvimento e amor durante este processo! “Confiei ao Senhor os meus planos, e agora eles se realizaram.” Provérbios 16:3.

“Quem estudou latim se lembra que a palavra "feliz" é felix, que significa também "fértil". Felicidade é sinônimo de fertilidade. Fertilidade não é apenas gerar outras pessoas. Fertilidade é impedir que a vida cesse na sua múltipla condição. Fertilidade é dificultar a desertificação dos nossos sonhos. Fertilidade é fazer com que não haja a esterilização do nosso futuro.”

Mário Sérgio Cortella

BARBOZA, J.O. **Análise comparativa da ação antimicrobiana do cimento endodôntico Acroseal associado a diferentes concentrações de nanopartícula de prata sobre o biofilme de *Enterococcus faecalis***. 2018. 28f. Trabalho de Conclusão de Curso – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2018.

RESUMO

O insucesso do tratamento endodôntico está relacionado com a persistência de infecções no sistema de canais radiculares, como por exemplo *Enterococcus faecalis*, assim o uso de cimentos endodônticos deve prevenir a recolonização bacteriana e a formação do biofilme. Por esta razão, vários cimentos endodônticos têm em suas fórmulas, agentes antimicrobianos. Nanopartículas de prata têm mostrado atividade antimicrobiana efetiva contra o biofilme de *Enterococcus faecalis*. O presente estudo tem por objetivo avaliar comparativamente a ação antimicrobiana do cimento endodôntico Acroseal, que tem como base em sua formulação o hidróxido de cálcio, associado a diferentes concentrações de nanopartículas de prata pós presa, em um modelo de biofilme *in vitro*. Para a realização do estudo foram confeccionados 160 espécimes de dentina (n=8) que permaneceram em placas contendo meio de cultura inoculado com *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) para permitir a formação de biofilme. Decorrido o período de formação, os espécimes foram lavados em solução salina e transferidos para outra placa onde os discos dos cimentos a serem testados foram colocados sobre o biofilme formado. As placas de cultura foram deixadas em estufa a 37°C por 2, 7 e 14 dias. Espécimes sem aplicação dos cimentos foram utilizados como controle para cada tempo experimental. Após cada tempo experimental de contato com o cimento, os espécimes foram lavados em solução salina, agitados em vortex, diluídos e plaqueadas em triplicata em meio de cultura específicos. As unidades formadoras de colônia foram contadas e analisadas estatisticamente ($p < 0,05$) para determinação do potencial antimicrobiano. Os dados foram analisados estatisticamente usando os teste one-way ANOVA, Shapiro-Wilk and Kruskal-Wallis ($p < 0.05$) para determinar o potencial antimicrobiano. O resultado encontrado indicou que as diferentes concentrações de nanopartícula de prata associadas ao cimento endodôntico Acroseal obtiveram ação

antimicrobiana eficaz no tempo experimental de 7 dias em contato com o biofilme de *E. faecalis*. Porém não houve aumento na ação antibacteriana no período seguinte (14 dias). Assim, conclui-se que o efeito antimicrobiano do Acroseal não é potencializado pela associação as nanopartículas de prata.

Palavras-chave: Endodontia, Cimentos Endodônticos, *Enterococcus faecalis*, Nanopartícula, Prata, Acroseal.

BARBOZA, J.O. **Comparative analysis of the antimicrobial action of Acroseal associated silver nanoparticles endodontic sealer after setting, against *Enterococcus faecalis* biofilms.** 2018. 28f. Trabalho de Conclusão de Curso – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2018.

ABSTRACT

The failure of endodontic treatment is related to the persistence of infections in the root canal system, such as *Enterococcus faecalis*, so the use of dental cements should prevent bacterial recolonization and biofilm formation. For this reason, various dental cements have antimicrobial agents in their formulas. Silver nanoparticles have shown effective antimicrobial activity against the biofilm of *Enterococcus faecalis*. The objective of the present study was to evaluate the antimicrobial action of Acroseal dental cement, which is based on its formulation calcium hydroxide, associated to different concentrations of silver nanoparticles after prey, in an in vitro biofilm model. In order to perform the study, 160 dentin specimens (n = 8) were placed on plates containing *Enterococcus faecalis* inoculated culture medium (ATCC 29212) to allow biofilm formation. After the formation period, the specimens were washed in saline solution and transferred to another plate where the discs of the cements to be tested were placed on the formed biofilm. The culture plates were left in an oven at 37 ° C for 2, 7 and 14 days. Specimens without cement application were used as controls for each experimental time. After each experimental time of contact with the cement, the specimens were washed in saline solution, vortexed, diluted and plated in triplicate in specific culture media. The colony forming units were counted and analyzed statistically (p <0.05) to determine the antimicrobial potential. The data were analyzed statistically using the one-way ANOVA, Shapiro-Wilkand Kruskal-Wallis test (p <0.05) to determine the antimicrobial potential. The results showed that the different concentrations of silver nanoparticle associated with Acroseal dental cement obtained effective antimicrobial action in the experimental time of 7 days in contact with the *E. faecalis* biofilm. However, there was no increase in antibacterial action in the

following period (14 days). Thus, we conclude that the antimicrobial effect of Acroseal is not potentiated by the association of silver nanoparticles.

Key words: Endodontic, Dental Cements, *Enterococcus faecalis*, Nanoparticle, Silver, Acroseal.

LISTA DE ABREVIATURAS

UNESP	Universidade Estadual Paulista
<i>E. faecalis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
Prof.	Professor
Dr.	Doutor
Assoc.	Associado
SP	São Paulo
°C	Graus Celsius
mL	Mililitro
BHI	Infusão Cardíaca Cerebral
UFC	Unidades Formadoras de Colônias
FOA	Faculdade de Odontologia de Araçatuba
mm	Milímetros
g	Gramas
pH	Potencial hidrogeniônico
min	Minutos
nm	Nanômetros
µL	Micrometros
%	Porcentagem
Log	Logaritmo
Ac	Acroseal

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Grupos experimentais e seus tempos experimentais	17
Tabela 2. Média e desvio padrão de UFC (UFC/ml) nos diferentes grupos e tempos	21

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	14
2	OBJETIVO	16
3	MATERIAIS E MÉTODOS	17
3.1.	Materiais Experimentais	17
3.1.1.	Confecção dos discos de cimento	17
3.2.	Grupos Experimentais	17
3.3.	Análise da atividade antimicrobiana em modelo de biofilme	18
3.3.1.	Obtenção e preparo dos blocos de dentina	18
3.3.2.	Condição de crescimento do <i>Enterococcus faecalis</i>	18
3.3.3.	Formação do biofilme de <i>Enterococcus faecalis</i>	18
3.3.4.	Atividade antimicrobiana	19
3.3.5.	Análise microbiológica das suspensões de microrganismos totais	19
3.4.	Análise estatística	20
4	RESULTADOS	21
5	DISCUSSÃO	22
6	CONCLUSÃO	24
7	REFERÊNCIAS	25

1. INTRODUÇÃO

Eliminar os microrganismos presentes no sistema de canais radiculares através da instrumentação, irrigação, medicação intracanal e obturação, são os principais objetivos do tratamento endodôntico. Entretanto, esses métodos não são capazes de eliminar completamente os microrganismos dos canais radiculares (Mickel et al., 2003). O *E. faecalis* é um coco Gram-positivo, anaeróbio facultativo que possui a capacidade de sobreviver em pH alcalinos (11,5) (McHugh et al., 2004), invadir e viver dentro de túbulos dentinários (Love, 2001) e permanecer longos períodos sem nutrientes (Figdor&Sundqvist, 2003). Além disso, o *E. faecalis* pode formar biofilme tornando-o mais resistente aos agentes antimicrobianos (Distel et al., 2002), por essas razões é um dos microrganismos mais estudados na área da endodontia.

Assim, o uso de materiais obturadores com ação antimicrobiana pode auxiliar a eliminar microrganismos que resistiram ao tratamento endodôntico (Zhang et al., 2009). Atualmente existem no mercado diversos tipos de cimentos obturadores, como Acroseal. O Acroseal é um cimento endodôntico a base de hidróxido de cálcio, que possui atividade antimicrobiana contra *E. faecalis* em teste de contato direto (Pinheiros et al., 2009), mas não foi capaz de eliminar o biofilme após 14 dias de contato direto (Rezende et. al., 2015).

As nanopartículas de prata também já tiveram sua ação antibacteriana confirmada. Segundo Wu (2014) para que esta ação antimicrobiana ocorra é necessário estar atento as formas de aplicação das nanopartículas no interior do canal radicular. O autor verificou que, a ação antibacteriana não é efetivamente concluída quando as nanopartículas de prata são usadas como irrigantes durante o processo de tratamento endodôntico, fazendo-se necessário o uso de um veículo menos solúvel. Posteriormente as nanopartículas de prata foram testadas contra o biofilme de *E. faecalis*, evidenciando uma atividade antimicrobiana efetiva em dentina radicular (Halkai, 2018). Porém a forma de aplicação e uso das nanopartículas de prata ainda é um limitante, bem como a frequência e a durabilidade da ação antimicrobiana em dentina infectada com microrganismos resistentes. Outro estudo revela que a nanopartícula de prata associada a um veículo a base de hidróxido de cálcio pode potencializar a ação antimicrobiana esperada (Afkhami, 2015), confirmando a necessidade de um veículo para sua aplicação.

Com isso o objetivo do presente estudo foi avaliar a ação antimicrobiana do cimento endodôntico à base de hidróxido de cálcio, Acroseal, associado a diferentes concentrações de nanopartículas de prata, pós presa, sobre biofilme de *E. Faecalis* em diferentes períodos. A hipótese nula do presente estudo é de que a associação do cimento endodôntico Acroseal com a nanopartícula de prata, não aumente a atividade antimicrobiana do cimento estudado.

2. OBJETIVO

O objetivo deste trabalho foi avaliar comparativamente a ação antimicrobiana do cimento endodôntico Acroseal associado diferentes concentrações de nanopartícula de prata pós presa, em um modelo de biofilme monoespécie *in vitro* em diferentes períodos (2, 7 e 14 dias).

3. MATERIAL E MÉTODO

3.1 Materiais Experimentais

Foram empregados os cimentos endodônticos Acroseal (Septodont, Saint-Maur-des-Fossés, França) associados ou não a Nanopartículas de Prata, da marca SIGMA-ALDRICH.

3.1.1 Confeção dos discos de cimento

Sobre placa de vidro estéril foi colocada duas porções iguais da BASE e de CATALIZADOR, as quais foram espatuladas até a obtenção de uma consistência homogênea. Em seguida a mistura foi pesada e as diferentes concentrações de nanopartículas de prata (0,1%, 0,5% e 1%) foram adicionadas. Os cimentos foram colocados em moldes de silicone estéril (7,0 x 1,0 mm). Os discos foram mantidos em estufa a 37°C com 100% de umidade para tomar presa por 2 dias antes de serem aplicados sobre o biofilme.

3.2 Grupos experimentais

Os grupos experimentais serão divididos de acordo com a tabela abaixo:

Tabela 1. Grupos experimentais e seus tempos experimentais:

Materiais	Tempos Experimentais (Dias)		
Acroseal	2	7	14
Acroseal + 0,1% de Prata	2	7	14
Acroseal + 0,5% de Prata	2	7	14
Acroseal + 1% de Prata	2	7	14
Sem nenhum material	2	7	14

Os tempos experimentais indicam o tempo em dias que as amostras (blocos de dentina + biofilme) ficaram expostas aos materiais experimentais. Amostras adicionais foram utilizadas como controle positivo (contaminadas) e controle negativo (não contaminadas) mantidos em solução salina.

3.3 Análise da atividade antimicrobiana em modelo de biofilme

3.3.1 Obtenção e preparo dos blocos de dentina

Para a realização deste estudo foram obtidos dentes incisivos de bovinos com idade aproximada de três anos. Estes dentes foram mantidos em timol 2% pH 7,0 durante 30 dias antes de qualquer procedimento experimental. Blocos de dentina (4x4x1 mm) foram obtidos a partir da porção mais plana da raiz do dente. Em seguida, realizou-se o ajuste da dentina para obtenção de superfícies planas com auxílio da politriz APL-4 AROTEC e lixas de granulação 400. Durante todos os procedimentos e entre um passo e outro, os blocos foram mantidos em ambiente umedecido com timol 2% pH 7,0. Para cada material experimental e em cada tempo experimental foram confeccionados 12 blocos de dentina, totalizando 216 blocos. Os blocos resultantes (substratos para crescimento do biofilme de *E. faecalis*) foram colocados em um tubo de ensaio contendo água destilada e esterilizado em autoclave à 121°C por 20 min (Faria-Júnior et al., 2013).

3.3.2 Condição de crescimento do *Enterococcus faecalis*

A cepa padrão de *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) foi primeiramente plaqueada em meio de cultura BHI ágar (Brain Heart Infusion) (HIMEDIA, HimediaLaboratoriesPvt. Ltd., Mumbai, Maharashtra, India) e incubada em estufa à 37°C, por 24 a 48 horas. Após esse período, uma colônia de *E. faecalis* foi inoculada em 5mL de meio de cultura BHI caldo (HIMEDIA, HimediaLaboratoriesPvt. Ltd., Mumbai, Maharashtra, India) e mantidas em estufa à 37°C overnight para permitir o crescimento microbiano (Kimyai et al., 2011).

Após o crescimento overnight, 50 µl da cultura de *E. faecalis* foi ressuspendida em 5ml de meio de cultura fresco BHI caldo (HIMEDIA, HimediaLaboratoriesPvt. Ltd., Mumbai, Maharashtra, India), em seguida a densidade óptica foi ajustada em espectrofotômetro no comprimento de onda de 550nm (Espectrofotômetro UV/Vis – 1800, Shimadzu Corporation, Nakagyo-Ku, Kyoto, Japão), para obtenção de concentrações de 10⁷ UFC/mL (Faria-Júnior et al., 2013).

3.3.3 Formação do biofilme de *E. faecalis*

Para a formação do biofilme, os blocos de dentina foram colocados de forma asséptica em placas de cultura de tecido com 24 poços (TPP Techno PlasticProducts AG, Suíça), onde foram adicionados 200µL da suspensão com a concentração conhecida de *E. faecalis* (10⁷ UFC/mL) preparado previamente e acrescentando 1,8mL de meio de cultura fresco BHI caldo (HIMEDIA, Himedia Laboratories Pvt. Ltd., Mumbai, Maharashtra, India). As placas de cultura foram incubadas à 37°C por 14 dias e o meio de cultura foi completamente trocado a cada 48 horas, sem adição de novos microrganismos (Faria-Júnior et al., 2013).

3.3.4. Atividade antimicrobiana

Decorrido o período de formação de biofilme, as amostras foram lavadas uma vez com 2mL de solução salina a 0,9% para eliminar o meio de cultura e as bactérias não aderidas (Kimyai et al., 2011). Os espécimes foram transferidos para outra placa onde foram deixadas em contato com 2ml de solução salina e transferidas para uma nova placa onde os discos dos cimentos a serem testados (Acroseal e Acroseal com nanopartícula de prata) foram colocados sobre o biofilme formado. As placas de cultura foram deixadas em estufa a 37°C por 2, 7 e 14 dias. Espécimes sem aplicação dos cimentos foram utilizados como controle para cada tempo experimental. Após cada tempo experimental de contato com o cimento, as amostras foram lavadas uma vez com 2mL de solução salina a 0,9%.

As espécimes de *E. faecalis* foram transferidas para outro frasco contendo 1mL de solução salina e agitadas em vortex por 1 minuto para que os microrganismos a eles aderidos fossem transferidos para a solução salina (Fária- junior et al., 2013). As suspensões foram então vortexadas durante 30 segundos e foi realizada uma diluição seriada decimal em solução salina. Os espécimes com o biofilme de *E. faecalis* foram removidos com o auxílio de uma pinça clínica estéril.

3.3.5 Análise microbiológica das suspensões de microrganismos totais

As suspensões foram sequencialmente diluídas (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6}) e inoculadas em triplicata no meio de cultura m-Enterococcus ágar (HIMEDIA, HimediaLaboratoriesPvt. Ltd., Mumbai, Maharashtra, India) para determinar a quantidade de *E. faecalis*.

Para a determinação do número de microrganismos, 3 gotas de 10 µL das diluições pré-estabelecidas foram inoculadas pela técnica da semeadura por gotas, em triplicata, na superfície de placas de petri contendo o meio de cultura específico para cada espécime.

Quando as gotas estavam secas, as placas foram incubadas durante 24-48h a 37°C para a contagem de bactérias viáveis. As colônias resultantes foram contadas (foram contadas apenas as gotas que apresentarem um número entre 3 e 30 colônias) e

transformadas em Log_{10} UFC e padronizados de acordo com a área dos espécimes (Log_{10} UFC/cm²).

3.3 Análise estatística

A análise estatística foi realizada usando Sigma Plot 12.0 (Systat Software Inc., San Jose, USA). A média de UFC do biofilme de cada grupo foi calculada. Os dados foram analisados usando um modelo de One-Way ANOVA e Shapiro-Wilk. O teste unidirecional de Kruskal-Wallis também foi usado. Os dados encontrados foram submetidos à análise estatística com nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

4. RESULTADOS

A tabela 1 mostra a média e o desvio padrão de UFC/ml após 2, 7 e 14 dias em contato direto com os materiais testados. A comparação entre os grupos “Controle” e “Acroseal” revelou que houve diferença estatística entre eles. A ação antimicrobiana sobre o biofilme de *E. faecalis* foi evidenciada a partir de 14 dias e, nos períodos de 2 e 7 dias o controle se manteve com bactérias ativas. Já o Acroseal com diferentes concentrações de nanopartícula de prata, revelou ação antibacteriana eficaz a partir do sétimo dia em contato com o biofilme da amostra, porém a nanopartícula de prata se manteve, sem aumento de eficácia na ação antimicrobiana, no período de 14 dias.

Tabela 2. Média e desvio padrão de UFC (UFC/ml) nos diferentes grupos e tempos:

Grupos	2 dias	7 dias	14 dias
Controle	1,3x 10 ⁷ (±1,0x10 ⁷) A, a	1,1 x 10 ⁷ (±1,0x10 ⁷) A, a	2,4 x 10 ⁷ (±1,3x10 ⁷) A, a
Acroseal	2,6 x 10 ⁶ (±1,1x10 ⁶) B, a	3,7 x 10 ⁶ (±2,4x10 ⁶) B, a	3,2 x 10 ⁵ (±1,4x10 ⁵) B, b
Acroseal + 0,1% de Prata	4,3 x 10 ⁶ (±3,5x10 ⁶) B, a	2,5 x 10 ⁶ (±4,0x10 ⁶) B, b	1,7 x 10 ⁵ (±2,0x10 ⁵)B, b
Acroseal + 0,5% de Prata	2,6 x 10 ⁶ (±1,7x10 ⁶) B, a	3,6 x 10 ⁵ (±2,6x10 ⁵) B, b	4,8 x 10 ⁵ (±5,7x10 ⁵)B, b
Acroseal + 1% de Prata	1,9 x 10 ⁶ (±8,7x10 ⁵) B, a	6,6 x 10 ⁵ (±3,4x10 ⁵) B, b	5,6 x 10 ⁵ (±5,3x10 ⁵)B, b

*Letras maiúsculas indicam diferença estatísticas (P <0.05) entre os grupos.

* Letras minúsculas indicam diferença estatísticas (P <0.05) entre os tempos

5. DISCUSSÃO

Cimentos endodônticos com atividade antimicrobiana como o Acroseal podem ajudar a eliminar os microrganismos que sobreviveram ao tratamento endodôntico. Entretanto estudos recentes demonstraram o *E. faecalis* não pode ser completamente eliminado mesmo após 14 dias de contato direto com o Acroseal (Rezende GC, 2015). O *Enterococcus faecalis* é um microrganismo resistente que está frequentemente relacionado a infecções endodônticas primárias ou reinfecção de canais radiculares previamente tratados endodonticamente, devido a sua resistência aos medicamentos intracanais e por ser encontrado em biofilmes, juntamente com outros microrganismos ou isolados. (Kumar, et al. 2015, Benbelaïd, et al. 2014, Vivacqua-Gomes et al. 2005). Assim, o objetivo desse trabalho foi avaliar a ação antimicrobiana do Acroseal associado a diferentes concentrações de nanopartículas de prata (0,1%, 0,5% e 1%) sobre biofilme de *E. faecalis* nos períodos de 2, 7 e 14 dias. Para esse trabalho foi utilizado o teste de contato direto para avaliar a ação da atividade antimicrobiana dos materiais testados, pois embora o teste de difusão em ágar tenha sido muito utilizado é um teste pouco sensível, onde os resultados dependem da difusão e das propriedades físicas dos materiais testados. Já o teste de contato direto foi projetado para superar essas limitações para avaliar as atividades antibacterianas *in vitro* de numerosos selantes endodônticos (Saleh, 2004 / Kayaoglu, 2005). O Acroseal é um cimento a base de hidróxido de cálcio e sua atividade antimicrobiana é resultante da liberação de íons hidroxila, tornando o meio alcalino e desfavorável para a proliferação bacteriana, incluindo *E. faecalis* (Rezende GC, 2015). O presente estudo, demonstrou que a ação antimicrobiana apresentada pelo Acroseal, foi evidenciada a partir de 14 dias permanecendo nos períodos de 2 e 7 dias com bactérias ativas. O resultado obtido no presente estudo discorda do resultado encontrado por Pinheiro et al. (Pinheiro, 2009), que ao realizar um experimento por teste de difusão em ágar com o Acroseal encontrou atividade antimicrobiana *E. faecalis* após 48h. Os diferentes resultados podem ser explicados pelas diferentes metodologias empregadas. Como relatado anteriormente, a atividade antimicrobiana de cimentos endodônticos à base de hidróxido de cálcio pode ser causada pela liberação de íons

hidroxílicos, que tornam o meio alcalino, no entanto, o Acroseal apresenta menor quantidade de liberação de íons de cálcio e hidroxila, devido à relativa insolubilidade de seus compostos (Eldeniz, 2007).

As nanopartículas de prata exibem atividade antimicrobiana efetiva contra o biofilme de *E. faecalis* na dentina radicular. Portanto, pode ser empregado como agente antimicrobiano para desinfecção do canal radicular (Halkai, 2018). O efeito inibitório da prata é provavelmente a soma de mecanismos distintos de ação. Diversos estudos sugerem que os íons de prata reagem com grupos de proteínas e desempenham um papel essencial na inativação bacteriana interferindo com a permeabilidade da membrana (Durán, 2010), causando danos estruturais, forçando a dissipação de prótons, e finalmente a morte celular (SONDI, SALOPEK-SONDI, 2004; LOK et al., 2006). Também tem sido proposto que os íons de prata liberados das nanopartículas podem atuar no fosfato das moléculas de DNA, resultando na inativação da sua replicação (Carreira, 2009). Além disso, sabe-se que a nanopartícula de prata associada a um veículo a base de hidróxido de cálcio, como o Acroseal, tem efeito antimicrobiano potencializado (Afkhami, 2015). Desta forma, o presente estudo verificou que o cimento endodôntico Acroseal associado a diferentes concentrações de nanopartícula de prata (0,1%, 0,5% e 1%) revelou ação antimicrobiana eficaz a partir do sétimo dia em contato com o biofilme, porém a nanopartícula de prata se manteve, sem aumento de eficácia na ação antimicrobiana, no período de 14 dias, provando então, que as nanopartículas de prata associadas ao Acroseal não têm efeito antibacteriano potencializado. Além disso, o Acroseal possui um tempo de presa rápido confirmando a teoria de que, após o tempo de presa do cimento, os íons de prata ficam retidos e impossibilitados de serem dissociados no meio, mantendo o efeito antibacteriano sem progressos após os 14 dias do tempo experimental.

6. CONCLUSÃO

Baseado nos resultados pode-se concluir que a associação do cimento endodôntico com as diferentes concentrações de nanopartícula de prata estudadas, não aumentou a atividade antimicrobiana do Acroseal nos tempos avaliados.

7. REFERÊNCIAS

- AFKHAMI F, POURHASHEMI SJ, SADEGH M, SALEHI Y, FARD MJ. Antibiofilm efficacy of silver nanoparticles as a vehicle for calcium hydroxide medicament against *Enterococcus faecalis*. J Dent 2015, 43: 157-3-9.
- BENBLAID F, KHADIR A, ABDOUNE MA, BENDAHO M, MUSELLI A, COSTA J. Atividade antimicrobiana de alguns óleos essenciais contra o *Enterococcus faecalis* múltiplo resistente a múltiplos medicamentos, tanto no estado planctônico quanto no biofilme. Asian Pac J TropBiomed 2014; 4: 463-72.
- BRÄNDLE N, ZEHNDER M, WEIGER R, WALTIMO T. Impact of growth conditions on susceptibility of five microbial species to alkaline stress. J Endod 2008;34:579-82.
- CARREIRA CM, PEREIRA CA, BOMBANA AC, JORGE AOC. Eficácia antimicrobiana das nanopartículas de prata sobre esporos, leveduras e bactérias. 2009. Disponível em <http://www.inicepg.univap.br/cd/INIC_2009/anais/arquivos/0173_1015_01.pdf>.
- DISTEL JW, HATTON JF, GILLESPIE MJ. Biofilm formation in medicated root canals. J Endod 2002; 28: 689–693.
- ELDENIZ AU, ERDEMIR A, KURTOGLU F, ESENER T. Evaluation of pH and calcium ion release of Acroseal sealer in comparison with Apexit and Sealapex sealers. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2007;103:86-91.
- ESTRELA C, PIMENTA FC, ITO IY, BAMMANN LL. *In vitro* determination of the direct antimicrobial effect of calcium hydroxide. J Endod 1998;24:15–7.
- FARIA-JÚNIOR NB, TANOMARU-FILHO M, BERBERT FL, GUERREIRO-TANOMARU JM. Antibiofilm activity, pH and solubility of endodontic sealers. Int Endod J 2013;46:755-62.
- FIGDOR D, DAVIES JK, SUNDQVIST G. Starvation survival, growth and recovery of *Enterococcus faecalis* in human serum. Oral Microbiol Immunol. 2003; 18: 234–239.
- HALKAI KR, MUDDA JA, SHIVANNA V, RATHOD V, HALKAI R. Antibacterial Efficacy of Biosynthesized Silver Nanoparticles against *Enterococcus faecalis* Biofilm: An *in vitro* study. Contemp Clin Dent. 2018; 9: 237-41.
- HEYDER M, KRANZ S, VÖLPEL A, et al. Antibacterial effect of different root canal sealers on three bacterial species. Dent Mater 2013;29:542-9.

HOLLAND R, OTOBONI FILHO JA, DE SOUZA V, NERY MJ, BERNABÉ PF, DEZAN E JR. A comparison of one versus two appointment endodontic therapy in dogs' teeth with apical periodontitis. J Endod 2003;29:121-4.

KAYAOGLU G, ERTEN H, ALACAM T, ORSTAVIK D. Short-term antibacterial activity of root canal sealers towards *Enterococcus faecalis*. IntEndod J 2005;38:483–8.

KIMYAI S, LOTFIPOUR F, POURABBAS R, SADR UM, NIKAZAR S, MILANI M. Effect of two prophylaxis methods on adherence of *Streptococcus mutans* to microfilled composite resin and giomer surfaces. Med Oral Patol Oral Cir Bucal 2011; 16:e561-7.

KUMAR J, SHARMA R, SHARMA M, PRABHAVATHI V, PAUL J, CHOWDARY CD. Presença de *Candida albicans* nos canais radiculares dos dentes com periodontite apical e avaliação do seu possível papel na falha no tratamento endodôntico. J Int Saúde bucal 2015; 7: 42-45.

LOVE RM. *Enterococcus faecalis*: a mechanism for its role in endodontic failure. Int Endod J 2001;34:399–405.

MCHUGH CP, ZHANG P, MICHALEK S, ELEAZER PD. pH required to kill *Enterococcus faecalis* *in vitro*. J Endod. 2004; 30 :218-9.

MICKEL AK, NGUYEN TH, CHOGLE S. Antimicrobial activity of endodontic sealers on *Enterococcus faecalis*. J Endod 2003;29:257-8.

MONTEIRO DR, GORUP LF, SILVA S, NEGRI M, DE CAMARGO ER, OLIVEIRA R, BARBOSA DB, HENRIQUES M. Silver colloidal nanoparticles: antifungal effect against adhered cells and biofilms of *Candida albicans* and *Candida glabrata*. Biofouling 2011 Aug;27:711-9.

NELSON DURÁN; PRISCYLA D. MARCATO; ROSELI DE CONTI; OSWALDO L. ALVES; FABIO T. M. COSTA; MARCELO BROCCHI. REVIEW: Potential use of silver nanoparticles on pathogenic bacteria, their toxicity and possible mechanisms of action. J. Braz. Chem. Soc. vol.21 no.6 São Paulo, 2010.

PINHEIRO CR, GUINESI AS, PIZZOLITTO AC, BONETTI-FILHO I. In vitro antimicrobial activity of Acroseal, Polifil and Epiphany against *Enterococcus faecalis*. Braz Dent J. 2009;20:107-11.

REZENDE GC. Análise comparativa da ação antimicrobiana dos cimentos endodônticos Acroseal, Sealapex e AH plus pós presa em biofilme de *Enterococcus faecalis*. 2015. 46 f. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Faculdade de Odontologia de Araçatuba, 2015. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/11449/123780>>.

SAFAVI KE, NICHOLS FC. Alteration of biological properties of bacterial lipopolysaccharide by calcium hydroxide treatment 1994;20:127–9.

SALEH IM, RUYTER IE, HAAPASALO M, ORSTAVIK D. Survival of *Enterococcus faecalis* in infected dentinal tubules after root canal filling with different root canal sealers in vitro. Int Endod J 2004;37:193-8.

SETYA G, NAGPAL A, KUMAR S, INGLE NA. Comparison of root canal sealer distribution in obturated root canal: An in-vitro study. J Int Soc Prev Community Dent 2014;4:193-7.

SIQUEIRA JF JR, FAVIERI A, GAHYVA SM, et al. Antimicrobial activity and flow rate of newer and established root canal sealers. J Endod 2000; 26:274-7.

SIQUEIRA JF, JR, RÔÇAS IN. Diversity of endodontic microbiota revisited. J Dent Res 2009;88:969–81.

SONDI I, SALOPEK-SONDI B. Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on *E. coli* as a model for Gram-negative bacteria. J. Colloid Interface Sci. 2004. 275:177-182.

SUNDQVIST G, FIGDOR 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.

VIVACQUA-GOMES N, GURGEL-FILHO ED, GOMES BP, FERRAZ CC, ZAIA AA, SOUZA-FILHO FJ. Recuperação de *Enterococcus faecalis* após tratamentos do canal radicular de uma única ou múltipla visita realizados em dentes infectados ex vivo. IntEndod J 2005; 38: 697-704.

WALTIMO TM, HAAPASALO M, ZEHNDER M, MEYER J. Clinical aspects related to endodontic yeast infections. Endod Top 2004;9:66–78.

WAKABAYASHI H, MORITA S, KOBAYASHI K, TACHIBANA H, MATSUMOTO K. Effect of calcium hydroxide paste dressing on uninstrumented root canal wall. J Endod 1995;21:543–5.

WU D, FAN W, KISHEN A, GUTMANN JL, FAN B. Evaluation of the antibacterial efficacy of silver nanoparticles against *Enterococcus faecalis* biofilm. J Endod 2014; 40: 285-90.

ZHANG H, SHEN Y, RUSE ND, HAAPASALO M. Antibacterial activity of endodontic sealers by modified direct contact test against *Enterococcus faecalis*. J Endod 2009; 35:1051-5.