

**FERNANDO OLIVEIRA SILVA**

**Avaliação da Resposta Tecidual à Dispersão de Nanopartícula de Prata**

**Araçatuba-SP**

**2011**

**FERNANDO OLIVEIRA SILVA**

**Avaliação da Resposta Tecidual à Dispersão de Nanopartícula de Prata**

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 “Julho de Mesquita Filho”.

Orientador: Prof. João Eduardo Gomes filho

**Araçatuba-SP**

**2011**

## Dedicatória

*“Aos meus pais, Pedro da Conceição e Zélia Moreira, e ainda ao meu tio, Antônio José, que juntos me deram força para lutar sempre pelos meus ideais e nunca permitiu que eu baixasse a cabeça na realização desse sonho, oferecendo-me total apoio para sempre seguir em frente com muita humildade”.*

*Obrigado por tudo!*

## **Agradecimentos**

A Deus, pois sem ele seria impossível a realização desse sonho. Sempre me ofereceu forças para superar os obstáculos da vida com muita perseverança.

A meu Orientador, João Eduardo Gomes Filho, esse me mostrou que a odontologia não é apenas clínica e me apresentou o caminho científico, o mundo das pesquisas, fazendo-me descobrir que o mundo odontológico é bem maior do que eu imaginava.

Aos meus pais, Pedro da Conceição e Zélia Moreira, pessoas que sempre estiveram presente me apoiando na realização desse sonho, rindo quando eu precisava ri, chorando comigo quando das dificuldades e caminhando junto comigo, passo a passo, para alcançar meus ideais.

Ao meu tio, Antonio José Moreira, pela confiança que depositou em mim e apostando muito nessa conquista.

As minhas irmãs, minha vó, minha sobrinha, pessoas que foram decisivas e confiantes, acreditando que eu podia ir sempre além.

Aos professores, que nos anos de convivência, muito me ensinou, contribuindo para meu crescimento científico e intelectual.

A Prof<sup>ª</sup> Ana Maria Pires Soubhia, pela atenção e apoio durante o processo de definição e orientação. A PROEX e ao Portal Universia pelo apoio financeiro e pela oportunidade de conhecer outros caminhos.

Aos meus amigos, que de qualquer forma, direta ou indiretamente, me deram força para continuar.

A Moradia Estudantil, em especial a casa 3 bloco 1, pela companhia, pelas brincadeiras, pela compreensão e inesquecivelmente pela ajuda quando precisei.

Ao Dr. Luciano de Miranda Andrade por ajudar a estender meus conhecimentos e compreender um pouco sobre atendimento em PSF.

A FAPESP, que apostou em mim na concessão da bolsa de iniciação científica para a realização desse trabalho.

A Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Araçatuba, por tornar possível esse sonho.

“Não procure ser um homem com  
êxito, e sim um homem com  
valores”  
(Albert Einstein)

SILVA, F. O. **Avaliação da Resposta Tecidual à Nanopartícula de Prata**. 2011. Trabalho de Conclusão de Curso – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2011.

### **Resumo**

A prata é um metal conhecido por seu largo espectro antimicrobiano contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, fungos, protozoários e certos vírus, incluindo cepas antibiótico-resistentes e *S. aureus* e *Enterococcus* comuns na flora do canal radicular. O objetivo deste estudo foi avaliar a resposta tecidual em tecido conjuntivo subcutâneo de ratos a tubos preenchidos por fibrina embebida em dispersão de nanopartículas de prata em comparação ao hipoclorito de sódio a 2,5%. Foram utilizados 30 ratos, os quais receberam individualmente quatro implantes de tubos de polietileno, dois contendo esponja de fibrina embebida em dispersão de nanopartículas de prata na concentração de 47ppm e outro 23ppm, um contendo esponja de fibrina embebida em hipoclorito de sódio a 2,5% e mais um tubo vazio como controle. Após 7, 15, 30, 60 e 90 dias, seis animais foram sacrificados e os tubos com o tecido circundante foram removidos, processados histologicamente com método para glicol metacrilato, cortes seriados de 3µm e coloração por HE. O critério de avaliação histológica foi de 0 a 3 em função da quantidade de células inflamatórias, a cápsula fibrosa foi considerada fina quando < 150µm e espessa quando > 150µm. Necrose foi registrada como presente ou ausente. Os resultados foram analisados estatisticamente pelo teste Kruskal Wallis. Ambos os materiais causaram reações moderadas em 7 dias ( $p < 0,05$ ). A resposta da dispersão de nanopartícula de prata na concentração de 23 ppm e do hipoclorito de sódio a 2.5% foi similar ao controle aos 15 dias enquanto que a dispersão de nanopartícula de prata na concentração de 47 ppm foi similar ao controle somente aos 30 dias ( $p < 0,05$ ). Concluiu-se a dispersão de nanopartícula de prata foi biocompatível especialmente na menor concentração.

Palavras-chave: Biocompatibilidade, nanopartícula de prata.

SILVA, F. O. **Evaluation of the tissue response to silver nanoparticles.** 2011. Trabalho de Conclusão de Curso – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2011.

### **Abstract**

Nanomaterials have been used to create new consumer products as well as applications for life sciences and biotechnology. The aim of this study was to evaluate the tissue response to implanted polyethylene tubes filled with fibrin sponge embedded with silver nanoparticles dispersion. **Methods:** Thirty rats received individually four polyethylene tubes, filled with sponge embedded in 47ppm, 23ppm silver nanoparticles dispersion, 2.5% sodium hypochlorite or with no embedding as control. The observation periods were 7, 15, 30, 60 e 90 days. After each period of time, six animals were killed and the tubes and surrounding tissue removed, fixed and prepared to be analyzed in light microscope with glycol methacrylate embedding, 3  $\mu$ m serial cutting and HE stain. Qualitative and quantitative evaluations of the reaction were performed. **Results:** Both materials caused moderate reactions at 7 days. The response was similar to the control on the 15th day with 23ppm silver nanoparticles dispersion and 2.5% sodium hypochlorite and on the 30th day with 47ppm silver nanoparticles dispersion. **Conclusions:** It was possible to conclude that silver nanoparticles dispersion was biocompatible especially in a lower concentration.

Key words: Biocompatibility, silver nanoparticles, irrigating solutions.



## Lista de Figuras

- Figura 1. Controle , 7, 15 e 30 dias (a,b,c) ; Hipocorito 2,5%, 7, 15 e 30 dias (d,e,f); nanopartícula de prata 23ppm, 7, 15 e 30 dias (g,h,i); nanopartícula de prata 47ppm, 7, 15 e 30 dias (j,k,l). 19
- Figura 2. Controle, 60 e 90 dias (a,b) ; Hipocorito 2,5%, 60 e 90 dias (c,d); nanopartícula de prata 23ppm, 60 e 90 dias (e,f); nanopartícula de prata 47ppm, 60 e 90 dias (g,h). 20

## **Lista de Tabelas**

Tabela 1. Percentagem das amostras em cada grupo categorizada de acordo com o escore de inflamação.	21
---	----

## **Sumário**

1 – Introdução	11
2 – Proposição	13
3 – Materiais e Métodos	14
3.1 – Materiais Experimentais	14
4 – Teste de Biocompatibilidade	14
5 – Critério Para Análise Estatística Quantitativa	17
6 – Resultados	17
7 – Discussão	21
8 – Conclusões	24
9 – Referências	24

## 1. INTRODUÇÃO

O papel essencial dos microrganismos no desenvolvimento das patologias pulpares e periapicais têm sido demonstrados 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 a instrumentação mecânica 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* (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. 2005), 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 da 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 atualmente 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 existem 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 será analisar a resposta do tecido subcutâneo de ratos a tubos preenchidos por fibrina embebida em dispersão de nanopartículas de prata em comparação ao hipoclorito de sódio a 2,5%.

## **2. Proposição**

O objetivo deste estudo foi avaliar a resposta tecidual em tecido conjuntivo subcutâneo de ratos a tubos preenchidos por fibrina embebida em dispersão de nanopartículas de prata em comparação ao hipoclorito de sódio a 2,5%.

### **3. Materiais e Métodos**

#### **3.1. 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 47ppm com tamanho da partícula em torno de 90 µm e Hipoclorito de Sódio a 2,5% (Apoticário, Araçatuba, São Paulo).

#### **4. 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, tendo sido aprovado pelo Comitê de Ética (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 os ratos eram mantidos em cama de serragem, a qual era 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 120 tubos de polietileno (Abbott. Lab. do Brasil, São Paulo – SP) estéreis com 1,0mm de diâmetro interno e 1,6mm de diâmetro externo e 10,0mm de comprimento. Esponja de fibrina foi introduzida nos tubos e receberam 0,1ml de dispersão de nanopartículas de prata a 23ppm ou 47ppm, ou hipoclorito de sódio. No grupo controle, os tubos receberam somente a esponja de fibrina.

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 ultrapassará 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%. Em seguida, iniciou-se 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). Após a divulsão do tecido subcutâneo para o lado esquerdo da porção cranial e caudal e direito da porção cranial e caudal, cada bolsa recebeu dois tubos levados em posição com auxílio de pinça reta. Assim, cada animal adquiriu quatro implantes de tubos de polietileno, dois contendo esponja de fibrina embebida em dispersão de nanopartículas de prata na concentração de 47ppm ou 23ppm, um contendo esponja de fibrina embebida em hipoclorito de sódio a 2,5% e mais um tubo contendo somente a esponja de fibrina como controle. O tecido foi suturado com fio de seda (4,0) não reabsorvível e anti-sepsia final será realizada com solução de iodo 5%.

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



## **Grupos Experimentais**

Os grupos experimentais e controle serão definidos da seguinte maneira:

Grupo 1: Controle

Grupo 2: Hipoclorito de sódio a 2,5%

Grupo 3: Nanopartícula de prata a 23ppm

Grupo 4: Nanopartícula de prata a 47ppm

Os períodos de avaliação foram de 7, 15, 30, 60 e 90 dias (American National Standards Institute, 1979; Federation Dentaire International, 1980). A cada tempo experimental, seis 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 fixados em solução formalina 10% pH 7. As amostras foram processadas e incluídas em glicol metacrilato (GMA) (Gomes-Filho et al, 2001), cortadas seriadamente em 3  $\mu$ m e foram 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 será considerada fina quando  $< 150\mu$ m e espessa quando  $> 150\mu$ m. Necrose foi registrada como presente ou ausente (Costa et al, 2000; Federation Dentaire International, 1980; Ozbas et al,

2003; Yaltirik et al, 2004; Gomes-Filho et al, 2008b; Gomes-Filho et al, 2008c; Gomes-Filho et al, 2009). Possibilitando, dessa maneira, dados objetivos para uma análise estatística posterior com teste de Kruskal Wallis.

## **5. Critério Para Análise Estatística Quantitativa**

### **A- Infiltrado Inflamatório**

0- nenhuma- nenhuma ou poucas células

1- leve- inferior a 25 células

2- moderado- entre 25 e 125 células

3- severo- superior a 125 células (desorganização do tecido)

### **B- Cápsula Fibrosa**

fina- até 150 $\mu$ m

espessa- maior que 150 $\mu$ m

## **6. RESULTADOS**

### **Controle (Tubos Vazios)**

Em 7 dias, um infiltrado celular inflamatório moderado consistindo de linfócitos e macrófagos estava presente na cápsula fibrosa (Fig.1a e 1b). A cápsula fibrosa em volta do tubo estava fina com poucas células inflamatórias crônicas em 15, 30, 60 e 90 dias (Fig.1c, 2a e 2b).

### **Hipoclorito de Sódio 2,5%**

Em 7 e 15 dias, um infiltrado celular inflamatório moderado consistindo de linfócitos e macrófagos estava presente na cápsula fibrosa (Fig.1d e 1e). A intensidade da inflamação e a espessura da cápsula fibrosa estavam reduzidas a partir de 30, 60 e 90 dias, similar ao grupo controle (Fig.1f, 2c e 2d) com poucas

células inflamatórias crônicas consistindo de linfócitos, macrófagos e fibroblastos.

### **Dispersão de nanopartículas de prata 23ppm**

Em 7 dias, um infiltrado celular inflamatório moderado consistindo de linfócitos e macrófagos estava presente na cápsula fibrosa (fig.1g). A intensidade da inflamação foi reduzida a partir de 15, 30, 60 e 90 dias, e a cápsula fibrosa em volta do tubo estava fina (Fig. 1h, 1i, 2e e 2f).

### **Dispersão de nanopartículas de prata 47ppm**

Em 7 e 15 dias, um infiltrado celular inflamatório moderado consistindo de linfócitos e macrófagos estava presente na cápsula fibrosa (fig.1j e 1k). A intensidade da inflamação foi reduzida a partir de 30, 60 e 90 dias, e a cápsula fibrosa em volta do tubo estava fina, sem células inflamatórias e similares ao grupo controle (Fig. 1h, 1i, 2e e 2f).

## **Comparação Entre os Grupos**

### **7 dias**

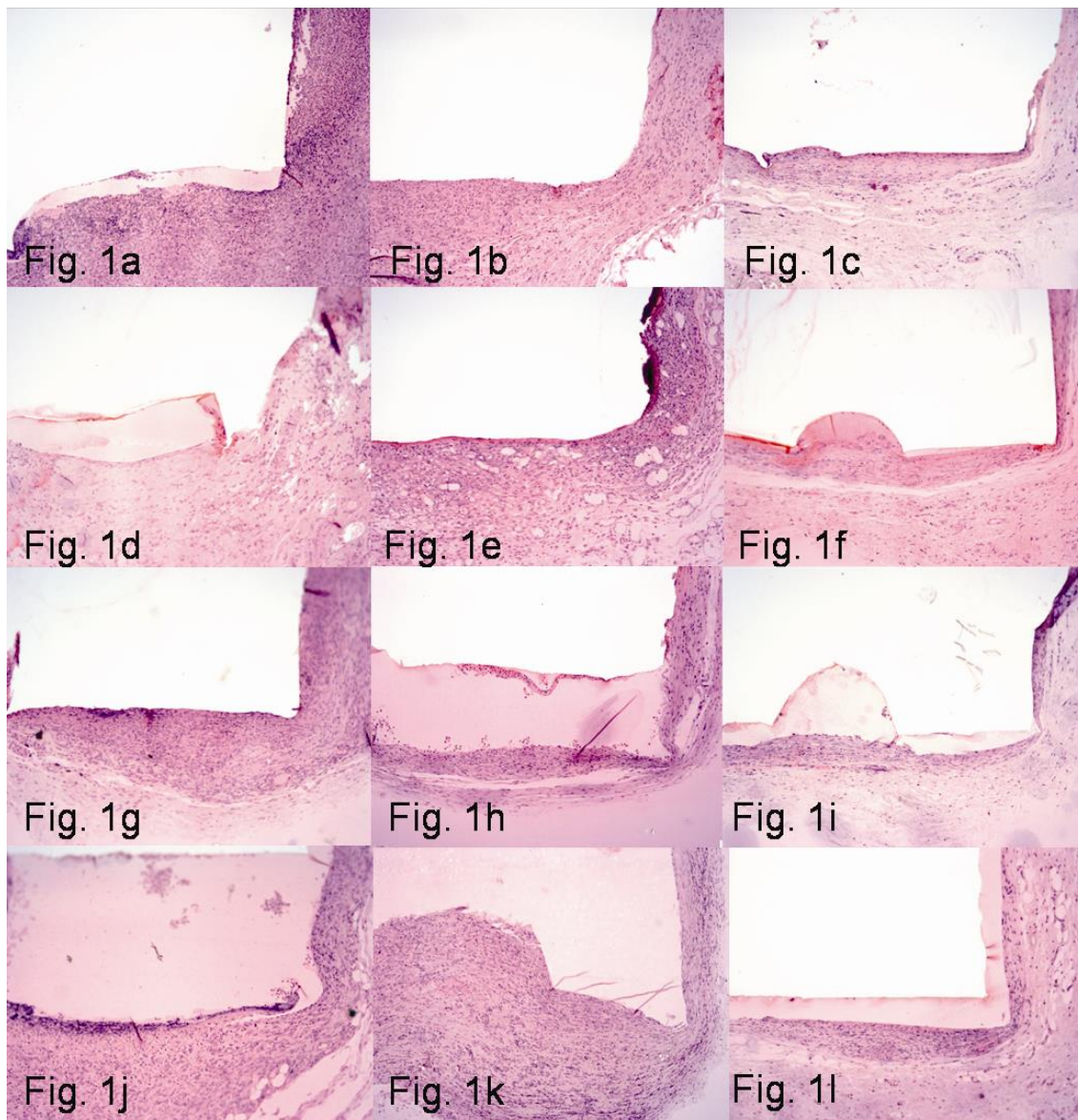
Não houve diferença estatisticamente significativa entre os escores dos diferentes grupos (média do escore de 2).

### **15 dias**

Houve diferença estatisticamente ( $p < 0.05$ ) entre o número de células inflamatórias da dispersão de nanopartículas de prata 23ppm e outros grupos ( $p < 0.05$ ) exceto para grupo controle ( $p > 0.05$ ). A média do escore de células inflamatórias para dispersão de nanopartículas de prata 23ppm e grupo controle (média do escore de 1) foi mais baixo do que outros grupos (média do escore de 2) ( $p < 0.05$ ).

### **30, 60 e 90 dias**

Não houve diferença estatisticamente significativa ( $p < 0.05$ ) entre os escores dos diferentes grupos (média do escore de 1).



**Figura 1.** Controle , 7, 15 e 30 dias (a,b,c) ; Hipocorito 2,5%, 7, 15 e 30 dias (d,e,f); nanopartícula de prata 23ppm, 7, 15 e 30 dias (g,h,i); nanopartícula de prata 47ppm, 7, 15 e 30 dias (j,k,l).

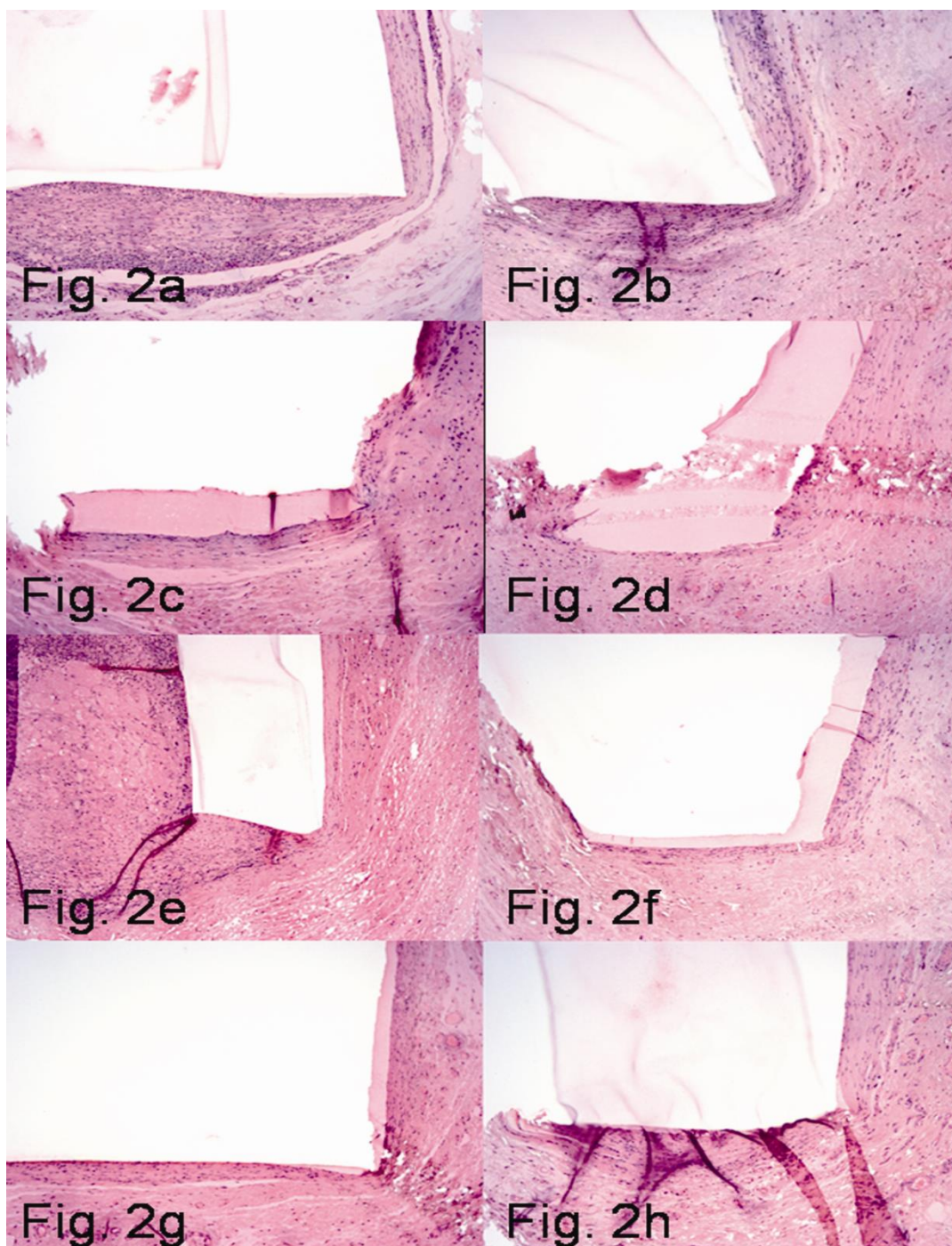


Figura 2. Controle, 60 e 90 dias (a,b) ; Hipocrito 2,5%, 60 e 90 dias (c,d); nanopartícula de prata 23ppm, 60 e 90 dias (e,f); nanopartícula de prata 47ppm, 60 e 90 dias (g,h).

Material	ESCORE			
	0	1	2	3
7 dias				
Controle	0	0	100	0
Hipoclorito	0	0	100	0
23	0	0	100	0
47	0	0	100	0
15 dias				
Controle	0	100	0	0
Hipoclorito	0	0	100	0
23	0	100	0	0
47	0	0	100	0
30 dias				
Controle	0	100	0	0
Hipoclorito	0	100	0	0
23	0	100	0	0
47	0	100	0	0
60 dias				
Controle	0	100	0	0
Hipoclorito	0	100	0	0
23	0	100	0	0
47	0	100	0	0
90 dias				
Controle	0	100	0	0
Hipoclorito	0	100	0	0
23	0	100	0	0
47	0	100	0	0

TABELA 1. Percentagem das amostras em cada grupo categorizada de acordo com o escore de inflamação.

## 7. DISCUSSÃO

Os biofilmes são definidos como comunidades de bactérias que colonizam as superfícies em um meio aquoso. A formação de biofilme ocorre como resultado de uma seqüência de eventos (Monteiro et al., 2009): Fixação da superfície microbiana, proliferação celular, produção de matriz e desprendimento. Agentes antimicrobianos de prata têm sido produzidos como uma estratégia alternativa para reduzir a adesão bacteriana e para prevenir a formação de biofilmes. Experimentos com agentes antimicrobianos demonstraram que a prata é efetiva contra uma variedade de células bacterianas e biofilmes maduros, no entanto, a concentração é um fator importante. A revisão

atual sugere que a prata elementar e nanopartículas de prata em polímeros podem constituir uma biomaterial antimicrobiano efetivo para uma variedade de aplicações promissoras (Monteiro et al., 2009).

O objetivo deste estudo foi avaliar a biocompatibilidade de nanopartículas de prata em dispersão visando uma possível utilização como solução irrigadora em tratamento endodôntico, uma vez que não há nenhum estudo sobre este material no campo endodôntico. Dispersão de nanopartículas de prata foi comparado com a solução de hipoclorito de sódio que é amplamente utilizada como solução irrigadora.

Ag tem recebido atenção devido à sua toxicidade em baixas concentrações iônicas. Além disso, exposição Ag está associada a sintomas clínicos específicos, como argiria, o que provoca uma coloração cinza irreversível da pele (Payne et al., 1992). Reações alérgicas foram observadas em pacientes expostos topicamente ao nitrato de prata (Dunn et al., 2004), e alguns estudos têm relatado sua toxicidade no fígado (Chaby et al., 2005; Trop et al., 2006). Tem sido sugerido que a tendência geral citotoxicidade de nanopartículas é semelhante entre os vários tipos de nanopartículas (Jin et al., 2008) e que o estresse oxidativo inespecífico é uma das maiores preocupações na toxicidade induzida pela Nanopartícula (Nel et al., 2006). No presente estudo, observou-se uma resposta do tecido leve a nanopartículas de prata especialmente nas concentração mais baixa (23 ppm). Os resultados observados com a dispersão de nanopartículas prata 47ppm e hipoclorito de sódio a 2,5% foram semelhantes, com um moderado infiltrado inflamatória crônica no início, o que reduziu com o tempo.

Os estudos enfocaram também o potencial da atividade antimicrobiana possuído pela nanopartículas de prata (Monteiro et al., 2009; Panáček et al., 2006; Baker et al., 2005; Chaby et al., 2005). Baker et al. (2005) encontraram que baixas concentrações de prata como  $8\mu\text{g}/\text{cm}^2$  foram citotóxicas para *Escherichia coli*. Eles também mostraram a significativa atividade antimicrobiana in vitro e previniu a formação do biofilme usando *Escherichia coli*, *Enterococcus*, *Staphylococcus aureus*, coagulase-negativo, *Estafilococos*, *Pseudomonas*

aeruginosa e *Candida albicans* quando cateter de revestimento (Roe et al., 2008). Diamino fluoreto de prata ( $\text{Ag}[\text{NH}_3]_2\text{F}$ ), foi avaliado como um agente antibacteriano contra o biofilme *Enterococcus faecalis* e mostrou potencial para ser usado como um irrigante do canal radicular, especialmente em locais em que o potencial de escurecimento da dentina pela prata metálico não é uma grande preocupação (Hiraishi et al., 2010).

O tamanho da partícula também foi relacionado com a atividade antimicrobiana, uma vez que as partículas menores dão mais efeito bactericida do que as partículas maiores (Monteiro et al., 2009; Panáček et al., 2006; Baker et al., 2005). No presente estudo, foi utilizada a 90  $\mu\text{m}$  NPs de Ag produzido com a reação eletrolítica que deverá ter efeitos citotóxicos intermediários e antimicrobianos. No entanto, foi observado que a reação do tecido com uma baixa concentração de Ag NP (23 ppm) produziu um reação suave, mostrando que uma combinação adequada de concentração e tamanho pode otimizar os resultados in vivo. A Liga de prata/estanho já era utilizada como uma radiopacificador alternativo no cimento de silicato de cálcio para utilização como material retrobturador sem alterando o mecanismo de hidratação do material resultante (Camilleri, et al., 2010).

No presente estudo, o hipoclorito de sódio induziu uma resposta inflamatória moderada no início e uma ligeira redução após 30 dias, o que está de acordo com relatório anterior (Gomes-Filho et al., 2008a). O hipoclorito de sódio é um dos mais populares e mais usado irrigante endodôntico devido a sua atividade antibacteriana e capacidade de dissolver tecidos remanentes necróticos (Siqueira et al., 1997). O efeito antimicrobiano do hipoclorito de sódio resulta da formação de ácido hipocloroso (HOCl), quando em contato com resíduos orgânicos. HOCl exerce seu efeito pela oxidação de grupos sulfidrílicos no âmbito dos sistemas de enzimas bacterianas, assim perturba o metabolismo microbiano (Siqueira et al., 1997).



## 8. Conclusão Final

Este estudo concluiu que a dispersão de nanopartículas de prata foi biocompatível quando comparada à solução de hipoclorito de sódio, principalmente na menor concentração de 23ppm, esse ainda mostrou melhor resultado inflamatório no início quando confrontado com o hipoclorito de sódio 2,5%. Mas outros estudos serão necessários para analisar melhor o comportamento 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. Baker C, Pradhan A, Pakstis L, Pochan DJ, Shah SI. Synthesis and antibacterial properties of silver nanoparticles. *J Nanosci Nanotechnol* 2005;5:244–9.
3. 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.
4. 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.
5. 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.
6. 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.

7. Camilleri J. Hydration characteristics of calcium silicate cements with alternative radiopacifiers used as root-end filling materials. *J Endod* 2010;36:502-8.
8. Chaby, G., Viseux, V., Poulain, J.F., De Cagny, B., Denoeux, J.P., Lok, C., 2005. Topical silver sulfadiazine-induced acute renal failure. *Ann Dermatol Venereol* 132, 891–893.
9. Chen D, Xi T, Bai J. Biological effects induced by nanosilver particles: in vivo study. *Biomed Mater*. 2007 Sep;2(3):S126-8.
10. 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.
11. Costa CAS, Teixeira HM, Nascimento ABL, Hebling J (). Biocompatibility of two current adhesive resins. *J of Endodon* 200026:512–6.
12. Dunn, K., Edwards-Jones, V. The role of Acticoat™ with nanocrystalline silver in the management of burns. *Burns* 2004;30, S1–S9.
13. Ehrlich DG, Brian JD Jr, Walker WA. Sodium hypochlorite accident: inadvertent injection into the maxillary sinus. *J Endod* 1993;19:180-2.
14. Estrela C, Estrela CR, Barbin EL, Spanó JC, Marchesan MA, Pécora JD. Mechanism of action of sodium hypochlorite. *Braz Dent J* 2002;13:113-7.
15. Estrela C, Ribeiro RG, Estrela CR, Pécora JD, Sousa-Neto MD. Antimicrobial effect of 2% sodium hypochlorite and 2% chlorhexidine tested by different methods. *Braz Dent J* 2003;14:58-62.
16. 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.
17. Gomes BP, Ferraz CC, Vianna ME, Berber VB, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. In vitro antimicrobial activity of several concentrations of sodium hypochlorite and chlorhexidine gluconate in the elimination of *Enterococcus faecalis*. *Int Endod J* 2001;34:424-8.
18. Gomes Filho JE, Gomes BPF, Zaia AA, Novaes PD, Souza Filho FJ. Glycol Methacrylate: An alternative method for embedding subcutaneous implants. *J Endodon* 2001;27:266-8.

19. Gomes-Filho JE, Aurélio KG, Costa MMTM, Bernabé PFE. Comparison of the biocompatibility of different root canal irrigants. *J Appl Oral Sci* 2008a;16:137-44.
20. 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 Pathol Oral Radiol Endod* 2008b;106:71-6.
21. Gomes-filho JE, Defaria M, Bernabe P, Nery M, Otobonifilho J, Dezanjunior E, Demoraescosta M, Cannon M. Mineral Trioxide Aggregate but not Light-cure Mineral Trioxide Aggregate Stimulated Mineralization. *J Endodon* 2008c;34:62-65.
22. 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.
23. Gordon TM, Damato D, Christner P. Solvent effect of various dilutions of sodium hypochlorite on vital and necrotic tissue. *J Endod* 1981;7:466-9.
24. Harrison JJ, Ceri H, Turner RJ. Multimetal resistance and tolerance in microbial biofilms. *Nat Rev Microbiol* 2007;5:928–38.
25. Hess, W. Anatomy of root canals of the teeth of the permanent dentition. Sons and Danielson Ltd, 1925.
26. Hiraishi N, Yiu CK, King NM, Tagami J, Tay FR. Antimicrobial efficacy of 3.8% silver diamine fluoride and its effect on root dentin. *J Endod* 2010;36:1026-9
27. Hülsmann M, Hahn W. Complications during root canal irrigation--literature review and case reports. *Int Endod J* 2000;33:186-93.
28. Imazato S, Ehara A, Torii M, Ebisu S. Antibacterial activity of dentine primer containing MDPB after curing. *J Dent* 1998;26:267–71.
29. Jeansonne MJ, White RR. A comparison of 2.0% chlorhexidine gluconate and 5.25% sodium hypochlorite as antimicrobial endodontic irrigants. *J Endod* 1994;20:276-8.
30. 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.

31. Jin, C.Y., Zhu, B.S., Wang, X.F., Lu, Q.H.. Cytotoxicity of titanium dioxide nanoparticles in mouse fibroblast cells. *Chem Res Toxicol* 2008;21,1871–1877.
32. 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.
33. Kuruvilla JR, Kamath MP. Antimicrobial activity of 2.5% sodium hypochlorite and 0.2% chlorhexidine gluconate separately and combined, as endodontic irrigants. *J Endod* 1998;24:472-6.
34. 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.
35. Melaiye A, Youngs WJ. Silver and its application as an antimicrobial agent. *Expert Opin Ther Pat* 2005;15:125–30.
36. 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.
37. Monteiro DR, Gorup LF, Takamiya AS, Ruvollo-Filho AC, ER, Barbosa DB. The growing importance of materials that prevent microbial adhesion: antimicrobial effect of medical devices containing silver. *Int J Antimicrob Agents* 2009;34:103-10.
38. Nel, A., Xia, T., Madler, L., Li, N. Toxic potential of materials at the nanolevel. *Science* 2006;311, 622–627.
39. Oberdörster E. Manufactured nanomaterials (fullerenes, C60) induce oxidative stress in the brain of juvenile Largemouth Bass. *Environ Health Perspect* 2004;112:1058.
40. Ohashi S, Saku S, Yamamoto K. Antibacterial activity of silver inorganic agent YDA filler. *J Oral Rehabil* 2004;31:364–7.
41. 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.
42. 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.

43. 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.
44. Payne, C.M., Bladin, C. Colchester, A.C., Bland, J., Lapworth, R., Lane, D. Argyria from excessive use of topical silver sulphadiazine. *Lancet* 1992; 340, 126.
45. 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.
46. Roe D, Karandikar B, Bonn-Savage N, Gibbins B, Rouillet JB. Antimicrobial surface functionalization of plastic catheters by silver nanoparticles. *J Antimicrob Chemother.* 2008 Apr;61(4):869-76.
47. 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.
48. 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.
49. Siqueira JF Jr, Machado AG, Silveira RM, Lopes HP, Uzeda M. Evaluation of the effectiveness of sodium hypochlorite used with three irrigation methods in the elimination of *Enterococcus faecalis* from the root canal in vitro. *Int Endod J* 1997;30:279-32.
50. Siqueira JF Jr, Rocas IN, Favieri A et al. Chemomechanical reduction of the bacterial population in the root canal after instrumentation and irrigation with 1%, 2.5%, and 5.25% sodium hypochlorite. *J Endod* 2000;26:331-334.
51. 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.
52. 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.
53. Sundqvist G. Ecology of the root canal flora. *J Endod* 1992 18: 427-430.

54. Trop, M., Novak, M., Rodl, S., Hellbom, B., Kroell, W., Goessler, W., 2006. Silvercoated dressing acticoat caused raised liver enzymes and argyria-like symptoms in burn patient. *J Trauma* 60, 648–652.
55. 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.
56. 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.
57. Yaltirik M, Ozbas H, Bilgic B, Issever H. Reactions of connective tissue to mineral trioxide aggregate and amalgam. *Journal of Endodontics* 2004;30:95-9.
58. Yang SF, Rivera EM, Baumgardner KR, Walton RE, Stanford C. Anaerobic tissue-dissolving abilities of calcium hydroxide and sodium hypochlorite. *J Endod* 1995;21:613-6.