

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)
autor(a), o texto completo desta tese
será disponibilizado somente a partir
de 19/09/2018.



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



GISSELLE MORAIMA CHÁVEZ ANDRADE

***ATIVIDADE ANTIMICROBIANA, ANTIBIOFILME E CITOTÓXICA DE
SOLUÇÕES DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA E FARNESOL PARA
DESINFECÇÃO DE CANAIS RADICULARES***

Araraquara

2016



UNESP - Universidade Estadual Paulista
"Júlio de Mesquita Filho"
Faculdade de Odontologia de Araraquara



GISSELLE MORAIMA CHÁVEZ ANDRADE

***ATIVIDADE ANTIMICROBIANA, ANTIBIOFILME E CITOTÓXICA DE
SOLUÇÕES DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA E FARNESOL PARA
DESINFECÇÃO DE CANAIS RADICULARES***

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em
Odontologia - Área de Endodontia, da Faculdade de
Odontologia de Araraquara, da Universidade
Estadual Paulista - UNESP, para obtenção do Título
de Doutor em Odontologia.

Orientador: Profa. Dra. Juliane Maria Guerreiro
Tanomaru

Araraquara

2016

Chávez Andrade, Gisselle Moraima

Atividade antimicrobiana, antibiofilme e citotóxica de soluções de nanopartículas de prata e farnesol para desinfecção de canais radiculares / Gisselle Moraima Chávez Andrade.-- Araraquara: [s.n.], 2016.

88 f. ; 30 cm.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia

Orientadora: Profa. Dra Juliane Maria Guerreiro Tanomaru

1. Preparo de canal radicular
 2. Produtos com ação antimicrobiana
 3. Técnicas de cultura de células
- I. Título

GISSELLE MORAIMA CHÁVEZ ANDRADE

COMISSÃO JULGADORA

TESE PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE DOUTOR

Presidente e Orientador: Profa. Dra. Juliane Maria Guerreiro Tanomaru

2º Examinador: Profa. Dra. Gisele Faria

3º Examinador: Profa. Dra. Denise Madalena Palomari Spolidoro

4º Examinador: Prof. Dr. Evandro Watanabe

5º Examinador: Prof. Dr. Paulo Henrique Weckwerth

Araraquara, 19 de setembro de 2016

DEDICATÓRIA E AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

A **Deus**, pelas inúmeras graças e pela sua infinita misericórdia, a quem devo minha vida e tudo o que eu sou.

A **Maria, Nossa Senhora e Mãe**, pela sua intercessão e benção, por estar sempre comigo em todos os momentos e guiando minhas decisões.

À minha querida filha, **Nicolle Alexia C. Chávez**, meu motor, minha vida, por estar comigo, pela sua especial companhia, pela força que me proporciona para não desistir. Muita obrigada pela sua paciência. *“Eres el regalo más precioso que Dios me dio, espero merecer tanta dicha. Me llenas de orgullo siempre con tus logros, querida”*.

Aos meus amados pais, **Alberto Pío Chávez Perez e Moraima Alicia Andrade**, pelo seu amor, carinho e apoio, por não deixar que desista dos meus sonhos. *“Que Dios los bendiga y cuide siempre. Sin ustedes y sin su apoyo no lo hubiera conseguido. Los amo mucho”*.

À minha querida irmã, **Rocio M. Chávez Andrade Rocha**, por me apoiar incondicionalmente nestes anos, por ser mais que uma tia-madrinha para minha Nicolle, por cuidar de nós com devoção, sem você não teria como realizar este sonho.

Ao meu cunhado, **Marcelo A. S. Rocha**, por me receber em sua casa, pelo carinho de irmão, pelo seu apoio, por cuidar de nós desde que chegamos ao Brasil, sem sua ajuda não estaria aqui agora.

À minha sobrinha e afilhada **Graziella Mariah Chávez Rocha**, pelo seu carinho e companhia, por compartilhar sua vida com nós de forma tão especial. Amo você demais, minha querida.

Ao meu sobrinho lindo **Rafael Antônio Chávez Rocha**, a tia ama você de paixão e agradeço ao Senhor pela sua vida que ilumina meu existir.

Aos meus avós, **Analicia e Ismael Andrade** (*in memoriam*), muito obrigada pela sua dedicação e amor, sempre me apoiando, sei que desde o céu continuam me abençoando e intercedendo ante Deus por mim. *Gracias abuelitos, los amo y recuerdo con cariño.*

À minha prima **Ângela Dias Velasco** (*in memoriam*), pela sua sabedoria e conselhos, pelo seu carinho para com todos nós, sempre torcendo por mim, você nunca duvidou que eu estaria aqui agora, muito obrigada, sei que mesmo no céu continua torcendo por mim e intercedendo junto a Deus por todos nós.

À família do meu cunhado, **Sr. Silvio Rocha** (*in memoriam*), **Dona Conceição, Silvinho e Michelle**, muito obrigada pelo carinho e acolhida.

À minha madrinha, **Siria Andrade**, por ser mais que uma tia, sempre comigo, me apoiando em todos os momentos da minha vida e em meus estudos, obrigada por acreditar, junto comigo, em meus sonhos.

Aos meus afilhados, **Victor Hugo Quevedo e Ivonne Penadillo**, lembrar de vocês com carinho, me deu muita força e alegria.

Aos meus primos, **Cinthyá Quevedo Andrade, Julissa e Franco Pereyra Andrade**, por estar sempre comigo, amo muito vocês e agradeço pelo carinho de irmãos.

A toda minha família: tios e primos, que sempre me apoiaram, e apesar da distância, senti que estavam comigo, nos meus momentos bons e nos difíceis, dando-me forças para continuar e não desistir, sempre presentes e agora estou aqui graças a vocês.

À **Dona Ilda Tomazini**, por ser minha mãezinha aqui em Araraquara, muito obrigada por tudo o que a senhora faz por mim, eu amo muito você.

À **Andréia Panhan e Marcelo Lima**, e aos professores da Escola **Interação Idiomas**, pela amizade, ajuda, apoio e linda convivência.

À **Dona Iara, Dona Leliana** e **Sr. Lucarelli**, que me ajudaram muito com os estudos de Nicolle, assim como a todos os professores das escolas *Prof. Jose Roberto Pádua Camargo, Fantasia Sapiens, Colégio Progresso* e *Colégio Conexão*, obrigada pelo apoio, Deus os abençoe nesta sublime tarefa.

As minhas amigas do **Clube de Vôlei – SESC Araraquara**, assim como aos treinadores, **Gabi** e **Igor**. Muito obrigada pelo carinho, amizade, pela força, pelos lindos momentos compartilhados nesses anos e pelos momentos de lazer. São muito especiais para mim e estarão no meu coração sempre.

Às minhas amigas do grupo de intercessão do *Seminário de vida no Espírito Santo*, **Mara C. Amaral, Cleide Rigolin, Fátima Sacomano, Marcia e dona Maria**, muito obrigada pela amizade, linda convivência durante todos esses anos e apoio espiritual. São pessoas muito especiais para mi e quero que saibam que são o apoio e força nos dias de dúvidas, tristezas e de preocupações, assim como nas alegrias e conquistas. Que o Espírito Santo de Deus sempre guie seus caminhos.

Aos meus amigos do grupo de oração “*Enchei-vos*” da Casa Comunitária – Paróquia “Nossa Senhora das Graças”, em especial para **Rose, Zilda, Wellington, Fátima Rigolin, Vera, Mônica, Cristina, Lurdinha, Silvana, Rita, Wilma, Sandra, Elaine, Telma**. Agradeço pelo carinho, amizade, pela caminhada juntos, pelos dias lindos que compartilhamos e pelas mensagens de amor.

Ao **Padre Emílio Carlos Mancini** e ao **Padre Jean Franco de Toledo**, pelas mensagens de amor, paz e esperança. Obrigada pelo apoio espiritual.

Aos amigos da Paróquia *Santa Ângela de Mérici*, em especial para o Pároco **Padre Geanfranco A. Pereira, Dona Vera, Regina Brand e Arquibaldo, Roberto e Gláucia, Ricardo e Andréia, Djanira e Betinho, Luzia, Bruno, Thiago, Tereza, Dona Célia, Dona Maria, Dona Cristina e Karina, Florisvaldo e Geralda, Sergio e Tânia, Camila e Marcelo, Rafael e Tina, Carlinhos e Débora, Oswaldo e Laís, Leonardo e Patricia, Dona Cida, Cristina Zampieri** e a todos os Ministros da Eucaristia e a equipe de liturgia. São minha família.

AGRADECIMENTOS

À *Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP)*, na pessoa de seu Magnífico Reitor Prof. Dr. Julio Cezar Durigan.

À *Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP*, na pessoa da sua Diretora Profa. Dra. Elaine Maria Sgavioli Massucato e vice-diretor Prof. Dr. Edson Alves Campos.

Ao *Departamento de Odontologia Restauradora* da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP, representado pela Chefe de Departamento Profa. Dra. Alessandra Nara de Souza Rastelli e vice-chefe Profa. Dra. Juliane M. Guerreiro Tanomaru.

Ao *Programa de Pós-Graduação em Odontologia – Área de Endodontia*, coordenado pelo Prof. Dr. Carlos Rossa Junior.

À *Profa. Dra. Juliane Maria Guerreiro Tanomaru*, orientadora do Mestrado e Doutorado. A caminhada junto da professora só me fez crescer, no profissional e no pessoal. Obrigada pelo apoio constante durante o desenvolvimento deste trabalho e pelas oportunidades que sempre me brindou, assim como pela amizade que só cresceu nesses anos de convivência. Com a professora aprendi a ter calma e confiança, e os seus ensinamentos foram muitos valiosos para mim. Minha eterna gratidão, admiração e respeito.

Ao *Prof. Dr. Mário Tanomaru Filho*, quem me deu a oportunidade de conhecer a pesquisa e amá-la. Muito obrigada pelos seus conselhos e ensinamentos, sempre com palavras de ânimo e até de consolo, que me ensinou que não se pode desistir e que todo pode ser possível com muito trabalho e dedicação. Muito obrigada professor pela ajuda no desenvolvimento desta tese.

À *Profa. Dra. Gisele Faria*, muito obrigada pela sua amizade, carinho, apoio e colaboração neste trabalho. Agradeço seus ensinamentos, conselhos e os momentos de descontração compartilhados.

Aos **docentes do Departamento de Odontologia Restauradora** da Faculdade de Odontologia de Araraquara, em especial aos professores da disciplina de Endodontia, **Prof. Dr. Idomeo Bonetti Filho, Prof. Dr. Renato de Toledo Leonardo, Dr. Fábio Luiz Camargo Vilella Berbert e Prof. Dr. Milton Carlos Kuga**, pela linda convivência e pelo carinho. Obrigada pelo apoio e pelos conhecimentos dados durante o curso que com certeza serão valiosos para minha formação profissional.

Aos **funcionários do Departamento de Odontologia Restauradora** desta Faculdade, Creusa, Dona Cida, Marinho, Vanderlei, Priscila, Alessandra (*in memoriam*) e Maria Ap. “Cida”. Muito obrigada pela amizade, permanecerão para sempre no meu coração.

Aos **funcionários da Seção ERAPI** desta faculdade, Renan e Tarciso, muito obrigada pela atenção e apoio.

Aos **funcionários da Seção de Pós-Graduação**, Mara, Alexandre e Cristiano, pela ajuda, paciência e simpatia. Obrigada por ficarem sempre à disposição.

Aos **funcionários da Biblioteca**, Ceres, Marley, Adriano, Inês, Cristina, Silvia, Eliane e Disleide, pelo auxílio nas pesquisas bibliográficas e na documentação.

Às **funcionárias da Seção de Comitê de Ética, CEP e CEUA**, Viviane e Fernanda, pela ajuda proporcionada durante este período.

Aos **funcionários desta Faculdade**, em especial para Diva, Silvia Helena, Décio, Cristina, Helena, Maria, Vera, Fernando, Paula.

Aos **colegas de Pós-Graduação**, Ariele P. Rabello, Paula Nakasone, Alana Aguiar, Natalia Kalatzis, Bernardo Costa, Carolina Venção, Miriam Magro, Lauriê Garcia, Carolina Andolfatto, Leticia Mestieri, Tiago Fonseca, Keli Victorino, Kennia Scapin Viola, Gabriela Castro, Katia Keine, Rodrigo Vasconcelos, Larissa Torres, Aline Andrade, Derik Barbosa, Roberto Hoshino, Livia Finotti, Thalita Boldieri, pela convivência, amizade e companheirismo. Muito obrigada por serem mais que colegas, são para mim o mais próximo de “uma família”. Eu amo muito vocês, permanecerão no meu coração para sempre.

A minha colega de Pós-graduação, amiga e vizinha, **Camila Almeida Nascimento Mendes “Camis”**, muito obrigada pela sua companhia e carinho durante todos esses anos, durante o Mestrado e Doutorado, eu não tenho como agradecer a Deus por ter colocado você na minha vida. Obrigada pelo seu apoio, companhia e alegria sem par.

Um agradecimento muito especial para duas pessoas, dois anjos que me apoiaram incondicionalmente e por quem tenho um enorme carinho, de “mãe mesmo”, **Camila Espir Passador** e **Fernanda Ferrari Esteves Torres**. Muito obrigada pela amizade, carinho, paciência e compreensão, sei que eu não poderei nunca pagar o que vocês fizeram por mim, sempre dispostas a me ajudar, a me escutar e compartilhar comigo momentos de alegrias, dificuldades e tristezas, que permanecerão na minha alma e no meu coração. Minha eterna gratidão, filhotas queridas.

Ao meu grande amigo, colega de Pós-graduação, **Arturo Aranda**, obrigada pelo apoio assim como um agradecimento ao aluno de Mestrado **Fernando A. Vasquez**, foi um prazer ter conhecido vocês e “*que viva México*”.

Um especial agradecimento para os Pós-doutorandos, **Roberta Bosso-Martelo**, **Elisandra Marcia Rodrigues**, **Raqueli Viapiana “a Raqualis A”** e **Guilherme Ferreira da Silva**, e para a aluna de Doutorado **Ana Livia Gomes Cornélio**. Cada um de vocês me ajudou em algum momento desta jornada que hoje culmino, me ajudaram em algumas etapas experimentais, sem o apoio de vocês não tivesse sido possível. Minha eterna gratidão.

Uma especial homenagem ao Pós-graduando **Adinael Trindade Junior** (*in memoriam*), meu amigo querido, foi um enorme prazer ter conhecido você e espero que como um anjinho, continues intercedendo por nós.

A **FAPESP** (nº 2012/11362-8) e **CAPES** pela concessão das bolsas de estudos.

A todas as pessoas que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho, os mais sinceros agradecimentos.

DADOS CURRICULARES

GISSELLE MORAIMA CHÁVEZ ANDRADE

NASCIMENTO	25/01/1972 – Jesus Maria, Lima - Peru
FILIAÇÃO	Máximo Pío Alberto Chávez Pérez Moraima Alicia Andrade Elcorrobarrutia de Chávez
1990 – 1996	Graduação em Odontologia na Universidad Particular de San Martín de Porres (USMP), Lima - Peru.
1997	Bacharel em Odontologia (USMP), Lima – Peru.
1998	Título de Cirurgiã-Dentista (USMP), Lima – Peru.
2007 – 2008	Aperfeiçoamento em Endodontia na Fundação Araraquarense de Ensino e Pesquisa em Odontologia (FAEPO), Araraquara, SP - Brasil.
2008 – 2009	Pós-graduação em Odontologia – Área de Endodontia, nível de Mestrado (aluna especial), na Faculdade de Odontologia de Araraquara, Universidade Estadual Paulista – UNESP.
2010 – 2012	Pós-graduação em Odontologia – Área de Endodontia, nível de Mestrado, na Faculdade de Odontologia de Araraquara, Universidade Estadual Paulista – UNESP.
2012 – 2016	Pós-graduação em Odontologia – Área de Endodontia, nível de Doutorado, na Faculdade de Odontologia de Araraquara, Universidade Estadual Paulista – UNESP.
ASSOCIAÇÕES	SBPqO – Sociedade Brasileira de Pesquisa em Odontologia. IADR – International Association for Dental Research.

Salmo 145

Louva ao Senhor

Louva ao Senhor, ó minha alma!

*Enquanto eu viver, vou louvar ao Senhor!
vou tocar ao meu Deus, enquanto eu existir!*

*Não coloqueis a segurança nos nobres
nos filhos dos homens que não podem salvar.
Exalam o espírito e voltam à terra, e
no mesmo dia perecem seus planos!*

*Feliz quem se apoia no Deus de Jacó,
quem põe a esperança no Senhor seu Deus:
foi ele quem fez o céu e a terra,
o mar e tudo o que neles existe.*

*Ele mantém para sempre a verdade:
fazendo justiça aos oprimidos
dando pão aos famintos;
Senhor liberta os prisioneiros,*

*O Senhor abre os olhos dos cegos,
Senhor endireita os curvados,
Senhor ama os justos.*

*O Senhor protege os estrangeiros;
sustenta o órfão e a viúva,
mas transtorna o caminho dos ímpios.*

*O Senhor reina para sempre,
teu Deus, ó Sion, de geração em geração!
Louva ao Senhor!*

Chávez-Andrade GM. Atividade antimicrobiana, antibiofilme e citotóxica de soluções de nanopartículas de prata e farnesol para desinfecção de canais radiculares [Tese de Doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2016.

RESUMO

Nanopartículas de prata (NPsAg) apresentam ação bactericida e biocompatibilidade, mostrando potencial para aplicações na Odontologia. Farnesol (FAR) é um álcool encontrado em óleos essenciais de frutas cítricas e apresenta atividade antibacteriana/antibiofilme. O objetivo deste estudo foi avaliar a atividade antimicrobiana, antibiofilme e a citotoxicidade de soluções de NPsAg e FAR, para serem utilizadas na desinfecção de canais radiculares. O estudo foi dividido em duas publicações. Na **Publicação 1**, a atividade antimicrobiana foi avaliada sobre *Enterococcus faecalis*, *Candida albicans* ou *Pseudomonas aeruginosa*, por meio da determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e microbicida mínima (CMM) pelo método de microdiluição e coloração com resazurina. A avaliação da atividade sobre a biomassa dos biofilmes foi realizada por meio do ensaio de cristal violeta. A capacidade anti-adesão de biofilme foi avaliada em blocos de dentina radicular bovina após tratamento da dentina com as soluções por 3 min. Foram realizadas análises em microscopia eletrônica de varredura (MEV) e contagem de UFC mL⁻¹ log 10. Os dados foram submetidos à análise estatística ($\alpha=0,05$). No teste antibacteriano sobre células planctônicas de *E. faecalis*, os valores de CIM/CMM das soluções de NPsAg e FAR foram de 42,5/50 μ M e 0,85/1,0%, respectivamente. Para *C. albicans*, os valores de CIM/CMM de NPsAg e FAR foram de 27,5/37,5 μ M e 1,75/2,5%, respectivamente. Para *P. aeruginosa*, os valores de CIM/CMM de NPsAg e FAR foram de 32,5/32,5 μ M e 2,5/2,75%, respectivamente. Ambas as soluções mostraram atividade sobre a biomassa dos biofilmes, porém foram menos efetivas do que NaOCl. Na avaliação da capacidade anti-adesão de biofilme, NPsAg e FAR mostraram menor quantidade de biofilme aderido ao substrato quando comparados ao controle (SS-salina), porém sem diferença entre as duas soluções ($p>0,05$), exceto sobre *C. albicans*. Na contagem de UFC mL⁻¹, pode-se observar que não houve diferença entre as soluções de NPsAg e FAR ($p>0,05$), sendo similares ao controle (SS), para as 3 cepas avaliadas. Na **Publicação 2**, foi avaliada a citotoxicidade e genotoxicidade das soluções em cultura de fibroblastos L929, por meio dos ensaios de MTT e Cometa, respectivamente. Para avaliar ex vivo a efetividade antibacteriana, foram realizados diferentes protocolos de irrigação na etapa final do preparo biomecânico em dentes humanos extraídos contaminados com *E. faecalis* por 21 dias. Após 3 coletas microbiológicas (inicial, pós-irrigação e final), foi realizada a contagem de UFC mL⁻¹ em cada grupo. Os dados obtidos foram analisados estatisticamente ($\alpha=0,05$). No ensaio MTT, NPsAg e FAR foram menos citotóxicos do que NaOCl. No ensaio Cometa, ambas as soluções mostraram menor % de DNA na cauda, em comparação ao controle positivo (H₂O₂). No ensaio antibacteriano, todos os protocolos de irrigação foram mais efetivos que o C+ (sem irrigação), com exceção de SS/FAR. NaOCl e sua combinação com NPsAg e FAR levaram a completa eliminação bacteriana ($p>0,05$). Em comparação à coleta inicial, tanto a coleta pós-irrigação quanto final, apresentaram redução microbiana significativa ($p<0,05$). NPsAg e FAR mostraram baixa citotoxicidade e genotoxicidade, contribuem com a redução de *E. faecalis* e apresentam potencial para uso em protocolos de irrigação final do SCR.

Palavras-chave*: Preparo de canal radicular. Produtos com ação antimicrobiana. Técnicas de cultura de células.

* Conforme Descritores em Ciências da Saúde – DeCS (Bireme) e Normas FOAr.

Chávez-Andrade GM. Antimicrobial, anti-biofilm and cytotoxic activities of silver nanoparticles and farnesol solutions to root canal disinfection [Tese de Doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2016.

ABSTRACT

Silver nanoparticles (AgNPs) have potential for applications in dentistry due to bactericidal action and biocompatibility. Farnesol (FAR) is an alcohol found in essential oils of citrus fruits and it has antibacterial/antibiofilm activity. The aim of this study was to evaluate the antimicrobial, antibiofilm activities and the cytotoxicity of AgNPs and FAR solutions used as root canal disinfectant. The study was divided into two publications. In **Publication 1**, antimicrobial activity was evaluated against *Enterococcus faecalis*, *Candida albicans* or *Pseudomonas aeruginosa*, by determining the minimum inhibitory concentration (MIC) and the minimum microbicidal concentration (MMC) by microdilution method and rezasurin staining. The anti-biofilm activity was performed by crystal violet assay. The anti-biofilm adhesion ability was evaluated using bovine root dentine blocks after treating them with tested solutions for 3 min. Scanning electron microscopy (SEM) analysis and CFU mL⁻¹ log 10 counting were performed. Data were statistically analyzed ($\alpha=0.05$). The antibacterial test against planktonic cells of *E. faecalis* showed MIC/MMC values of 42.5/50 μ M and 0.85/1.0% for AgNPs and FAR, respectively. The values of MIC/MMC of AgNPs and FAR for *C. albicans* were 27.5/37.5 μ M and 1.75/2.5% and for *P. aeruginosa* were 32.5/32.5 μ M and 2.5/2.75%, respectively. The anti-adhesion biofilm capacity assay showed smaller amount of biofilm adhered to the substrate treated with AgNPs and FAR when compared to control group (saline solution - SS), but there was no statistical difference between the two solutions ($p>0.05$), except for *C. albicans*. The log 10 UFC mL⁻¹ counting showed no statistical difference between AgNPs and FAR solutions ($p>0.05$), which were similar to the control group (SS) for all strains. In **publication 2**, the cytotoxicity and genotoxicity of the solutions were evaluated in culture cell of fibroblast L929 by MTT and Comet assays, respectively. To evaluate the ex vivo antibacterial effectiveness, different irrigation protocols were performed in the final stage of root canal instrumentation on extracted human teeth infected with *E. faecalis* for 21 days. The number of log 10 CFU mL⁻¹ in each group was determined in microbiological samples collected at different periods (initial, post-irrigation and final). Data were statistically analyzed ($\alpha=0.05$). In the MTT assay, AgNPs and FAR were less cytotoxic than NaOCl. In the Comet assay, both solutions showed lower % of DNA in the tail, compared to positive control (H₂O₂). In the antimicrobial assay, all the irrigating protocols were more effective than C+ (without irrigation), with exception of SS/FAR. NaOCl and their combinations with AgNPs or FAR led to complete bacterial elimination ($p>0.05$). In comparison with initial sample, both the post-irrigation and final samples showed significant microbial reduction ($p<0.05$). AgNPs-PVA and FAR showed low cytotoxicity and genotoxicity, contribute to *E. faecalis* reduction and exhibit potential for use as a final irrigation protocols of the RCS.

Keywords*: Root canal preparation. Products with antimicrobial action. Cell culture techniques.

* Conforme Descritores em Ciências da Saúde – DeCS (Bireme) e Normas FOAr.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 PROPOSIÇÃO	23
3 PUBLICAÇÃO 1	24
4 PUBLICAÇÃO 2	42
5 DISCUSSÃO	58
6 CONCLUSÃO.....	67
REFERÊNCIAS	68
APÊNDICE	78
ANEXO.....	82

1 INTRODUÇÃO

O tratamento endodôntico tem como objetivos a limpeza, desinfecção, conformação e obturação do sistema de canais radiculares (SCR), eliminando restos pulpares, micro-organismos e subprodutos que são fatores etiológicos das alterações pulpares e perirradiculares e, por conseguinte do insucesso da terapia endodôntica (Beus et al.¹⁴, 2012; Siqueira et al.¹⁰⁴, 2002; Townsend, Maki¹⁰⁹, 2009). O preparo biomecânico contribui para o controle da infecção no SCR, por meio da ação mecânica dos instrumentos endodônticos e da ação físico-química das soluções irrigadoras (Sakamoto et al.⁹⁶, 2007). A irrigação visa limpeza e desinfecção (Costa et al.²⁸, 2012) e sua eficácia depende dos métodos utilizados promovendo contato da solução irrigadora com as estruturas anatômicas dos canais radiculares (Camos et al.¹⁹, 2009; Lin et al.⁶³, 1992; Mitchell et al.⁷⁰, 2010).

A persistência de micro-organismos no SCR favorece o desenvolvimento e manutenção das alterações apicais e periapicais contribuindo para o insucesso do tratamento (Gergova et al.³⁸, 2016; Sakamoto et al.⁹⁶, 2007; Siqueira¹⁰², 2002). Micro-organismos, tais como *Enterococcus*, *Pseudomonas* e *Candida*, são considerados os mais resistentes encontrados em canais radiculares infectados e têm sido frequentemente isolados em casos de infecção persistente/secundária e de insucessos do tratamento endodôntico, com especial destaque para *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Candida albicans* (Cheung, Ho²², 2001; Chugal et al.²⁴, 2011; Mohammadi et al.⁷², 2012; Ranta et al.⁹², 1988; Samiei et al.⁹⁷, 2013; Siqueira, Rocas¹⁰³, 2004).

Enterococcus faecalis é uma bactéria anaerobia facultativa Gram-positiva presente em casos de infecção primária, mas que representa uma espécie predominante na infecção secundária e/ou persistente e tem ganhado a atenção dos pesquisadores pela sua habilidade de invadir os túbulos dentinários, aderir-se ao colágeno e de persistir após tratamento e obturação dos canais radiculares. Além disso, *E. faecalis* é capaz de sintetizar toxinas contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas e desenvolver uma mono-infecção por eliminar outros micro-organismos (Blome et al.¹⁵, 2008; Tennert et al.¹⁰⁸, 2014). *Candida albicans* é uma espécie microbiana oportunista que tem como principal fator de virulência a capacidade de formar biofilme e é frequentemente encontrada em canais radiculares infectados, sendo considerada a espécie fúngica mais comumente isolada em casos de infecções persistentes devido a sua capacidade de invadir os túbulos dentinários e resistir à ação dos agentes antimicrobianos (Mohammadi et al.⁷², 2012; Samiei et al.⁹⁷, 2013; Siqueira, Sen¹⁰⁵, 2004).

Outra espécie bacteriana, *Pseudomonas aeruginosa*, é um bacilo aeróbio Gram-negativo considerado um patógeno oportunista (Kalishwaralal et al.⁵³, 2010; Kora, Arunachalam⁵⁹, 2011) envolvido no estabelecimento de diversas infecções e também tem sido isolado em canais radiculares com infecção secundária/persistente (Cheung, Ho²², 2001; Ranta et al.⁹², 1988; Samiei et al.⁹⁷, 2013). Por esses motivos tem sido incluída em estudos in vitro que avaliam a atividade antimicrobiana e antibiofilme de substâncias usadas nas áreas médica e odontológica (Gergova et al.³⁸, 2016; Gurunathan et al.⁴², 2014; Hinenoya et al.⁴⁶, 2015; Konigs et al.⁵⁸, 2015; Mohammadi et al.⁷², 2012; Oliveira et al.⁷⁸, 2015; Perin et al.⁸⁵, 2004; Phee et al.⁸⁷, 2013; Samiei et al.⁹⁷, 2013).

A solução de hipoclorito de sódio (NaOCl) é a mais utilizada como solução irrigadora na Endodontia devido a sua ação antimicrobiana, assim como por sua propriedade de dissolução dos tecidos orgânicos (Al-Jadaa et al.⁴, 2009; Estrela et al.³⁴, 2002; Poggio et al.⁸⁸, 2012; Spratt et al.¹⁰⁶, 2001). No entanto, é conhecida também sua citotoxicidade, podendo causar complicações quando em contato com os tecidos periapicais (Camos et al.¹⁹, 2009; Gondim et al.⁴⁰, 2010; Mehdipour et al.⁶⁹, 2007; Psimma et al.⁹⁰, 2013). Ainda, NaOCl diminui significativamente a elasticidade e resistência flexural da dentina humana pela ação proteolítica na matriz de colágeno, desta maneira interfere na formação da camada híbrida (Lahor-Soler et al.⁶⁰, 2015; Zehnder¹¹⁵, 2006). De acordo com a literatura, alterações na superfície da dentina afetam a adesão dos cimentos obturadores do canal radicular à dentina. Estudos tem demonstrado que o uso de NaOCl como irrigante final produz uma diminuição significativa na resistência de união com as paredes dentinárias e uma deficiente adesão (Lahor-Soler et al.⁶⁰, 2015; Vilanova et al.¹¹¹, 2012). Desta maneira, substâncias químicas e associações, estão sendo estudadas como alternativa ao uso do NaOCl (Alves et al.⁶, 2013; Moghadas et al.⁷¹, 2012; Mohammadi et al.⁷², 2012; Poggio et al.⁸⁸, 2012).

Os benefícios potenciais da nanotecnologia em aplicações biomédicas e industriais tornaram-se amplamente aceitos e é o setor mais promissor para a geração de novas aplicações na medicina (Franci et al.³⁶, 2015; Gurunathan et al.⁴², 2014; Palanisamy et al.⁸¹, 2014). Nesse contexto, destacam-se as NPsAg (Allaker⁵, 2010; Dankovich, Gray³⁰, 2011; Mahmoudi, Serpooshan⁶⁷, 2012; Monteiro et al.⁷⁴, 2011; Wady et al.¹¹³, 2012; Zhang et al.¹¹⁸, 2013) que apresentam atividades antibacteriana, antiviral e antibiofilme (Franci et al.³⁶, 2015; Kalishwaralal et al.⁵³, 2010; Zhang et al.¹¹⁸, 2013), e podem ser usadas como coadjuvante no tratamento de doenças infecciosas (Gurunathan et al.⁴², 2014; Kalishwaralal et al.⁵³, 2010).

A prata (Ag^+) é conhecida por apresentar atividades antibacteriana, antifúngica e antiviral, baixa toxicidade, estabilidade térmica elevada e baixa volatilidade (Allaker⁵, 2010;

Arai et al.⁸, 2015; Cheng et al.²¹, 2012; Zhang et al.¹¹⁸, 2013) e uma variedade de compostos de Ag^+ tem sido utilizada como agentes tópicos aplicados para o tratamento de queimaduras, feridas e infecções oculares (Bressan et al.¹⁶, 2013; Haase et al.⁴³, 2012; Kawahara et al.⁵⁷, 2000; Morones et al.⁷⁶, 2005). NPsAg são mencionadas como as NPs mais comercializadas no mundo (Haase et al.⁴³, 2012) e têm recebido muita atenção por serem incorporadas em vários materiais utilizados como agentes terapêuticos para prevenir a colonização bacteriana sobre dispositivos médicos, tais como cateteres e próteses ortopédicas, assim como na indústria alimentícia e cosmética (Allaker⁵, 2010; Arai et al.⁸, 2015; Jia et al.⁵¹, 2008; Mohanty et al.⁷³, 2012; Zhang et al.¹¹⁶, 2014).

Como mencionado anteriormente, NPsAg apresentam propriedade bactericida e excelente biocompatibilidade, com potencial aplicabilidade biomédica (AshaRani et al.¹⁰, 2009; Paino, Zucolotto⁸⁰, 2015; Zhang et al.¹¹⁶, 2014). No entanto, Ag^+ em forma de nanopartícula tem sido relacionada com possíveis efeitos adversos e toxicológicos para saúde dos seres humanos e do meio ambiente (Allaker⁵, 2010; Haase et al.⁴³, 2012; Paino, Zucolotto⁸⁰, 2015; Suresh et al.¹⁰⁷, 2013).

Os efeitos antibacterianos das NPsAg têm sido descritos, mas o seu mecanismo de ação e os efeitos tóxicos sobre os micro-organismos ainda não são conclusivos (Franci et al.³⁶, 2015; Gao et al.³⁷, 2013; Mohanty et al.⁷³, 2012; Zhang et al.¹¹⁸, 2013). A atividade antibacteriana tem sido atribuída à liberação lenta de íons Ag^+ da superfície das NPsAg (Dankovich, Gray³⁰, 2011; Gao et al.³⁷, 2013; Morones et al.⁷⁶, 2005). Alguns estudos propõem que as NPsAg formam deposições e interagem com a parede celular microbiana, exercendo um efeito tóxico pela inativação de suas enzimas essenciais (Mohanty et al.⁷³, 2012; Morones et al.⁷⁶, 2005), aumento da permeabilidade da membrana e dano do citoplasma e ao DNA bacteriano (Haase et al.⁴³, 2012; Konigs et al.⁵⁸, 2015; Morones et al.⁷⁶, 2005).

Pelo menos dois mecanismos têm sido propostos para interpretar a atividade antibacteriana da prata. Em primeiro lugar, as NPsAg poderiam se ligar à membrana celular bacteriana, causando mudanças estruturais ou danos funcionais. A consequente redução crítica da atividade enzimática provocaria alterações no metabolismo dos micro-organismos e inibição do seu crescimento, ou até a morte da célula. O aumento da lesão na membrana poderia ser esperado a partir dos aglomerados de Ag. Por outro lado, os íons Ag^+ podem ser liberados a partir de nanopartículas e catalisar a produção de radicais de oxigênio que oxidam a estrutura molecular das bactérias. O mecanismo não necessita do contato direto entre o agente antibacteriano e as bactérias, porque o oxigênio ativo produzido se difunde para o

ambiente envolvente, que poderia inibir a multiplicação de micro-organismos (Zhang et al.¹¹⁸, 2013).

Devido à diferença estrutural na composição das paredes celulares de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, as NPsAg têm, significativamente, menos efeito sobre o crescimento de bactérias Gram-positivas. As bactérias Gram-negativas apresentam uma camada externa de lipopolissacarídeo, e apresenta uma camada fina (7-8 nm) de peptidoglicanos. A carga negativa dos lipopolissacarídeos atrai a carga positiva fraca das NPsAg. Por outro lado, a parede celular das bactérias Gram-positivas é composta principalmente por uma camada espessa (20-80 nm) de peptidoglicanos, formando uma estrutura rígida tridimensional. A rigidez e a extensão de reticulação não só reduz a ligação das NPsAg à parede celular bacteriana, mas também a torna mais difícil de ser penetrada (Franci et al.³⁶, 2015).

Sabe-se também que quanto menor o tamanho da partícula, maior a área de contato com a membrana microbiana proporcionando maior efeito bactericida (Monteiro et al.⁷⁴, 2011; Panacek et al.⁸³, 2006; Suresh et al.¹⁰⁷, 2013). O tamanho da NPAg, menor que 5 nm, apresenta um coeficiente de difusão em biofilme de *Pseudomonas fluorescens* de 60-80% (Peulen, Wilkinson⁸⁶, 2011). Outro estudo (Morones et al.⁷⁶, 2005) avaliou o efeito antibacteriano de várias concentrações de NPsAg (1-100 nm) sobre bactérias Gram-negativas. Os resultados demonstraram que a concentração de NPsAg que impede o crescimento bacteriano é diferente para cada cepa avaliada e que as NPsAg de 1-10 nm se aderem na superfície da membrana/parede celular e perturbam o bom funcionamento da bactéria, tais como permeabilidade e respiração.

Holtz et al.⁴⁷ (2012) avaliaram a atividade antibacteriana de um nanomaterial para ser utilizado como agente antibacteriano, o vanadato de prata nanoestruturado, que é composto de NPsAg (5-40 nm), sobre várias cepas por meio do teste de microdiluição. Neste estudo foi demonstrada a atividade das NPsAg sobre *E. faecalis* indicando um amplo espectro antibacteriano. Por outro lado, Monteiro e colaboradores avaliaram o efeito das NPsAg (5, 10 e 60 nm) sobre biofilme de *C. albicans* e *C. glabrata* e mostraram atividade antifúngica em baixas concentrações (0,4 - 3,3 µg/mL). Os autores concluíram que as NPsAg têm um potencial terapêutico antifúngico e podem contribuir para o desenvolvimento de novas estratégias para a melhora da saúde bucal (Monteiro et al.⁷⁴, 2011; Monteiro et al.⁷⁵, 2012).

De forma similar, outro estudo avaliou a atividade de NPsAg sobre 6 cepas de bactérias. Os resultados mostraram atividade antibacteriana das NPsAg sobre todas as cepas avaliadas. NPsAg de 5 nm apresentam melhor atividade antimicrobiana sobre *Escherichia*

coli e *Fusobacterium nucleatum*. NPsAg de 5 nm inibiram completamente o crescimento de *F. nucleatum* na concentração de 25 µg/mL; para 15 e 55 nm, a concentração foi de 50 e 100 µg/mL, respectivamente (Lu et al.⁶⁵, 2013).

As propriedades antibacteriana e antibiofilme das NPsAg ou em associação a antibióticos sobre várias bactérias foi também pesquisada. *P. aeruginosa* mostrou-se mais susceptível em comparação as bactérias Gram-positivas, devido à interação entre os compostos das NPs e os componentes da parede celular bacteriana com carga negativa (Gurunathan et al.⁴², 2014). De forma similar, foi relatada a atividade antibiofilme das NPsAg sobre *P. aeruginosa* que resultou na redução de 95 a 98% da capacidade de formação de biofilme (Kalishwaralal et al.⁵³, 2010).

Estudos recentes investigaram a eficácia das NPsAg sobre células planctônicas e em biofilme de *P. aeruginosa*. Os resultados mostraram-se satisfatórios com redução da formação de biofilme, sendo que a completa inibição foi alcançada com a concentração de 10 µg/mL (Konigs et al.⁵⁸, 2015; Velazquez-Velazquez et al.¹¹⁰, 2015).

Em comparação com outros metais, a prata é menos citotóxica para células humanas e é usada em baixa concentração in vivo. NPsAg têm mostrado atividade antifúngica sobre *C. albicans* a uma concentração de 0,2 µg/mL, que é significativamente inferior à concentração citotóxica sobre fibroblastos humanos (30 µg/mL) (Allaker⁵, 2010; Panacek et al.⁸², 2009). Panacek et al.⁸² (2009) avaliaram a atividade antifúngica de diferentes concentrações de NPsAg, demonstrando que a concentração de 27 mg/L inibiu o crescimento de *C. albicans*, e que esse efeito inibitório foi melhorando com adição de estabilizadores na formulação (CIM = 0,05 mg/L), além disso não mostraram efeito citotóxico em fibroblastos humanos nessas concentrações.

Recentemente, um estudo mostrou que as NPsAg com tamanho de 100 nm foram menos citotóxicas do que as de menor tamanho (20 e 60 nm) nas maiores concentrações avaliadas e que as NPsAg em geral causaram leve inflamação no tecido pulmonar de ratos (Arai et al.⁸, 2015).

No estudo de Ahn et al.² (2014), foi demonstrado que os agentes de revestimento na superfície das NPsAg e o tamanho das partículas contribuem com a toxicidade, e que o estresse oxidativo e danos no DNA parecem ser mecanismos potenciais da genotoxicidade. Álcool polivinílico (*polyvinyl alcohol* - PVA) é um polímero sintético que está sendo usado atualmente como agente estabilizador e de revestimento na síntese de NPsAg (Cavassin et al.²⁰, 2015; Mahmoud⁶⁶, 2015; Paino, Zucolotto⁸⁰, 2015) por ser biocompatível, não mutagênico, solúvel em meio aquoso e apresenta resistência química (Baker et al.¹², 2012).

São poucos os artigos publicados sobre o uso das NPsAg na Endodontia, sobretudo estudos *in vitro* simulando uma condição clínica, especificamente para ser usado como solução irrigadora de canais radiculares. Moghadas et al.⁷¹ (2012) introduziram uma solução irrigadora à base de NPsAg para ser utilizada no tratamento endodôntico e compararam sua eficácia antibacteriana com NaOCl a 5,25% sobre suspensão de *E. faecalis* e *Staphylococcus aureus* (forma plantônica) após os períodos de contato de 3, 5 e 15 min. Após cada período foi realizada a contagem das UFC mL⁻¹. Não foi observado crescimento bacteriano nos grupos e períodos avaliados, concluindo que a nova solução irrigadora de NPsAg é tão efetiva quanto NaOCl.

Wu et al.¹¹⁴ (2014) avaliaram a eficácia antibacteriana das NPsAg como irrigante dos canais radiculares sobre biofilmes de *E. faecalis* formados em dentina humana por 4 semanas. A solução de NPsAg a 0,1% foi comparada ao NaOCl a 2% e a análise dos espécimes após tratamento foi realizada por meio de MEV e microscopia confocal de varredura a laser (MCVL). A integridade da estrutura do biofilme não foi destruída após 2 minutos de irrigação com a solução de NPsAg e a proporção de células vivas foi similar ao grupo tratado com salina.

Recentemente, outro estudo avaliou a citotoxicidade em cultura celular, e a atividade antibacteriana sobre células planctônicas de *E. faecalis* das NPsAg (com diferentes cargas) em comparação ao NaOCl a 2,5% e clorexidina (CLX) a 0,2% (Abbaszadegan et al.¹, 2015). As NPsAg com carga positiva tiveram maior atividade antibacteriana e as NPsAg com diferentes cargas foram menos citotóxicas do que o NaOCl e CLX.

Farnesol (FAR), de fórmula molecular C₁₅H₂₆O, é um álcool sesquiterpênico naturalmente encontrado em própolis e em óleos essenciais de sementes, plantas aromáticas e frutas cítricas que apresenta atividades antitumoral, antimicrobiana e antibiofilme (Akiyama et al.³, 2002; Alves et al.⁷, 2013; Jabra-Rizk et al.⁴⁸, 2006; Jahangir, Sultana⁴⁹, 2008). Tem sido recentemente identificada como uma molécula autoreguladora “*quorum-sensing (QS)*” secretada pelo fungo patógeno *C. albicans* (Brilhante et al.¹⁸, 2015; Joo, Jetten⁵², 2010; Sato et al.⁹⁸, 2004; Shirtliff et al.¹⁰¹, 2009). QS é uma forma de comunicação química entre um grupo de micro-organismos da mesma ou diferentes espécies, e é essencial para o desenvolvimento de biofilmes. Ainda, é responsável por mediar diversas características dos biofilmes, tais como virulência, maturação, espessura e resistência aos antibióticos (Fernandes et al.³⁵, 2016). Além disso, farnesol está envolvido na inibição da germinação e a formação de biofilme por *C. albicans* (Brilhante et al.¹⁸, 2015; Katragkou et al.⁵⁵, 2015; Ramage et al.⁹¹, 2002) e pode ser citotóxico em elevadas concentrações (Shirtliff et al.¹⁰¹, 2009).

Nesses sentido, farnesol merece destaque devido a sua expressiva atividade antimicrobiana sobre espécies bacterianas e fúngicas. A sua potencial atividade antifúngica foi demonstrada sobre diferentes espécies de *Candida* e *Cryptococcus*, bem como sobre *Coccidioides posadasii* e *Paracoccidioides brasiliensis* (Brilhante et al.¹⁷, 2013; Brilhante et al.¹⁸, 2015; Cordeiro et al.²⁷, 2013; Jabra-Rizk et al.⁴⁸, 2006). O seu mecanismo de ação ainda não foi elucidado (Cordeiro et al.²⁷, 2013; Jabra-Rizk et al.⁴⁸, 2006). Acredita-se que o farnesol danifica a membrana da célula fúngica comprometendo a síntese de ergosterol em que por sua vez, induz a apoptose em *C. albicans* por meio de ativação das caspases (Cordeiro et al.²⁷, 2013; Shirliff et al.¹⁰¹, 2009). Uma vez ativadas, as caspases clivam a enzima fosfocolina citidiltransferasa- α , causando a interrupção da síntese de fosfatidilcolina em células de mamíferos, mas a relevância deste mecanismo permanece desconhecido em células fúngicas (Cordeiro et al.²⁷, 2013). Segundo alguns autores, farnesol atua como um precursor na biossíntese de esteróis e isoprenóides, que são essenciais na regulação da proliferação, diferenciação e apoptose, assim como na biossíntese de lipídios em fungos, plantas e animais (Brilhante et al.¹⁸, 2015; Joo, Jetten⁵², 2010).

Cordeiro et al.²⁷ (2013) avaliaram a atividade antifúngica do farnesol e sua interação com antifúngicos tradicionais sobre cepas resistentes de *Candida spp.*, incluindo *C. albicans*, por meio da determinação da CIM pelo método de microdiluição. Os valores de CIM para farnesol, variaram entre 4,68 – 150 μ M, concluindo que os seus efeitos in vitro melhoram a atividade dos antifúngicos tradicionais sobre os isolados resistentes de *Candida spp.* Estes resultados suportam uma investigação mais aprofundada sobre o papel desta substância na biossíntese de esteróis e como ele interfere com a viabilidade celular. Recentemente, os resultados do estudo de Katragkou et al.⁵⁵ (2015) demonstraram que farnesol em combinação com substâncias antifúngicas, pode ser utilizado como agente antibiofilme adjuvante sobre *C. albicans*.

Na área da Endodontia, são poucos os estudos que avaliam o farnesol, porém esta solução apresenta potencial para ser utilizada como coadjuvante no tratamento endodôntico (Alves et al.⁷, 2013). Alves et al.⁶ (2013) avaliaram os efeitos antimicrobiano e antibiofilme do farnesol a 0,2% e associações, como solução irrigadora de canais radiculares, comparado ao NaOCl a 2,5%. Foram realizados três ensaios: cristal violeta, para avaliar os efeitos sobre a biomassa do biofilme de *E. faecalis*; o teste de desinfecção da dentina, para avaliar os efeitos sobre a viabilidade bacteriana em biofilme; e o teste de desinfecção do canal radicular, para simular a utilização na prática clínica. Farnesol foi eficaz na redução da biomassa do biofilme.

Todas as substâncias afetaram a viabilidade bacteriana em biofilmes e farnesol apresentou bons resultados, porém não foi superior ao NaOCl.

Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar a atividade antimicrobiana, antibiofilme e citotoxicidade de soluções de NPsAg e farnesol para fornecer subsidios para sua indicação na etapa de irrigação final após preparo biomecânico dos canais radiculares.

6 CONCLUSÃO

Pode-se concluir que:

As soluções de NPsAg e FAR avaliadas apresentam atividades antimicrobiana e antibiofilme sobre *E. faecalis*, *C. albicans* e *P. aeruginosa*, porém foram menos efetivas do que NaOCl. Ainda, apresentam baixa citotoxicidade, sem efeitos genotóxicos sobre as células fibroblásticas quando comparadas ao NaOCl, e apresentam ação antimicrobiana ex vivo na redução de *E. faecalis* do SCR.

NPsAg e FAR podem ser uma opção em casos onde NaOCl apresente limitações de uso e/ou efeitos colaterais, incluindo casos de hipersensibilidade. Além disso, apresentam potencial para uso em diferentes protocolos de irrigação final dos canais radiculares.

REFERÊNCIAS*

1. Abbaszadegan A, Nabavizadeh M, Gholami A, Aleyasin ZS, Dorostkar S, Saliminasab M et al. Positively charged imidazolium-based ionic liquid-protected silver nanoparticles: a promising disinfectant in root canal treatment. *Int Endod J*. 2015; 48(8): 790-800.
2. Ahn JM, Eom HJ, Yang X, Meyer JN, Choi J. Comparative toxicity of silver nanoparticles on oxidative stress and DNA damage in the nematode, *Caenorhabditis elegans*. *Chemosphere*. 2014; 108(4): 343-52.
3. Akiyama H, Oono T, Huh WK, Yamasaki O, Ogawa S, Katsuyama M et al. Actions of farnesol and xylitol against *Staphylococcus aureus*. *Chemotherapy*. 2002; 48(3): 122-8.
4. Al-Jadaa A, Paque F, Attin T, Zehnder M. Necrotic pulp tissue dissolution by passive ultrasonic irrigation in simulated accessory canals: impact of canal location and angulation. *Int Endod J*. 2009; 42(1): 59-65.
5. Allaker RP. The use of nanoparticles to control oral biofilm formation. *J Dent Res*. 2010; 89(11): 1175-86.
6. Alves FR, Neves MA, Silva MG, Rocas IN, Siqueira JF, Jr. Antibiofilm and antibacterial activities of farnesol and xylitol as potential endodontic irrigants. *Braz Dent J*. 2013; 24(3): 224-9.
7. Alves FR, Silva MG, Rocas IN, Siqueira JF, Jr. Biofilm biomass disruption by natural substances with potential for endodontic use. *Braz Oral Res*. 2013; 27(1): 20-5.
8. Arai Y, Miyayama T, Hirano S. Difference in the toxicity mechanism between ion and nanoparticle forms of silver in the mouse lung and in macrophages. *Toxicology*. 2015; 328(1): 84-92.
9. Aranda-Garcia AR, Guerreiro-Tanomaru JM, Faria-Junior NB, Chavez-Andrade GM, Leonardo RT, Tanomaru-Filho M et al. Antibacterial effectiveness of several irrigating solutions and the Endox Plus system - an ex vivo study. *Int Endod J*. 2012; 45(12): 1091-6.
10. AshaRani PV, Low Kah Mun G, Hande MP, Valiyaveetil S. Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in human cells. *ACS Nano*. 2009; 3(2): 279-90.
11. Aubut V, Pommel L, Verhille B, Orsiere T, Garcia S, About I et al. Biological properties of a neutralized 2.5% sodium hypochlorite solution. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2010; 109(2): e120-5.

*De acordo com o Guia de Trabalhos Acadêmicos da FOAr, adaptado das Normas Vancouver. Disponível no site da Biblioteca: <http://www.foar.unesp.br/Home/Biblioteca/guia-normalizacao-marco-2015.pdf>

12. Baker MI, Walsh SP, Schwartz Z, Boyan BD. A review of polyvinyl alcohol and its uses in cartilage and orthopedic applications. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2012; 100(5): 1451-7.
13. Barsoumian A, Sanchez CJ, Mende K, Tully CC, Beckius ML, Akers KS et al. In vitro toxicity and activity of Dakin's solution, mafenide acetate, and amphotericin B on filamentous fungi and human cells. *J Orthop Trauma.* 2013; 27(8): 428-36.
14. Beus C, Safavi K, Stratton J, Kaufman B. Comparison of the effect of two endodontic irrigation protocols on the elimination of bacteria from root canal system: a prospective, randomized clinical trial. *J Endod.* 2012; 38(11): 1479-83.
15. Blome B, Braun A, Sobarzo V, Jepsen S. Molecular identification and quantification of bacteria from endodontic infections using real-time polymerase chain reaction. *Oral Microbiol Immunol.* 2008; 23(5): 384-90.
16. Bressan E, Ferroni L, Gardin C, Rigo C, Stocchero M, Vindigni V et al. Silver nanoparticles and mitochondrial interaction. *Int J Dent.* 2013; ID 312747(11): 1-8.
17. Brilhante RS, de Lima RA, Caetano EP, Leite JJ, Castelo-Branco Dde S, Ribeiro JF et al. Effect of farnesol on growth, ergosterol biosynthesis, and cell permeability in *Coccidioides posadasii*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013; 57(5): 2167-70.
18. Brilhante RS, de Lima RA, Marques FJ, Silva NF, Caetano EP, Castelo-Branco Dde S et al. *Histoplasma capsulatum* in planktonic and biofilm forms: in vitro susceptibility to amphotericin B, itraconazole and farnesol. *J Med Microbiol.* 2015; 64(Pt 4): 394-9.
19. Camoes IC, Salles MR, Fernando MV, Freitas LF, Gomes CC. Relationship between the size of patency file and apical extrusion of sodium hypochlorite. *Indian J Dent Res.* 2009; 20(4): 426-30.
20. Cavassin ED, de Figueiredo LF, Otoch JP, Seckler MM, de Oliveira RA, Franco FF et al. Comparison of methods to detect the in vitro activity of silver nanoparticles (AgNP) against multidrug resistant bacteria. *J Nanobiotechnology.* 2015; 13(64): 1-16.
21. Cheng L, Weir MD, Xu HH, Antonucci JM, Kraigsley AM, Lin NJ et al. Antibacterial amorphous calcium phosphate nanocomposites with a quaternary ammonium dimethacrylate and silver nanoparticles. *Dent Mater.* 2012; 28(5): 561-72.
22. Cheung GS, Ho MW. Microbial flora of root canal-treated teeth associated with asymptomatic periapical radiolucent lesions. *Oral Microbiol Immunol.* 2001; 16(6): 332-7.

23. Christensen GD, Simpson WA, Younger JJ, Baddour LM, Barrett FF, Melton DM et al. Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. *J Clin Microbiol.* 1985; 22(6): 996-1006.
24. Chugal N, Wang JK, Wang R, He X, Kang M, Li J et al. Molecular characterization of the microbial flora residing at the apical portion of infected root canals of human teeth. *J Endod.* 2011; 37(10): 1359-64.
25. Coban AY, Darka O, Tasdelen Fisgin N, Cihan CC, Bilgin K, Akgunes A et al. The resazurin microplate method for rapid detection of vancomycin resistance in enterococci. *J Chemother.* 2005; 17(4): 361-6.
26. Collins AR. The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. *Mol Biotechnol.* 2004; 26(3): 249-61.
27. Cordeiro RA, Teixeira CE, Brilhante RS, Castelo-Branco DS, Paiva MA, Giffoni Leite JJ et al. Minimum inhibitory concentrations of amphotericin B, azoles and caspofungin against *Candida* species are reduced by farnesol. *Med Mycol.* 2013; 51(1): 53-9.
28. Costa EM, Evangelista AP, Medeiros AC, Dametto FR, Carvalho RA. In vitro evaluation of the root canal cleaning ability of plant extracts and their antimicrobial action. *Braz Oral Res.* 2012; 26(3): 215-21.
29. Da Silva J. O uso do ensaio Cometa para o ensino de genética toxicológica. *Genética na escola.* 2007; 30-3 [acesso em 17 de fevereiro de 2013]. Disponível: <http://www.medicinabiomolecular.com.br/biblioteca/pdfs/Nutrigenomica/nutrig-0036.pdf>
30. Dankovich TA, Gray DG. Bactericidal paper impregnated with silver nanoparticles for point-of-use water treatment. *Environ Sci Technol.* 2011; 45(5): 1992-8.
31. Delgado RJ, Gasparoto TH, Sipert CR, Pinheiro CR, Moraes IG, Garcia RB et al. Antimicrobial effects of calcium hydroxide and chlorhexidine on *Enterococcus faecalis*. *J Endod.* 2010; 36(8): 1389-93.
32. DeMerlis CC, Schoneker DR. Review of the oral toxicity of polyvinyl alcohol (PVA). *Food Chem Toxicol.* 2003; 41(3): 319-26.
33. Essner MD, Javed A, Eleazer PD. Effect of sodium hypochlorite on human pulp cells: an in vitro study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2011; 112(5): 662-6.
34. Estrela C, Estrela CR, Barbin EL, Spano JC, Marchesan MA, Pecora JD. Mechanism of action of sodium hypochlorite. *Braz Dent J.* 2002; 13(2): 113-7.

35. Fernandes RA, Monteiro DR, Arias LS, Fernandes GL, Delbem AC, Barbosa DB. Biofilm formation by *Candida albicans* and *Streptococcus mutans* in the presence of farnesol: a quantitative evaluation. *Biofouling*. 2016; 32(3): 329-38.
36. Franci G, Falanga A, Galdiero S, Palomba L, Rai M, Morelli G et al. Silver nanoparticles as potential antibacterial agents. *Molecules*. 2015; 20(5): 8856-74.
37. Gao M, Sun L, Wang Z, Zhao Y. Controlled synthesis of Ag nanoparticles with different morphologies and their antibacterial properties. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2013; 33(1): 397-404.
38. Gergova RT, Gueorgieva T, Dencheva-Garova MS, Krasteva-Panova AZ, Kalchinov V, Mitov I et al. Antimicrobial activity of different disinfection methods against biofilms in root canals. *J Investig Clin Dent*. 2016; 7(3): 254-62.
39. Ghinzelli GC, Souza MA, Cecchin D, Farina AP, de Figueiredo JA. Influence of ultrasonic activation on photodynamic therapy over root canal system infected with *Enterococcus faecalis*--an in vitro study. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2014; 11(4): 472-8.
40. Gondim E, Jr., Setzer FC, Dos Carmo CB, Kim S. Postoperative pain after the application of two different irrigation devices in a prospective randomized clinical trial. *J Endod*. 2010; 36(8): 1295-301.
41. Guerreiro-Tanomaru JM, Chavez-Andrade GM, de Faria-Junior NB, Watanabe E, Tanomaru-Filho M. Effect of passive ultrasonic irrigation on *Enterococcus faecalis* from root Canals: an ex vivo study. *Braz Dent J*. 2015; 26(4): 342-6.
42. Gurunathan S, Han JW, Kwon DN, Kim JH. Enhanced antibacterial and anti-biofilm activities of silver nanoparticles against Gram-negative and Gram-positive bacteria. *Nanoscale Res Lett*. 2014; 9(373): 1-17.
43. Haase A, Manton A, Graf P, Plendl J, Thuenemann AF, Meier W et al. A novel type of silver nanoparticles and their advantages in toxicity testing in cell culture systems. *Arch Toxicol*. 2012; 86(7): 1089-98.
44. Herczegh A, Ghidan A, Friedreich D, Gyurkovics M, Bendo Z, Lohinai Z. Effectiveness of a high purity chlorine dioxide solution in eliminating intracanal *Enterococcus faecalis* biofilm. *Acta Microbiol Immunol Hung*. 2013; 60(1): 63-75.
45. Hidalgo E, Bartolome R, Dominguez C. Cytotoxicity mechanisms of sodium hypochlorite in cultured human dermal fibroblasts and its bactericidal effectiveness. *Chem Biol Interact*. 2002; 139(3): 265-82.

46. Hinenoya A, Awasthi SP, Yasuda N, Shima A, Morino H, Koizumi T et al. Chlorine Dioxide is a better disinfectant than sodium hypochlorite against multi-drug resistant *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Acinetobacter baumannii*. *Jpn J Infect Dis*. 2015; 68(4): 276-9.
47. Holtz RD, Lima BA, Souza Filho AG, Brocchi M, Alves OL. Nanostructured silver vanadate as a promising antibacterial additive to water-based paints. *Nanomedicine*. 2012; 8(6): 935-40.
48. Jabra-Rizk MA, Meiller TF, James CE, Shirtliff ME. Effect of farnesol on *Staphylococcus aureus* biofilm formation and antimicrobial susceptibility. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006; 50(4): 1463-9.
49. Jahangir T, Sultana S. Benzo(a)pyrene-induced genotoxicity: attenuation by farnesol in a mouse model. *J Enzyme Inhib Med Chem*. 2008; 23(6): 888-94.
50. Jena P, Mohanty S, Mallick R, Jacob B, Sonawane A. Toxicity and antibacterial assessment of chitosan-coated silver nanoparticles on human pathogens and macrophage cells. *Int J Nanomedicine*. 2012; 7(0): 1805-18.
51. Jia H, Hou W, Wei L, Xu B, Liu X. The structures and antibacterial properties of nano-SiO₂ supported silver/zinc-silver materials. *Dent Mater*. 2008; 24(2): 244-9.
52. Joo JH, Jetten AM. Molecular mechanisms involved in farnesol-induced apoptosis. *Cancer Lett*. 2010; 287(2): 123-35.
53. Kalishwaralal K, BarathManiKanth S, Pandian SR, Deepak V, Gurunathan S. Silver nanoparticles impede the biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus epidermidis*. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2010; 79(2): 340-4.
54. Kar S, Bagchi B, Kundu B, Bhandary S, Basu R, Nandy P et al. Synthesis and characterization of Cu/Ag nanoparticle loaded mullite nanocomposite system: A potential candidate for antimicrobial and therapeutic applications. *Biochim Biophys Acta*. 2014; 1840(11): 3264-76.
55. Katragkou A, McCarthy M, Alexander EL, Antachopoulos C, Meletiadiis J, Jabra-Rizk MA et al. In vitro interactions between farnesol and fluconazole, amphotericin B or micafungin against *Candida albicans* biofilms. *J Antimicrob Chemother*. 2015; 70(2): 470-8.
56. Kaur J, Tikoo K. Evaluating cell specific cytotoxicity of differentially charged silver nanoparticles. *Food Chem Toxicol*. 2013; 51(0): 1-14.
57. Kawahara K, Tsuruda K, Morishita M, Uchida M. Antibacterial effect of silver-zeolite on oral bacteria under anaerobic conditions. *Dent Mater*. 2000; 16(6): 452-5.

58. Konigs AM, Flemming HC, Wingender J. Nanosilver induces a non-culturable but metabolically active state in *Pseudomonas aeruginosa*. *Front Microbiol.* 2015; 6(395): 1-11.
59. Kora AJ, Arunachalam J. Assessment of antibacterial activity of silver nanoparticles on *Pseudomonas aeruginosa* and its mechanism of action. *World J Microbiol Biotechnol.* 2011; 27(5): 1209-16.
60. Lahor-Soler E, Miranda-Rius J, Brunet-Llobet L, Farre M, Pumarola J. In vitro study of the apical microleakage with resilon root canal filling using different final endodontic irrigants. *J Clin Exp Dent.* 2015; 7(2): e212-7.
61. Li G, Lian LL, Wan L, Zhang J, Zhao X, Jiang Y et al. Antimicrobial susceptibility of standard strains of nontuberculous mycobacteria by microplate Alamar Blue assay. *PLoS One.* 2013; 8(12): e84065.
62. Lin JJ, Lin WC, Dong RX, Hsu SH. The cellular responses and antibacterial activities of silver nanoparticles stabilized by different polymers. *Nanotechnology.* 2012; 23(6): 1-12.
63. Lin LM, Skribner JE, Gaengler P. Factors associated with endodontic treatment failures. *J Endod.* 1992; 18(12): 625-7.
64. Lorenzo Y, Costa S, Collins AR, Azqueta A. The comet assay, DNA damage, DNA repair and cytotoxicity: hedgehogs are not always dead. *Mutagenesis.* 2013; 28(4): 427-32.
65. Lu Z, Rong K, Li J, Yang H, Chen R. Size-dependent antibacterial activities of silver nanoparticles against oral anaerobic pathogenic bacteria. *J Mater Sci Mater Med.* 2013; 24(6): 1465-71.
66. Mahmoud KH. Synthesis, characterization, optical and antimicrobial studies of polyvinyl alcohol-silver nanocomposites. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc.* 2015; 138(0): 434-40.
67. Mahmoudi M, Serpooshan V. Silver-coated engineered magnetic nanoparticles are promising for the success in the fight against antibacterial resistance threat. *ACS Nano.* 2012; 6(3): 2656-64.
68. Malheiros CF, Marques MM, Gavini G. In vitro evaluation of the cytotoxic effects of acid solutions used as canal irrigants. *J Endod.* 2005; 31(10): 746-8.
69. Mehdipour O, Kleier DJ, Averbach RE. Anatomy of sodium hypochlorite accidents. *Compend Contin Educ Dent.* 2007; 28(10): 544-6, 8, 50.
70. Mitchell RP, Yang SE, Baumgartner JC. Comparison of apical extrusion of NaOCl using the EndoVac or needle irrigation of root canals. *J Endod.* 2010; 36(2): 338-41.

71. Moghadas L, Shahmoradi M, Narimani T. Antimicrobial activity of a new nanobased endodontic irrigation solution: in vitro study. *Dent Hypotheses*. 2012; 3(4): 142-6.
72. Mohammadi Z, Shalavi S, Giardino L, Palazzi F, Mashouf RY, Soltanian A. Antimicrobial effect of three new and two established root canal irrigation solutions. *Gen Dent*. 2012; 60(6): 534-7; quiz p 8-9.
73. Mohanty S, Mishra S, Jena P, Jacob B, Sarkar B, Sonawane A. An investigation on the antibacterial, cytotoxic, and antibiofilm efficacy of starch-stabilized silver nanoparticles. *Nanomedicine*. 2012; 8(6): 916-24.
74. Monteiro DR, Gorup LF, Silva S, Negri M, de Camargo ER, Oliveira R et al. Silver colloidal nanoparticles: antifungal effect against adhered cells and biofilms of *Candida albicans* and *Candida glabrata*. *Biofouling*. 2011; 27(7): 711-9.
75. Monteiro DR, Silva S, Negri M, Gorup LF, de Camargo ER, Oliveira R et al. Silver nanoparticles: influence of stabilizing agent and diameter on antifungal activity against *Candida albicans* and *Candida glabrata* biofilms. *Lett Appl Microbiol*. 2012; 54(5): 383-91.
76. Morones JR, Elechiguerra JL, Camacho A, Holt K, Kouri JB, Ramirez JT et al. The bactericidal effect of silver nanoparticles. *Nanotechnology*. 2005; 16(10): 2346-53.
77. Navarro-Escobar E, Gonzalez-Rodriguez MP, Ferrer-Luque CM. Cytotoxic effects of two acid solutions and 2.5% sodium hypochlorite used in endodontic therapy. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2010; 15(1): e90-4.
78. Oliveira BP, Aguiar CM, Camara AC, Albuquerque MM, Correia AC, Soares MF. The efficacy of photodynamic therapy and sodium hypochlorite in root canal disinfection by a single-file instrumentation technique. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2015; 12(3): 436-43.
79. Ordinola-Zapata R, Bramante CM, Aprecio RM, Handysides R, Jaramillo DE. Biofilm removal by 6% sodium hypochlorite activated by different irrigation techniques. *Int Endod J*. 2014; 47(7): 659-66.
80. Paino IM, Zucolotto V. Poly(vinyl alcohol)-coated silver nanoparticles: activation of neutrophils and nanotoxicology effects in human hepatocarcinoma and mononuclear cells. *Environ Toxicol Pharmacol*. 2015; 39(2): 614-21.
81. Palanisamy NK, Ferina N, Amirulhusni AN, Mohd-Zain Z, Hussaini J, Ping LJ et al. Antibiofilm properties of chemically synthesized silver nanoparticles found against *Pseudomonas aeruginosa*. *J Nanobiotechnology*. 2014; 12(2): 1-7.
82. Panacek A, Kolar M, Vecerova R, Pucek R, Soukupova J, Krystof V et al. Antifungal activity of silver nanoparticles against *Candida* spp. *Biomaterials*. 2009; 30(31): 6333-40.

83. Panacek A, Kvitek L, Prucek R, Kolar M, Vecerova R, Pizurova N et al. Silver colloid nanoparticles: synthesis, characterization, and their antibacterial activity. *J Phys Chem B*. 2006; 110(33): 16248-53.
84. Paradella TC, Bottino MA. Scanning electron microscopy in modern dentistry research. *Braz Dent Sci*. 2012; 15(2): 43-8.
85. Perin FM, Franca SC, Silva-Sousa YT, Alfredo E, Saquy PC, Estrela C et al. Evaluation of the antimicrobial effect of Er:YAG laser irradiation versus 1% sodium hypochlorite irrigation for root canal disinfection. *Aust Endod J*. 2004; 30(1): 20-2.
86. Peulen TO, Wilkinson KJ. Diffusion of nanoparticles in a biofilm. *Environ Sci Technol*. 2011; 45(8): 3367-73.
87. Phee A, Bondy-Denomy J, Kishen A, Basrani B, Azarpazhooh A, Maxwell K. Efficacy of bacteriophage treatment on *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *J Endod*. 2013; 39(3): 364-9.
88. Poggio C, Colombo M, Scribante A, Sforza D, Bianchi S. In vitro antibacterial activity of different endodontic irrigants. *Dent Traumatol*. 2012; 28(3): 205-9.
89. Prado M, Silva EJ, Duque TM, Zaia AA, Ferraz CC, Almeida JF et al. Antimicrobial and cytotoxic effects of phosphoric acid solution compared to other root canal irrigants. *J Appl Oral Sci*. 2015; 23(2): 158-63.
90. Psimma Z, Boutsoukis C, Vasiliadis L, Kastrinakis E. A new method for real-time quantification of irrigant extrusion during root canal irrigation ex vivo. *Int Endod J*. 2013; 46(7): 619-31.
91. Ramage G, Saville SP, Wickes BL, Lopez-Ribot JL. Inhibition of *Candida albicans* biofilm formation by farnesol, a quorum-sensing molecule. *Appl Environ Microbiol*. 2002; 68(11): 5459-63.
92. Ranta K, Haapasalo M, Ranta H. Monoinfection of root canal with *Pseudomonas aeruginosa*. *Endod Dent Traumatol*. 1988; 4(6): 269-72.
93. Ryu M, Matsumura R, Quan G, Furuta T. Comparison of the cytotoxicity of high-level disinfectants by the MTT assay and direct contact assay. *Biocontrol Sci*. 2013; 18(4): 221-5.
94. Saghiri MA, Delvarani A, Mehrvarzfar P, Nikoo M, Lotfi M, Karamifar K et al. The impact of pH on cytotoxic effects of three root canal irrigants. *Saudi Dent J*. 2011; 23(3): 149-52.
95. Sagripanti JL, Bonifacino A. Cytotoxicity of liquid disinfectants. *Surg Infect (Larchmt)*. 2000; 1(1): 3-14.

96. Sakamoto M, Siqueira JF, Jr., Rocas IN, Benno Y. Bacterial reduction and persistence after endodontic treatment procedures. *Oral Microbiol Immunol*. 2007; 22(1): 19-23.
97. Samiei M, Aghazadeh M, Lotfi M, Shakoei S, Aghazadeh Z, Vahid Pakdel SM. Antimicrobial Efficacy of Mineral Trioxide Aggregate with and without Silver Nanoparticles. *Iran Endod J*. 2013; 8(4): 166-70.
98. Sato T, Watanabe T, Mikami T, Matsumoto T. Farnesol, a morphogenetic autoregulatory substance in the dimorphic fungus *Candida albicans*, inhibits hyphae growth through suppression of a mitogen-activated protein kinase cascade. *Biol Pharm Bull*. 2004; 27(5): 751-2.
99. Schaudinn C, Carr G, Gorur A, Jaramillo D, Costerton JW, Webster P. Imaging of endodontic biofilms by combined microscopy (FISH/cLSM - SEM). *J Microsc*. 2009; 235(2): 124-7.
100. Schmitt DM, O'Dee DM, Cowan BN, Birch JW, Mazzella LK, Nau GJ et al. The use of resazurin as a novel antimicrobial agent against *Francisella tularensis*. *Front Cell Infect Microbiol*. 2013; 3(12): 1-6.
101. Shirliff ME, Krom BP, Meijering RA, Peters BM, Zhu J, Scheper MA et al. Farnesol-induced apoptosis in *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009; 53(6): 2392-401.
102. Siqueira JF, Jr. Endodontic infections: concepts, paradigms, and perspectives. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2002; 94(3): 281-93.
103. Siqueira JF, Jr., Rocas IN. Polymerase chain reaction-based analysis of microorganisms associated with failed endodontic treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2004; 97(1): 85-94.
104. Siqueira JF, Jr., Rocas IN, Santos SR, Lima KC, Magalhaes FA, de Uzeda M. Efficacy of instrumentation techniques and irrigation regimens in reducing the bacterial population within root canals. *J Endod*. 2002; 28(3): 181-4.
105. Siqueira JF, Jr., Sen BH. Fungi in endodontic infections. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2004; 97(5): 632-41.
106. Spratt DA, Pratten J, Wilson M, Gulabivala K. An in vitro evaluation of the antimicrobial efficacy of irrigants on biofilms of root canal isolates. *Int Endod J*. 2001; 34(4): 300-7.
107. Suresh AK, Pelletier DA, Doktycz MJ. Relating nanomaterial properties and microbial toxicity. *Nanoscale*. 2013; 5(2): 463-74.

108. Tennert C, Fuhrmann M, Wittmer A, Karygianni L, Altenburger MJ, Pelz K et al. New bacterial composition in primary and persistent/secondary endodontic infections with respect to clinical and radiographic findings. *J Endod.* 2014; 40(5): 670-7.
109. Townsend C, Maki J. An in vitro comparison of new irrigation and agitation techniques to ultrasonic agitation in removing bacteria from a simulated root canal. *J Endod.* 2009; 35(7): 1040-3.
110. Velazquez-Velazquez JL, Santos-Flores A, Araujo-Melendez J, Sanchez-Sanchez R, Velasquillo C, Gonzalez C et al. Anti-biofilm and cytotoxicity activity of impregnated dressings with silver nanoparticles. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2015; 49(4): 604-11.
111. Vilanova WV, Carvalho-Junior JR, Alfredo E, Sousa-Neto MD, Silva-Sousa YT. Effect of intracanal irrigants on the bond strength of epoxy resin-based and methacrylate resin-based sealers to root canal walls. *Int Endod J.* 2012; 45(1): 42-8.
112. Viswanathan V, Phadatare AG, Mukne A. Antimycobacterial and antibacterial activity of *Allium sativum* bulbs. *Indian J Pharm Sci.* 2014; 76(3): 256-61.
113. Wady AF, Machado AL, Zucolotto V, Zamperini CA, Berni E, Vergani CE. Evaluation of *Candida albicans* adhesion and biofilm formation on a denture base acrylic resin containing silver nanoparticles. *J Appl Microbiol.* 2012; 112(6): 1163-72.
114. 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(2): 285-90.
115. Zehnder M. Root canal irrigants. *J Endod.* 2006; 32(5): 389-98.
116. Zhang T, Wang L, Chen Q, Chen C. Cytotoxic potential of silver nanoparticles. *Yonsei Med J.* 2014; 55(2): 283-91.
117. Zhang W, Torabinejad M, Li Y. Evaluation of cytotoxicity of MTAD using the MTT-tetrazolium method. *J Endod.* 2003; 29(10): 654-7.
118. Zhang Y, Chen Y, Zhang H, Zhang B, Liu J. Potent antibacterial activity of a novel silver nanoparticle-halloysite nanotube nanocomposite powder. *J Inorg Biochem.* 2013; 118(1): 59-64.
119. Zhu X, Yin X, Chang JW, Wang Y, Cheung GS, Zhang C. Comparison of the antibacterial effect and smear layer removal using photon-initiated photoacoustic streaming aided irrigation versus a conventional irrigation in single-rooted canals: an in vitro study. *Photomed Laser Surg.* 2013; 31(8): 371-7.