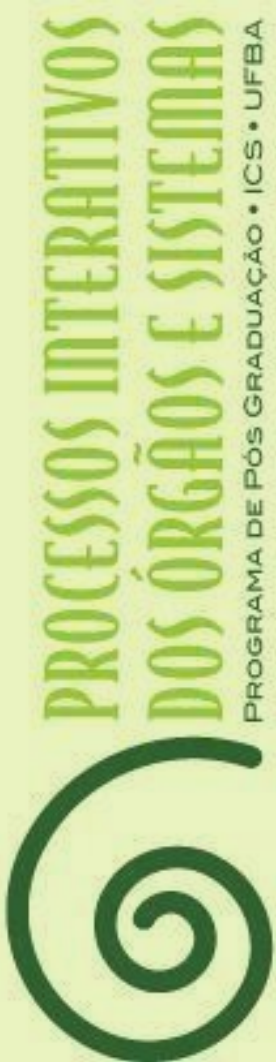


Maiana Maria Rios Siqueira Mattos



**ATIVIDADE DE NANOPARTÍCULAS DE  
PRATA BIOGÊNICAS EM ISOLADOS  
ORAIS DE *Enterococcus faecalis* e  
*Enterococcus faecium***

Salvador  
2023

**Maiana Maria Rios Siqueira Mattos**

**Atividade de Nanopartículas de Prata Biogênicas em Isolados  
Orais de *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus faecium***

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas, do Instituto de Ciências da Saúde, da Universidade Federal da Bahia, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor.

**Orientador:** Prof. Dr. Ricardo Wagner Dias Portela

Salvador  
2023

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

M435a Mattos, Maiana Maria Rios Siqueira.  
Atividade de nanopartículas de prata biogênicas em isolados orais de  
*Enterococcus faecalis* e *Enterococcus faecium*. / Maiana Maria Rios Siqueira  
Mattos. – Salvador (BA), 2023.  
74 f.: il.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Wagner Dias Portela  
Tese (Doutorado) – PPGPIOS/UFBA

1. Agentes antimicrobianos. 2. Biofilme bacteriano. 3. Infecções  
endodônticas. 4. Nanotecnologia. I. Universidade Federal da Bahia, Instituto de  
Ciências da Saúde. II. Portela, Ricardo Wagner Dias. III. Título.

CDU 615.3 (043.2)



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA**  
**Instituto de Ciências da Saúde**



---

**TERMO DE APROVAÇÃO DA DEFESA PÚBLICA DE TESE**

**MAIANA MARIA RIOS SIQUEIRA MATTOS**

**ATIVIDADE DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA BIOGÊNICAS  
SOBRE ENTEROCOCCUS FAECALIS E ENTEROCOCCUS FAECIUM**

**Salvador, Bahia, 05 de maio de 2023.**

COMISSÃO EXAMINADORA:

DocuSigned by:

PROF. DR. RICARDO WAGNER DIAS PORTELA (Examinador Interno)

DocuSigned by:

PROFA. DRA. ANA RITA SOKOLONSKI ANTÓN (Examinadora Interna)

DocuSigned by:

PROFA. DRA. SAMIRA ABDALLAH HANNA (Examinadora Interna)

DocuSigned by:

PROFA. DRA. CÍNTIA SILVA MINAFRA E REZENDE (Examinadora Externa)

DocuSigned by:

PROFA. DRA. LJUBICA TASIC (Examinadora Externa)

Dedico essa tese de doutorado aos meus pais, que sempre estiverem a meu lado, me incentivando em todos os caminhos. Aos meus irmãos, que de longe me davam o apoio necessário.

Dedico também ao meu marido José Eduardo, que me auxiliou em todoo percurso, me motivando e me apoiando incondicionalmente. Te amo, Amor!

E por último, dedico a minha filha Julia. Foi um desafio escrever esta tese e ao mesmo tempo conciliar com a maternidade. Mas vencemos! Te amo, filha!

## **AGRADECIMENTOS**

Ao meu orientador, Prof. Ricardo Portela, que, mesmo com todas as adversidades ao longo deste caminho, esteve ao meu lado me incentivando, sendo uma referência no meio acadêmico.

À Professora Ljubica Tasic (UNICAMP), pela colaboração e pelo apoio científico no desenvolvimento deste trabalho.

A Arlene Souza Lessa (FIOCRUZ), por me receber de forma carinhosa e atenciosa no laboratório de Microscopia Eletrônica.

À equipe do Laboratório de Imunologia e Biologia Molecular (LABIMUNO), fundamental para o desenvolvimento das pesquisas.

Ao Prof. Henrique Figueiredo (UFMG), pelo auxílio na identificação dos isolados.

Ao Prof. Roberto Meyer, pela oportunidade de trabalhar no LABIMUNO.

Agradeço aos colegas do Grupo de Pesquisa em Biotecnologia Aplicada a Saúde Animal pelo apoio, em especial a Luiz e Laerte, que me auxiliaram em todos os passos neste caminho, ensinando muito sobre microbiologia e protocolos associados.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

A todos que contribuíram, direta ou indiretamente, para a realização deste trabalho, meu muito obrigada!

MATTOS, Maiana Maria Rios Siqueira. *Atividade antimicrobiana de nanopartículas de prata biogênicas em isolados orais de Enterococcus faecalis e Enterococcus faecium*. 2023. Orientador: Ricardo Wagner Dias Portela. 74 f. il. Tese (Doutorado em Processos Interativos de Órgãos e Sistemas) – Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2024.

## RESUMO

**Introdução:** O tratamento endodôntico tem como objetivo eliminar microrganismos patogênicos presentes no complexo pulpar. Apesar de haver protocolos bem definidos para esse tratamento, infecções persistentes, principalmente causadas por *Enterococcus*, tornam-se desafiadoras para o sucesso do tratamento. Considerando o potencial antimicrobiano das nanopartículas de prata biogênicas (AgNP), o objetivo deste estudo foi avaliar a atividade desses compostos sobre *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus faecium*, bem como sobre seus biofilmes. **Método:** Utilizaram-se cepas referências e isolados clínicos de *Enterococcus*, provenientes de pacientes que apresentaram ausência de resposta ao teste de sensibilidade pulpar e reação crônica, as quais foram submetidas a testes de sensibilidade às AgNP por meio de ensaio de microdiluição em caldo. Determinaram-se as concentrações inibitórias mínimas (MIC<sub>100</sub>) e concentrações bactericidas mínimas. Também foi testada a atividade inibitória de AgNP na formação de biofilme e atividade sobre biofilme consolidado. A microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi utilizada para a análise morfológica do *Enterococcus* tratado pelas AgNP. **Resultados:** As AgNP apresentaram 100% de efeito bacteriostático para todas as cepas e isolados clínicos, com exceção de um isolado clínico de *E. faecium*, em concentrações que variaram de 31,25 a 125 ug/mL. Com relação ao efeito bactericida, somente um isolado clínico e a cepa referência de *E. faecium* não foram 100% inativados pelas AgNP. Todas as cepas e isolados clínicos analisados foram produtores moderados de biofilme. As AgNP foram capazes de interferir na formação de biofilme pelos *Enterococcus*, sendo um máximo de 55% de interferência para *E. faecalis* e de 40% para *E. faecium*. Houve interferência no biofilme consolidado em níveis que variaram de 20 a 40%. As análises de MEV comprovaram a atividade antibacteriana das AgNP por meio de alterações morfológicas das células. **Conclusão:** As AgNP demonstraram ser um agente antimicrobiano com capacidade bacteriostática e bactericida sobre cepas referências e isolados clínicos orais de *E. faecalis* e *E. faecium*, bem como apresentaram propriedade de inibição na formação de biofilme e ruptura de biofilme formado.

**Palavras-chave:** agentes antimicrobianos; biofilme bacteriano; infecções endodônticas; nanotecnologia.

MATTOS, Maiana Maria Rios Siqueira. *Antimicrobial activity of biogenic silver nanoparticles on oral isolates of Enterococcus faecalis and Enterococcus faecium*. 2023. Tutor: Ricardo Wagner Dias Portela. 74 f. il. Thesis (Doctorate in Interactive Processes of Organs and Systems) – Institute of Health Sciences, Federal University of Bahia, Salvador, 2024

## ABSTRACT

**Introduction:** The endodontic treatment aims to eliminate pathogenic microorganisms in the pulp complex. Even though this treatment has well-defined protocols, persistent infections, mainly caused by *Enterococcus*, have become a challenge for a successful treatment. Considering the antimicrobial potential of biogenic silver nanoparticles (AgNPs), this study aimed to evaluate the activity of these compounds on reference strains and clinical isolates of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium*, as well as on their biofilms. **Methods:** Reference strains and clinical isolates of *Enterococcus* were obtained from patients who showed no response to the pulp sensitivity test and chronic reaction. These were submitted to AgNPs sensitivity tests through broth microdilution assays. Minimum inhibitory concentrations (MIC<sub>S100</sub>) and minimum bactericidal concentrations (MBC<sub>S100</sub>) were determined. The inhibitory activity of AgNPs on biofilm formation and activity on consolidated biofilms was also tested. Scanning electron microscopy (SEM) was used for the morphological analysis of *Enterococcus* treated with AgNPs. **Results:** AgNPs showed 100% bacteriostatic effect for all strains and clinical isolates, except one clinical isolate of *E. faecium*, at concentrations ranging from 31.25 to 125 µg/mL. Regarding the bactericidal effect, only one clinical isolate and the reference strain of *E. faecium* were not 100% inactivated by AgNPs. All strains and clinical isolates analyzed herein were moderate biofilm producers. AgNPs were able to interfere with the formation of biofilm by the *Enterococcus*, with a maximum of 55% interference for *E. faecalis*, and 40% for *E. faecium*. There was an interference in the consolidated biofilm at levels ranging from 20 to 40%. SEM analysis confirmed the antibacterial activity of AgNPs through morphological changes in cells. **Conclusion:** AgNPs proved to be an antimicrobial agent with significant bacteriostatic and bactericidal capacity on reference strains and clinical oral isolates of *E. faecalis* and *E. faecium*, as well as showing inhibition properties in biofilm formation and disruption.

**Keywords:** antimicrobial agents; bacterial biofilm; endodontic infections; nanotechnology.



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> – Etapas do tratamento endodôntico.....	16
<b>Figura 2</b> – Evolução da cárie para uma inflamação pulpar .....	18
<b>Figura 3</b> – Complexidade dos sistemas de canais radiculares.....	19
<b>Figura 4</b> – Características morfológicas do <i>Enterococcus faecalis</i> .....	20
<b>Figura 5</b> – Formação do biofilme bacteriano .....	21
<b>Figura 6</b> – MEV de biofilme de <i>E. faecalis</i> nas paredes do canal radicular e dentro dos túbulos dentinários.....	22
<b>Figura 7</b> – Esquema comparativo entre mecanismos de resistência em bactérias e mecanismos antibacterianos de AgNP .....	25
<b>Figura 8</b> – Ações antibacterianas das nanopartículas de prata (AgNP).....	26
<b>Figura 9</b> – Ações antibacterianas das nanopartículas de prata (AgNP).....	27
<b>Figura 10</b> – Coleta das amostras dos canais radiculares .....	30
<b>Figura 11</b> – Curvas de inibição de crescimento de cepas de <i>E. faecalis</i> expostas a diferentes concentrações de AgNP .....	37
<b>Figura 12</b> – Curvas de inibição de crescimento de cepas de <i>E. faecalis</i> expostas a diferentes concentrações de AgNP.....	38
<b>Figura 13</b> – Curvas de inibição de crescimento de cepas de <i>E. faecium</i> expostas a diferentes concentrações de AgNP .....	39
<b>Figura 14</b> – Perfil de sensibilidade de cepas de referência e isolados clínicos de <i>E. faecalis</i> a nanopartículas de prata .....	40
<b>Figura 15</b> – Perfil de sensibilidade de cepas de referência e isolados clínicos de <i>E. faecium</i> a nanopartículas de prata .....	41
<b>Figura 16</b> – Semi-quantificação da formação de biofilme por cepas de referência e isolados clínicos de <i>E. faecalis</i> e <i>E. faecium</i> .....	42
<b>Figura 17</b> – Inibição da formação de biofilme por <i>E. faecalis</i> induzida por AgNP .....	43
<b>Figura 18</b> – Inibição da formação de biofilme por <i>E. faecium</i> induzida por AgNP.....	44
<b>Figura 19</b> – Inibição no biofilme consolidado por <i>E. faecalis</i> induzida por AgNs .....	45
<b>Figura 20</b> – Inibição no biofilme consolidado por <i>E. faecium</i> induzida por AgNP .....	46
<b>Figura 21</b> – Análise por microscopia eletrônica de varredura (MEV) .....	47
<b>Figura 22</b> – Análise por microscopia eletrônica de varredura (MEV) .....	48
<b>Figura 23</b> – Análise por microscopia eletrônica de varredura (MEV) .....	49
<b>Figura 24</b> – Análise por microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	50

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Perfil de sensibilidade de cepas de referência e isolados clínicos de <i>E. Faecalis</i> e <i>E. faecium</i> a AgNP.....	36
--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

## LISTA DE ABREVIATURAS

AgNP	Nanopartículas de prata
BHI	Brain Heart Infusion
Ca(OH) <sub>2</sub>	Hidróxido de cálcio
<i>C. albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
<i>C. glabrata</i>	<i>Candida glabrata</i>
<i>C. parapsilosis</i>	<i>Candida parapsilosis</i>
<i>Candida spp.</i>	Cândida sem identificação de espécie
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CFM	Concentração Fungicida Mínima
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CHX	Clorexidina
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DO	Densidade óptica
<i>E. faecalis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
<i>E. faecium</i>	<i>Enterococcus faecium</i>
<i>F. oxysporum</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de Hidrogênio
MET	Microscopia Eletrônica de Transmissão
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
mL	Mililitro
NaOCl	Hipoclorito de Sódio
NCBI	National Center for Biotechnology Information
Nm	Nanômetros
NMs	Nanomateriais
ODI	Densidade óptica do isolado
ODNC	Densidade óptica do controle negativo:
PA	Periodontite Apical
PBS	Tampão Fosfato de Sódio
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
SciELO	Scientific Electronic Library Online
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
µm	Micrômetro
NP	Nanopartículas
TSB	Caldo Triptona de Soja
UFC	Unidades Formadoras de Colônias
VF <sub>s</sub>	Fatores de virulência
VRE	<i>Enterococcus</i> resistentes à vancomicina

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>13</b>
1.1	JUSTIFICATIVA	14
1.2	OBJETIVOS	14
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b>	<b>16</b>
2.1	TRATAMENTO ENDODÔNTICO	16
2.2	PERIODONTITE APICAL	17
2.3	INSUCESSO ENDODÔNTICO	18
2.4	<i>ENTEROCOCCUS SPP</i>	19
2.5	BIOFILME	21
2.6	NANOTECNOLOGIA	23
2.7	NANOPARTÍCULAS DE PRATA (AgNP)	24
<b>3</b>	<b>MÉTODO</b>	<b>29</b>
3.1	SELEÇÃO DOS MICRORGANISMOS	29
3.2	COLETA DE AMOSTRAS	29
3.3	IDENTIFICAÇÃO DOS MICRORGANISMOS POR MALDI-TOF	31
3.4	SÍNTESE DAS NANOPARTÍCULAS DE PRATA	31
3.5	DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA E DA CONCENTRAÇÃO BACTERICIDA MÍNIMA	32
3.6	ENSAIO DE SEMI-QUANTIFICAÇÃO DE BIOFILME	32
3.7	INIBIÇÃO DA FORMAÇÃO DO BIOFILME PELA NANOPARTÍCULA DE PRATA	33
3.8	ENSAIO DE INTERFERÊNCIA EM BIOFILME CONSOLIDADO	34
3.9	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)	34
<b>4</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>35</b>
4.1	AValiação DA SUSCETIBILIDADE ANTIMICROBIANA DE CÉLULAS PLANCTÔNICA DE <i>E. FAECALIS</i> E <i>E. FAECIUM</i> A AgNP	35
4.2	DETECÇÃO DA FORMAÇÃO DE BIOFILME EM MICROPLACA DE CULTIVO	41
4.3	INTERFERÊNCIA DE AgNP NA FORMAÇÃO DE BIOFILME DE <i>E.</i> <i>FAECALIS</i> E <i>E.FAECIUM</i>	42
4.4	Ensaio De Interferência Em Biofilme Consolidado	44
4.5	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)	46
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO</b>	<b>51</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO</b>	<b>57</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>58</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A maior parte dos processos patológicos que afetam a cavidade oral envolve a presença de algum agente infeccioso. Desequilíbrios da microbiota podem contribuir para a patogenicidade de inúmeras condições clínicas, como a cárie dental e as doenças periodontais, endodônticas e periapicais.<sup>1</sup>

O tratamento endodôntico é um procedimento comum na Odontologia e as principais indicações são pulpite irreversível e necrose da polpa dentária, ambas causadas por processos cariosos, trincas ou lascas dentárias, ou ainda traumatismo dentário. Um tratamento endodôntico bem sucedido é caracterizado pela ausência de sintomas e sinais clínicos em dentes sem evidência radiográfica de envolvimento periodontal.<sup>2</sup> A principal causa de insucesso endodôntico é a persistência de microrganismos, os quais causam uma lesão intrarradicular ou infecção extra-radicular, tornando-se resistentes às medidas de desinfecção.<sup>3</sup> Entre esses microrganismos, podem ser encontradas espécies aeróbias, anaeróbias, facultativas e microaerofílicas. Os mais comuns são o *Streptococcus mutans*, *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus faecalis*, considerados como potentes patógenos orais.<sup>4</sup> O *Enterococcus* spp. é capaz de sobreviver a procedimentos endodônticos e contribuir para o insucesso do tratamento endodôntico, sendo essencial identificar novas formas de erradicá-lo nos canais radiculares.<sup>5</sup>

Nanopartículas de prata possuem um amplo espectro de propriedades bacterianas, antifúngicas e antivirais, sendo capazes de agir nas paredes celulares bacterianas, alterando a estrutura da membrana celular e até mesmo resultando em morte celular.<sup>6</sup> Sendo assim, as nanopartículas (NP) se apresentam como uma alternativa viável para tratamento de várias infecções, principalmente causadas por bactérias multirresistentes.<sup>7</sup>

As NP tem uma grande aplicabilidade na Odontologia, sendo utilizadas com material restaurador, na Endodontia, Implantodontia, próteses dentárias, Ortodontia e outras áreas odontológicas.<sup>8</sup> As propriedades das NPs, incluindo sua relação superfície/volume, ação antibacteriana, características físicas, mecânicas e biológicas e tamanho de partícula, as tornam veículos eficazes para aplicações odontológicas.<sup>9</sup> Também têm sido aplicadas com sucesso em diversas áreas na Odontologia, devido à sua atividade antimicrobiana significativa contra vários microrganismos, podendo ser aplicadas na desinfecção, profilaxia e prevenção de infecções na cavidade oral.<sup>10</sup>

Tendo em vista o potencial antimicrobiano das AgNP, o objetivo deste estudo é avaliar e comparar a atividade desses compostos sobre cepas referências e isolados clínicos de *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus faecium*.

## 1.1. JUSTIFICATIVA

A infecção bacteriana desempenha um papel importante no desenvolvimento de lesões periapicais. Dentre os microrganismos mais frequentes encontrados nas lesões endodônticas persistentes estão os *Enterococcus* spp. Os protocolos atuais de tratamento das infecções endodônticas são desafiantes, face às altas taxas de insucesso. Devido ao potencial antimicrobiano das AgNPs, novos estudos sobre a eficácia desses compostos contra patógenos orais são necessários, principalmente frente a microrganismos como *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus faecium*.

## 1.2. OBJETIVOS

### Objetivos Geral

- Avaliar as atividades bacteriostática e bactericida de nanopartículas de prata sobre cepas referências e isolados clínicos de *E. faecalis* e *E. faecium*, bem como sua capacidade de inibição de formação de biofilme e ruptura de biofilmes formado.

### Objetivos Específicos

- Determinar as concentrações mínimas de AgNPs capazes de inibir 100% do crescimento de *E. faecalis* e *E. faecium* (MIC<sub>100</sub>).
- Determinar as concentrações mínimas de AgNPs capazes de inativar completamente *E. faecalis* e *E. faecium* (MBC<sub>100</sub>).
- Avaliar a formação de biofilme em cepas referências e isolados clínicos de *E. faecalis* e *E. faecium*;
- Avaliar a capacidade de interferência de nanopartículas de prata biogênicas na formação de biofilme por *E. faecalis* e *E. faecium*;
- Avaliar a capacidade disruptiva de nanopartículas de prata em biofilme maduro de *E. faecalis* e *E. faecium*;

- Avaliar a morfologia das espécies de *Enterococcus*, após tratamento com as nanopartículas de prata biogênicas.

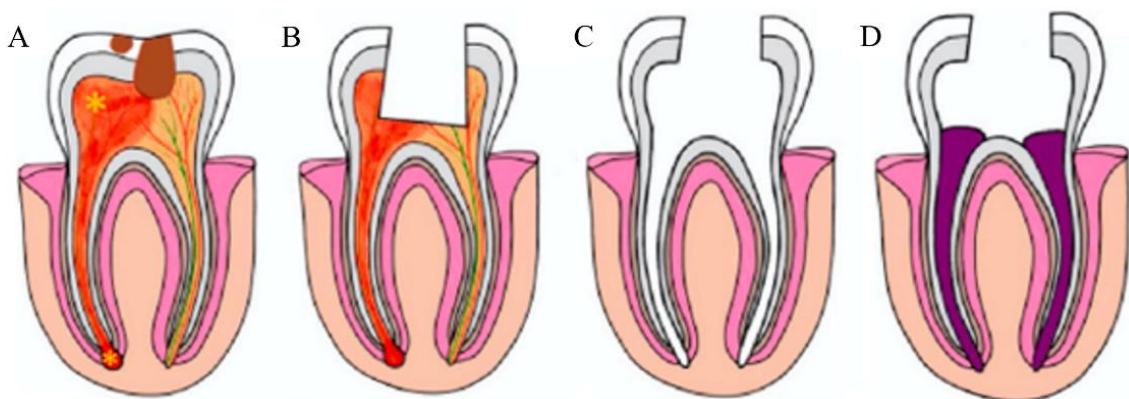
## 2. REVISÃO DE LITERATURA

Esta seção compreende a base teórica que deu sustentação a esta pesquisa.

### 2.1. TRATAMENTO ENDODÔNTICO

O objetivo primário da terapia endodôntica é criar um ambiente biologicamente aceitável, dentro do sistema de canais radiculares, o qual permita a cicatrização e a manutenção da saúde do tecido perirradicular.<sup>11</sup> Para tanto, é necessário a completa limpeza mecânica e química dos sistemas de canais radiculares, seguidas do completo enchimento do material obturador (**Figura 1**). A remoção de substâncias infectadas e a prevenção de mais infecções intra ou pós operatórias são cruciais para um tratamento bem sucedido.<sup>12</sup> Essa etapa de preparo químico-mecânico é de extrema importância durante o tratamento de dentes infectados e com periodontite apical, porque o resultado do tratamento depende da eficácia da eliminação das bactérias, de seus produtos e do tecido necrótico que serviria como substrato para o crescimento bacteriano.<sup>13</sup>

**Figura 1.** Etapas do tratamento endodôntico.



**Legenda:** Cárie (A), Acesso endodôntico (B) Preparo Químico Mecânico (C) e Obturação (D)

**Fonte:** adaptado de Siddiqui *et al.* (2022)<sup>14</sup>.

O tratamento endodôntico apresenta taxa de sucesso significativa, mesmo sendo composto de procedimentos invasivos e associados à certa dificuldade, ocasionada por uma anatomia complexa. Algumas complicações podem surgir durante ou após um procedimento endodôntico, em razão da má compreensão dessa anatomia, principalmente durante a



instrumentação. A presença de curvaturas e variações anatômicas internas complexas do sistema de canais radiculares pode favorecer a persistência de bactérias, não apenas em áreas de difícil acesso, mas também em áreas da parede do canal principal, as quais permanecem intocadas por instrumentos. Se bactérias resistirem a procedimentos químico-mecânicos, há um risco aumentado de periodontite apical pós-tratamento.<sup>13</sup>

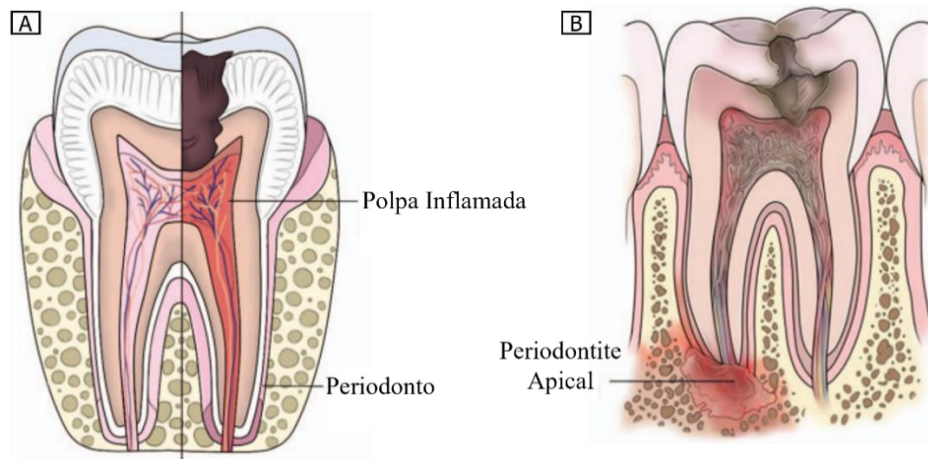
As infecções endodônticas podem ser reduzidas significativamente, com o preparo químico-mecânico dos canais radiculares.<sup>15</sup> No entanto, a instrumentação não elimina completamente os microrganismos presentes na raiz e se faz necessário o uso de uma medicação intracanal com atividade antimicrobiana.

## 2.2. PERIODONTITE APICAL

A periodontite apical (PA) é uma doença inflamatória de etiologia microbiana causada, principalmente, por infecção da polpa e do sistema de canais radiculares. A comunidade bacteriana presente na PA, bem como suas alterações em resposta à terapia odontológica, é de extrema importância para entender a patogênese da periodontite apical e estabelecer estratégias terapêuticas antimicrobianas eficazes.<sup>16,17</sup>

Evidências mostram a etiologia polimicrobiana das infecções endodônticas, nas quais as bactérias e seus produtos são os principais agentes para o desenvolvimento, progressão e disseminação de periodontite. Fatores microbianos em canais radiculares necróticos podem se espalhar para o tecido apical, evocando e sustentando uma carga inflamatória (**Figura 2**). Assim, a periodontite apical é o resultado da complexa interação entre fatores microbianos e defesa do hospedeiro contra a invasão dos tecidos perirradiculares.<sup>18</sup>

**Figura 2.** Evolução da cárie para uma inflamação pulpar.



**Legenda:** (A) Pulpite, (B) Periodontite Apical

**Fonte:** adaptado de Zajac *et al.* (2021)<sup>19</sup>.

Embora mais de 500 espécies bacterianas tenham sido detectadas em infecções endodônticas, um grupo de 20 a 30 espécies é mais frequentemente encontrado. Espécies anaeróbias obrigatórias são mais abundantes nas comunidades bacterianas intrarradiculares de dentes com periodontite apical primária, enquanto anaeróbios e facultativos dominam as comunidades na periodontite apical pós-tratamento.<sup>16</sup>

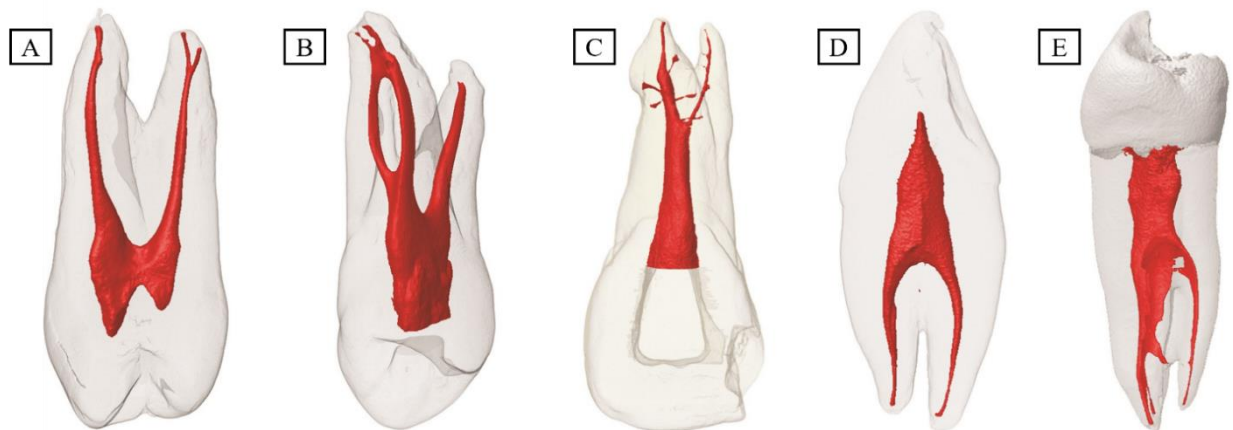
### 2.3 INSUCESSO ENDODÔNTICO

O insucesso do tratamento endodôntico pode ocorrer por diferentes causas, como a persistência de bactérias, os procedimentos inadequados de modelagem, limpeza e obturação, restaurações ruins e exposição por fratura, selamento coronal impróprio (infiltração) e canais não tratados (canais perdidos). Entretanto, a principal razão para o insucesso endodôntico é a presença de bactérias dentro do sistema de canais radiculares, tais como o *Enterococcus faecalis*. Essas bactérias são mais resistentes aos agentes desinfetantes, causando uma infecção intra ou extrarradicular persistente.<sup>20,21</sup>

O conhecimento completo das complexidades anatômicas do sistema de canais radiculares tem um impacto direto na eficácia do preparo e da obturação do canal, sendo um pré-requisito essencial para o sucesso do tratamento endodôntico.<sup>22</sup> A presença dessas

variações complexas (**Figura 3**) e o desafio do controle de microrganismos nesses canais representam fatores de risco para insucesso, após o tratamento do canal radicular infectado.<sup>23</sup> Esse alto grau de dificuldade se dá em razão da persistência de microrganismos em áreas de difícil acesso, como istmos e ramificações, canais acessórios de deltas apicais e regiões intocadas pelos instrumentos endodônticos<sup>13</sup>; e esses microrganismos são frequentemente associados com doença pulpar, infecção primária do canal, reinfecção do canal e doença pós-tratamento.<sup>22</sup>

**Figura 3.** Complexidade dos sistemas de canais radiculares.



**Legenda:** (A) Primeiro pré-molar superior com bifurcação na porção apical. (B) Primeiro pré-molar superior com bifurcação no terço médio. (C) Incisivo central superior com ramificações no terço apical. (D) Canino inferior com dois canais radiculares. (E) Pré-molar Inferior com ramificações no terço apical.

**Fonte:** adaptado de Ahmed *et al.* (2018)<sup>22</sup>.

A microbiota dos dentes com persistência/infecção endodôntica secundária é uma comunidade polimicrobiana com espécies Gram-positivas e Gram-negativas, bacilos e cocos, anaeróbios facultativos e estritos. *E. faecalis* (Gram-positivo) e *Porphyromonas gingivalis* (Gram-negativo) são as espécies mais detectadas em dentes com infecção endodôntica persistente.<sup>23,24</sup> Biofilmes de microrganismos que se desenvolvem nas superfícies radiculares dos forames apicais estão associados com periodontite periapical refratária.<sup>12</sup>

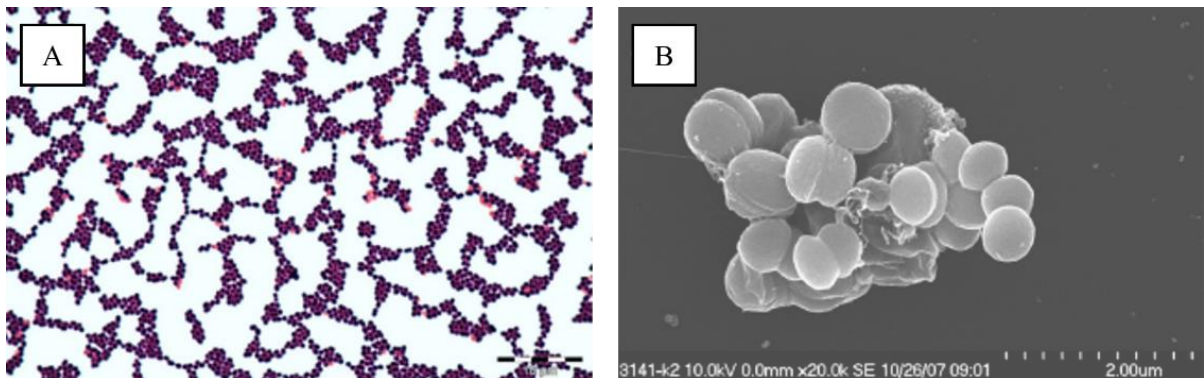
#### 2.4 *ENTEROCOCCUS SPP*

A persistência de microrganismos ou reinfecções são as principais razões para o insucesso do tratamento endodôntico.<sup>25</sup> As infecções endodônticas persistentes são de origem polimicrobiana com espécies Gram-positivas e Gram-negativas, bacilos e cocos, anaeróbios

facultativos e estritos.<sup>26,27</sup> *Enterococcus* são altamente detectados em todas as etapas do retratamento endodôntico, evidenciando assim a sua resistência aos procedimentos endodônticos.<sup>27</sup>

O gênero *Enterococcus* contém atualmente mais de 50 espécies, sendo *E. faecalis* e *E. faecium* as espécies isoladas predominantes, representando mais de 80% de isolados. Além disso, essas duas espécies são consideradas a terceira e a quarta espécies nosocomiais patogênicas mais prevalentes em todo o mundo.<sup>28,29</sup> *Enterococcus* são cocos anaeróbios facultativos Gram-positivos (**Figura 4**), produtores de ácido lático, não formadores de esporos, que estão cada vez mais associados a infecções nosocomiais, como bacteremia, endocardite infecciosa, infecções do trato urinário, entre outras. Desde a alarmante aparecimento de *Enterococcus* resistentes à vancomicina em todo o mundo, a Organização Mundial da Saúde os listou como “patógenos resistentes de alta prioridade” para o desenvolvimento de novos antibióticos para tratar mais eficientemente infecções por *Enterococcus*.<sup>30</sup>

**Figura 4.** Características morfológicas de *Enterococcus faecalis*



**Legenda:** (A) Coloração de Gram, (B) Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) de *E. faecalis*.  
**Fonte:** adaptado de Wellinghausen *et al.* (2009)<sup>31</sup>.

Os *Enterococcus* são resistentes e capazes de sobreviver em condições adversas, tornando-se bem adaptáveis aos ambientes de atenção à saúde. Duas espécies causam a maioria das infecções enterocócicas: *E. faecalis* e *E. faecium*. Ambas as espécies demonstram uma resistência intrínseca a antibióticos comuns, além de um genoma notável, possibilitando pronta resistência a outros antibióticos, seja por mutação ou por transferência horizontal de elementos genéticos.<sup>32</sup>

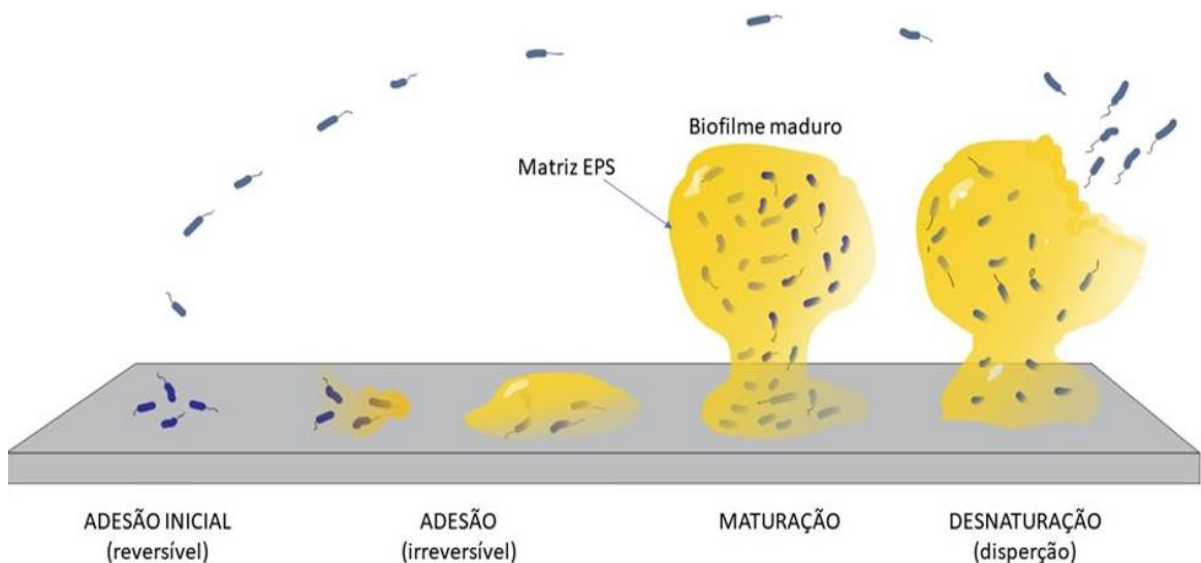
*E. faecalis* presente em infecções endodônticas e periapicais persistentes apresenta características microbiológicas, bem como fatores de virulência, que determinam sua

patogenicidade, o que favorece a persistência das infecções, mesmo quando o retratamento é instituído.<sup>33</sup> Além disso, são altamente resistentes a medicações intracanalais, utilizadas na prática endodôntica, sendo conhecidos por resistir ao efeito antibacteriano do hidróxido de cálcio ( $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ), uma medicação amplamente utilizada endodontia.<sup>34</sup> *E. faecium* é uma espécie de cocos Gram-positivos, reconhecido como um patógeno oportunista globalmente importante, tendo um genoma extraordinariamente flexível, que permite sua rápida adaptação à mudança no ambiente, sendo capaz de causar uma série de infecções humanas devido a essa capacidade de adaptação às condições de um ambiente nosocomial e com uma marcada resistência a glicopeptídeos.<sup>35,36,37,38</sup>

## 2.5 BIOFILME

Os biofilmes são formados por uma comunidade bacteriana complexa, encapsulada por uma matriz polimérica, com fortes propriedades aderentes e fenótipo persistente (**Figura 5**). Eles são considerados como uma das áreas mais desafiadoras da medicina moderna, visto que os antibióticos existentes são mais eficientes contra células bacterianas planctônicas e, portanto, muitos tratamentos de infecção relacionada ao biofilme falham.<sup>39,40</sup> Nos últimos anos, surgiram inúmeros microrganismos multirresistentes, e um especial mecanismo que confere resistência à antibióticos e ao sistema imune é a capacidade de formar biofilme.<sup>41</sup>

**Figura 5.** Formação do biofilme bacteriano.

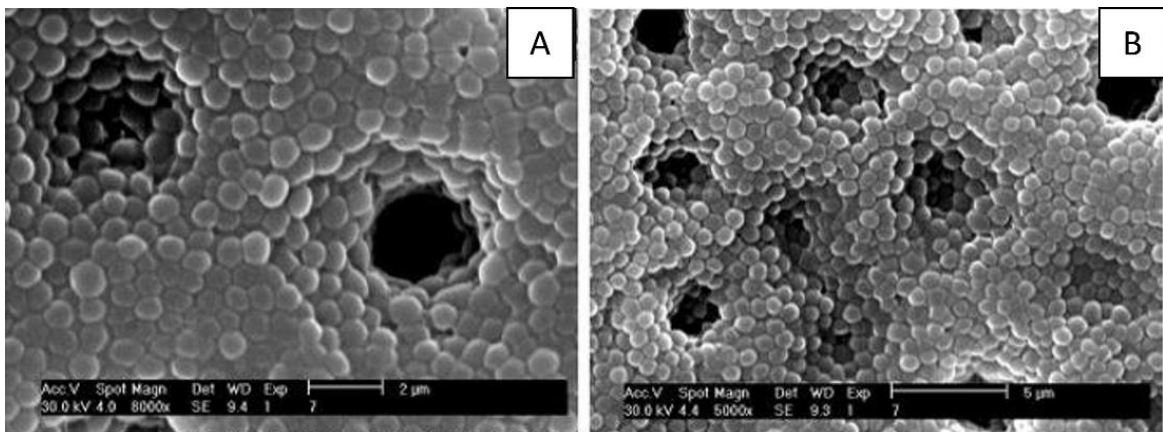


**Fonte:** adaptado de Pavão, Moraes, Ribeiro *et al.* (2021)<sup>41</sup>.

A cavidade oral abriga um microbioma complexo, composto por bactérias, protozoários, fungos e vírus.<sup>8,42</sup> Esses microrganismos são responsáveis por doenças comuns da cavidade oral, incluindo doença periodontal (gingiva) e cárie dentária. A cárie dentária é causada por placas, que são uma comunidade de microrganismos em formato de biofilme.<sup>42</sup>

A microbiota endodôntica é formada por entidades altamente organizadas e complexas, os biofilmes, cujas características são fundamentalmente diferentes dos microrganismos em suspensões planctônicas (**Figura 6**). A complexidade e variabilidade do sistema de canais radiculares, juntamente com a natureza multiespécies dos biofilmes, tornam a desinfecção desse sistema extremamente desafiador. A persistência microbiana parece ser o fator mais importante para a falha do tratamento endodôntico e isso pode ter um impacto adicional na dor e na qualidade de vida.<sup>43</sup> O biofilme não só confere às bactérias uma proteção eficaz contra o sistema de defesa do hospedeiro, mas também as torna mais resistentes a uma variedade de agentes desinfetantes usados, como produtos de higiene bucal ou no tratamento de infecções.<sup>44</sup>

**Figura 6.** MEV de biofilme de *E. faecalis* nas paredes do canal radicular e dentro dos túbulos dentinários.



**Legenda:** (A) ampliação de 5000x e (B) de 8000x

**Fonte:** Adaptado de Ghabraei *et al.* (2018)<sup>45</sup>

As infecções endodônticas podem ser uma matriz para resistência a antibióticos e, por isso, o respectivo tratamento deve considerar as características de adesão e formação de biofilme por bactérias. Levando em consideração que as bactérias dos canais radiculares desenvolvem, potencialmente, resistência a antibióticos, sua capacidade de formação de biofilmes facilitaria a disseminação dessa resistência.<sup>46</sup>

Compreender a virulência dos microrganismos do biofilme presente nos canais radiculares é essencial para o desenvolvimento de novos procedimentos terapêuticos visando à desinfecção intracanal. Desenvolvimentos recentes de medicamentos intracanaís biocompatíveis

podem abrir novos caminhos, com um agente terapêutico ideal para erradicar o biofilme endodôntico.<sup>47</sup>

## 2.6 NANOTECNOLOGIA

Nos últimos anos, a propagação e a resistência de microrganismos patogênicos (bactérias, fungos e vírus) a agentes antimicrobianos têm levado a sérios problemas de saúde. A nanotecnologia e as nanopartículas (NP) foram assinaladas como uma nova abordagem para lidar com esse problema, devido à sua atividade antimicrobiana significativa. O uso de NP como antimicrobianos pode ser uma nova estratégia para o controle de microrganismos patogênicos.<sup>48</sup>

Vários nanomateriais podem ser feitos sob medida para alcançar as propriedades desejadas. No campo biomédico, a nanotecnologia tem gerado grandes estímulos para avanços, tanto nas áreas de diagnóstico, quanto na de terapia (nanomedicina). Ressalta-se que as NP têm seus comportamentos/impactos biológicos, variando conforme seu tamanho, morfologia e características físico-químicas.<sup>49</sup>

A notoriedade da nanotecnologia resulta da possibilidade de obtenção de materiais com melhores propriedades químicas, elétricas, térmicas, mecânicas ou ópticas. Materiais de tamanho nano são caracterizados por uma área de superfície aumentada, o que melhora sua reatividade química e sua mobilidade. Devido a essa reatividade aumentada e ao tamanho adequadamente pequeno, algumas nanopartículas são usadas como agentes antimicrobianos<sup>8,49,50</sup> Como mecanismo multifacetado, a adesão de nanopartículas a células microbianas, indução da produção de espécies reativas de oxigênio e sua penetração no interior das células, têm sido reconhecidos como os modos mais proeminentes de ação antimicrobiana.<sup>50</sup>

As NP, como agentes antibacterianos, utilizam vários mecanismos diferentes dos mecanismos antimicrobianos de outras terapias convencionais. Além disso, devido à alta área de superfície em relação ao volume, a energia estática das partículas é mais bem estabelecida.<sup>8</sup>  
<sup>51</sup> Sua aplicação no desenvolvimento de nanomateriais (NM) tem ganhado importância devido à sua superioridade física, propriedades mecânicas, químicas e biológicas, resultando em melhor desempenho, em comparação aos seus homólogos convencionais.<sup>51</sup>

Em razão da sua baixa toxicidade, propriedades antimicrobianas e interações proteína-superfície, as NP podem ser usadas em várias aplicações odontológicas. Seu potencial na

formação de biomateriais (por exemplo, compostos injetáveis ou fibras) é uma inovação na Odontologia. A combinação de refinamento contínuo nas modalidades de tratamento convencionais e os avanços nas aplicações clínicas da nanotecnologia representam um caminho promissor para melhorar o atendimento odontológico.<sup>9</sup>

As nanopartículas são cada vez mais usadas como antibióticos, sendo vistas como alternativas na terapia complementar a eles. Podem ser utilizadas em revestimentos antibacterianos para dispositivos implantáveis, materiais medicinais para prevenir infecções e promover a cicatrização de feridas, diminuição de administração de antibióticos para tratar doenças, sistemas de detecção bacteriana para gerar diagnósticos microbianos, bem como vacinas antibacterianas.<sup>52</sup>

As nanopartículas à base de metal têm sido extensivamente investigadas para aplicações biomédicas. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), além do tamanho reduzido e seletividade para bactérias, aquelas à base de metal também se mostraram eficazes contra patógenos listados como prioritários e são conhecidas por terem mecanismos de toxicidade bacteriana não específicos (eles não se ligam a um receptor específico na célula bacteriana), o que não só dificulta o desenvolvimento de resistência por bactérias, mas também amplia o espectro de atividade antibacteriana.<sup>53</sup>

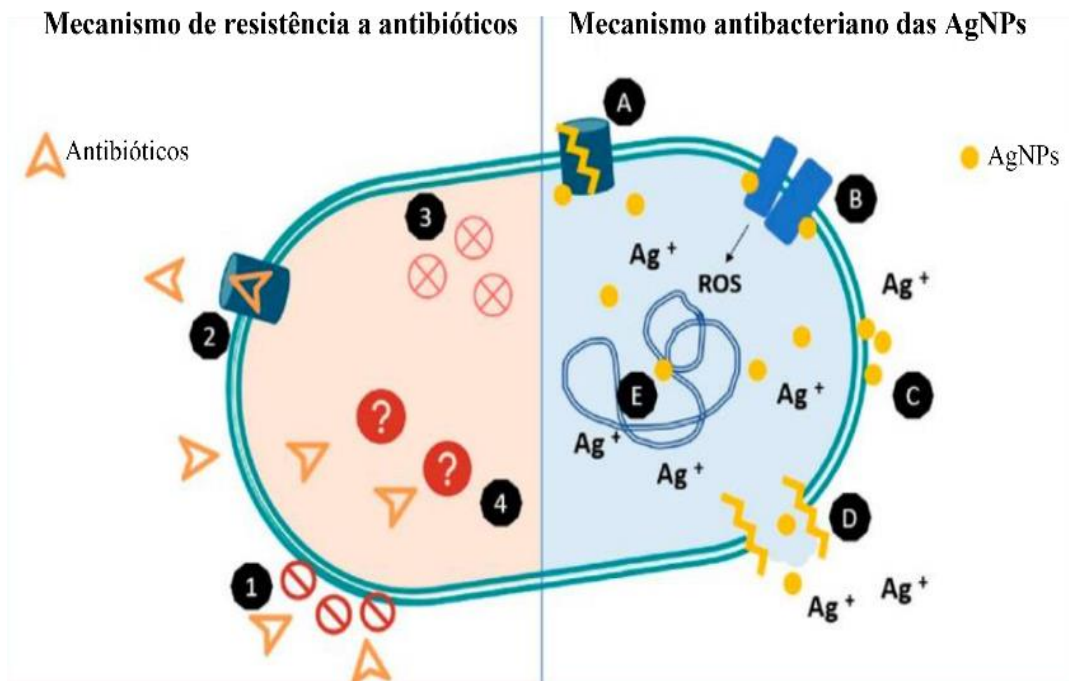
## 2.7 NANOPARTÍCULAS DE PRATA (AgNP)

O aumento da resistência a antibióticos por bactérias tornou-se uma grande preocupação no diagnóstico e no tratamento de doenças infecciosas. O progresso no desenvolvimento de medicamentos baseados em nanotecnologia tem sido considerado no combate à multirresistência em microrganismos. Dentre elas, as nanopartículas de prata (AgNP) prometem enfrentar esse desafio, devido ao seu amplo espectro de atividade e robustas propriedades antimicrobianas.<sup>7</sup> As AgNP apresentam forte atividade contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, incluindo cepas resistentes a antibióticos,<sup>54,55</sup> podendo ser utilizadas como em dispositivos médicos e sistemas de controle antimicrobiano.<sup>54</sup>

As AgNP atuam nas células bacterianas por diferentes mecanismos simultâneos, os quais incluem difusão de íons Ag na célula, ruptura e dano mecânico nas membranas celulares e alteração de proteínas e DNA. Um esquema desses mecanismos é exposto na **Figura 7**.<sup>55</sup>



**Figura 7.** Esquema comparativo entre mecanismos de resistência em bactérias e mecanismos antibacterianos de AgNP.

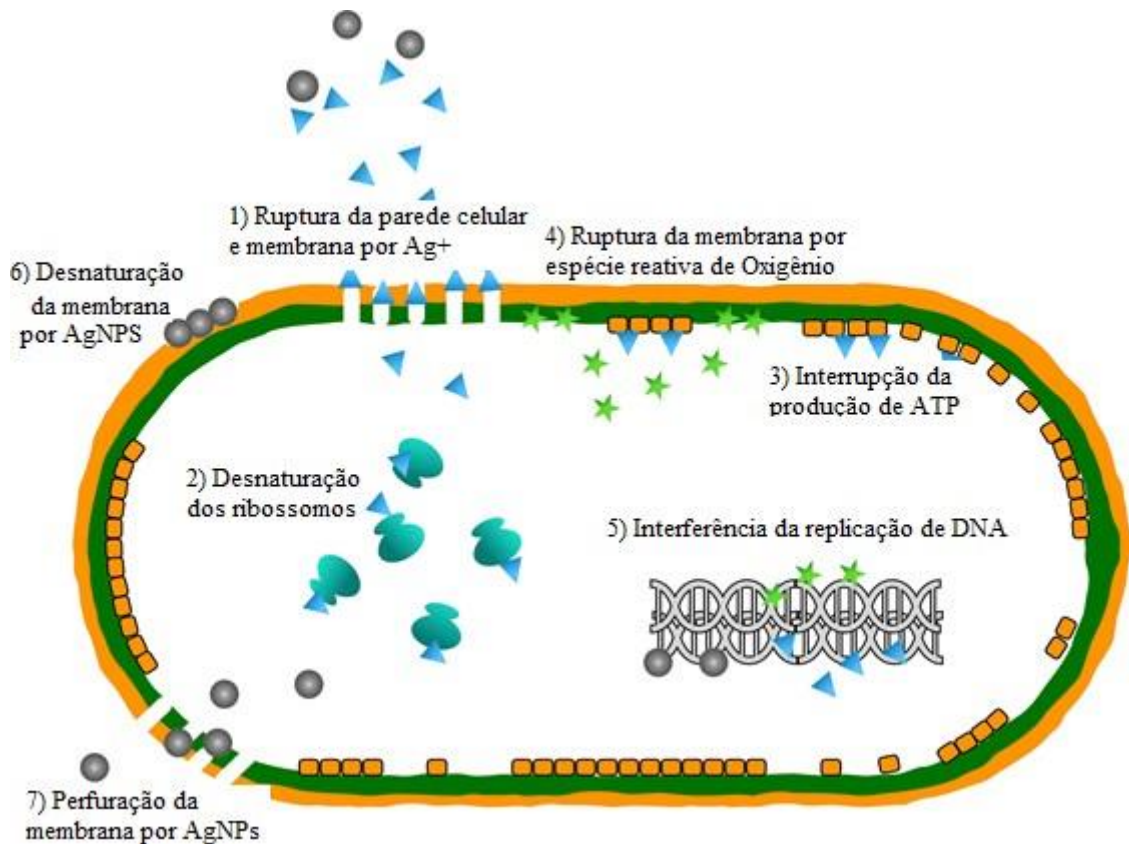


**Legenda:** Mecanismo de resistência à antibióticos: (1) barreiras de permeação, (2) bombas de efluxo, (3) inativação do antibiótico e (4) alterações estruturais nos alvos do antibiótico (representados como "?"). Mecanismos antibacterianos das AgNP: (A) alteração das bombas de efluxo, (B) rompimento de proteínas de membrana e de cadeias de transporte de elétrons (C) acúmulo na membrana afetando a permeabilidade, (D) rompimento da membrana e vazamento de conteúdo intracelular, (E) interação e danos no DNA.

**Fonte:** adaptado de Bruna *et al.* (2021)<sup>55</sup>.

AgNP exibem mecanismos de ação múltiplos e simultâneos e, em combinação com outros agentes antibacterianos, tem demonstrado efeito sinérgico contra bactérias patogênicas, tais como *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. As características das AgNP as tornam adequadas para aplicação em produtos médicos visando tratar infecções ou preveni-las com eficiência.<sup>55</sup> Embora alguns mecanismos da atividade antibacteriana das AgNP não sejam totalmente esclarecidos, várias ações antibacterianas já foram descritas (**Figura 8**).<sup>6,55</sup>

**Figura 8.** Ações antibacterianas das nanopartículas de prata (AgNP).



**Fonte:** adaptado de Yin *et al.* (2020)<sup>6</sup>.

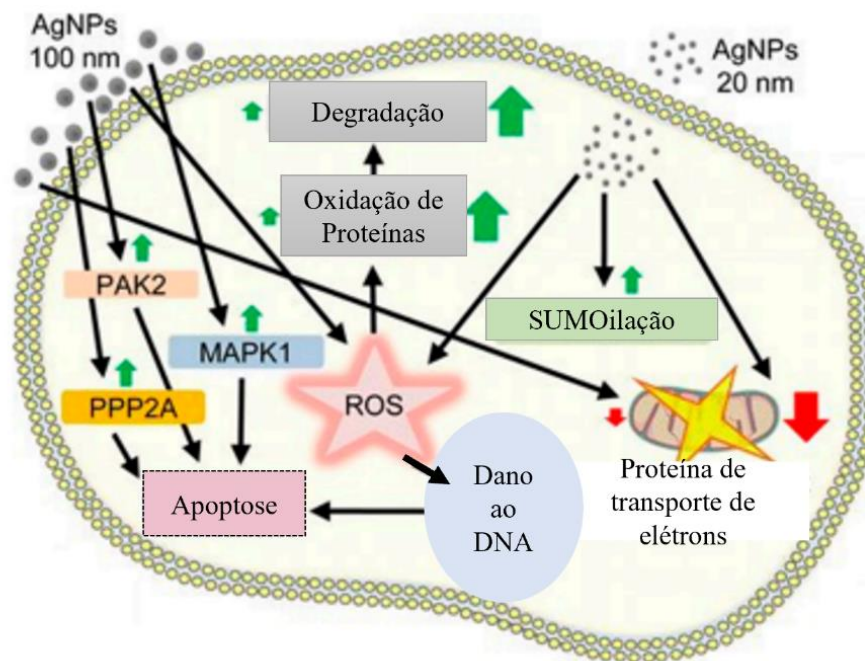
As AgNP penetram em um sistema biológico de várias maneiras. A rota de exposição e tempo, tamanho, estado de agregação e doses de AgNP estão relacionadas à sua biodisponibilidade, biodistribuição e possíveis efeitos adversos. No nível celular, a AgNP gera uma grande quantidade de espécies reativas de oxigênio (ROS), ativando enzimas e destruindo o citoesqueleto e o DNA, danificando as enzimas de reparo do DNA e regulando positivamente a autofagia para ativar as vias de apoptose e os efeitos citotóxicos. No nível genético, uma dose mais baixa de AgNP levará a mudanças no metabolismo energético, estresse oxidativo, mudanças no ciclo celular e em outros genes relacionados. Mesmo em doses muito baixas, as AgNP são capazes de causar danos estruturais ou funcionais às células-alvo.<sup>56</sup>

Há um crescimento de publicações e desenvolvimento tecnológico envolvendo AgNP na área da saúde, visto a comprovação da sua eficácia antimicrobiana, seja em nanocompósitos ou associadas a biomateriais. As AgNP surgem como um agente antimicrobiano para uso no controle de bactérias patogênicas, inflamação tecidual e perda óssea, quando em concentrações que apresentam baixa citotoxicidade às células do paciente.<sup>10</sup> Entretanto, existe um limite para

o seu uso devido à toxicidade, já que há uma correlação entre o tamanho e a morfologia das nanopartículas com a potência de citotoxicidade. A citotoxicidade é inversamente proporcional ao tamanho das nanopartículas.<sup>57</sup>

O principal mecanismo de toxicidade das nanopartículas de prata envolve a interrupção da cadeia respiratória mitocondrial, o que resulta na geração de ROS e na interrupção da síntese de ATP, o que leva a uma cascata de eventos tóxicos<sup>58</sup> (**Figura 9**). Ainda que as nanopartículas de prata tenham sido amplamente utilizadas como nanomateriais para a fabricação de produtos cosméticos e de saúde, têxteis antimicrobianos, curativos para feridas, transportadores de medicamentos antitumorais, foram relatadas como tóxicas para várias linhagens de células humanas, incluindo células epiteliais brônquicas, células endoteliais da veia umbilical, entre outras. AgNP induzem uma citotoxicidade dependente de dose, tamanho e tempo, particularmente aquelas com tamanhos  $\leq 10$  nm.<sup>59</sup>

**Figura 9.** Ações antibacterianas das nanopartículas de prata (AgNP).



Fonte: adaptado de De Matteis *et al.* (2018)<sup>60</sup>

As AgNP de tamanho pequeno ( $\leq 10$  nm) poderiam ser empregadas para combater doenças bacterianas. No entanto, suas alta reatividade, instabilidade, susceptibilidade à oxidação rápida e citotoxicidade, são vistas como deficiências cruciais para sua absorção e aplicação clínica.<sup>61</sup> Ademais, pode-se observar uma associação entre estabilidade coloidal e

toxicidade de AgNP, pois a agregação extrema leva à perda completa da atividade biológica. O maior grau de resistência à agregação, observado para partículas maiores, tem um impacto significativo na toxicidade *in vitro*, retendo mais sua atividade contra microrganismos e células de mamíferos. Em razão disso, almejar o menor tamanho de nanopartículas pode não ser o melhor curso de ação.<sup>62</sup>

O excelente uso na Medicina levou à sua aplicação na clínica odontológica. O interesse na erradicação do biofilme microbiano do sistema de canais radiculares ainda existe no campo da Endodontia. As nanopartículas provaram ser muito mais eficientes em sua capacidade de ligação e superfície química, em comparação com os materiais convencionais, tendo uma boa perspectiva na aplicação prática endodôntica, com grande promessa na redução da formação de biofilme, melhora da remineralização do dente, inibição do seu processo de desmineralização e neutralização dos microrganismos relacionados à cárie e a outros microrganismos endodônticos.<sup>51</sup>

### 3 MÉTODO

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Instituto de Ciências da Saúde, da Universidade Federal da Bahia (número do parecer 3.216.001). As amostras clínicas foram coletadas de voluntários adultos com mais de 18 anos de ambos os sexos, os quais apresentaram ausência de resposta ao teste de sensibilidade pulpar e reação crônica visível radiograficamente. Os critérios de exclusão compreenderam a presença de alteração sistêmica, voluntários em uso de antibióticos sistêmicos, dentes com tratamento endodôntico prévio e canais radiculares expostos ao meio bucal. Os voluntários para esta pesquisa leram e assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

#### 3.1 SELEÇÃO DOS MICRORGANISMOS

Os microrganismos referências utilizados para esta pesquisa foram o *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Enterococcus faecalis* ATCC 51299 e o *Enterococcus faecium* ATCC 6965. Utilizaram-se também isolados clínicos obtidos de amostras de pacientes voluntários com mais de 18 anos, de ambos os sexos, em tratamento de canal radicular, que concordaram em participar da pesquisa e assinaram o TCLE, provenientes da Clínica Escola da UFBA - Salvador.

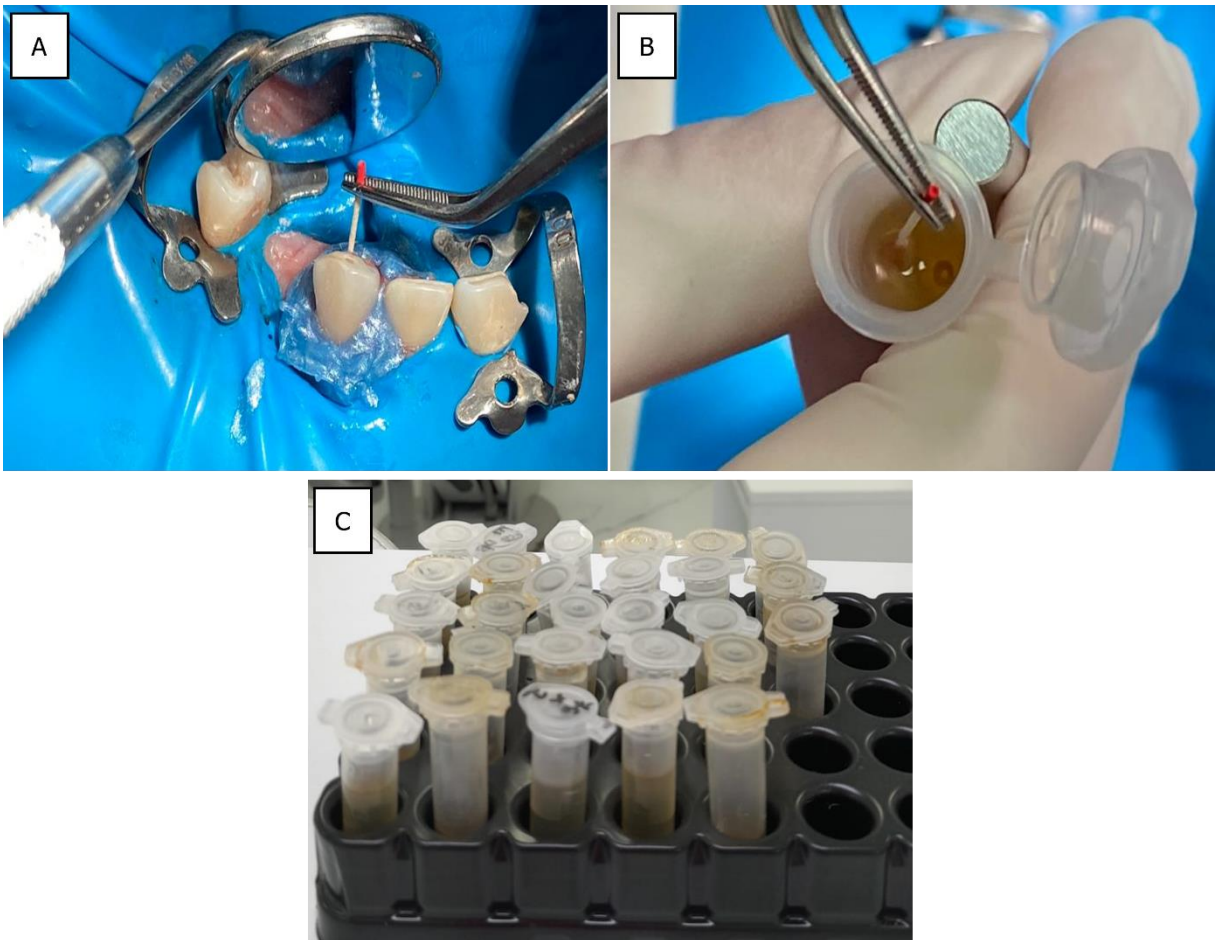
#### 3.2 COLETA DE AMOSTRAS

Coletaram-se as amostras por um cirurgião-dentista habilitado, com inscrição no Conselho Regional de Odontologia. Previamente à intervenção, realizaram-se bochechos com 10 mL de enxaguatório bucal (clorexidina 0,12%) por um minuto. Em seguida, os voluntários foram anestesiados localmente, os agentes contaminantes coronários, tais como cáries e/ou restaurações, removidos, para em seguida ser realizado o isolamento absoluto. A antisepsia do campo operatório (dente, grampo, lençol de borracha e arco) foi efetuada usando *swabs* estéreis, umedecidos, primeiramente em peróxido de hidrogênio a 30% (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), durante 30 segundos; depois foi utilizada uma solução de hipoclorito de sódio 2,5% (NaOCl) por mais 30 segundos e, por fim, uma solução de tiosulfato de sódio 5% para neutralizar a ação química dos agentes

antissépticos.<sup>27</sup>

A coleta do material para análise microbiológica foi realizada com a utilização de cones de papel absorvente nº 15 estéreis, introduzido no comprimento total do canal (determinado pela radiografia periapical pré-operatória), permanecendo nesta posição por um min (**Figura 10A**). Nos casos em que o canal estava seco, foi umedecido com soro fisiológico estéril, para assegurar uma amostra viável. Realizaram-se três coletas por paciente. Posteriormente, os cones foram transferidos para um tubo de ensaio contendo 3 mL do meio BHI (Brain Heart Infusion) (**Figura 10B**). As amostras foram identificadas e transportadas para processamento por cultura microbiológica imediatamente após o término do procedimento clínico (**Figura 10C**).

**Figura 10.** Coleta das amostras nos canais radiculares.



**Legenda:** (A) cone de papel absorvente posicionado no canal radicular. (B) Cone no papel com material biológico introduzido em microtubo.(C) Acondicionamento das amostra.

**Fonte:** arquivo fotográfico da autora

As culturas foram semeadas em placa de Petri contendo ágar BHI e incubadas em estufa a

37°C por 24 horas. Após o crescimento microbiano, foi preparada uma suspensão em tubo, contendo 10 mL de solução salina esterilizada, até se obter uma turvação compatível com 0,5 da escala McFarland ( $1,5 \times 10^8$  UFC/m). Em seguida, um *swab* estéril foi embebido na suspensão bacteriana, comprimindo-o contra as paredes do tubo para tirar o excesso da suspensão e foi semeado de forma suave em todas direções da referida placa, procurando abranger toda a superfície. Esse procedimento foi realizado em triplicata.

### 3.3 IDENTIFICAÇÃO DOS MICRORGANISMOS POR MALDI-TOF

As amostras bacterianas isoladas foram enviadas para identificação em equipamento MALDI Biotyper (Bruker, Bremen, Alemanha), na Universidade Federal de Minas Gerais. Nesse sistema, uma colônia bacteriana foi inserida no equipamento, bombardeada por laser e, então, analisada por meio de espectrometria de massa associada à ionização e à dessorção a laser, assistida por matriz (MALDI) e do tipo tempo de voo (TOF). Os resultados de espectrograma carga/massa foram, então, confrontados com um banco de dados com espectrogramas associados a diferentes espécies bacterianas e fúngicas, para posterior identificação de espécie. Trata-se de um método rápido e confiável para a identificação de microrganismos.

### 3.4 SÍNTESE DAS NANOPARTÍCULAS DE PRATA

A síntese dos AgNP foi realizada seguindo o procedimento descrito por Ballotin *et al.* (2017)<sup>105</sup>. A biossíntese e a caracterização das AgNP, cedidas para este estudo, foram realizadas no Laboratório de Química Biológica do Instituto de Química da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Em resumo, o fungo *Fusarium oxysporum* foi cultivado em meio de cultura sólido, consistindo de 0,5% de extrato de levedura, 2% de malte, 2% de ágar e água destilada, sendo mantido a 28°C por uma semana. Após o crescimento, água destilada esterilizada foi adicionada à cultura sob agitação constante, até atingir a concentração proteica de 0,1 g/mL, e mantida sob agitação por 72 horas. Uma filtração a vácuo foi realizada e então 0,01 mol/L de AgNO<sub>3</sub> foram adicionados ao sobrenadante. A solução foi mantida a 28 °C e selada com folha de alumínio até a formação das nanopartículas. As AgNP foram previamente

caracterizadas e apresentaram tamanhos de  $28,0 \pm 13,1$  nm, polidispersidade de 0,231, potencial zeta de  $-31,7 \pm 2,8$  mV, e eram esféricas.<sup>35</sup>

### 3.5 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA E DA CONCENTRAÇÃO BACTERICIDA MÍNIMA

A metodologia de microdiluição em caldo foi realizada de acordo com Norman *et al.* (2014)<sup>65</sup>, com modificações. A solução de AgNP foi diluída em água destilada estéril em concentrações, variando de 0,975 a 1 mg/mL.<sup>66</sup> Os solventes e diluentes para a preparação de soluções padrão de agentes antimicrobianos seguiram a metodologia descrita na norma M7-A6 do Clinical and Laboratory Standards Institute<sup>67</sup>(CLSI) para bactérias aeróbicas e o suplemento M100-S16<sup>68</sup>, para as bactérias fastidiosas. O caldo Mueller-Hinton foi utilizado como meio de primeira escolha para testes de sensibilidade para *E. faecalis* e *E. faecium*. Após a incubação, cada cepa isolada foi diluída em caldo Mueller-Hinton para alcançar, em espectrofotômetro, uma densidade óptica de 0,08-0,10, no comprimento de onda de 600 nm (opticamente comparável à solução padrão McFarland de 0,5). Cada suspensão continha aproximadamente  $3 \times 10^6$  UFC/mL de *E. faecalis* e *E. faecium*. Em seguida, as suspensões foram imediatamente diluídas em caldo Mueller-Hinton para obter uma concentração de  $1 \times 10^6$  UFC/mL. Para atingir uma concentração final de  $5 \times 10^5$  UFC/mL nos poços, 100  $\mu$ L do inóculo e 100  $\mu$ L da solução coloidal AgNP nas diferentes concentrações foram inoculados em microplaca de 96 poços. Em seguida, as microplacas foram então incubadas durante 48H a 37 °C. Dois controles foram usados para cada diluição, um positivo (suspensão bacteriana sem AgNP) e um negativo (solução coloidal de AgNP sem inoculação bacteriana). A análise foi então realizada em espectrofotômetro no comprimento de onda de 600 nm e estabelecida a concentração mínima capaz de inibir totalmente o crescimento bacteriano (MIC<sub>100</sub>). Após a determinação da MIC<sub>100</sub>, 20  $\mu$ L de cada poço foram removidos e inoculados em placas de ágar BHI e incubadas por 48H a 37 °C. A concentração bactericida mínima (MBC<sub>100</sub>) foi definida como a concentração mais baixa capaz de inativar todas as bactérias. Os ensaios foram realizados em triplicata.

### 3.6 ENSAIO DE SEMI-QUANTIFICAÇÃO DE BIOFILME

A análise semi-quantitativa da produção de biofilme seguiu a metodologia descrita por Kalil *et al.* (2019)<sup>69</sup>. Isolados de *E. faecalis* e *E. faecium*, foram inoculados em 3 mL de Caldo



Triptona de Soja (TSB), acrescido de 0,25% de glicose, e incubados a 37 °C até obtenção de densidade óptica de 0,2 (aproximadamente  $3 \times 10^8$  UFC/mL) em comprimento de onda de 595 nm. Em seguida, 200µL dessa suspensão bacteriana foram transferidos para microplacas estéreis e incubados a 37 °C por 24H, com diferentes concentrações de AgNP. Após a incubação, o conteúdo de cada poço foi aspirado e os poços foram lavados duas vezes com 200µL de PBS 0,01 mol/L pH 7,2.

As bactérias que permaneceram aderidas foram fixadas com 200µL de metanol durante 15 minutos. Após esse tempo, o metanol foi cuidadosamente descartado e os poços foram então corados por 5 min com 200µL de uma solução de violeta cristal estéril a 2%. Em seguida, os poços foram lavados três vezes com água destilada estéril. Por fim, foram então eluídos com 160µL de uma solução de ácido acético a 33%. Como controle negativo para este teste, foram utilizados poços com TSB 0,25% de glicose e sem inóculo. A absorbância de cada poço foi medida em um comprimento de onda de 595 nm. Para caracterizar a intensidade de formação do biofilme, utilizaram-se as seguintes equações, onde ODI indica a densidade óptica do isolado e ODNC representa a densidade óptica do controle negativo:  $ODI \leq ODNC$  = nenhum desenvolvimento de biofilme;  $ODI / ODNC \leq 2$  = formação fraca de biofilme;  $ODI / ODNC \leq 4$  = capacidade moderada de produção de biofilme;  $ODI / ODNC > 4$  = forte capacidade de produção de biofilme.<sup>70</sup>

### 3.7 INIBIÇÃO DA FORMAÇÃO DO BIOFILME POR AGNP

Para avaliar a capacidade da AgNP de interferir na formação do biofilme de *E. faecalis* e *E. faecium*, 100µL das suspensões bacterianas com uma DO de 0,2 e 100µL da AgNP, levando em consideração as concentrações de AgNP obtidas anteriormente de MIC<sub>100</sub> e MBC<sub>100</sub>, foram inoculados nos poços de uma microplaca estéril e incubado em 37°C por 24 h. Em seguida, o biofilme formado foi detectado conforme descrito no item de semi-quantificação e a porcentagem de inibição da produção de biofilme foi calculado considerando as suspensões bacterianas controle que não foram não incubadas com as nanopartículas.

A porcentagem de inibição da formação de biofilme foi calculada pela seguinte fórmula.<sup>98</sup>

$$\% \text{ inibição de biofilme} = \frac{1 - OD_{595} \text{ de } \textit{Enterococcus} \text{ tratada com extrato}}{OD_{595} \text{ de } \textit{Enterococcus} \text{ não tratado}} \times 100$$

### 3.8 ENSAIO DE INTERFERÊNCIA EM BIOFILME CONSOLIDADO

O ensaio de ação de AgNP em biofilme consolidado seguiu metodologia de Nostro *et al.* (2007)<sup>70</sup>. Os isolados de *E. faecalis* e *E. faecium* foram inoculados em três mL de TSB acrescidos de glicose 0,25% e incubados a 37 °C por 24 horas. As suspensões bacterianas foram padronizadas então em caldo TSB, com absorbância de 0.2 em comprimento de onda de 595nm. 200 µL dessas suspensões foram transferidas para os poços das microplacas e incubadas a 37 °C por 24H. Após a consolidação do biofilme, levando em consideração os resultados de concentrações obtidos anteriormente de MIC<sub>100</sub> e MBC<sub>100</sub>, 200uL de solução coloidal AgNP, em diferentes concentrações, foram inoculados nos poços com biofilme consolidado. Em seguida, as microplacas foram incubadas em estufa bacteriológica a 37 °C por 24 horas. O biofilme formado foi detectado após 24 horas e o grau de inibição do biofilme foi determinado tendo como base as suspensões bacterianas controle que não haviam sido incubadas com a AgNP.

### 3.9 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

A microscopia eletrônica de varredura foi usada para observar as alterações morfológicas de *E. faecalis* e *E. Faecium*, tratadas com AgNP, e foi realizado no laboratório de Microscopia Eletrônica da FIOCRUZ. Lamínulas contendo as culturas bacterianas tratadas ou não com AgNPs foram fixadas em glutaraldeído a 2,5% por 12H. Após a fixação, as lamínulas foram lavadas três vezes com tampão cacodilato de sódio 0,1mol/L, pH 7,4 durante 5 minutos cada. Em seguida, foi feita a pós-fixação com tetróxido de ósmio 1% em tampão cacodilato de sódio 0,1 mol/L por 30 minutos. A seguir, foi feita novamente três lavagens com tampão cacodilato de sódio 0,1M, por 5 minutos cada. Posteriormente, foi realizada a desidratação com imersão em etanol 30, 50, 70, 90 e 100%, alternando 10 minutos em cada uma delas. Ao final da desidratação, as amostras foram colocadas em *stubs* e submetidas à metalização em ouro para visualização no Microscópio Eletrônico de Varredura (Jeol JSM-6390-LV).

## 4 RESULTADOS

Esta seção apresenta os resultados obtidos. Com base no cumprimento dos objetivos estabelecidos para este estudo

### 4.1 AVALIAÇÃO DA SUSCETIBILIDADE ANTIMICROBIANA DE CÉLULAS PLANCTÔNICA DE *E. FAECALIS* E *E. FAECIUM* A AgNP

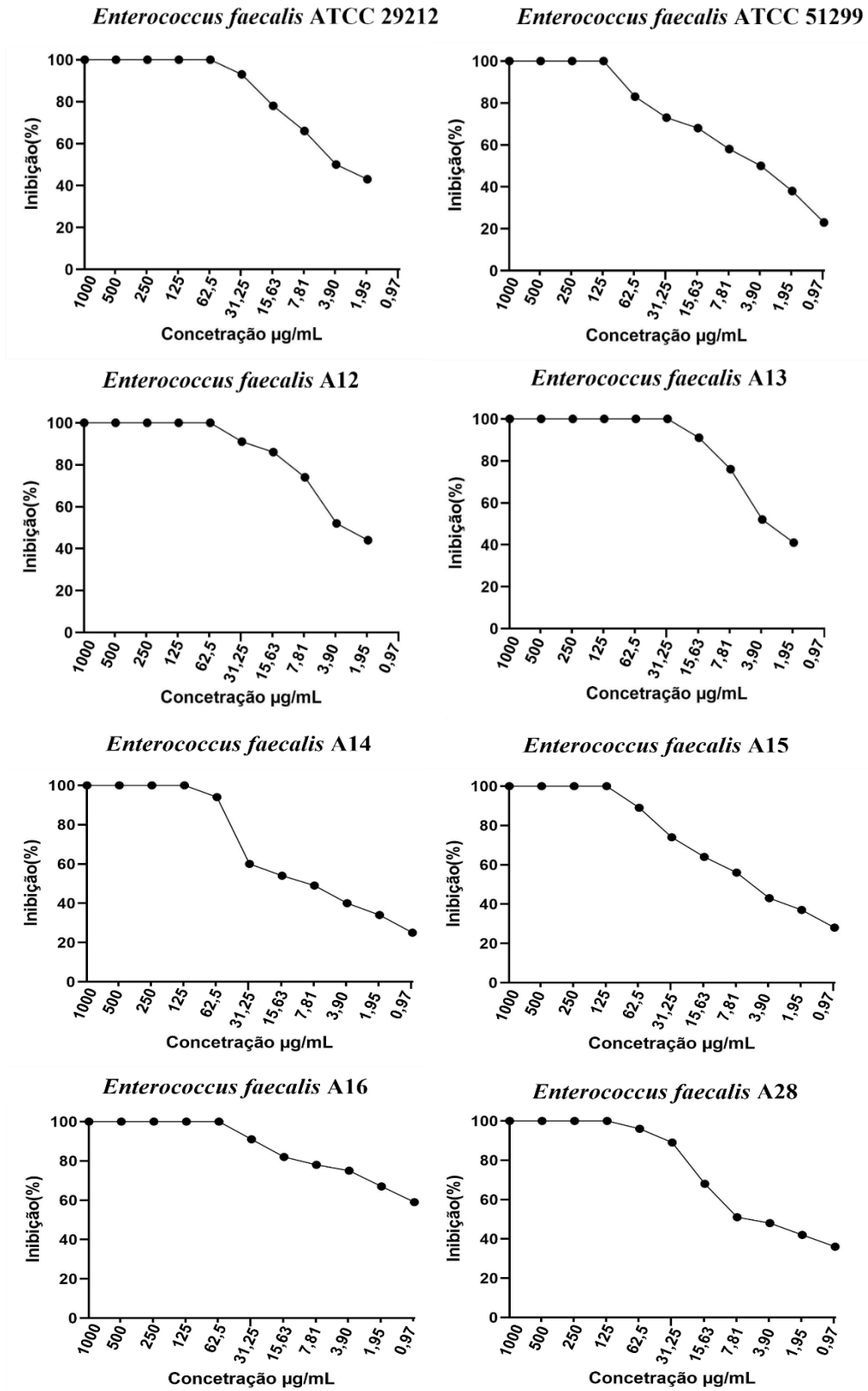
Mediante a utilização do Biotyper, foi possível identificar 09 (nove) isolados clínicos como *E. faecalis* e 07 (sete) como *E. faecium*. A avaliação da atividade antimicrobiana de AgNP contra *E. faecalis* e *E. faecium*, usando a metodologia de microdiluição em caldo, demonstrou uma inibição de crescimento da maioria dos isolados em concentrações entre 7,81 e 125 µg/mL. Um isolado clínico de *E. faecium* não demonstrou inibição total do crescimento quando tratada com AgNP (**Tabela 1**).

Os valores da ação bactericida das AgNP variaram entre 31,25 e 500 µg/mL (**Tabela 1**). As AgNP não tiveram ação bactericida sobre *E. faecium* ATCC 6965 e o isolado clínico *E. faecium* A05, nas concentrações testadas neste estudo (**Tabela 1**). Curvas de cinética de MIC<sub>100</sub> foram criadas para visualizar a ação antibacteriana de AgNP em diferentes concentrações nas cepas identificadas (**Figuras 11,12 e 13**). Um resumo comparativo dos perfis de sensibilidade está representado nas **Figuras 14 e 15**.

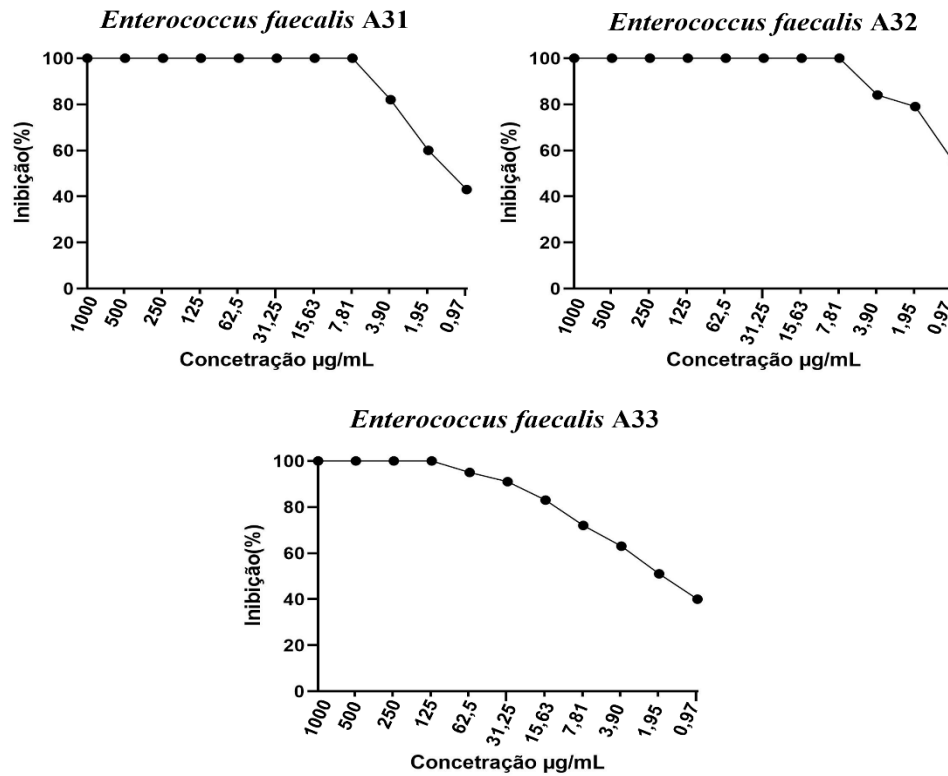
**Tabela 1** - Perfil de sensibilidade de cepas de referência e isolados clínicos de *E. Faecalis* e *E. faecium* a AgNPs.

<b>Cepas Referência e Isolados Clínicos</b>	<b>MIC<sub>100</sub> (µg/mL)</b>	<b>MBC<sub>100</sub> (µg /mL)</b>
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	62,5	62,5
<i>E. faecalis</i> ATCC 51299	125	500
<i>E. faecalis</i> A12	62,5	125
<i>E. faecalis</i> A13	125	250
<i>E. faecalis</i> A14	125	250
<i>E. faecalis</i> A15	125	250
<i>E. faecalis</i> A16	62,5	125
<i>E. faecalis</i> A28	125	500
<i>E. faecalis</i> A31	7,81	31,25
<i>E. faecalis</i> A32	7,81	31,25
<i>E. faecalis</i> A33	125	250
<i>E. faecium</i> ATCC 6965	125	-
<i>E. faecium</i> A01	125	250
<i>E. faecium</i> A05	-	-
<i>E. faecium</i> A08	62,5	62,5
<i>E. faecium</i> A13A	31,25	31,25
<i>E. faecium</i> A17	62,5	125
<i>E. faecium</i> A25	125	250
<i>E. faecium</i> A27	125	500

**Figura 11** - Curvas de inibição de crescimento de cepas de *E. faecalis* expostas a diferentes concentrações de AgNP



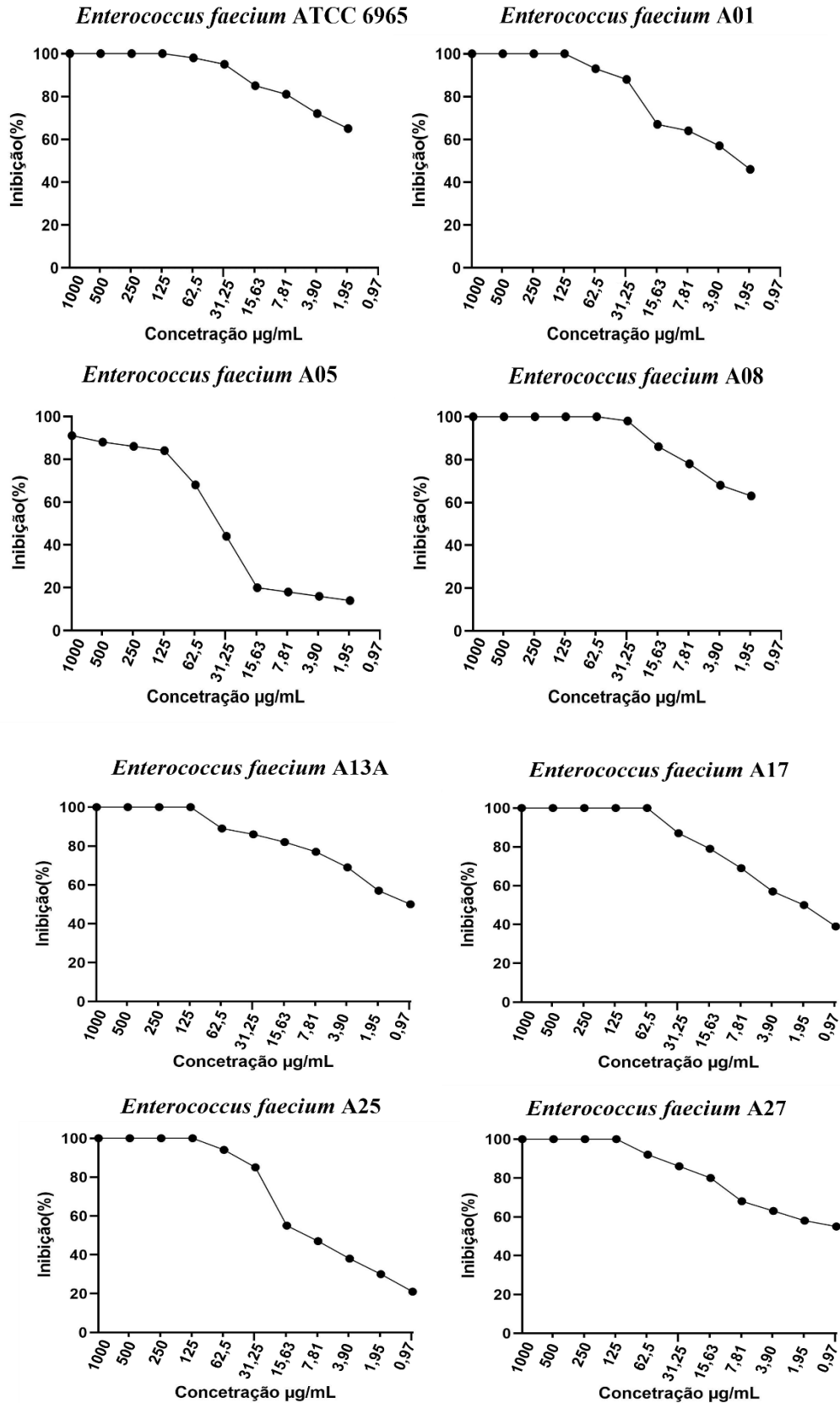
**Figura 12** - Curvas de inibição de crescimento de cepas de *E. faecalis* expostas a diferentes concentrações de AgNP



**Legenda:** os resultados expressam a média das inibições de crescimento, em porcentagem, obtidas por três experimentos independentes.

**Fonte:** dados da pesquisa.

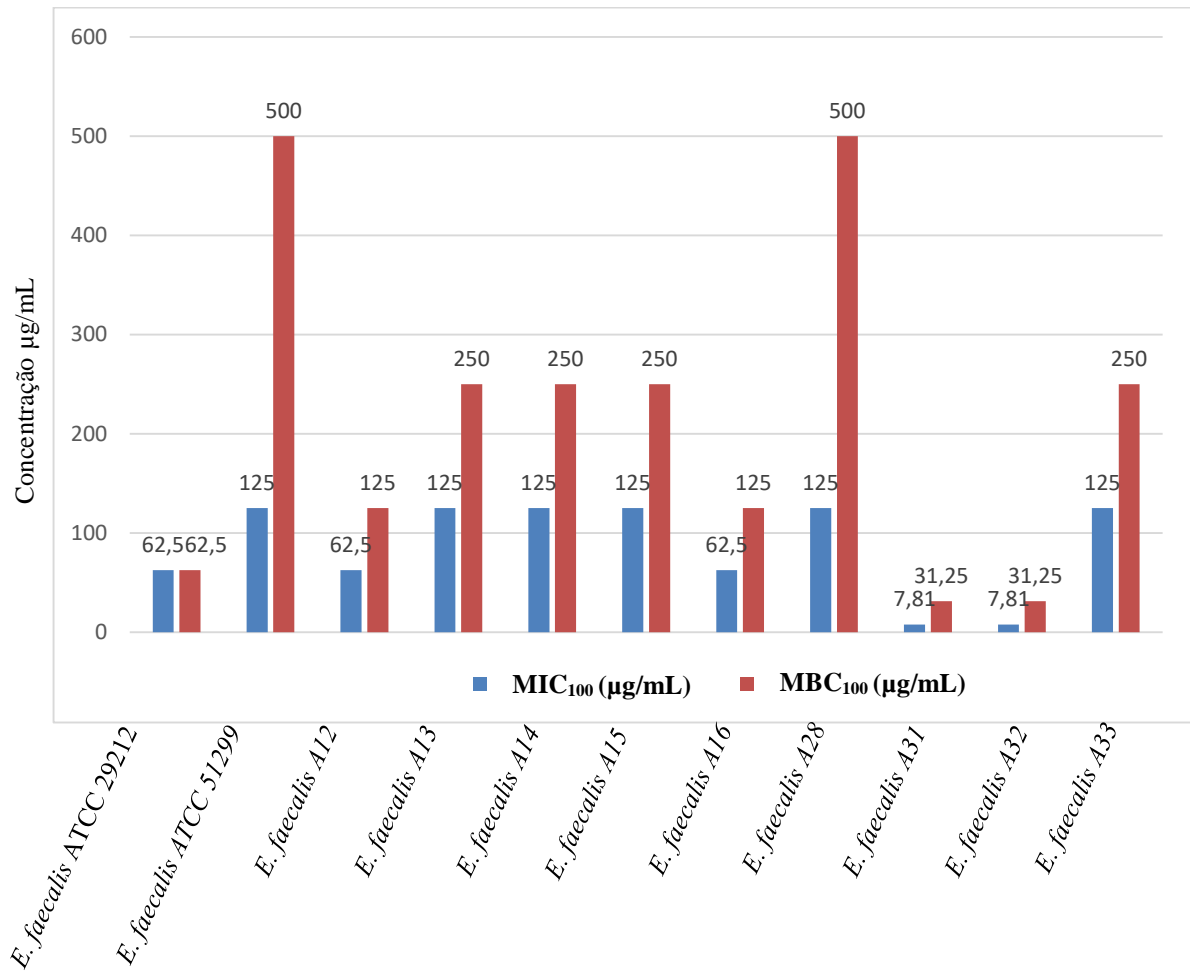
**Figura 13.** Curvas de inibição de crescimento de cepas de *E. faecalis* expostas a diferentes concentrações de AgNP (continuação).



**Legenda:** os resultados expressam a média das inibições de crescimento, em porcentagem, obtidas por três experimentos independentes.

**Fonte:** dados da pesquisa.

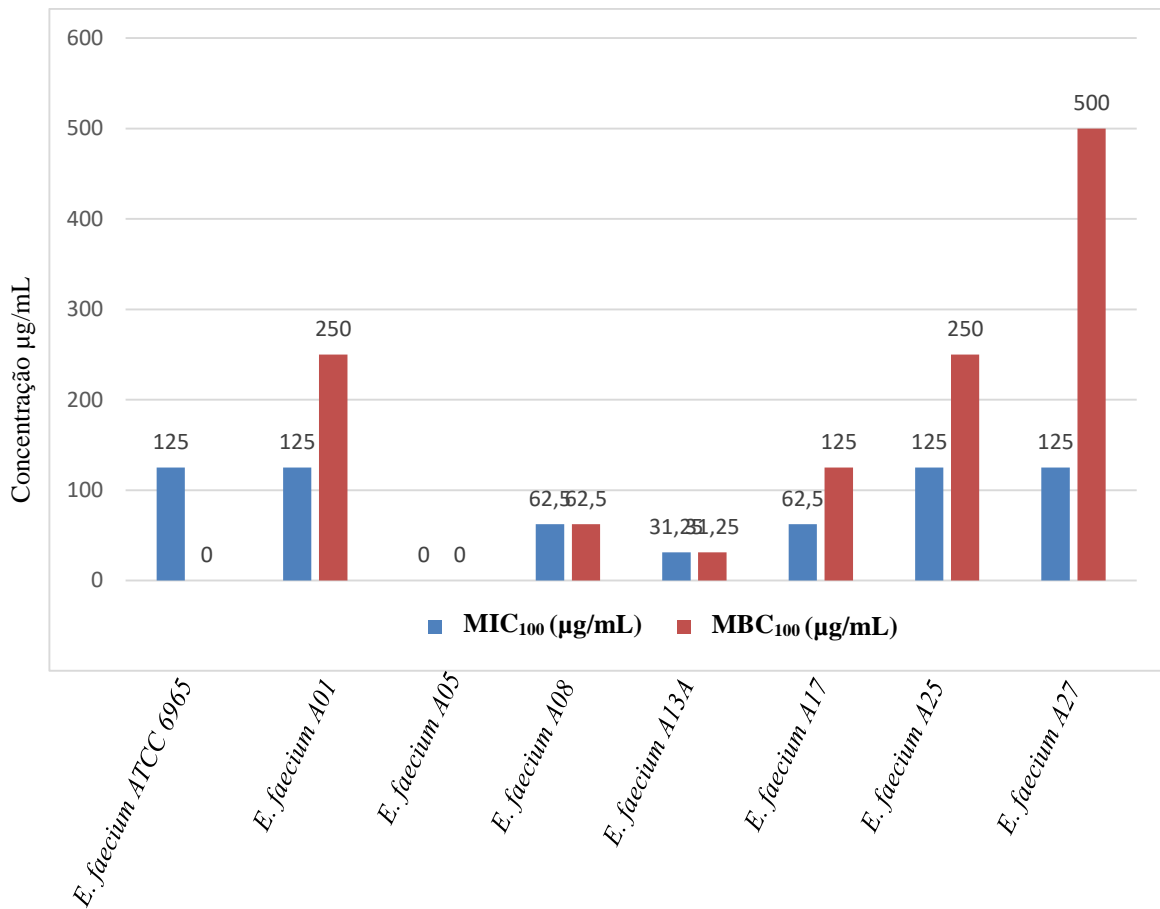
**Figura 14.** Perfil de sensibilidade de cepas de referência e isolados clínicos de *E. faecalis* a nanopartículas de prata.



**Fonte:** dados da pesquisa.



**Figura 15.** Perfil de sensibilidade de cepas de referência e isolados clínicos de *E. faecium* a nanopartículas de pratas biogênicas.



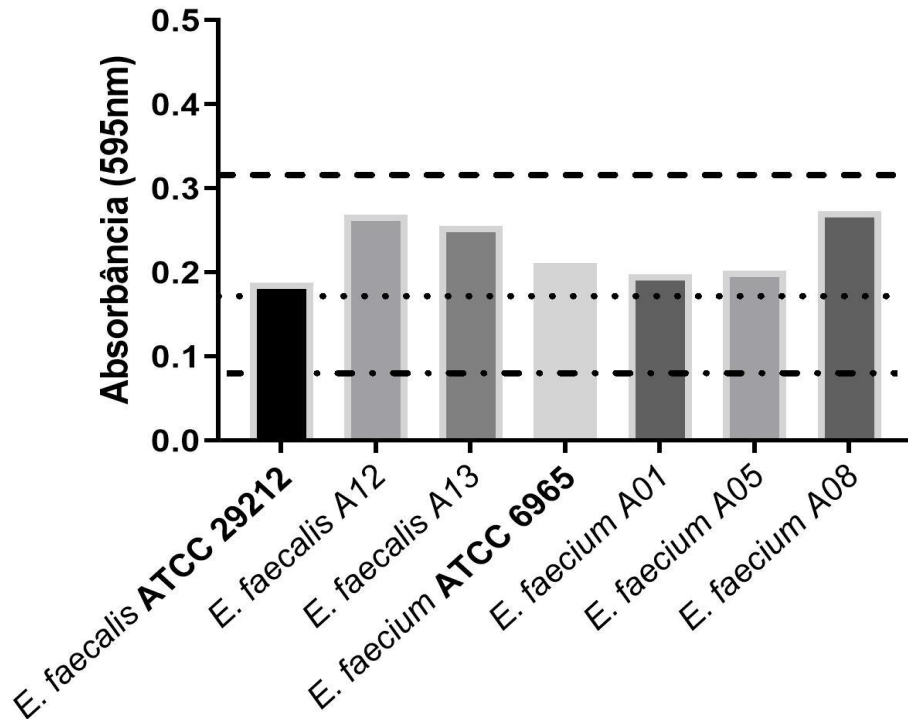
**Fonte:** dados da pesquisa.

#### 4.2 DETECÇÃO DA FORMAÇÃO DE BIOFILME EM MICROPLACA DE CULTIVO

Um total de sete amostras de *E. faecalis* e *E. faecium*, escolhidas aleatoriamente, foi utilizado no experimento e classificado como formadores de biofilme. Para caracterizar a intensidade da formação de biofilme entre as cepas de referência, a OD595 do controle negativo foi de 0,08 nm. As bactérias com OD595, entre 0,08 e 0,16 nm, foram consideradas fracas produtoras de biofilme. Se OD595 se apresentou entre 0,16 e 0,32 nm, as bactérias foram consideradas uma moderada produção de biofilme; e OD595 > 0,32 foram caracterizados como fortes produtores de biofilme, conforme metodologia descrita por Nostro *et al.* (2007). Nesse experimento, todas as cepas foram consideradas moderadas produtoras de biofilme (**Figura 16**). A cepa *E. faecalis* ATCC 29212 teve o menor resultado com relação à produção de biofilme. O isolado clínico *E. faecium* A08 se mostrou como o maior

produtor de biofilme.

**Figura 16.** Semiquantificação da formação de biofilme por cepas de referência e isolados clínicos de *E. faecalis* e *E. faecium*.



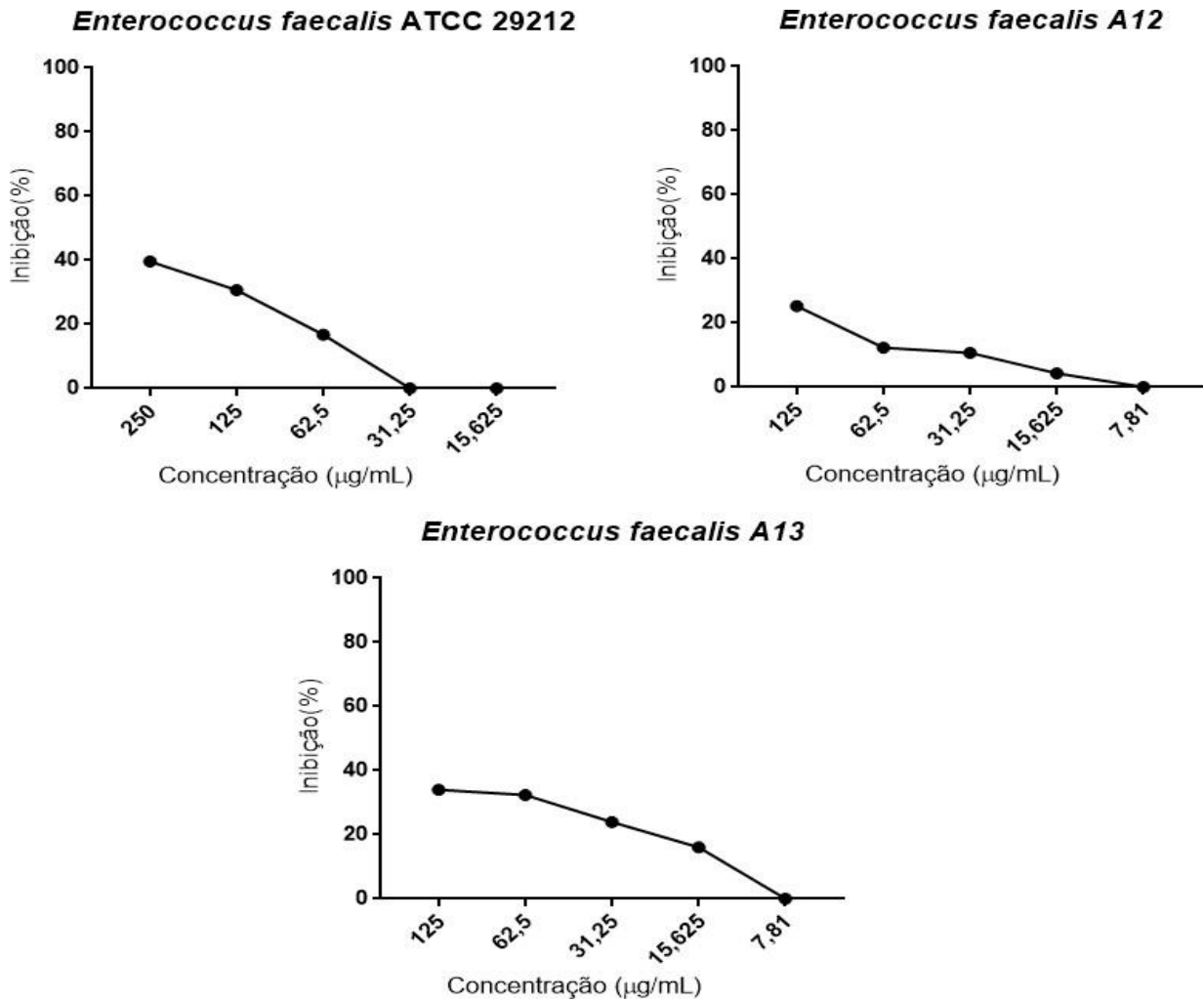
**Legenda:** a linha tracejada indica o valor médio do controle negativo ( $DO_{595} = 0.08$ ), fraca produção de biofilme ( $DO_{595} < 0.16$ ), moderada produção de biofilme ( $0.16 < DO_{595} < 0.32$ ) e forte produção de biofilme ( $DO_{595} > 0.32$ ).

**Fonte:** dados da pesquisa.

#### 4.3 INTERFERÊNCIA DE AGNP NA FORMAÇÃO DE BIOFILME DE *E. faecalis* E *E. faecium*

O teste de interferência na formação de biofilme em 24 horas de incubação constatou que as AgNP foram capazes de interferir com a formação de biofilme em todos os isolados e cepas testados. Para *E. faecalis*, o máximo de interferência detectada foi de 40% para a cepa referência, e para *E. faecium* de cerca de 55%, também para a cepa ATCC (**Figuras 17 e 18**).

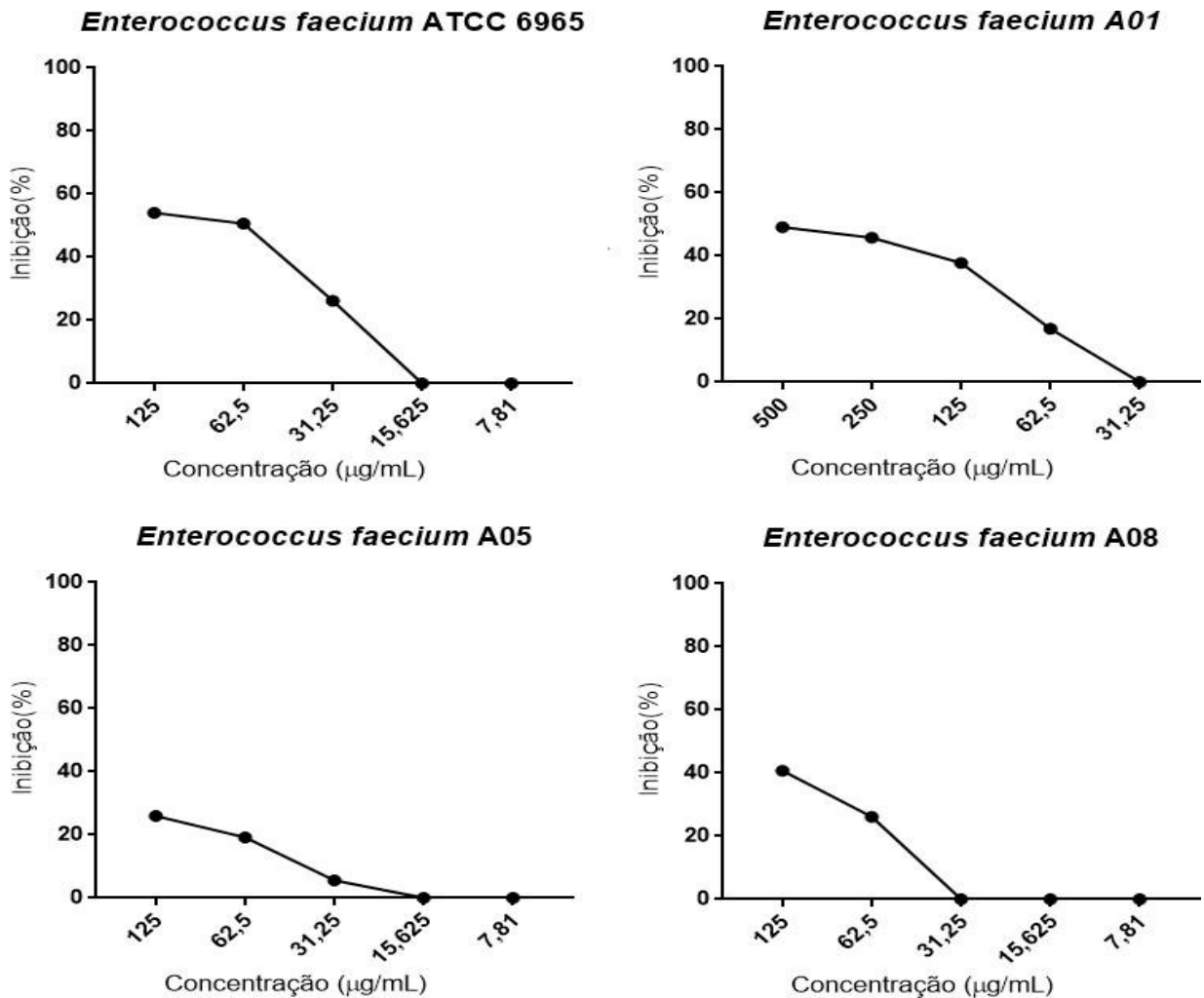
**Figura 17.** Inibição da formação de biofilme por *E. faecalis* induzida por AgNP.



**Legenda:** os resultados são expressos em porcentagens relativas ao controle, e correspondem à média de quatro experimentos independentes.

**Fonte:** dados da pesquisa.

**Figura 18.** Inibição da formação de biofilme por *E. faecium* induzida por AgNP.



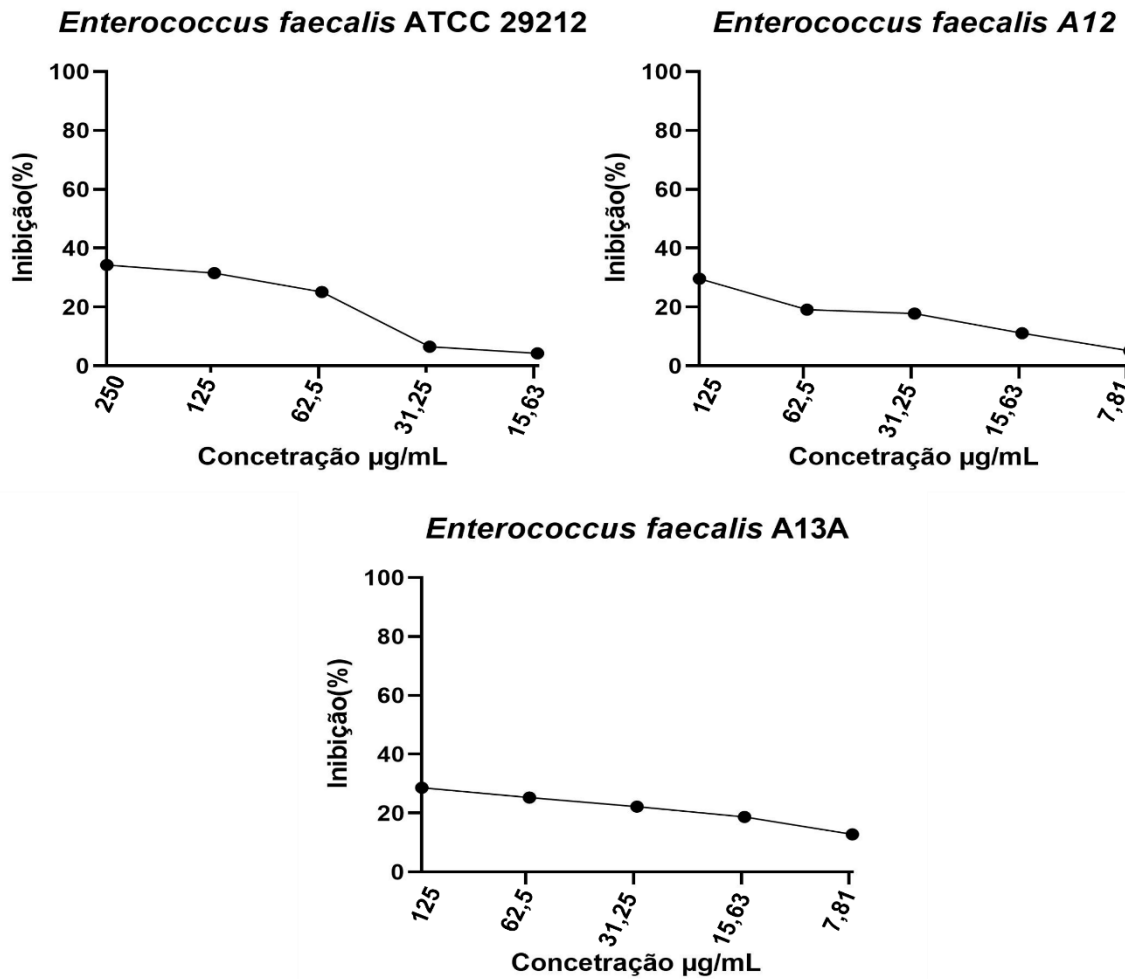
**Legenda:** os resultados são expressos em porcentagens relativas ao controle, e correspondem à média de quatro experimentos independentes.

**Fonte:** dados da pesquisa.

#### 4.4 ENSAIO DE INTERFERÊNCIA DE AGNP EM BIOFILME CONSOLIDADO

O teste de interferência no biofilme consolidado em 24 horas de incubação ~~em~~ que as AgNP foram capazes de interferir no biofilme consolidado em todos os isolados e cepas testados. Para *E. faecalis*, o máximo de interferência detectada foi de 34,3%, para a cepa referência; e para *E. faecium*, foi de cerca de 41,16%, para o isolado clínico A05 (**Figuras 19 e 20**).

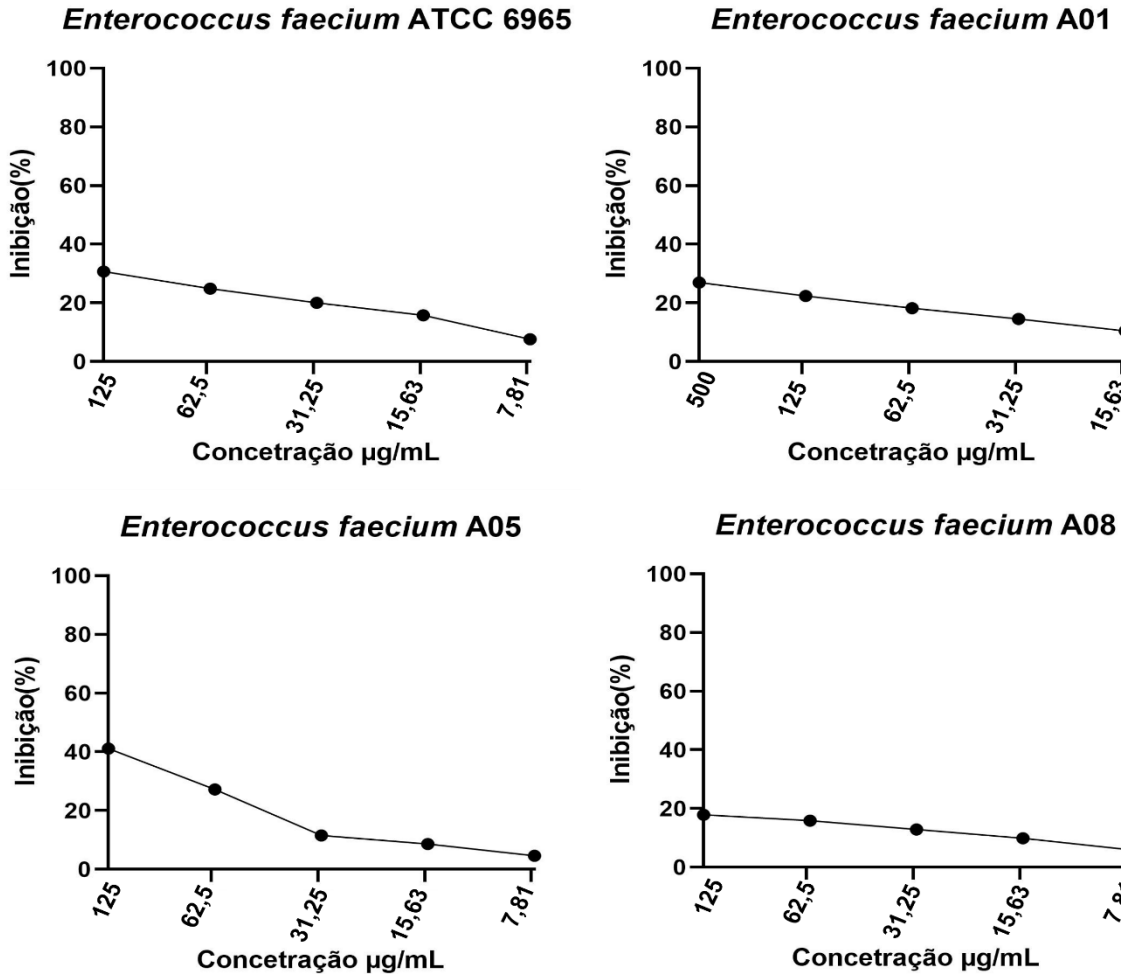
**Figura 19.** Inibição no biofilme consolidado por *E. faecalis* induzida por AgNP.



**Legenda:** os resultados são expressos em porcentagens relativas ao controle, e correspondem à média de quatro experimentos independentes.

**Fonte:** dados da pesquisa.

**Figura 20.** Inibição no biofilme consolidado por *E. faecium* induzida por AgNP.



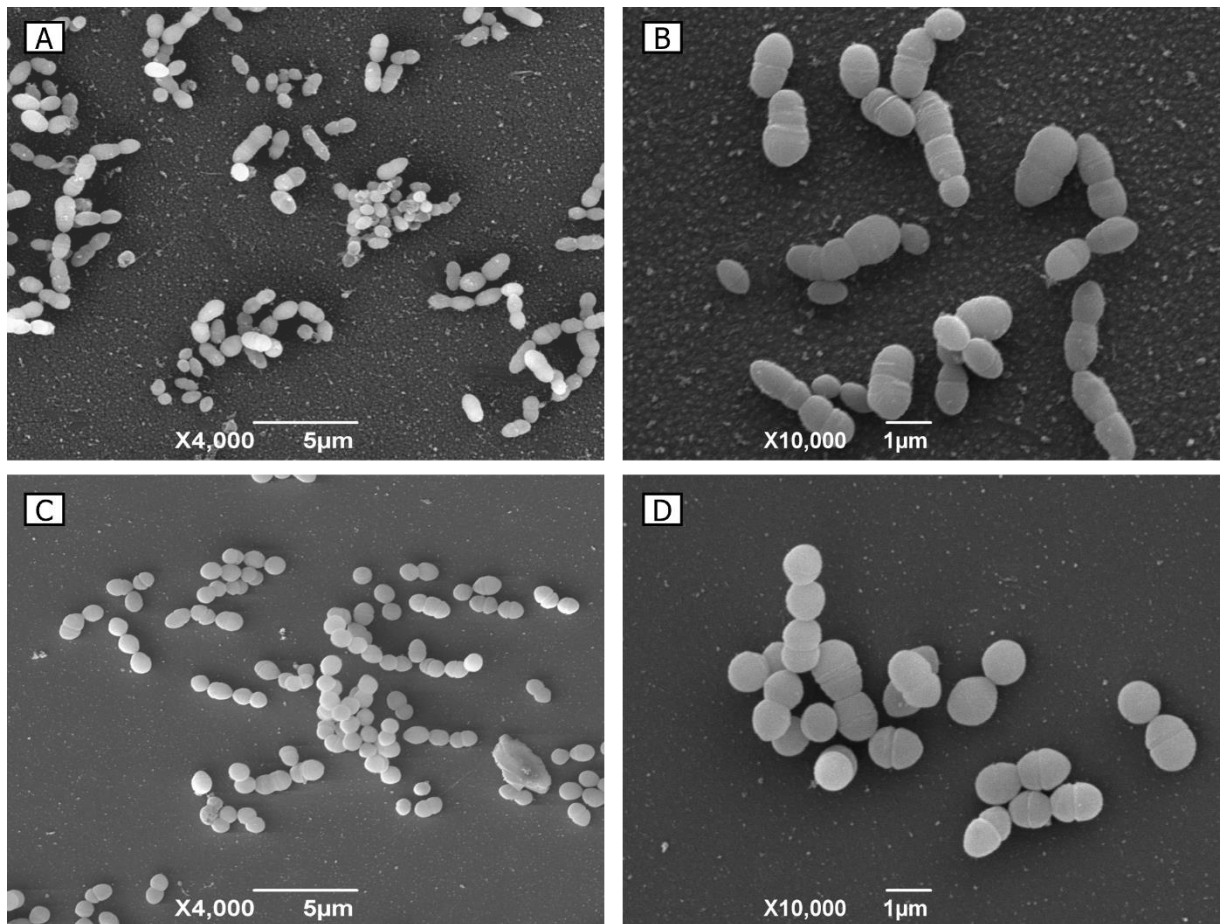
**Legenda:** os resultados são expressos em porcentagens relativas ao controle, e correspondem à média de quatro experimentos independentes.

**Fonte:** dados da pesquisa.

#### 4.5 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

Uma análise de microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi realizada para avaliar os efeitos de AgNP na morfologia das bactérias aqui estudadas. *E. faecalis* ATCC 29212 e *E. faecium* ATCC 6965, tratados sem AgNP (grupo controle), apresentaram uma morfologia celular em formato de cocos, em pares ou em cadeias curtas, exibindo uma superfície celular aparentemente intacta (**Figura 21**).

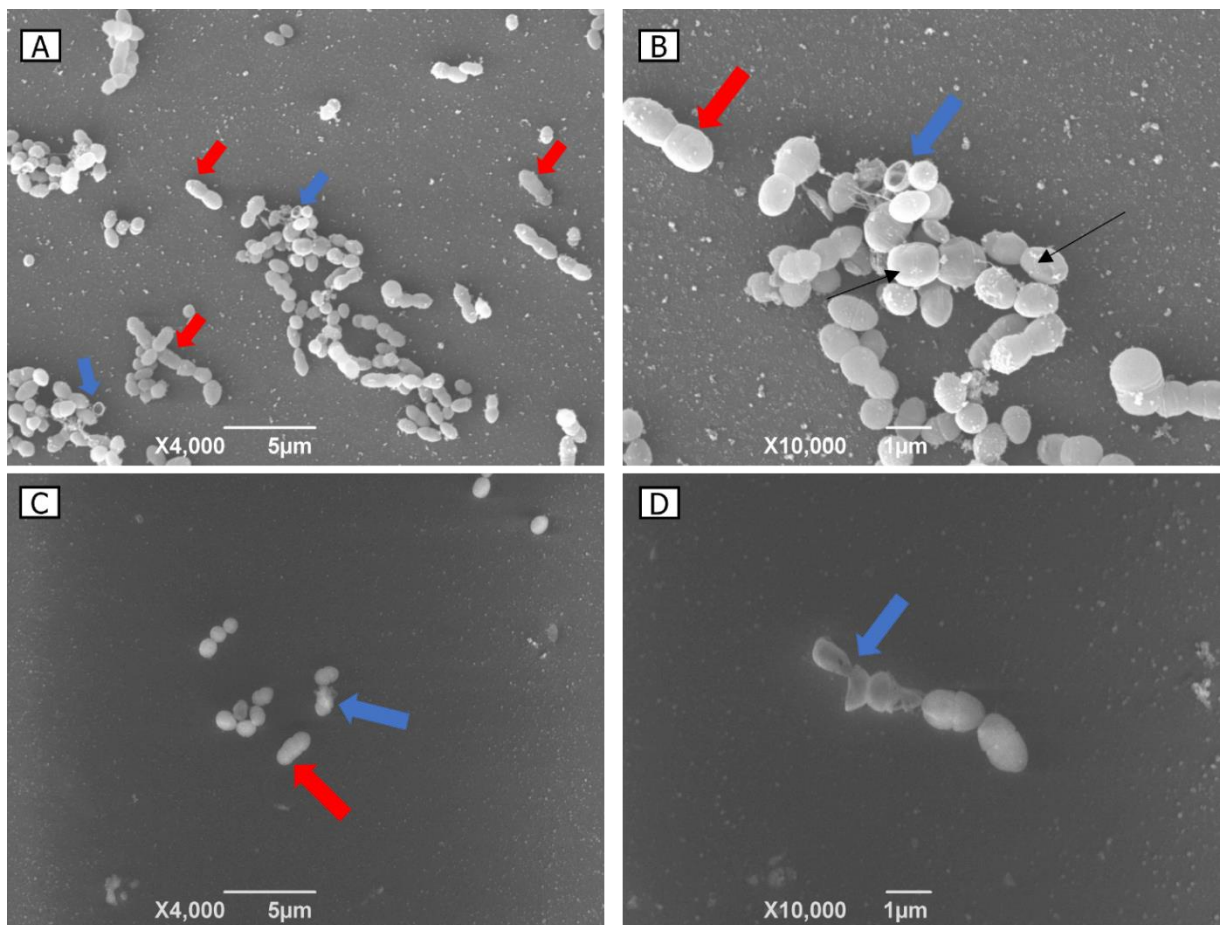
**Figura 21.** Análise por microscopia eletrônica de varredura (MEV) de *E. faecalis* (A e B) e *E. faecium* (C e D) cultivados na ausência de AgNP.



**Legenda:** as barras de escala são indicadas na parte inferior de todas as figuras.  
**Fonte:** arquivo fotográfico da autora.

A análise do MEV revelou que os AgNP causaram danos à superfície em ambas as cepas analisadas. Após tratamento e incubação com as AgNP, com concentrações correspondentes ao MIC<sub>100</sub> (**Figura 20**), 2x MIC<sub>100</sub> (**Figura 21**) e 4x MIC<sub>100</sub> (**Figura 22**), as cepas *E. faecalis* ATCC 29212 e *E. faecium* ATCC 6965 apresentaram alterações na morfologia celular, expondo restos celulares sem morfologia definida, assim como partículas de AgNP aderidas na superfície celular. Alterações celulares foram observadas pelo aumento do tamanho celular, além da alteração do formato oval para uma forma mais alongada. (**Figura 22, 23 e 24**).

**Figura 22.** Análise por microscopia eletrônica de varredura (MEV) de isolados de *E. faecalis* (A e B) e *E. faecium* (C e D) tratadas com AgNP, em uma concentração correspondente ao MIC<sub>100</sub>.

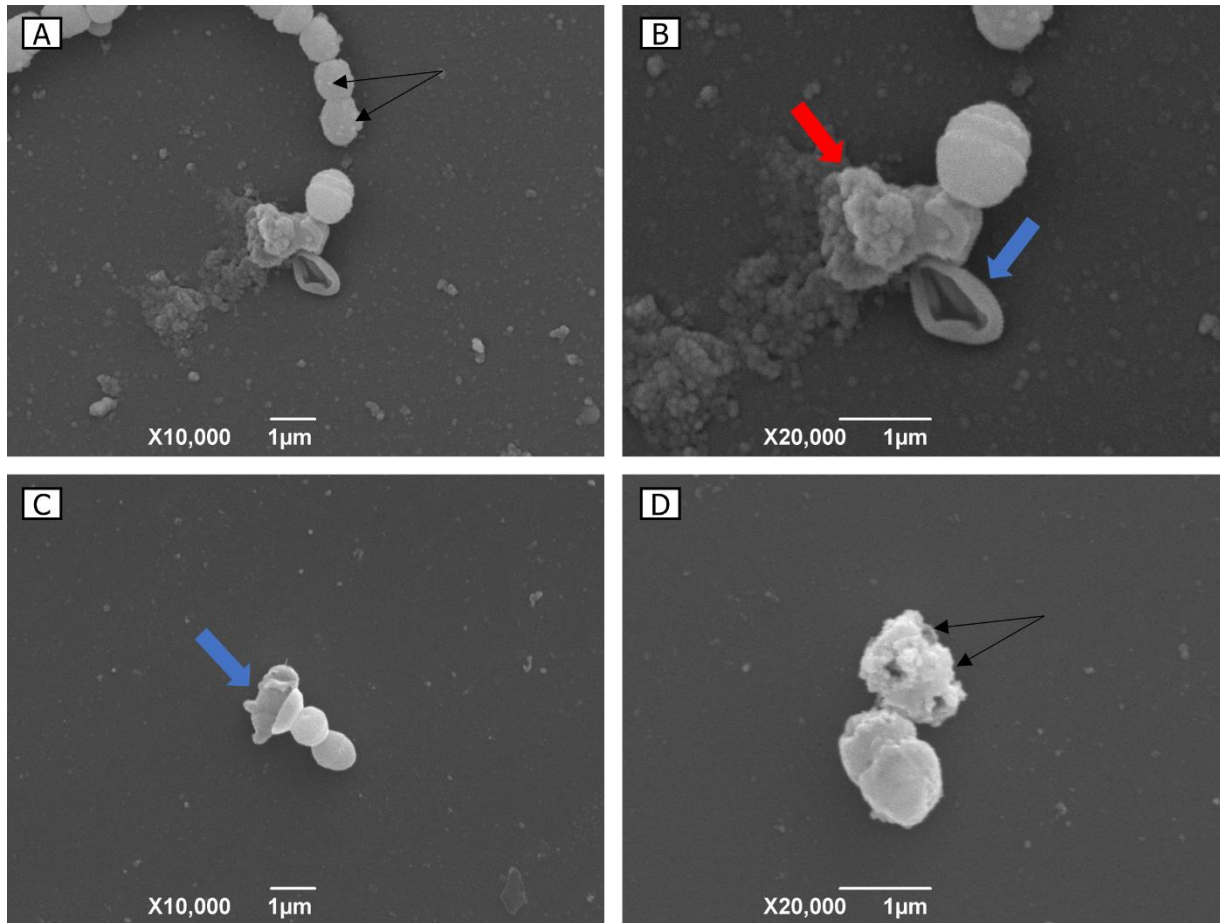


**Legenda:** as setas vermelhas representam alterações na morfologia celular. As setas azuis mostram a biomassa residual das bactérias lisadas após o tratamento com as AgNP. As setas pretas, indicam possíveis partículas de AgNP aderidas na superfície celular. As barras de escala são indicadas na parte inferior de todas as figuras

**Fonte:** arquivo fotográfico da autora.



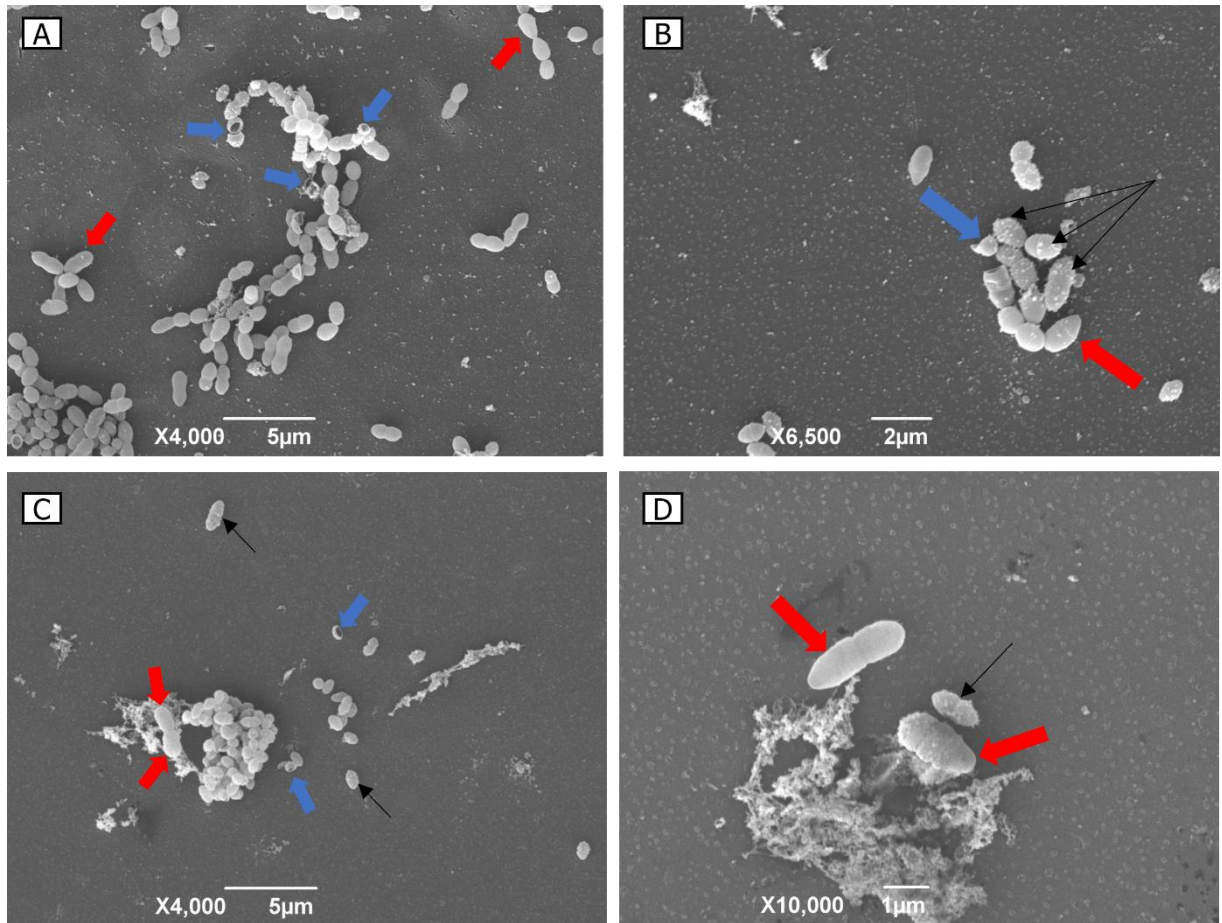
**Figura 23.** Análise por microscopia eletrônica de varredura (MEV) de *E. faecalis* (A e B) e *E. faecium* (C e D) tratadas com AgNP em uma concentração correspondente a  $2X MIC_{100}$ .



**Legenda:** As setas vermelhas indicam destruição celular. As setas azuis indicam biomassa residual das bactérias lisadas após o tratamento com as AgNP. As setas pretas indicam possíveis partículas de AgNP aderidas na superfície celular. As barras de escala são indicadas na parte inferior das figuras.

**Fonte:** arquivo fotográfico da autora.

**Figura 24.** Análise por microscopia eletrônica de varredura (MEV) de *E. faecalis* (A e B) e *E. faecium* (C e D) tratadas com AgNP, em uma concentração correspondente a 4x MIC<sub>100</sub>.



**Legenda:** as setas vermelhas representam as alterações na morfologia celular. As setas azuis mostram a biomassa residual das bactérias lisadas após o tratamento com as AgNP. As setas pretas, indicam possíveis partículas de AgNP aderidas na superfície celular. As barras de escala são indicadas na parte inferior de todas as figuras.

**Fonte:** arquivo fotográfico da autora.

## 5 DISCUSSÃO

Devido a sua bem descrita atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, as nanopartículas associadas a metais têm sido propostas como alternativa aos antibióticos tradicionais para superar o problema da resistência bacteriana. As nanopartículas usam múltiplos mecanismos de ação diferentes dos antibióticos clássicos, com a vantagem de serem ativos contra bactérias que já desenvolveram resistência.

Estudos *in vitro* demonstraram que AgNP podem causar citotoxicidade em algumas células humanas, como células epiteliais, macrófagos, glóbulos vermelhos, hepatócitos, especificamente aquelas com tamanhos  $\leq 10$  nm. O efeito tóxico das AgNP foi descrito como dependente do tamanho, do tempo e da dose.<sup>61, 62,71,72</sup> Liu *et al.* (2010) investigaram a citotoxicidade de três nanopartículas de prata (5nm, 20nm e 50nm), usando quatro linhagens de células humanas (A549, SGC-7901, HepG2 e MCF-7). As partículas de 5nm exibiram maiores alterações morfológicas, danos na membrana celular, geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) e interrupção do ciclo celular e apoptose celular. Os resultados também mostraram que AgNP, com o tamanho de 5nm, poderiam penetrar nas células muito mais facilmente em comparação com as de 20nm. A reatividade biológica de partículas menores é maior e pode levar a uma maior toxicidade. O tamanho da nanopartícula utilizado neste estudo foi de 28nm, o que demonstrou baixo poder de citotoxicidade; apesar de esse aspecto não ser testado neste estudo, já foi descrito anteriormente que essas mesmas partículas não induziram efeito tóxico, quando administradas em feridas cirúrgicas de ovinos.<sup>71, 74, 75, 76,77</sup>

É importante ressaltar que a toxicidade está sempre relacionada à dose e à duração do contato. O contato direto com a cavidade oral, dentes e tecidos circundantes é uma consideração importante devido aos efeitos potencialmente prejudiciais do tratamento com AgNP em aplicações endodônticas.<sup>100</sup> Chan *et al.* (2015) avaliaram efeito citotóxico de uma nova partícula de nanop prata (25,2±6,5 nm) como irrigante endodôntico (0,2 mM), em comparação com o hipoclorito de sódio a 3%, e concluíram que o novo irrigante de nanopartículas de prata não foi citotóxico nos ensaios utilizados e que a resposta à exposição ao hipoclorito de sódio e uma nova nanopartícula de pratas foi semelhante. Corroborando esses resultados, Mahmoud *et al.* (2022) realizaram um estudo em células da polpa dentária humana e constataram que a citotoxicidade da AgNP em gel foi comparável àquela com hidróxido de cálcio, sugerindo que AgNP pode representar um candidato promissor para uso clínico em Endodontia regenerativa.

Os microrganismos referências *Enterococcus faecalis* ATCC 51299 e o *Enterococcus faecium* ATCC 6965 foram escolhidos como controle nesta pesquisa, por estarem disponíveis no banco de dados biológicos de microrganismo do grupo de pesquisa de Biotecnologia Aplicada à Saúde Animal. A escolha do microrganismo referência *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 decorreu por ser uma cepa sensível à vancomicina e por ter sido amplamente utilizada como uma cepa de controle para experimentos clínicos e laboratoriais. *E. faecalis* ATCC 29212 é um isolado da urina humana e é usado como cepa de controle para avaliar a qualidade de meios de cultura microbiológicos preparados comercialmente e testes de suscetibilidade de patógenos a antibióticos.<sup>99</sup>

Esta pesquisa utilizou cepas referência e isolados clínicos de *E. faecalis* e *E. Faecium*, obtidos de canais infectados. Sánchez-Sanhueza *et al.* (2015)<sup>78</sup>, por meio de uma identificação fenotípica, determinaram que, dentre as amostras coletadas dos canais radiculares, 83/84 (98%) das cepas selecionadas correspondiam a *E. faecalis*, o que foi confirmado por PCR. O *E. faecium* (2%) foi a única cepa com diferentes características e identificada por meio de testes fenotípicos e moleculares. Conforme uma revisão sistemática e uma metanálise realizado por Nardello *et al.* (2022)<sup>79</sup>, as espécies mais frequentes nas amostras pós-instrumentação são *Streptococcus spp.*, *Leptotrichia buccalis*, *Fusobacterium nucleatum* e *Capnocytophaga ochracea*. A frequência de detecção de algumas espécies aumentou após tratamento, incluindo principalmente membros de *Firmicutes*, como *Streptococcus*, *E. faecium*, *Selenomonas noxia* e *Solobacterium moorei*, determinando assim a importância de *E. faecium* em casos recorrentes. Em estudo com o objetivo de investigar a composição da microbiota do canal radicular em insucessos endodônticos, pela identificação e quantificação dos microrganismos, Murad *et al.* (2014)<sup>80</sup> determinaram que *E. faecium* e *Staphylococcus epidermidis* foram as espécies mais prevalentes (presentes em 37% das amostras), apresentando proporções elevadas. *Eubacterium saburreum*, *Parvimonas micra*, *Leptotrichia buccalis*, *E. faecalis* e *Staphylococcus warneri* estiveram presentes em 28% dos canais radiculares avaliados, mas suas contagens gerais foram moderadas. Em concordância, Ferreira *et al.* (2015)<sup>34</sup> identificaram nas amostras coletadas o *E. faecium* (60%) como a espécie mais frequente detectada, após a instrumentação, e 40%, após o tratamento do canal radicular, com a medicação intracanal. A frequência mais alta de isolamento de *E. faecium* do que em estudos anteriores pode ser relacionada ao fato de que alguns isolamentos foram obtidos de pessoas com tratamentos recorrentes; e, como indicado anteriormente, essa espécie se torna mais frequente nesse tipo de infecção.

O presente estudo avaliou o efeito antibacteriano de AgNP sintetizada a partir de

biomassa do fungo *Fusarium oxysporum*. Para uma análise da ação de AgNP em *E. faecalis* e *E. faecium*, foram determinadas as concentrações inibitórias mínimas (MIC<sub>100</sub>), as concentrações bactericidas mínimas (MBC<sub>100</sub>) e os efeitos antimicrobianos em células planctônicas e no biofilme. Os resultados do teste de sensibilidade em microdiluição em caldo confirmou que as AgNPs demonstraram eficácia na inibição do crescimento de todas as cepas referências e isolados clínicos, em concentrações diferentes, mas não foi 100% eficaz para uma cepa referência e um isolado clínico de *E. faecium*. Esta descoberta concorda com estudos que mostram a eficácia de outros tipos de AgNP contra esses mesmos microrganismos, enfatizando assim que as AgNP biogênicas surgem como um novo agente antimicrobiano para desinfecção endodôntica.<sup>81,82</sup> Parvekar *et al.* (2020)<sup>83</sup>, utilizando os mesmos métodos para confirmar a eficácia antimicrobiana de AgNP sintetizadas de diferentes formas, comprovaram que elas têm potencial efeitos bactericidas contra *S. Aureus*, na concentração de 0,625 mg/ml, podendo assim ser incorporadas nos medicamentos do canal radicular, cimentos e irrigantes. Já Chávez-Andrade *et al.* (2019)<sup>84</sup> avaliaram a atividade antimicrobiana de nanopartículas de prata revestidas contra *E. faecalis*, *Candida albicans* e *Pseudomonas aeruginosa*, confirmando o efeito bactericida do nanocompósito contra os microrganismos testados. Bruniera *et al.* (2020)<sup>85</sup> verificou as propriedades antibacterianas de AgNP contra espécie frequentemente associadas a infecções endodônticas, tais como *E. coli* ATCC 25922, *E. faecalis* NCTC 775, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Streptococcus mutans* ATCC 25175, mostraram efeito bactericida e atividades bacteriostáticas em diferentes valores. Entretanto, quando utilizada como substância irrigadora, uma solução dessas nanopartículas não foi tão eficaz contra *E. Faecalis*, em comparação com o hipoclorito de sódio (NaOCl), que é apropriado como irrigante devido a sua capacidade de ruptura do biofilme e na eliminação de bactérias em biofilmes e em túbulos dentinários.<sup>86</sup> A combinação de irrigação de nanopartículas de prata com aplicação do laser Nd:YAG teve efeitos na redução de colônias microbianas de *E. faecalis*, destacando o potencial deste método na diminuição da carga microbiana, no interior do canal radicular.<sup>87</sup>

A combinação de AgNP com outras substâncias foi avaliada por Nayyar *et al.* (2021)<sup>88</sup>, que utilizaram AgNP isoladas e com hidróxido de cálcio e clorexidina contra *E. faecalis*, sendo verificado um efeito antibacteriano maior na combinação de AgNP com esses medicamentos, em comparação às AgNP isoladas. Isso demonstra que procedimentos desinfetantes podem ser conduzidos em associação com as nanopartículas de prata aqui testadas, o que poderia aumentar sua atividade.

Esta pesquisa também quantificou a formação de biofilme em superfície abiótica por cepas de referência e isolados clínicos de *E. faecalis* e *E. faecium*, confirmando assim a formação do biofilme. Todas as cepas analisadas foram consideradas formadoras moderadas de biofilme. A formação de biofilme de 47 diferentes isolados bacterianos aeróbicos e anaeróbicos, pertencentes a 32 espécies diferentes previamente isoladas de canais radiculares infectados, foi estudada. Como resultado, foi comprovado que bactérias aeróbicas, sendo 7 isolados que compreenderam a espécies *E. faecalis*, *S. anginosus*, *S. oralis*, *M. osloensis* e *E. corrodens*, não formaram biofilmes; 8 isolados pertencentes às espécies *E. faecalis*, *S. mutans*, *S. constellatus*, *L. rhamnosus*, *L. casei* e *Lactobacillus gasseri* foram considerados produtores moderados de biofilme; 5 isolados das espécies *E. faecalis*, *S. mutans*, *L. fermentum*, *A. naeslundii*, e *A. viscosus*, foram caracterizadas como forte produtores de biofilme.<sup>46</sup> O mesmo protocolo de quantificação foi utilizado por Albaghdadi *et al.* (2021)<sup>89</sup>, com o objetivo de caracterizar biofilmes formados por várias espécies de *Prevotella*, sendo constatado que *Prevotella loescheii*, *Prevotella oralis* e *Prevotella nigrescens* apresentaram grande formação de biofilme. Xu *et al.* (2016)<sup>90</sup> utilizou *S. aureus*, concluindo que a maioria das cepas estudadas foram formadoras fracas de biofilmes (mais de 75,0%), alguns formadores moderados de biofilmes e muito poucos formadores fortes de biofilmes (2,0–5,0%). Em outro estudo, do total de 12 linhagens testadas, 8 (66,7%) foram classificadas como fortes formadoras de biofilme, 2 (16,7%) como fracas formadoras e 2 (16,7%) como não formadoras. Considerando somente as bactérias Gram-positivas, 33,3% foram classificadas como não produtoras de biofilme. O percentual foi igual para fracas produtoras, *S. aureus* e *S. pneumoniae* ATCC 6303, e para fortes formadoras de biofilme, *E. faecalis* ATCC 19429 e *S. pyogenes* ATCC 19615.<sup>90</sup> No presente trabalho, verificou-se que todas as cepas de referência e os isolados clínicos foram formadores moderados de biofilme, demonstrando que esses isolados podem ter importância clínica significativa, já que teriam a capacidade de formar esse biofilme *in vivo*, e dessa forma serem mais resistentes ao tratamento com compostos antibacterianos e sanitizantes, já utilizados rotineiramente na prática endodôntica.

As AgNPs apresentam potencial terapêutico antibacteriano e antibiofilme promissor. As amostras com AgNPs esféricas e de menor tamanho apresentam os melhores resultados para bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, com ou sem perfis de resistência, dentre elas isolados clínicos de *Klebsiella pneumoniae carbapenemase* (KPC), *E. coli*, *Acinetobacter spp*, *S. aureus*, e cepas de referência de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, *S. aureus* ATCC 29213, e *S. aureus* ATCC 3359.<sup>91</sup> O teste de

interferência na formação do biofilme constitui-se em boa estratégia para verificar um possível controle do desenvolvimento de biofilme. O objetivo desse teste é inibir a fixação inicial de bactérias em superfícies formadoras de biofilme, reduzindo assim as chances de desenvolvimento de biofilme.<sup>92</sup> De acordo com esse estudo, houve diferenças entre cepas de referência e isolados clínicos de *E. faecalis* e *E. faecium* na capacidade de formação biofilme e na resposta após exposição as AgNP, assim como na concentração à AgNP. Uma pesquisa sobre a atividade antibiofilme de AgNP foi conduzida para avaliar o desenvolvimento do biofilme na presença de concentrações variadas de outros tipos de AgNP. As AgNPs reduziram com sucesso a formação de biofilme em concentrações de 20 µg/ml e 10 µg/ml ( $p=0,004$  e  $0,045$ ), mostrando uma atividade antibiofilme dose-dependente significativa contra *S. pseudintermedius*.<sup>93</sup> Nosso estudo foi capaz de identificar essa atividade anti-biofilme sobre os isolados orais de *Enterococcus*, dessa forma sugerindo que uma solução de AgNP pode ter a mesma atividade *in vivo* sobre biofilmes de *Enterococcus* orais.

Em pesquisa para avaliar o efeito inibitório de AgNP em biofilmes dentais, foram utilizados dois tamanhos de AgNP (5,3nm e 37,4nm). Ambos os tamanhos de AgNP mostraram um excelente efeito contra biofilmes orais de pacientes com e sem cárie. Também foi identificado que a atividade bactericida das AgNPs está relacionada com o tamanho das partículas, sendo que o menor tamanho apresentou maior efeito.<sup>96</sup> Corroboram essa situação o estudo de Mohanta *et al.* (2020)<sup>97</sup>, que analisou a atividade antibacteriana e antibiofilme de AgNP contra *P. aeruginosa*, *E. coli* e *Staphylococcus aureus* e seus resultados demonstram o potencial de AgNP fitossintetizados para atuar como agentes anti-biofilme e para outras aplicações biomédicas. Nesta pesquisa, foi também avaliada a atividade antibiofilme de AgNP contra o biofilme consolidado após 24 horas, mostrando resultados satisfatórios para uso de AgNP baseados em biomassa de *F. oxysporum* e no tamanho de 28nm. Para avaliar a atividade antifúngica e antibiofilme de AgNP sintetizadas com extratos de *Lycopersicon esculentum* contra *C. albicans* (ATCC 90028), *C. parapsilosis* (ATCC 90018) e *C. glabrata* (ATCC 90030), testes de concentração inibitória mínima (MIC) foram realizados, confirmando assim a inibição do crescimento em todas as *Candida* avaliadas.<sup>94</sup> O mesmo resultado pôde ser observado por Fonseca *et al.* (2022), que avaliaram atividade antifúngica e antibiofilme das mesmas AgNP à base de *Fusarium oxysporum*, utilizadas nesse estudo sobre *Candida* spp. de isolados clínicos orais, comprovando assim que todas as *Candida* spp. foram suscetíveis a AgNP em baixas concentrações, exceto *Candida parapsilosis*. Além disso, as AgNP causaram danos na superfície, disrupção celular e inibição da formação de biofilme.

A solução coloidal de AgNP também reduziu de forma significativa os biofilmes consolidados de *C. pseudotuberculosis* em todas as concentrações testadas, controlando assim a mudança entre a forma planctônica sésil, impedindo a fixação e a colonização do biofilme em microplaca. As imagens da microscopia eletrônica (MEV) de varredura mostraram uma ação de AgNP em *C. pseudotuberculosis* associado a biofilmes consolidados, demonstrando o potencial das AgNP para atuar como agentes antibiofilme na linfadenite caseosa.<sup>95</sup> As alterações identificadas por MEV nesse trabalho em *C. pseudotuberculosis* foi muito semelhante ao observado em nosso estudo, sendo baseadas em alterações morfológicas, rupturas da célula microbiana e acúmulo de nanopartículas na parede das células.

A ampla utilização de AgNP em diversos campos aumenta sua exposição ambiental, causando efeitos de longo alcance nos ecossistemas naturais. As AgNP passam por vários processos físico-químicos e transformações no ambiente, antes de encontrar o seu destino final. Vários fatores bióticos e abióticos desempenham papéis centrais na determinação do transporte, toxicidade e destino de AgNP no ecossistema.<sup>103</sup> De acordo com Ghobashy *et al.* (2021)<sup>104</sup>, o ciclo do destino das AgNP (transformação, migração, dissolução, agregações e toxicidade) e suas propriedades intrínsecas e a toxicidade no solo são regidas por muitos parâmetros, como as vias de eliminação (líquido ou sólidos de esgoto) e as condições ambientais circundantes. Esses parâmetros devem ser considerados com precisão ao avaliar a toxicidade dos AgNP no meio ambiente, mas uma grande vantagem das nanopartículas é sua síntese biológica, sem a utilização de substâncias químicas com potencial poluidor.



## 6 CONCLUSÃO

As AgNP biogênicas demonstraram ter ação bacteriostática contra a maioria dos isolados clínicos e de cepas de referência de *E. faecalis* e *E. faecium*, tendo também ação bactericida na maioria dos isolados clínicos. Além disso, tiveram atividade de inibição na formação de biofilme e de interferência no biofilme consolidado. As análises morfológicas por meio de MEV constataram que as células bacterianas sofreram ação das AgNP em todas as concentrações analisadas. De acordo com os resultados desta pesquisa, as AgNP se apresentam como um potencial agente antimicrobiano para as infecções endodônticas, podendo ser posteriormente investigadas como irrigantes durante o preparo químico-mecânico ou como uma medicação intracanal, entre as sessões. Ademais, há possibilidade de associá-las às medicações intracanaís, já empregadas na Endodontia, assim como nos cimentos endodônticos, aumentando assim o efeito bactericida e bacteriostático desses elementos relevantes.

## REFERÊNCIAS

1. Foschi F, Izard J, Sasaki H, Sambri V, Prati C, Müller R, Stashenko P. *Treponema denticola* in disseminating endodontic infections. *J. Dent Res.* 2006;85(8): 761-5.
2. Manfredi M, et al. Single versus multiple visits for endodontic treatment of permanent teeth. *Cochrane Database Syst Rev.* 2016 Dec.
3. Prada I et al. Influence of microbiology on endodontic failure: Literature review. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2019 May 1;24 (3):e364-72.
4. Marinho BVS, Araújo ACS. Uso dos enxaguatórios bucais sobre a gengivite e biofilme dental. *International Journal of Dentistry.* 2007; 6(4):124-31.
5. Łysakowska ME, Sienkiewicz M, Banaszek K, Sokołowski J. The sensitivity of endodontic *Enterococcus* spp. strains to geranium essential oil. *Molecules.* 2015 Dec 21;20(12):22881-9
6. Yin IX, Zhang J, Zhao IS, Mei ML, Li Q, Chu CH. The antibacterial mechanism of silver nanoparticles and its application in dentistry. *Int J Nanomedicine.* 2020 Apr. 17;15:2555-62
7. Tang S, Zheng J. Antibacterial activity of silver nanoparticles: Structural effects. *Adv HealthcMater.* 2018 Jul;7(13)
8. Song W, Ge S. Application of antimicrobial nanoparticles in dentistry. *Molecules.* 2019 Mar 15;24(6):1033. doi: 10.3390/molecules24061033.
9. Bapat RA, Joshi CP, Bapat P, Chaubal TV, Pandurangappa R, Jnanendrappa N, Gorain B, Khurana S, Kesharwani P. The use of nanoparticles as biomaterials in dentistry. *Drug Discov Today.* 2019 Jan;24(1):85-98. doi: 10.1016/j.drudis.2018.08.012.
10. Fernandez CC, Sokolonski AR, Fonseca MS, Stanisic D, Araújo DB, Azevedo V, Portela RD, Tasic L. Applications of silver nanoparticles in dentistry: Advances and technological innovation. *Int J Mol Sci.* 2021 Mar 2;22(5):2485. doi: 10.3390/ijms22052485.
11. Dioguardi M, Di Gioia G, Illuzzi G, Arena C, Caponio VCA, Caloro GA, Zhurakivska K, Adipietro I, Troiano G, Lo Muzio L. Inspection of the microbiota in endodontic lesions. *DentJ (Basel).* 2019 May 1;7(2):47. doi: 10.3390/dj7020047.
12. Yamaguchi M, Noiri Y, Itoh Y, Komichi S, Yagi K, Uemura R, Naruse H, Matsui S, Kuriki N, Hayashi M, Ebisu S. Factors that cause endodontic failures in general practices in Japan. *BMC Oral Health.* 2018 Apr 27;18(1):70. doi: 10.1186/s12903-018-0530-6.
13. Siqueira Junior JF, Rôças IDN, Marceliano-Alves MF, Pérez AR, Ricucci D. Unprepared root canal surface areas: causes, clinical implications, and therapeutic strategies. *Braz Oral Res.* 2018 Oct 18;32(suppl 1):e65. doi: 10.1590/1807-3107bor-2018.vol32.0065.
14. Siddiqui Z, Acevedo-Jake AM, Griffith A, Kadincesme N, Dabek K, Hindi D, Kim KK, Kobayashi Y, Shimizu E, Kumar V. Cells and material-based strategies for regenerative endodontics. *Bioact Mater.* 2021 Nov 30;14:234-49. doi: 10.1016/j.bioactmat.2021.11.015.
15. Siqueira JF Jr, Rôças IN. Diversity of endodontic microbiota revisited. *J Dent Res.* 2009 Nov;88(11):969-81. doi: 10.1177/0022034509346549.

16. Qian W, Ma T, Ye M, Li Z, Liu Y, Hao P. Microbiota in the apical root canal system of tooth with apical periodontitis. *BMC Genomics*. 2019 Apr 4;20(Suppl 2):189. doi: 10.1186/s12864-019-5474-y.
17. Siqueira JF Jr, Rôças IN. Present status and future directions: Microbiology of endodontic infections. *Int Endod J*. 2022 May;55 Suppl 3:512-30. doi: 10.1111/iej.13677.
18. Gomes BPFA, Herrera DR. Etiologic role of root canal infection in apical periodontitis and its relationship with clinical symptomatology. *Braz Oral Res*. 2018 Oct 18;32(suppl 1):e69. doi: 10.1590/1807-3107bor-2018.vol32.0069.
19. Zajac JC, Manrique M, Fleury CM, Marrazzo J, Mantilla-Rivas E, Talbet JH, Brennan AM, Aivaz M, Oh AK, Tate AR, Rogers GF. Dental topics for plastic surgeons, part three: Infection and trauma of the dentition. *J Craniofac Surg*. 2021 Mar-Apr 01;32(2):805-12. doi: 10.1097/SCS.00000000000007191.
20. Alghamdi F, Shakir M. The *Influence of Enterococcus faecalis* as a dental root canal pathogen on endodontic treatment: A systematic review. *Cureus*. 2020 Mar 13;12(3):e7257. doi: 10.7759/cureus.7257.
21. Miccoli G, Seracchiani M, Zanza A, Giudice AD, Testarelli L. Possible complications of endodontic treatments. *J Contemp Dent Pract*. 2020 May 1;21(5):473-4.
22. Ahmed HMA, Versiani MA, De-Deus G, Dummer PMH. A new system for classifying root and root canal morphology. *Int Endod J*. 2017 Aug;50(8):761-70. doi: 10.1111/iej.12685.
23. Decurcio DA, Bueno MR, Silva JA, Loureiro MAZ, Damião Sousa-Neto M, Estrela C. Digital planning on guided endodontics technology. *Braz Dent J*. 2021 Sep-Dec;32(5):23-33. doi: 10.1590/0103-6440202104740
24. Alghamdi F, Shakir M. The influence of *Enterococcus faecalis* as a dental root canal pathogen on endodontic treatment: A systematic review. *cureus*. 2020 Mar 13;12(3):e7257. doi: 10.7759/cureus.7257.
25. Anderson AC, Hellwig E, Vespermann R, Wittmer A, Schmid M, Karygianni L, Al-Ahmad A. Comprehensive analysis of secondary dental root canal infections: a combination of culture and culture-independent approaches reveals new insights. *PLoS One*. 2012;7(11):e49576. doi: 10.1371/journal.pone.0049576.
26. Gajan EB, Aghazadeh M, Abashov R, Salem Milani A, Moosavi Z. Microbial Flora of Root Canals of Pulpally-infected Teeth: *Enterococcus faecalis* a Prevalent Species. *J Dent Res Dent Clin Dent Prospects*. 2009 Winter;3(1):24-7. doi: 10.5681/joddd.2009.007
27. Barbosa-Ribeiro M, Arruda-Vasconcelos R, Mendes Louzada L, Rodrigues Lima A, Marciano M, Affonso de Almeida JF, De-Jesus-Soares A, Zaia AA, Ferraz C, Gomes BP. Microbiological investigation in teeth with persistent/secondary endodontic infection in different stages of root canal retreatment. *Eur Endod J*. 2020 Dec;5(3):219-25. doi: 10.14744/iej.2020.73626.
28. Torres C, Alonso CA, Ruiz-Ripa L, León-Sampedro R, Del Campo R, Coque TM. Antimicrobial Resistance in *Enterococcus* spp. of animal origin. *Microbiol Spectr*. 2018 Jul;6(4). doi: 10.1128/microbiolspec.ARBA-0032-2018.
29. Espíndola LCP, do Nascimento MVMR, do Souto RM, Colombo APV. Antimicrobial susceptibility and virulence of *Enterococcus* spp. isolated from periodontitis-associated

- subgingival biofilm. J Periodontol. 2021 Nov;92(11):1588-600. doi: 10.1002/JPER.20-0815.
30. WHO/CDC/ICBDSR. Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics. Geneva: World Health Organization; 2017. Disponível em: <http://www.who.int/medicines/publications/global-prioritylist-antibiotic-resistant-bacteria/en/>
  31. Wellinghausen N, Chatterjee I, Berger A, Niederfuehr A, Proctor RA, Kahl BC. Characterization of clinical *Enterococcus faecalis* small-colony variants. J Clin Microbiol. 2009 Sep;47(9):2802-11. doi: 10.1128/JCM.00485-09.
  32. García-Solache M, Rice LB. The *Enterococcus*: A model of adaptability to its environment. Clin Microbiol Rev. 2019 Jan 30;32(2):e00058-18. doi: 10.1128/CMR.00058-18.
  33. Paradella, TC, et al. *Enterococcus faecalis*: considerações clínicas e microbiológicas. Revista de Odontologia da UNESP. 2007; 36(2):163-8
  34. Ferreira NS, Martinho FC, Cardoso FG, Nascimento GG, Carvalho CA, Valera MC. Microbiological profile resistant to different intracanal medications in primary endodontic infections. J Endod. 2015 Jun;41(6):824-30. doi: 10.1016/j.joen.2015.01.031.
  35. Top J, Willems R, Bonten M. Emergence of CC17 *Enterococcus faecium*: from commensal to hospital-adapted pathogen. FEMS Immunol Med Microbiol. 2008;52(3):297-308.
  36. Gilmore MS, Lebreton F, van Schaik W. Genomic transition of enterococci from gut commensals to leading causes of multidrug-resistant hospital infection in the antibiotic era. Curr Opin Microbiol. 2013;16(1):10-6.
  37. Gao W, Howden BP, Stinear TP. Evolution of virulence in *Enterococcus faecium*, a hospital-adapted opportunistic pathogen. Curr Opin Microbiol. 2018 Feb;41:76-82. doi: 10.1016/j.mib.2017.11.030.
  38. Gorrie C, Higgs C, Carter G, Stinear TP, Howden B. Genomics of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. Microb Genom. 2019 Jul;5(7):e000283. doi: 10.1099/mgen.0.000283.
  39. Cruz CD, Shah S, Tammela P. Defining conditions for biofilm inhibition and eradication assays for Gram-positive clinical reference strains. BMC Microbiol. 2018 Nov 3;18(1):173. doi:10.1186/s12866-018-1321-6.
  40. Jiao Y, Tay FR, Niu LN, Chen JH. Advancing antimicrobial strategies for managing oral biofilm infections. Int J Oral Sci. 2019 Oct 1;11(3):28. doi: 10.1038/s41368-019-0062-1.
  41. Pavão DP et al. Capacidade de formação de biofilme por cepas bacterianas e ação antibiofilme do extrato de *Lafoensia pacari* (Lythraceae). Revista Fitos. Rio de Janeiro. 2021; 15(2): 153-65
  42. Mosaddad SA, Tahmasebi E, Yazdanian A, Rezvani MB, Seifalian A, Yazdanian M, Tebyanian H. Oral microbial biofilms: an update. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2019 Nov;38(11):2005-19. doi: 10.1007/s10096-019-03641-9.
  43. Neelakantan P, Romero M, Vera J, Daood U, Khan AU, Yan A, Cheung GSP. Biofilms in Endodontics-Current Status and Future Directions. Int J Mol Sci. 2017 Aug 11;18(8):1748. doi:10.3390/ijms18081748.
  44. Jhajharia K, Parolia A, Shetty KV, Mehta LK. Biofilm in endodontics: A review. J Int Soc

- Prev Community Dent. 2015 Jan-Feb;5(1):1-12. doi: 10.4103/2231-0762.151956
45. Ghabraei S, Marvi M, Bolhari B, Bagheri P. Minimum intracanal dressing time of triple antibiotic paste to eliminate *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) and determination of minimum inhibitory concentration and minimum bactericidal concentration: An Ex Vivo Study. J Dent (Tehran). 2018 Jan;15(1):1-9.
  46. Al-Ahmad A, Ameen H, Pelz K, Karygianni L, Wittmer A, Anderson AC, Spitzmüller B, Hellwig E. Antibiotic resistance and capacity for biofilm formation of different bacteria isolated from endodontic infections associated with root-filled teeth. J Endod. 2014 Feb;40(2):223-30. doi: 10.1016/j.joen.2013.07.023.
  47. Yoo YJ, Perinpanayagam H, Oh S, Kim AR, Han SH, Kum KY. Endodontic biofilms: Contemporary and future treatment options. Restor Dent Endod. 2019 Jan 31;44(1):e7. doi: 10.5395/rde.2019.44.e7.
  48. Khezerlou A, Alizadeh-Sani M, Azizi-Lalabadi M, Ehsani A. Nanoparticles and their antimicrobial properties against pathogens including bacteria, fungi, parasites and viruses. Microb Pathog. 2018 Oct;123:505-26. doi: 10.1016/j.micpath.2018.08.008
  49. Barar J. Bioimpacts of nanoparticle size: why it matters? Bioimpacts. 2015;5(3):113-5. doi: 10.15171/bi.2015.23. Epub 2015 Sep 10.
  50. Staroń A, Długosz O. Antimicrobial properties of nanoparticles in the context of advantages and potential risks of their use. J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng. 2021;56(6):680-93. doi: 10.1080/10934529.2021.1917936.
  51. Raura N, Garg A, Arora A, Roma M. Nanoparticle technology and its implications in endodontics: a review. Biomater Res. 2020 Dec 4;24(1):21. doi: 10.1186/s40824-020-00198-z.
  52. Wang L, Hu C, Shao L. The antimicrobial activity of nanoparticles: present situation and prospects for the future. Int J Nanomedicine. 2017 Feb 14;12:1227-49. doi: 10.2147/IJN.S121956.
  53. Sánchez-López E, Gomes D, Esteruelas G, Bonilla L, Lopez-Machado AL, Galindo R, Cano A, Espina M, Ettcheto M, Camins A, Silva AM, Durazzo A, Santini A, Garcia ML, Souto EB. Metal-based nanoparticles as antimicrobial agents: An overview. Nanomaterials (Basel). 2020 Feb 9;10(2):292. doi: 10.3390/nano10020292.
  54. Alshareef, K. Laird, R.B.M. Cross, shape-dependent antibacterial activity of silver nanoparticles on *Escherichia coli* and *Enterococcus faecium* bacterium, Applied Surface Science. 2017; 424(3):310-5
  55. Bruna T, Maldonado-Bravo F, Jara P, Caro N. Silver nanoparticles and their antibacterial applications. Int J Mol Sci. 2021 Jul 4;22(13):7202. doi: 10.3390/ijms22137202.
  56. Zhang J, Wang F, Yalamarty SSK, Filipczak N, Jin Y, Li X. Nano silver-induced toxicity and associated mechanisms. Int J Nanomedicine. 2022 Apr 26;17:1851-64. doi: 10.2147/IJN.S355131.
  57. Hanan NA, Chiu HI, Ramachandran MR, Tung WH, Mohamad Zain NN, Yahaya N, Lim V. Cytotoxicity of Plant-Mediated Synthesis of Metallic Nanoparticles: A Systematic Review. Int J Mol Sci. 2018 Jun 11;19(6):1725. doi: 10.3390/ijms19061725.
  58. Choudhary A, Singh S, Ravichandiran V. Toxicity, preparation methods and applications

- of silver nanoparticles: An update. *Toxicol Mech Methods*. 2022 Nov;32(9):650-61. doi: 10.1080/15376516.2022.2064257.
59. Liao C, Li Y, Tjong SC. Bactericidal and cytotoxic properties of silver nanoparticles. *Int J Mol Sci*. 2019 Jan 21;20(2):449. doi: 10.3390/ijms20020449.
  60. De Matteis V, Cascione M, Toma CC, Leporatti S. Silver nanoparticles: Synthetic routes, in vitro toxicity and theranostic applications for cancer disease. *Nanomaterials (Basel)*. 2018 May 10;8(5):319. doi: 10.3390/nano8050319.
  61. Tripathi N, Goshisht MK. Recent advances and mechanistic insights into antibacterial activity, antibiofilm activity, and cytotoxicity of silver nanoparticles. *ACS Appl Bio Mater*. 2022 Apr 18;5(4):1391-463. doi: 10.1021/acsabm.2c00014.
  62. Bélteky P, Rónavári A, Zakupszky D, Boka E, Igaz N, Szerencsés B, Pfeiffer I, Vágvölgyi C, Kiricsi M, Kónya Z. Are smaller nanoparticles always better? Understanding the biological effect of size-dependent silver nanoparticle aggregation under biorelevant conditions. *Int J Nanomedicine*. 2021 Apr 23;16:3021-40. doi: 10.2147/IJN.S304138.
  63. Ballottin, D., Fulaz, S., Cabrini, F., Tsukamoto, J., Durán, N., Alves, O. L., et al. (2017). Antimicrobial textiles: Biogenic silver nanoparticles against *Candida* and *Xanthomonas*. *Mater.Sci. Eng. C 75*, 582–9. doi:10.1016/j.msec.2017.02.110.
  64. Stanisic, D., Fregonesi, N. L., Barros, C. H. N., Pontes, J. G. M., Fulaz, S., Menezes, U. J., et al. (2018). NMR insights on nano silver post-surgical treatment of superficial caseous lymphadenitis in small ruminants. *RSC Adv*. 8, 40778–40786. doi:10.1039/C8RA08218A.
  65. Norman, T. E., Batista., M., Lawhon, S. D., Zhang, S., Kuskie, K. R., Swinford, A. K., et al. (2014). In vitro susceptibility of equine-obtained isolates of *Corynebacterium pseudotuberculosis* to gallium maltolate and 20 other antimicrobial agents. *J. Clin. Microbiol*. 52, 2684–5. doi:10.1128/JCM.01252-14.
  66. Fonseca MS, Rodrigues DM, Sokolonski AR, Stanisic D, Tomé LM, Góes-Neto A, Azevedo V, Meyer R, Araújo DB, Tasic L, Portela RD. Activity of *Fusarium oxysporum*-based silver nanoparticles on *Candida* spp. oral isolates. *Nanomaterials (Basel)*. 2022 Jan 31;12(3):501. doi:10.3390/nano12030501.
  67. CLSI. Manual Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standards 6th ed. Document M7- A6 performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Wayne, PA; Clinical and Laboratory Standards Institute; 2006.
  68. CLSI. Manual Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically: approved standards 6th ed. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Sixteenth informational supplement M100-S16(tab 2J). Wayne, PA. Clinical and Laboratory Standards Institute; 2006a.
  69. Kalil, M. A., Santos, L. M., Barral, T. D., Rodrigues, D. M., Pereira, N. P., Sá, M. da C. A., et al. Brazilian Green Propolis as a Therapeutic Agent for the Post-surgical Treatment of Caseous Lymphadenitis in Sheep. *Front. Vet. Sci*. 2019;6, 1–10. doi:10.3389/fvets.2019.00399.
  70. Nostro, A., Roccaro, A. S., Bisignano, G., Marino, A., Cannatelli, M. A., Pizzimenti, F. C., et al. (2007). Effects of oregano, carvacrol and thymol on *Staphylococcus aureus* and

- Staphylococcus epidermidis* biofilms. *J. Med. Microbiol.* 56, 519–23. doi:10.1099/jmm.0.46804-0.
71. Gliga AR, Skoglund S, Wallinder IO, Fadeel B, Karlsson HL. Size-dependent cytotoxicity of silver nanoparticles in human lung cells: the role of cellular uptake, agglomeration and Ag release. *Part Fibre Toxicol.* 2014 Feb 17;11:11. doi: 10.1186/1743-8977-11-11
  72. Ferdous Z, Nemmar A. Health Impact of Silver Nanoparticles: A review of the biodistribution and toxicity following various routes of exposure. *Int J Mol Sci.* 2020 Mar 30;21(7):2375. doi: 10.3390/ijms21072375.
  73. Liu W, Wu Y, Wang C, Li HC, Wang T, Liao CY, Cui L, Zhou QF, Yan B, Jiang GB. Impact of silver nanoparticles on human cells: effect of particle size. *Nanotoxicology.* 2010 Sep;4(3):319-30. doi: 10.3109/17435390.2010.483745.
  74. Ivask A, Kurvet I, Kasemets K, Blinova I, Aruoja V, Suppi S, Vija H, Käkinen A, Titma T, Heinlaan M, Visnapuu M, Koller D, Kisand V, Kahru A. Size-dependent toxicity of silver nanoparticles to bacteria, yeast, algae, crustaceans and mammalian cells in vitro. *PLoS One.* 2014 Jul 21;9(7):e102108. doi: 10.1371/journal.pone.0102108.
  75. Hoshyar N, Gray S, Han H, Bao G. The effect of nanoparticle size on in vivo pharmacokinetics and cellular interaction. *Nanomedicine (Lond).* 2016 Mar;11(6):673-92. doi: 10.2217/nmm.16.5.
  76. Prabha S, Arya G, Chandra R, Ahmed B, Nimesh S. Effect of size on biological properties of nanoparticles employed in gene delivery. *Artif Cells Nanomed Biotechnol.* 2016;44(1):83-91. doi: 10.3109/21691401.2014.913054.
  77. Williams KM, Gokulan K, Cerniglia CE, Khare S. Size and dose dependent effects of silver nanoparticle exposure on intestinal permeability in an in vitro model of the human gut epithelium. *J Nanobiotechnology.* 2016 Jul 28;14(1):62. doi: 10.1186/s12951-016-0214-9.
  78. Sánchez-Sanhueza, G., González-Rocha, G., Dominguez, M., & Bello-Toledo, H. *Enterococcus* spp. isolated from root canals with persistent chronic apical periodontitis in a Chilean population. *Brazilian Journal of Oral Sciences*, 14(Braz. J. Oral Sci., 2015 14(3). <https://doi.org/10.1590/1677-3225v14n3a13>
  79. Nardello LCL, Pinheiro ET, Gavini G, Prado LC, Romero RX, Gomes BPPA, Skelton-Macedo MC. Nature and prevalence of bacterial taxa persisting after root canal chemomechanical preparation in permanent teeth: A systematic review and meta-analysis. *J Endod.* 2022 May;48(5):572-96. doi: 10.1016/j.joen.2022.01.016.
  80. Murad CF, Sassone LM, Faveri M, Hirata R Jr, Figueiredo L, Feres M. Microbial diversity in persistent root canal infections investigated by checkerboard DNA-DNA hybridization. *J Endod.* 2014 Jul;40(7):899-906. doi: 10.1016/j.joen.2014.02.010.
  81. Halkai KR, Mudda JA, Shivanna V, Rathod V, Halkai R. Evaluation of antibacterial efficacy of fungal-derived silver nanoparticles against *Enterococcus faecalis*. *Contemp Clin Dent.* 2018 Jan-Mar;9(1):45-8. doi: 10.4103/ccd.ccd\_703\_17.
  82. Arora SS, Shetty R, Hemagiriappa MS, Thakur SS, Mishra N, Lokhande NM. Comparative evaluation of antibacterial efficacy of silver and cadmium nanoparticles and calcium hydroxide against *Enterococcus faecalis* biofilm. *J Contemp Dent Pract.* 2021 Dec 1;22(12):1438-1443.
  83. Parvekar P, Palaskar J, Metgud S, Maria R, Dutta S. The minimum inhibitory concentration

- (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) of silver nanoparticles against *Staphylococcus aureus*. *Biomater Investig Dent*. 2020 Jul 23;7(1):105-9. doi: 10.1080/26415275.2020.1796674.
84. Chávez-Andrade GM, Tanomaru-Filho M, Basso Bernardi MI, de Toledo Leonardo R, Faria G, Guerreiro-Tanomaru JM. Antimicrobial and biofilm anti-adhesion activities of silver nanoparticles and farnesol against endodontic microorganisms for possible application in root canal treatment. *Arch Oral Biol*. 2019;107:104481. doi: 10.1016/j.archoralbio.2019.104481.
  85. Bruniera JFB, Gabriel-Silva L, Goulart RS, Silva-Sousa YTC, Lara MG, Pitondo-Silva A, Miranda CES. Green synthesis, characterization and antimicrobial evaluation of silver nanoparticles for an intracanal dressing. *Braz Dent J*. 2020 Sep-Oct;31(5):485-92. doi:
  86. Rodrigues CT, de Andrade FB, de Vasconcelos LRSM, Midena RZ, Pereira TC, Kuga MC, Duarte MAH, Bernardineli N. Antibacterial properties of silver nanoparticles as a root canal irrigant against *Enterococcus faecalis* biofilm and infected dentinal tubules. *Int Endod J*. 2018 Aug;51(8):901-11. doi: 10.1111/iej.12904.
  87. Kushwaha V, Yadav RK, Tikku AP, Chandra A, Verma P, Gupta P, Shakya VK. Comparative evaluation of antibacterial effect of nanoparticles and lasers against Endodontic Microbiota: An in vitro study. *J Clin Exp Dent*. 2018 Dec 1;10(12):e1155-e60. doi: 10.4317/jced.55076.
  88. Nayyar P, Sethi A, Thakur D, Khullar S, Gayati S, Adarsh K. Antibacterial Effect of silver nanoparticle gel as an intracanal medicament in combination with other medicaments against *Enterococcus faecalis*: An in vitro study. *J Pharm Bioallied Sci*. 2021 Jun;13(Suppl 1):S408- S411. doi: 10.4103/jpbs.JPBS\_600\_20.
  89. Albaghdadi SZ, Altaher JB, Drobiova H, Bhardwaj RG, Karched M. In vitro characterization of biofilm formation in prevotella species. *Front Oral Health*. 2021 Oct 8;2:724194. doi: 10.3389/froh.2021.724194.
  90. Xu Z, Liang Y, Lin S, Chen D, Li B, Li L, Deng Y. Crystal violet and xtt assays on staphylococcus aureus biofilm quantification. *Curr Microbiol*. 2016 Oct;73(4):474-82. doi: 10.1007/s00284-016-1081-1.
  91. Dos Santos EMP, Martins CCB, de Oliveira Santos JV, da Silva WRC, Silva SBC, Pelagio-Flores MA, Galembeck A, Cavalcanti IMF. Silver nanoparticles-chitosan composites activity against resistant bacteria: tolerance and biofilm inhibition. *J Nanopart Res*. 2021;23(8):196. doi:10.1007/s11051-021-05314-1.
  92. Subhadra B, Kim DH, Woo K, Surendran S, Choi CH. Control of biofilm formation in healthcare: Recent Advances exploiting quorum-sensing interference strategies and multidrug efflux pump inhibitors. *Materials (Basel)*. 2018 Sep 10;11(9):1676. doi: 10.3390/ma11091676.
  93. Seo M, Oh T, Bae S. Antibiofilm activity of silver nanoparticles against biofilm forming *Staphylococcus pseudintermedius* isolated from dogs with otitis externa. *Vet Med Sci*. 2021 Sep;7(5):1551-7. doi: 10.1002/vms3.554.
  94. Choi JS, Lee JW, Shin UC, Lee MW, Kim DJ, Kim SW. Inhibitory Activity of silver nanoparticles synthesized using *Lycopersicon esculentum* against biofilm formation in *candida* species. *nanomaterials (Basel)*. 2019 Oct 23;9(11):1512. doi: 10.3390/nano9111512.



95. Santos, LMC. Atividade de nanopartículas de prata biogênicas e de extratos de própolis em biofilmes de *Corynebacterium pseudotuberculosis*. 2021. Tese (Doutorado) - Programa de Pós- graduação em Ciência Animal nos Trópico, Universidade Federal da Bahia. Salvador, 2021
96. Jiménez-Ramírez, AJ *et al.* Antimicrobial activity of silver nanoparticles against clinical biofilms from patients with and without dental caries. *Journal of Nanomaterials*. vol. 2021, Article ID 5587455, 13 pages, 2021. <https://doi.org/10.1155/2021/5587455>
97. Mohanta YK, Biswas K, Jena SK, Hashem A, Abd Allah EF, Mohanta TK. Anti-biofilm and antibacterial activities of silver nanoparticles synthesized by the reducing activity of phytoconstituents present in the Indian medicinal plants. *Front Microbiol*. 2020 Jun 23;11:1143. doi: 10.3389/fmicb.2020.01143.
98. Siddique, M. H., Aslam, B., Imran, M., Ashraf, A., Nadeem, H., Hayat, S., et al. Effect of silver nanoparticles on biofilm formation and EPS production of multidrug-resistant *klebsiella pneumoniae*. *Biomed Res. Int*. 2020, 9. doi:10.1155/2020/6398165.
99. Kim EB, Kopit LM, Harris LJ, Marco ML. Draft genome sequence of the quality control strain *Enterococcus faecalis* ATCC 29212. *J Bacteriol*. 2012 Nov;194(21):6006-7. doi: 10.1128/JB.01423-12.
100. Oncu A, Huang Y, Amasya G, Sevimay FS, Orhan K, Celikten B. Silver nanoparticles in endodontics: recent developments and applications. *Restor Dent Endod*. 2021 Jul 1;46(3):e38. doi: 10.5395/rde.2021.46.e38.
101. Mahmoud A, Moussa S, El Backly R, El-Gendy R. Investigating the residual effect of silver nanoparticles gel as an intra-canal medicament on dental pulp stromal cells. *BMC Oral Health*. 2022 Nov 30;22(1):545. doi: 10.1186/s12903-022-02542-2.
102. Chan EL, Zhang C, Cheung GS. Cytotoxicity of a novel nano-silver particle endodontic irrigant. *Clin Cosmet Investig Dent*. 2015 Jul 13;7:65-74. doi: 10.2147/CCIDE.S68874.
103. Prasher, P; Sharma, M; Mudila, H; Verma, A; Bhatt, P. Chapter 26 - Silver nanoparticles in natural ecosystems: Fate, transport, and toxicity, Editor(s): Kamel A. Abd-Elsalam, In *Nanobiotechnology for plant protection, green synthesis of silver nanomaterials*. New York: Elsevier; 2022.
104. Ghobashy, MM *et al.* An overview of methods for production and detection of silver nanoparticles, with emphasis on their fate and toxicological effects on human, soil, and aquatic environment. *Nanotechnology Reviews*. 2021 10 (1):954-77. doi: 10.1515/ntrev-2021-0066.
105. Ballotin D. *et al.* Antimicrobial textiles: Biogenic silver nanoparticles against *candida* and *xanthomonas*. *Materials Science and Engineering C*. 2017 Jun; 75:582–9.

## APÊNDICE – Termo de consentimento livre e esclarecido



PROCESSOS INTERATIVOS  
DOS ÓRGÃOS E SISTEMAS  
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO • ICS • UFBA



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PROCESSOS INTERATIVOS DOS ÓRGÃOS  
E SISTEMAS

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

O Sr.(a) está sendo convidado(a) para participar da pesquisa "**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DE EXTRATOS SUPERCRÍTICOS DE PRÓPOLIS VERMELHA E VERDE E DA NANOPARTÍCULA DE PRATA SOBRE ENTEROCOCCUS FAECALIS**". Nesta pesquisa pretendemos avaliar a resistência e/ou susceptibilidade das espécies clínicas de *Enterococcus faecalis*, coletados dos canais radiculares, diante aos diferentes tipos de própolis, bem como a Nanopartícula de Prata (NpAg). O tratamento das de infecções dos canais dentários são desafiantes devido a altas taxas de retorno. Devido ao potencial das NpAg e dos extratos de Própolis, novos estudos sobre a eficácia desses compostos nos tratamentos endodônticos são necessários, principalmente frente a microrganismos como o *Enterococcus faecalis*. Para esta pesquisa adotaremos os seguintes procedimentos: Será realizado o tratamento de canal dentário de acordo com o protocolo do departamento de Endodontia da Universidade Federal da Bahia, onde será realizada a abertura do dente e as amostras serão coletadas do canal radicular através de um cone de papel estéril para identificação dos microrganismos presentes no interior dos canais radiculares.

Os desconfortos físicos esperados fazem parte do tratamento endodôntico, podendo apresentar dor durante o tratamento assim como inflamação após tratamento, que poderão ser minimizados através de medicações prescritas pelo pesquisador e/ou de soluções caseiras como infusões. Além disso, o tratamento endodôntico pode apresentar intercorrências como a quebra do dente (podendo ser reconstruído com materiais dentários), perfuração do canal (o pesquisador vedará a perfuração com cimentos dentários), fratura de instrumentos (será analisada a viabilidade da retirada do fragmento no ato da consulta ou em momento futuro), extravasamento de material obturador. Para evitar quaisquer intercorrências, o procedimento será realizado seguindo

critérios de biossegurança e protocolos da clínica endodôntica. Caso ocorra alguma intercorrência durante o procedimento o(a) Sr.(a) terá toda assistência integral e imediata de forma gratuita e o(a) Sr.(a) poderá, a qualquer momento, se retirar da pesquisa.

O risco inerente à manutenção de sigilo e confidencialidade durante a coleta e uso de dado será minimizado utilizando números para identificação de cada amostra, evitando exposição do nome do Sr.(a) e só terá acesso a estes dados a equipe de pesquisa. Além do mais, todos os profissionais seguem um código de ética profissional e assinaram termos de compromisso e de confidencialidade.

O principal benefício desta pesquisa é a contribuição de um trabalho científico que poderá trazer benefícios para a saúde bucal, para a Odontologia e para a sociedade através de uma nova solução para tratamentos endodônticos com o uso de do Extrato de Própolis e da Nanopartícula de Prata.

Para participar deste estudo o(a) Sr.(a) não terá nenhum custo, nem receberá qualquer vantagem financeira, visto que já receberá o tratamento endodôntico na Instituição.

Caso o(a) Sr.(a) venha a sofrer qualquer tipo de dano resultante de sua participação na pesquisa o(a) Sr.(a) tem direito à indenização.

O Sr.(a) terá o esclarecimento sobre o estudo em qualquer aspecto que desejar e estará livre para participar ou recusar-se a participar. Poderá retirar seu consentimento ou interromper a participação a qualquer momento. A sua participação é voluntária e a recusa em participar não acarretará qualquer penalidade ou modificação na forma em que é atendido pelo(a) UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA.

Caso o (a) Sr.(a) tenha alguma dúvida ou necessite de qualquer esclarecimento ou ainda deseje retirar-se da pesquisa, por favor, entre em contato com os pesquisadores abaixo a qualquer tempo.

**Pesquisador Responsável – Maiana M<sup>a</sup> Rios Siqueira Mattos, tel: (71)991336175/991973737.**

Também em caso de dúvida, o(a) Senhor(a) poderá entrar em contato com o Comitê de Ética

em Pesquisa do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia (CEP/ICS/UFBA). O Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) busca defender os interesses dos participantes de pesquisa. O CEP é responsável pela avaliação e acompanhamento dos aspectos éticos de todas as pesquisas envolvendo seres humanos. O Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia (CEP/ICS/UFBA) está localizado na Avenida Reitor Miguel Calmon, s/n, - Instituto de Ciências da Saúde – 4º andar, Vale do Canela. Horário de funcionamento: De Segunda-feira a Sexta-feira das 7h às 13h. Telefone: (71) 3283-8951. E-mail: cepics@ufba.br.

Os resultados da pesquisa serão divulgados pelo Pesquisador Responsável através de comunicação direta com o(a) Senhor(a) informando todos os dados pertinentes a pesquisa, assim como para com as instituições integrantes. Além disso, estarão à sua disposição quando finalizada e devidamente publicada, sendo disponível da melhor forma de sua conveniência. Seu nome ou o material que indique sua participação não será liberado sem a sua permissão. O(a) Sr.(a) não será identificado em nenhuma publicação, sendo as amostras coletadas identificadas por numeração. Este termo de consentimento encontra-se impresso em duas vias originais, rubricadas em todas as suas páginas, as quais serão assinadas, ao seu término, pelo(a) Sr.(a) ou por seu representante legal, assim como pelo pesquisador responsável. Uma das vias deste termo será arquivada pelo pesquisador responsável, no INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE/UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA e a outra será fornecida ao(a) Sr.(a). Os dados e instrumentos utilizados na pesquisa ficarão arquivados com o pesquisador responsável por um período de cinco (5) anos, e após esse tempo serão destruídos. Os pesquisadores tratarão a sua identidade com padrões profissionais de sigilo, atendendo a legislação brasileira (Resolução Nº 466/12 do Conselho Nacional de Saúde), utilizando as informações somente para os fins acadêmicos e científicos.

Eu, \_\_\_\_\_, portador do documento de Identidade \_\_\_\_\_ fui informado (a) dos objetivos da pesquisa **"AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DE EXTRATOS SUPERCRTICOS DE PRÓPOLIS VERMELHA E VERDE E DA NANOPARTÍCULA DE PRATA SOBRE ENTEROCOCCUS FAECALIS"**, de maneira clara e detalhada e esclareci minhas dúvidas. Sei que a qualquer momento poderei solicitar novas informações e modificar minha decisão de participar, se assim o desejar. Declaro que concordo em participar. Recebi uma via deste termo de consentimento livre e esclarecido e me foi dada à oportunidade de ler e esclarecer as minhas

dúvidas.

Salvador, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 20

---

Nome	completo (participante)	Data
------	-------------------------	------

---

Nome	completo (pesquisador responsável)	Data
------	------------------------------------	------

Em caso de haver desistência em permanecer na pesquisa, autorizo que os meus dados já coletados referentes aos resultados de exames, questionários respondidos e similares ainda sejam utilizados na pesquisa, com os mesmos propósitos já apresentados neste TCLE.

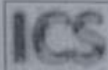
**SIM**

**NÃO**

---

Nome	completo (participante)	Data
------	-------------------------	------

## ANEXO – Parecer do Comitê de Ética



UFBA - INSTITUTO DE  
CIÊNCIAS DA SAÚDE DA  
UNIVERSIDADE FEDERAL DA



**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**

**DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

**Título da Pesquisa:** AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DE EXTRATOS DE PRÓPOLIS VERMELHA E VERDE E DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA SOBRE ENTEROCOCCUS FAECALIS

**Pesquisador:** MAIANA MARIA RIOS SIQUEIRA MATTOS

**Área Temática:**

**Versão:** 2

**CAAE:** 04251318.1.0000.5662

**Instituição Proponente:** Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

**DADOS DO PARECER**

**Número do Parecer:** 3.216.001

**Apresentação do Projeto:**

O presente estudo propõe-se avaliar a atividade de extratos da Própolis verde e vermelha e de Nanopartículas de Prata frente ao *Enterococcus faecalis*. Para tanto, será realizada a coleta de amostras de 20 pacientes na clínica de endodontia da UFBA, com diagnóstico de lesão periapical e sem vitalidade pulpar além da cepa padrão ATCC. Essas amostras serão transferidas e semeadas em placas contendo meio BHI para posterior testes bioquímicos para caracterização do *Enterococcus faecalis*. Através da técnica de microdiluição, será detectada a concentração mínima inibitória (CIM). A partir das diluições de antimicrobianos que não apresentarem crescimento, pode-se repicar para placa de ágar e verificar a concentração bacteriana mínima (MCB). Serão utilizados os antibióticos comerciais: doxiciclina, ampicilina, tetraciclina, estreptomicina (0,125 a 16 g/mL), norfloxacin, enrofloxacin e ciprofloxacina (0,125 a 8 g/mL). Espera-se com os resultados desse projeto abrir caminho para ensaios clínicos in vivo com as nanopartículas de prata e extrato de Própolis verde e vermelha.

**Objetivo da Pesquisa:**

**Objetivo Primário:**

- Avaliar a resistência e/ou susceptibilidade do *Enterococcus faecalis* frente a diferentes tipos de própolis extraídas pelo método de extração supercrítica e etanólica, bem como a nanopartículas de prata.

**Endereço:** Miguel Calmon

**Bairro:** Vale do Canela

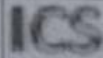
**UF:** BA

**Telefone:** (71)3283-8951

**Município:** SALVADOR

**CEP:** 40.110-902

**E-mail:** cepics@ufba.br



Continuação do Parecer: 3.216.001

**Objetivos Secundários:**

- Verificar a resistência ou susceptibilidade de isolados de *E. faecalis* diante extratos de própolis verde;
- Verificar a resistência ou susceptibilidade de isolados de *E. faecalis* diante extratos de própolis vermelha;
- Verificar a resistência ou susceptibilidade de isolados de *E. faecalis* diante nanopartículas de prata;
- Verificar alterações na coloração das coroas dentárias;
- Verificar a resistência ou susceptibilidade de *E. faecalis* diante a diversos antibióticos utilizados rotineiramente;
- Comparar os resultados obtidos com os extratos de própolis e nanopartículas de prata.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

**Riscos:**

OS DESCONFORTOS FÍSICOS ESPERADOS FAZEM PARTE DO TRATAMENTO ENDODÔNTICO, PODENDO APRESENTAR DOR DURANTE O TRATAMENTO ASSIM COMO INFLAMAÇÃO APÓS TRATAMENTO, QUE PODERÃO SER MINIMIZADOS ATRAVÉS DE MEDICAÇÕES PRESCRITAS PELO PESQUISADOR E/OU DE SOLUÇÕES CASEIRAS COMO INFUSÕES. ALÉM DISSO, O TRATAMENTO ENDODÔNTICO PODE APRESENTAR INTERCORRÊNCIAS COMO A QUEBRA DO DENTE (PODENDO SER RECONSTRUÍDO COM MATERIAIS DENTÁRIOS), PERFURAÇÃO DO CANAL (O PESQUISADOR VEDARÁ A PERFURAÇÃO COM CIMENTOS DENTÁRIOS), FRATURA DE INSTRUMENTOS (SERÁ ANALISADA A VIABILIDADE DA RETIRADA DO FRAGMENTO NO ATO DA CONSULTA OU EM MOMENTO FUTURO), EXTRAVASAMENTO DE MATERIAL OBTURADOR. ASSIM COMO O RISCO INERENTE À MANUTENÇÃO DE SIGILO E CONFIDENCIALIDADE DURANTE A COLETA E USO DE DADO SERÁ MINIMIZADO PELOS PROFISSIONAIS ENVOLVIDOS UTILIZANDO NÚMEROS PARA IDENTIFICAÇÃO DE CADA AMOSTRA, EVITANDO EXPOSIÇÃO DO NOME DO SR.(A) PARTICIPANTE VOLUNTÁRIO. ALÉM DO MAIS, TODOS OS PROFISSIONAIS SEGUEM UM CÓDIGO DE ÉTICA PROFISSIONAL E ASSINARAM TERMOS DE COMPROMISSO.

**Benefícios:**

O PRINCIPAL BENEFÍCIO DESTA PESQUISA É A CONTRIBUIÇÃO DE UM TRABALHO CIENTÍFICO QUE PODERÁ TRAZER BENEFÍCIOS PARA A SAÚDE BUCAL, PARA A ODONTOLOGIA E PARA A SOCIEDADE ATRAVÉS DE UMA NOVA SOLUÇÃO PARA TRATAMENTOS ENDODÔNTICOS COM O

**Endereço:** Miguel Calmon

**Bairro:** Vale do Canela

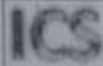
**UF:** BA

**Telefone:** (71)3283-8951

**Município:** SALVADOR

**CEP:** 40.110-902

**E-mail:** cepics@ufba.br



UFBA - INSTITUTO DE  
CIÊNCIAS DA SAÚDE DA  
UNIVERSIDADE FEDERAL DA



Continuação do Parecer: 3.216.001

**EXTRATO DE PRÓPOLIS E DA NANOPARTÍCULA DE PRATA.**

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Estudo experimental utilizando isolados clínicos obtidos de amostras de 20 pacientes em tratamento de canal radicular, voluntários, que concordarem em participar da pesquisa e assinarem o TCLE, provenientes da Clínica de Endodontia da UFBA-Salvador. As amostras de *Enterococcus faecalis* serão coletadas de pacientes que apresentarem ausência de resposta ao teste de sensibilidade pulpar e reação crônica visível radiograficamente. A coleta do material para análise microbiológica será realizado com a utilização de cones de papel absorvente nº15 estéreis e posteriormente serão transferidos para um tubo de ensaio contendo 3mL de Fluido de Transporte Reduzido (RTF) para os testes bioquímicos e contagem de Unidades Formadoras de Colônias (UFC). As amostras identificadas serão transportadas para processamento por cultura microbiológica, imediatamente após o término do procedimento clínico. Além as amostras clínicas, obter-se-á a cepa padrão ATCC para estudo comparativo.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Todos foram apresentados.

**Recomendações:**

Elaborar Relatórios e promover a devolutiva dos Resultados.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Atendido os princípios éticos e bioéticos e satisfeitas as pendências anteriormente formuladas opino pela Aprovação do presente Protocolo.

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Diante do exposto, o Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto de Ciências da Saúde (CEP-ICS/UFBA), de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS nº. 466 de 2012 e na Norma Operacional CNS nº. 001 de 2013, manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa proposto. Eventuais modificações no protocolo ou extensão do cronograma devem ser apresentadas ao CEP-ICS/UFBA de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas por meio de emenda. Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, a cada 6 meses e ao término do estudo. O participante tem a liberdade de recusar-se a entrar no estudo ou retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma ou prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 466/12) e deve receber uma via do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (Item IV.2.d). O pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após

**Endereço:** Miguel Calmon

**Bairro:** Vale do Canela

**UF:** BA

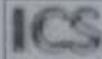
**Telefone:** (71)3283-8951

**Município:** SALVADOR

**CEP:** 40.110-902

**E-mail:** cepics@ufba.br





Continuação do Parecer: 3.216.001

análise das razões pelo CEP que o aprovou (Res. CNS Item III.3.z), aguardando seu parecer, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade do regime oferecido a um dos grupos da pesquisa (Item V.3). O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Item V.4). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária ANVISA junto com seu posicionamento.

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_P ROJETO_1180936.pdf	14/03/2019 13:39:00		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_modificado.pdf	14/03/2019 13:38:10	MAIANA MARIA RIOS SIQUEIRA MATTOS	Aceito
Recurso Anexado pelo Pesquisador	Carta_Resposta.pdf	14/03/2019 13:37:37	MAIANA MARIA RIOS SIQUEIRA MATTOS	Aceito
Outros	Declaracao_de_Confiabilidade.pdf	26/02/2019 11:32:17	MAIANA MARIA RIOS SIQUEIRA MATTOS	Aceito
Outros	Termo_de_Responsabilidade.pdf	26/02/2019 11:31:42	MAIANA MARIA RIOS SIQUEIRA MATTOS	Aceito
Outros	carta_de_anuencia.pdf	26/02/2019 11:31:21	MAIANA MARIA RIOS SIQUEIRA MATTOS	Aceito
Outros	Carta_de_encaminhamento.pdf	26/02/2019 11:31:06	MAIANA MARIA RIOS SIQUEIRA MATTOS	Aceito
Outros	_doacao_.pdf	26/02/2019 11:30:44	MAIANA MARIA RIOS SIQUEIRA MATTOS	Aceito
Orçamento	Orcamento.pdf	26/02/2019 11:30:24	MAIANA MARIA RIOS SIQUEIRA MATTOS	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.pdf	26/02/2019 11:30:01	MAIANA MARIA RIOS SIQUEIRA MATTOS	Aceito

Endereço: Miguel Calmon

Bairro: Vale do Canela

UF: BA

Telefone: (71)3283-8951

Município: SALVADOR

CEP: 40.110-902

E-mail: cepics@ufba.br



UFBA - INSTITUTO DE  
CIÊNCIAS DA SAÚDE DA  
UNIVERSIDADE FEDERAL DA



Continuação do Parecer: 3.216,001

Declaração de Pesquisadores	Equipe_detalhada.pdf	26/02/2019 11:29:15	MAIANA MARIA RIOS SIQUEIRA MATTOS	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_detalhado.pdf	26/02/2019 11:28:53	MAIANA MARIA RIOS SIQUEIRA MATTOS	Aceito
Folha de Rosto	folha.pdf	05/11/2018 09:02:28	MAIANA MARIA RIOS SIQUEIRA MATTOS	Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

SALVADOR, 22 de Março de 2019

---

**Assinado por:**  
**DANIEL DOMINGUEZ FERRAZ**  
(Coordenador(a))

**Endereço:** Miguel Calmon

**Bairro:** Vale do Canela

**UF:** BA

**Município:** SALVADOR

**CEP:** 40.110-902

**Telefone:** (71)3283-8951

**E-mail:** cepics@ufba.br

