



Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro Biomédico

Faculdade de Odontologia

Nancy Kudsi de Carvalho

**Nanopartículas de clorexidina-hexametafosfato na endodontia: síntese,
caracterização, avaliação biológica e físico-química da incorporação aos
cimentos endodônticos**

Rio de Janeiro

2020

Nancy Kudsi de Carvalho

**Nanopartículas de clorexidina-hexametafosfato na endodontia:
síntese, caracterização, avaliação biológica e físico-química da incorporação aos
cimentos endodônticos**

Tese apresentada, como requisito parcial para
obtenção do título de Doutor, ao Programa de
Pós-Graduação em Odontologia, da
Universidade do Estado do Rio de Janeiro.
Área de concentração: Endodontia.

Orientadores: Prof. Dr. Emmanuel João Nogueira Leal da Silva

Prof.^a Dra. Luciana Moura Sassone

Rio de Janeiro

2020

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB/B

C331 Carvalho, Nancy Kudsi de.
Nanopartículas de clorexidina-hexametafosfato na endodontia : síntese, caracterização, avaliação biológica e físico-química da incorporação aos cimentos endodônticos / Nancy Kudsi de Carvalho. – 2020.
110 f..

Orientadores: Emmanuel João Nogueira Leal da Silva, Luciana Moura Sassone

Tese (doutorado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Faculdade de Odontologia.

1. Clorexidina. 2. Fosfatos. 3. Nanopartículas. 4. Cimentos dentários. 5. Teste de Materiais. I. Silva, Emmanuel João Nogueira Leal da. II. Sassone, Luciana Moura. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Faculdade de Odontologia. IV. Título.

CDU
616.314

Bibliotecária: Adriana Caamaño CRB7/5235

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese, desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

Nancy Kudsi de Carvalho

Nanopartículas de clorexidina-hexametafosfato na endodontia: síntese, caracterização, avaliação biológica e físico-química da incorporação aos cimentos endodônticos

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Endodontia.

Aprovada em 11 de fevereiro de 2020.

Orientadores:

Prof. Dr. Emmanuel João Nogueira Leal da Silva
Faculdade de Odontologia – UERJ

Prof.^a Dra. Luciana Moura Sassone
Faculdade de Odontologia - UERJ

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Renato Liess Krebs
Faculdade de Odontologia - UERJ

Prof.^a Dra. Georgiana Amaral
Faculdade de Odontologia - UERJ

Prof. Dr. Tauby de Souza Coutinho Filho
Faculdade de Odontologia - UERJ

Prof.^a Dra. Cinthya Cristina Gomes
Universidade Federal Fluminense

Prof.^a Dra. Heloisa Carla Dell Santo Gusman
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Rio de Janeiro

2020

AGRADECIMENTOS

Primeiramente à Deus, origem de todas as coisas. Agradeço a força, a fé, e tudo que me foi concedido até hoje.

Aos meus familiares, meus pais, minha avó e antepassados. Tantas gerações que lutaram, e que pavimentaram o meu caminho, para que eu pudesse passar por ele de forma menos árdua. Obrigada pelo amor, pela dedicação e pelas concessões que fizeram por mim.

Ao meu marido, pelo amor, cuidado e compreensão nos meus momentos de ausência, de dificuldades, que foram tantas. Obrigada por compartilhar a vida comigo.

Aos meus amigos, por torcerem por mim, me apoiarem tantas vezes e por não desistirem da minha presença apesar de tanta ausência. Tantas gestações, encontros, aniversários que eu não pude acompanhar e estar presente. Não importa a distância, vocês estão sempre em meu coração.

Aos meu orientadores Prof. Dr. Emmanuel Silva e Prof^a Dra. Luciana Sassone por terem me confiado este trabalho, agradeço a oportunidade do aprendizado e todos os ensinamentos transmitidos nestes anos.

Ao Prof. Dr. Tauby Coutinho e Prof. Dr. Renato Krebs pela oportunidade do trabalho desde 2012 na especialização na UERJ, ali eu recebi a oportunidade de aprender a cada ano trabalhando com vocês, além disso aprendi o amor e o compromisso com esta especialidade.

À Prof. Dra. Sandra Rivera Fidel, sempre solícita e participativa, agradeço por hoje poder concluir esta etapa nesta universidade.

À toda equipe de professores da UERJ, com que tive o prazer de conviver há tantos anos e que me ensinam tanto sobre a odontologia e sobre a vida: Prof. Dr. Gustavo Ribeiro, Prof^a. Dra. Georgiana Amaral, obrigada pelos conselhos pelo carinho com que sempre me trataram, alguns que não convivo mais: Prof. Dr. Paulo Egreja, Prof^a Dra. Tereza Berlinck e Prof. Dr. Rivail Fidel.

Deixo um especial agradecimento ao Prof. Dr. Raphael Hirata, que para nossa tristeza desencarnou tão precocemente, deixando uma legião de alunos “órfãos”. Um ser humano ímpar, que foi fundamental na execução deste trabalho e que eu gostaria profundamente de compartilhar estes resultados. Agradeço a simplicidade e a forma acolhedora com que sempre me recebeu, com certeza Deus lhe guarda em bom lugar.

Aos meu amigos da UERJ, Cláudio Malizia, Milena Tomaz, muito obrigada pela parceria, por dividirem as aflições, as alegrias. Desejo todo o sucesso e felicidades para vocês.

Aos técnicos Douglas e Ana Beatriz por realizarem mais do que o trabalho que lhes cabia. Agradeço toda a disponibilidade e auxílio que prestaram, foram essenciais para que este trabalho fosse executado.

Agradeço especialmente a Bárbara Coelho, que além de ser tecnicamente responsável pelo laboratório que realizei os experimentos, tornou-se uma amiga para mim. Pude dividir tantas fases difíceis que atravessei, e ali no laboratório além de todo o aprendizado, pude compartilhar sentimentos. Obrigada por ter feito muito mais do que o seu trabalho, por se doar integralmente aos nossos trabalhos.

À equipe da UFRJ, técnico Heleno e Prof^a Dra. Renata Antoun Simão, que me acolheram e disponibilizaram não somente os recursos do laboratório, como também tempo para me auxiliarem em tantas análises.

À UNIGRANRIO por permitirem a utilização de toda a infra-estrutura possível e equipamentos, foram inúmeros dias convivendo nesta casa. Agradeço imensamente pela oportunidade.

Ao Prof. Dr. Lúcio Gonçalves pelos ensinamentos sobre estatística e pela disponibilidade e simplicidade com que me recebeu.

Aos funcionários da UERJ que sempre nos tratam atenciosamente, agradeço a paciência e auxílio ao longo destes anos.

Sonhar, porque se desistimos disso apaga-se a última claridade e nada mais valerá a pena. Escapar, na liberdade do pensamento, desse espírito de manada que trabalha obstinadamente para nos enquadrar, seja lá no que for. E que o mínimo que a gente faça seja, a cada momento, o melhor que afinal se conseguiu fazer.

Lya Luft

RESUMO

CARVALHO, N. K. **Nanopartículas de clorexidina-hexametafosfato na endodontia:** síntese, caracterização, avaliação biológica e físico-química da incorporação aos cimentos endodônticos. 2020. 110 f. Tese (Doutorado em Odontologia) - Faculdade de Odontologia, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2020.

Este estudo avaliou as influências da incorporação de nanopartículas (NPs) de clorexidina-hexametafosfato em diversas propriedades dos cimentos endodônticos: AH Plus, MTA Fillapex e Pulp Canal Sealer (PCS). As NPs foram sintetizadas através de uma suspensão contendo 5 mM de hexametafosfato de sódio (HMP) e 4 mM de digluconato de clorexidina (CHX) a 20%, caracterizadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV), espalhamento dinâmico de luz (DLS), potencial zeta, microscopia de força atômica (AFM) e espectroscopia de energia dispersiva de raios-X (EDS). Os cimentos endodônticos sofreram incorporação, em peso, de 2% e 5% das NPs. A ação antimicrobiana das amostras foi avaliada pelo teste de difusão em ágar e contato direto (DCT) frente a *Enterococcus faecalis*. O DCT foi conduzido em 3 tempos de armazenamento: cimentos frescos (T0), após 7 dias (T7) e após 30 dias (T30), e nos tempos de contato: 10 e 60 min. A citotoxicidade foi avaliada conforme as normas ISO 10993-12 através de extratos preparados em meio de cultura Dulbecco's modified Eagle's medium. As interações dos fibroblastos da linhagem MRC-5 com as diluições seriadas (1:1 a 1:8) dos extratos foram analisadas através do ensaio de quantificação do metabolismo mitocondrial pelo tetrazolium (MTT). O escoamento, radiopacidade, solubilidade e tempo de presa das amostras foi avaliado segundo a norma ISO 6876:2012. A solubilidade foi avaliada após 24 horas e 7 dias de imersão das amostras e o pH aferido após: 3h, 24h, 48h, 72h e 7 dias de armazenamento. Os resultados obtidos foram submetidos à análise estatística por análise de variância one-way e teste de Tukey, com nível de significância de 5%. A análise por MEV demonstrou aglomeração das NPs CHX-HMP, o diâmetro médio efetivo aferido por DLS foi de 169,39 nm e o potencial zeta foi de -10,18 mV. As NPs foram mensuradas por AFM, apresentando: 22,99 a 52,75 nm. Os elementos químicos: C, N, O, Na, P, Cl, identificados por EDS, comprovam a interação entre o digluconato de CHX e HMP. A ação antimicrobiana das NPs confirmou-se preliminarmente no teste de difusão em ágar e o DCT demonstrou o aumento da ação antimicrobiana dos cimentos endodônticos após incorporação das NPs, principalmente no MTA Fillapex, eliminando totalmente as cepas após 30 dias. A citotoxicidade dos cimentos analisados não foi potencializada pelas NPs. Houve redução do escoamento após a incorporação das NPs, no entanto sem infringir a norma ISO 6876:2012. A incorporação de NPs não alterou a radiopacidade das amostras, mas o MTA Fillapex não atingiu a radiopacidade mínima preconizada. As amostras incorporadas apresentaram redução da solubilidade após 24h de imersão, no entanto o MTA Fillapex em todas as amostras excedeu os valores preconizados pela ISO 6876:2012. Quanto ao pH, todas as amostras apresentaram decréscimo do valor com a progressão do tempo de imersão. O tempo de presa do AH Plus aumentou após a incorporação das NPs e o MTA Fillapex não atingiu a presa em nenhuma das condições testadas. Com os resultados obtidos conclui-se que a incorporação das NPs pode beneficiar o desempenho antimicrobiano dos cimentos endodônticos.

Palavras-chave: Nanopartículas. Cimentos endodônticos. Clorexidina.

ABSTRACT

CARVALHO, N. K. **Chlorhexidine hexametaphosphate nanoparticles in endodontics: synthesis, characterization, biological and physicochemical evaluation of incorporation to endodontic sealers.** 2020. 110 f. Tese (Doutorado em Odontologia) - Faculdade de Odontologia, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2020.

This study evaluated the influence of the incorporation of chlorhexidine hexametaphosphate NPs in various properties of the following endodontic sealers: AH Plus, MTA Fillapex and Pulp Canal Sealer (PCS). The NPs were synthesized using a suspension containing 5 mM sodium hexametaphosphate (HMP) and 4 mM 20% chlorhexidine digluconate (CHX), and characterized by scanning electron microscopy (SEM), dynamic light scattering (DLS), zeta potential, atomic force microscopy (AFM), energy-dispersive X-ray spectroscopy (EDS). Endodontic sealers were incorporated by weight of 2% and 5% of NPs. The antimicrobial activity of the samples was evaluated by agar diffusion test and direct contact (DCT) against *E. faecalis*. DCT was conducted in 3 storage times: fresh sealers (T0), after 7 days (T7) and after 30 days (T30) storage, and two contact times with *E. faecalis* suspension for 10 and 60 minutes. The cytotoxicity of the samples was evaluated according to ISO 10993-12 standards, through extracts prepared in Eagle modified by Dulbecco culture medium. The interactions of MRC-5 fibroblasts cell culture with the extracts serial dilutions (1: 1 to 1: 8) were analyzed by tetrazolium mitochondrial metabolism quantification assay (MTT). Samples flow, radiopacity, solubility and setting time were evaluated according to ISO 6876: 2012. Solubility was evaluated after 24 hours and 7 days of sample immersion and the pH measured after: 3h, 24h, 48h, 72h and 7 days of storage. The results were submitted to statistical analysis by one-way analysis of variance test and Tukey test, with a significance level of 5%. SEM analysis showed a tendency for CHX-HMP NPs to cluster, the effective mean diameter measured by DLS was 169,39 nm and the zeta potential: -10.18 mV. The NPs were individually measured by AFM, showing: 22.99 to 52.75 nm. The chemical elements: C, N, O, Na, P, Cl, identified by EDS, prove the interaction between CHX digluconate and HMP. The antimicrobial action of NPs was preliminarily confirmed in the agar diffusion test and the DCT demonstrated an increase in the antimicrobial action of endodontic sealers after incorporation of NPs, mainly in the MTA Fillapex, totally eliminating the strains after 30 days. There was reduction of flow after NPs incorporation, however without violating the ISO 6876: 2012 standard. The incorporation of NPs did not change the radiopacity of the samples, but MTA Fillapex did not reach the minimum radiopacity recommended. The incorporated samples showed reduced solubility after 24 hours of immersion, however the MTA Fillapex in all samples exceeded the values recommended by ISO 6876:2012.. Regarding the pH, all samples showed a decrease in the value as the immersion time progressed. AH Plus setting time increased after incorporation of NPs and MTA Fillapex did not reached setting under none of the conditions tested. With the obtained results it can be concluded that the incorporation of NPs can benefit the antimicrobial performance of endodontic sealers.

Keywords: Nanoparticles. Endodontic sealers. Chlorhexidine.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Quadro 1 -	Apresentação e composição dos cimentos endodônticos	33
Figura 1 -	Fluxograma dos grupos de materiais analisados	34
Figura 2 -	Componentes da suspensão de CHX-HMP	36
Figura 3 -	Elaboração da suspensão de CHX-HMP	37
Figura 4 -	<i>Pellet</i> obtido depositado em placas de Petri	38
Figura 5 -	Obtenção das NPs de CHX-HMP	38
Figura 6 -	Moldes de borracha para confecção das amostras de cimento endodôntico	40
Figura 7 -	Análise das amostras em microscopia eletrônica de varredura	40
Figura 8 -	Mecanismo da análise por espalhamento dinâmico de luz	41
Figura 9 -	Equipamento utilizado da análise por espalhamento dinâmico e potencial zeta	42
Figura 10 -	Imagem do <i>cantilever</i> e sonda utilizado no microscópio de força atômica	44
Figura 11 -	Figura esquemática do método de análise por microscopia de força atômica	45
Figura 12 -	Imagem das NPs após preparo para análise em microscopia de força atômica	46
Figura 13 -	Figura esquemática do método de análise por espectroscopia de energia dispersiva de raios-X	48
Figura 14 -	Equipamentos para análises por microscopia eletrônica de varredura e espectroscopia de energia dispersiva de raios-X	49
Figura 15 -	Placas de Petri com amostras dos materiais posicionadas	51
Figura 16 -	Placa de 96 poços utilizada no teste de contato direto	52
Figura 17 -	Contagem das unidades formadoras de colônia em placas de Petri	54
Figura 18 -	Equipamentos e materiais utilizados na análise da citotoxicidade das amostras	56
Figura 19 -	Materiais utilizados e procedimentos da análise do escoamento	58

Figura 20 -	Confecção das amostras e análise da radiopacidade	59
Figura 21 -	Moldes e imersão das amostras para análise da solubilidade	60
Figura 22 -	Pesagens das amostras dos cimentos endodônticos para análise de solubilidade	61
Figura 23 -	Materiais utilizados na análise do pH	62
Figura 24 -	Equipamento e protocolo de análise do pH	63
Figura 25 -	Equipamento e protocolo da análise do tempo de presa	65
Figura 26 -	Caracterização da superfície das amostras das nanopartículas de CHX-HMP em microscopia eletrônica de varredura	66
Figura 27 -	Caracterização da superfície das amostras dos cimentos endodônticos em microscopia eletrônica de varredura	67
Figura 28 -	Imagens representativas das NPs CHX-HMP no microscópio de força atômica	69
Figura 29 -	Representação da análise química elementar das nanopartículas de CHX-HMP	70
Gráfico 1 -	Avaliação da atividade antimicrobiana dos cimentos endodônticos frescos sobre o <i>E.faecalis</i> através da contagem de UFC	73
Gráfico 2 -	Avaliação da atividade antimicrobiana dos cimentos endodônticos após armazenamento de 7 dias sobre o <i>E.faecalis</i> através da contagem de UFC	74
Gráfico 3 -	Avaliação da atividade antimicrobiana dos cimentos endodônticos após armazenamento de 30 dias sobre o <i>E.faecalis</i> através da contagem de UFC	74
Gráfico 4 -	Resultados da viabilidade celular dos fibroblastos expostos aos extratos do grupo AH Plus em quatro diluições avaliadas	75
Gráfico 5 -	Resultados da viabilidade celular dos fibroblastos expostos aos extratos do grupo MTA Fillapex em quatro diluições avaliadas	76
Gráfico 6 -	Resultados da viabilidade celular dos fibroblastos expostos aos extratos do grupo PCS em quatro diluições avaliadas	76

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Resultados obtidos das análises das NPs por DLS.....	68
Tabela 2 -	Composição química elementar das NPs CHX-HMP.....	71
Tabela 3 -	Resultados correspondentes às análises das amostras pelo teste de difusão em ágar	72
Tabela 4 -	Viabilidade celular dos fibroblastos expostos aos extratos dos cimentos endodônticos nas quatro diluições avaliadas.....	77
Tabela 5 -	Valores correspondentes à média e desvio padrão dos diâmetros dos cimentos endodônticos nas análises do escoamento	78
Tabela 6 -	Valores correspondentes à média e desvio padrão das análises de radiopacidade	79
Tabela 7 -	Representação da média e desvio padrão das análises da solubilidade	80
Tabela 8 -	Resultados das análises do PH nos diferentes períodos de tempo	81
Tabela 9 -	Resultados correspondentes à média e desvio padrão das análises do tempo de presa	82

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AH	AH Plus
AFM	Microscopia de força atômica
ATCC	American Type Culture Collection
CHX	Clorexidina
CIV	Cimento de ionômero de vidro
DCT	Teste de contato direto
DLS	Espalhamento dinâmico de luz
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's médium
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDS	Espectroscopia de energia dispersiva de raios-X
EVA	Etileno vinil acetato
<i>E. faecalis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
HMP	Hexametáfosfato de sódio
ISO	International Organization for Standardization
MEV	Microscópio eletrônico de varredura
MTT	Ensaio 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil brometo de tetrazólio
MTA F	MTA Fillapex
NPs	Nanopartículas
NPs CHX-HMP	Nanopartículas de clorexidina-hexametáfosfato
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PCS	Pulp Canal Sealer
PF	Peso final
PQM	Preparo químico-mecânico
PI	Peso inicial
<i>Sc. Wiggsiae</i>	<i>Scardovia Wiggsiae</i>
SCR	Sistema de canais radiculares
SPSS	Statistical Package for the Social Sciences
<i>S. mutans</i>	<i>Streptococcus mutans</i>
TMP	Trimetáfosfato de sódio

TP	Trifosfato de sódio
TSA	Tryptcase Soy Agar
TSB	Tryptcase Soy Broth
UFC	Unidades formadoras de colônia

LISTA DE SÍMBOLOS

Nm	Nanômetro
%	Porcento
Mm	Micrômetro
pH	Potencial hidrogeniônico
mM	Milimolar
mL	Mililitro
=	Igual
/	Divisão
mmol/L	Milimol por litro
X	Vezes
G	Gramma
min	Minutos
rpm	Rotações por minuto
° C	Graus Celsius
mm	Milímetro
h	Hora
kV	Quilovolt
µl	Microlitro
°	Graus
kHz	Quilohertz
N/m	Newtons por metro
$C_{22}H_{30}Cl_2N_{10}.2C_6H_{12}O_7$	Digluconato de clorexidina
$((NaPO_3)_6)$	Hexametáfosfato de sódio
n	Número amostral
NaOCl	Hipoclorito de sódio
<	Menor
n°	Número
mm ² /mL	Milímetro quadrado por mililitro
µg/mL	Micrograma por mililitro
unidades/mL	Unidades por mililitro

CO ₂	Dióxido de carbono
cm ²	Centímetro quadrado
:	Proporção
mg/mL	Miligrama por mililitro
±	Mais ou menos
s	Segundo
mA	Miliampère
cm	Centímetro
Al	Alumínio
-	Menos
α	Nível de significância
mV	Milivolt
cps	Contagem por segundo
KeV	Mil elétrons-volt
C	Carbono
N	Nitrogênio
O	Oxigênio
Na	Sódio
P	Fósforo
Cl	Cloro
P	Valor de P
>	Maior
UFC/mL	Unidades formadoras de colônia por mililitro
Au	Ouro
Cu	Cobre
Fe	Ferro
Zn	Zinco
Å	Ångstrom

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	17
1	REVISÃO DE LITERATURA	19
1.1	Nanotecnologia	19
1.2	Nanopartículas de clorexidina-hexametafosfato	23
1.3	Incorporação de agentes antimicrobianos aos cimentos endodônticos	29
2	PROPOSIÇÃO	32
2.1	Objetivo geral	32
2.2	Objetivos específicos	32
3	MATERIAIS E MÉTODOS	33
3.1	Síntese das nanopartículas de clorexidina-hexametafosfato	34
3.2	Caracterização das nanopartículas de clorexidina-hexametafosfato	39
3.2.1	<u>Microscopia eletrônica de varredura</u>	39
3.2.2	<u>Espalhamento dinâmico de luz</u>	41
3.2.3	<u>Potencial zeta</u>	43
3.2.4	<u>Microscopia de força atômica</u>	44
3.2.5	<u>Espectroscopia de energia dispersiva de raios-X</u>	47
3.3	Análises biológicas das nanopartículas de clorexidina-hexametafosfato	49
3.3.1	<u>Teste de difusão em ágar</u>	49
3.3.2	<u>Teste de contato direto</u>	51
3.3.3	<u>Avaliação da citotoxicidade</u>	54
3.4	Análises físico-químicas das nanopartículas de clorexidina-hexametafosfato	57
3.4.1	<u>Escoamento</u>	57
3.4.2	<u>Radiopacidade</u>	58
3.4.3	<u>Solubilidade</u>	60
3.4.4	<u>pH</u>	62
3.4.5	<u>Tempo de presa</u>	64
3.5	Análise estatística	65

4	RESULTADOS	66
4.1	Caracterização das nanopartículas de clorexidina-hexametafosfato	66
4.1.1	<u>Microscopia eletrônica de varredura</u>	66
4.1.2	<u>Espalhamento dinâmico de luz</u>	68
4.1.3	<u>Potencial zeta</u>	68
4.1.4	<u>Microscopia de força atômica</u>	69
4.1.5	<u>Espectroscopia de energia dispersiva de raios-X</u>	70
4.2	Análises biológicas das nanopartículas de clorexidina-hexametafosfato	71
4.2.1	<u>Teste de difusão em ágar</u>	71
4.2.2	<u>Teste de contato direto</u>	72
4.2.3	<u>Citotoxicidade</u>	75
4.3	Análises físico-químicas das nanopartículas de clorexidina-hexametafosfato	78
4.3.1	<u>Escoamento</u>	78
4.3.2	<u>Radiopacidade</u>	79
4.3.3	<u>Solubilidade</u>	79
4.3.4	<u>pH</u>	80
4.3.5	<u>Tempo de presa</u>	81
5	DISCUSSÃO	83
	CONCLUSÃO	95
	REFERÊNCIAS	96

INTRODUÇÃO

O tratamento endodôntico visa primordialmente a eliminação do tecido pulpar, microrganismos e outros agentes irritantes contidos no sistema de canais radiculares (SCR), através da aplicação de estratégias químicas e mecânicas que viabilizem a realização da obturação tridimensional do SCR (RUDDLE, 1997). O sucesso do tratamento endodôntico depende de um ambiente favorável à prevenção e à cura dos tecidos perirradiculares, sendo imprescindível o selamento hermético e tridimensional do SCR (LI et al., 2014).

A guta percha associada a um cimento endodôntico são os materiais vastamente utilizados na obturação do SCR (SHOKOUHINEJAD et al., 2011). Os cimentos endodônticos cumprem a função de preencher os espaços existentes entre a guta-percha e as paredes dos canais radiculares na obturação do SCR (WU; VAN; WESSELINK, 2000). Atualmente, os cimentos endodônticos são comercialmente disponíveis em diversas classificações e fórmulas: cimentos à base de óxido de zinco e eugenol; cimentos ionoméricos; cimentos de silicato de cálcio e cimentos resinosos, dentre outros.

Os cimentos endodônticos idealmente devem possuir propriedades antimicrobianas, a fim de maximizar a eliminação de microrganismos que persistam aos procedimentos químico-mecânicos. No intuito de melhorar a eficiência desses materiais, a incorporação de diferentes agentes antimicrobianos tem sido considerada como uma abordagem para aumentar a atividade antimicrobiana (BARROS et al., 2014a; DEL CARPIO-PEROCHENA et al., 2015; KESLER SHVERO et al., 2013; KISHEN et al., 2008; SHAYANI RAD et al., 2013; SHRESTHA et al., 2010), gerando inúmeras pesquisas sobre as aplicações de diversos nanomateriais aos cimentos endodônticos.

Existem diversos agentes antimicrobianos veiculados sob forma de nanopartícula, dentre eles a clorexidina (CHX), um potente agente antimicrobiano, de alta eficácia e baixo custo, que apresenta substantividade, uma das grandes vantagens da sua aplicação. Recentemente a CHX foi incorporada a vários tipos materiais: insumos à base de silicone (GARNER et al., 2015), cimentos ionoméricos (BELLIS et al., 2016; 2018; HOOK et al., 2014), materiais biomédicos (BARBOUR et al., 2013; 2016; WOOD et al., 2014), e superfícies de implantes (GARNER et al., 2015; WOOD et al., 2015), em função de sua ação antimicrobiana de amplo espectro, eficaz contra bactérias Gram-positivas, negativas e fungos.

As nanopartículas de clorexidina veiculadas ao hexametáfosfato (NPs CHX-HMP) são consideradas dispositivos de liberação lenta e prolongada (BELLIS et al., 2016; 2018), e atuam na redução da colonização e crescimento de microrganismos patogênicos (BARBOUR et al., 2013; 2016; BELLIS et al., 2018; GARNER et al., 2015; HOOK et al., 2014; WOOD et al., 2014; 2015). No entanto, até o presente momento, esta nanopartícula não foi testada incorporada a cimentos obturadores endodônticos.

Devido o histórico científico de atuações promissoras das NPs CHX-HMP, este estudo propõe a avaliação físico-química e biológica de cimentos endodônticos após a incorporação destas nanopartículas (NPs).

1 REVISÃO DE LITERATURA

1.1 Nanotecnologia

A nanotecnologia é uma área do conhecimento que realiza o domínio de partículas e interfaces extremamente pequenas, que conceitualmente apresentam componentes com 1 a 100 nm, em pelo menos uma de suas dimensões, incluindo aglomerados de átomos, grãos, fibras, filmes e compósitos (KONG et al., 2006). Os nanomateriais podem ser originados de materiais naturais ou sintéticos, e contém partículas dispostas em um estado não-ligado ou apresentam-se como um agregado ou aglomerado. Nestes casos 50% ou mais destas partículas em número, tamanho e distribuição devem possuir uma ou mais dimensões externas menor que 100 nm. Com base na forma, podem classificar-se em: partículas, esferas, tubos, hastes ou placas (KISHEN, 2015; SHRESTHA; KISHEN, 2016).

Indiscutivelmente, a tecnologia aplicada aos materiais nanométricos vem apresentando rápida evolução no âmbito científico nas últimas décadas, devido aos altos investimentos neste ramo, realizados em escala mundial. A aplicação da nanotecnologia difunde-se de forma inovadora e promissora, nos mais diversos segmentos científicos e industriais (SAMIEI et al., 2016; TELLES; PRADO; SIMÃO, 2017), permitindo o controle do tamanho e da composição dos nanomateriais, viabilizando a criação de novos materiais, dispositivos e sistemas nanométricos, além de aprimorar as propriedades de materiais já existentes (BARROS et al., 2014a; SAMIEI et al., 2016).

Historicamente, as NPs são utilizadas em diversas áreas: medicina, química e processos do meio ambiente (catálise, filtração, tratamentos para potabilidade da água de abastecimento, redução de consumo energético, aumento da eficiência na produção de energia, fomentação de sistemas energéticos sustentáveis, reciclagem de pilhas), sistemas de comunicação e informação (dispositivos semicondutores e optoeletrônicos, computadores quânticos), indústria (equipamentos aeroespaciais, automobilísticos e refinarias) (CUSHING; KOLESNICHENKO; O'CONNOR, 2004; KANAPARTHY; KANAPARTHY, 2011; WANG et al., 2019). Inclui-se também: a fabricação de aditivos alimentares (LIU et al., 2011), produtos antibacterianos (QI et al., 2004), produtos de higiene pessoal e cosméticos (MENARD; DROBNE; JEMEC, 2011).

No campo da medicina, o termo nanomedicina foi mencionado inicialmente em 1993. Este termo foi descrito como a observação, controle e tratamento dos sistemas biológicos do corpo humano em nível molecular utilizando nanoestruturas e nanodispositivos (FREITAS, 2000). A utilização de NPs na nanomedicina é aplicada em exames de finalidade diagnóstica (CORMODE et al., 2010; ELLIS; PELLICO; DAVIS, 2019), nas pesquisas biológicas, na detecção biomolecular em ensaios através de biossensores de DNA (LI et al., 2005), bioimagem celular e imunoenaios (DAHIYA; MEHTA, 2019), na regeneração tecidual (DONG et al., 2020; VIEIRA et al., 2017). Novas formulações para o diagnóstico e tratamento do câncer, também utilizam NPs, aprimorando os métodos tanto de detecção de tumores, como também aumentando a eficácia dos medicamentos utilizados nos tratamentos (BAETKE; LAMMERS; KIESSLING, 2015).

No âmbito terapêutico, há uma grande relevância dos nanomateriais quanto à sua atuação como nanocarreadores, que atuam na liberação de fármacos devido suas características (BHASKAR et al., 2010; BRIGGER; DUBERNET; COUVREUR, 2002; COMOGLU; ARISOY; AKKUS, 2017; FADEEL; GARCIA-BENNETT, 2010). Sob os aspectos físico-químicos peculiares dos nanomateriais, ressalta-se: os tamanhos ultra-pequenos, a grande área de superfície em relação à massa do material, e a maior reatividade química e maior dispersão, comparativamente aos seus equivalentes, de mesma composição química, constituídos de macropartículas (COHEN, 2001; THOMAS et al., 2006).

Quanto a estas propriedades dos nanomateriais, o aumento da área de superfície relativa e os efeitos quânticos, representam os principais fatores que diferenciam os nanomateriais dos demais. Visto que respectivamente, uma partícula de 30 nm possui 5% de seus átomos em sua superfície, de 10 nm possui 20% de seus átomos, e de 3 nm possui 50% de seus átomos. Demonstra-se que as NPs tem uma área de superfície maior por unidade de massa em comparação com partículas maiores (DREXLER, 2006; KANAPARTHY; KANAPARTHY, 2011).

Estes fatores viabilizam o domínio das propriedades de determinadas matérias. À medida que suas dimensões são reduzidas, aproximando-se da nanoescala, surgem alterações e novos fenômenos no comportamento óptico, físico-químico, biológico e magnético de seus componentes (QUINA, 2004; WATTS; MAROUF; AL-HINDI, 2003; ZHANG; WEBSTER, 2009). Uma representação que exemplifica estes fenômenos, é a comparação do níquel nanocristalino que apresenta tanta resistência mecânica quanto o aço temperado (DREXLER, 2006).

O aproveitamento destas características dos nanomateriais em diversas aplicações tecnológicas constituem a base da nanotecnologia. A razão entre o aumento da área de superfície em relação ao volume dos nanomateriais e o número aumentado de átomos presentes próximos à superfície em comparação com as macroestruturas, contribuem no excelente desempenho destes nanomateriais nos mais variados âmbitos. Tais características permitem a elaboração de materiais e dispositivos altamente específicos, que promovem interações a níveis subcelulares e moleculares no corpo humano (VENUGOPAL et al., 2008).

Desta forma, atingem a máxima eficácia terapêutica e mínimos efeitos colaterais. Assim, surgiram principalmente os sistemas de administração e transporte de fármacos, devido o tamanho reduzido das NPs, sendo possível que estas não sejam reconhecidas ou restringidas pelo corpo humano, migrando e atravessando membranas celulares, carreando os fármacos exatamente ao sítio alvo (VENUGOPAL et al., 2008).

Conforme a decorrência do avanço do desenvolvimento dos nanomateriais e o aumento de suas aplicações, surgiu sua utilização no âmbito odontológico, visando proporcionar uma saúde bucal ideal, através do uso de nanomateriais e nanotécnicas em diversos aspectos da odontologia (BHARDWAJ et al., 2014). O escopo de aplicações inclui uma ampla variedade de questões relacionadas à saúde bucal, desde o diagnóstico através de radiografias digitais obtidas por cintiladores de nanofósforos, nas quais a dose de radiação é diminuída e obtém-se imagens de alta qualidade (MUPPARAPU, 2006), até os tratamentos em diversas especialidades odontológicas.

Atualmente as NPs são utilizadas em inúmeros tratamentos odontológicos: agentes para o tratamento da hipersensibilidade à dentina, em materiais restauradores, nos quais os nanocompósitos fornecem uma interface mais estável e natural entre os tecidos duros mineralizados dentários melhorando a transição entre a estrutura do dente e os biomateriais restauradores (KANAPARTHY; KANAPARTHY, 2011); na eliminação de microrganismos, como por exemplo as NPs de prata que mesmo em baixa concentração, apresentaram efeito antimicrobiano contra o *Streptococcus mutans*, principal microrganismo associado à cárie dentária, gerando menor toxicidade (HERNÁNDEZ-SIERRA et al., 2008); na eliminação de biofilme, através de sistemas de atuação na liberação de fármacos em bolsas periodontais; no diagnóstico e tratamento de cânceres orais, anestesia local, dentifrícios, e também nos implantes dentários e enxertos ósseos (AHMADZADEH et al., 2016; BESINIS et al., 2015; FREITAS, 2000; KANAPARTHY; KANAPARTHY, 2011; SHRESTHA; KISHEN, 2016)

A aplicação da nanotecnologia na Endodontia visa a promoção e criação de novos produtos de diversas funções, assim como, o aprimoramento das propriedades de materiais endodônticos já existentes e comercializados (SAMIEI et al., 2016). A atuação destes nanomateriais é direcionada principalmente para superar o desafio microbiano, aumentando a eficácia antimicrobiana dos tratamentos endodônticos através das propriedades antibacterianas, anti-adesivas e carreadoras de fármacos (FAN et al., 2016; HASEEB et al., 2016; PAGONIS et al., 2010). São realizadas também investigações quanto às propriedades osteogênicas (FAN et al., 2016) e propriedades mecânicas (MOHN et al., 2010; NEVAREZ-RASCON et al., 2014; ; SHAYANI RAD et al., 2013), além da avaliação do desempenho destes nanomateriais em processos regenerativos pulpares (BIZ; CUCCO; CAVALCANTI, 2019; MOONESI RAD et al., 2019; SHRESTHA; KISHEN, 2016).

Sob o aspecto da atividade antimicrobiana, as NPs possuem amplas aplicações no controle de infecções, especialmente no ambiente da cavidade oral, que possui alta complexidade. As reduzidas dimensões a níveis atômicos das NPs, gera o aumento considerável na área de superfície, por conseguinte aumenta o contato dos agentes terapêuticos das NPs com os microrganismos, permitindo uma interação mais efetiva com a membrana dos patógenos (SAWAI et al., 1996; SHI et al., 2006). Deste modo, em função destas grandes áreas de superfície das NPs, são providas por consequência, maiores concentrações dos agentes terapêuticos no local alvo, representando a eficácia no comportamento antimicrobiano destes materiais quando comparadas com as contrapartes convencionais (SHRESTHA; KISHEN, 2016).

Devido à ultra-pequena dimensão alcançada, as NPs podem ser conduzidas a regiões anatômicas complexas (SHRESTHA et al., 2009), tendo a capacidade de adentrar nos túbulos dentinários, que apresentam diâmetros médios de 0,5 a 4 μm . Tal fato foi avaliado por Shrestha et al (2009), que verificaram a influência da ação ultrassônica na penetração de nanopartículas de quitosana nos túbulos dentinários através de microscopia eletrônica de varredura. Esta capacidade de penetração possui alta significância, visto que a permanência bacteriana nos túbulos dentinários tem sido associada a infecções persistentes do SCR (ABRAMOVITZ et al., 2015; SHRESTHA; KISHEN, 2016; SIQUEIRA; UZEDA, 1996). A utilização adequada das NPs, assim como o grau de eficácia antimicrobiana depende do método de administração estabelecido, do tipo de agente antimicrobiano e o material ao qual foi associada, como por exemplo: irrigantes, medicações intracanal e cimentos endodônticos (DEL CARPIO-PEROCHENA et al., 2015; SHRESTHA; KISHEN, 2014).

Outra característica relevante é a capacidade das NPs permanecerem ativas quanto à ação antimicrobiana por longo períodos (BARROS et al., 2014a; DEL CARPIO-PEROCHENA et al., 2015; HASEEB et al., 2016; SHRESTHA et al., 2010). No entanto, é preponderante que os nanomateriais quando aplicados a novos materiais ou a materiais previamente comercializados, não interfiram nos requisitos ideais pré-estabelecidos, no que tange às propriedades físico-químicas, biológicas dos materiais ao qual serão adicionados (BARROS et al., 2014a; TELLES; PRADO; SIMÃO, 2017). E, deste modo, não comprometam o desempenho satisfatório dos materiais utilizados nos procedimentos endodônticos. Atualmente, tal fato representa um grande desafio científico.

Acerca dos possíveis efeitos inesperados das NPs, a pesquisa em nanotecnologia deve ser realizada com cautela. Primordialmente, respeitando protocolos de segurança e empregando os procedimentos adequados ao controle de qualidade e dos riscos deste processo (AYDIN; SIPAHI; CHAREHSAZ, 2012; YAH; SIMATE; IYUKE, 2012), a fim de garantir a segurança biológica, e para que os nanomateriais sejam manipulados e aplicados sem ocasionarem efeitos citotóxicos, e de preferência gerando mínimos efeitos colaterais (ABBASZADEGAN et al., 2015; CHÁVEZ-ANDRADE et al., 2017).

1.2 Nanopartículas de clorexidina-hexametafosfato

Atualmente diversos agentes antimicrobianos tem sido associados às NPs, dentre eles a CHX, que apresenta diversas aplicações na odontologia e na medicina. A CHX é considerada um potente antimicrobiano, cuja estrutura química de caráter catiônico apresenta molécula simétrica, consistindo de dois anéis 4-clorofenil e dois grupos biguanida conectados por uma cadeia de hexametileno central (GREENSTEIN; BERMAN; JAFFIN, 1986). Esta bisbiguanida é uma base forte e apresenta-se praticamente insolúvel em água, o que permite que sua forma comercial possa afigurar-se em soluções aquosas, géis e como compostos em pomadas (GOMES et al., 2013).

Quanto aos aspectos antimicrobianos da CHX, esta atua sobre diversas bactérias orais patogênicas, inibindo microrganismos Gram-positivos e Gram-negativos, anaeróbicos estritos e facultativos, assim como fungos e leveduras (GARNER; BARBOUR, 2015; GOMES et al., 2013). As moléculas da CHX alcançam atividade antimicrobiana ideal na faixa de pH de 5.5 a

7.0, e apresentam caráter hidrofóbico e lipofílico, interagindo com os fosfolipídeos e lipopolissacarídeos das membranas celulares dos patógenos, e assim penetrando nas células por transporte ativo ou passivo (ATHANASSIADIS; ABBOTT; WALSH, 2007).

Em decorrência da adsorção da CHX à parede celular aniônica dos patógenos, ocorre alteração das estruturas superficiais, aumentando a permeabilidade da membrana bacteriana, facilitando a entrada da CHX no citoplasma. Ocorre a perda do equilíbrio osmótico e, por conseguinte uma precipitação dos constituintes citoplasmáticos, impedindo a reparação da membrana celular e levando à morte dos microrganismos (HUGO; LONGWORTH, 1964). Quando há disponibilidade de CHX em baixa concentração, sua atuação é considerada bacteriostática, causando seu rompimento da membrana celular, e conseqüente perda de material intracelular. Quando em alta concentração, é considerada bactericida, ao inibir a respiração celular, causando perda de ácido nucléico e coagulação citoplasmática (GOMES et al., 2013).

A CHX tem recebido maior projeção nas pesquisas científicas devido diversas vantagens do seu uso, como: eficácia, baixo custo, ausência de resistência microbiana, e substantividade. Os íons carregados positivamente liberados pela CHX podem adsorver na dentina, devido sua tendência de ligar-se à hidroxiapatita, impedindo a colonização microbiana na superfície da dentina de forma prolongada, além do período real de aplicação. Este efeito antimicrobiano atrelado à substantividade depende da quantidade de moléculas de CHX disponíveis para interagir com o substrato dentinário (ATHANASSIADIS; ABBOTT; WALSH, 2007; KHADEMI; MOHAMMADI; HAVAAEE, 2006; MOHAMMADI; ABBOTT, 2009).

Outro aspecto que gera grande interesse no desenvolvimento de estratégias de liberação da CHX aplicada a diversos materiais, consiste no fato de não gerarem resistência antimicrobiana, o que reduz a probabilidade de farmacoressistência do hospedeiro em comparação aos demais antibióticos (GOMES et al., 2013; MILSTONE; PASSARETTI; PERL, 2008; MOHAMMADI; ABBOTT, 2009). Além dos raros relatos de alergia à CHX, geralmente relacionados à sensibilização anterior. No entanto, quanto à citotoxicidade, a CHX é descrita cientificamente como biologicamente aceitável e relata-se que os efeitos citotóxicos são diretamente correlacionados à dose de exposição, frequência e duração (GOMES et al., 2013).

Na endodontia, a CHX é utilizada nas diversas etapas dos procedimentos da terapia endodôntica. Inicialmente utilizada em forma líquida, sob a apresentação de digluconato de

CHX, e em gel à base de natrosol, este último atua lubrificando as paredes do canal, facilitando o preparo químico-mecânico (PQM), mantendo os detritos em suspensão e eliminando microrganismos (GOMES et al., 2013; MOHAMMADI; ABBOTT, 2009). No entanto, outros veículos tem sido testados em associação à CHX, a fim de gerar maior aplicabilidade aos materiais endodônticos, e todavia aprimorar o desempenho dos materiais.

Inicialmente, a aplicação da CHX aos diversos materiais ocorria através do uso de soluções aquosas de CHX (BARBOUR et al., 2009; MANTRI; PARKHEDKAR; MANTRI, 2013; RAAD et al., 2012; TABARY et al., 2014). Tal fato restringia o tipo, a composição e a finalidade dos materiais aos quais a CHX poderia ser associada, visto que a apresentação era sob a forma líquida. Posteriormente, surgiram novos veículos de diversas apresentações e fórmulas associados à CHX, como: polietilenoglicol (HASEEB et al., 2016), silicato de cálcio mesoporoso (FAN et al., 2016), sílica mesoporosa (SENEVIRATNE et al., 2014), ácidos graxos (OBERMEIER et al., 2014) e diacetato (BUENO et al., 2013; CHENG et al., 2012; FONG; POOLE-WARREN; SIMMONS, 2013; MARTI, 2013; MARTINS et al., 2018; PADOIS et al., 2012; TAKAHASHI et al., 2006; VERRAEDT et al., 2010).

Diante dos diversos veículos existentes, observou-se que a liberação de CHX, ocorre devido à dissolução dos sais atrelados à CHX. Estes sais exibem diferentes solubilidades, o que irá controlar a taxa e a duração da liberação CHX (GARNER et al., 2015). A taxa de liberação de CHX é regulada por fatores cinéticos (agitação do meio circundante) e fatores termodinâmicos (grau de subsaturação do meio circundante). Por estas razões, cada associação à CHX apresentará peculiaridades pertinentes à respectiva composição do veículo.

A forma comercialmente disponível de CHX, o digluconato de clorexidina, apresenta baixa retenção *in situ*, oferecendo menor duração da função antimicrobiana. Estudos relatam que a aplicação no âmbito periodontal desta apresentação, libera a CHX por curto prazo. Verifica-se que maior parte desta CHX é liberada nos primeiros 2 dias, e no período subsequente, a liberação torna-se lenta e reduzida (TABARY et al., 2014). Devido a apresentação aquosa, o digluconato quando associado a determinados materiais, como os cimentos de ionômero de vidro (CIV), geram comprometimento das propriedades mecânicas deste material (TÜRKÜN et al., 2008).

Outra forma de veiculação da CHX que surgiu foi o diacetato, um composto configurado como um pó cristalino e seco (VERRAEDT et al., 2010). Segundo análises realizadas, constata-se uma variância quanto às dimensões apresentadas pelo diacetato, um estudo relata a dimensão de 44.2 µm inicialmente, e 13.5 µm após moagem (ANUSAVICE;

ZHANG; SHEN, 2006). Outro estudo descreveu dimensões de 1.5 e 1.6 μm (NOJOSA, 2014). Contudo, conclui-se que o diacetato não representa uma nanopartícula, em detrimento às dimensões apresentadas. Tal fato consubstancia os resultados negativos apresentados quando associado ao CIV, onde apesar de ter provido a inibição de *Streptococcus mutans* e *Lactobacillus acidophilus*, gerou prejuízo às propriedades mecânicas do material (TÜRKÜN et al., 2008).

Outra característica relevante do diacetato de CHX refere-se a seu perfil de liberação de CHX, que apresenta intensidade variada. Não há constância no grau de liberação de CHX, inicialmente ocorre uma elevada liberação de CHX, e no período subsequente há reduzida ou nenhuma liberação de CHX (BELLIS et al., 2018). Este fato possivelmente justifica a elevada citotoxicidade observada em decorrência da incorporação do diacetato de CHX (IZ et al., 2013). Em virtude destas desvantagens do diacetato, permanecia a busca por um veículo que viabilizasse uma controlada e prolongada liberação da CHX.

Em 2013, Barbour et al. descreveram uma nova associação entre o digluconato de CHX e o hexametáfosfato de sódio (HMP). A partir da reação entre estes compostos, obtiveram uma suspensão estável. Após a caracterização do material obtido, observou-se que as partículas eram carregadas negativamente e possuíam dimensões de 20 a 160 nm. Portanto, averiguou-se que tal processo consistia na síntese das nanopartículas de clorexidina-hexametáfosfato (NPs CHX-HMP). Neste estudo realizado, as NPs foram aplicadas em superfícies de vidro, de titânio e de elastômeros por imersão na suspensão de NPs. Estes materiais exibiram uma liberação gradual de CHX durante 50 dias, apresentando ação contra *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* em condições planctônicas e estruturadas em biofilme. A obtenção das NPs favorece a atividade antibacteriana devido a maior área de superfície, que permite maior grau de interação com a superfície das células bacterianas (SHRESTHA; KISHEN, 2016; SHI et al., 2006; YAMAMOTO, 2001).

O HMP, composto utilizado na síntese destas NPs, apresenta moderada solubilidade após reação em meio aquoso, formando com a CHX, um sal nanoparticulado. Quando aplicado aos materiais, este sal dissolve-se lenta e gradualmente, promovendo a liberação contínua de CHX (BARBOUR et al., 2013; BELLIS et al., 2016; WOOD et al., 2015). Tal fato contrasta com o comportamento do digluconato de CHX, que apresenta-se em solução aquosa e por isto se dispersa imediatamente no meio, e com o diacetato que apesar de sólido, apresenta alta solubilidade (BELLIS et al., 2016).

Os relatos científicos odontológicos mencionam o uso frequente do HMP como agente químico na composição de cremes dentais clareadores, com a finalidade de prover a limpeza abrasiva da superfície dentária, auxiliando na remoção e prevenção de manchas extrínsecas (JOINER, 2010). Quimicamente esta substância constitui-se de uma cadeia longa contendo 10 a 12 subunidades de pirofosfato repetidas, e possuem uma forte afinidade e tendência à ligação com a estrutura dentária. Este maior potencial de ligação, proporciona aumento da sua retenção no substrato dentinário e substantividade, comparativamente a outros pirofosfatos (BAIG et al., 2005; MCGAUGHEY, 1983).

A interação da CHX com o substrato dentinário ocorre de diferentes formas, sob a influência da apresentação da CHX. Quando o digluconato de CHX reage com o fosfato presente na hidroxiapatita, forma-se um sal e a partir da dissolução deste, ocorre a liberação de CHX no período seguinte a sua aplicação (MISRA, 1994). Quanto à interação das NPs com o substrato dentinário, estabeleceu-se a hipótese de em um curto tempo de contato com a hidroxiapatita, ocorre uma adesão mais rápida das NPs (GARNER; BARBOUR, 2015; MISRA, 1994).

Garner e Barbour (2015) avaliaram a interação da clorexidina com a hidroxiapatita, através da aplicação de soluções de digluconato de CHX e suspensões aquosas das NPs CHX-HMP sob concentrações de: 1, 2,2 e 5 mM de CHX. Observou-se ao longo do período de 7 dias, que as NPs CHX-HMP aumentaram tanto a dose local, quanto a duração da liberação de CHX no meio (GARNER; BARBOUR, 2015). Pode-se atribuir tal fato, à dissolução gradual das NPs, em relação ao digluconato, o que resulta em uma liberação continuada de CHX (BARBOUR et al., 2013, WOOD et al., 2014).

Tendo em vista as vantajosas características apresentadas pelas NPs CHX-HMP, diversos materiais foram submetidos à incorporação ou revestimento de NPs CHX-HMP, como por exemplo os materiais biomédicos para o tratamento de feridas, utilizados em ambiente hospitalar. Estes materiais receberam o recobrimento por NPs CHX-HMP e por digluconato de CHX. As NPs CHX-HMP apresentaram eficácia antimicrobiana, no entanto ocasionando menor efeito citotóxico, desta forma reduzindo a colonização por *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*), mas sem interferir no processo cicatricial em ratos (BARBOUR et al., 2016).

Outro material vastamente utilizado no âmbito biomédico, é o etileno vinil acetato (EVA), que apresenta várias aplicações, dentre elas: dispositivos intravítreos, catéteres, órgãos artificiais e protetores bucais. Devido a propensão deste material à colonização

bacteriana, Wood et al. (2014) propuseram seu revestimento com NPs CHX-HMP, sob duas concentrações diferentes: 5 mM e 0,5 mM. Observou-se que nas superfícies revestidas pela maior concentração de CHX, houve a liberação de CHX pelo período de 56 dias, impedindo o crescimento de *Staphylococcus aureus resistente* e *Pseudomonas aeruginosa*.

No âmbito odontológico, os implantes dentários que conhecidamente apresentam alta susceptibilidade à colonização por bactérias orais patogênicas, foram submetidos ao revestimento por NPs CHX-HMP sob a concentração de 5 mM. Verificou-se a liberação contínua de CHX por 99 dias, sem exaurir a amostra durante este período, demonstrando a eficácia antimicrobiana contra *Streptococcus gordonii* (WOOD et al., 2015).

Outros suprimentos odontológicos foram analisados, como os materiais à base de silicone. Garner et al. (2015) avaliaram associações de diferentes pirofosfatos à CHX: trifosfato de sódio (TP), trimetafosfato de sódio (TMP) e HMP. Os materiais foram submetidos à imersão nas suspensões elaboradas com os pirofosfatos propostos, observando-se que não houve interferência no caráter hidrofílico destes materiais, segundo análise por ângulo de contato com a água. Assim como constatou-se alterações quanto à absorção de líquidos do meio, após a imersão por 16 semanas em saliva artificial. No entanto, a taxa, a concentração e a duração da liberação de CHX foi influenciada pelo tipo de pirofosfato utilizado. As NPs CHX-HMP apresentaram uma liberação de padrão lento e constante, promovendo a eliminação satisfatória de *Candida albicans*. Porquanto, o TP e TMP apresentaram uma liberação mais rápida, por curto período de duração, e mais concentrada (GARNER et al., 2015). Desta forma, sugere-se que o TP e TMP apresentam uma tendência maior à solubilidade

Quanto à incorporação das NPs CHX-HMP, este processo foi realizado apenas no CIV. Hook et al. (2014) realizaram uma substituição em massa de 1, 2, 5, 10 e 20% de NPs CHX-HMP nestes cimentos. Os resultados demonstraram a liberação dose-dependente de clorexidina pelas amostras, e vantajosamente a liberação de flúor não foi afetada significativamente pela incorporação. Em proporções de até 10% de substituição, não foram observadas alterações na estrutura interna do CIV, já a resistência à tração diametral diminuiu nas amostras com proporções de substituição de 10 e 20%, todavia esta diferença não foi estatisticamente significativa.

Outras análises do CIV foram realizadas por Bellis et al. (2016), que incorporou as NPs CHX-HMP sob a forma de pasta, em substituição ao pó do CIV em diferentes proporções, até o valor máximo de 1,70% em massa. A incorporação resultou na liberação

de CHX por mais de 14 meses, de forma dose-dependente. Houve inibição do *S. mutans*, e de acordo com os resultados descritos, concluiu-se que as pequenas incorporações de NPs CHX-HMP não afetaram adversamente as propriedades mecânicas do CIV. No entanto, as incorporações de maior proporção, podem alterar influenciar a presa e as propriedades mecânicas destes materiais (BELLIS et al., 2016).

Recentemente o CIV foi avaliado quanto à possibilidade de liberação de dose controlada após incorporação de NPs CHX-HMP e recarregamento com clorexidina. A aferição da liberação de CHX em saliva artificial ocorreu por 660 dias, realizando recargas no material com digluconato de CHX e com suspensão de NPs CHX-HMP de mesma concentração. Conforme os resultados obtidos, as NPs CHX-HMP geraram reduzidos efeitos adversos nas propriedades mecânicas do CIV. A recarga com as NPs aumentou a liberação de CHX em 100%, sendo este resultado altamente significativo em comparação com o digluconato, que liberou 50%. Ambos atuaram inibindo o crescimento de *S. mutans* e *Sc. Wiggisiae*, segundo análise por difusão em ágar (BELLIS et al., 2018).

1.3 Incorporação de agentes antimicrobianos aos cimentos endodônticos

A endodontia vivencia um inexorável progresso científico que implica nos avanços quanto às técnicas e materiais utilizados na terapia endodôntica. Com isso, torna-se mais segura e rápida a execução dos protocolos, e por conseguinte atinge-se maiores índices de sucesso no tratamento, sendo imprescindível a máxima limpeza e desinfecção do SCR, e posteriormente o estabelecimento de um obturação hermética, para manter ou restabelecer a saúde dos tecidos perirradiculares (RAY; TROPE, 1995; SJÖGREN et al., 1997).

Quanto à obturação do SCR, preconiza-se que esta seja hermética e tridimensional, geralmente constituída da associação da guta percha e um cimento endodôntico, que possui a função de unir a guta percha às paredes dentinárias, promovendo o selamento dos canais que compõem a complexa anatomia radicular (ALMEIDA et al., 2007; SCHILDER, 1967; WU; VAN; WESSELINK, 2000). A respeito dos cimentos endodônticos, são requeridas determinadas propriedades físicas, químicas, biológicas e mecânicas, para que apresentem um desempenho adequado na obturação do SCR (SCHWARTZ, 2006). No entanto, verifica-

se que nenhum dos cimentos endodônticos disponíveis, atendem a todos estes requisitos preconizados, apresentando vantagens e desvantagens decorrentes do uso.

Dentre as propriedades fundamentais dos cimentos endodônticos, considera-se a atividade antimicrobiana indispensável para o controle dos microrganismos remanescentes e auxílio na erradicação da infecção do SCR (ZHANG et al., 2009), visto que recentemente foram comprovadas deficiências no PQM do SCR através de análises microtomográficas, constatando que áreas do SCR não são atingidas pelos procedimentos de limpeza e desinfecção, e com isso podem alojar restos orgânicos, necróticos e microrganismos, favorecendo os processos infecciosos (LACERDA et al., 2017).

Após o PQM, os microrganismos anaeróbios estritos são comumente eliminados, no entanto os microrganismos facultativos quando são estabelecidos pela primeira vez no SCR, possuem maior resistência aos procedimentos de sanificação (CHÁVEZ DE LA PAZ; BERGENHOLTZ; SVENSÄTER, 2010; RÔÇAS; SIQUEIRA, 2012; SUNDQVIST et al., 1998).

A respeito da microbiota do insucesso endodôntico, há predominância de bactérias Gram-positivas, como o *E. faecalis* (PINHEIRO et al., 2003a; 2003b; PRADA et al., 2019), que são capazes de formar biofilme altamente organizado e manterem-se viáveis em condições adversas. Diante do exposto, ressalta-se a importância da atividade antimicrobiana do cimento endodôntico na eliminação destes microrganismos remanescentes do SCR (MICKEL; NGUYEN; CHOGLE, 2003), entretanto observa-se que esta atividade cessa seguidamente ao fim da presa do material (KAPRALOS et al., 2018; NEELAKANTAN; SUBBARAO, 2008).

Em função destas deficiências dos cimentos endodônticos, há uma busca permanente pelo aprimoramento destes materiais, a fim de obter uma atividade antimicrobiana eficaz e de longo prazo (BARROS et al., 2014a; KISHEN et al., 2008). Neste intuito, a adição de NPs foi instituída em diversos estudos, todavia um aspecto deve ser considerado quanto à incorporação das NPs antimicrobianas, estas alterações na composição dos materiais não devem modificar negativamente as demais propriedades dos cimentos endodônticos, assim como não devem potencializar ou gerar efeitos citotóxicos.

Quanto à incorporação de nanopartículas, alguns materiais foram testados associados a diferentes cimentos endodônticos, como: prata (LOYOLA-RODRÍGUEZ et al., 2019), quitosana (DEL CARPIO-PEROCHENA et al., 2015; KISHEN et al., 2008), compostos quaternários de amônia (ABRAMOVITZ et al., 2012; BEYTH et al., 2013; KESLER

SHVERO et al., 2013), e o óxido de zinco (JAVIDI, et al., 2015; KISHEN et al., 2008; OMIDI et al., 2017; VERSIANI et al., 2016). A aplicação adequada das NPs depende da eficácia e forma de administração dos agentes. Segundo a maioria das análises realizadas foram demonstrados resultados positivos quanto aos diversos aspectos do desempenho dos cimentos endodônticos (SHRESTHA et al., 2009; TELLES, PRADO e SIMÃO, 2017).

Apesar das diversas pesquisas realizadas quanto à incorporação de agentes antimicrobianos aos cimentos endodônticos, não há relato científico da associação destes materiais às NPs CHX-HMP. Tendo em vista este apontamento e o resultado satisfatório destas NPs a outros segmentos de materiais, o objetivo deste estudo foi investigar as possíveis influências nas propriedades físico-químicas e biológicas dos cimentos AH Plus, MTA Fillapex e Pulp canal Sealer (PCS), provenientes da incorporação de diferentes concentrações de NPs CHX-HMP.

2 PROPOSIÇÃO

As finalidades desta pesquisa fundamentam-se nos seguintes objetivos:

2.1 Objetivo geral

O objetivo geral deste estudo foi avaliar as propriedades biológicas e físico-químicas dos cimentos endodônticos AH Plus, PCS e MTA Fillapex, após a incorporação de nanopartículas de clorexidina-hexametafosfato.

2.1 Objetivos específicos

Os seguintes objetivos específicos foram estabelecidos:

- a) Analisar a ação antimicrobiana dos cimentos endodônticos propostos após a incorporação das nanopartículas de clorexidina-hexametafosfato de 2% e 5% em peso, através do teste de difusão em ágar e teste de contato direto frente ao *E. faecalis*;
- b) Verificar o grau de citotoxicidade dos cimentos endodônticos propostos após a incorporação das nanopartículas de clorexidina-hexametafosfato de 2% e 5% em peso, de acordo com o ensaio de captação do corante Tetrazolium (atividade metabólica mitocondrial), e verificação da porcentagem de células viáveis em cada diluição dos extratos dos cimentos endodônticos supracitados;
- c) Avaliar a influência da incorporação das nanopartículas de clorexidina-hexametafosfato de 2% e 5% em peso, no desempenho físico-químico dos cimentos endodônticos propostos, sob os seguintes aspectos: escoamento, radiopacidade, solubilidade, pH e tempo de presa.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

O presente estudo analisou cimentos endodônticos de diferentes classificações: resinosos, à base de silicato de cálcio e de óxido de zinco e eugenol. Sendo selecionados respectivamente, de acordo com os segmentos citados: o AH Plus, o MTA Fillapex e o PCS (Quadro 1). Estes materiais foram manipulados conforme as especificações dos respectivos fabricantes. Os grupos de cimentos mencionados foram submetidos à incorporação de 2% e 5% em peso de nanopartículas de clorexidina-hexametafosfato, deste modo segmentados em 9 grupos de materiais analisados (Figura 1).

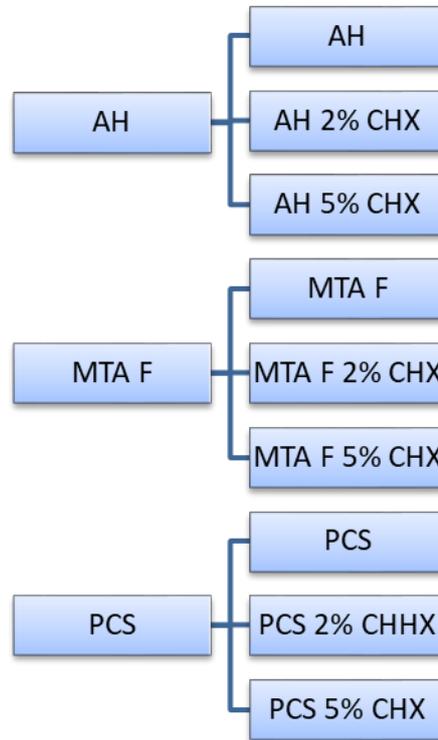
Quadro 1 – Apresentação e composição dos cimentos endodônticos

Material	Apresentação	Composição
AH Plus® (Dentsply DeTrey - Konstanz–Alemanha)	Pasta A e pasta B	Resina epóxica de Bisfenol-A, resina epóxica de bisfenol-F, tungstato de cálcio, óxido de zircônio, sílica e pigmentos de óxido de ferro. Dibenzil-diamina, amina adamantana, triciclodecano diamina, tungstato de cálcio, óxido de zircônio, sílica e óleo de silicone.
MTA Fillapex (Angelus®- Londrina/ PR – Brasil)	Pasta base e pasta catalisadora	Pasta base: resina salicilato, resina natural, tungstato de cálcio, sílica nanoparticulada, pigmentos; Pasta catalisadora: resina diluente, mineral trióxido agregado, sílica nanoparticulada, pigmentos.
Pulp Canal Sealer EWT (Kerr Corporation, Orange, CA, EUA)	Base (pó) e catalisador (líquido)	Pó: óxido de zinco, prata precipitada, subcarbonato de bismuto, sulfato de bário; Líquido: óleo de cravo e bálsamo-do-canadá.

Nota: Descrição dos cimentos endodônticos preconizados no estudo, segundo as informações dos respectivos fabricantes: DENTSPLY, 2019; ANGELUS, 2019; KERR, 2019.

Fonte: A autora, 2019.

Figura 1 – Fluxograma dos grupos de materiais analisados



Legenda: Amostras subdivididas em grupos para realização das análises propostas.

Fonte: A autora, 2019.

3.1 Síntese das nanopartículas de clorexidina-hexametafosfato

As nanopartículas de clorexidina-hexametafosfato foram confeccionadas a partir da metodologia preconizada por Wood et al. (2014). Inicialmente, foi elaborada uma suspensão com volume total de 20 mL que continha 5 mM de hexametafosfato de sódio (Sigma-Aldrich Company Ltd, Dorset, Reino Unido), 4 mM de digluconato de clorexidina a 20% (Sigma-Aldrich Company Ltd, Dorset, Reino Unido) e água deionizada. Esta suspensão foi obtida de acordo com os cálculos descritos abaixo, onde o digluconato de clorexidina apresenta massa molar = 897,9 e o hexametafosfato apresenta massa molar = 611,77.

$$\text{Mol} = \frac{\text{Massa}}{\text{Massa Molar}} \quad (1)$$

$$\text{Mol} = \frac{\text{Molaridade}}{\text{Volume da Solução}} \quad (2)$$

Item 1 - digluconato de CHX a 20%

$$4 \text{ mM} = 4 \text{ mmol/L}$$

$$\begin{array}{l} 4 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \quad \text{_____} \quad 1000 \text{ mL} \\ X \quad \text{_____} \quad 20 \text{ mL} \end{array}$$

$$X = \frac{20 \cdot 4 \cdot 10^{-3}}{1000} \quad X = 8 \cdot 10^{-5}$$

Massa de digluconato de CHX necessária:

$$8 \cdot 10^{-5} = \frac{\text{massa de CHX}}{897,8} \quad m = (8 \cdot 10^{-5}) \times 897,8$$

$$m = 0,071824 \text{ g de CHX}$$

Quantidade de mililitros de digluconato de CHX a 20% está contida na massa de 0,071824g:

$$\begin{array}{l} 20 \text{ g} \quad \text{_____} \quad 100 \text{ mL} \\ 0,071824 \text{ g} \quad \text{_____} \quad X \text{ mL} \end{array}$$

$$X = \frac{0,071824 \cdot 100}{20} \quad X = 0,35912 \text{ mL de digluconato de CHX a 20\%}$$

Item 2 - hexametáfosfato de sódio

$$5 \text{ mM} = 5 \text{ mmol/L}$$

$$\begin{array}{l} 5 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \quad \text{_____} \quad 1000 \text{ mL} \\ X \quad \text{_____} \quad 20 \text{ mL} \end{array}$$

$$X = \frac{20 \cdot 5 \cdot 10^{-3}}{1000} \quad X = 1 \cdot 10^{-4}$$

Massa de HMP necessária:

$$1 \cdot 10^{-4} = \frac{\text{massa de HMP}}{611,77} \quad m = 0,061177 \text{ g de HMP}$$

Portanto, para elaboração da suspensão final foram necessários: 0,061177g de HMP, 0,35912 mL de CHX e água deionizada para completar o total de 20 mL da suspensão. As substâncias veiculadas como líquido: água deionizada e digluconato de clorexidina foram pipetadas em um béquer e o hexametáfosfato de sódio, que é comercializado na apresentação pó, foi submetido à pesagem em balança de alta precisão (Bioscale, São Paulo, Brasil), como descrito na Figura 2.

Figura 2 - Componentes da suspensão de CHX-HMP

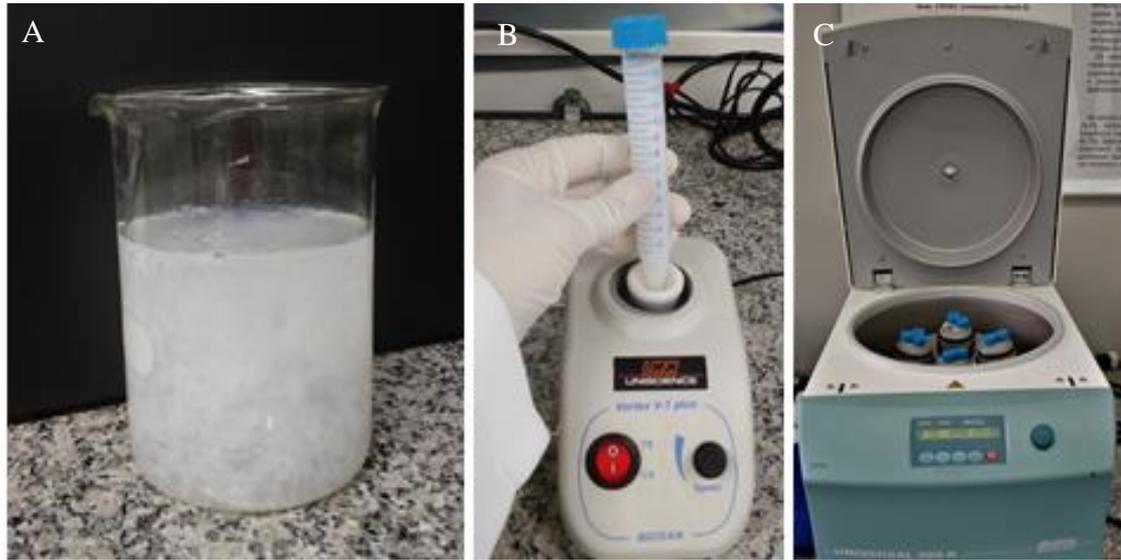


Legenda: (A) - Apresentação dos componentes utilizados na elaboração da suspensão: hexametáfosfato de sódio e digluconato de clorexidina; (B) - Pesagem do hexametáfosfato de sódio em balança analítica.

Fonte: (A) – CARMO, 2017, f.19. (B) - O autor, 2019.

Após o condicionamento das substâncias no béquer, realizou-se a mistura manual da suspensão obtida e a sua transferência para tubos Falcon graduados. Após o preenchimento dos tubos Falcon, iniciou-se a agitação do conteúdo dos tubos em vórtex (V-1 Plus, Biosan, EUA) por 5 min. Em seguida, as amostras foram alocadas em uma centrífuga (universal 320R, Heitich Zentrifugen, Tuttlingen, Alemanha). A centrifugação foi realizada a 4500 rpm durante 60 min a 15°C (Figura 3). A centrifugação promove a separação das partículas de diferentes densidades, pela atuação da força centrífuga, sendo possível separar diversos elementos de uma mistura, sejam estes: líquido-líquido ou líquido-sólido.

Figura 3 - Elaboração da suspensão de CHX-HMP

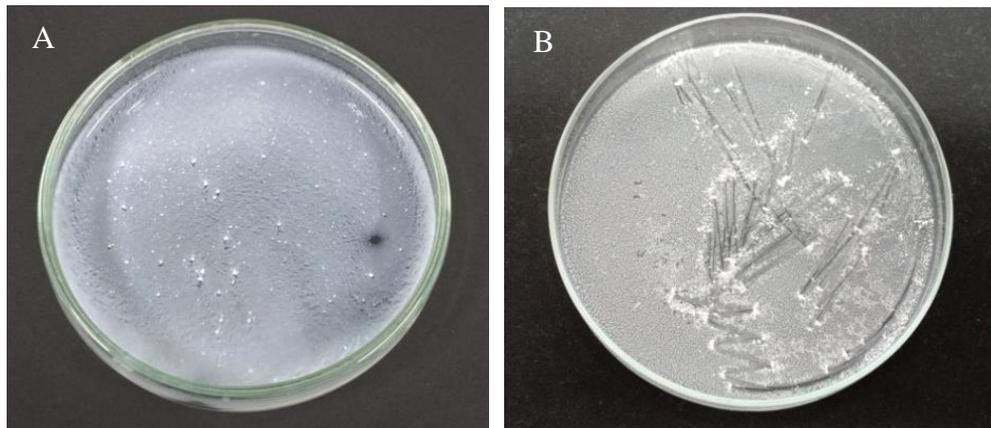


Legenda: (A) - Suspensão de CHX-HMP obtida; (B) - Agitação em vórtex da suspensão depositada em tubos Falcon; (C) - Alocação dos tubos Falcon após a agitação em centrífuga.

Fonte: A autora, 2019.

A centrifugação diferencial visa a sedimentação das partículas de acordo com seu tamanho e densidade, através deste processo foram obtidas duas fases: o precipitado (ou *pellet*), no qual constam as partículas maiores e mais densas, e a fração não-precipitada (ou sobrenadante), que continha as partículas menores e menos densas. Após a centrifugação, o sobrenadante obtido foi descartado e o *pellet* foi transferido para placas de petri de vidro de dimensões 90 x 15 mm (Forlab Express, Rio de Janeiro, RJ, Brasil). As placas de vidro foram armazenadas em estufa (Sterilifer, São Paulo, SP, Brasil) por 48 h sob a temperatura de 40°C para promover a secagem do *pellet*, findo o período de secagem, os sedimentos foram removidos das placas e macerados com gral e pistilo (Forlab Express, Rio de Janeiro, RJ, Brasil). O processo da síntese resultou na obtenção de um pó fino e solto à base de digluconato de clorexidina e hexametáfosfato de sódio, após a finalização desta etapa foram estipulados os processos a fim de analisar e caracterizar este material (Figura 4 e 5).

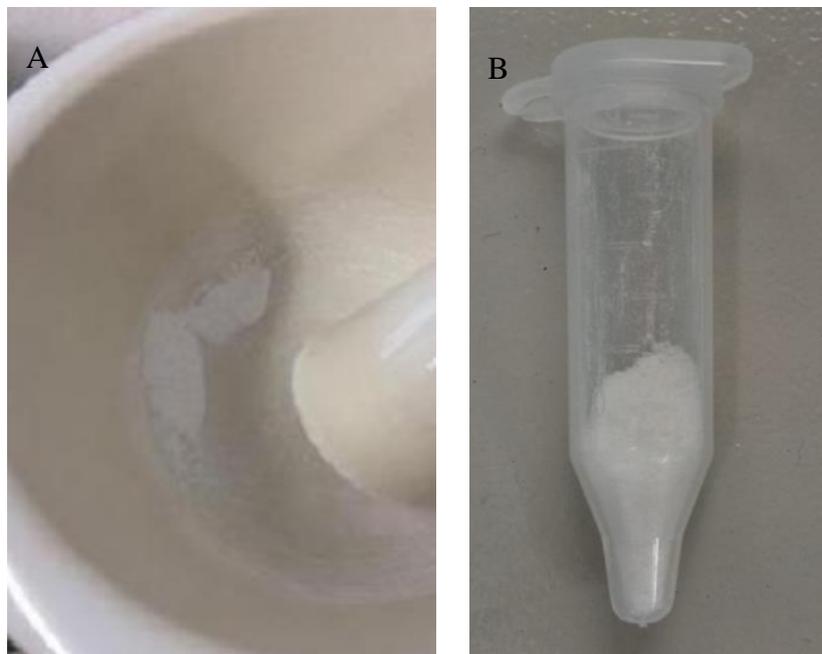
Figura 4 - *Pellet* obtido depositado em placas de Petri



Legenda: (A) - Condicionamento do pellet obtido após centrifugação da suspensão de CHX-HMP em placas de Petri; (B) - Placa de Petri contendo os sedimentos após o período de secagem de 48h a 40°C.

Fonte: A autora, 2019.

Figura 5 - Obtenção das NPs CHX-HMP



Legenda: (A) - Maceração com gral e pistilo do material contido nas placas de vidro após a secagem; (B) - Nanopartículas obtidas condicionadas em *eppendorf* após conclusão do processo de síntese.

Fonte: (A) – CARMO, 2017, f. 19. (B) - A autora, 2019.

3.2 Caracterização das nanopartículas de clorexidina-hexametafosfato

A caracterização permite elucidar a composição, forma e comportamento dos materiais de natureza orgânica ou inorgânica. A caracterização das nanopartículas sintetizadas neste estudo foi conduzida através das seguintes metodologias: microscopia eletrônica de varredura (MEV), espalhamento dinâmico de luz (DLS), aferição do potencial zeta, microscopia de força atômica (AFM) e espectroscopia de energia dispersiva de raios-X (EDS)

3.2.1 Microscopia eletrônica de varredura

A metodologia de obtenção de imagens através do MEV foi aplicada com a finalidade de observar a morfologia, uniformidade e agregação das NPs CHX-HMP em sua forma isolada, como também analisar os cimentos endodônticos propostos, em sua forma originalmente comercializada, e após a incorporação de 2% e 5% das NPs CHX-HMP.

As amostras dos cimentos endodônticos propostos foram previamente manipulados de acordo com as instruções dos fabricantes e determinadas amostras sofreram a incorporação de 2% e 5% das NPs CHX-HMP. Após a manipulação, estes materiais foram incluídos em moldes de borracha (Odeme Dental Research, Santa Catarina, Brasil) de 10 mm x 2 mm (Figura 6) e subsequentemente armazenados em estufa (Sterilifer, SP, Brasil) a 37°C por 48h, foram analisadas 5 amostras de cada material proposto, a fim de obter as imagens mais representativas e fidedignas de cada material.

Findo o período de armazenamento em estufa, iniciou-se a análise no Laboratório Multiusuário de Microscopia Eletrônica e Microanálise (COPPE/UFRJ). Todas as amostras dos discos de cimentos endodônticos e as NPs CHX-HMP foram posicionadas em um *stub* (suporte metálico) de alumínio, fixadas através de fitas adesivas dupla face de carbono (Electron Microscopy Sciences, Washington, EUA). Em seguida, as amostras foram submetidas à metalização por recobrimento das superfícies com uma camada de 20 nm de espessura de ouro mediante o uso de um metalizador Desk V (Denton Vacuum, Cherry Hill, NJ, EUA). O *stub* com as amostras previamente metalizadas foi condicionado no microscópio eletrônico de varredura VEGA 3 (Tescan, Brno, República Checa) para a análise topográfica

das amostras sob aceleração de voltagem de 8 a 10 kV, distância de trabalho entre 7 e 10 mm e magnificação entre 3000x e 20000x (Figura 7).

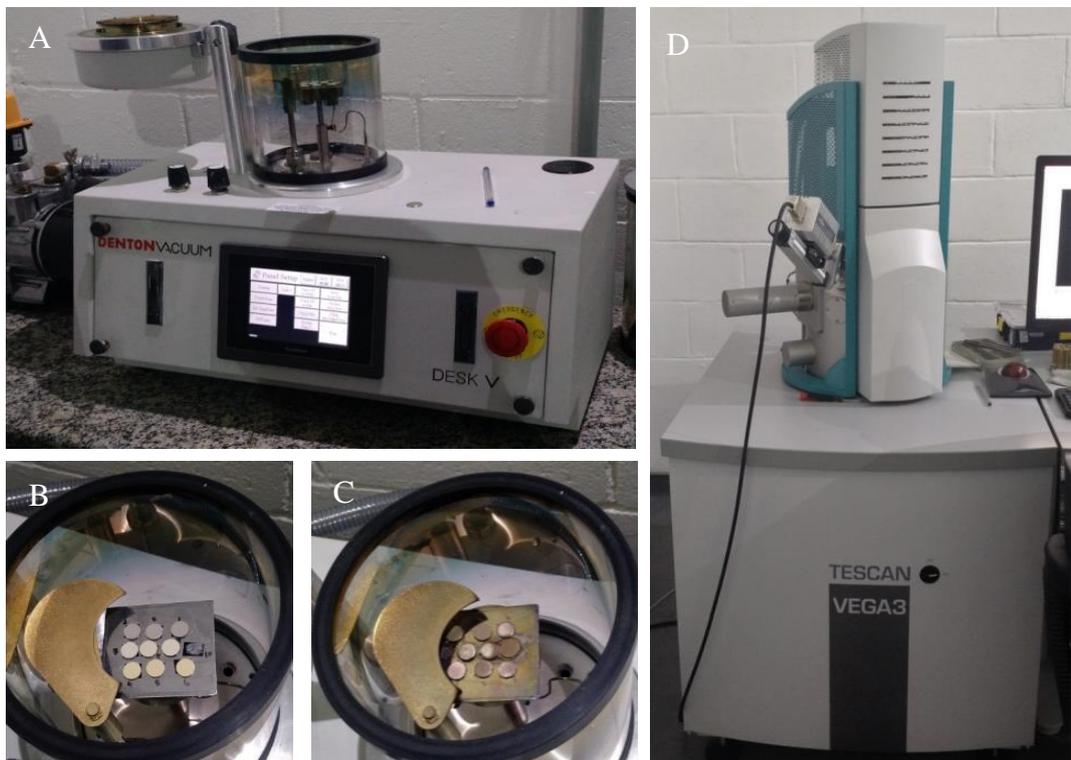
Figura 6 - Moldes de borracha para confecção das amostras de cimento endodôntico



Legenda: Molde de borracha de 10 x 2 mm preenchido respectivamente com os cimentos: AH Plus, MTA Fillapex, PCS.

Fonte: A autora, 2019.

Figura 7 - Análise das amostras em microscopia eletrônica de varredura



Legenda: (A) - Equipamento utilizado para metalização das amostras; (B) - Amostras posicionadas em *stub*. (C) - Amostras após o processo de metalização; (D) - Microscópio eletrônico de varredura utilizada na análise realizada na COPPE/UFRJ.

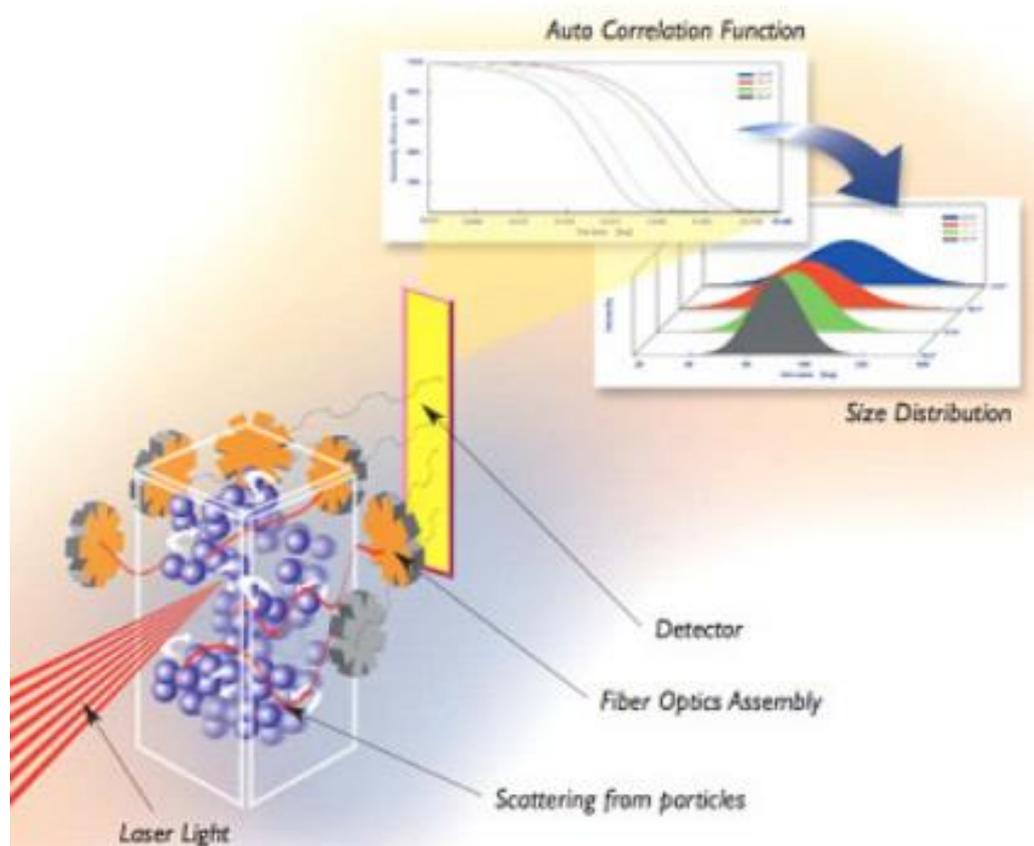
Fonte: O autor, 2019.

3.2.2 Espalhamento dinâmico de luz

A análise da modulação da intensidade da luz espalhada em função do tempo, permite a determinação do tamanho das NPs devido a distribuição da intensidade de luz, e a partir disto, infere-se a distribuição de volume e quantidade das NPs presentes na amostra.

A execução desta análise foi realizada como descrito por Santos (2013), houve a emissão de um laser monocromático incidindo em uma cubeta na qual encontrava-se a amostra suspensa em álcool isopropílico, utilizado como meio dispersante. Durante a análise, a luz emitida espalhou-se, e em função da dispersão amostral, a luz emitida foi refletida com diferentes intensidades após a incidir no material. A intensidade da refração da luz em determinado ângulo foi captada por fibras ópticas e pelo detector. Essa captação define o ângulo de espalhamento e o volume de espalhamento da região avaliada (Figura 8).

Figura 8 - Mecanismo da análise por espalhamento dinâmico de luz



Legenda: Esquema ilustrativo dos componentes e funcionamento da análise por DLS.
Fonte: BEZEM, 2012, f.21.

A correlação com a intensidade do espalhamento de luz foi medida através de um contador de fótons, atrelada à dispersão da molécula no meio, deste modo as pequenas partículas movem-se mais rapidamente que as grandes, apresentando maior variação na intensidade do espalhamento da luz. Este padrão de intensidade do espalhamento foi comparado durante todo o tempo decorrido da análise, gerando a função de correlação supracitada. Ao ser atingido pela luz, os elétrons do material analisado sofrem uma polarização oscilante em função do campo elétrico da luz e quando a relação intermolecular muda, a energia é irradiada e com isso ele passa a ser uma fonte secundária de luz, espalhando luz em todas as direções.

A Figura 9 apresenta o equipamento NanoBrook 90Plus PALS (Brookhaven Instruments, Holtsville, NY, EUA) no qual foi realizada a análise das NPs. As mensurações foram conduzidas com 700 μ L de suspensão, conduzida em triplicata, sob temperatura constante de 25°C, o feixe de luz laser de comprimento de onda 640 nm e ângulo de incidência de 90°.

Figura 9 - Equipamento utilizado na análise por espalhamento dinâmico e potencial zeta



Legenda: Imagem do equipamento NanoBrook 90Plus PALS utilizado nas análises por espalhamento dinâmico de luz e potencial zeta.

Fonte: BROOKHAVEN INSTRUMENTS, 2019.

3.2.3 Potencial zeta

A aferição do potencial zeta foi instituída a fim de determinar a carga das NPs CHX-HMP e avaliar o grau de estabilidade destas em suspensões coloidais, realizada no mesmo equipamento utilizado para análise por DLS (Figura 8), sendo utilizado o álcool isopropílico como meio para dispersão das partículas, condicionado conjuntamente com a amostra em uma câmara contendo dois eletrodos. Após a aplicação de um campo elétrico a esta estrutura, as partículas carregadas migram para o eletrodo correspondente com uma velocidade proporcional ao seu potencial zeta como descrito por Smith et al. (2017).

Em um campo elétrico, como na técnica da eletroforese (movimento de partículas dispersas relativas a um fluido, sob a influência de um campo elétrico espacialmente uniforme), cada partícula e os íons mais fortemente ligados à esta, movem-se como uma unidade. O potencial decorrente do plano de cisalhamento entre esta unidade descrita e o meio circundante é denominado potencial zeta (BHATTACHARJEE, 2016; SIQUEIRA, 2008).

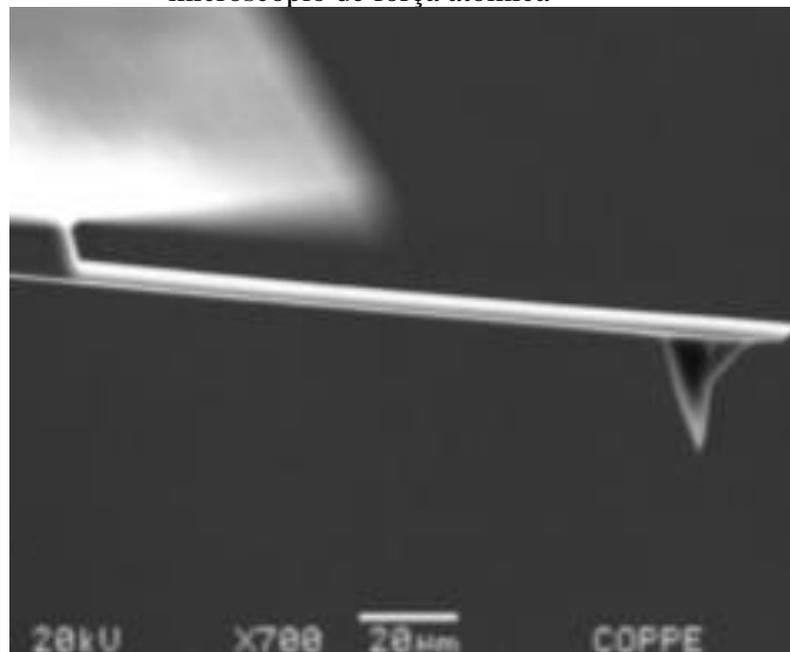
As NPs em contato com o líquido do meio adquirem uma carga elétrica em sua superfície, esta carga proveniente atua na superfície das amostras afetando a distribuição de íons no seu entorno, aumentando a concentração de contra-íons junto à superfície. Assim, forma-se uma dupla camada elétrica na interface da partícula com o líquido. Esta dupla camada divide-se em: uma região interna com íons fortemente ligados à superfície e uma região externa na qual a distribuição dos íons é determinada pelo equilíbrio entre forças eletrostáticas e o movimento térmico (BHATTACHARJEE, 2016; CASANOVA, 2010; CLOGSTON; PATRI, 2013).

Os módulos dos valores obtidos referentes ao potencial zeta são classificados de acordo com o grau de estabilidade em: altamente instáveis, relativamente estáveis, moderadamente estáveis e altamente estáveis (BHATTACHARJEE, 2016; HULLER, 2018). Quando o potencial zeta aproxima-se de zero, representa menor estabilidade do sistema, e quanto maior for o potencial, torna-se gradativamente mais estável.

3.2.4 Microscopia de força atômica

As NPs CHX-HMP foram submetidas à análise em microscópio de força atômica (AFM). Este sistema como descrito inicialmente por Binnig, Quate e Gerber (1986) e posteriormente por Kaupp (2006), Bezem et al. (2012) e Kreplak (2016) apresenta forças de interação estabelecidas entre a sonda e a amostra, que podem ter caráter atrativo ou repulsivo, estabelecem seguintes modos de operação para o AFM: modo de contato, de não-contato e intermitente. Este sistema permite a detecção das forças intermoleculares provenientes da interação entre sonda e amostra, sendo composto por: um *cantilever* (conjunto haste-sonda), um *scanner* piezoelétrico (sistema de varredura), o laser de diodo, o fotodetector e um sistema de *feedback*. O *cantilever* possui uma haste flexível, que atua como uma espécie de mola, evitando deformações na superfície da amostra. Na extremidade deste *cantilever*, está posicionada uma sonda de formato prismático que interage com os átomos da amostra (Figura 10), este conjunto sofre as deflexões decorrentes da interação de forças entre sonda e amostra.

Figura 10 - Imagem do *cantilever* e sonda utilizado no microscópio de força atômica



Legenda: Imagem obtida por microscopia eletrônica de varredura apresentado o *cantilever* e sonda utilizada na análise por microscopia de força atômica no laboratório do COPPE/UFRJ.

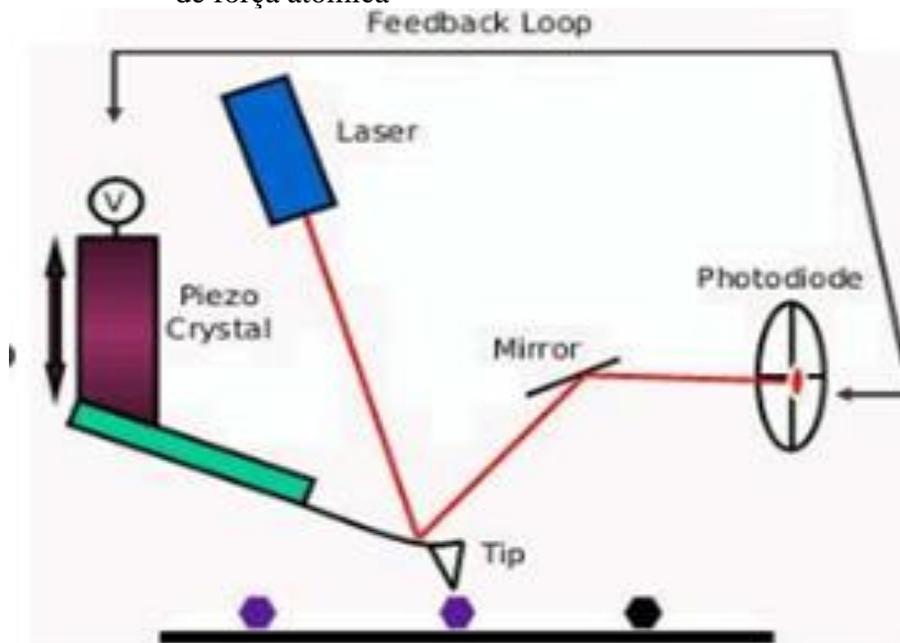
Fonte: Thaísa Ferreira Macedo, 2018, f. 54.

O feixe de luz laser de diodo incide sobre a haste do *cantilever*, e quando há deflexão nesta haste em função da diferença de forças estabelecidas, isto ocasiona uma oscilação da amplitude da luz do laser. Na parte superior desta haste, há um espelho que reflete a luz do feixe de laser de diodo. Após a reflexão, o feixe de laser passa por uma lente e incide sobre um fotodetector (fotodiodo) de quatro quadrantes, que monitora o movimento, medindo as variações de posição e de intensidade da luz produzidas pelas deflexões do *cantilever*.

O sistema de *feedback* conecta o sinal do fotodiodo com o *scanner* piezoelétrico. A distância entre sonda e amostra é ajustada pela mudança na posição de um *scanner* piezoelétrico, de modo a manter a força constante, realizando o controle eletrônico da análise. Quando ocorre deflexão do *cantilever* durante a análise da superfície, a amplitude do feixe do laser diodo fica alterada e incide no fotodiodo, com isso o sistema do *scanner* piezoelétrico levantará o *cantilever* para recuperar a posição do ponto. O sistema de movimentação tridimensional ocorre em função deste deslocamento vertical do *scanner* piezoelétrico (eixo Z), e das varreduras em cada ponto (eixo X e Y) da amostra, assim originando a topografia da superfície.

Após a finalização da captação das oscilações pelo fotodetector, cada respectivo ponto avaliado corresponde a um pixel na imagem final obtida, que são armazenadas e processadas por um computador, que transformam-as em imagens representativas da superfície analisada (Figura 11).

Figura 11 - Figura esquemática do método de análise por microscopia de força atômica

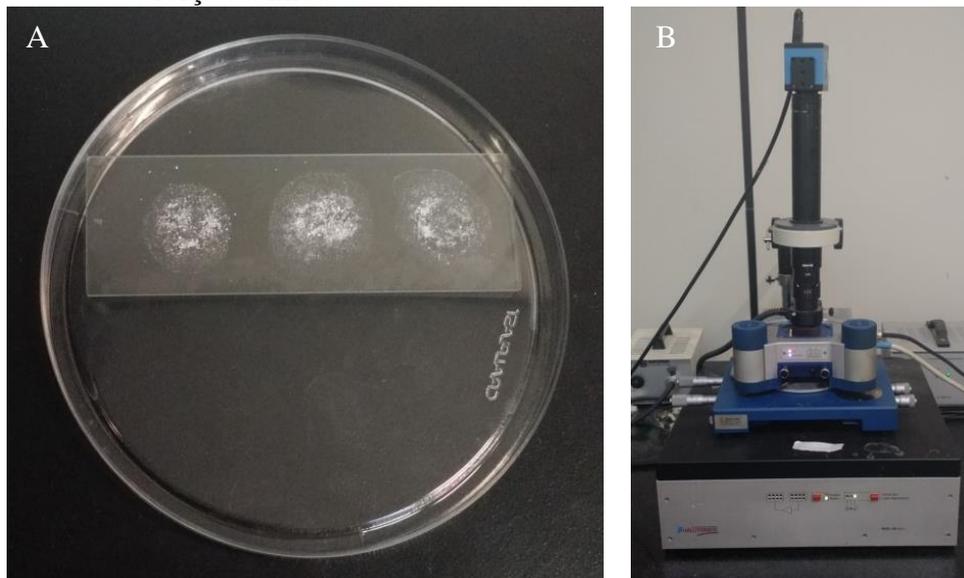


Legenda: Componentes e mecanismo de ação do microscópio de força atômica.
Fonte: BEZEM, 2012, f. 23.

O preparo das NPs CHX-HMP foi realizado para que estas fossem avaliadas no AFM. Inicialmente, as NPs foram submetidas à dispersão em meio de etanol, sendo utilizados 5 μ l da suspensão obtida, que foi dispensada sobre uma superfície de mica (Ted Pella Inc., CA, EUA). Após dispensação, foram dispostas em câmara de fluxo laminar (Labconco, Kansas City, EUA) a 37°C para promover a evaporação do meio. Em seguida, a análise das amostras foi realizada no AFM (JPK I, JPK instruments, Berlin, Alemanha) do laboratório de caracterização de superfícies do programa de engenharia metalúrgica e de materiais da COPPE/UFRJ (Figura 12). A aquisição das imagens das amostras foi conduzida através do software *JPK Image Processing* (JPK Instruments AG, Berlim, Alemanha).

A análise das amostras foi realizada pelo modo de contato intermitente do AFM a 25°C, sendo utilizada uma sonda de silício (PPP-NCSTAu, Nanosensors®), sob a frequência de ressonância próxima a 160 kHz e constante de mola de 7,4 N/m. Durante o contato intermitente, o *cantilever* do AFM oscila geralmente de acordo com a frequência de ressonância e seu amortecimento causado pela superfície da amostra é mantido constante. Foram avaliadas 10 amostras em diferentes áreas, sendo realizada inicialmente uma análise mais abrangente da área das amostras e posteriormente áreas mais restritas e representativas.

Figura 12 - Imagem das NPs após preparo para análise em microscopia de força atômica



Legenda: (A) - Disposição da amostra após preparo e posicionamento em superfície de mica; (B) - Microscópio de força atômica utilizado para análise das amostras no COPPE/UFRJ.

Fonte: A autora, 2019.

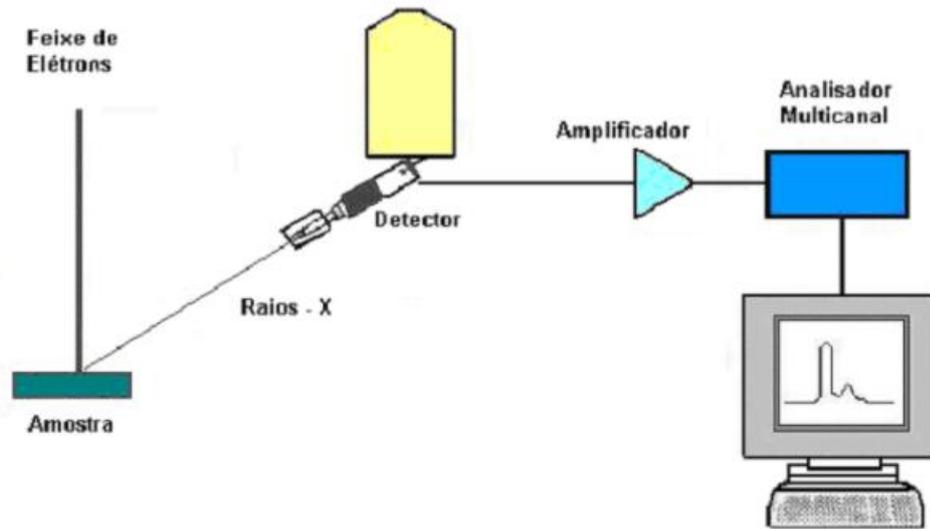
3.2.5 Espectroscopia de energia dispersiva de raios-X

A análise por espectroscopia de energia dispersiva de raios-X (EDS) foi utilizada na caracterização das NPs CHX-HMP. A EDS é realizada por um aparelho que atua através do seu acoplamento a outro equipamento, dentre eles: microscópio eletrônico de varredura, de transmissão, aparelho de fluorescência de raios-X ou sonda eletrônica para microanálise de raios-X (BRUNDLE; EVANS; WILSON, 1992; GOLDSTEIN et al., 2003). Através deste método realiza-se de forma não-destrutiva, a qualificação e quantificação dos elementos químicos, além de detectarem possíveis contaminações decorrentes do processo de moagem dos materiais ou presentes como substratos do método (GOLDSTEIN et al., 2003; WOOD et al., 2015)

A análise tem início com a incidência do feixe de elétrons focalizado sobre a amostra em um microscópio eletrônico de varredura, equipamento que foi preconizado neste estudo para o acoplamento e realização da EDS (Figura 13). Os elétrons do feixe primário penetram na amostra e interagem com seus átomos, desta interação resultam dois tipos de raios-X: raios-X Bremsstrahlung, proveniente da desaceleração das partículas, conhecida como "radiação de frenagem" e os raios-X característicos. A energia dos raios-X característicos permite a identificação dos elementos químicos que constituem a amostra, enquanto a intensidade dos picos desta radiação permitem a mensuração das concentrações dos elementos químicos presentes.

Subsequentemente ocorre a detecção da dispersão da energia, a amplificação da corrente gerada e processamento eletrônico, que permite a conversão dos dados expressos em um gráfico, no qual verifica-se uma série de picos que representam o tipo e a quantidade de cada elemento químico presente, gerando um mapeamento químico elementar amostral (BONACCORSO et al., 2008).

Figura 13 - Figura esquemática do método de análise por espectroscopia de energia dispersiva de raios -X

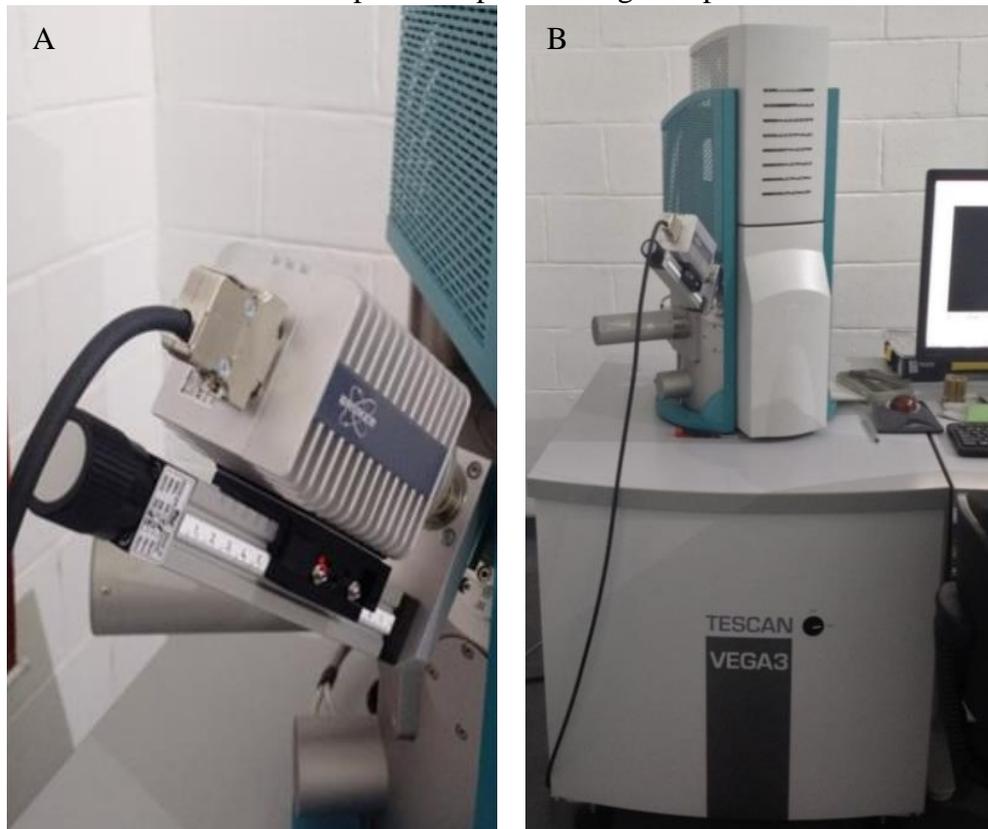


Legenda: Componentes e mecanismo de ação do espectrofotômetro de energia dispersiva de raios -X.

Fonte: KLAUSS, 2003, f. 15.

A análise proposta foi realizada no Laboratório Multiusuário de Microscopia Eletrônica e Microanálise (COPPE/UFRJ). As NPs CHX-HMP foram posicionadas em um *stub* (suporte metálico) de alumínio, fixadas através de fitas adesivas dupla face de carbono (Electron Microscopy Sciences, Washington, EUA). O *stub* foi condicionado no microscópio eletrônico de varredura VEGA 3 (Tescan, Brno, República Checa), no qual havia o acoplamento de aparelho para análise por EDS (Bruker, Massachusetts, EUA), apresentado na Figura 14. Foram realizadas análises de 3 amostras das NPs CHX-HMP, resalta-se a fórmula química e os constituintes das partículas analisadas: digluconato de clorexidina ($C_{22}H_{30}Cl_2N_{10}.2C_6H_{12}O_7$) e hexametáfosfato de sódio ($(NaPO_3)_6$).

Figura 14 - Equipamentos para análises por microscopia eletrônica de varredura e espectroscopia de energia dispersiva de raios-X



Legenda: (A) - Equipamento acoplado ao microscópio eletrônico de varredura para realização da espectroscopia de energia dispersiva por raios - X utilizados na análise realizada no COPPE/UFRJ; (B) - Microscópio eletrônico de varredura.

Fonte: A autora, 2019.

3.3 Análises biológicas das nanopartículas de clorexidina-hexametafosfato

3.3.1 Teste de difusão em ágar

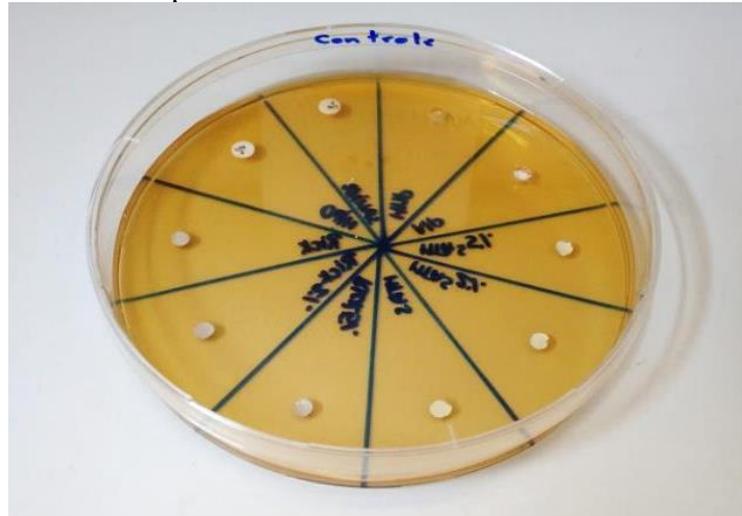
A análise antimicrobiana inicial dos materiais propostos o teste de difusão em Ágar com cepas de *E. faecalis* (American Type Culture Collection® - ATCC 29212, Rockville, MD, EUA). Esta metodologia foi aplicada de acordo com estudo de Pinheiro et al. (2009). Culturas bacterianas armazenadas por congelamento a -70°C em leite desnatado a 10% (SKIM milk, Difco® Laboratories, MI, EUA), contendo 5% de glicerol (Merck®, São Paulo, SP, Brasil), foram ativadas pela suspensão em caldo de cultura estéril que continham proteínas de soja (Tryptcase Soy Broth - TSB - Difco, Detroit, MI, EUA). As suspensões em

caldo obtidas foram mantidas em estufa (Sterilifer, SP, Brasil) a 37°C por 24 horas para viabilizar a multiplicação celular de forma a obter o quantitativo suficiente para a realização do experimento.

Subsequentemente à fase inicial de ativação dos microrganismos selecionados, as placas de Petri (150 x 15 mm) utilizadas no experimento receberam 45 mL de meio de cultura sólido com proteínas de soja (Tryptcase Soy Agar - TSA - Difco), apresentando espessura de 4 mm. Os microrganismos foram cultivados em TSA a 37°C por 48h. Após o período de crescimento, os microrganismos foram removidos da superfície das placas com auxílio de *swabs* estéreis e transferidos para tubos de ensaios contendo solução salina. A suspensão dessa massa de células bacterianas foi calibrada até obter-se uma turbidez correspondente a 0,5 na escala nefelométrica de McFarland (aproximadamente $1,5 \times 10^8$ unidades formadoras de colônia por mL). As placas de Petri foram semeadas na superfície do meio sólido de TSA, previamente geleificado, com os inóculos correspondentes a 0,5 mL desta suspensão obtida, que foram semeados em cada respectiva placa com o auxílio de alças de Drigalsky estéreis, visando a obtenção de um crescimento confluyente e homogêneo das colônias bacterianas sobre o meio de cultura.

Posteriormente aos procedimentos descritos, foram confeccionados orifícios equidistantes com 4 mm de profundidade e 4 mm de diâmetro em cada placa de ágar. As placas de Petri foram pré-incubadas em temperatura ambiente por 1 h, a fim de permitir a posterior difusão das substâncias antes do desenvolvimento microbiano. Os cimentos endodônticos da forma convencional comercializada: AH Plus, MTA Fillapex e PCS; após a incorporação de 2% e 5% de NPs CHX-HMP, assim como as NPs CHX-HMP isoladas foram alocados nos respectivos orifícios previamente confeccionados (n=3), até que ficassem completamente preenchidos e sem extravasamento de material. Os materiais que necessitavam de manipulação foram manipulados no momento da inserção, de acordo com as orientações dos respectivos fabricantes. Além destes grupos, instituiu-se o grupo controle negativo (solução salina) e o grupo controle positivo (NaOCl a 2,5%), nos grupos controle, por consistirem de substâncias líquidas, foram empregados discos de papel-filtro estéreis. Estes discos foram embebidos em 1 mL das respectivas soluções preconizadas nos grupos pelo período de 1 min e alocados na superfície do meio de cultura. Todos os procedimentos de inserção dos materiais foram realizados sob cabine de fluxo laminar (Labconco, Kansas City, EUA). Todos os materiais foram testados simultaneamente em cada respectiva placa (Figura 15). Uma placa, não foi inoculada com o microrganismo preconizado com a finalidade de estabelecer o controle negativo do meio de cultura empregado no experimento.

Figura 15 - Placas de Petri com amostras dos materiais posicionadas



Legenda: Placas de Petri contendo meio sólido TSA, semeadas com *E. faecalis* e apresentando as amostras dos materiais posicionadas de forma equidistante.

Fonte: A autora, 2019.

As placas contendo os materiais testados foram incubadas a 37°C por 24h, para posterior aferição dos diâmetros dos halos de inibição formados. Decorrido o período de incubação, com o auxílio de um paquímetro digital (Mitutoyo MTI Corporation) foi realizada a mensuração da zona de inibição do crescimento microbiano ao redor dos materiais, aferindo-se duas medidas perpendiculares entre si, sendo obtida a média destas medidas. Destes valores obtidos foi subtraído o valor de 4 mm referente ao diâmetro confeccionado nas placas para inserção das amostras.

3.3.2 Teste de contato direto

Primeiramente foi realizada a padronização do inóculo, as culturas de *E. faecalis* (ATCC 29212) foram cultivadas em caldo de soja trypticase (Difco, Detroit, MI) e incubadas em estufa (Sterilifer, SP, Brasil) por 24 a 48h à temperatura de 37°C. Após a inoculação e crescimento em meio sólido, foram isoladas colônias e suspensas em tubos contendo 5 mL de TSB. O inóculo bacteriano foi padronizado em uma densidade óptica de 405 nm através de leitora de microplacas (Thermo Plate, Nanshan District, Shenzhen, China). Todos os

procedimentos nesta análise foram realizados em cabine de fluxo laminar (Labconco, Kansas City, EUA).

A análise foi conduzida de forma similar à metodologia empregada por Barros et al. (2014a). As amostras dos cimentos endodônticos testados neste experimento foram inseridas em uma placa de poliestireno de 96 poços (Prolab, São Paulo-SP, Brasil), foram condicionados aproximadamente 0,03 mL dos cimentos endodônticos propostos previamente manipulados (Figura 16), em cada respectivo poço (n=5), como corpo de prova, com auxílio de uma seringa de insulina descartável de 1 mL e uma espátula Suprafill nº1 (Duflex, SS White; Rio de Janeiro, RJ, Brasil).

Figura 16 - Placa de 96 poços utilizada no teste de contato direto



Legenda: Placa de 96 poços após a alocação dos cimentos endodônticos propostos para análise no teste de contato direto frente ao *E. faecalis*.

Fonte: A autora, 2019.

A análise foi subdividida em grupos de acordo com o tempo de armazenamento dos materiais: os cimentos endodônticos foram testados após 20 min da manipulação, estando as amostras frescas (T0), após 7 dias (T7) e por 30 dias (T30); e quanto ao tempo de contato dos materiais com a suspensão de *E. faecalis*: 10 min e 60 min. As placas que continham amostras

a serem testadas nos tempos mais tardios (T7 e T30) permaneceram armazenadas em estufa a 37°C, até o momento da realização dos testes.

As alíquotas de 10 µL de suspensão bacteriana (contendo cerca de $1,5 \times 10^6$ bactérias) foram dispensadas sobre a superfície de cada amostra. O grupo controle positivo foi estabelecido pelos poços não preenchidos pelos materiais testados, nos quais a suspensão bacteriana foi aplicada e houve o crescimento de colônias. No grupo controle negativo, os poços preenchidos com os materiais testados receberam solução salina estéril ao invés da alíquota de suspensão bacteriana.

De acordo com os critérios estabelecidos de tempo de armazenamento dos materiais e tempo de contato com o *E. faecalis* para cada respectivo grupo, as placas de 96 poços foram incubadas a 37°C em ambiente com 100 % de umidade relativa. Em seguida, 200 µL de TSB foram adicionados a cada poço. Após a inserção do TSB, o conteúdo de cada poço foi suavemente agitado com auxílio de uma pipeta durante 1 min, logo após a agitação, 100 µL da suspensão foram pipetados para placas de microdiluição e submetidos a 10 diluições em série em solução salina estéril. A sobrevivência bacteriana foi determinada por cultura de alíquotas de 10 µL de cada diluição realizada em placas de ágar Mitis Salivarius. A contagem das unidades formadoras de colônias (UFC) foi realizada após o período de 24h de incubação das placas a 37°C (Figura 17).

Figura 17 - Contagem das unidades formadoras de colônia em placas de Petri



Legenda: Contagem das UFC em Placa de Petri com ágar Mitis Salivarius após o período de 24 h de incubação a 37°C.

Fonte: A autora, 2019.

3.3.3 Avaliação da citotoxicidade

A análise da citotoxicidade foi conduzida de acordo com a metodologia preconizada por Saavedra (2018) e em acordância com a ISO 10993-12. As amostras dos cimentos endodônticos propostos foram confeccionadas sob condições assépticas, através de moldes de borracha estéril e inerte (Odeme Dental Research, Santa Catarina, Brasil), com 5 mm de diâmetro e 2 mm de altura. Todos os procedimentos executados neste protocolo foram realizados sob cabine de fluxo laminar (Labconco, Kansas City, EUA). Após a manipulação dos materiais e preenchimento dos moldes citados, estes foram armazenados em estufa (Sterilifer, SP, Brasil) a 37°C por 24h, e foram após o tempo de presa foram obtidos os discos dos cimentos analisados. Na análise preconizou-se a razão entre a superfície das amostras e o volume do meio de aproximadamente 150 mm²/mL. O excesso de material eventualmente presente nas amostras foi previamente removido com auxílio de uma lâmina de bisturi estéril.

O extrato das amostras foi obtido em Dulbecco's modified Eagle's médium - DMEM (GIBCO® Invitrogen Corporation, Grand Island, N.Y., U.S.A.) com 10% soro fetal bovino (GIBCO® Invitrogen Corporation, Grand Island, N.Y., U.S.A.), e 1% de penicilina 10000 unidades/mL e estreptomicina 10000 µg/mL (GIBCO® Invitrogen Corporation, Grand Island, NY, EUA) a 37°C em uma estufa de CO₂ (5% CO₂) (modelo 3110, Thermo Scientific, Marietta, Ohio, EUA), apresentada na figura 17. Durante a obtenção dos extratos, os materiais permaneceram armazenados sob temperatura constante de 37° C por 24 h.

As células utilizadas nesta análise foram os fibroblastos da linhagem MRC-5. Essas células foram cultivadas em DMEM com 10% soro fetal bovino, penicilina e estreptomicina a 37°C em uma estufa de CO₂ (5% CO₂) em garrafas de 75 cm² até que fosse alcançada pelo menos 80% de confluência. No experimento, foram cultivadas 0,5 x 10⁵ células em cada poço de placas de 96 poços, sendo necessários 327 poços incluindo os grupos controle e o total de 163,5 x 10⁵ células. A contagem das células foi realizada em câmera de Neubauer e a viabilidade destas foi confirmada com o corante azul de tripan (Sigma, St. Louis, EUA). O plaqueamento das células foi realizado antes do início do experimento, a fim de formar uma monocamada celular nos poços com aproximadamente 80% de confluência. Após o período de 24 h, houve a exposição das células aos extratos dos cimentos endodônticos (Figura 17), os quais permaneceram em contato com as células por 24 h em armazenamento na estufa a 37°C. O grupo controle consistia nos poços em que havia apenas células sem a exposição aos extratos dos cimentos endodônticos.

A análise da citotoxicidade foi conduzida por ensaio de captação do corante Tetrazolium, de acordo com as normas ISO 10993-12. A atividade mitocondrial foi avaliada através do ensaio 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil brometo de tetrazólio (MTT) (ATCC, Virgínia, EUA). Este teste objetiva a mensuração de células viáveis após exposição dos fibroblastos aos respectivos extratos dos cimentos endodônticos. Estes extratos foram previamente submetidos à diluição com o meio de cultura supracitado, sendo propostas as seguintes diluições seriadas: 1:1; 1:2; 1:4 e 1:8.

Após o período de contato entre os fibroblastos e as respectivas diluições dos extratos dos cimentos endodônticos, o meio de cultura foi aspirado e as células foram submetidas a duas lavagens com 1 mL de PBS (*phosphate buffered saline*) estéril. Adicionou-se 1 mL da solução de MTT (0,5 mg/mL) a cada poço. Após o período de incubação de 2 h, removeu-se a solução de MTT e foi adicionado 500 µl de dimetilsulfóxido (DMSO) estéril a cada poço. Findo este processo, as placas de 96 poços foram agitadas por 5 min e armazenadas por 5 min para a estabilização da cor sob proteção da luz. Subsequentemente, foram obtidas alíquotas de

100 μ l de cada poço e transferidas para uma nova placa estéril de 96 poços a ser inserida no espectrofotômetro de microplacas ilustrado na figura 18 (Epoch, Biotek, Winooski, VT, EUA), sendo a absorbância do equipamento de 540 nm. Todo o protocolo foi executado em triplicata.

Figura 18 - Equipamentos e materiais utilizados na análise da citotoxicidade das amostras



Legenda: (A) - Estufa de CO₂ utilizada durante os experimentos da avaliação da citotoxicidade; (B) - Placas de 96 poços após a exposição dos fibroblastos aos extratos dos materiais testados; (C) - Espectrofotômetro de microplacas utilizados nesta análise.

Fonte: A autora, 2019.

A determinação dos resultados da viabilidade celular ocorre através da análise colorimétrica que afere a metabolização do MTT pela mitocôndria de células viáveis após a exposição destas ao extrato, que liberam a enzima succinato desidrogenase, clivam o anel de tetrazólio, gerando a transformação de um composto de coloração amarela para um composto de coloração azul escura, denominado cristais de formazan, insolúveis em soluções aquosas. Deste modo, a produção destes cristais reflete o estado funcional da cadeia respiratória das células analisadas. O resultado obtido consiste em uma medida de densidade óptica: quanto mais escura a coloração do poço, maior a densidade óptica, maior a metabolização do MTT e conseqüentemente menos citotóxico é o material testado.

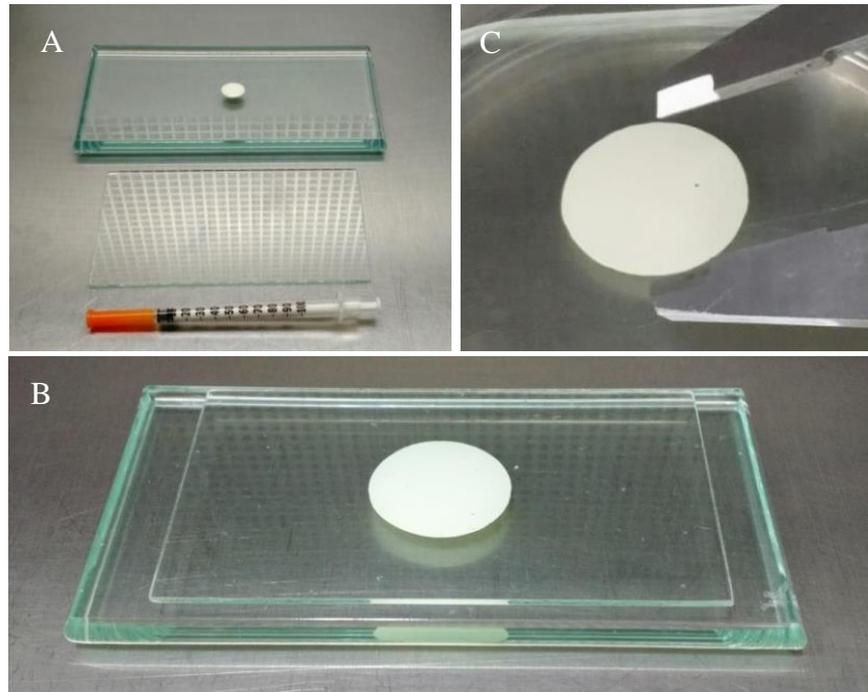
Os valores obtidos da densidade óptica dos materiais testados foram convertidos em valores percentuais em referência ao grupo controle. Sendo assim possível a determinação de uma tabela com a porcentagem de células viáveis em cada grupo de cimentos endodônticos nas respectivas diluições realizadas.

3.4 Análises físico-químicas das nanopartículas de clorexidina-hexametafosfato

3.4.1 Escoamento

A análise do escoamento foi conduzida seguindo as especificações de acordo com a ISO 6876:2012 sob adaptações, assim como descrito por Vertuan et al. (2018), a fim de verificar possíveis alterações desta propriedade nos cimentos submetidos à adição das NPs CHX-HMP. Os cimentos testados foram manipulados de acordo com as especificações dos respectivos fabricantes. Um volume final de 0,05 ($\pm 0,005$) mL de cada cimento foi preparado e com auxílio de uma seringa de 1 mL, como demonstrado na Figura 19, os materiais foram dispensados sobre uma placa de vidro (150 x 80 x 5 mm). Completados 180 (± 5) s após a manipulação dos cimentos, uma segunda placa de vidro foi colocada sobre a superfície na qual foram dispensados, e adicionada uma carga de 120 (± 2) g. Foram confeccionadas 5 amostras de cada cimento avaliado, totalizando 45 análises. Após 10 min da incidência da carga na superfície, iniciou-se a aferição das médias (Figura 19), expressas em milímetros, obtidas pela medição do maior e menor diâmetro de cada amostra através de paquímetro digital (Mitutoyo MTI Corporation). Foram realizadas três aferições de cada amostra a fim de obter a média respectiva. As análises que não apresentavam formato final circular e uniforme, com diferença de mais de 1 mm entre o maior e menor diâmetro foram descartadas e realizada a repetição da análise da amostra.

Figura 19 - Materiais utilizados e procedimentos da análise do escoamento



Legenda: (A) - Seringa utilizada na análise e amostra de cimento dispensada sobre a placa de vidro; (B) - Após 180 seg, a placa de 120g sobreposta ao cimento endodôntico avaliado; (C) - Após 10 min da sobreposição da placa de 120g, iniciada a aferição do maior e menor diâmetro das amostras testadas.

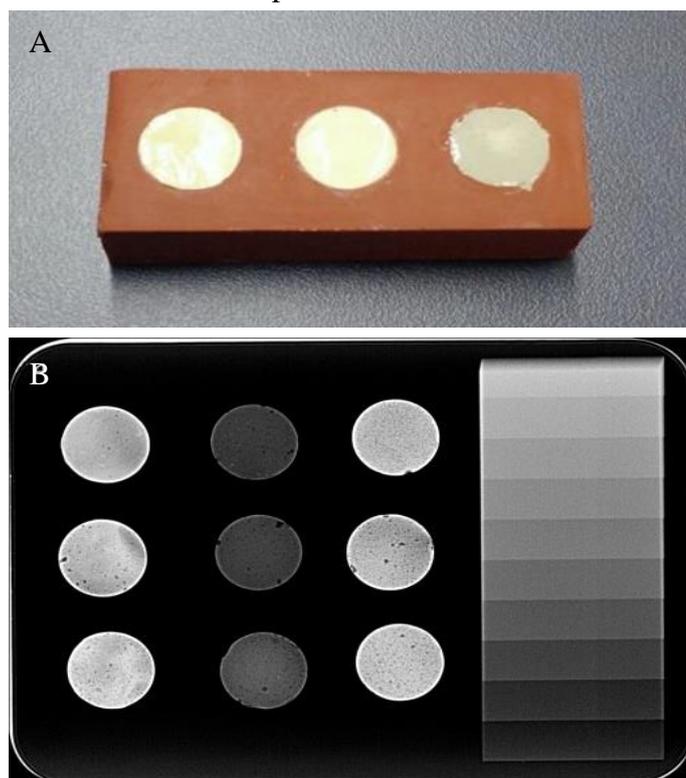
Fonte: A autora, 2019.

3.4.2 Radiopacidade

A análise de radiopacidade foi realizada de acordo com a norma ISO 6876:2012. Após a manipulação dos cimentos endodônticos realizada em concordância com as determinações de cada fabricante, foi realizada a inserção destes materiais em moldes de borracha (Odeme Dental Research, Santa Catarina, Brasil). Os moldes preenchidos foram armazenados em estufa digital (Sterilifer, SP, Brasil) a 37°C por 48 h, a fim de garantir o tempo de presa final dos cimentos endodônticos (Figura 20). As amostras obtidas (n=5) apresentavam 10 mm de diâmetro e 1 mm de altura. Em sequência, as dimensões propostas foram conferidas com paquímetro digital (Mitutoyo MTI Corporation) e após esta aferição, foram dispostas sobre um sensor oclusal eletrônico de fósforo Digora (Soredex, Helsinki, Finlândia), juntamente com uma escala em alumínio (Odeme Dental Research, Santa Catarina, Brasil), que apresenta degraus de 1 mm de altura, totalizando 10 mm (Figura 20). As tomadas radiográficas foram

realizadas com uma exposição de 0,3 s empregando o equipamento Focus™ (Carestream Dental LLC/RVG 6100, Atlanta, GA, EUA), com 70 kV e 7 mA, e a distância foco/filme foi padronizada em 40 cm. O processamento dos sensores expostos foi conduzido no leitor Digora (Soredex-Finndent, Orion Corporation, Helsinki, Finlândia), as imagens digitalizadas obtidas foram analisadas com auxílio do software Image J (Imaging Processing and Analysis in Java). Todas as imagens obtidas dos cimentos endodônticos propostos, assim como cada espessura da escala de alumínio, foram mensuradas aleatoriamente em três pontos de diferentes áreas, para deste modo obter a média da radiopacidade mais fidedigna de cada material. Os valores finais obtidos foram expressos em mm de Al, convertidos através da alicação da metodologia descrita por Duarte et al. (2009) e Candeiro (2012).

Figura 20 - Confecção das amostras e análise da radiopacidade



Legenda: (A) - Molde de borracha após preenchimento com os cimentos endodônticos testados para obtenção dos discos de cimentos; (B) - Exposição radiográfica do sensor oclusal com a disposição das amostras dos cimentos endodônticos e a escala de alumínio.

Fonte: A autora, 2019.

3.4.3 Solubilidade

A análise da solubilidade foi realizada como descrito por Vertuan et al. (2018), de acordo com os requisitos determinados pela norma ISO 6876:2012. Os cimentos endodônticos foram manipulados conforme orientações dos fabricantes e inseridos em moldes de borracha (Odeme Dental Research, Santa Catarina, Brasil) de 10 mm x 2 mm. Durante o tempo de presa, foram inseridos fios de nylon em cada amostra a fim de que estes ficassem presos aos discos de cimento, e desta forma viabilizassem a fixação e suspensão adequada das amostras durante o período de imersão. Após 48h de armazenamento em estufa a 37° C (Sterilifer, SP, Brasil) e conseqüentemente, fim do tempo de presa, as amostras foram pesadas em balança analítica (Bioprecisa, São Paulo, Brasil), a fim de determinar o peso inicial das amostras (PI). Cada amostra foi submetida a três pesagens iniciais para confirmação do valor inicial obtido.

Após a obtenção do PI de todas as amostras, foi iniciada a fixação destas nos respectivos recipientes. As amostras foram condicionadas em recipientes plásticos padronizados, contendo 20 mL de água destilada (Figura 21), posicionadas de modo que ficassem totalmente imersas, e não tocassem quaisquer paredes ou o fundo do recipiente, no qual estavam contidas. Em seguida, os recipientes foram armazenados em estufa subdivididas em dois grupos quanto ao período de imersão: 24h (n=3) e 7 dias (n=3).

Figura 21 - Moldes e imersão das amostras para análise da solubilidade

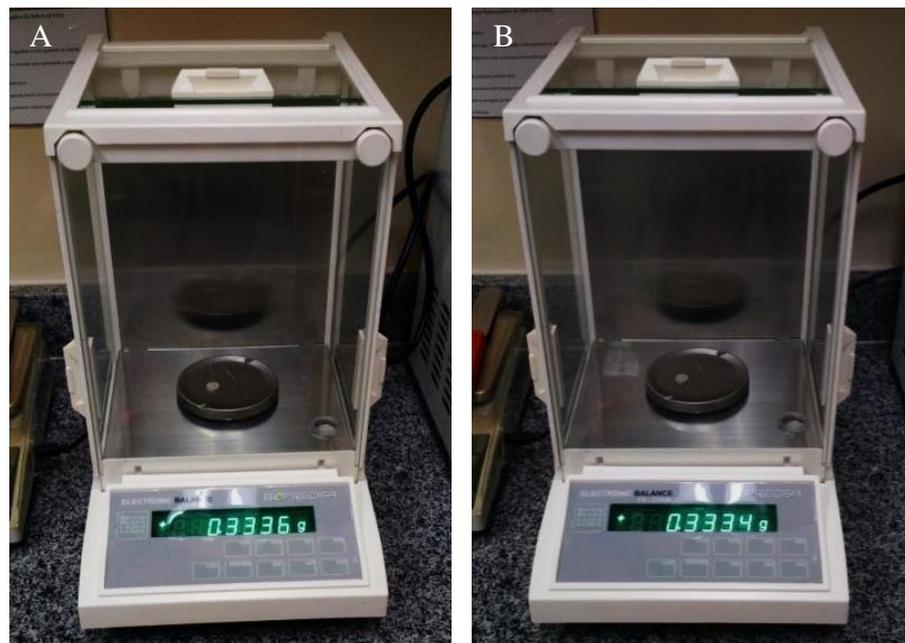


Legenda: (A) - Molde de borracha utilizado para obtenção dos discos dos demais cimentos endodônticos; (B) - Amostra imersa e suspensa em 20 mL de água destilada para avaliação da solubilidade.

Fonte: A autora, 2019.

Após o período de imersão, as amostras foram removidas dos respectivos recipientes e submetidas à rinsagem e secas com papel absorvente. Posteriormente foram submetidas à desumidificação por 48h e ao fim deste período, foram submetidas à pesagem em balança analítica para determinação do peso final (PF). Nenhuma das amostras apresentou características visuais de desintegração, deste modo nenhuma foi descartada durante o experimento. Os valores obtidos com as pesagens (Figura 22) em cada grupo foram condicionados à seguinte equação: $([PF-PI]/PI) \times 100$, sendo o resultado final expresso em porcentagem.

Figura 22 - Pesagens das amostras dos cimentos endodônticos para análise de solubilidade



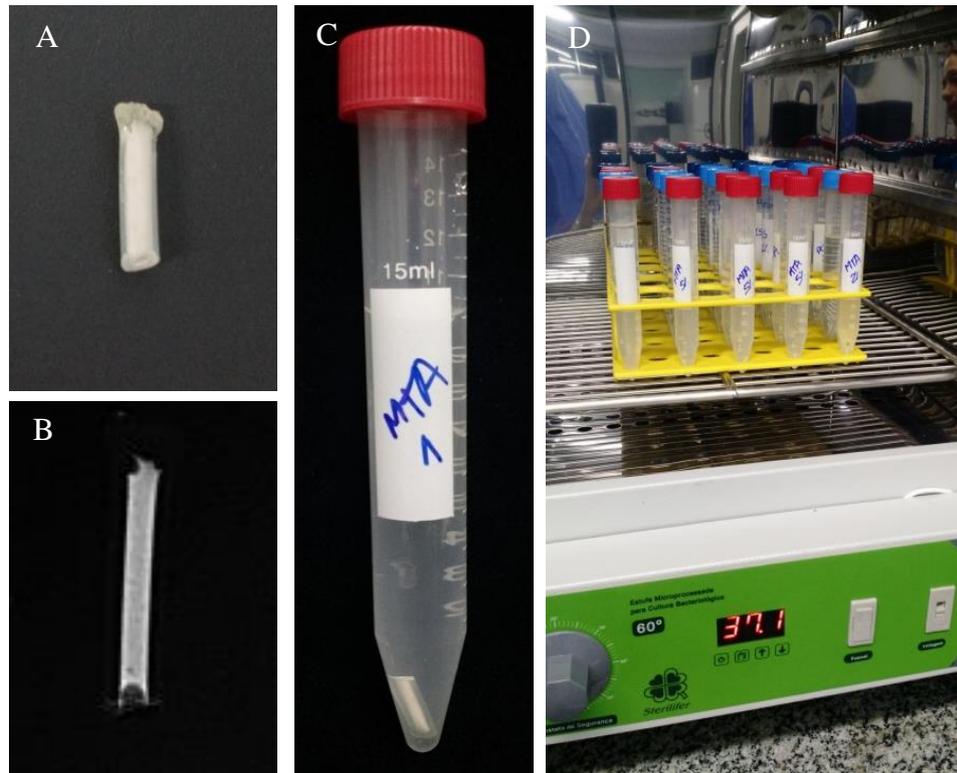
Legenda: (A) - Imagem da balança analítica na pesagem inicial da amostra do cimento endodôntico PCS; (B) - Imagem da balança analítica na pesagem final da amostra do cimento endodôntico PCS após o período de 7 dias de imersão.

Fonte: A autora, 2019.

3.4.4 pH

A avaliação do pH dos cimentos endodônticos testados foi realizada com a inserção destes materiais manipulados de acordo com as orientações dos fabricantes, em tubos de polietileno com diâmetro interno de 1,0 mm e 10 mm de comprimento, seguindo a metodologia de Silva et al. (2013). Os tubos possuíam uma das suas extremidades vedadas por aquecimento do polietileno (n=5). Os cimentos foram inseridos nestes tubos com auxílio de uma lentulo (Dentsply Maillefer, Baillagues Suíça), finalizado o preenchimento, as amostras foram radiografadas a fim de confirmar o completo preenchimento e ausência de bolhas no interior dos tubos. Cada amostra foi imersa individualmente em frascos de polipropileno contendo 10 mL de água destilada (Figura 23).

Figura 23 - Materiais utilizados na análise do pH



Legenda: (A) - Tubo de polietileno preenchidos com o cimento endodôntico; (B) - Radiografia do tubo de polietileno para verificação do completo preenchimento pelo cimento endodôntico; (C) - Imersão da amostra em frasco de polipropileno contendo 10 mL de água destilada; (D) - Armazenamento dos frascos de polipropileno em estufa a 37°C.

Fonte: A autora, 2019.

Antes da imersão de cada amostra no seu respectivo meio, houve aferição deste meio sendo constatado o seu pH no valor de 6,8. O grupo controle foi representado por frascos que continham apenas água destilada com o tubo de polietileno vazio. O pH das amostras foi aferido com auxílio do pHmetro (modelo pHb 500, Ionlab produtos laboratoriais, Curitiba, PR, Brazil), previamente calibrado com soluções com pH pré-estabelecido em 4, 7 e 10 . As amostras foram armazenadas em estufa digital (Sterilifer, SP, Brasil) a 37°C até os períodos determinados para análises: 3h, 24h, 48h, 72h e 7 dias (Figura 24). Antes de cada aferição, a solução do meio era agitada no frasco em vórtex por 5 s. Após cada mensuração, o eletrodo do equipamento era limpo com água destilada para evitar contaminação com o fluido avaliado subsequentemente. As análises eram conduzidas sob a temperatura ambiente de 25°C e foram realizadas sem substituição do meio de cada amostra.

Figura 24 - Equipamento e protocolo de análise do pH



Legenda: (A) - Calibração do equipamento prévia ao início das análises com solução de pH pré-estabelecido em 7,00; (B) - Aferição do pH da amostra de cimento MTA Fillapex com incorporação de 2 % de NPs CHX-HMP.

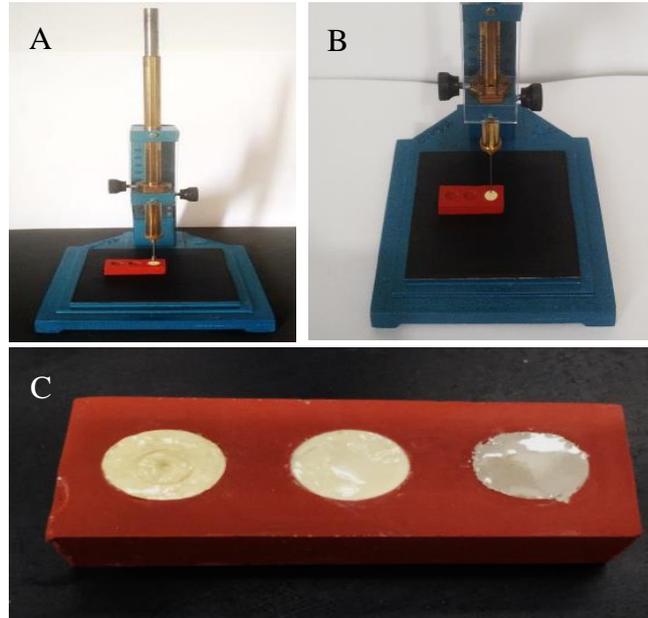
Fonte: A autora, 2019.

3.4.5 Tempo de presa

A análise do tempo de presa foi conduzida de acordo com as normas ISO 6876:2012 sob algumas adaptações. Foram utilizadas três amostras de cada cimento endodôntico, conforme as especificações dos respectivos fabricantes. Após a manipulação dos materiais, os cimentos endodônticos que não requerem umidade para obtenção da presa: AH Plus e PCS, foram vertidos em moldes de borracha com diâmetro de 10 mm x 2 mm. Após 120 (± 10) s da espatulação destes materiais, houve o armazenamento em estufa digital (Sterilifer, SP, Brasil). O MTA Fillapex, segundo mencionado pelo fabricante, requer umidade para atingir a presa final, por este motivo foi vertido em molde de gesso de 10 mm x e 1 mm, com o mesmo protótipo do modelo utilizado na metodologia da análise da solubilidade, já previamente confeccionado e armazenado em estufa a 37 (± 1)°C e umidade relativa de 95 (± 5) % por 24h. Após o preenchimento do molde de gesso, as amostras do MTA Fillapex foram imediatamente condicionadas na estufa.

O equipamento utilizado apresentava carga de 100 ($\pm 0,5$) g de peso e ponta com extremidade plana de diâmetro de 2 ($\pm 0,1$) mm (Figura 25). Cada material foi analisado de acordo com o tempo de presa mencionado, ao aproximar-se o tempo de presa determinado pelos respectivos fabricantes iniciou-se as análises em constantes intervalos de tempo. A agulha foi posicionada verticalmente sobre a superfície das amostras testadas, enquanto o tempo de presa não foi alcançado, este procedimento gerou marcações nas superfícies dos materiais, as quais foram registradas (Figura 25). Ao longo das aferições, a agulha de Gilmore foi limpa entre a execução das análises e deslocada de posição ao longo da superfície das amostras para repetição da análise. O tempo de presa compreende o tempo desde o início da espatulação até o momento em que cessaram as marcações na amostras provenientes da incidência da força da agulha de Gilmore.

Figura 25 - Equipamento e protocolo da análise do tempo de presa



Legenda: (A) - Equipamento utilizado na análise do tempo de presa; (B) -Extremidade plana de 2 mm de diâmetro, acoplada ao equipamento; (C) - Amostras dos cimentos endodônticos inseridas nos moldes de borracha após a incidência do dispositivo plano.

Fonte: A autora, 2019.

3.5 Análise estatística

Os resultados das análises descritas foram submetidos ao teste Kolmogorov–Smirnov para testar a normalidade das respectivas amostras. Os dados foram posteriormente submetidos à análise de variância one-way e a diferença estatística entre os grupos foi avaliada utilizando-se o teste de Tukey com nível de significância de 5% ($\alpha = 0,05$). Os dados foram analisados pelo software SPSS (SPSS Inc., Chicago, IL, EUA).

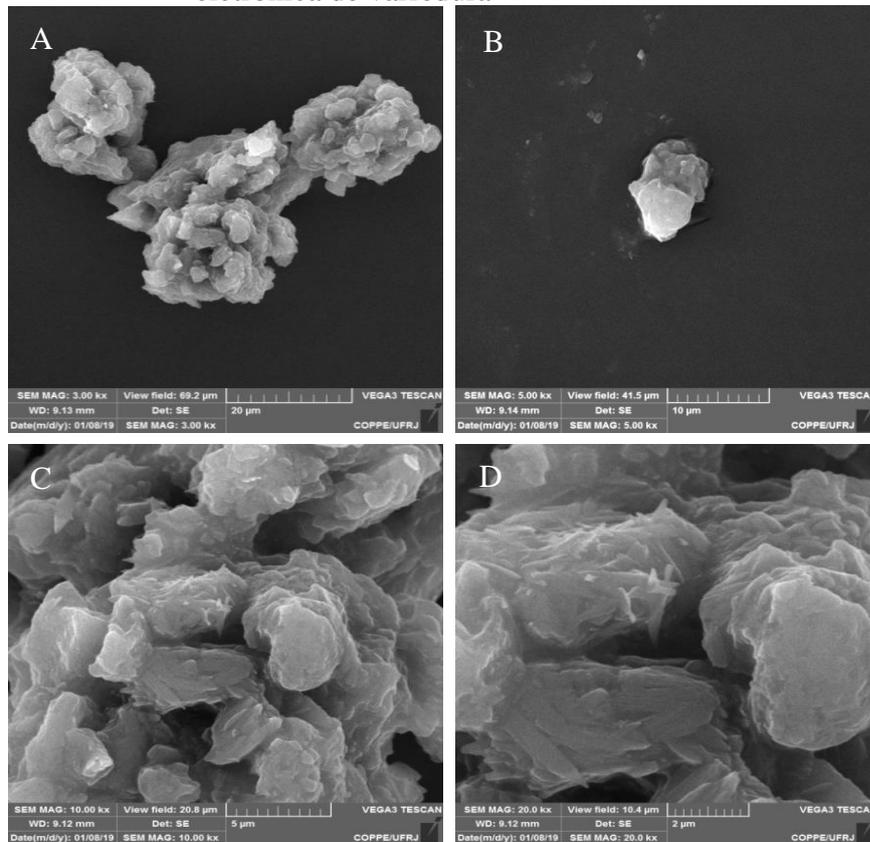
4 RESULTADOS

4.1 Caracterização das nanopartículas de clorexidina-hexametafosfato

4.1.1 Microscopia eletrônica de varredura

A análise das NPs CHX-HMP isoladas demonstrou que há uma grande tendência destas a aglomerarem-se (Figura 26). Quanto à interação das NPs aos cimentos endodônticos analisados, não houve diferença significativa entre as imagens obtidas das superfícies dos cimentos comercialmente veiculados e os que sofreram incorporação de 2% e 5% das NPs (Figura 27).

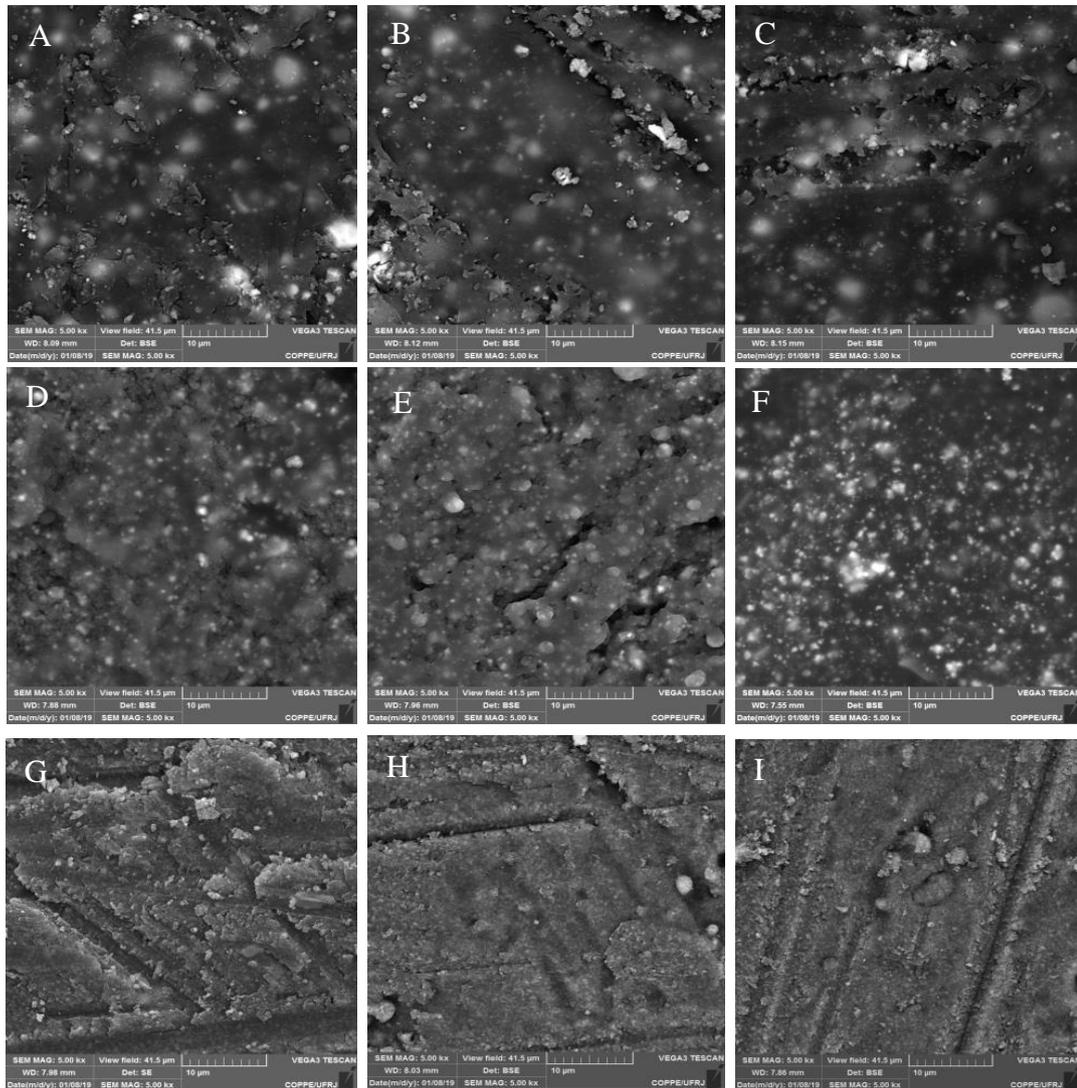
Figura 26 - Caracterização da superfície das amostras das nanopartículas CHX-HMP em microscopia eletrônica de varredura



Legenda: Imagens obtidas em MEV da superfície das NPs CHX-HMP de áreas distintas da amostra analisada. (A) - Aumento de 3000x; (B) - Aumento de 5000x; (C) - Aumento de 10000x; (D) - Aumento de 20000x.

Fonte: A autora, 2019.

Figura 27 - Caracterização da superfície das amostras dos cimentos endodônticos em microscopia eletrônica de varredura



Legenda: Imagens obtidas em MEV da superfície dos cimentos endodônticos sob aumento de 5000 x. (A) - AH Plus; (B) - AH Plus com 2% de NPs CHX-HMP; (C) - AH Plus com 5% de NPs CHX-HMP; (D) - MTA Fillapex; (E) - MTA Fillapex com 2% de NPs CHX-HMP; (F) - MTA Fillapex com 5% de NPs CHX-HMP; (G) - PCS; (H) - PCS com 2% de NPs CHX-HMP; (I) - PCS com 5% de NPs CHX-HMP.

Fonte: A autora, 2019.

4.1.2 Espalhamento dinâmico de luz

O espalhamento dinâmico de luz aferiu os tamanhos das NPs através de estimativa, por distribuição de intensidade de luz espalhada pelas NPs CHX-HMP. O valor médio por número das NPs obtido na análise destas amostras foi 169,39 nm (Tabela 1).

Tabela 1 - Resultados obtidos das análises das NPs por DLS

Amostra	Diâmetro
NPs CHX-HMP 1	55,21
NPs CHX-HMP 2	90,62
NPs CHX-HMP 3	362,36
MÉDIA E DESVIO PADRÃO	169,39 ± 137,20

Legenda: Valores correspondentes ao diâmetro efetivo de cada amostra, expressos em nm, e a respectiva média e desvio padrão da análise.

Fonte: A autora, 2019.

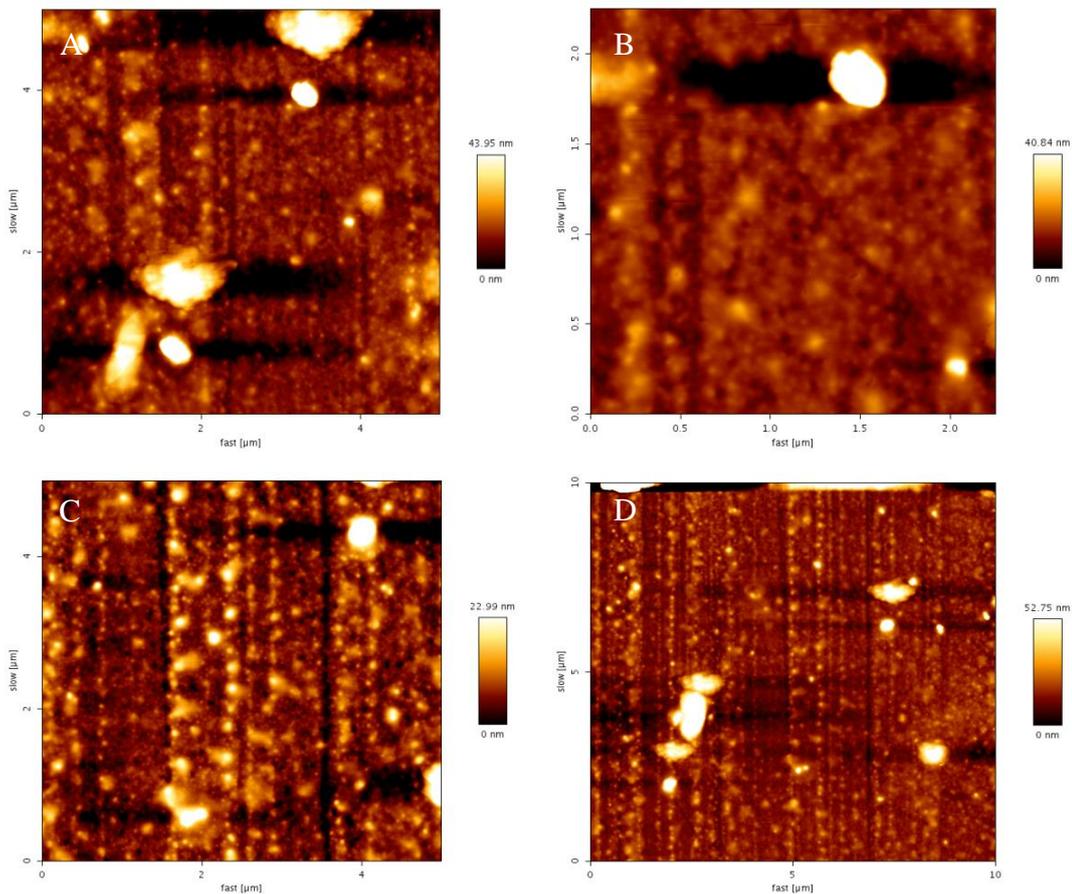
4.1.3 Potencial zeta

As NPs CHX-HMP apresentaram o valor correspondente ao potencial zeta de: -10,18 mV, demonstrando perfil aniônico e sendo consideradas altamente instáveis de acordo com a interação no meio analisado. A partir do potencial zeta negativo e o valor do módulo próximo a zero infere-se a agregação destas partículas do meio dispersante.

4.1.4 Microscopia de força atômica

As imagens de microscopia de força atômica das NPs CHX-HMP foram obtidas de forma representativa das amostras (Figura 28). Observa-se através desta análise uma menor disposição de aglomerados das NPs, assim como um formato com maior regularidade das unidades, permitindo a visualização e mensuração de modo individualizado.

Figura 28 - Imagens representativas das NPs CHX-HMP no microscópio de força atômica



Legenda: Imagens e mensurações das NPs CHX- HMP individualizadas na análise do AFM; (A) - Imagem de 2x2 μm com escala vertical de 40.84 nm mostrando nanopartículas individuais globulares; (B) - Imagem de 5x5 μm com escala vertical de 22.99 nm; (C) - Imagem de 5x5 μm com escala vertical de 43.95 nm; (D) - Imagem de 10x10 μm com escala vertical de 52.75 nm.

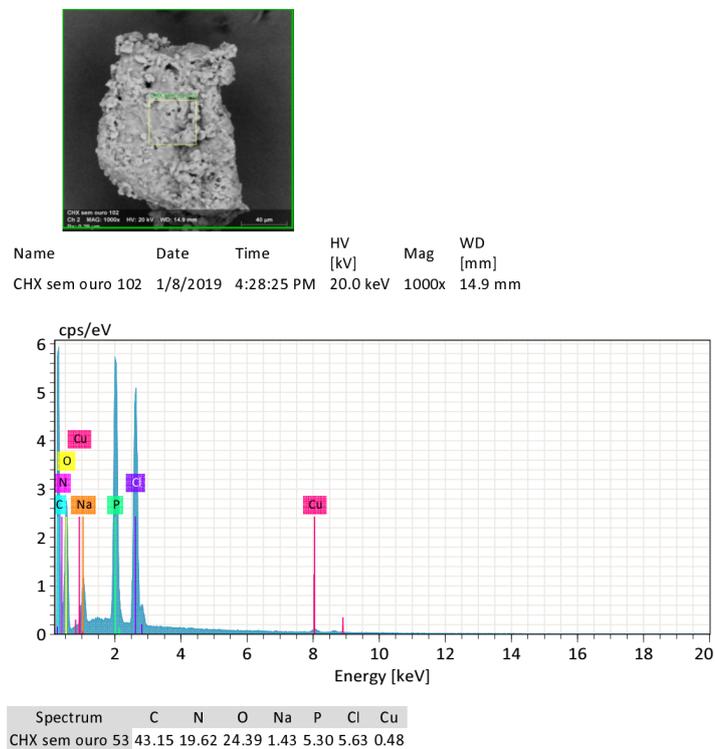
Fonte: A autora, 2019.

4.1.5 Espectroscopia de energia dispersiva de raios-X

As análises das amostras geraram imagens microscópicas que permitem a visualização da área específica selecionada para avaliação e emissão de um gráfico (Figura 28), que contém a taxa de contagem por segundo (cps) da radiação em função da energia, expressa em KeV. A média dos resultados provenientes das diferentes amostras de NPs CHX-HMP foi apresentada na Tabela 2, na qual constam as porcentagens atômicas de cada elemento químico presente na amostra e identificado durante a análise, observa-se a presença de C, N, O, Na, P, Cl, e os seguintes contaminantes: Au, Cu, Fe e Zn. Os resultados desta metodologia não foram submetidos à análise estatística.

Figura 29 - Representação da análise química elementar das nanopartículas CHX-HMP

Application Note



Legenda: Dados e gráfico da composição química elementar das NPs CHX-HMP analisadas por EDS, expressos em KeV.

Fonte: A autora, 2019.

Tabela 2 - Composição química elementar das NPs CHX-HMP

Componentes químicos	Média ± Desvio padrão
C (at.%)	43,97 ± 5,05
N (at.%)	13,35 ± 9,44
O (at.%)	21,83 ± 2,26
Na (at.%)	2,55 ± 1,80
P (at.%)	7,32 ± 5,20
Cl (at.%)	6,49 ± 3,62

Legenda: Valores correspondentes à média e desvio padrão da análise das amostras por EDS expressas em porcentagem atômica (at. %)

Fonte: A autora, 2019.

4.2 Análises biológicas das nanopartículas de clorexidina-hexametafosfato

4.2.1 Teste de difusão em ágar

Os resultados do teste de difusão em ágar frente ao *E. faecalis* foram analisados estatisticamente e expressos na Tabela 3. Não houve formação de halo de inibição no grupo controle negativo, no qual utilizou-se solução salina, assim como no MTA Fillapex. A incorporação de 2% e 5% das NPs CHX-HMP, não influenciou de forma estatisticamente significativa a formação do halo de inibição no grupo dos cimentos endodônticos: PCS e AH Plus ($P > 0,05$). No entanto, no grupo do MTA Fillapex, a incorporação da NPs CHX-HMP permitiu e intensificou a formação do halo de inibição de forma estatisticamente significativa ($P < 0,05$).

Tabela 3 – Resultados correspondentes às análises das amostras pelo teste de difusão em ágar

MATERIAIS	Média± Desvio padrão
Solução Salina	0 ± 0 ^A
NaOCl a 2,5%	0,93 ± 0,047 ^C
NPs CHX-HMP	1,13 ± 0,094 ^C
AH	0,9 ± 0 ^C
AH 2% CHX	0,86 ± 0,047 ^C
AH 5% CHX	0,86 ± 0,047 ^C
MTA	0 ± 0 ^A
MTA 2% CHX	0,43 ± 0,047 ^B
MTA 5% CHX	0,96 ± 0,047 ^C
PCS	0,43 ± 0,047 ^B
PCS 2% CHX	0,33 ± 0,047 ^B
PCS 5% CHX	0,36 ± 0,047 ^B

Legenda: Valores correspondentes à média e desvio padrão da análise, expressos em cm. As letras maiúsculas sobrescritas iguais representam que não houve diferença estatisticamente significativa.

Fonte: A autora, 2019.

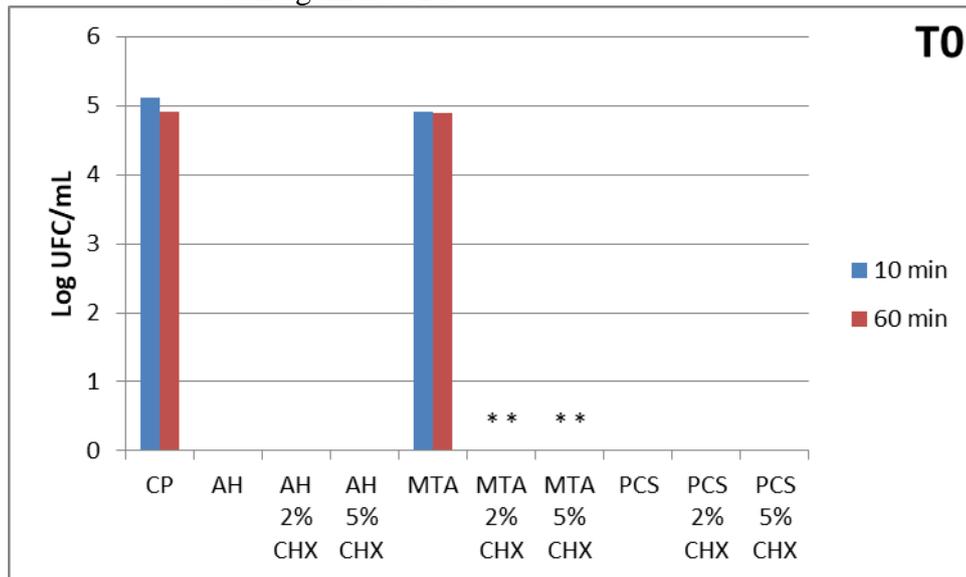
4.2.2 Teste de contato direto

Os resultados das análises dos cimentos endodônticos propostos no DCT frente ao *E. faecalis*, expressos em Log de UFC/mL, foram apresentados em gráficos após a análise estatística. Não houve crescimento bacteriano nos grupos controle negativo estabelecidos nas análises.

Os cimentos frescos (T0) eliminaram as cepas independente da presença das NPs CHX-HMP incorporadas, tanto no tempo de contato de 10 min como em 60 min (Gráfico 1). A única exceção foi relacionada ao cimento MTA Fillapex, que apenas na presença de NPs

CHX-HMP apresentou atividade antibacteriana frente ao *E. faecalis*, eliminando completamente as cepas ($P < 0,05$).

Gráfico 1 – Avaliação da atividade antimicrobiana dos cimentos endodônticos frescos sobre o *E. faecalis* através da contagem de UFC



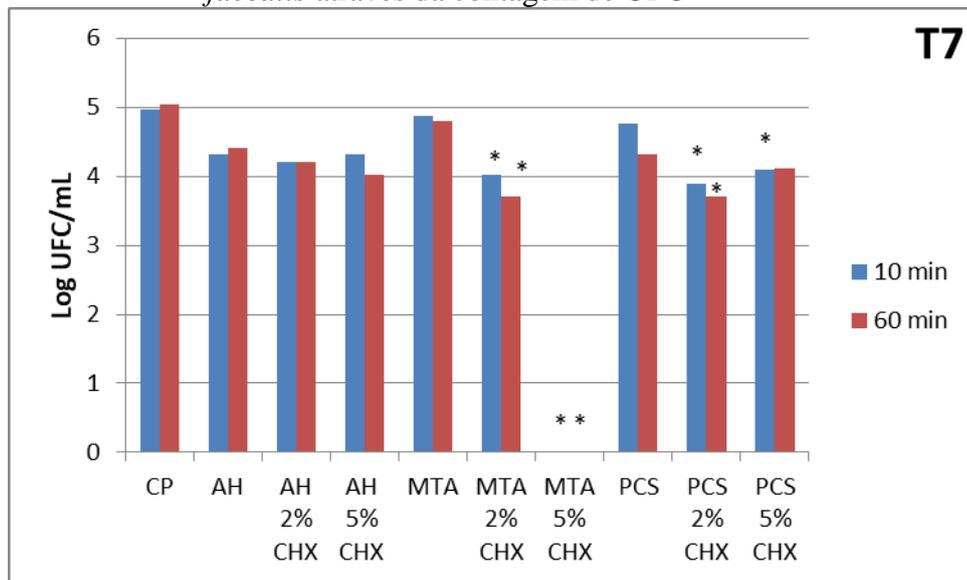
Legenda: O asterisco identifica a presença de diferença estatisticamente significativa após análise ANOVA-one way.

Fonte: A autora, 2019.

Os resultados apresentados após armazenamento dos cimentos endodônticos originalmente comercializados por 7 dias (T7), demonstraram uma significativa redução da atividade antibacteriana dos materiais (Gráfico 2). Não houve diferença estatisticamente significativa dentre os grupos do AH Plus após a incorporação das NPs CHX-HMP ($P > 0,05$). No entanto, o MTA Fillapex após incorporação de 2 % de NPs CHX-HMP reduziu o crescimento bacteriano de forma estatisticamente significativa em relação aos cimentos endodônticos não-modificados, assim como a incorporação de 5% de NPs CHX-HMP que promoveu a total eliminação das cepas, tanto no tempo de contato de 10 min quanto 60 min ($P < 0,05$).

O PCS gerou redução estatisticamente significativa do crescimento bacteriano na presença das NPs CHX-HMP ($P < 0,05$), com exceção do grupo que apresentava a incorporação de 5% de NPs CHX-HMP no tempo de contato de 60 min com *E. faecalis*.

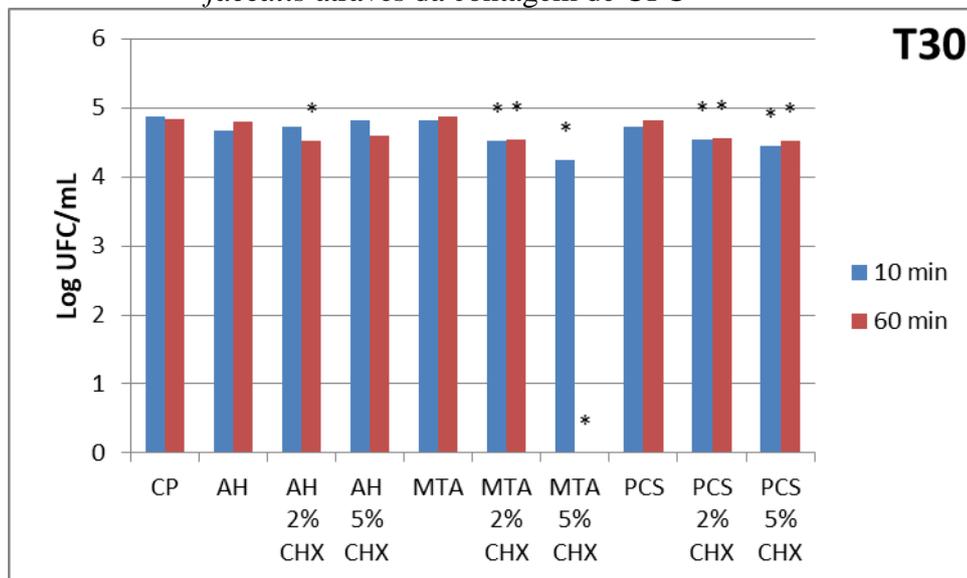
Gráfico 2 - Avaliação da atividade antimicrobiana dos cimentos endodônticos após armazenamento de 7 dias sobre o *E. faecalis* através da contagem de UFC



Legenda: O asterisco identifica a presença de diferença estatisticamente significativa após análise ANOVA-one way.

Fonte: A autora, 2019.

Gráfico 3 - Avaliação da atividade antimicrobiana dos cimentos endodônticos após armazenamento de 30 dias sobre o *E. faecalis* através da contagem de UFC



Legenda: O asterisco identifica a presença de diferença estatisticamente significativa após análise ANOVA-one way.

Fonte: O autor, 2019.

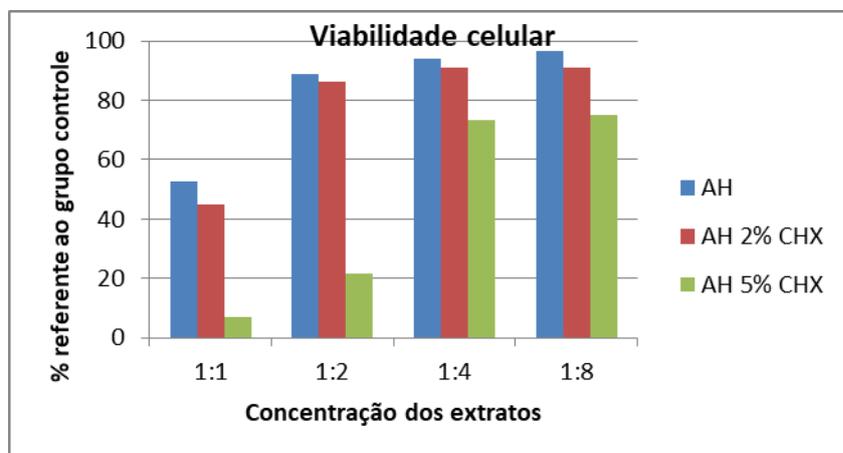
Após o armazenamento dos cimentos endodônticos por 30 dias (T30), observa-se ainda a redução e perda da atividade antibacteriana dos materiais (Gráfico 3). O grupo MTA Fillapex apresentou redução das cepas em ambas as concentrações de incorporações das NPs CHX-HMP e ambos os tempos de contato com *E. faecalis*, no entanto a incorporação de 5 % e 60 min de contato com *E. faecalis* erradicou as cepas ($P < 0,05$).

O grupo do PCS apresentou redução estatisticamente significativa na presença nas NPs CHX-HMP ($P < 0,05$), enquanto o grupo AH Plus não apresentou aumento significativo da ação antibacteriana após a incorporação das NPs CHX-HMP ($P > 0,05$), com exceção da incorporação de 2% de NPs CHX-HMP no tempo de contato de 60 min ($P < 0,05$)

4.2.3 Citotoxicidade

Segundo a análise da citotoxicidade, todos os materiais avaliados apresentaram efeitos citotóxicos à cultura de fibroblastos MRC-5. Quanto a estes efeitos, nota-se relação sendo a citotoxicidade diretamente proporcional à incorporação das NPs CHX-HMP. Os níveis de citotoxicidade apresentados pelos materiais foram distintos para cada grupo de cimentos endodônticos testados (Gráfico 4, 5 e 6).

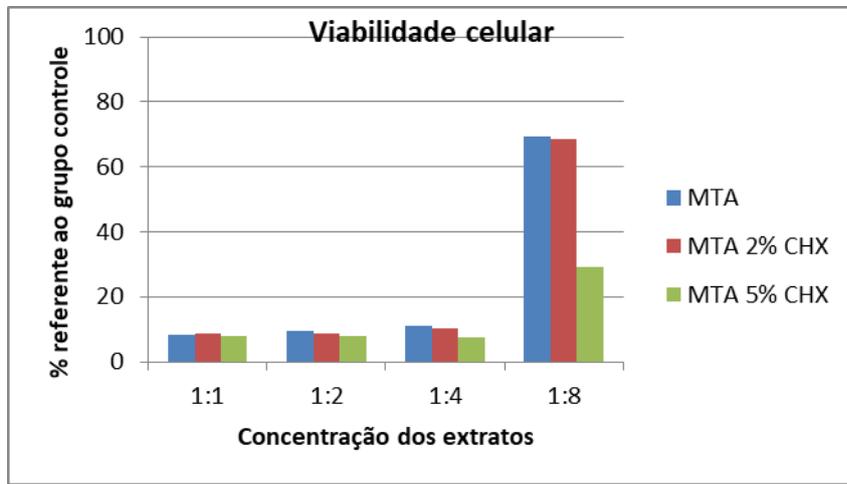
Gráfico 4 - Resultados da viabilidade celular dos fibroblastos expostos aos extratos do grupo AH Plus em quatro diluições avaliadas



Legenda: O gráfico 4 apresenta as médias e desvios padrões da viabilidade celular de cada cimento endodôntico nas 4 diluições destinadas.

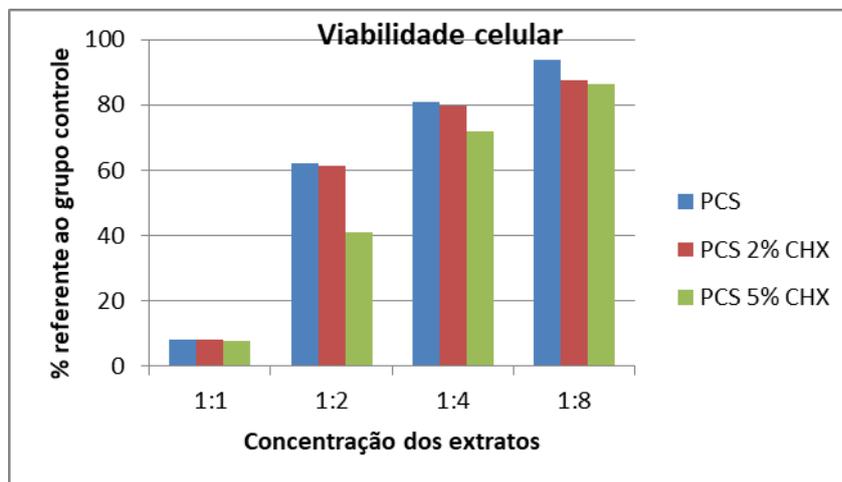
Fonte: A autora, 2019.

Gráfico 5 - Resultados da viabilidade celular dos fibroblastos expostos aos extratos do grupo MTA Fillapex em quatro diluições avaliadas



Legenda: O gráfico 5 apresenta as médias e desvios padrões da viabilidade celular de cada cimento endodôntico nas 4 diluições destinadas.
Fonte: A autora, 2019.

Gráfico 6 - Resultados da viabilidade celular dos fibroblastos expostos aos extratos do grupo PCS em quatro diluições avaliadas



Legenda: O gráfico 6 apresenta as médias e desvios padrões da viabilidade celular de cada cimento endodôntico nas 4 diluições destinadas.
Fonte: O autor, 2019.

Diante dos resultados expressos na Tabela 4, verifica-se que a ordem crescente da citotoxicidade dos cimentos endodônticos: AH Plus < PCS < MTA Fillapex. Observa-se

aumento da citotoxicidade de forma estatisticamente significativa no AH Plus sob a incorporação de 5% de NPs CHX-HMP em todas as diluições estabelecidas ($P < 0,05$).

Quanto ao PCS, evidencia-se aumento do comportamento citotóxico de forma significativa estatisticamente apenas sob a incorporação de 5% de NPs CHX-HMP nas diluições 1:2 e 1:4 ($P < 0,05$), todavia apesar do MTA Fillapex apresentar maior citotoxicidade dentre os cimentos testados, não há uma potencialização deste comportamento em função da incorporação da NPs CHX-HMP, visto que só houve diferença estatisticamente significante no grupo submetido à incorporação de 5% de NPs CHX-sob a diluição 1:8 ($P < 0,05$).

Tabela 4 – Viabilidade celular dos fibroblastos expostos aos extratos dos cimentos endodônticos nas quatro diluições avaliadas

	1:1	1:2	1:4	1:8
AH	52,65 ± 5,92 ^{Aa}	88,91 ± 5,08 ^{Aa}	94,12 ± 6,33 ^{Aa}	96,44 ± 3,74 ^{Aa}
AH 2% CHX	44,73 ± 5,48 ^{Ba}	86,30 ± 5,27 ^{Aa}	90,95 ± 4,69 ^{Aa}	91,04 ± 2,73 ^{Aa}
AH 5% CHX	6,86 ± 0,13 ^{Ba}	21,81 ± 6,57 ^{Ba}	73,51 ± 9,17 ^{Ba}	74,97 ± 8,63 ^{Ba}
MTA	8,45 ± 0,33 ^{Ab}	9,60 ± 1,02 ^{Ab}	11,12 ± 2,61 ^{Ab}	69,22 ± 17,73 ^{Ab}
MTA 2% CHX	8,68 ± 0,16 ^{Ab}	8,80 ± 0,84 ^{Ab}	10,39 ± 0,62 ^{Ab}	68,61 ± 9,95 ^{Ab}
MTA 5% CHX	7,96 ± 0,38 ^{Aa}	8,01 ± 0,43 ^{Ab}	7,51 ± 0,42 ^{Ab}	29,36 ± 12,32 ^{Bb}
PCS	8,11 ± 0,33 ^{Ab}	62,22 ± 36,63 ^{Ac}	80,91 ± 7,23 ^{Ac}	93,62 ± 6,70 ^{Aa}
PCS 2% CHX	8,26 ± 0,36 ^{Ab}	61,42 ± 31,62 ^{Ac}	79,69 ± 7,95 ^{Ac}	87,40 ± 11,22 ^{Aa}
PCS 5% CHX	7,65 ± 0,40 ^{Aa}	41,12 ± 43,65 ^{Bc}	72 ± 22,68 ^{ABb}	86,46 ± 12,28 ^{Ac}

Legenda: Resultados correspondentes à média e desvio padrão da análise, expressos em porcentagens de células viáveis. As letras maiúsculas sobrescritas representam diferença estatisticamente significante entre o mesmo grupo de cimento endodôntico em diferentes concentrações de incorporação de NPs CHX-HMP sob a mesma diluição. As letras minúsculas sobrescritas representam diferença estatisticamente significante entre grupos de cimentos endodônticos diferentes, mas sob mesma concentração de incorporação das NPs CX-HMP e mesma diluição.

Fonte: A autora, 2019

4.3 Análises físico-químicas das nanopartículas de clorexidina-hexametafosfato

4.3.1 Escoamento

Todos os materiais analisados apresentaram resultados acima de 17 mm de diâmetro, valor mínimo preconizado pela norma ISO 6876:2012 (Tabela 4).

O MTA Fillapex apresentou escoamento estatisticamente superior ao AH Plus e ao PCS ($P < 0,05$), que não diferiram quanto ao escoamento entre si ($P > 0,05$). Observa-se que quanto maior a concentração das NPs incorporadas, menor o escoamento dos materiais. No entanto, todos se mantiveram de acordo com as normas preconizadas.

Tabela 5 – Valores correspondentes à média e desvio padrão dos diâmetros dos cimentos endodônticos nas análises do escoamento

Materiais	Original	2%	5%
AH	23,7 ± 0,64 ^{Aa}	21,84 ± 0,44 ^{Ba}	21,14 ± 0,19 ^{Ba}
MTA	31,78 ± 0,26 ^{Ab}	25,12 ± 0,61 ^{Bb}	23,06 ± 0,61 ^{Cb}
PCS	24,4 ± 0,52 ^{Aa}	23,3 ± 0,41 ^{Bc}	20,7 ± 0,41 ^{Ca}

Legenda: Resultados expressos em mm. Letras maiúsculas diferentes sobrescritas representam diferença estatística significativa entre os grupos do mesmo cimento endodôntico, e letras minúsculas diferentes sobrescritas representam diferença estatisticamente significante nos grupos sob mesma concentração.

Fonte: A autora, 2019

4.3.2 Radiopacidade

Os resultados obtidos na análise de radiopacidade foram apresentados na Tabela 5. De acordo com a ISO 6876:2012, os cimentos endodônticos devem apresentar radiopacidade equivalente a no mínimo 3 mm de Al.

Após análise estatística dos resultados, constatou-se que não houve diferença estatisticamente significativa nos respectivos grupos de cimentos após a incorporação das NPs ($P>0,05$). Além disso, não houve diferença estatisticamente significativa entre o AH Plus e o PCS ($P>0,05$), ambos superiores ao MTA Fillapex ($P<0,05$). O MTA Fillapex apresentou resultado ligeiramente aquém ao valor mínimo preconizado pela norma supracitada.

Tabela 6 – Valores correspondentes à média e desvio padrão das análises de radiopacidade

Materiais	Original	2%	5%
AH	9,09 ± 0,11 ^{Aa}	9,09 ± 0,21 ^{Aa}	9,08 ± 0,25 ^{Aa}
MTA	2,98 ± 0,12 ^{Bb}	2,98 ± 0,13 ^{Bb}	2,97 ± 0,18 ^{Bb}
PCS	9,3 ± 0,22 ^{Ca}	9,29 ± 0,18 ^{Ca}	9,1 ± 0,18 ^{Ca}

Legenda: Resultados expressos em mm de Al. Letras maiúsculas diferentes sobscritas representam diferença estatística significativa entre os grupos do mesmo cimento endodôntico, e letras minúsculas diferentes sobscritas representam diferença estatisticamente significativa nos grupos sob mesma concentração.

Fonte: A autora, 2019

4.3.3 Solubilidade

Os resultados obtidos na análise de solubilidade, expressos em % de massa adquirida ou perdida, evidenciam por meio de comparação que o cimento endodôntico MTA Fillapex apresentou maior solubilidade, seguido pelo PCS e AH Plus (Tabela 7). De acordo com o requisito estabelecido na ISO 6876:2012, os cimentos endodônticos não podem exceder 3% de perda de sua massa após a análise da solubilidade, no entanto o MTA Fillapex não adequa-se à norma preconizada, excedendo os limites estabelecidos nos dois períodos de imersão

estabelecidos, tanto na forma não-modificada comercializada quanto após a incorporação de NPs CHX-HMP.

Observa-se uma correlação positiva entre o período de imersão das amostras e a solubilidade das amostras. Quanto à incorporação das NPs CHX-HMP verifica-se que com o aumento da concentração da incorporação, houve a redução da solubilidade das amostras em ambos os períodos de imersão, com exceção do grupo do cimento AH Plus, no qual a incorporação das NPs CHX-HMP não alterou a solubilidade das amostras.

Tabela 7 - Representação da média e desvio padrão das análises da solubilidade

	24 h			7 dias		
	Original	2%	5%	Original	2%	5%
AH	0,1 ± 0,00 ^{Aa}	0,08 ± 0,00 ^{Ab}	0,08 ± 0,00 ^{Ab}	0,32 ± 0,01 ^{Aa}	0,32 ± 0,01 ^{Aa}	0,32 ± 0,00 ^{Aa}
MTA	7,3 ± 0,33 ^{Ba}	5,7 ± 0,05 ^{Bb}	4,4 ± 0,03 ^{Bc}	17,7 ± 0,41 ^{Ba}	13,9 ± 0,57 ^{Bb}	13,7 ± 0,15 ^{Bb}
PCS	0,49 ± 0,00 ^{Ca}	0,43 ± 0,01 ^{Cb}	0,42 ± 0,01 ^{Cb}	1,14 ± 0,05 ^{Ca}	1,05 ± 0,00 ^{Ca}	1,04 ± 0,02 ^{Ca}

Legenda: Resultados expressos em % da massa perdida dos materiais. Letras maiúsculas sobrescritas representam diferenças estatísticas entre os grupos de cimentos endodônticos sob mesma concentração. Letras minúsculas sobrescritas representam diferenças estatísticas entre o mesmo grupo de cimentos endodônticos sob diferentes concentrações.

Fonte: A autora, 2019.

4.3.4 pH

Segundo a análise do pH das amostras avaliadas, observa-se na Tabela 8, que a incorporação das NPs nas diferentes concentrações não alteraram, de forma significativa estatisticamente, o pH dos cimentos endodônticos nos diferentes períodos de tempo de imersão no qual foram analisados, com exceção das amostras: MTA 5% CHX, PCS 2% CHX e 5 % CHX após 3h de imersão. Denota-se em todas as amostras avaliadas, um decréscimo do valor do pH com a progressão do tempo de imersão e armazenamento.

Tabela 8 – Resultados das análises do pH nos diferentes períodos de tempo

	3h	24h	48h	72h	7d
AH	7,05 ± 0,03 ^{Aa}	7 ± 0,02 ^{Aa}	7,02 ± 0,09 ^{Aa}	6,94 ± 0,10 ^{Aa}	6,74 ± 0,07 ^{Ba}
AH 2% CHX	7,04 ± 0,02 ^{Aa}	7,01 ± 0,02 ^{Aa}	7,13 ± 0,30 ^{Aa}	7,12 ± 0,27 ^{Aa}	6,84 ± 0,07 ^{Ba}
AH 5% CHX	7,12 ± 0,05 ^{Aa}	7,02 ± 0,02 ^{Aa}	6,9 ± 0,06 ^{Aa}	6,99 ± 0,16 ^{Aa}	6,76 ± 0,08 ^{Ba}
MTA	8,35 ± 0,22 ^{Aa}	7,79 ± 0,30 ^{Ba}	7,19 ± 0,05 ^{Ca}	6,83 ± 0,11 ^{Da}	6,79 ± 0,09 ^{Da}
MTA 2% CHX	8,24 ± 0,17 ^{Aa}	7,65 ± 0,39 ^{Ba}	7,18 ± 0,12 ^{Ca}	7,01 ± 0,03 ^{Cb}	6,88 ± 0,09 ^{Ca}
MTA 5% CHX	7,67 ± 0,25 ^{Ab}	7,40 ± 0,24 ^{Bb}	7,04 ± 0,10 ^{Cb}	7 ± 0,12 ^{Cb}	6,72 ± 0,13 ^{Da}
PCS	7,08 ± 0,04 ^{Aa}	7,04 ± 0,05 ^{Aa}	7,06 ± 0,06 ^{Aa}	6,86 ± 0,05 ^{Ba}	6,75 ± 0,09 ^{Ba}
PCS 2% CHX	7,35 ± 0,03 ^{Ab}	7,13 ± 0,07 ^{ABb}	6,99 ± 0,01 ^{BCa}	6,88 ± 0,20 ^{CDa}	6,72 ± 0,06 ^{Da}
PCS 5% CHX	7,22 ± 0,04 ^{Ab}	7,14 ± 0,05 ^{ABb}	6,99 ± 0,02 ^{BCa}	6,89 ± 0,11 ^{CDa}	6,57 ± 0,06 ^{Db}

Legenda: Representação dos valores da média e desvio padrão das amostras. As letras sobrescritas maiúsculas diferentes representam diferença estatisticamente significativa entre os diferentes tempos de avaliação do mesmo cimento endodôntico sob mesma concentração. As letras sobrescritas minúsculas diferentes representam diferença estatisticamente significativa no mesmo período de avaliação dos cimentos endodônticos do mesmo grupo nas diferentes concentrações de NPs.

Fonte: A autora, 2019.

4.3.5 Tempo de presa

Os resultados das médias e desvios padrões da análise do tempo de presa, assim como o tempo de presa determinado pelos respectivos fabricantes estão descritos na Tabela 9. Não há determinação dos fabricantes quanto ao tempo de presa do PCS e MTA Fillapex, ambos os cimentos endodônticos possuem determinação apenas do tempo de trabalho: maior que 6h e 23 min, respectivamente.

A ISO 6876:2012 preconiza que os cimentos endodônticos que possuem tempo de presa estabelecidos pelo fabricante de até 30 min, não devem ultrapassar 10% do tempo referido, enquanto os cimentos endodônticos que possuem tempo de presa maior que 30 min e até 72 h, para os quais o fabricante cite um intervalo de tempo, o tempo de presa deverá estar dentro deste intervalo previsto.

Tabela 9 – Resultados correspondentes à média e desvio padrão das análises do tempo de presa

	Original	2%	5%	Tempo do fabricante
AH	676±5 ^A	703±5 ^B	713±9 ^B	Até 24h
MTA	*	*	*	-
PCS	73±5 ^A	76±5 ^A	80±0 ^A	-

Legenda: Resultados expressos em min. Letras maiúsculas diferentes sobrescritas representam diferença estatística significativa entre os grupos do mesmo cimento endodôntico. O tempo do respectivos fabricantes foram verificados em: Dentsply (<http://www.dentsply.com.br>), Angelus (<http://www.angelus.ind.br>) e Kerr (www.kerrdental.com).

Fonte: A autora, 2019

O cimento MTA Fillapex não alcançou a presa, apresentando edentações sob a análise mesmo após longos períodos de tempo, deste modo seu tempo não foi determinado. O AH Plus apresentou tempo de presa excessivamente reduzido em relação ao tempo estabelecido pelo respectivo fabricante. O tempo de presa do AH Plus foi maior que o do PCS, e após a incorporação de NPs CHX-HMP, o cimento AH Plus teve o tempo de presa aumentado de forma estatisticamente significativa ($P < 0,05$), enquanto o PCS não apresentou alteração estatisticamente significativa ($P > 0,05$).

5 DISCUSSÃO

Os cimentos endodônticos apresentam uma diminuição da atividade antimicrobiana após a manipulação, no decorrer do tempo. A redução desta atividade ocorre de modo progressivo até a cessação, subseqüentemente à presa do material (ORSTAVIK, 1981; SIQUEIRA et al., 2000). Em decorrência disso, estudos surgiram promovendo modificações nas composições destes materiais, incorporando agentes antimicrobianos no intuito de melhorar a performance antimicrobiana e prolongar esta atividade, assim contribuindo para a máxima desinfecção do SCR, e combate de microrganismos que persistam ao PQM (BARROS et al., 2014a; DEL CARPIO-PEROCHENA et al., 2015; KESLER SHVERO et al., 2013).

Sob o aspecto da incorporação de agentes antimicrobianos aos cimentos endodônticos, a aplicação das NPs possibilita maior ação antibacteriana em relação aos respectivos compostos em apresentações convencionais (SHRESTHA; KISHEN, 2016). Devido as suas dimensões reduzidas, as NPs apresentam maior grau dispersão e maior área de superfície. Deste modo, podem exibir diferenciados fenômenos físicos, químicos e biológicos, além de obter propriedades ópticas e magnéticas (QUINA, 2004; WATTS; MAROUF; AL-HINDI, 2003; ZHANG; WEBSTER, 2009). Diante destas características, as NPs favorecem a interação do agente antimicrobiano com as superfícies dos microrganismos (KISHEN et al., 2008).

Diversos fatores devem ser investigados a respeito do processo de incorporação de antimicrobianos aos cimentos endodônticos, inicialmente é fundamental a confirmação quanto o aprimoramento da performance antimicrobiana, contudo sem interferir na biocompatibilidade do material. Diante disso, torna-se imprescindível a avaliação dos possíveis impactos da incorporação das NPs nas propriedades físicas, químicas, mecânicas dos cimentos endodônticos, visto que estes materiais devem ter mantidas e preservadas suas propriedades a fim de exercerem um adequado desempenho na obturação do SCR.

Em razão dos resultados positivos demonstrados por estudos prévios, quanto à aplicação das NPs CHX-HMP à diversos materiais (BARBOUR et al., 2013; 2016; BELLIS et al., 2016; 2018; GARNER et al., 2015; GARNER; BARBOUR, 2015; HOOK et al., 2014; WOOD et al., 2014; 2015), realizou-se a incorporação das NPs a 2 e 5 %, em peso, aos cimentos endodônticos: AH Plus, MTA Fillapex e PCS. As porcentagens de incorporação das NPs CHX-HMP foram estabelecidas sem exceder o valor de 5% em peso, visto que a

realização de tentativas de incorporações de porcentagens maiores, implicaram em alterações macroscópicas nas propriedades físicas, gerando visível friabilidade, alteração da textura e da umidade do material, que prejudicaram a manipulação dos materiais propostos.

Após a síntese das NPs, o processo de caracterização das NPs CHX-HMP foi conduzido com a análise química elementar por EDS, concomitantemente à análise por MEV. Dentre as vantagens da análise por EDS, consiste o rápido levantamento da composição geral da amostra, no qual todos os elementos químicos são contabilizados simultaneamente (MANNHEIMER, 2002). As amostras das NPs apresentaram componentes químicos oriundos de ambos os compostos utilizados na síntese (digluconato de CHX e HMP), confirmando a interação destes compostos na síntese da NPs. No entanto, constatou-se a presença dos seguintes contaminantes: Au, Cu, Fe e Zn, oriundos possivelmente de contaminações das amostras durante a síntese, ou na própria análise por EDS. Outras limitações podem estar atreladas à análise por EDS, como irregularidades na superfície da amostra que podem interferir na interação dos elétrons e na propagação dos raios-X. Além disso, elementos químicos que possuam número atômico e fração de massa reduzida podem não ser identificados gerando distorções nos resultados.

Seguidamente, a avaliação por MEV das NPs CHX-HMP demonstrou agregados nanoparticulados de diversas proporções, confirmando a tendência à formação de aglomerados das NPs. Após a incorporação destas aos cimentos endodônticos, evidenciou-se superfícies uniformes, nas quais não era possível distinguir a presença das NPs das matrizes dos cimentos endodônticos aos quais foram incorporadas. A visualização das NPs por MEV apresenta correlação direta ao método com o qual foram aplicadas aos materiais avaliados. Os estudos que realizaram a imersão das amostras em suspensões das NPs CHX-HMP, geraram imagens em que era possível evidenciar a presença das NPs nas superfícies das amostras, caracterizando deste modo o recobrimento do material (BARBOUR et al., 2013; GARNER et al., 2015; GARNER; BARBOUR, 2015; WOOD et al., 2014). No entanto, estudos que submeteram os materiais testados à incorporação das NPs, como HOOK et al. (2014), apresentaram imagens congruentes com o presente estudo.

As NPs CHX-HMP foram mensuradas inicialmente por DLS, que afere as partículas quanto à distribuição, e de acordo com a área, volume, quantidade e intensidade da reflexão de luz das partículas contidas em uma suspensão (CASANOVA, 2010). Esta metodologia baseia-se no movimento Browniano e no espalhamento de luz. A emissão do laser gera o espalhamento da radiação pelas partículas em todas as direções, com intensidades diferentes de acordo com seu tamanho. Quando suspensas em um meio líquido, as partículas não

apresentam caráter estacionário, estão em constante movimento. Este movimento denominado Browniano, ocorre pelo constante bombardeamento de moléculas do solvente, que movem-se devido a sua energia térmica (CAPUTO et al., 2019; NEVES, 2013). Deste modo, pequenas partículas movem-se rapidamente e grandes partículas movem-se mais lentamente.

Devido as flutuações de intensidade da luz espalhada, o correlacionador digital avalia o grau de semelhança dos sinais de intensidade de luz espalhada ao longo do tempo, obtendo-se o coeficiente de difusão. Desta forma, é estabelecida a distribuição de tamanho das partículas (BEZEM, 2012; CAPUTO et al., 2019). De acordo com a análise por DLS, constatou-se que as NPs CHX-HMP apresentaram tamanho médio de 169,39 nm ($\pm 137,20$ nm), estando este resultado em acordância com análises prévias que observaram valores entre 140 e 200 nm (HOOK et al., 2014; WOOD et al., 2014). Há um desvio padrão elevado identificado nos estudos que utilizaram o DLS. Tal fato pode estar relacionado à tendência das NPs formarem agregados, e assim simularem o comportamento de partículas maiores. Idealmente, a análise por DLS requer partículas homogêneas e de uniforme distribuição na suspensão coloidal (BEZEM, 2012).

Algumas limitações são relatadas quanto ao DLS, como a sensibilidade à poeira e contaminantes, que podem ser incluídos nas aferições e desviar a luz emitida, assim como a impossibilidade de avaliar materiais que absorvam o mesmo comprimento de onda do laser. Quanto ao formato das partículas, podem ocorrer alterações nas aferições. Tendo em vista que uma esfera é o único objeto geométrico descrito por um único número, as partículas de formato não-esférico, serão representadas pelo diâmetro de uma esfera equivalente, ou seja, que tenha o mesmo coeficiente de difusão translacional médio da partícula examinada, o que ainda assim pode exacerbar os resultados.

A presença de agregados na análise por DLS pode elevar a média do resultado dos tamanhos das partículas, pois simulam partículas grandes que dispersam mais luz (a dispersão de luz da partícula é proporcional à sexta potência do seu diâmetro), e assim mascaram a presença de partículas menores (CAPUTO et al., 2019 ; HOOK et al., 2014). Ainda assim, o DLS é vastamente utilizado para checagem inicial de amostras em função da praticidade e baixo custo de execução (CAPUTO et al., 2019).

Conjuntamente à análise por DLS, foi aferido o potencial zeta das NPs, obtendo-se o valor -10,18 mV. O valor negativo determina o caráter aniônico das NPs, assim como foi observado nos estudos de Barbour et al. (2013), Wood et al. (2014) e Hook et al. (2014). No entanto, o resultado apresentou módulo menor em relação aos estudos prévios citados. Ressalta-se que o valor do potencial zeta não correlaciona-se somente à superfície das

partículas analisadas, mas também às características do meio: natureza, composição, princípio ativo, ação dos componentes da formulação, condutividade entre suas cargas e força iônica. Desta forma, as cargas das partículas podem assumir um valor positivo ou negativo, assim como podem apresentar módulos elevados ou reduzidos, de acordo com a variação dos parâmetros e condições experimentais (SCHAFFAZICK et al., 2003).

O potencial permite a verificação da estabilidade físico-química de uma suspensão coloidal. O valor reduzido do módulo do potencial zeta caracterizado neste estudo indica alta instabilidade da suspensão (BHATTACHARJEE, 2016), justificando desta forma a existência de agregados de NPs, visto que o potencial zeta reduzido gera atração eletrostática entre as NPs, assim como a possível dissociação dos agentes e liberação de CHX no meio.

Posteriormente, as NPs CHX-HMP foram submetidas à análise por AFM, na qual as estruturas foram visualizadas individualmente. Esta técnica integra a classe de microscopia de varredura por sonda, que apresenta vantagens como o seu caráter não-destrutivo, a alta resolução espacial, além de não necessitar de vácuo para execução, o que permite sua atuação frente a superfícies de diferentes naturezas e em diversos meios.

Em função destas vantagens, a AFM possui alta aplicabilidade no âmbito científico, por permitir a varredura de uma superfície por meio de sondas de dimensões bastante reduzidas, que atuam a distâncias muito pequenas (da ordem de alguns Å) das amostras, e proporciona uma análise morfológica das superfícies das NPs. Deste modo, são obtidas informações tridimensionais de alta resolução em escala nanométrica (BEZEM, 2012; BINNIG; QUATE; GERBER, 1986). Através desta técnica, as NPs-CHX apresentaram dimensões entre 22,99 e 52,75 nm, tamanhos ligeiramente reduzidos comparativamente aos estudos prévios que observaram: 40 a 80 nm (WOOD et al., 2014), 80 a 90 nm (HOOK et al., 2014) e 20 a 160 nm (BARBOUR et al., 2013). No entanto, é sabido que o método de síntese e preparo das NPs são fatores determinantes no diâmetro médio e na polidispersão apresentado pela partículas (SCHAFFAZICK et al., 2003), o que pode gerar distorções dos resultados.

Findo o processo de síntese e caracterização, as NPs CHX-HMP foram submetidas ao teste de difusão em ágar frente ao *E. faecalis* como análise preliminar da atividade antibacteriana. Sob análise isoladamente, as NPs apresentaram halo de inibição superior ao NaOCl a 2,5%, utilizado como controle positivo, comprovando a ação antibacteriana. Observou-se que o MTA Fillapex não apresentou atividade antibacteriana, somente após a incorporação das NPs de forma dose-dependente. No entanto, o AH Plus e PCS não apresentaram aumento da atividade antibacteriana com a modificação dos cimentos. Esses

resultados apresentam-se alinhados com Poggio et al. (2017), quanto ao comportamento do AH Plus e MTA Fillapex.

Todavia, ressalta-se que o teste de difusão em ágar apresenta significativas limitações, as quais ocasionaram o desuso desta análise, que fundamenta-se na difusibilidade do material analisado no meio de cultura (TOBIAS, 1988). Tal fato inadequa-se à avaliação de materiais que devem ser essencialmente insolúveis. Além disto, o teste de difusão em ágar não permite a diferenciação dos efeitos bactericidas dos bacteriostáticos (BARROS et al., 2014a). Por esta razão, a análise por DCT foi realizada seguidamente para avaliar e apurar o comportamento antibacteriano das amostras.

O DCT, introduzido por Weiss, Shalhav e Fuss (1996), avalia quantitativamente as propriedades antibacterianas da superfície das amostras e determina o crescimento bacteriano após o contato direto com estas superfícies de forma fidedigna, por simular o contato da bactéria com o material no ambiente clínico (BARROS et al., 2014a; WEISS; SHALHAV; FUSS, 1996; ZHANG et al., 2009). As modificações metodológicas instituídas por Zhang et al. 2009 e Barros et al. 2014a foram reproduzidas neste estudo, realizando-se as contagens das UFCs, a fim de verificar microrganismos sobreviventes e avaliar o caráter bactericida das amostras, diferentemente das análises que preconizam o uso da densidade óptica para avaliação dos resultados, visto que podem sofrer influência da liberação de partículas dos cimentos endodônticos (SEIL; WEBSTER, 2012).

O presente estudo demonstrou após a análise por DCT, que entre os diferentes grupos de amostras, ocorreu a potencialização e prolongamento da atividade antibacteriana após a incorporação das NPs CHX-HMP frente as cepas de *E. faecalis*. Este patógeno foi preconizado na análise devido sua resistência a diversas substâncias utilizadas em endodontia e a associação aos quadros de periodontite apical pós-tratamento (STUART et al., 2006; SUNDQVIST et al., 1998). A análise dos cimentos frescos demonstrou que o AH Plus e PCS promoveram inibição total das cepas independentemente da presença da NPs CHX-HMP. No entanto, o MTA Fillapex não apresentou atividade antibacteriana significativa, somente após a incorporação das NPs, eliminando completamente as cepas. Após 7 e 30 dias, evidenciou-se na análise que todos os cimentos endodônticos não-modificados apresentaram redução significativa da atividade antimicrobiana, enquanto as amostras submetidas à incorporação das NPs apresentaram um aumento significativo desta atividade. A eliminação total das cepas foi observada no MTA Fillapex submetido à incorporação de 5% das NPs, tal fato foi constatado em todos os períodos de armazenamento testados, confirmando a eficácia e o

prolongamento da ação antibacteriana, que apresentou efetividade no período de 30 dias após a manipulação do material.

Os resultados obtidos no DCT quanto aos cimentos endodônticos não-modificados apresentaram-se alinhados a estudos prévios (GONG et al., 2014; JAFARI et al., 2016; KAPRALOS et al., 2018; MORGENTAL et al., 2011; POGGIO et al., 2017; ZHANG et al., 2009). Os cimentos endodônticos frescos geralmente promovem ação antibacteriana devido a liberação de componentes antibacterianos não fixados ao material no meio circundante (BARROS et al., 2014a), entretanto após a presa, ocorre uma diminuição significativa desta atividade, tal fato foi vastamente discutido cientificamente (BARROS et al., 2014a, ORSTAVIK, 1981; PIZZO et al., 2006; SIQUEIRA et al., 2000). Esta redução da atividade antibacteriana pode ser atribuída aos agentes antimicrobianos que podem ter sido parcialmente liberados após eluição no meio, e os agentes remanescentes podem estar inseridos na matriz do material de tal forma que não sofrem liberação.

Quanto às peculiaridades da ação antibacteriana dos cimentos, observa-se que o AH Plus apresenta discreta liberação de formaldeído durante a presa, além de possuir na sua composição o éter de bisfenol A diglicidil, gerando efeito antimicrobiano significativo no período da presa do material (BREZHNEV et al., 2019; LEONARDO et al., 1999). A incorporação das NPs CHX-HMP não apresentou resultados expressivos, apresentando aumentos pontuais da atividade antibacteriana, tal fato também foi constatado em relação a incorporação das NPs de compostos quaternários de amônia (BARROS et al., 2014a). Especula-se que tal fato pode estar relacionado à interferência de outros componentes químicos do AH Plus afetando a disponibilidade do agente antimicrobiano no meio (BARROS et al., 2014b), possivelmente os relatos podem ser atribuídos à matriz resinosa deste material, que devido à reduzida solubilidade (DUARTE et al., 2010; VERSIANI et al., 2006), pode conseqüentemente gerar menor liberação de agente antimicrobiano no meio circundante.

No caso do PCS, a atividade antimicrobiana é atribuída a presença de eugenol (HAUMAN; LOVE et al., 2003), e ainda ao óxido de zinco e o pó de prata presentes na composição da PCS que contribuem nesta ação. Este material foi amplamente discutido quanto a atividade antibacteriana pronunciada (ALSHWAIMI et al., 2016). Todavia os resultados prévios confirmam a eficiência antibacteriana deste material em seu estado recém-manipulado, e assim como os demais materiais analisados, esta capacidade bactericida é perdida após a presa (BARROS et al., 2014a; PIZZO et al., 2006).

Dentre os cimentos endodônticos testados, o MTA Fillapex apresentou os resultados mais expressivos após a incorporação das NPs CHX-HMP. A atividade antibacteriana deste material é oriunda da dissociação deste material em íons cálcio e íons hidroxila, que estabelecem um pH alcalino (VITTI et al., 2013). Esta dissociação pode estar associada ao melhor desempenho antibacteriano após a incorporação de NPs, visto que em decorrência da liberação dos íons cálcio e hidroxila, pode ocorrer simultaneamente a liberação da CHX, em função da solubilidade deste material (FARIA-JÚNIOR et al., 2013; SILVA et al., 2016).

Os resultados observados quanto à atividade antibacteriana dos cimentos endodônticos submetidos à incorporação das NPs após 30 dias de armazenamento, apresentam correlação com a dissolução lenta gradual das NPs CHX-HMP, que promovem a liberação contínua e prolongada de CHX, assim como explicitado em estudos prévios (BARBOUR et al., 2013; WOOD et al., 2014). No entanto, a ação da CHX torna-se proporcional à eluição e liberação no meio circundante pelos cimentos endodônticos aos quais foram incorporadas, estando a sua atuação dependente da composição e comportamento destes materiais.

Um aspecto relevante quanto à incorporação das NPs CHX-HMP refere-se a biocompatibilidade, haja vista o comportamento citotóxico da CHX relatado cientificamente. Babich et al. (1995) relataram que a citotoxicidade da CHX sobre as células epiteliais gengivais, depende de fatores como a duração da exposição e a composição do meio. A adição de componentes como soro bovino, albumina e lecitina diminuíram a citotoxicidade da CHX, provavelmente em decorrência da ligação do grupo catiônico da CHX às porções químicas carregadas negativamente dos componentes adicionados e de superfícies de bactérias. Esta constatação respaldou a utilização da CHX no SCR, visto que diante dos substratos, a CHX pode apresentar aceitável biocompatibilidade (BOYCE; WARDEN; HOLDER, 1995).

Quanto à biocompatibilidade, a análise deste aspecto demonstrou que independentemente da incorporação das NPs CHX-HMP, os cimentos endodônticos apresentam elevada citotoxicidade. Estes resultados corroboram com estudos prévios, que constataram a citotoxicidade do PCS, MTA Fillapex e AH Plus sobre células do ligamento periodontal humano (JUNG et al., 2019) e osteoblastos humanos (JUNG et al., 2018; SCELZA et al., 2011). Após a incorporação das NPs-CHX verifica-se as alterações da citotoxicidade entre os cimentos endodônticos com diferentes expressões, no AH Plus ocorreu o aumento predominantemente associado às incorporações de 5% das NPs CHX-HMP. O PCS apresentou aumento da citotoxicidade de forma pontual, apenas na diluição

1:2, 1:4, também associado à incorporação de 5% das NPs CHX-HMP. Enquanto o MTA Fillapex apenas na diluição 1:8.

A redução da expressão citotóxica da CHX quando associada às NPs, foi observada por Barbour et al. (2016) e Bellis et al. (2016). Comparativamente, outros veículos de CHX como o digluconato e o diacetato promovem uma alta liberação inicial de CHX decorrente da rápida solubilização e dispersão no meio, e em seguida há uma redução brusca ou interrupção desta liberação, o que justifica a elevada citotoxicidade apresentada. Contrariamente, as NPs CHX-HMP sofrem menor solubilidade, consequentemente a partir desta dissolução gradual ocorre a liberação contínua e prolongada de CHX ocasionando menor citotoxicidade (BARBOUR et al., 2013; 2016; WOOD et al., 2014).

As propriedades físico-químicas dos cimentos endodônticos devem ser analisadas de acordo com metodologias padronizadas. Essencialmente, estes protocolos devem ser obedecidos a fim de obter resultados reprodutíveis e confiáveis, tendo em vista a necessidade de comparação com resultados de estudos prévios. Deste modo, preconizou-se os critérios da norma ISO 6876:2012 para padronização das análises deste estudo.

Quanto ao escoamento das amostras, observou-se que houve a redução do escoamento das amostras, conforme houve o aumento da incorporação das NPs. Apesar disto, todos os materiais analisados mantiveram-se de acordo com a norma ISO 6876:2012, que preconiza o valor mínimo de escoamento de 17 mm. Destaca-se que o escoamento de um cimento endodôntico consiste na sua capacidade de penetrar em irregularidades, ramificações do SCR e túbulos dentinários. Quanto maior a fluidez do material, maior será sua capacidade de penetração (WU; VAN; WESSELINK, 2000). No entanto, o escoamento exacerbado pode promover o extravasamento do material para os tecidos perirradiculares (VIAPIANA et al., 2013).

Dentre os materiais analisados, o MTA Fillapex apresentou maior escoamento tanto sob a forma não-modificada quanto após a incorporação das NPs, comparativamente às suas contrapartes. Estes resultados apresentam-se alinhados com Faraoni et al. (2013) e Lee et al. (2017), que demonstraram desempenho superior do MTA Fillapex em relação ao AH Plus. Verificou-se discordância com os resultados expostos por Vitti et al. (2013) e Shakya et al. 2016, que relatam maior escoamento atribuído ao AH Plus. Uma possível justificativa para a divergência entre os resultados pode ser atribuída às diferentes consistências do AH Plus dentro de uma mesma embalagem. Tal fato pode ocasionar alterações em suas propriedades físico-químicas, como o escoamento, radiopacidade e tempo de presa (BALDI et al., 2012). Observou-se no estudo de BARROS et al. (2014a), que também houve redução do

escoamento dos cimentos endodônticos PCS e AH Plus, após incorporação de NPs de compostos quaternários de amônio, e assim como o presente estudo, apesar desta redução não houve o comprometimento desta propriedade.

Com relação à radiopacidade, nenhuma amostra sofreu alterações em razão da incorporação das NPs, todavia o MTA Fillapex independentemente da presença das NPs, apresentou radiopacidade aquém ao valor de 3 mm de Al, limite mínimo estabelecido pela ISO 6876:2012. Essencialmente, os cimentos endodônticos devem apresentar um grau mínimo de radiopacidade a fim de agregar radiopacidade ao material sólido associado, e assim sejam claramente visíveis nas radiografias, possibilitando a avaliação da qualidade da obturação do SCR e identificação de possíveis falhas (BAKSI AKDENIZ et al., 2007).

A reduzida radiopacidade do MTA Fillapex foi descrita por Lee et al. (2017). Segundo Vitti et al. (2013), os diferentes radiopacificadores presentes nos cimentos endodônticos, podem gerar as diferenças de radiopacidade. Observa-se o óxido de zircônio e tungstato de cálcio como radiopacificadores no AH Plus, e a prata associada ao óxido de zinco no PCS (BAKSI AKDENIZ et al., 2007; SILVA et al., 2013). O MTA Fillapex recentemente apresentou uma substituição do óxido de bismuto pelo tungstato de cálcio, pois estudos relataram que o óxido de bismuto interferia na hidratação deste material (CAMILLERI, 2007), ocasionando prejuízos as suas propriedades mecânicas (COOMARASWAMY; LUMLEY; HOFMANN, 2007). Além disso, a presença de possíveis resíduos de NaOCl no SCR podem reagir com óxido de bismuto, resultando em um precipitado que promovia o escurecimento da estrutura dentária (CAMILLERI, 2014; MARCIANO; DUARTE; CAMILLERI, 2015). Esta substituição pode estar associada às divergências de resultados em relação aos estudos prévios (BORGES et al., 2014; SILVA et al., 2013).

A insolubilidade é um dos fatores físicos mais requeridos quanto às propriedades dos cimentos endodônticos (ORSTAVIK; NORDHAL; TIBBALS, 2001), posto que a degradação destes materiais pode impactar negativamente na taxa de sucesso do tratamento do SCR, ao passo que podem surgir lacunas na interface entre o cimento endodôntico e a dentina, ou na interface com a guta-percha, propiciando a invasão de microrganismos e seus produtos tóxicos para o tecidos perirradiculares (ORSTAVIK; NORDHAL; TIBBALS, 2001; SILVA et al., 2017). Além deste aspecto, a dissolução dos cimentos endodônticos pode propiciar a liberação de componentes químicos que podem aumentar a citotoxicidade ao atingirem os tecidos perirradiculares (SILVA et al., 2016).

O presente estudo constatou que quanto maior o tempo de imersão, maior a solubilidade das amostras. Observa-se que o MTA Fillapex, independentemente da presença

das NPs CHX-HMP, excede o valor máximo de 3% de perda de massa, determinado pela norma ISO 6876:2012. Verifica-se que após a incorporação das NPs, houve um decréscimo da solubilidade das amostras, principalmente no MTA Fillapex, ao qual ocasionaram uma redução significativa.

Uma possível justificativa para esta diminuição da solubilidade após a incorporação da NPs, pode estar relacionada à sua alta reatividade, descrita por Shrestha e Kishen et al. (2016), com isso podem teoricamente tornar a microestrutura do cimento endodôntico mais densa e menos suscetível à degradação. No entanto, estudos são necessários a fim de avaliar a estrutura do material e confirmar esta hipótese. Quanto às NPs CHX-HMP, o mecanismo de adesão desses compostos não foi totalmente elucidado, mas acredita-se que possua natureza física, posto que há adesão das NPs a diversos substratos, independentemente das propriedades da superfície e dos grupos funcionais disponíveis nas amostras (WOOD et al., 2014).

As NPs CHX-HMP são pouco solúveis, o que pode ter implicado na redução da solubilidade dos cimentos endodônticos. Garner et al. (2015) demonstraram que mesmo após 112 dias de imersão das amostras à base de silicone em saliva, a análise por microscopia eletrônica de varredura, constatou que o recobrimento pelas NPs CHX-HMP permanecia sobre as amostras, o que também foi descrito por Wood et al. (2015), que menciona a presença das NPs CHX-HMP, visualizadas com auxílio da microscopia de força atômica sobre a superfície de titânio mesmo após a imersão das amostras em água deionizada por 95 dias.

Os resultados obtidos neste estudo quanto a solubilidade das amostras apresentaram acordância com o estudo de Borges et al. (2012), que avaliaram a solubilidade do MTA Fillapex comparativamente ao AH Plus, e constataram a alta solubilidade do MTA Fillapex que excedeu o valor máximo estabelecido de 3%, apresentando 14,89%. Viapiana et al. 2013 observaram perda de massa de 14,94% do MTA Fillapex após 7 dias de imersão, e Faria-Júnior et al. (2013) descreveram 15,03% após 7 dias de imersão. No entanto, o PCS e o AH Plus apresentaram baixa solubilidade, este último devido às ligações cruzadas presentes em sua estrutura (BORGES et al., 2012). Resultados similares sobre o AH e PCS também foram descritos por diversos estudos (BORGES et al., 2012; POGGIO et al., 2017; VITTI et al., 2013; ZHOU et al., 2013). Alguns estudos apresentam discordância quanto ao MTA Fillapex, mencionando uma baixa solubilidade deste material (VITTI et al., 2013; ZHOU et al., 2013). Esta discrepância entre os resultados dos estudos pode ser atribuída a variações nos métodos utilizados na secagem das amostras após a imersão (COLOMBO et al., 2018).

Outro aspecto relevante são as alterações de pH dos cimentos endodônticos que relacionam-se aos efeitos antimicrobianos e potencial osteogênico, desempenhando um papel importante no processo de cicatrização (MCHUGH et al., 2004; OKABE et al., 2006). Este estudo constatou que todas as amostras sofreram diminuição do pH ao longo dos 7 dias de imersão, independentemente da presença das NPs CHX-HMP. Observou-se um pH neutro associado às amostras não-modificadas do PCS e AH Plus, e inicialmente o MTA Fillapex apresentou pH alcalino, que ao longo do período de imersão tornou-se neutro. Resultados similares foram descritos por Silva et al. (2016) sobre o AH Plus e MTA Fillapex após 7 dias de imersão, e estudos prévios apresentaram comportamento similar dos cimentos não-modificados (SILVA et al., 2013; ZHOU et al., 2013). Após a incorporação das NPs CHX-HMP aos cimentos endodônticos, ocorreram pequenas reduções no pH do MTA Fillapex, e reduções pontuais foram observadas no PCS, todavia o AH Plus não apresentou quaisquer alterações.

Com relação ao tempo de presa, sabe-se que esta propriedade pode ser influenciada por fatores como temperatura, umidade, meio ambiente (NIELSEN; BEELER; BAUMGARTNER, 2006). Idealmente, o tempo de presa não deve ser curto, evitando transtornos na prática clínica, nem demasiadamente extenso, uma vez que pode favorecer a liberação de agentes irritantes para os tecidos perirradiculares (ALLAN; WALTON; SCHAFFER, 2001; VERTUAN, et al., 2018). O tempo de presa compreende o intervalo de tempo disponível entre a manipulação do material até o seu completo endurecimento na obturação dos canais radiculares. Segundo a ISO 6876:2012, a avaliação desta propriedade preconiza o uso de um identador, com o qual são geradas marcações no material. Deste modo, esta análise consiste em uma inspeção visual, o que torna esta avaliação subjetiva (VIAPIANA et al., 2013).

De acordo com os resultados obtidos após a análise dos cimentos endodônticos, observou-se o aumento do tempo de presa apenas no AH Plus, que apresentava 676 min e após a incorporação das NPs CHX-HMP, culminou em 713 min com a concentração de 5%. O MTA Fillapex foi analisado sob inserção em molde de gesso confeccionado de acordo com a norma ISO 6876:2012, a fim de prover a umidade requerida para atingir sua presa completa (ALLAN; WALTON; SCHAFFER, 2001), mas nenhuma das amostras apresentou presa final. Tal fato foi descrito por Faraoni et al. (2013). Deste modo apenas o MTA Fillapex não atende a normas preconizadas, que estabelecem até 72 horas para presa, apesar do fabricante não mencionar o período de presa do material.

O aumento do tempo de presa após a incorporação de NPs foi descrito por Barros et al. (2014a), que utilizou compostos quaternários de amônio, verificando alterações no AH Plus e PCS. Apesar da congruência quanto à influência das NPs no tempo de presa, há divergência quanto aos cimentos afetados, visto que este estudo verificou alterações pertinentes somente ao AH Plus. Observa-se também que estudos prévios mencionaram valores discrepantes quanto a presa dos materiais (FARAONI et al., 2013; VERTUAN et al., 2018; VIAPIANA et al., 2013). Estas diferenças de tempos de presa apresentadas podem estar relacionadas às proporções do material, principalmente o AH Plus, como descrito anteriormente por Baldi et al. (2012), que podem ocasionar alterações no tempos de trabalho e de presa.

Cientificamente verifica-se que nenhum cimento endodôntico disponível comercialmente atende a todas as propriedades ideais requeridas. Diante do exposto, constantemente surgem novas formulações e associações de diversas substâncias a fim de promover melhores propriedades a estes materiais, dentre elas o prolongamento dos efeitos antibacterianos. Neste quesito, a incorporação das NPs CHX-HMP representa uma abordagem promissora frente às infecções de origem endodôntica, devido a atuação contínua e de longo prazo, tendo em vista o comportamento antibacteriano de curto prazo da maioria dos cimentos endodônticos.

A partir deste estudo, confirma-se a alta reatividade proveniente da dimensão nanométrica das NPs CHX-HMP, todavia futuros estudos são necessários para elucidar a interação das NPs CHX-HMP em contato com o substrato dentinário, assim como quantificar, avaliar o período de liberação da CHX após a incorporações das NPs. Estas análises auxiliarão a compreender o comportamento das NPs, posto que o sucesso da sua aplicação dependerá da atuação eficaz diante das complexidades anatômicas do SCR.

CONCLUSÃO

Conforme as metodologias aplicadas e os resultados obtidos no presente estudo, conclui-se que:

- a) As NPs CHX-HMP incorporadas aos cimentos endodônticos proporcionaram ação antimicrobiana contra *E. faecalis*, principalmente associadas ao MTA Fillapex gerando eliminação das cepas por 30 dias;
- b) Todos os cimentos endodônticos avaliados apresentaram comportamento citotóxico, independente da incorporação de NPs;
- c) A incorporação das NPs não comprometeu as propriedades físico-químicas dos cimentos endodônticos, não ocasionou alteração significativa do pH e radiopacidade e promoveu redução da solubilidade. Apesar da redução do escoamento dos cimentos endodônticos, e aumento do tempo de presa constatados, não houve infração da norma ISO 6876:2012.

REFERÊNCIAS

- ANGELUS. **MTA Fillapex**. Londrina, [2019]. Disponível em : < <http://angelus.ind.br/MTA-Fillapex-11.html>>. Acesso em: 10 fev. 2019.
- ABBASZADEGAN, A. et al. Positively charged imidazolium-based ionic liquid-protected silver nanoparticles: a promising disinfectant in root canal treatment. **International Endodontic Journal**, Oxford, v. 48, n. 8, p. 790–800, 2015.
- ABRAMOVITZ, I. et al. In vitro biocompatibility of endodontic sealers incorporating antibacterial nanoparticles. **Journal of Nanomaterials**, New York, p. 1-9, 2012.
- ABRAMOVITZ, I. et al. Intratubular antibacterial effect of polyethyleneimine nanoparticles: an ex vivo study in human teeth. **Journal of Nanomaterials**, New York, p. 1-5, 2015.
- AHMADZADEH, E. et al. Osteoconductive composite graft based on bacterial synthesized hydroxyapatite nanoparticles doped with different ions: From synthesis to in vivo studies. **Nanomedicine**, London, v. 12, n. 5, p. 1387-1395, 2016.
- ALLAN, N. A.; WALTON, R. C.; SCHAFFER, M. A. Setting times for endodontic sealers under clinical usage and in vitro conditions. **Journal of Endodontics**, New York, v. 27, n. 6, p. 421-423, 2001.
- ALMEIDA, J. F. et al. Filling of artificial lateral canals and microleakage and flow of five endodontic sealers. **International Endodontic Journal**, Oxford, v. 40, p. 692-699, 2007.
- ALSHWAIMI, E. et al. In Vitro Antimicrobial Effectiveness of Root Canal Sealers against *Enterococcus faecalis*: A Systematic Review. **Journal of Endodontics**, New York, v. 42, n. 11, p. 1588–159, 2016.
- ANUSAVICE, K. J.; ZHANG, N. Z.; SHEN, C. Controlled release of chlorhexidine from UDMA-TEGDMA resin. **Journal of dental research**, Thousand Oaks, v. 85, p. 950–954, 2006.
- ATHANASSIADIS, B.; ABBOTT, P.; WALSH, L. The use of calcium hydroxide, antibiotics and biocides as antimicrobial medicaments in endodontics. **Australian Dental Journal**, Sydney, v. 52, p. 64–82, 2007.
- AYDIN, A.; SIPAHI, H.; CHAREHSAZ, M. Nanoparticles toxicity and their routes of exposure. **Recent Advances in Novel Drug Carrier Systems**, London, 2012.
- BABICH, H. et al. An in vitro study on the cytotoxicity of chlorhexidine digluconate to human gingival cells. **Cell biology and toxicology**, Princeton, v. 11, n. 2, p. 79-88, 1995.
- BAETKE, S. C.; LAMMERS, T.; KIESSLING, F. Applications of nanoparticles for diagnosis and therapy of cancer. **British Journal of Radiology**, London, 2015.

- BAIG, A. et al. Extrinsic whitening effects of sodium hexametaphosphate--a review including a dentifrice with stabilized stannous fluoride. **Compendium of continuing education in dentistry**, Jamesburg, v. 26, n. 9, p. 47-53, 2005.
- BALDI, J. V. et al. Variability of physicochemical properties of an epoxy resin sealer taken from different parts of the same tube. **International Endodontic Journal**, Oxford, v. 45, n. 10, p. 915–920, 2012.
- BAKSI AKDENIZ, B. G. et al. The effect of three different sealers on the radiopacity of root fillings in simulated canals. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology**, Saint Louis, v. 103, n. 1, p. 138–141, 2007.
- BARBOUR, M. E. et al. Differential adhesion of *Streptococcus gordonii* to anatase and rutile titanium dioxide surfaces with and without functionalization with chlorhexidine. **Journal of biomedical materials research. Part A**, Hoboken 90, p. 993-998, 2009.
- BARBOUR, M. E. et al. Synthesis, characterization, and efficacy of antimicrobial chlorhexidine hexametaphosphate nanoparticles for applications in biomedical materials and consumer products. **International Journal of Nanomedicine**, Auckland, v. 8, p. 3507–3519, 2013.
- BARBOUR, M. E. et al. Chlorhexidine hexametaphosphate as a wound care material coating: Antimicrobial efficacy, toxicity and effect on healing. **Nanomedicine**, London, v. 11, n. 16, p. 2049–2057, 2016.
- BARROS, J. et al. Antibacterial, physicochemical and mechanical properties of endodontic sealers containing quaternary ammonium polyethylenimine nanoparticles. **International Endodontic Journal**, Oxford, v. 47, n. 8, p. 725–734, 2014a.
- BARROS, J. et al. Antibiofilm effects of endodontic sealers containing quaternary ammonium polyethylenimine nanoparticles. **Journal of Endodontics**, New York, v. 40, n. 8, p. 1167-1171, 2014b.
- BELLIS, C. A. et al. Glass ionomer cements functionalised with a concentrated paste of chlorhexidine hexametaphosphate provides dose-dependent chlorhexidine release over at least 14 months. **Journal of Dentistry**, Bristol, v. 45, p. 53–58, 2016.
- BELLIS, C. A. et al. Glass ionomer cements with milled, dry chlorhexidine hexametaphosphate filler particles to provide long-term antimicrobial properties with recharge capacity. **Dental Materials**, Oxford, v. 34, n. 12, p. 1717–1726, 2018.
- BESINIS, A. et al. Review of nanomaterials in dentistry: interactions with the oral microenvironment, clinical applications, hazards, and benefits. **American Chemical Society nano**, Washington, v. 9, n. 3, p. 2255-2289, 2015.
- BEYTH, N. et al. Rapid kill - Novel endodontic sealer and *Enterococcus faecalis*. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 8, n. 11, 2013.

BEZEM, M. T. **Stabilisation of Tyrosine Hydroxylase in Nanoparticles for Enzyme Replacement Therapy**. 2012. 83 f. Mestrado em Ciências (Departamento de Biomedicina) – Universidade de Bergen, Noruega, 2012.

BHARDWAJ, A. et al. Nanotechnology in dentistry: Present and future. **Journal of international oral health**, Ahmedabad, v. 6, n. 1, p. 121-6, 2014.

BHASKAR, S. et al. Multifunctional Nanocarriers for diagnostics, drug delivery and targeted treatment across blood-brain barrier: Perspectives on tracking and neuroimaging. **Particle and Fibre Toxicology**, London, 2010.

BHATTACHARJEE, S. DLS and zeta potential – What they are and what they are not? **Journal of Controlled Release**, Amsterdam, n. 235, p. 337–351, 2016.

BINNIG, G.; QUATE, C. F.; GERBER, C. Atomic force microscope. **Physical Review Letters**, New York, v. 56, n. 9, p. 930-933, 1986.

BIZ, M. T.; CUCCO, C.; CAVALCANTI, B. N. Incorporation of AuNP-PLL nanocomplexes in DPSC: a new tool for 3D analysis in pulp regeneration. **Clinical Oral Investigations**, Berlin, 2019.

BONACCORSO, A. et al. Chemical Analysis of Nickel-Titanium Rotary Instruments with and without Electropolishing after Cleaning Procedures with Sodium Hypochlorite. **Journal of Endodontics**, New York, v. 34, n. 11, p. 1391–1395, 2008.

BORGES, R. P. et al. Changes in the surface of four calcium silicate-containing endodontic materials and an epoxy resin-based sealer after a solubility test. **International Endodontic Journal**, Oxford, v. 45, n. 5, p. 419-428, 2012.

BORGES, A. H. et al. Physicochemical properties and surfaces morphologies evaluation of MTA FillApex and AH plus. **ScientificWorldJournal**, New York, 2014.

BOUILLAGUET, S. et al. Cytotoxicity and sealing properties of four classes of endodontic sealers evaluated by succinic dehydrogenase activity and confocal laser scanning microscopy. **European Journal of Oral Sciences**, Chichester, v. 112, n. 2, p. 182–187, 2004.

BOYCE, S. T.; WARDEN, G. D.; HOLDER, I. A. Cytotoxicity testing of topical antimicrobial agents on human keratinocytes and fibroblasts for cultured skin grafts. **The Journal of burn care & rehabilitation**, Hagerstown, v. 16, n. 2, p. 97-103.

BREZHNEV, A. et al. Antibacterial Additives in Epoxy Resin-Based Root Canal Sealers: A Focused Review. **Dentistry Journal**, Basel, v. 7, n. 3, pii – E72.

BRIGGER, I.; DUBERNET, C.; COUVREUR, P. Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis. **Advanced drug delivery reviews**, Amsterdam, v. 54, p. 631-651, 2002.

BROOKHAVEN INSTRUMENTS CORPORATION. **NanoBrook 90Plus PALS**. Rio de Janeiro. Fevereiro, 2019. Disponível em:

<<https://www.brookhaveninstruments.com/nanobrook-90plus>>. Acesso em: 10 jul. 2019.

BRUNDLE, C. R.; EVANS, C. A.; WILSON, S. Encyclopedia of materials characterization: surfaces, interfaces and thin films. Stoneham: **Butterworth-Heinemann**; 1992. 800 p.

BUENO, M. et al. Effect of antimicrobial agents incorporated into resilient denture relines on the *Candida albicans* biofilm. **Oral Diseases**, Copenhagen, v. 21, n. 1, p. 57–65, 2013.

CAMILLERI, J. Hydration mechanisms of mineral trioxide aggregate. **International Endodontic Journal**, Oxford, v. 40, p. 462-470, 2007.

CAMILLERI, J. Color stability of white MTA in contact with hypochlorite solution. **Journal of Endodontics**, New York, v. 40, 436–440, 2014.

CANDEIRO, G. T. M. **Avaliação da radiopacidade, escoamento, pH e da liberação de íons cálcio de um cimento endodôntico biocerâmico**. 2012. 58 f. Tese (Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas) – Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

CAPUTO, F. et al. Measuring particle size distribution of nanoparticle enabled medicinal products, the joint view of EUNCL and NCI-NCL. A step by step approach combining orthogonal measurements with increasing complexity. **Journal of Controlle Release**, Amsterdam, v. 10, n. 299, p. 31-43, 2019.

CARMO, P. P. **Avaliação da resistência ao deslocamento do MTA e MTA HP acrescidos de nanopartículas de clorexidina**. 2017. 39 f. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Odontologia) - Universidade do Grande Rio, Duque de Caxias, 2017.

CASANOVA, M. C. R. C. **Síntese, caracterização e estudo da estabilidade de nanopartículas metálicas estabilizadas com polieletrólitos e tióis**. 2010. 86 f. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Química) - Instituto de química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

CHÁVEZ-ANDRADE, G. M. et al. Cytotoxicity, genotoxicity and antibacterial activity of poly(vinyl alcohol)-coated silver nanoparticles and farnesol as irrigating solutions. **Archives of oral biology**, Oxford, v. 84, p. 89-93, 2017.

CHÁVEZ DE PAZ L. E.; BERGENHOLTZ, G.; SVENSÄTER, G. The effects of antimicrobials on endodontic biofilm bacteria. **Journal of Endodontics**, New York, v. 36, n. 1, p. 70-77, 2010.

CHENG, L. et al. Antibacterial and physical properties of calcium–phosphate and calcium–fluoride nanocomposites with chlorhexidine. **Dental Materials**, Oxford, v. 28, n. 5, p. 573–583, 2012.

CLOGSTON, J. D.; PATRI, A. K. Importance of Physicochemical Characterization Prior to Immunological Studies. **Handbook of Immunological Properties of Engineered Nanomaterials**, p. 25–52, 2013.

COHEN, M. L. Nanotubes, nanoscience, and nanotechnology. **Materials Science and Engineering: C**, v. 15, n. 1–2, p. 1-11, 2001.

- COLOMBO, M. et al. Biological and physico-chemical properties of new root canal sealers . **Journal of Clinical and Experimental Dentistry**, Spain, v. 10, n. 2, p. e120-e12, 2018.
- COMOGLU, T.; ARISOY, S.; AKKUS, Z. B. Nanocarriers for Effective Brain Drug Delivery. **Current topics in medicinal chemistry**, Saif Zone, v. 17, n. 13, p. 1490-1506, 2017.
- COOMARASWAMY, K. S.; LUMLEY, P. J.; HOFMANN, M. P. Effect of bismuth oxide radiopacifier content on the material properties of an endodontic Portland cement-based (MTA-like) system. **Journal of Endodontics**, New York, v. 33, p. 295–298, 2007.
- CORMODE, D. P. et al. Modified natural nanoparticles as contrast agents for medical imaging. **Advanced Drug Delivery Reviews**, Amsterdam, v. 62, p. 329-338, 2010.
- CUSHING, B. L.; KOLESNICHENKO, V. L.; O’CONNOR, C. J. Recent advances in the liquid-phase syntheses of inorganic nanoparticles. **Chemical reviews**, Washington, v. 104, n. 9, p. 3893-3946, 2004.
- DAHIYA, B.; MEHTA, P. K. Detection of potential biomarkers associated with outrageous diseases and environmental pollutants by nanoparticle-based immuno-PCR assays. **Analytical Biochemistry**, San Diego, v. 587, 2019.
- DEL CARPIO-PEROCHENA, A. et al. Antibacterial Properties Associated with Chitosan Nanoparticle Treatment on Root Dentin and 2 Types of Endodontic Sealers. **Journal of Endodontics**, New York, v. 41, p. 1353-1358, 2015.
- DENTSPLY. **AH Plus**. Rio de Janeiro, Fevereiro, 2019. Disponível em:<<http://www.dentsply.com.br/bulas/diretory/A/AH-Plus.pdf>>. Acesso em: 12 fev. 2019.
- DONG, Y. et al. Engineered bioactive nanoparticles incorporated biofunctionalized ECM/silk proteins based cardiac patches combined with MSCs for the repair of myocardial infarction: In vitro and in vivo evaluations. **Science of the Total Environment**, Amsterdam, 707, 2020.
- DREXLER, K. E. *Nanosystems: Molecular Machinery, Manufacturing, and Computation*. New York: **Wiley**, 2006. 576p.
- DUARTE, M. A. H. et al. Radiopacity of Portland cement associated with different radiopacifying agents. **Journal of Endodontics**, New York, v. 35, p. 737-740, 2009.
- DUARTE, M. A. H. et al. Influence of Calcium Hydroxide Association on the Physical Properties of AH Plus. **Journal of Endodontics**, New York, v. 36, n. 6, p. 1048–1051, 2010.
- ELLIS, C. M.; PELLICO, J.; DAVIS, J. J. Magnetic Nanoparticles Supporting Bio-responsive T1/T2 Magnetic Resonance Imaging. **Materials**, Basel, v. 12, n. 24, p. 4096, 2019.
- FADEEL, B.; GARCIA-BENNETT, A. E. Better safe than sorry: Understanding the toxicological properties of inorganic nanoparticles manufactured for biomedical applications. **Advanced drug delivery reviews**, Amsterdam, v. 62, n. 3, p. 362-374, 2010.

FAN, W. et al. Calcium-silicate mesoporous nanoparticles loaded with chlorhexidine for both anti- *Enterococcus faecalis* and mineralization properties. **Journal of Nanobiotechnology**, London, v. 14, n. 1, 2016.

FARAONI, G. et al. Avaliação comparativa do escoamento e tempo de presa do cimento MTA Fillapex ®. **Revista da Faculdade de Odontologia de Passo Fundo**, Passo Fundo, v. 18, n. 2, p. 180-184, 2013.

FARIA-JÚNIOR, N. B. et al. Antibiofilm activity, pH and solubility of endodontic sealers. **International Endodontic Journal**, Oxford, v. 46, n. 8, 2013.

FONG, N.; POOLE-WARREN, L. A.; SIMMONS, A. Development of sustained-release antibacterial urinary biomaterials through using an antimicrobial as an organic modifier in polyurethane nanocomposites. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials**, Hoboken, v. 101B, n. 2, p. 310–319, 2013.

FREITAS, R. A. Jr. Nanodentistry. **Journal of American Dental Association**, London, v. 131, p. 1559-1566, 2000.

GARNER, S. J. et al. An antifungal coating for dental silicones composed of chlorhexidine nanoparticles. **Journal of dentistry**, Bristol, v. 43, p. 362-372, 2015.

GARNER, S.; BARBOUR, M. E. Nanoparticles for controlled delivery and sustained release of chlorhexidine in the oral environment. **Oral diseases**, Copenhagen, v. 21, p. 641-644, 2015.

GOLDSTEIN, J. Scanning electron microscopy and X-ray microanalysis. New York: **Springer**, 2012. 689p.

GOMES, B. P. A. et al. Chlorhexidine in Endodontics. **Brazilian Dental Journal**, Ribeirão Preto, v. 24, p. 89-102, 2013.

GONG, S. et al. In Vitro Evaluation of Antibacterial Effect of AH Plus Incorporated with Quaternary Ammonium Epoxy Silicate against *Enterococcus faecalis*. **Journal of endodontics**, New York, v. 40, n. 10, p. 1611–1615, 2014.

GREENSTEIN, G.; BERMAN.; JAFFIN, R. Chlorhexidine: an adjunct to periodontal therapy. **Journal of Periodontology**, Chicago, v. 57, p. 370-376, 1986.

HASEEB, R. et al. Synthesis and characterization of new chlorhexidine-containing nanoparticles for root canal disinfection. **Materials**, Basel, v. 9, n. 6, 2016.

HAUMAN, C. H. J.; LOVE, R. M. Biocompatibility of dental materials used in contemporary endodontic therapy: a review. Part 2. Root-canal-filling materials. **International Endodontic Journal**, Oxford, v. 36, n. 3, p. 147–160, 2003.

HERNÁNDEZ-SIERRA, J. F. et al. The antimicrobial sensitivity of *Streptococcus mutans* to nanoparticles of silver, zinc oxide, and gold. **Nanomedicine**, London, v. 4, p. 237-240, 2008.

HOOK, E. R. et al. Development of a novel antimicrobial-releasing glass ionomer cement functionalized with chlorhexidine hexametaphosphate nanoparticles. **Journal of Nanobiotechnology**, London, v. 12, p. 1–9, 2014.

HUGO, W.B.; LONGWORTH, A. R. Some aspects of the mode of action of chlorhexidine action. **Journal of pharmacy & pharmacology**, London, v. 16, p. 655-662, 1964.

HULLER, D. **Caracterização e avaliação do potencial citotóxico, antimicrobiano e anti-inflamatório de nanopartículas de ouro**, 2018. 114f. Dissertação (Mestrado em Odontologia) - Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2018.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **ISO 6876: Dental Root Canal Sealing Materials**. 2012.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **ISO 10993-12: Biological evaluation of medical devices - Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity**. 2012.

IZ, S. G. et al. Biocompatibility of glass ionomer cements with and without chlorhexidine. **European Journal of Dentistry**, Stuttgart, v. 7, n. 5, 2013.

JAFARI, F. et al. Antibacterial Activity of MTA Fillapex and AH 26 Root Canal Sealers at Different Time Intervals. **Iranian endodontic journal**, Tehran, v.11, n. 3, p. 192-197, 2016.

JAVIDI, M. et al. Cytotoxicity of a New Nano Zinc-Oxide Eugenol Sealer on Murine Fibroblasts. **Iranian endodontic journal**, Tehran, v. 10, n. 4, p. 231-235, 2015.

JOINER, A. Whitening toothpastes: A review of the literature. **Journal of Dentistry**, Bristol, v. 38, p. e17–e24, 2010.

JUNG, S. et al. Evaluation of the biocompatibility of root canal sealers on human periodontal ligament cells ex vivo. **Odontology**, Tokyo, v. 107, n. 1, p. 54-63, 2019.

JUNG, S. et al. Cytotoxic effects of four different root canal sealers on human osteoblasts. **PLoS One**, San Francisco, v. 26, n. 13, 2018.

KAPRALOS, V. et al. Antibacterial Activity of Endodontic Sealers against Planktonic Bacteria and Bacteria in Biofilms. **Journal of Endodontics**, New York, v. 44, n. 1, p. 149-154, 2018.

KANAPARTHY, R.; KANAPARTHY, A. The changing face of dentistry: Nanotechnology. **International Journal of Nanomedicine**, Auckland, v. 6, p. 2799-2804, 2011.

KAUPP, G. Atomic Force Microscopy, Scanning Nearfield Optical Microscopy and Nanoscratching. New York: **Springer**, 2006. 292 p.

KHADEMI, A. A.; MOHAMMADI, Z.; HAVAEI, A. Evaluation of the antibacterial substantivity of several intra-canal agents. **Australian Endodontic Journal**, Sydney, v. 32, p. 112–115, 2006.

KERR. **Pulp canal sealer EWT**. Rio de Janeiro. Fevereiro, 2019. Disponível em: < <https://www.kerrdental.com.br/product/pulp-canal-sealer-ewt/>>. Acesso em: 13 fev. 2019.

KESLER SHVERO, D. et al. Towards antibacterial endodontic sealers using quaternary ammonium nanoparticles. **International Endodontic Journal**, Oxford, v. 46, p. 747-754, 2013.

KISHEN, A. et al. An Investigation on the Antibacterial and Antibiofilm Efficacy of Cationic Nanoparticulates for Root Canal Disinfection. **Journal of Endodontics**, New York, v. 34, n. 12, p. 1515–1520, 2008.

KISHEN, A. **Nanotechnology in endodontics: Current and potential clinical applications**, 2015.

KLAUSS, P. **Estudo da obtenção de imagens no microscópio eletrônico de varredura e espectros na microanálise por energia dispersiva**. 2003. 26 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharel em Química) Departamento de Química - Centro de Ciências Físicas e Matemáticas, Universidade Federal de Santa Catarina, Santa Catarina, 2003.

KONG, L.X. et al. Nanotechnology and its role in the management of periodontal diseases. **Periodontology 2000**, Copenhagen, v. 40, p. 184-96, 2006.

KREPLAK, L. Introduction to Atomic Force Microscopy (AFM) in Biology. **Current Protocols in Protein Science**, Hoboken, v. 85, p. 17.7.1-17.7.21, 2016.

LACERDA, M. F. L. S. et al. Cleaning and Shaping Oval Canals with 3 Instrumentation Systems: A Correlative Micro-computed Tomographic and Histologic Study. **Journal of Endodontics**, New York, v. 43, n. 11, p. 1878–1884, 2017.

LEONARDO, M. R. et al. Release of formaldehyde by 4 endodontic sealers. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology**, Saint Louis, v. 88, n. 2, p.221–225, 1999

LI, J. et al. DNA biosensor based on chitosan film doped with carbon nanotubes. **Analytical biochemistry**, San Diego, v. 346, n. 1, p. 107-114, 2005.

LI, G. H. et al. Ability of new obturation materials to improve the seal of the root canal system: A review. **Acta Biomaterialia**, Oxford, v. 10, n. 3, p. 1050–1063, 2014.

LIU, Y. et al. Preparation and characterization of α -galactosidase-loaded chitosan nanoparticles for use in foods. **Carbohydrate Polymers**, v. 83, p. 1162-1168, 2011.

LOYOLA-RODRÍGUEZ, J. P. et al. Antimicrobial activity of endodontic sealers and medications containing chitosan and silver nanoparticles against *Enterococcus faecalis*. **Journal of Applied Biomaterials & Functional Materials**, Thousand Oaks, v. 17, n. 3, 2019.

MACEDO, T. F. **Caracterização microestrutural de propriedades viscoelásticas de ligantes asfálticos usando a microscopia de força atômica**. 2018. 144 f.

Tese (Programa de Engenharia Civil) - COPPE, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2018.

MANNHEIMER, W. A. **Microscopia dos materiais: uma introdução**. 1ª Ed. Editora E-papers, 2002. 226 p.

MANTRI, S. S.; PARKHEDKAR, R. D.; MANTRI, S. P. Candida colonisation and the efficacy of chlorhexidine gluconate on soft silicone- lined dentures of diabetic and non-diabetic patients. **Gerodontology**, Oxford, v. 30, p. 288–295, 2013.

MARCIANO, M. A.; DUARTE, M. A. H.; CAMILLERI, J. Dental discoloration caused by bismuth oxide in MTA in the presence of sodium hypochlorite. **Clinical Oral Investigations**, Berlin, v. 19, n. 9, p. 2201-2209, 2015.

MARTI, L. M. **Incorporação de gluconato ou diacetato de clorexidina a um cimento de ionômero de vidro: porosidade, rugosidade superficial e atividade anti-biofilme**. 2013. 70f. Dissertação (Faculdade de Odontologia) - Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2013.

MARTINS, A. T. et al. Microbiological effect of glass ionomer cement added by chlorhexidine diacetate. **Revista odontológica do Brasil Central**, Goiânia, v. 27, n. 81, p. 68-72, 2018.

MCGAUGHEY, C. Binding of polyphosphates and phosphonates to hydroxyapatite, subsequent hydrolysis, phosphate exchange and effects on demineralization, mineralization and microcrystal aggregation. **Caries research**, Basel, v. 17, p. 229– 241, 1983.

MCHUGH, C. et al. pH Required to Kill Enterococcus faecalis in Vitro. **Journal of Endodontics**, New York, v. 30, n. 4, p. 218–219, 2004.

MENARD, A.; DROBNE, D.; JEMEC, A. Ecotoxicity of nanosized TiO₂. Review of in vivo data. **Environmental pollution**, Barking, Essex, v. 159, p. 677-684, 2011.

MICKEL, A. K.; NGUYEN, T. H.; CHOGLE, S. Antimicrobial activity of endodontic sealers on Enterococcus faecalis. **Journal of Endodontics**, New York, v. 29, n. 4, p. 257-258, 2003.

MILSTONE, A. M.; PASSARETTI, C. L.; PERL, T. M. Chlorhexidine: expanding the armamentarium for infection control and prevention. **Clinical infectious disease**, Oxford, v. 46, n. 2, p. 274-281, 2008.

MISRA, D. N. Interaction of chlorhexidine digluconate with and adsorption of chlorhexidine on hydroxyapatite. **Journal of Biomedical Materials Research**, Hoboken, v. 28, n. 11, p. 1375–1381, 1994.

MOHAMMADI, Z.; ABBOTT, P. V. The properties and applications of chlorhexidine in endodontics. **International Endodontic Journal**, Oxford, v. 42 , p. 288–302, 2009.

MOHN, D. et al. Composites made of flame-sprayed bioactive glass 45S5 and polymers: bioactivity and immediate sealing properties. **International Endodontic Journal**, Oxford, v. 43, n. 11, p. 1037–1046, 2010.

MOONESIRAD, R. et al. Evaluation of human dental pulp stem cells behavior on a novel nanobiocomposite scaffold prepared for regenerative endodontics. **Materials science & engineering. C, Materials for biological applications**, Amsterdam, v. 100, p. 928-948, 2019.

MORGENTAL, R. D. et al. Antibacterial activity of two MTA-based root canal sealers. **International Endodontic Journal**, Oxford, v. 44, n. 12, p. 1128-1133, 2011.

MUPPARAPU, M. New nanophosphor scintillators for solid-state digital dental imagers. **Dento maxillo facial radiology**, London, v. 35, p. 475-476, 2006.

NEELAKANTAN, P.; SUBBARAO, C.V. An analysis of the antimicrobial activity of ten root canal sealers-a duration based in vitro evaluation. **The Journal of Clinical Pediatric Dentistry**, Birmingham, v.33, p.117-122, 2008.

NEVAREZ-RASCON, A. et al. Mechanical characterization of optical glass fiber coated with a thin film of silver nanoparticles by nanoindentation. **Materials Letters**, v. 136, p. 63–66, 2014.

NEVES, J. K. O. **Desenvolvimento e caracterização de microemulsões antimicrobianas e anti-inflamatórias contendo óleo de copaíba (*Copaiba multijuga*)**. 2013. 123 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, 2013.

NIELSEN, B. A.; BEELER, W. J.; BAUMGARTNER, J. C. Setting times of Resilon and other sealers in aerobic and anaerobic environments. **Journal of Endodontics**, New York, v. 32, v. 2, p. 130-132, 2006.

NOJOSA, J. S. **Caracterização de selantes resinosos contendo micropartículas poliméricas carregadas com clorexidina**. 2014. 75 f. Dissertação (Mestrado em Odontologia) - Universidade Federal do Ceará. Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, Fortaleza, 2014.

OBERMEIER, A. et al. Novel high efficient coatings for anti-microbial surgical sutures using chlorhexidine in fatty acid slow-release carrier systems. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 9, n. 7, 2014.

OKABE, T. et al. Effects of pH on Mineralization Ability of Human Dental Pulp Cells. **Journal of Endodontics**, New York, v. 32, n. 3, p. 198–201, 2006.

OMIDI, S. et al. Subcutaneous Connective Tissue Reaction to a New Nano Zinc-Oxide Eugenol Sealer in Rat Model. **Iranian endodontic journal**, Tehran, v.12, n.1, p. 64-69, 2017.

ORSTAVIK, D. Antibacterial properties of root canal sealers, cements and pastes. **International Endodontic Journal**, Oxford, v. 14, p. 125–133, 1981.

ORSTAVIK, D. ; NORDHAL, I.; TIBBALS, J. E. Dimensional change following setting of root canal sealer materials. **Dental Materials**, Oxford, v. 17, p. 146-51, 2001.

- PADOIS, K. et al. Chlorhexidine salt loaded polyurethane orthodontic chains: in vitro release and antibacterial activity studies. **AAPS PharmSciTech**, New York, v. 13, p. 1446–1450, 2012.
- PAGONIS, T. C. et al. Nanoparticle-based endodontic antimicrobial photodynamic therapy. **Journal of Endodontics**, New York, v. 36, n. 2, p. 322-328, 2010.
- PINHEIRO, E. T. Microorganisms from canals of root-filled teeth with periapical lesions. **International Endodontic Journal**, Oxford, v. 36, n. 1, p.1-11, 2003a.
- PINHEIRO, E. T. Evaluation of root canal microorganisms isolated from teeth with endodontic failure and their antimicrobial susceptibility. **Oral microbiology and immunology**, Copenhagen, v. 18, n. 2, p. 100-103, 2003b.
- PINHEIRO, C. R. et al. In vitro antimicrobial activity of acroseal, polifil and epiphany against *Enterococcus faecalis*. **Brazilian Dental Journal**, Ribeirão Preto, v. 20, n. 2, p. 107–111, 2009.
- PIZZO, G. et al. In vitro antibacterial activity of endodontic sealers. **Journal of Dentistry**, Bristol, v. 34, n. 1, p. 35–40, 2006.
- POGGIO, C. et al. Antibacterial activity of different root canal sealers against *Enterococcus faecalis*. **Journal of clinical and experimental dentistry**, Valencia, v. 9, n. 6, p. e743-e748, 2017.
- PRADA, I. et al. Influence of microbiology on endodontic failure. Literature review. **Medicina Oral Patología Oral y Cirugía Bucal**, Valencia, v. 24, n. 3, p. e364–e372, 2019.
- QI, L. et al. Preparation and antibacterial activity of chitosan nanoparticles. **Carbohydrate research**, Amsterdam, v. 339, p. 2693-2700, 2004.
- QUINA, F. H. Nanotecnologia e o meio ambiente: perspectivas e riscos. **Química Nova**, v. 27, n. 6, p. 1028-1029, 2004.
- RAAD, I. et al. Improved Antibiotic-Impregnated Catheters with Extended-Spectrum Activity against Resistant Bacteria and Fungi. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 56, n. 2, 935–941, 2012.
- RAY, H. A.; TROPE, M. Periapical status of endodontically treated teeth in relation to the technical quality of the root filling and the coronal restoration. **International Endodontic Journal**, Oxford, v. 28, n. 1, p. 12–18, 1995.
- RÔÇAS, I. N.; SIQUEIRA, J. F. Jr. Characterization of microbiota of root canal-treated teeth with post-treatment disease. **Journal of clinical microbiology**, Washington, v. 50, p. 1721–1724, 2012.
- RUDDLE, C. J. Endodontics overfills: Good? Bad? Ugly? **Dentistry Today**, Montclair, v. 5, p. 15, 1997.

SAAVEDRA, F. M. **Avaliação da expressão de substância P, receptores Nk1 e citotoxicidade em cultura de fibroblastos após o contato com cimentos endodônticos.** 2017. 71 f. Dissertação (Programa de Pós-graduação) - Faculdade de Odontologia de Piracicaba Universidade Estadual de Campinas, Piracicaba, 2018.

SAMIEI, M. et al. Nanoparticles for antimicrobial purposes in Endodontics: a systematic review of in vitro studies. **Materials science & engineering. C, Materials for biological applications**, Amsterdam, v. 58, p. 1269-78, 2016.

SANTOS, N. T. **Nanopartículas de ouro como sistema de liberação de droga associada a Berberina: síntese e caracterização.** 2013. 40 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação de Farmácia da Faculdade de Ceilândia) - Universidade de Brasília, Brasília, 2013.

SAWAI, J. et al. Effect of particle size and heating temperature of ceramic powders on antibacterial activity of their slurries. **Journal of Chemical Engineering of Japan**, v. 29, n. 2, p. 251–256, 1996.

SCHAFFAZICK, S. R.; GUTERRES, S. S. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Química Nova**, v. 26, n. 5, p. 726-737, 2003.

SCHILDER, H. Filling root canals in three dimensions. **Dental clinics of North America**, Philadelphia, v. 11, p. 723-744, 1967.

SCHWARTZ, R. S. Adhesive Dentistry and Endodontics. Part 2: Bonding in the Root Canals System – The Promise and the Problems: A Review. **Journal of endodontics**, New York, v. 32, n. 12, p. 1125-1134, 2006.

SEIL, J. T.; WEBSTER, T. J. Antimicrobial applications of nanotechnology: methods and literature. **International journal of nanomedicine**, Auckland, v. 7, p. 2767-2781, 2012.

SENEVIRATNE, C. J. et al. Nanoparticle-encapsulated chlorhexidine against oral bacterial biofilms. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 9, n. 8, 2014.

SHAKYA, V. K. et al . An Invitro Evaluation of Antimicrobial Efficacy and Flow Characteristics for AH Plus, MTA Fillapex, CRCS and Gutta Flow 2 Root Canal Sealer. **Journal of clinical and diagnostic research**, India, v. 10, n. 8, p. 104-108, 2016.

SHAYANI RAD, M. et al. Microleakage and antibacterial properties of ZnO and ZnO:Ag nanopowders prepared via a sol-gel method for endodontic sealer application. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 15, n. 9, p. 1-8, 2013.

SHI, Z. et al. Antibacterial and mechanical properties of bone cement impregnated with chitosan nanoparticles. **Biomaterials**, Guilford, v. 27, p. 2440 –2449, 2006.

SHOKOUHINEJAD, N. et al. Penetration of epiphany, epiphany self-etch, and AH plus into dentinal tubules: A scanning electron microscopy study. **Journal of Endodontics**, New York, v. 37, n. 9, p. 1316–1319, 2011.

SHRESTHA, A. et al. Delivery of Antibacterial Nanoparticles into Dentinal Tubules Using High-intensity Focused Ultrasound. **Journal of Endodontics**, New York, v. 35, n. 7, p. 1028–1033, 2009.

SHRESTHA, A. et al. Nanoparticulates for antibiofilm treatment and effect of aging on its antibacterial activity. **Journal of Endodontics**, New York, v. 36, n. 6, p. 1030–1035, 2010.

SHRESTHA, A.; KISHEN, A. Antibacterial efficacy of photosensitizer functionalized biopolymeric nanoparticles in the presence of tissue inhibitors in root canal. **Journal of Endodontics**, New York, v. 40, n. 4, p. 566-570, 2014.

SHRESTHA, A.; KISHEN, A. Antibacterial nanoparticles in Endodontics: a review. **Journal of Endodontics**, New York, v. 42, n.10, p.1417-1426, 2016.

SILVA, E. J. N. L. et al. Evaluation of cytotoxicity and physicochemical properties of calcium silicate-based endodontic sealer MTA Fillapex. **Journal of Endodontics**, New York, v. 39, n. 2, p. 274-277, 2013.

SILVA, E. J. N. L. et al. Long-Term Cytotoxicity, pH and Dissolution Rate of AH Plus and MTA Fillapex. **Brazilian Dental Journal**, Ribeirão Preto, v. 27, n. 4, p. 419-23, 2016.

SILVA, E. J. et al. Dissolution, dislocation and dimensional changes of endodontic sealers after a solubility challenge: A micro-CT approach. **International Endodontic Journal**, Oxford, v. 50, n. 4, p. 407-414, 2017.

SIQUEIRA, J. F.; UZEDA, M. D. Disinfection by calcium hydroxide pastes of dentinal tubules infected with two obligate and one facultative anaerobic bacteria. **Journal of Endodontics**, New York, v. 22, p. 674–676, 1996.

SIQUEIRA, J. F. Jr. et al. Antimicrobial activity and flow rate of newer and established root canal sealers. **Journal of Endodontics**, New York, v. 26, p. 274–277, 2000.

SIQUEIRA, N. M. **Desenvolvimento tecnológico e avaliação da penetração cutânea de benzofenona-3 a partir de nanocápsulas revestidas com quitosana**. 2008. 130 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul, 2008.

SIQUEIRA, J. F. Jr. et al. Unprepared root canal surface areas: causes, clinical implications, and therapeutic strategies. **Brazilian Oral Research**, São Paulo, v. 32, n. 1, 2018.

SJÖGREN, U. et al. Influence of infection at the time of root filling on the outcome of endodontic treatment of teeth with apical periodontitis. **International Endodontic Journal**, Oxford, v. 30, p. 297–306, 1997.

SMITH, M. C. et al. Zeta potential: a case study of cationic, anionic, and neutral liposomes. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 409, n. 24, p. 5779–5787, 2017.

STUART, C. et al. Enterococcus faecalis: Its Role in Root Canal Treatment Failure and Current Concepts in Retreatment. **Journal of Endodontics**, New York, v. 32, n. 2, p. 93–98, 2006.

SUNDQVIST, G. et al. Microbiologic analysis of teeth with failed endodontic treatment and the outcome of conservative re-treatment. **Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics**, Saint Louis, v. 85, p. 86–93, 1998.

TABARY, N. et al. A chlorhexidine loaded biodegradable cellulosic device for periodontal pockets treatment. **Acta biomaterialia**, Oxford, v. 10, p. 318–329, 2014.

TAKAHASHI, Y. et al. Antibacterial effects and physical properties of glass-ionomer cements containing chlorhexidine for the ART approach. **Dental Materials**, Oxford, v. 22, p. 647–652, 2006.

TELLES, I.S.F.; PRADO, M.; SIMÃO, R.A. Nanopartículas e aplicações endodônticas: uma revisão da literatura. **Revista Brasileira de Odontologia**, Rio de Janeiro, v.74, n.2, p.167-175, 2017.

THOMAS, J. P. et al. **Nanotechnology and Biomaterials**. Boca Raton, FL: CRC Taylor and Francis, 2006.

TOBIAS, R. S. Antibacterial properties of dental restorative materials: a review. **International Endodontic Journal**, Oxford, v. 21, n. 2, p. 155–160, 2007.

TÜRKÜN, L. S. et al. Long-Term Antibacterial Effects and Physical Properties of a Chlorhexidine-Containing Glass Ionomer Cement. **Journal of Esthetic and Restorative Dentistry**, London, v. 20, n. 1, p. 29–44, 2008.

VENUGOPAL, J. et al. Nanotechnology for nanomedicine and delivery of drugs. **Current pharmaceutical design**, Saif Zone, v. 14, p. 2184–2200, 2008.

VERRAEDT, E. et al. Controlled release of chlorhexidine from amorphous microporous silica. **Journal of Controlled Release**, Amsterdam, v. 142, n. 1, p. 47–52, 2010.

VERSIANI, M. A. et al. A comparative study of physicochemical properties of AH Plus and Epiphany root canal sealants. **International Endodontic Journal**, Oxford, v. 39, n. 6, p. 464–71, 2006.

VERSIANI, M. A. et al. Zinc Oxide Nanoparticles Enhance Physicochemical Characteristics of Grossman Sealer. **Journal of Endodontics**, New York, v. 42, n. 12, p. 1804–1810, 2016.

VERTUAN, G.C. et al. Evaluation of Physicochemical Properties of a New Root Canal Sealer. **Journal of Endodontics**, New York, v. 44, n. 3, p. 501–505, 2018.

VIAPIANA, R. et al. Physicochemical and mechanical properties of zirconium oxide and niobium oxide modified Portland cement-based experimental endodontic sealers. **International Endodontic Journal**, Oxford, v. 47, n. 5, p. 437–448, 2013.

VIEIRA, S. et al. Nanoparticles for bone tissue engineering. **Biotechnology progress**, New York, v. 33, n. 3, p. 590–611, 2017.

VITTI, R. P. et al. Physical Properties of MTA Fillapex Sealer. **Journal of Endodontics**, New York, v. 39, n. 7, p. 915–918, 2013.

WANG, L. et al. Nanocarbon materials in water disinfection: state-of-the-art and future directions. **Nanoscale**, Cambridge, v. 11, n. 20, p. 9819-9839, 2019.

WATTS, D.C.; MAROUF, A.S.; AL-HINDI, A.M. Photo-polymerization shrinkage-stress kinetics in resin-composites: methods development. **Dental Materials**, Oxford, v.19, p.1-11, 2003.

WEISS, E. I.; SHALHAV, M.; FUSS, Z. Assessment of antibacterial activity of endodontic sealers by a direct contact test. **Endodontics & Dental Traumatology**, Copenhagen, v, 2, p. 179–84, 1996.

WOOD, N. J. et al. Functionalization of ethylene vinyl acetate with antimicrobial chlorhexidine hexametaphosphate nanoparticles. **International Journal of Nanomedicine**, Auckland, v. 9, p. 4145–4152, 2014.

WOOD, N. J. et al. Chlorhexidine hexametaphosphate nanoparticles as a novel antimicrobial coating for dental implants. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, London, v. 26, n. 6, 2015.

WU, M.; FAN, B.; WESSELINK, P. R. Diminished leakage along root canals filled with gutta-percha without sealer over time : a laboratory study. **International Endodontic Journal**, Oxford, v. 33, p. 121–125, 2000.

YAH, C. S.; SIMATE, G. S.; IYUKE, S. E. Nanoparticles toxicity and their routes of exposures. **Pakistan journal of pharmaceutical sciences**, Karachi, v. 25, n. 2, p. 477-491, 2012.

YAMAMOTO, O. Influence of particle size on the antibacterial activity of zinc oxide. **International Journal of Inorganic Materials**, v. 3, n. 7, p. 643–646, 2001.

ZHANG, H. et al. Antibacterial activity of endodontic sealers by modified direct contact test against *Enterococcus faecalis*. **Journal of Endodontics**, New York, v. 35, p.1051–1055, 2009.

ZHANG, L.; WEBSTER, T.J. Nanotechnology and Nanomaterials: Promises for Improved Tissue Regeneration. **Nano Today**, v. 4, p. 66-80, 2009.

ZHOU, H. M. et al. Physical properties of 5 root canal sealers. **Journal of Endodontics**, New York, v. 39, n. 10, p. 1281-1286, 2013.