

**SARA VIEIRA PACANARO**

**Resposta tecidual a tubos de dentina contaminados e irrigados com nanopartícula de prata na concentração de 23ppm ou hipoclorito de sódio a 2,5%**

**ARAÇATUBA – SP**

**2012**

**SARA VIEIRA PACANARO**

**Resposta tecidual a tubos de dentina contaminados e irrigados com nanopartícula de prata na concentração de 23ppm ou hipoclorito de sódio a 2,5%**

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

Orientador: Prof. João Eduardo Gomes Filho

**ARAÇATUBA – SP**

**2012**

## **Dedicatória**

Dedico este trabalho aos meus pais, José Aldo e Margarida, aos quais nada disso teria sido possível, sem o seu esforço diário, compreensão e apoio incondicional, à minha irmã, Lara pelo dia a dia, a paciência, as conversas e trocas de experiência, bem como os puxões de orelha e conselhos que fizeram de mim uma pessoa melhor.

## Agradecimentos

Ao Professor João Eduardo por ter me dado a oportunidade de ser orientador em meu primeiro trabalho de iniciação científica e posteriormente trabalho de conclusão de curso, que me ensinou e contribuiu com o meu conhecimento não só intelectual e científico, como humano.

Aos meus amigos Luana Godoy, Fernanda Fragoso, Fernando Silva e Karina Tendoro por termos nos tornado uma equipe durante os trabalhos realizados em laboratório, bem como em âmbito pessoal. À Simone Watanabe, por seu apoio e auxílio fundamentais durante o processo de elaboração deste trabalho.

À Ermelinda e Nelci pelo auxílio na confecção das lâminas e as técnicas de laboratório no desenvolvimento do projeto.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pela concessão de bolsa de iniciação científica e pelo apoio financeiro para a realização da pesquisa.

À Universidade Estadual Paulista, pela oportunidade de realização do curso de graduação.

“O Senhor é meu pastor, nada me faltará. Ainda que eu atravessasse o vale escuro, nada temerei, pois estais comigo. A vossa bondade e misericórdia hão de seguir-me por todos os dias da minha vida.” **Salmo 22**

PACANARO, S.V. Resposta tecidual a tubos de dentina contaminados e irrigados com nanopartícula de prata na concentração de 23ppm ou hipoclorito de sódio a 2,5%. Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2012.

## Resumo

O objetivo deste estudo foi avaliar a resposta tecidual da nanopartícula de prata pela resposta tecidual frente ao implante de tubos de dentina contaminados por saliva e irrigados com dispersão de nanopartículas de prata ou hipoclorito de sódio a 2,5% em tecido subcutâneo de ratos. Foram utilizados 30 ratos, os quais receberam individualmente dois implantes de tubos de dentina bovina contaminados por saliva e irrigados com dispersão de nanopartículas de prata na concentração 23ppm, hipoclorito de sódio a 2,5%, soro fisiológico, ou tubos não contaminados como controle. Os períodos de avaliação foram de 7 e 30 dias. Após cada período pós-operatório, 15 animais foram sacrificados e os tubos de dentina juntamente com o tecido que o circunda foram removidos, fixados e processados para análise em microscopia de luz, com inclusão em glicol metacrilato, cortes seriados de 3 $\mu$ m e coloração por HE. O critério de avaliação foi de 0: nenhuma ou poucas células e nenhuma reação; 1: menos de 25 células e reação leve; 2: entre 25 e 125 células e reação moderada; 3: 125 ou mais células e severa reação. Cápsula fibrosa será considerada fina quando < 150 $\mu$ m e espessa quando > 150 $\mu$ m. Necrose foi registrada como presente ou ausente. Os dados obtidos foram analisados pelo teste Kruskal Wallis. No 7º dia, em todos os grupos, havia um infiltrado inflamatório moderado e cápsula fibrosa espessa. A intensidade da inflamação reduziu no 30º dia, em todos os grupos, e uma cápsula fibrosa mais fina foi encontrada. Este estudo concluiu que a dispersão de Nanopartículas de Prata foi biocompatível quando comparada com a solução de Hipoclorito de Sódio, mas outros estudos são necessários para melhor analisar as propriedades deste material e confirmar os dados observados.

Palavras-chave: Biocompatibilidade. Nanopartícula de prata. Solução Irrigadora.

PACANARO, S.V. Tissue response to infected dentine tubes irrigate with 23ppm silver nanoparticles or 2.5% sodium hypochlorite. UNESP - São Paulo State University, Araçatuba, 2012.

## **Abstract**

The aim of this study was to evaluate the tecidual answer effect of silver nanoparticles dispersion using the tissue response to implanted dentine tubes irrigated with silver nanoparticles dispersion or 2.5% sodium hypochlorite. Forty rats was individually receive two dentine tubes irrigated with 23ppm silver nanoparticles dispersion, 2.5% sodium hypochlorite, saline or sterilized tube as control. The observation periods was 7 and 30 days. After each period of time, twenty animals was killed and the tubes and surrounding tissue removed, fixed and prepared to be analyzed in light microscope with glycol methacrylate embedding, 3  $\mu\text{m}$  serial cutting and HE staining. Scores will be defined as follows: 0, none or few inflammatory cells, no reaction; 1, <25 cells, mild reaction; 2, 25 to 125 cells, moderate reaction; 3, >125 cells, severe reaction. Fibrous capsule was categorized as “thin” when thickness was < 150  $\mu\text{m}$  and “thick” at > 150  $\mu\text{m}$ . Necrosis and formation of calcification were recorded.. The data were statistically analyzed using Kruskal Wallis test. At 7th day, all groups had a mild inflammatory infiltrate and thick fibrotic capsule. The intensity of inflammation reduced on the 30th day, all groups, and a thin fibrous capsule was found. This study concluded that the dispersion of silver nanoparticles was biocompatible when compared with sodium hypochlorite solution, but further studies are needed to better analyze the properties of this material and confirm the data observed.

Key words: Biocompatibility. Silver nanoparticles. Irrigating solution.

## Lista de Figuras

Figura 1A	Tricotomia da região dorsal	17
Figura 1B	Anti-sepsia com iodo 5%	17
Figura 1C	Incisão	17
Figura 1D	Divulsão	17
Figura 1E	Tubo sendo levado em posição	17
Figura 1F	Sutura	17
Figura 2	Esquema ilustrativo do local de implantação do tubo de dentina em tecido conjuntivo subcutâneo e sua relação com estruturas anexas	18
Figura 3 A,B	Nanopartícula de Prata 23 ppm 7 dias	22
Figura 3 C,D	Nanopartícula de Prata 23 ppm 30 dias	22
Figura 3 E,F	Hipoclorito de Sódio 2,5% 7 Dias	22
Figura 3 G,H	Hipoclorito de Sódio 2,5% 30 dias	22
Figura 3 I,J	Soro 7 dias	22
Figura 3 K,L	Soro 30 dias	23

## **Lista de Tabelas**

Tabela 1 -	Definição dos grupos experimentais	18
Tabela 2 –	Resultados dos grupos experimentais	20

## Sumário

Introdução	11
Proposição	14
Materiais e métodos	15
Resultados	19
Discussão	24
Conclusão	27
Referências	28
Anexos	32

## Introdução

O papel essencial dos microrganismos no desenvolvimento das patologias pulpares e periapicais tem sido demonstrado em modelos animais e em humanos (Kakehashi et al., 1965; Moller et al., 1981; Sundqvist, 1992). A eliminação dos microrganismos de canais infectados se mostra muitas vezes como uma tarefa extremamente difícil. Inúmeros métodos foram descritos para se tentar eliminar os microrganismos do sistema de canais radiculares, incluindo técnicas de instrumentação, regimes de irrigação e medicamentos intra-canal.

A literatura não evidencia que nenhuma terapia isoladamente seja capaz de eliminar completamente as bactérias do sistema de canais radiculares (Bystrom & Sundqvist, 1981) em função de sua complexa anatomia (Hess, 1925; Peters et al., 2001). É possível acreditar que qualquer remanescente pulpar deixado no sistema de canais radiculares possa servir como nutriente bacteriano e manter um estado patológico, bem como, impedir que os medicamentos e irrigantes atinjam seu máximo poder bactericida, sendo necessário o estudo constante de novas alternativas de soluções e técnicas de irrigação que consigam eliminar o máximo de microrganismos do endodonto.

Das soluções irrigadoras indicadas para casos de necrose e contaminação pulpar, as soluções de hipoclorito de sódio são as mais utilizadas, devido a sua ação antimicrobiana (Jeansonne et al., 1994; Kuruvilla et al., 1998; Estrela et al., 2003; Gomes et al., 2001; Siqueira et al., 2000; Gordon et al., 1981) e capacidade de dissolução de tecido orgânico (Gordon et al., 1981; Yang et al., 1995). Embora essas propriedades sejam importantes, o hipoclorito de sódio provoca severa reação inflamatória no tecido subcutâneo e periapical (Gomes-Filho et al., 2008; Kuruvilla et al., 1998) que pode resultar em complicações quando injetado acidentalmente nos tecidos (Ehrich et al., 1993; Hülsmann et al., 2000). A citotoxicidade do hipoclorito de sódio está provavelmente relacionada ao pH alcalino e a formação de ácido hipocloroso (HOCl), quando em contato com os tecidos (Gomes-Filho et al., 2008; Estrela et al., 2002).

Recentemente, tem se dado ênfase à nanopartícula de prata como um agente antimicrobiano. Nanotecnologia envolve a criação e manipulação de materiais em nano escala para criar produtos que exibam novas propriedades podendo ter um impacto na vida humana e no ecossistema. A prata é um metal conhecido por seu largo espectro antimicrobiano contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, fungos, protozoários e certos vírus (Balazs et al., 2004), incluindo cepas antibiótico-resistentes (Melaiye, 2005; Stobie et al., 2008) e *S. aureus* e *Enterococcus* (Jia et al., 2007; Roe et al., 2008) comuns na flora do canal radicular. Pode ser usado para reduzir infecções no tratamento de áreas queimadas (Parikh et al., 2005; Ulkur et al., 2005), para prevenir a colonização bacteriana em dispositivos médicos (Panáček et al., 2006; Rupp et al., 2004; Samuel & Guggenbichler, 2004; Strathmann & Wingender, 2004; Ohashi et al., 2004; Bosetti et al., 2002), bem como, em fibras de tecidos (Panáček et al., 2006; Imazato et al., 1998) e para o tratamento de água (Chou et al., 2005).

Entretanto, a prata nos diversos modos de aplicação deve ser utilizada com cautela, uma vez que sua toxicidade é dependente da concentração. (Braydich-Stolle et al. 2007), avaliaram a suscetibilidade de uma linhagem de espermatogônias de camundongos em um modelo *in vitro* para avaliar a nanotoxicidade da prata. Observaram que a concentração de nanopartículas de prata entre 5 g/mL e 10 g/mL induziram necrose ou apoptose das células. Além disso, o acúmulo de metais pesados no meio ambiente tem sido considerado inapropriado (Harrison et al. 2007), embora, a prata não tenha sido considerada como o mais prevalente dos metais pesados (Harrison et al. 2007). As nanopartículas exercem stress oxidativo e podem causar severa peroxidação lipídica em tecido cerebral de peixes (Oberdörster, 2004).

Poucos trabalhos relatam a relação das nanopartículas com seus efeitos biológicos em modelos *in vivo*. Nanopartículas de prata e micropartículas de prata foram implantadas em músculo de ratos para observação da biocompatibilidade e observou-se um bom comportamento aos 7 e 14 dias com ambas as partículas, entretanto, aos 30 dias a resposta não foi satisfatória principalmente para a nanopartícula (Chen et al., 2007). A biocompatibilidade e toxicidade da nanopartícula de prata foram consideradas dose-dependente em modelo de embriões de peixes (Lee et al., 2007). Watari et al. (2009), relataram a importância do tamanho, da forma e das características físicas das partículas para a sua reatividade tecidual, observando que a transição da bioreatividade das partículas ocorre nos tamanhos críticos de 100  $\mu\text{m}$ , 10  $\mu\text{m}$  e 200 nm. O tamanho foi determinado como inespecífico, ou seja, independe do material e quando menor de 10  $\mu\text{m}$  tem um efeito pronunciado para as células, estimulando

a fagocitose celular e inflamação tecidual. Quando a partícula era menor que 200 nm, tornava-se menos estimulativa e o reconhecimento pelo sistema imune era deficiente, podendo invadir diretamente o meio interno pela respiração ou sistema digestório e se difundir por todo o corpo. Assim, ganha importância o estudo das nanopartículas com relação aos seus efeitos biológicos nos diferentes modos de aplicação.

Considerando-se que, embora as nanopartículas estejam sendo contemporaneamente amplamente usadas na tecnologia moderna, há uma falta de informações a respeito das implicações de produtos que as contenham na saúde humana e no meio ambiente. Considerando-se ainda que não existam trabalhos na literatura avaliando a utilização da nanopartícula de prata em etapas do tratamento endodôntico, principalmente como solução irrigadora final após o preparo biomecânico. O objetivo deste estudo foi avaliar a resposta tecidual frente ao implante de tubos de dentina irrigados com dispersão de nanopartículas de prata a 23ppm em comparação ao hipoclorito de sódio a 2,5% em tecido subcutâneo de ratos.

## **Proposição**

O objetivo deste estudo foi avaliar a resposta tecidual frente ao implante de tubos de dentina contaminados com microorganismos salivares e irrigados com dispersão de nanopartículas de prata 23 ppm em comparação ao hipoclorito de sódio a 2,5% em tecido subcutâneo de ratos para verificação do seu efeito antimicrobiano comparativamente.

## **Materiais e métodos**

### **Materiais Experimentais**

Foram empregados a dispersão de nanopartículas de prata (KHEMIA EQUIPAMENTOS TECNOLÓGICOS DE EFLUENTES LTDA., empresa de desenvolvimento e pesquisa, Cidade Universitária, São Paulo, Estado de São Paulo) na concentração de 23ppm e Hipoclorito de Sódio a 2,5% (Apoticário, Araçatuba, São Paulo.)

### **Teste de Biocompatibilidade**

Para a realização deste trabalho, foram utilizados 30 ratos albinos Wistar, machos, entre 4 – 6 meses de idade, pesando 250 – 280g, sendo provenientes do biotério da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, UNESP. O Protocolo experimental seguiu critérios e passos de estudos previamente realizados (Gomes-Filho, 2001; Gomes-Filho et al, 2008a; Gomes-Filho et al, 2008b; Gomes-Filho et al, 2009).

Os animais foram mantidos em ambientes com temperatura entre 22°C e 24°C, com ciclo de Luz controlada (12 horas claro e 12 horas escuro) e em gaiolas coletivas, contendo seis ratos por gaiola.

No interior das gaiolas havia cama de serragem, a qual foi trocada diariamente. Esses animais foram alimentados antes e durante todo o período experimental, com ração sólida triturada e água “ad libitum”, exceto nas primeiras 12 horas pré e pós-operatórias.

Foram utilizados 60 tubos de dentina preparados a partir de raízes de dentes bovinos uniradiculares e com ápices completos. Para tanto, as coroas foram seccionadas a 7 mm do ápice radicular com auxílio de torno elétrico e disco diamantado, os remanescentes apicais foram alargados até a lima K #35, sobreinstrumentados 2mm além do forame apical e uma broca de Gates-Glidden nº2 foi utilizada em toda a extensão do tubo. Uma broca EndoZ (Dentsply Maillefer, Baillagues, Switzerland) foi utilizada para dar acabamento e deixar as paredes de dentina com aproximadamente 0,5mm conferida com régua endodôntica. Os tubos foram irrigados durante o preparo com hipoclorito de sódio e ao final inundados com EDTA a 17% para remover a “smear layer”. Os tubos foram autoclavados e mantidos em grau cirúrgico até o experimento.

Para a contaminação dos tubos, com microorganismos salivares, a saliva foi coletada por estimulação (3ml) e adicionada a três frascos de penicilina esterilizado em autoclave contendo 4ml de BHI, 1ml de saliva para cada frasco. Os frascos foram mantidos em estufa a 37°C por 48 horas para crescimento dos microrganismos salivares. Sessenta espécimes foram, de forma asséptica, fixados no fundo dos poços das placas de 24 poços esterilizados (Corning, NY, USA) com auxílio de cera utilidade descontaminada com álcool 70°GL e preenchidos com o BHI previamente contaminado sob fluxo laminar. As placas contendo os espécimes foram mantidas em estufa pelo período de 7 dias para contaminação dos túbulos dentinários, com reposição de 0,1ml de BHI contaminado no interior de cada tubo a cada 2 dias para evitar a saturação do meio. Dois tubos extras foram utilizados para checar a contaminação e foram imersos individualmente em frascos de penicilina contendo 4ml de BHI e mantidos em estufa. O turvamento do meio indica a contaminação dos tubos.

Os tubos foram irrigados com 2 ml de dispersão de nanopartículas de prata a 23ppm, hipoclorito de sódio a 2,5% ou solução fisiológica (grupo controle) e implantados no tecido subcutâneo de ratos.

Foram empregados como sedativo Dopaser (Laboratórios Calier AS, Barcelona – Espanha), a base de xilazina (relaxante muscular, analgésico e sedativo) na dosagem de 10mg/Kg de peso corporal e como anestésico o Vertanacol (Fort Dodge, Iowa – EUA), a base de cloridrato de ketamina a 5% na dosagem de 25mg/Kg de peso corporal.

Para a realização das intervenções cirúrgicas, os animais foram inicialmente pesados, sedados com injeção intramuscular de Dopaser, e em seguida anestesiados com Vertanacol. O período de trabalho com cada animal não ultrapassou 5 minutos e para não haver necessidade de complementação anestésica.

Após a anestesia, foi feita a tricotomia da região dorsal e a lavagem da área com a finalidade de se evitar contaminação do campo cirúrgico pela presença de pêlos. A anti-sepsia da área desprovida de pêlos foi efetuada esfregando por dois minutos com gaze em solução de iodo 5%.

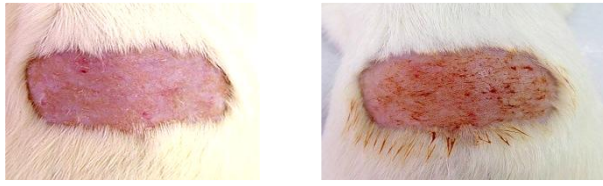


Fig. 1A Tricotomia da região dorsal      Fig. 1B- Anti-sepsia com iodo 5%

Em seguida, iniciou o procedimento cirúrgico, fazendo-se uma incisão com lâmina de bisturi número 15, no dorso do animal, (tendo a coluna vertebral como linha média de marcação).



Fig.1C- Incisão      Fig.1D- Divulsão      Fig.1E- Tubo sendo levado em posição

Após a divulsão do tecido subcutâneo foi criada uma bolsa do lado direito e outra do lado esquerdo da linha média e cada bolsa recebeu 1 tubo levado em posição com auxílio de pinça reta.

Assim, cada animal recebeu dois implantes de tubos de dentina que receberam o mesmo tratamento. O tecido foi suturado com fio de seda (4,0) não reabsorvível e anti-sepsia final foi realizada com solução de iodo 5%.



Fig. 1F- Sutura

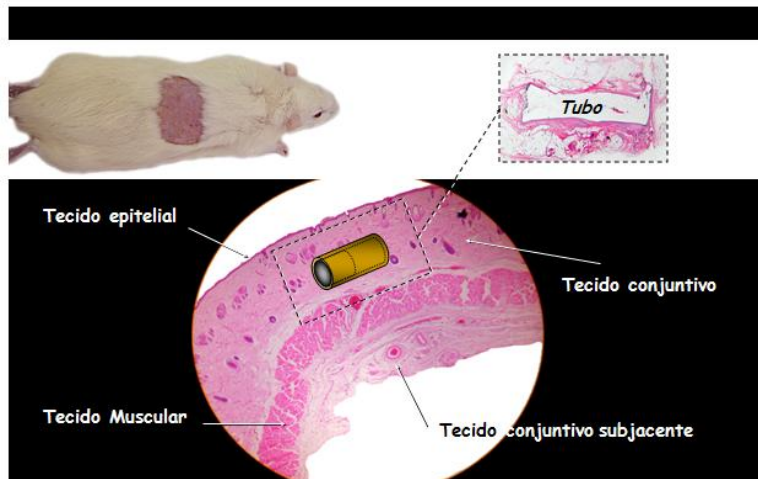


Fig. 2. Esquema ilustrativo do local de implantação do tubo de dentina em tecido conjuntivo subcutâneo e sua relação com estruturas anexas.

Os animais foram acompanhados até se recuperarem da anestesia antes de retornarem ao biotério.

### Grupos Experimentais

Os grupos experimentais e controle foram definidos da seguinte maneira:

		n
Grupo 1:	Nanopartícula de prata a 23 ppm	10
Grupo 2:	Hipoclorito de sódio 2,5 %	10
Grupo 3:	Soro fisiológico (grupo controle)	10

Tabela 1: Definição dos Grupos Experimentais

Os períodos de avaliação foram de 7 e 30 dias. A cada tempo experimental, cinco animais foram sacrificados por meio de uma dose excessiva de anestésico (cloridrato de ketamina). Após o sacrifício, foi realizada novamente uma tricotomia da região dorsal, e anti-sepsia da área com solução de iodo 5%. Logo após, foi realizada uma nova incisão com lâmina de bisturi número 15, tendo a coluna vertebral como linha média de marcação, os tubos foram localizados e removidos juntamente com os tecidos que os envolvem e foram

fixados em solução formalina 10% pH 7. A descalcificação das peças foi feita com uso de solução de ácido fórmico e citrato de sódio e foram processadas e incluídas em glicol metacrilato (GMA) (Gomes-Filho et al, 2001), cortadas seriadamente em 3 µm para serem coradas com hematoxilina e eosina.

A análise histomorfológica qualitativa do processo inflamatório consistiu na descrição dos fenômenos inflamatórios observados microscopicamente nos cortes teciduais representativos de cada grupo e tempos pós-operatórios.

A análise quantitativa foi realizada por meio da atribuição de escores, graduando a importância dos fenômenos microscópicos observados separadamente. Foi realizada a determinação das condições microscópicas das estruturas examinadas, em itens distintos, e avaliadas sob a forma de escores de 0 a 3, para resposta inflamatória. Cápsula fibrosa foi considerada fina quando  $< 150\mu\text{m}$  e espessa quando  $> 150\mu\text{m}$ . Necrose foi registrada como presente ou ausente (American National Standards Institute, 1979; Costa et al, 2000; Federation Dentaire International, 1980; Ozbas et al, 2003; Yaltirik et al, 2004; Gomes-Filho et al, 2009). Possibilitando, dessa maneira, dados objetivos para uma análise estatística com teste de Kruskal Wallis.

## Resultados

O critério de avaliação histológica foi de 0 a 3 em função da quantidade de células inflamatórias, a cápsula fibrosa foi considerada fina ou espessa e necrose foi registrada como presente ou ausente. Os resultados foram analisados estatisticamente pelo teste Kruskal Wallis.

Escore (E)

0 – Nenhuma reação = nenhuma ou pouca célula.

1 – Leve = menos de 25 células.

2 – Moderado = 25-125 células.

3 – Severo = 125 ou mais células.

Tratamento	7 dias (escore)	30 dias (escore)
Solução Fisiológica (grupo controle)	2	1
Hipoclorito de Sódio 2,5 %	2	1
Nanopartícula de Prata 23 ppm	2	1

Tabela 2 : Resultados dos grupos experimentais

### **Nanopartícula de prata 23ppm**

No período de 7 dias houve um infiltrado celular inflamatório moderado composto de linfócitos e macrófagos e uma cápsula fibrosa espessa perto do tubo de dentina. No 30º dia houve a diminuição do infiltrado inflamatório e uma cápsula fibrosa mais fina próxima ao tubo. (Fig.3A e 3B)

### **Hipoclorito de sódio 2.5%**

No período de 7 dias houve um infiltrado inflamatório moderado com poucas células inflamatórias crônicas composto por linfócitos, macrófagos e fibroblastos. E uma espessa cápsula fibrosa perto do tubo. Após 30 dias, a intensidade da inflamação reduziu para um grau leve, e a cápsula fibrosa encontrada foi mais fina. (Fig. 3C e 3D)

**Solução Fisiológica- Controle**

No 7º dia havia um infiltrado inflamatório moderado consistindo de macrófagos e linfócitos e a cápsula fibrosa era espessa. A intensidade da inflamação reduziu no 30º dia, e uma cápsula fibrosa mais fina pode ser notada próxima ao tubo. (Fig.3E e 3F)

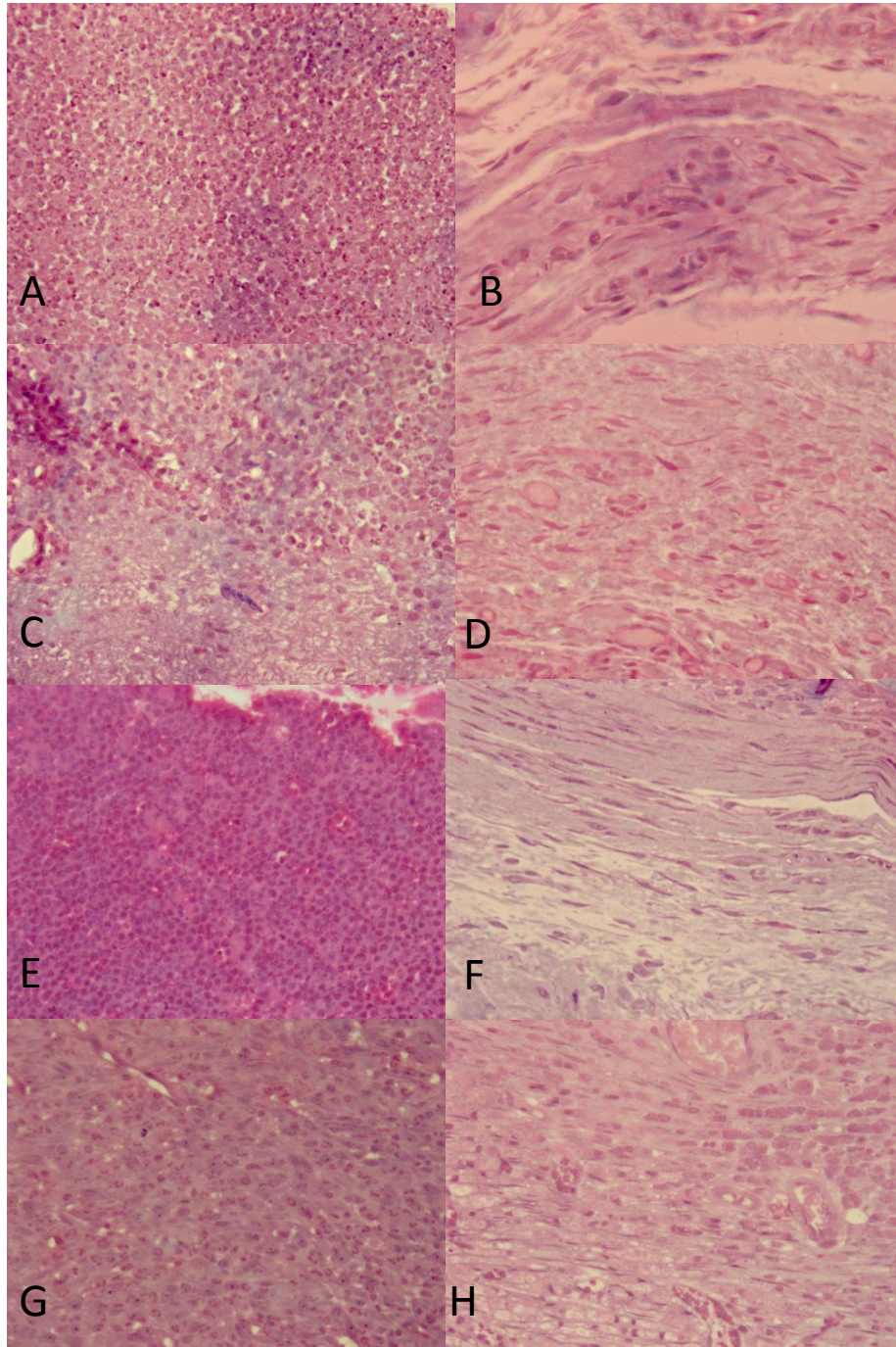


Figura 3 (A) a formação de cápsula fibrosa espessa e infiltrado inflamatório moderado (7 dias, HE, 40x) e (B) infiltração inflamatória crônica leve em uma cápsula fibrosa fina (30 dias, HE, 40x) . Hipoclorito: (C) infiltração celular inflamatória crônica moderada e formação de cápsula fibrosa espessa (7 dias, HE, 40x) e (D) a redução da espessura da cápsula fibrosa e infiltração de células inflamatórias, perto do tubo (30 dias, hematoxilina e eosina, 40x). Soro fisiológico: (E) cápsula fibrosa espessa e infiltrado inflamatório moderado composto de

linfócitos e macrófagos (7 dias, hematoxilina e eosina, 40x) e (F) da cápsula fibrosa que envolve o tubo era fina, com poucas células inflamatórias crônicas (30 dias, HE, 40x). Controle: (G) cápsula fibrosa espessa e infiltrado inflamatório moderado composto de linfócitos e macrófagos (7 dias, HE, 40x) e (H) de redução na espessura da cápsula fibrosa e infiltração de células inflamatórias, perto do tubo (30 dias, hematoxilina HE, 40x).

## Discussão

Comparando os grupos nos períodos de 7 e 30 dias, não houve diferença estatisticamente significativa ( $P > 0,05$ ) entre os escores dos diferentes grupos.

Biofilmes são definidos como comunidades de bactérias que colonizam as superfícies em um ambiente aquoso. A formação de biofilme ocorre como resultado de uma seqüência de eventos: Fixação da superfície microbiana, proliferação celular, produção de matriz. A infecção endodôntica ocorre através das bactérias do biofilme, e o sucesso do tratamento endodôntico depende da efetiva eliminação destas bactérias de dentro do sistema de canais radiculares. A resistência bacteriana aos desinfetantes presentes, como o hipoclorito de sódio e clorexidina é devido a fatores inerentes a complexa anatomia do sistema de canais radiculares. O crescimento bacteriano é um processo adaptativo que permite que as bactérias sobrevivam em um ambiente aonde os nutrientes são semelhantes aos dos canais radiculares tratados. Nanoparticuladoss exibem maior atividade antibacteriana, como resultado de suas policatiônicas / natureza polianiônico com maior área superficial e densidade de carga, resultando em maior grau de interação com a célula bacteriana.

Os antimicrobianos de prata são testados como uma nova estratégia contra a redução da adesão bacteriana e impedir a formação de biofilmes. Experimentos com a nanopartícula de prata tem demonstrado que a prata é efetiva contra uma ampla gama de células bacterianas e biofilmes maduros, no entanto, a sua concentração é um fator importante.

Os metais têm sido usados durante séculos como agentes antimicrobianos e compostos de prata têm sido amplamente estudados em comparação com outros metais, por causa de suas ações antibacteriana, antifúngica e antiviral. O uso de íons de prata tem sido considerado para uma série de aplicações biomédicas, incluindo, dentro da área odontológica, como um componente antibacteriano em compósitos odontológicos. A prata também é conhecida por apresentar uma forte afinidade com zeólita, um material poroso e cristalino material de silicato de alumínio hidratado, que pode ligar até 40% de íons de prata dentro de sua estrutura. A prata foi incorporada condicionadores de tecido, resinas acrílicas, e enxaguatórios bucais. A nanopartícula de prata, sozinha ou como um composto com outros agentes, têm mostrado resultados encorajadores, especialmente como agentes antimicrobianos.

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito antimicrobiano de biocompatibilidade e dispersão de Nanopartícula de prata, para possível uso como uma solução de irrigação no tratamento de canal, já que não há nenhum estudo sobre este material no domínio endodôntico. Dispersão de nanopartículas de prata foi comparado com solução de hipoclorito de sódio pois é amplamente utilizado como irrigante endodôntico.

No presente estudo, houve uma resposta leve do tecido em todos os grupos de tubos de dentina infectada. especialmente no Ag dispersão de NPs menor concentração (23 ppm). Nos grupos onde os tubos de dentina estavam infectados foi observada uma resposta inflamatória crônica intensa no início, que reduziu com o tempo.

No presente trabalho, com tubos de dentina infectada, o hipoclorito de sódio induziu uma resposta inflamatória moderada no início com uma ligeira redução após 30 dias, estando de acordo com o relatório anterior. O hipoclorito de sódio é uma das soluções irrigadoras mais populares e amplamente utilizadas na endodontia, devido à sua atividade antibacteriana e capacidade de dissolver os restos de tecido necrótico. O efeito antimicrobiano do hipoclorito de sódio resulta da formação do ácido hipocloroso (HOCl), quando em contato com resíduos orgânicos. HOCl exerce seu efeito pela oxidação dos grupos sulfidril no âmbito dos sistemas de enzimas bacterianas, assim interrompendo o metabolismo microbiano.

No presente trabalho constatou-se que a dispersão de nanopartícula de prata na concentração de 23ppm e o hipoclorito não tiveram ação antimicrobiana, sendo similar ao soro fisiológico e ao grupo controle que não recebeu nenhum tratamento após a contaminação. Tal fato pode ser explicado em função da metodologia empregada, pois 2mL das soluções foram utilizadas empregadas para irrigação dos tubos contaminados. Sabe-se que para um melhor saneamento dos canais radiculares é necessário o preparo biomecânico aliado ao emprego de soluções irrigadoras e posteriormente a utilização de curativo de demora (Holland et al., 2003). Uma vez que não só a luz dos tubos de dentina foram contaminados, mas também os seus túbulos dentinários, as soluções irrigadoras tiveram dificuldade de descontaminá-los de forma mais completa. Assim, explica-se a semelhança de resposta inflamatória da dispersão de nanopartícula de prata e do hipoclorito de sódio à solução salina e ao grupo controle, embora este último possuísse contaminação inclusive da luz do tubo de dentina. Outros estudos serão necessários para melhor analisar o comportamento deste material e confirmar os dados observados. Mas de maneira interessante o tecido se encontrava

mais organizado e com menos células inflamatórias no período de 30 dias, entretanto sem diferenças entre os tratamentos realizados.

Conclui-se com a metodologia utilizada que a dispersão de nanopartícula de prata na concentração de 23ppm e o hipoclorito de sódio não foram efetivos na descontaminação de tubos de dentina contaminados por saliva.

## **Conclusão**

Este estudo concluiu que a dispersão de Nanopartículas de Prata foi biocompatível quando comparada com a solução de Hipoclorito de Sódio, mas outros estudos são necessários para melhor analisar as propriedades deste material e confirmar os dados observados.

## Referências

1. American National Standards Institute/Revised American National Standards Institute American Dental Association Document No. 41 For recommended standard practices for biological evaluation of dental materials (1979). New York, NY: Am National Standards Institute.
2. Balazs DJ, Triandafillu K, Wood P, Chevolut Y, van Delben C, Harms H, et al. Inhibition of bacterial adhesion on PVC endotracheal tubes by RF-oxygen glow discharge, sodium hydroxide and silver nitrate treatments. *Biomaterials* 2004;25:2139–51.
3. Bosetti M, Massè A, Tobin E, Cannas M. Silver coated materials for external fixation devices: in vitro biocompatibility and genotoxicity. *Biomaterials* 2002;23:887–92.
4. Braydich-Stolle L, Hussain S, Schlager JJ, Hofmann MC. In vitro cytotoxicity of nanoparticles in mammalian germline stem cells. *Toxicol Sci* 2005;88:412–9.
5. Bystrom A, Sundqvist G. Bacteriologic evaluation of the efficacy of mechanical root canal instrumentation in endodontic therapy. *Scand J Dent Res* 1981 89: 321-328.
6. Chen D, Xi T, Bai J. Biological effects induced by nanosilver particles: in vivo study. *Biomed Mater*. 2007 Sep;2(3):S126-8.
7. Chou WL, Yu DG, Yang MC. The preparation and characterization of silverloading cellulose acetate hollow fiber membrane for water treatment. *Polym Adv Technol* 2005;16:600–7.
8. Costa CAS, Teixeira HM, Nascimento ABL, Hebling J (). Biocompatibility of two current adhesive resins. *J Endodon* 2000;26:512–6.
9. Federation Dentaire International Recommended standart practices for biological evaluation of dental materials. Federation Dentaire International Commission on Dental Materials, Equipment, and Therapeutics. (1980) Part 4.11: Subcutaneous implantation test. *International Dental Journal* 30:173–4.
10. Gomes BP, Souza SF, Ferraz CC, Teixeira FB, Zaia AA, Valdrighi L, Souza-Filho FJ. Effectiveness of 2% chlorhexidine gel and calcium hydroxide against

*Enterococcus faecalis* in bovine root dentine in vitro. *Int Endod J.* 2003 Apr;36(4):267-75

11. Gomes Filho JE, Gomes BPFA, Zaia AA, Novaes PD, Souza Filho FJ. Glycol Methacrylate: An alternative method for embedding subcutaneous implants. *J Endodon* 2001; 27:266-8.
12. Gomes-Filho JE, Bernabé PFE, Nery MJ, Otoboni-Filho JA, Dezan-Júnior E, Costa MMTM, Faria MD, Watanabe S, Gomes AC. Reaction of rat connective tissue to a new calcium hydroxide-based sealer. *Oral Surg Oral Med Oral Path Oral Radiol Endodon* 2008;106:71-6.
13. Gomes-filho JE, De Faria M, Bernabe P, Nery M, Otoboni Filho J, Dezanjunior E, Costa MM, Cannon M (). Mineral Trioxide Aggregate but not Light-cure Mineral Trioxide Aggregate Stimulated Mineralization. *J Endodon* 2008;34:62-65.
14. Gomes-Filho, J.E.; Watanabe, Simone; BERNABÉ, Pedro Felício Estrada; COSTA, Mariana Teixeira de Moraes (). A Mineral Trioxide Aggregate sealer stimulated mineralization. *J Endodon* 2009;2:256-60.
15. Harrison JJ, Ceri H, Turner RJ. Multimetal resistance and tolerance in microbial biofilms. *Nat Rev Microbiol* 2007;5:928–38.
16. Hess, W. Anatomy of root canals of the teeth of the permanent dentition. Sons and Danielson Ltd, 1925.
17. Imazato S, Ebara A, Torii M, Ebisu S. Antibacterial activity of dentine primer containing MDPB after curing. *J Dent* 1998;26:267–71.
18. Jia H, Hou W, Wei L, Xu B, Liu X. The structures and antibacterial properties of nano-SiO<sub>2</sub> supported silver/zinc-silver materials. *Dent Mater.* 2008 Feb;24(2):244-9.
19. Kakehashi S, Stanley HR, Fitzgerald RJ. The effects of surgical exposure of dental pulps in germ-free and conventional laboratory rats. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1965 18: 340-348.
20. Lee KJ, Nallathamby PD, Browning LM, Osgood CJ, Xu XH. In vivo imaging of transport and biocompatibility of single silver nanoparticles in early development of zebrafish embryos. *ACS Nano.* 2007 Sep;1(2):133-43.
21. Melaiye A, Youngs WJ. Silver and its application as an antimicrobial agent. *Expert Opin Ther Pat* 2005;15:125–30.

22. Moller AJ, Fabricius L, Dahlen G et al. Influence on periapical tissues of indigenous oral bacteria and necrotic pulp tissue in monkeys. *Scand J Dent Res* 1981 89: 475-484.
23. Oberdörster E. Manufactured nanomaterials (fullerenes, C60) induce oxidative stress in the brain of juvenile Largemouth Bass. *Environ Health Perspect* 2004;112:1058.
24. Ohashi S, Saku S, Yamamoto K. Antibacterial activity of silver inorganic agent YDA filler. *J Oral Rehabil* 2004;31:364–7.
25. Ozbas H, Yaltirik M, Bilgic B, Issever H () Reactions of connective tissue to compomers, composite and amalgam root-end filling materials. *Int Endod J* 2003;36:281-7.
26. Panáček A, Kvítek L, Pucek R, Kolár M, Vecerová R, Pizúrová N, et al. Silver colloid nanoparticles: synthesis, characterization, and their antibacterial activity. *J Phys Chem B* 2006;110:16248–53.
27. Parikh DV, Fink T, Rajasekharan K, Sachinvala ND, Sawhney APS, Calamari TA, et al. Antimicrobial silver/sodium carboxymethyl cotton dressings for burn wounds. *Text Res J* 2005;75:134–8.
28. Perez F, Calas P, de Falguerolles A, Maurette A. Migration of a *Streptococcus sanguis* strain through the root dentinal tubules. *J Endod*. 1993 Jun;19(6):297-301.
29. Peters OA, Laib A, Gohring TN et al. Changes in root canal geometry after preparation assessed by high resolution computed tomography. *J Endod* 2001 27: 1-6.
30. Roe D, Karandikar B, Bonn-Savage N, Gibbins B, Roullet JB. Antimicrobial surface functionalization of plastic catheters by silver nanoparticles. *J Antimicrob Chemother*. 2008 Apr;61(4):869-76.
31. RuppME, Fitzgerald T, Marion N, Helget V, Puumala S, Anderson JR, et al. Effect of silver-coated urinary catheters: efficacy, cost-effectiveness, and antimicrobial resistance. *Am J Infect Control* 2004;32:445–50.
32. Samuel U, Guggenbichler JP. Prevention of catheter-related infections: the potential of a new nano-silver impregnated catheter. *Int J Antimicrob Agents* 2004;23(Suppl. 1):S75–8.
33. Stobie N, Duffy B, McCormack DE, Colreavy J, HidalgoM,McHale P, et al. Prevention of *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation using a low-

temperature processed silver-doped phenyltriethoxysilane sol-gel coating. *Biomaterials* 2008;29:963-9.

34. Strathmann M, Wingender J. Use of an oxonol dye in combination with confocal laser scanning microscopy to monitor damage to *Staphylococcus aureus* cells during colonisation of silver-coated vascular grafts. *Int J Antimicrob Agents* 2004;24:234-40.
35. Sundqvist G. Ecology of the root canal flora. *J Endod* 1992 18: 427-430.
36. Ulkur E, Oncul O, Karagoz H, Yeniz E, Celikoz B. Comparison of silver-coated dressing (Acticoat), chlorhexidine acetate 0.5% (Bactigrass), and fusidic acid 2% (Fucidin) for topical antibacterial effect in methicillin-resistant staphylococci-contaminated, full-skin thickness rat burn wounds. *Burns* 2005;31:874-7.
37. Watari F, Takashi N, Yokoyama A, Uo M, Akasaka T, Sato Y, Abe S, Totsuka Y, Tohji K. Material nanosizing effect on living organisms: non-specific, biointeractive, physical size effects. *J R Soc Interface*. 2009 Jun 6;6 Suppl 3:S371-88.
38. Yaltirik M, Ozbas H, Bilgic B, Issever H (). Reactions of connective tissue to mineral trioxide aggregate and amalgam. *J Endodon* 2004;30:95-9.

## Anexos

Certificado da Aprovação da Comissão de Ética na Experimentação Animal



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
Campus de Araçatuba



COMISSÃO DE ÉTICA NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL  
(CEEA)

### CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto "RESPOSTA TECIDUAL A TUBOS DE DENTINA CONTAMINADOS E IRRIGADOS COM DISPERSÃO DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA A 23ppm OU HIPOCLORITO DE SÓDIO A 2,5%" sob responsabilidade do *Prof. Ass.Dr. João Eduardo Gomes Filho* e colaborador *Sara Vieira Pacanaro* está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela CEEA em 26/11/2009 de acordo com o protocolo 2009-008035.

Araçatuba, 26 de Novembro de 2009



**Prof.ª Adj. Tereza Cristina Cardoso da Silva**  
Presidente da CEEA-FOA/UNESP