

ESTUDO DO EFEITO ANTIMICROBIANO DA SOLUÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA EM CANAIS INSTRUMENTADOS COM O SISTEMA PROTAPER UNIVERSAL.

Wilber Fellipe de Lima Gomes¹; Carla Cabral dos Santos Accioly Lins²

¹Estudante do Curso de Odontologia- CCS- UFPE; E-mail:ibiodonto@hotmail.com

²Docente/pesquisador do Depto de Anatomia – CCB – UFPE. E-mail: cabralcarla1@hotmail.com.

Sumário: Avaliar os efeitos antimicrobianos da solução de nanopartículas de prata (NP-Ag) na viabilidade celular de diferentes espécies de micro-organismos, associado a instrumentação com o Sistema Protaper Universal™. Quarenta pré-molares inferiores humanos foram selecionados e os canais radiculares contaminados por: *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosas* e *Enterococcus faecalis*. Estes foram divididos em 4 grupos de acordo com a solução irrigadora utilizada: Grupo 1: Solução de NP-Ag; Grupo 2: NaOCl a 1%; Grupo 3: (Controle positivo): Solução Salina estéril (NaCl 0,9%); Grupo 4: (Controle negativo– sem micro-organismos): Solução Salina estéril (NaCl 0,9%). Os canais foram instrumentados com o sistema rotatório ProTaper Universal™ e foi avaliada a ação antimicrobiana das soluções antes e após o preparo biomecânico. Os dados obtidos foram submetidos ao teste Exato de Fischer ($p < 0,05$). Ao final do experimento, o NaOCl a 1% se mostrou eficaz para eliminação de todos os micro-organismos testados ($p < 0,001$), enquanto a solução de NP-Ag apresentou resultado significativo apenas para a *C. albicans*, apresentando diferenças entre esses dois grupos ($p = 0,033$). Verificou-se que a NP-Ag foi capaz de reduzir o número de células viáveis de *C. albicans*, porém demonstrou ser ineficaz para *S. aureus*, *P. aeruginosas* e *E. faecalis*.

Palavras-chave: endodontia; nanopartículas; tratamento do canal radicular

INTRODUÇÃO

Na Endodontia a redução ou eliminação microbiana é obtida por meio da ação mecânica dos instrumentos endodônticos e das propriedades físico-químicas e antimicrobianas das soluções irrigadoras (Siqueira jr et al., 2000); ao longo dos anos várias substâncias têm sido preconizadas, todas elas apresentando indicações precisas, vantagens e desvantagens (Menezes et al., 2004). Nesse sentido, com intuito de buscar novas alternativas, procuramos avaliar a atividade antibacteriana da solução de nanopartículas de prata (NP-Ag) frente à *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosas* e *Enterococcus faecalis*, sob a ação da instrumentação com o sistema rotatório ProTaper Universal™.

MATERIAIS E MÉTODOS

A presente pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFPE (CAAE: 07864012.3.0000.5208), foi desenvolvida no Laboratório de Microbiologia do Departamento de Nutrição da UFPE, e no Departamento de Química Fundamental-DQF/UFPE que foi responsável pela realização dos ensaios de caracterização das nanopartículas.

Seleção da nanopartícula de prata: Para determinar as concentrações mínimas inibitórias (CIM) e mínimas bactericidas (CBM) e fungicidas (CFM) das nanopartículas de prata foi realizado o teste de microdiluição seriada em placas de 96 poços. Foi utilizado o meio caldo BHI para as cepas de bactérias e o meio caldo Sabouraud para a cepa de *C.*

albicans, as concentrações de NP-Ag variaram de 0 a 600µg/mL. Para determinação da CIM foi utilizado como revelador de viabilidade microbiana o corante resazurina. A CBM e CFM foram consideradas como sendo a menor concentração a partir da qual não foi observado crescimento microbiano, após cultivo em meio de cultura sólido, na ausência da nanopartícula de prata.

Seleção, Preparo dos Espécimes e Sistema Experimental: Foram selecionados 40 pré-molares inferiores humanos, íntegros, unirradulares, retos, com o comprimento variando entre 20 e 21 mm. Realizou-se a abertura coronária, e o sistema experimental foi confeccionado, utilizando-se de um frasco de vidro com tampa de borracha; o dente foi inserido até o limite amelocementário, a interface entre o dente e a tampa selado com cianoacrilato que foram levados a esterilização. Posteriormente, em uma câmara de fluxo laminar, os frascos foram preenchidos com BHI, e incubados a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por 96h para se verificar a esterilidade.

Preparo do pool microbiano e contaminação dos canais radiculares: Quatro suspensões microbianas foram formadas. As suspensões tiveram densidade óptica ajustada de acordo com a Escala de McFarland na concentração de 3×10^9 UFC/ mL para *C. albicans*, e na concentração aproximada de 3×10^8 UFC/ mL para *S. aureus*, *P.aeruginosas*, e *E. faecalis*, de cada suspensão, 1mL foi removido e uma mistura foi preparada. Em seguida, o sistema foi aberto e os canais radiculares infectados, exceto o controle negativo, com 10µL utilizando uma micropipeta automática. Limas esterilizadas tipo K 10# foram utilizadas para levar a suspensão para o interior do canal. Para se testar a efetividade da contaminação, o sistema foi incubado em estufa biológica a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por 48h. A turbidez do meio durante o período de incubação foi indicativo do crescimento microbiano.

Preparo biomecânico dos canais radiculares: os grupos foram divididos com dez espécimes cada: Grupo 1: Solução de NP-Ag; Grupo 2: Solução de NaOCl a 1%; Grupo 3: (Controle positivo): Solução Salina estéril (NaCl 0,9%); Grupo 4: (Controle negativo – sem micro-organismos): Solução Salina estéril (NaCl 0,9%). Todos foram instrumentados com o sistema rotatório ProTaper Universal™ até o instrumento F3. Após o preparo biomecânico e antes da coleta do material do canal radicular, no grupo 2, foi realizada irrigação com 2mL de Tiosulfato de Sódio a 5% para neutralizar o NaOCl. Para a avaliação da ação antimicrobiana das soluções, pontas de papel absorvente estéreis foram introduzidas no interior do canal radicular, por 1 minuto, da seguinte forma: T0-inicial (antes do preparo biomecânico), T1- após instrumentação com o F3, e depois transferidos para tubos de ensaio com BHI e incubados a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por 48h. Após este período, foi realizado o semeio em placas de Petri, para avaliar a presença ou ausência de crescimento microbiano. Os dados obtidos foram submetidos ao teste Exato de Fischer ($p < 0,05$).

RESULTADOS

Foram testados 4 soluções de NP-Ag, a atividade antimicrobiana delas em relação aos micro-organismos estudados foi avaliada segundo a determinação da concentração mínima bacteriostática/fungistática, e da concentração mínima bactericida/fungicida para 48 horas de crescimento microbiano. Como se pode observar pelos resultados descritos no Quadro 1, as NP-Ag inibiram o crescimento dos micro-organismos testes, apresentando efeito estático e cida, contudo foi verificado que a nanopartícula de prata NP3 apresentou menor concentração estática e cida, sendo considerada a melhor para aplicação nos ensaios nos dentes. Na Tabela 1, informa a quantidade total de prata, morfologia, tamanho e distribuição das nanopartículas de prata, que foram testadas neste experimento.

Quanto à intervenção realizada nos dentes, todas as amostras do controle positivo apresentaram crescimento microbiano antes e após o preparo biomecânico. Ao contrário do controle negativo, em que se observou ausência de crescimento em todos os tempos

experimentais, verificando-se diferenças significativas entre os grupos ($p < 0,001$). Com relação aos micro-organismos *E. faecalis*, *P. aeruginosas* e *S. aureus*, a solução de NP-Ag não promoveu a eliminação desses patógenos, porém a solução de NaOCl a 1% se mostrou efetiva ($p < 0,001$). Quando analisamos a ação das duas soluções sob a *C. albicans* verificou-se existir diferenças entre eles ($p=0,033$).

Quadro 1- Concentrações Inibitórias Mínimas (CIMs) e Concentrações Bactericidas Mínimas (CBMs) das NP-Ag para microrganismos patógenos.

Micro-organismos	NP1 mg/mL		NP2 mg/mL		NP3 mg/mL		NP4 mg/mL	
	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM
<i>Staphylococcus aureus</i>	31,98	47,97	16,92	25,38	15,78	23,67	23,37	31,16
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	31,98	47,97	33,84	50,76	31,56	47,34	31,16	46,74
<i>Enterococcus faecalis</i>	47,97	63,96	33,84	50,76	31,56	47,34	46,74	62,32
<i>Candida albicans</i>	31,98	47,97	25,38	33,84	23,67	31,56	31,16	46,74

Tabela 1- Quantidade total de prata, morfologia e tamanho e distribuição das NP-Ag.

NP	Prata (Ag)	Esférica		Triangular		Elíptica	
Amostra	Ag (mg/mL)	%	size (nm)	%	size (nm)	%	size (nm)
NP1	159.9	100.0	8.7±3.1	-	-	-	-
NP2	169.2	97.0	15.0±7.9	2.5	22.2±9.5	-	-
NP3	157.8	77.3	31.8±10.4	15.9	27.1±10.1	6.8	33.2±3.6
NP4	155.8	75.2	43.2±14.3	23.3	38.2±14.8	1.5	38.4±7,3

DISCUSSÃO

As NP-Ag vêm ganhando espaço nas pesquisas da área odontológica, principalmente devido ao seu amplo espectro antimicrobiano e antibiofilme (García-Contreras et al., 2011; Cheng et al., 2012), principalmente contra bactérias gram-positivas e gram-negativas, incluindo bactérias antibiótico-resistentes (Percival, Bowler & Dolman, 2007). Elas têm demonstrado satisfatória biocompatibilidade, especialmente em baixas concentrações (Sivieri-Araujo, et al. 2013). Na literatura, não há um consenso dos valores de CIM das NP-Ag (Chopra, 2007; Antunes et al., 2013). Sabe-se essa atividade é influenciada pelo tamanho da partícula (Onoda, 2011) e culmina com a interferência no processo de multiplicação bacteriana (Feng et al., 2000). Desta forma, neste estudo realizou-se a análise do CIM, para selecionar qual solução de NP-Ag teria melhor ação nos micro-organismos testes.

Após o preparo biomecânico com o sistema rotatório proaper universal™, observou-se na avaliação da ação antimicrobiana da solução de NP-Ag, que ela pode reduzir a viabilidade celular da *C. albicans*, porém não demonstrou ter ação para a *P. aeruginosas*, *E. faecalis* e *S. aureus*, corroborando com outras pesquisas (Santos, 2014; Carrera, 2009). Contudo a solução de NaOCl a 1% se mostrou eficaz como solução irrigadora para todos os micro-organismos teste, colaborando com outros estudos, que descrevem essa capacidade deste produto de promover alterações celulares biossintéticas e danos fosfolípidos (Siqueira jr. et al., 2000; Estrela et al., 2003).

CONCLUSÕES

Verificou-se que a nanopartícula de prata em combinação com a instrumentação automatizada do sistema ProTaper Universal™, foi capaz de reduzir o número de células

viáveis de *C. albicans*, porém demonstrou ser ineficaz para *S. aureus*, *P. aeruginosas* e *E. faecalis*.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem o apoio do Programa Institucional de Iniciação Científica da Universidade Federal de Pernambuco (PIBIC/UFPE), ao CNPq, ao Departamento de Química Fundamental-DQF/UFPE pela realização dos ensaios de caracterização das nanopartículas e a Professora Dra. Thayza Christina Montenegro Stamford pela contribuição dada na parte microbiológica.

REFERÊNCIAS

1. Antunes, F.S., Acqua, N.D., Bergmann, C.P., Giovanela, M. 2013. Synthesis, characterization and application of silver nanoparticles as antimicrobial agents. *Estudos Tecnológicos em Engenharia*. 9: 20-26.
2. Carreira, C.M. 2009. Avaliação *in vitro* do controle microbiano e da neutralização de endotoxinas presentes em canais radiculares por nanopartículas de prata. Tese de Doutorado. Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo. São Paulo
3. Cheng, L., Weir, M.D., Xu, H.H.K., Antonucci, J.M., Kraigsley, A.M., Lin, N.J., Lin-Gibson, S., Zhou, X. 2012. Antibacterial amorphous calcium phosphate nanocomposites with a quaternary ammonium dimethacrylate and silver nanoparticles. *Dent Mater* 28:561-572.
4. Chopra I. The increasing use of silver-based products as antimicrobial agents: a useful development or a case for concern? *J Antimicrob Chemother*. 2007; 59:587-90.
5. Estrela, C., Ribeiro, R.G., Estrela, C.R.A., Pécora, J.D., Sousa Neto, M.D. 2003. Antimicrobial effect of 2% sodium hypochlorite and 2% chlorhexidine tested by different methods. *Braz Dent J*.14:58-62.
6. Feng, Q.L., Wu, J., Chen, G.Q., Cui, F.Z., Kim, T.M., Kim, J.O. 2000. A mechanism study of antibacterial effect of silver ions on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *J Biomed Mater* 52: 662-668.
7. García-Contreras, R., Argueta-Figueroa, L., Mejía-Rubalcava, C., Jiménez-Martínez, R., Cuevas-Guajardo, S., Sánchez-Reyna, P.A., Mendieta-Zeron, H. 2011. Perspectives for the use of silver nanoparticles in dental practice. *International Dental Journal* 61:297-301.
8. Menezes, M.M., Valera, M.C., Jorge, A.O.C., Koga-ito, C.H.R., Mancini, M.N.G. 2004. In vitro evaluation of the effectiveness of irrigants and intracanal medicaments on microorganisms with root canals. *Int. Endod. J* 37: 311-319.
9. Onoda, H.K. 2011 Avaliação *in vitro* da ação antimicrobiana de três cimentos endodônticos modificados com nanopartículas de prata Tese de Doutorado. Universidade Federal do Mato Grosso do Sul. Campo Grande.
10. Percival, S.L., Bowler, P.G., Dolman, J. 2007. Antimicrobial activity of silver-containing dressings on wound microorganisms using an *in vitro* biofilm model. *Int Wound J* 4:186-191.
11. Santos, G. V. 2014. Efeito antibiofilme de soluções de hipoclorito de sódio e de nanopartículas de prata. Trabalho de conclusão de curso. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.
12. Siqueira Júnior, J.F., Rôças, I.N., Favieri, A., Lima, K.C. 2000 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* 26: 331-4.
13. Sivieri-Araujo, G., Santos, L.M.S, Queiroz, I.O.A, Wayama, M.T., Martins, C.M., Dezan-Júnior, E., Cintra, L.T.A., Gomes-Filho, J.E. 2013 Avaliação das nanopartículas de prata como solução irrigadora. *Dental Press Endod* 3:16-23.