UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO

ANA BEATRIZ VILELA TEIXEIRA

**CIMENTO ENDODÔNTICO ANTIMICROBIANO COM A
INCORPORAÇÃO DE VANADATO DE PRATA -
ANÁLISE DAS PROPRIEDADES FÍSICAS E
MICROBIOLÓGICAS**

Ribeirão Preto

2016

ANA BEATRIZ VILELA TEIXEIRA

**Cimento endodôntico antimicrobiano com a incorporação de
vanadato de prata -
Análise das propriedades físicas e microbiológicas**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia
de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para
obtenção do Título de Mestre em Ciências no
Programa de Odontologia.

Área de Concentração: Reabilitação Oral

Orientadora: Profa. Dra. Andréa Cândido dos Reis

Versão Corrigida

Ribeirão Preto

2016

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

Elaborada pela Biblioteca Central do Campus da USP – Ribeirão Preto

Teixeira, Ana Beatriz Vilela

Cimento endodôntico antimicrobiano com a incorporação de vanadato de prata - Análise das propriedades físicas e microbiológicas. Ribeirão Preto, 2016.

108 p.: il.; 30 cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto/USP. Área de Concentração: Reabilitação Oral. **Versão corrigida da Dissertação/Tese. A versão original se encontra disponível na Unidade que aloja o Programa.**

Orientadora: Cândido dos Reis, Andréa.

Cimentos Endodônticos. Agente Antimicrobiano. Nanotecnologia. Propriedades Físicas.

Radiografia Dentária Digital. Descoloração Dental.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Ana Beatriz Vilela Teixeira

**Cimento endodôntico antimicrobiano com a incorporação de vanadato de prata -
Análise das propriedades físicas e microbiológicas**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre.

Área de Concentração: Reabilitação Oral

Data da defesa: 25/01/2017

Banca Examinadora

Prof.(a) Dr.(a) Andréa Cândido dos Reis

Instituição: Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo

Julgamento: Aprovado Assinatura: _____

Prof.(a) Dr.(a) Rubens Ferreira de Albuquerque Junior

Instituição: Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo

Julgamento: Aprovado Assinatura: _____

Prof.(a) Dr.(a) Antônio Carlos Shimano

Instituição: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo

Julgamento: Aprovado Assinatura: _____

Prof.(a) Dr.(a) Rodrigo Sanches Cunha

Instituição: College of Dentistry - University of Manitoba - Canadá

Julgamento: Aprovado Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

À Deus por sempre guiar meus passos e iluminar meu caminho, dando-me forças para lutar e seguir em frente. Devo à Ele o dom da vida, o amor de minha família e todas as minhas conquistas. Que seu amor nunca nos falte!

*À minha mãe **Magda Prado Vilela Teixeira** pelo apoio incondicional em todos os momentos de minha vida e por não medir esforços pela educação de seus filhos. Exemplo a ser seguido de mulher batalhadora, íntegra e de bom coração, que me incentivou a continuar nos momentos mais difíceis e vibrou comigo à cada conquista. Você foi grande responsável por eu ter chegado até aqui, esta conquista também é sua!*

*Ao meu pai **Antônio Eduardo Teixeira** que nos ensinou a honrar nossos compromissos e nos educou em princípios de base sólida que contribuíram para o meu crescimento pessoal e intelectual. Agradeço pelo desprendimento e sacrifício em abdicar-se da convivência familiar diária para nos proporcionar os subsídios necessários para a minha formação. Obrigada por tudo que faz por nós!*

*Ao meu irmão **Marcelo Prado Vilela Santos Teixeira** por sempre apoiar-me e incentivar-me, sendo grande amigo, companheiro e até professor. Obrigada por seu amor e dedicação à nossa família.*

AGRADECIMENTO ESPECIAL

*À minha orientadora **Profa. Dra. Andréa Cândido dos Reis** por estar sempre presente preocupando-se com a minha formação, futuro e felicidade. Agradeço não somente aos anos de orientação, mas também a amizade, paciência, encorajamento em momentos de incerteza, ensinamentos que contribuíram para minha formação profissional e pessoal, e por acreditar nas minhas capacidades. Sem você nada disso seria possível!*

Muito Obrigada!

AGRADECIMENTOS

À Universidade de São Paulo e à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, representada pela Diretora Profa Dra Léa Assed Bezerra da Silva, pela minha formação como Cirurgiã-Dentista e Mestre.

À Profa. Dra. Rossana Pereira de Almeida Antunes, coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Reabilitação Oral, pela atenção aos alunos e pela dedicação ao programa.

Ao Prof. Dr. Christiano de Oliveira Santos por seus ensinamentos, atenção e disponibilidade de tempo que foram essenciais para o desenvolvimento do trabalho.

Ao Prof. Dr. Marco Antônio Schiavon pela colaboração e disponibilidade em ajudar no que for necessário.

Ao Prof. Dr. César Penazzo Lepri por mostrar-se sempre disponível e por toda a colaboração com o trabalho.

À Profa. Dra. Cláudia Helena Lovato da Silva e Profa. Dra. Helena de Freitas Oliveira Paranhos pela atenção e disponibilidade dos laboratórios.

À Profa. Dra. Alma Blásida Concepción Elizaur Benítez Catirse pela disponibilidade de equipamento que contribuiu para a realização do trabalho.

À Profa. Dra. Regina Guenka Palma Dibb pela atenção e contribuição com o trabalho.

*Ao **Prof. Dr. Evandro Watanabe** pela disponibilidade e sugestões.*

*À funcionária **Viviane de Cássia Oliveira** pela sua atenção, competência, disponibilidade e aprendizado durante a realização do trabalho.*

*Ao técnico do Laboratório Integrado de Pesquisas em Biocompatibilidade de Materiais **Edson Volta**, pela disponibilidade, auxílio em ensaios da pesquisa e principalmente pela preocupação em nos oferecer o melhor ambiente de trabalho.*

*À funcionária **Juliana Jendiroba Faraoni Romano** por sua atenção e auxílio no manuseio do equipamento Microscópio Confocal a Laser.*

*Aos **Professores do Departamento de Materiais Dentários e Prótese** pela contribuição para minha formação no curso de mestrado.*

*Às funcionárias da secretaria de **Pós-Graduação** e do **Departamento de Materiais Dentários e Prótese** pela disponibilidade e suporte aos alunos de pós-graduação.*

*Às minhas colegas **Denise Tornavoi de Castro** e **Mariana Lima da Costa Valente** pela amizade, atenção e disponibilidade em ajudar no que for preciso, o que contribuiu para a realização do trabalho e para o meu crescimento profissional e pessoal.*

*Aos colegas do Laboratório Integrado de Pesquisas em Biocompatibilidade de Materiais **Raony Mólím, Karen Pintado** e **Cecília Vasconcelos** pelos momentos de convivência e por estarem sempre dispostos a ajudar.*

*Aos membros do nosso grupo de pesquisa **Carla Larissa Vidal, Geyson Galo da Silva** e alunos de Iniciação Científica pela convivência e trabalhos desenvolvidos em conjunto.*

Aos colegas do curso de mestrado pelos momentos de aprendizado, convivência e trabalhos desenvolvidos em conjunto para as disciplinas cursadas.

*Um agradecimento especial à minha amiga **Gabriela Benedini Strini Portinari Beja** por todos os momentos de convivência desde a época da faculdade, inclusive durante a iniciação científica. Agradeço ao apoio e incentivo, compreensão, paciência e por compartilhar comigo momentos de alegrias e tristezas.*

Às minhas queridas amigas de Ribeirão Preto, de Carmo do Rio Claro e do Centro Estudantil por todos os momentos de convivência, apoio e incentivo para que eu alcançasse os meus objetivos.

*Aos membros da minha família **Avô, Tias, Primos e Cunhada, Christiane Batista da Silva Vilela**, por estarem sempre torcendo por mim e compartilharem comigo a alegria das conquistas.*

*À **Acecil®** pelo serviço prestado de esterilização das amostras.*

*À **Oficina de Precisão do Campus da USP de Ribeirão Preto** pela contribuição na confecção de dispositivos para a realização do trabalho.*

*À **CAPES** pelo auxílio financeiro na forma de bolsa de mestrado.*

EPÍGRAFE

“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis. ”

(José de Alencar)

SUMÁRIO

RESUMO	15
ABSTRACT	19
1. INTRODUÇÃO	23
2. PROPOSIÇÃO	35
3. MATERIAL E MÉTODO.....	39
3.1 Material.....	41
3.1.1 Vanadato de prata nanoestruturado decorado com nanopartículas de prata.....	41
3.1.2 Cimentos Endodônticos	41
3.2 Método	42
3.2.1 Síntese do Vanadato de prata nanoestruturado decorado com nanopartículas de prata.....	42
3.2.2 Determinação da Concentração Inibitória Mínima do AgVO_3	43
3.2.3 Confeção das amostras.....	45
3.2.4 Esterilização.....	47
3.2.5 Avaliação da atividade antimicrobiana.....	47
3.2.6 Avaliação das Propriedades Físicas.....	50
3.2.7 Caracterização Físico-Química.....	55
3.2.8 Análise dos Dados	56
4. RESULTADOS	57
4.1 Morfologia do Vanadato de Prata.....	59
4.2 Concentração Inibitória Mínima do Nanomaterial Puro	59
4.3 Atividade Antimicrobiana dos Cimentos Endodônticos Modificados	60
4.3.1 Teste de Difusão em Ágar	60
4.4 Análises das Propriedades Físicas	63
4.4.1 Escoamento.....	63
4.4.2 Radiopacidade	64
4.4.3 Alteração de cor da Estrutura Dental.....	65
4.5 Caracterização Físico-Química.....	67
5. DISCUSSÃO	69
6. CONCLUSÕES.....	83
7. REFERÊNCIAS.....	87
8. APÊNDICES.....	97

RESUMO

TEIXEIRA, A.B.V. **Cimento endodôntico antimicrobiano com a incorporação de vanadato de prata - Análise das propriedades físicas e microbiológicas.** Ribeirão Preto, 2016. **108 p.** Dissertação (Mestrado em Reabilitação Oral) – Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

O desenvolvimento de cimentos endodônticos com maior capacidade antimicrobiana, leva a associação de cimentos endodônticos com agentes antimicrobianos. O vanadato de prata nanoestruturado decorado com nanopartículas de prata (AgVO_3) é um nanomaterial com capacidade antimicrobiana com aplicação na odontologia. O objetivo desse trabalho foi avaliar quatro cimentos endodônticos (AH Plus, Sealapex, Sealer 26 e Endofill) incorporados com AgVO_3 , em diferentes concentrações (0%, 2,5%, 5% e 10%), através de testes *in vitro* de concentração inibitória mínima (CIM) e capacidade antimicrobiana (difusão em ágar) (n=6) frente aos micro-organismos: *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*. Testes das propriedades físicas de escoamento (n=6), radiopacidade (n=5), teste de alteração de cor da estrutura dental (n=3) e padrão de distribuição superficial do AgVO_3 aos cimentos endodônticos (n=5) foram realizados. Para análise estatística da capacidade antimicrobiana e escoamento foram realizados teste paramétrico 2-way ANOVA e teste de Tukey honestly significant difference (HSD), os dados da radiopacidade foram analisados pelo teste Kruskal-Wallis e teste de permutação com nível de significância de 5%, e para a alteração de cor realizou-se análise estatística descritiva. A CIM do AgVO_3 para *E. faecalis* foi de 500 $\mu\text{g/mL}$ e para *P. aeruginosa* e *E. coli* de 31,25 $\mu\text{g/mL}$. A incorporação de 10% de AgVO_3 promoveu maior atividade antimicrobiana a todos os cimentos frente a *E. coli*, ao Sealer 26 e Sealapex frente a *E. faecalis* e ao AH Plus e Endofill frente a *P. aeruginosa* ($p < 0,05$). A incorporação de AgVO_3 não influenciou na atividade antimicrobiana inerente do AH Plus frente a *E. faecalis* ($p > 0,05$) e não promoveu tal propriedade ao Sealer 26 e Sealapex frente a *P. aeruginosa* ($p > 0,05$). O escoamento do AH Plus e Endofill reduziu com o aumento da concentração de AgVO_3 ($p < 0,05$). Não houve influência no escoamento do Sealer 26 e Sealapex ($p > 0,05$). Todos os grupos apresentaram valores de escoamento dentro do recomendado pela American National Standard/American Dental Association (ANSI/ADA), exceto o AH Plus 10%. O AgVO_3 não influenciou na radiopacidade do Endofill ($p = 0,399$) e Sealapex ($p = 0,316$), e a concentração de 2,5% do Sealer 26 e AH Plus apresentou maior radiopacidade em relação ao controle ($p = 0,022$ e $p = 0,006$, respectivamente), que não diferiu dos demais grupos ($p > 0,05$). Todos cimentos incorporados com AgVO_3 apresentaram maiores alterações de cor após 180 dias, a menor alteração foi do Endofill 10% e a maior do Sealer 26 10%. O AgVO_3 apresentou um padrão de distribuição superficial circular na composição dos cimentos endodônticos. Concluiu-se que a incorporação do AgVO_3 tem potencial para aumentar a atividade antimicrobiana dos cimentos endodônticos avaliados, não influenciou no escoamento do Sealer 26 e Sealapex, e na radiopacidade dos cimentos avaliados. Os grupos incorporados com AgVO_3 apresentaram maior alteração de cor com 180 dias, exceto o Endofill 10%.

Palavras-Chave: Cimentos Endodônticos. Agente Antimicrobiano. Nanotecnologia.

Propriedades Físicas. Radiografia Dentária Digital. Descoloração Dental.

ABSTRACT

TEIXEIRA, A.B.V. **Antimicrobial endodontic sealer with the incorporation of silver vanadate - Analysis of the physical and microbiological properties**. Ribeirão Preto, 2016. **108 p**. Dissertation (Master's Degree in Oral Rehabilitation) – School of Dentistry of Ribeirão Preto, University of São Paulo.

The development of endodontic sealers with higher antimicrobial capacity, leads to the association of endodontic sealers with antimicrobial agents. The nanostructured silver vanadate decorated with silver nanoparticles (AgVO_3) is an antimicrobial nanomaterial with application in dentistry. The aim of this study was to evaluate four endodontic sealers (AH Plus, Sealapex, Sealer 26 and Endofill) incorporated with AgVO_3 , in different concentrations (0%, 2.5%, 5% and 10%), through *in vitro* tests of minimum inhibitory concentration (MIC) and antimicrobial capacity (agar diffusion method) ($n=6$) against microorganisms: *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*. Tests on physical properties of flow ($n = 6$), radiopacity ($n = 5$), tooth discoloration ($n = 3$) and superficial distribution pattern of the AgVO_3 to endodontic sealers ($n = 5$) were performed. For statistical analysis of antimicrobial capacity and flow, were performed the 2-way ANOVA parametric test and the Tukey honestly significant difference (HSD) test, the radiopacity data were analyzed by the Kruskal-Wallis test and permutation test with significance level of 5%, and descriptive statistical analysis was performed for tooth discoloration. The MIC of AgVO_3 for *E. faecalis* was 500 $\mu\text{g/mL}$ and for *P. aeruginosa* and *E. coli* 31,25 $\mu\text{g/mL}$. The incorporation of 10% of AgVO_3 increased antimicrobial activity to all sealers against *E. coli*, to Sealer 26 and Sealapex against *E. faecalis* and to AH Plus and Endofill against *P. aeruginosa* ($p < 0.05$). The incorporation of AgVO_3 did not influence on antimicrobial activity inherent of the AH Plus against *E. faecalis* ($p > 0.05$) and did not promote this property to Sealer 26 and Sealapex against *P. aeruginosa* ($p > 0.05$). The flow of AH Plus and Endofill decreased with increasing AgVO_3 concentration ($p < 0.05$). There was no influence on the flow of Sealer 26 and Sealapex ($p > 0.05$). The evaluated groups presented flow values within the recommended by the American National Standard/American Dental Association (ASNI/ADA), except the AH Plus 10%. The AgVO_3 did not influence the radiopacity of Endofill ($p = 0.399$) and Sealapex ($p = 0.316$), the concentration of 2.5% of Sealer 26 and AH Plus presented higher radiopacity than the control ($p = 0.022$ and $p = 0.006$, respectively), which did not differ from the other groups ($p > 0.05$). All sealers incorporated with AgVO_3 presented color alterations after 180 days, the lowest change was Endofill 10% and the highest was Sealer 26 10%. The AgVO_3 presented a pattern of circular superficial distribution in the composition of the endodontic sealers. It is concluded that the incorporation of AgVO_3 has the potential to increase the antimicrobial activity of the endodontic sealers evaluated, did not influence the flow of the Sealer 26 and Sealapex, and the radiopacity of sealers evaluated. The groups incorporated with AgVO_3 presented color alterations with 180 days, except Endofill 10%.

Keywords: Endodontic Sealer, Antimicrobial Agents, Nanotechnology, Physical Properties, Radiography Dental Digital, Tooth Discoloration

1. *INTRODUÇÃO*

Para o sucesso do tratamento endodôntico é desejável que a população de micro-organismos infecciosos diminua, prevenindo reinfecções e possibilitando uma obturação adequada (Nair et al., 2005; Slutzky-Goldberg et al., 2008; Gjorgievskaa et al., 2013; Gong et al., 2014; Arias-Moliz; Camilleri, 2016). O preparo químico-mecânico auxilia na redução desses micro-organismos, no entanto, a eliminação completa dos mesmos é dificultada em situações clínicas típicas (Zhang et al., 2009; Baer; Maki, 2010; Gjorgievskaa et al., 2013). Devido à complexidade anatômica do sistema de canais radiculares e fatores de virulência, os micro-organismos adquirem resistência a soluções irrigantes, medicamentos intra-canal e compostos antimicrobianos, ocasionando reinfecções subsequentes (Paz, 2007; Wu et al., 2014; Al-Shwaimi et al., 2016; Vanapatla et al., 2016).

Dessa forma, é desejável que os cimentos endodônticos tenham atividade antimicrobiana inerente, o que leva a um controle da população de micro-organismos no sistema de canais radiculares após sua aplicação (Slutzky-Goldberg et al., 2008; Zhang et al., 2009; Bailón-Sánchez et al., 2014; Barros et al., 2014a; Barros et al., 2014b; Al-Shwaimi et al., 2016; Arias-Moliz; Camilleri, 2016; Shakya et al., 2016; Rezende et al., 2016).

A atividade antimicrobiana dos materiais odontológicos pode ser aprimorada através da adição de alguns agentes como a clorexidina (Ruiz-Linares et al., 2013), cloreto de cetilpiridínio, cloreto de benzalcônio (Gjorgievskaa et al., 2013), antibióticos (Hoelscher; Bahcall; Maki, 2006; Baer; Maki, 2010; Vanapatla et al., 2016) e nanopartículas, por exemplo (Beyth et al., 2013; Rad et al., 2013; Barros et al., 2014a; Barros et al., 2014b; Wu et al., 2014; Carpio-Perochena et al., 2015).

Bactérias Gram-negativas, como a *Pseudomonas aeruginosa*, e Gram-positivas, como a *Enterococcus faecalis*, são prevalentes em infecções endodônticas com lesão periapical (Gjorgievskaa et al., 2013; Phee et al., 2013). A *E. faecalis* apresenta fatores de virulência, incluindo enzimas líticas, citolisina, substância de agregação, feromonas e ácido lipoprotéico, sendo capaz de invadir os túbulos dentinários e resistir às soluções desinfetantes utilizadas para irrigação dos canais radiculares (Wu et al., 2014). A predominância de micro-organismos anaeróbios com pigmentos proteolíticos negros encontrados em culturas de canais radiculares infectados, associado à frequente recuperação de *E. faecalis*, resultou no conceito de que esta bactéria é o único agente etiológico de infecções endodônticas crônicas. Consequentemente, o foco na *E. faecalis* resultou em menos informações sobre a existência outros micro-organismos persistentes em tais infecções (Paz, 2007).

As infecções endodônticas têm origem polimicrobiana, e fatores inerente ao ambiente dos canais radiculares influenciam na colonização bacteriana, assim, a disponibilidade de oxigênio e nutrientes limitam o crescimento de certos micro-organismos. Após o tratamento do canal radicular, a sobrevivência de micro-organismos resistentes determina a capacidade dos mesmos em se adaptarem às condições existentes nesse novo ambiente (Paz, 2007).

A *P. aeruginosa* foi encontrada isoladamente em 6,8% dos casos de um estudo com tratamentos endodônticos com infecções persistentes, e dois desses casos apresentaram uma infecção monoespécie causada por essa bactéria. Esse micro-organismo é resistente a altas concentrações de sais, corantes, antissépticos fracos, incluindo o digluconato de clorexidina, e antibióticos, persistindo após o tratamento convencional (Phee et al., 2013).

Micro-organismos anaeróbios facultativos são encontrados em 10 a 20% dos canais radiculares infectados (Leonardo et al., 2000), e assim como os aeróbios facultativos, são capazes de crescer tanto na presença como na ausência de oxigênio (Alvares; Alvares Junior, 2009). A *Escherichia coli*, bactéria anaeróbia facultativa, apesar de ser um micro-organismo originário do trato intestinal, pode ser encontrada em canais radiculares infectados, proveniente de infecções secundárias, em casos que os canais são repetidamente abertos e fechados devido à presença de dor, e em pacientes submetidos a tratamentos inadequados, incluindo antibioticoterapia incorreta (Tronstad, 1992).

Com base na origem polimicrobiana das infecções endodônticas, a atividade antimicrobiana de cimentos endodônticos deve ser avaliada frente a diferentes espécies de micro-organismos Gram-positivos e Gram-negativos (Leonardo et al., 2000). Há também uma relação interdependente entre micro-organismos anaeróbios estritos, aeróbios e anaeróbios facultativos, cuja presença e permanência nos canais radiculares dependem dos nutrientes disponíveis e do potencial de oxidação-redução fornecidos pelos anaeróbios facultativos. Dessa forma, a determinação da ação antimicrobiana de materiais endodônticos sobre esses micro-organismos é essencial (Leonardo et al., 2000).

Assim, pode-se encontrar na literatura estudos que avaliaram a atividade antimicrobiana de cimentos endodônticos comerciais, puros e com a incorporação de agentes antimicrobianos, frente a diversas espécies de micro-organismos, como o *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus casei* e *Actinomyces viscosus*, utilizados para avaliar o efeito inibidor dos cimentos RoekoSeal, Endomethasone N, N2, Apexit Plus e AH Plus, incorporados com 2% de cloreto de benzalcônio e 2% de cloreto de cetilpiridínio, pelo método de difusão em ágar (Gjorgievskaa et al., 2013). Leonardo et al. (2000) avaliaram o efeito inibidor de cimentos endodônticos (Sealapex, Fill Canal, Ketac Endo, AH Plus), pelo método de difusão

em ágar, frente a sete espécies de micro-organismos, sendo cinco Gram-positivos: *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus mutans*, e dois Gram-negativos: *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*.

No entanto, a maioria dos estudos encontrados na literatura avaliaram o efeito antimicrobiano de cimentos endodônticos frente a *Enterococcus faecalis* (Rezende et al., 2016; Shakya et al., 2016; Wu et al., 2016; Vanapatla et al., 2016; Carpio-Perochena et al., 2015; Wang; Shen; Haapasalo, 2014; Baer; Maki, 2010; Hiraishi et al., 2009; Zhang et al., 2009; Slutzky-Goldberg et al., 2008; Hoelscher; Bahcall; Maki, 2006; Çobankara et al., 2004; Mickel; Nguyen; Chogle, 2003), uma vez que há relatos que esse micro-organismo é o mais prevalente em canais infectados e em casos de retratamentos; sua prevalência varia de 24% a 77% (Al-Shwaimi et al., 2016).

Os métodos mais utilizados para avaliação da atividade antimicrobiana de cimentos endodônticos são o teste de difusão em ágar e o teste de contato direto (Al-Shwaimi et al., 2016). O teste de difusão em ágar, técnica utilizada por muito tempo como teste padrão para avaliar o efeito inibidor de materiais dentários, é realizado através de pequenos poços confeccionados na placa de ágar e preenchidos pelo cimento endodôntico, e a zona de inibição é medida como uma indicação do efeito antimicrobiano. Foram relatadas também variações desta técnica, como a colocação de pontos de papel absorvente misturados ao cimento de avaliado (Al-Shwaimi, 2011).

É importante ressaltar que há dificuldades na comparação dos resultados de vários estudos que utilizaram o teste de difusão em ágar, devido à utilização de diferentes micro-organismos e meios de crescimento. Além disso, esse teste requer controle e padronização para obter-se resultados precisos (Al-Shwaimi, 2011). Essa padronização envolve fatores como: o contato entre o material e o ágar, taxa de difusão do material testado, viscosidade do ágar, a densidade do inóculo, tipo de meio de cultura para ágar, volume do ágar colocado na placa e controle da temperatura (Al-Shwaimi, 2011).

No entanto, se a maioria dessas variáveis forem cuidadosamente controladas e padronizadas, resultados consistentes e reprodutíveis podem ser obtidos (Siqueira et al., 2000). Além disso, a padronização desses fatores permite excluir inúmeras variáveis existentes em testes realizados *in vivo* (Leonardo et al., 2000). Apesar dessas limitações, o teste de difusão em ágar ainda é utilizado para avaliar a atividade antimicrobiana de cimentos endodônticos (Gjorgievskaa et al., 2013).

Em meados dos anos noventa foi proposto o teste de contato direto, com a finalidade de superar as desvantagens do teste de difusão em ágar. Esse teste pretende avaliar o efeito antimicrobiano de diferentes materiais através do contato direto do material testado com o micro-organismo alvo. Essa técnica independe da solubilidade e difusibilidade dos componentes antimicrobianos dos cimentos. Porém, apresenta a desvantagem do risco de contaminação das amostras (Al-Shwaimi, 2011).

Um dos materiais utilizados como agente antimicrobiano incorporado aos cimentos endodônticos são as nanopartículas (Beyth et al., 2013; Rad et al., 2013; Barros et al., 2014a; Barros et al., 2014b; Wu et al., 2014; Carpio-Perochena et al., 2015). Os nanomateriais apresentam tamanho reduzido, que varia de 1 a 100 nm, e podem exibir propriedades antibacterianas que impedem as bactérias de adquirirem resistência, por estarem carregadas eletrostaticamente com carga positiva, interagem com as células bacterianas carregadas negativamente, resultando na morte das mesmas (Barros et al., 2014b; Wu et al., 2014).

Antes do surgimento das nanopartículas, compostos a base de prata eram conhecidos por sua ação virucida e bactericida de largo espectro há mais de 3000 anos, quando as civilizações antigas já utilizavam esses compostos no tratamento da água (Rai; Yadav; Gade, 2009; Holtz et al., 2010; Holtz et al., 2012). Diferentes campos da medicina também utilizaram esses compostos devido às suas propriedades antimicrobianas, e sua aplicação pode ser encontrada em cateteres, curativos e próteses (Corrêa et al., 2015). Compostos a base de prata, sob a forma de prata metálica, nitrato de prata e sulfadiazina de prata, foram utilizados para o tratamento de queimaduras, feridas e infecções bacterianas, até serem substituídos pelos antibióticos (Rai; Yadav; Gade, 2009).

Devido ao surgimento de bactérias patogênicas com resistência aos antibióticos, empresas farmacêuticas e pesquisadores vêm buscando novos agentes antimicrobianos (Rai; Yadav; Gade, 2009). Com o advento da nanotecnologia, foram sintetizados diferentes tipos de nanomateriais como cobre, zinco, titânio, magnésio, ouro, alginato, e a prata. As nanopartículas de prata (AgNPs) demonstraram propriedades antimicrobianas mais eficazes, com interação única com bactérias, vírus, fungos e micro-organismos eucarióticos. Essas nanopartículas são amplamente utilizadas na área médica, em suturas de feridas, tubos endotraqueais, instrumentos cirúrgicos e próteses ósseas (Rai; Yadav; Gade, 2009; Corrêa et al., 2015).

As AgNPs podem penetrar através da membrana celular, devido ao tamanho reduzido, resultando em maior atividade antimicrobiana (Corrêa et al., 2015). Assim, essas

nanopartículas apresentam uma relação de área de superfície-para-volume capaz de aumentar a reatividade, adesão e penetração na parede celular bacteriana, causando alterações estruturais, e gerando assim um grande potencial bactericida contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, incluindo bactérias resistentes (Rai; Yadav; Gade, 2009; Wu et al., 2014; Corrêa et al., 2015).

Essa ação bactericida das AgNPs se dá pela interação com os grupos tiol das enzimas presentes no metabolismo da célula bacteriana, produzindo a morte celular (Kwakye- Awuah et al., 2008; Holtz et al., 2012). Além disso, os íons de prata apresentam uma baixa toxicidade para células humanas quando utilizados em baixas concentrações (Holtz et al., 2010; Corrêa et al., 2015).

Devido ao seu potencial antimicrobiano, as AgNPs também foram aplicadas em várias áreas da odontologia, como na endodontia, em próteses dentárias, na implantodontia e odontologia restauradora, com o objetivo de diminuir a colonização microbiana sobre esses materiais, melhorando a saúde bucal e qualidade de vida dos pacientes (Corrêa et al., 2015).

O acúmulo de biofilme nas restaurações dentárias, que ocasionam falhas nas margens dessas mesmas, levou à incorporação de AgNPs em resinas compostas e sistemas adesivos, e os resultados desses estudos sugerem boas propriedades mecânicas e potencial antimicrobiano das resinas compostas, mesmo em baixas concentrações. Além de não comprometer a força de ligação e não afetar a citotoxicidade dos sistemas adesivos (Corrêa et al., 2015).

A Estomatite protética está presente em portadores de prótese dentária, e é frequentemente associada à colonização por *Candida*. A infecção persistente nesses casos levou à métodos de prevenção como a incorporação de AgNPs aos polímeros utilizados na confecção das bases protéticas, e aos condicionadores de tecidos. Autores sugerem resultados antimicrobianos promissores e nenhum efeito negativo nas propriedades mecânicas das resinas acrílicas (Corrêa et al., 2015).

Na endodontia, as falhas do tratamento ocasionadas por bactérias residuais nos canais radiculares, levou a introdução de AgNPs na guta-percha, que demonstrou efeito antimicrobiano frente a *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* e *Escherichia coli*. As AgNPs foram também utilizadas como solução irrigante para a desinfecção de canais, e na concentração de 0,005% apresentou o mesmo efeito bactericida que NaOCl a 5,2% frente a *E. faecalis*. Além desses estudos, as AgNPs foram incorporadas na concentração de 1% ao Agregado de Trióxido Mineral (MTA) e apresentaram maior efeito antimicrobiano contra *Enterococcus faecalis*, *Candida albicans* e *Pseudomonas aeruginosa* do que o MTA não modificado. Embora as AgNPs apresentem um bom efeito antimicrobiano,

poucos estudos empregaram essas nanopartículas em materiais endodônticos (Corrêa et al., 2015).

Apesar das AgNPs serem um potencial agente antimicrobiano, essas apresentam desvantagens, como a instabilidade termodinâmica e apresentam uma tendência natural de se aglomerarem. Manter a homogeneidade de tamanho e forma, além de elevada dispersão, prevenindo a aglomeração, é um grande desafio. A aplicação prática das AgNPs como aditivos estão limitadas, de certa forma, devido à dificuldade de se obter nanopartículas livres e agentes estabilizantes (Zarbin, 2007; Jones; Hoek, 2010). Além disso, a alteração de cor é uma desvantagem para os materiais odontológicos (Corrêa et al., 2015).

Recentemente foi desenvolvida uma maneira de estabilizar as AgNPs associando-as a nanofios de vanadato, formando vanadato de prata nanoestruturado decorado com nanopartículas de prata (AgVO_3). Esse nanomaterial foi sintetizado por uma reação de precipitação de vanadato de amônio e nitrato de prata, seguido por tratamento hidrotérmico. A atividade antimicrobiana foi avaliada contra três estirpes de bactérias *Staphylococcus aureus*, e foram obtidos resultados promissores (Holtz et al., 2010). Sua primeira aplicação como aditivo antibacteriano foi em tintas à base d'água para aplicações em ambientes domésticos e hospitalares, demonstrando atividade antimicrobiana efetiva contra as bactérias: *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, e *Salmonella entérica Typhimurium*. Esta ação antibacteriana foi 30 vezes maior que a Oxacilina. A adição de 1% dessa substância à tinta à base d'água mostrou uma zona de inibição de 4 mm contra uma estirpe de *Staphylococcus aureus*. (Holtz et al., 2012).

A toxicidade do vanadato de prata nanoestruturado decorado com nanopartículas de prata (SVSN-LQES1) isolado foi avaliada por Artal et al. (2013), que observaram o papel da liberação da prata e do vanádio na toxicidade aguda contra *Daphnia similis*, um micro-organismo aquático. Os autores concluíram que o SVSN-LQES1 foi extremamente tóxico para *D. similis*, e atribuíram a citotoxicidade aos íons de prata (Ag) e não ao vanádio (V).

A primeira aplicação do AgVO_3 na odontologia foi com a sua incorporação a resinas acrílicas odontológicas, demonstrando atividade antimicrobiana frente aos micro-organismos *P. aeruginosa*, *C. albicans*, *S. mutans* e *S. aureus* (Castro et al., 2014, 2016). Sua coloração amarelada reduz problemas como alterações de cor em materiais estéticos. Estudos que avaliem a incorporação do AgVO_3 nas propriedades antimicrobianas e físicas de cimentos endodônticos é uma inovação não encontrada na literatura.

O padrão de dispersão de nanopartículas influencia nas propriedades químicas, físicas, ópticas, mecânicas e microbiológicas dos materiais, assim a aglomeração das mesmas pode

reduzir essas propriedades (Rai; Yadav; Gade, 2009; Cho et al, 2014). O formato das nanopartículas também influencia na inibição do crescimento bacteriano, sendo assim, nanopartículas triangulares inibem o crescimento bacteriano em uma concentração menor do que nanopartículas esféricas. E as nanopartículas em forma de vara requerem ainda uma concentração maior para apresentarem atividade antimicrobiana eficaz (Rai; Yadav; Gade, 2009).

O Microscópio Confocal a Laser é cada vez mais utilizado para avaliar a morfologia de diversos materiais dentários e da estrutura dental, graças às características da luz laser (coerência, intensidade e frequência). Além disso, pode-se obter imagens tridimensionais de alta resolução através desse equipamento, que permite o estudo da interpenetração de diferentes materiais com resultados altamente confiáveis (Marigo et al., 2012).

Além da influência do padrão de dispersão e formato das nanopartículas, a adição desses agentes antimicrobianos pode alterar as propriedades dos materiais obturadores, necessitando de testes para confirmar a manutenção das mesmas (Ruiz-Linares et al., 2013). Dentre as propriedades físicas requeridas para os cimentos endodônticos destaca-se o escoamento e radiopacidade adequados, além da necessidade de não promover alterações de cor na estrutura dental. Essas propriedades são avaliadas por testes de controle que garantem o comportamento de um produto estável (Laghios et al., 2000; Duarte et al., 2010; Vitti et al., 2013a; Vitti et al., 2013b).

Um dos objetivos principais do tratamento endodôntico é que o canal radicular fique hermeticamente vedado pelo material obturador, para negar nutrientes aos micro-organismos restantes (Baer; Maki, 2010; Ping Xu et al., 2010; Siqueira et al., 2000). Materiais de obturação, como a guta-percha, ocupam a maior parte do canal, e o cimento preenche as irregularidades. Para isso, o cimento deve ter uma vazão adequada (Siqueira et al., 2000).

Além do canal radicular principal e dos túbulos dentinários, a raiz pode apresentar variações anatômicas tais como canais laterais e acessórios, ramificações e deltas, dando origem a um sistema complexo que pode ser inteiramente colonizado por micro-organismos. Assim, a capacidade de escoamento e antimicrobiana ideais ajudam na eliminação de micro-organismos localizados em áreas confinadas do sistema de canais radiculares (Siqueira et al., 2000).

A microbiota endodôntica de dentes não tratados é dominada por bactérias anaeróbias estritas. Em casos de falhas no tratamento endodôntico, foram encontrados micro-organismos aeróbios facultativos, como bactérias e fungos. Sendo assim, Siqueira et al. (2000) fizeram uma associação entre o efeito antimicrobiano e o escoamento de cimentos endodônticos, e

avaliaram essas propriedades utilizando os cimentos Kerr Pulp Canal Sealer EWT, Grossman's Sealer, ThermaSeal, Sealer 26, AH Plus e Sealer Plus, através do teste de difusão em ágar. O teste foi realizado frente a dois micro-organismos anaeróbios (*Prevotella nigrescens* e *Porphyromonas gingivalis*), oito aeróbios ou anaeróbios facultativos (*Streptococcus mitis*, *Streptococcus bovis*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Lactobacillus casei*, e *Escherichia coli*) e uma cultura mista (*Candida albicans* e uma amostra de saliva obtida de um dos autores). Para avaliar o escoamento, 0,5 mL de cada amostra dos cimentos endodônticos foi depositada entre duas placas de vidro e um peso de 500g foi colocado sobre a placa de vidro superior, com peso de 20g, totalizando o peso atuante de 520g. Após 1 minuto a placa superior foi removida e os diâmetros dos discos formados foram mensurados três vezes e determinada a média aritmética. Foram utilizadas seis amostras para cada cimento. Método semelhante foi utilizado no presente estudo.

A radiopacidade é uma propriedade requerida para os materiais intra-orais, pois permite que estes sejam distinguidos das estruturas circundantes, como dentes e osso alveolar, e através do exame radiográfico é possível avaliar a extensão e a qualidade do preenchimento (Bahar; Alsalim; Dayem, 2013; Carvalho-Junior et al., 2007; Ferreira et al., 1999).

A American National Standard/American Dental Association (ANSI/ADA, 2000), especificação nº 57, estabelece a avaliação da radiopacidade por meio de densitômetro óptico (Carvalho-Junior et al., 2007). Tagger e Katz (2003) dispensaram o uso desse equipamento, utilizando imagens digitais, e obtendo-se um valor de cinza por pixel através de um software especializado. Outros estudos encontrados na literatura também utilizaram diferentes softwares para mensurar a densidade dos tons de cinza das imagens radiográficas de cimentos endodônticos (Önem; Baksi; Şen, 2013; Guerreiro-Tanomaru et al., 2009; Carvalho-Junior et al., 2007; Tanomaru-Filho et al., 2007).

Os cimentos endodônticos são agentes potenciais para alterações de cor quando deixados na câmara pulpar por iatrogenia (Kohli et al., 2015; Meincke et al., 2013; Davis; Walton; Rivera, 2002; Van der Burgt; Mullaney; Plasschaert, 1986). Para análise dessas alterações, os espectrofotômetros são muito utilizados, avaliando a complexidade dos fatores óticos com maior precisão e eliminando interpretações subjetivas de determinação da cor por métodos a olho nu (Meincke et al., 2013).

A busca por um cimento endodôntico com propriedades antimicrobianas e com manutenção das propriedades físico-químicas, levou à incorporação de diferentes concentrações do AgVO₃ à quatro cimentos endodônticos. A hipótese nula foi que a adição de AgVO₃ não alteraria atividade antimicrobiana frente a *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas*

aeruginosa e *Escherichia coli* ou alterações no escoamento, radiopacidade e alteração de cor da estrutura dental dos cimentos avaliados, além de estar incorporado aos mesmos.

2. PROPOSIÇÃO

O objetivo geral desse trabalho foi incorporar o vanadato de prata nanoestruturado decorado com nanopartículas de prata (AgVO_3) à cimentos endodônticos como potencial agente antimicrobiano e avaliar as propriedades antimicrobianas e físico-químicas dos cimentos modificados em comparação com os cimentos puros (controle).

Os objetivos específicos foram avaliar *in vitro*:

1 – A concentração inibitória mínima (CIM) do AgVO_3 para a qual não se observa o crescimento de três espécies de micro-organismos: *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*.

2 – A atividade antimicrobiana de quatro cimentos endodônticos incorporados com AgVO_3 em três concentrações do nanomaterial: 2,5%, 5% e 10%, e o grupo controle (sem o agente antimicrobiano); contra três espécies de micro-organismos: *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*.

3 - O escoamento de quatro cimentos endodônticos incorporados com AgVO_3 em três concentrações do nanomaterial: 2,5%, 5% e 10%, e o grupo controle.

4 - A influência do AgVO_3 na radiopacidade de quatro cimentos endodônticos incorporados com três concentrações do nanomaterial: 2,5%, 5% e 10%, e o grupo controle.

5 - Se a incorporação de AgVO_3 à quatro cimentos endodônticos, modificados com três concentrações do nanomaterial: 2,5%, 5% e 10%, e o grupo controle, promove alteração de cor da estrutura dental.

6 – O padrão de distribuição superficial do AgVO_3 na composição dos cimentos endodônticos avaliados.

3. MATERIAL E MÉTODO

3.1 Material

3.1.1 Vanadato de prata nanoestruturado decorado com nanopartículas de prata

O Vanadato de prata nanoestruturado decorado com nanopartículas de prata (AgVO_3) foi produzido no Laboratório de Pesquisa em Química de Materiais, do Departamento de Ciências Naturais da Universidade Federal de São João Del-Rei.

3.1.2 Cimentos Endodônticos

Para o estudo foram selecionados quatro cimentos endodônticos comerciais descritos na Tabela 1.

Tabela 1. Marcas comerciais e composição dos Cimentos Endodônticos utilizados

Nome Comercial	Fabricante	Composição
AH Plus	DENTSPLY, Konstanz, Germany	Pasta A: Bisphenol-A resina epóxi, Bisphenol-F resina epóxi, Tungstato de cálcio, Óxido de zircônio, Sílica, Pigmentos de óxido de ferro. Pasta B: Dibenzylldiamine, Aminoadamantane, Tricyclodecane-diamine, Tungstato de cálcio, Óxido de zircônio, Sílica, Óleo de silicone.
Endofill	DENTSPLY, Petrópolis, RJ, Brazil	Pó: Óxido de zinco, Resina hidrogenada, Subcarbonato de bismuto, Sulfato de bário e Borato de sódio. Líquido: Eugenol, Óleo de amêndoas doces e BHT.
Sealapex	Kerr, Sybron Endo, Orange, CA, USA	Óxido de cálcio, Trióxido de bismuto, Óxido de zinco, Sílica sub-micro, Bióxido de titânio, Estearato de zinco, Fosfato tricálcico, Sulfonamida de tolueno etil, Silicato de metil metileno, Silicato de isobutil e Pigmento.
Sealer 26	DENTSPLY, Petrópolis, RJ, Brazil	Pó: Trióxido de bismuto, Hidróxido de cálcio, Hexametileno tetramina e Dióxido de titânio. Resina: Epóxi.

3.2 Método

3.2.1 Síntese do Vanadato de prata nanoestruturado decorado com nanopartículas de prata

A síntese do material foi realizada de acordo com o método descrito por Holtz et al. (2010) por meio de uma reação de precipitação entre o nitrato de prata (AgNO_3 , Merck 99,8%) e metavanadato de amônio (NH_4VO_3 , Merck 99%).

Inicialmente 0,9736 gramas de NH_4VO_3 foram solubilizados em 200 mL de água destilada a 65°C , sob agitação magnética, durante 10 minutos. Em seguida, foi realizada a solubilização de 1,3569 gramas de AgNO_3 em 200 mL de água destilada, nas mesmas condições. A solução de AgNO_3 foi adicionada à de NH_4VO_3 , gota a gota e agitadas durante 30 minutos, formando a solução de vanadato de amônio. O precipitado obtido foi filtrado à vácuo, lavado com água destilada e etanol absoluto, e seco em linha de vácuo durante 10 horas (figura 1).

A morfologia do material obtido foi analisada por Microscopia Eletrônica de Transmissão, como o microscópio Magellan 400L (FEI Company, Hillsboro, OR, USA) para confirmar a presença de AgNPs na superfície dos cristais formados.

Figura 1. Etapas da síntese do AgVO_3 . **a.** Reagente metavanadato de amônio. **b.** Reagente nitrato de prata. **c.** Pesagem dos reagentes em balança de precisão. **d.** Solução de nitrato de prata adicionada à de metavanadato de amônio. **e.** Filtragem da solução de vanadato de amônio. **f.** AgVO_3 obtido.

3.2.2 Determinação da Concentração Inibitória Mínima do AgVO₃

A concentração inibitória mínima (CIM) é a concentração mínima do agente antimicrobiano para a qual não se observa crescimento do micro-organismo. Os valores da CIM do AgVO₃ frente aos micro-organismos testados foram determinados com base no método das diluições sucessivas descritos pelo Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2003), em placas de cultura celular (TPP, Trasadingen, Unterklettgau, Suíça) contendo 96 poços e em duplicata, realizado no Laboratório de Pesquisa em Reabilitação Oral da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto - USP.

3.2.2.1 Micro-organismos e Condição de Crescimento

A CIM do AgVO₃ foi determinada frente aos micro-organismos *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) e *Escherichia coli* (ATCC 25922).

Os micro-organismos foram obtidos a partir do descongelamento das cepas e cultivo à 37°C por 24h em estufa microbiológica (DeLeo, B2DG, Bento Gonçalves, RS, Brasil). Após esse período, as culturas foram centrifugadas a 6.000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi lavado duas vezes com 10 mL de PBS (Phosphate Buffered Saline, contendo os sais: NaCl, KCl, Na₂HPO₄, KH₂PO₄). A confirmação da concentração do inóculo foi feita através da densidade óptica – Espectrofotômetro (BEL Photonics, modelo 1105, Piracicaba, SP, Brasil), com leitura de absorbância de 0,120 para *P. aeruginosa* e *E. coli*, e 0,150 para *E. faecalis* em comprimento de onda de 625nm, o que corresponde a 10⁸ células/mL. Após a padronização das suspensões, os inóculos foram diluídos na proporção de 1:10, obtendo-se um inóculo bacteriano de aproximadamente 10⁷ células/mL.

A confirmação da concentração celular foi verificada através da semeadura do inóculo em placas de Petri e determinação do número de Unidades Formadoras de Colônias (UFC/mL).

3.2.2.2 Meios de Cultura Utilizados

Foram utilizados os meios de cultura *Mueller Hinton Broth (MHB)* (Difco, Sparks, MD, USA), para *P. aeruginosa* e *E. coli*, e *Tryptone Soya Broth (TSB)* (Difco, Sparks, MD, USA), para *E. faecalis*.

Para o *MHB* a cada 38 g do meio de cultura desidratado foram adicionados 1000,00 mL de água destilada e esterilizados em autoclave a 121°C por 15 minutos. Para o *TSB* a cada 40,0 g do meio de cultura desidratado foram adicionados 1000,00 mL de água destilada e esterilizados em autoclave a 121°C por 15 minutos.

3.2.2.3 Concentração Inibitória Mínima

As placas de 96 poços foram preparadas contendo 100 µL do meio de cultura. O pó do AgVO_3 foi diluído em água destilada, e no primeiro poço foi adicionado 100 µL de AgVO_3 à concentração de 500 µg/mL, seguido de homogeneização. Foram feitas diluições sucessivas, transferindo-se 100 µL da suspensão para o próximo poço, de forma que a concentração do agente fosse reduzida pela metade, a cada diluição. Em cada poço foi inoculado 5 µL do micro-organismo testado, de forma que ao final a concentração do inóculo foi aproximadamente 5×10^5 células/mL.

Para cada micro-organismo foram obtidas 10 concentrações do agente antimicrobiano e dois controles, um positivo, contendo apenas meio de cultura, PBS e micro-organismo, e outro negativo, contendo meio de cultura e a solução com AgVO_3 .

As placas foram incubadas a 37°C, em estufa microbiológica, e após 24 horas de incubação, o crescimento microbiano foi avaliado através da turbidez da amostra a olho nu. Uma alíquota dos poços considerados negativos foi semeada em placa com meio de cultura específico para confirmar ausência/presença de crescimento. Havendo crescimento, o AgVO_3 seria considerado ineficiente para ação antimicrobiana.

A CIM do nanomaterial puro não corresponde à mínima concentração inibitória do mesmo quando adicionado a outro material. Assim, esta análise foi realizada para verificar se o AgVO_3 apresenta atividade antimicrobiana frente aos micro-organismos testados, porém a atividade antimicrobiana dos cimentos endodônticos incorporados com AgVO_3 foi determinada pelo teste de difusão em ágar.

3.2.3 Confeção das amostras

As amostras com AgVO_3 foram preparadas por mistura das porcentagens de 0% (grupo controle), 2,5%, 5% e 10% (em massa do agente antimicrobiano) incorporado proporcionalmente ao pó ou pasta base do cimento endodôntico, pesados em balança de precisão. Em seguida, o pó/pasta base foi incorporado ao líquido/pasta catalisadora seguindo as instruções de manipulação do fabricante.

Para a confecção dos corpos de prova para avaliação da atividade antimicrobiana, um tubo de PVC nas dimensões de 25 mm de diâmetro x 4 mm de altura foi preenchido por silicona de condensação (Zetalabor, © Zhermack SpA, Badia Polenise - RO, Italy), na qual foram inseridas 4 matrizes metálicas nas dimensões de 4x3 mm. Após a presa da silicona as matrizes foram retiradas formando cavidades, onde foi inserido o cimento endodôntico para confecção dos corpos de prova (figuras 2 e 3).

Figura 2. Matriz para confecção dos corpos de prova.

Figura 3. Cimento Endodôntico AH Plus com proporção de 5% de AgVO_3 e matriz para confecção dos corpos de prova.

O conjunto matriz e cimento endodôntico preparado foram levados à estufa (DeLeo, B2DG, Bento Gonçalves, Rio Grande do Sul, Brasil) a 37°C até a presa, que consistiu em 7 dias para os cimentos AH Plus, Endofill e Sealer 26, e 14 dias para o Sealapex. Após a presa, os corpos de prova foram lixados com discos de lixa Sof-Lex® (3M ESPE, Saint Paul, Estados Unidos) em duas granulações: fina e super fina (Figura 4).

Figura 4. Corpos de prova com Ø 4 x 3 mm. **a.** Endofill controle. **b.** Endofill com 5% de AgVO₃. **c.** Endofill com 10% de AgVO₃.

3.2.3.1 Delineamento Experimental

Foram confeccionadas 592 amostras no total:

- Teste de Difusão em Ágar:
4 cimentos x 4 concentrações x 6 amostras por grupo x 3 micro-organismos = 288 amostras
- Escoamento:
4 cimentos x 4 concentrações x 6 amostras por grupo = 96 amostras
- Radiopacidade:
4 cimentos x 4 concentrações x 5 amostras por grupo = 80 amostras
- Alteração de cor da Estrutura Dental:
4 cimentos x 4 concentrações x 3 amostras por grupo = 48 amostras
- Padrão de distribuição superficial do AgVO₃:
4 cimentos x 4 concentrações x 5 amostras por grupo = 80 amostras

3.2.4 Esterilização

Os corpos de prova de cada grupo utilizados para a avaliação da atividade antimicrobiana foram acondicionados em envelopes especiais com uma face de plástico (Envelope Grau Cirúrgico Termo – selável, Sispack, SP, Brasil) e esterilizados por meio de óxido de etileno na ACECIL – Central de Esterilização Comércio e Indústria Ltda – Campinas.

3.2.5 Avaliação da atividade antimicrobiana

O método de difusão em ágar foi realizado utilizando-se 4 cimentos endodônticos (Endofill, Sealer 26, AH Plus e Sealapex), com a incorporação de 3 concentrações do nanomaterial (2,5%, 5% e 10% de AgVO_3) e o grupo controle (sem adição de AgVO_3). Foram utilizados 6 corpos de prova para cada grupo, frente a 3 micro-organismos. Totalizando 288 corpos de prova para essa análise.

3.2.5.1 Micro-organismos e Condições de Crescimento

Esse método foi utilizado para a determinação do efeito inibidor frente as espécies: *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Escherichia coli* (ATCC 25922).

Os micro-organismos foram obtidos a partir do descongelamento das cepas e cultivo à 37°C por 24h em estufa microbiológica. Após esse período, as culturas foram centrifugadas a 6.000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi lavado duas vezes com 10 mL de PBS. A confirmação da concentração do inóculo foi feita através da densidade óptica – Espectrofotômetro (BEL Photonics, modelo 1105, Piracicaba, SP, Brasil), com leitura de absorbância de 0,120 para *P. aeruginosa* e *E. coli*, e 0,150 para *E. faecalis* em comprimento de onda de 625nm, o que corresponde a 10^8 células/mL.

Para o preparo da solução de micro-organismos incorporados ao meio de cultura, foram inseridos 500 µL dos inóculos bacterianos padronizados em 50 mL do meio de cultura esterilizado à 45-50° C, para obtenção de uma concentração de aproximadamente 10^6 células/mL do inóculo microbiano.

A confirmação da concentração celular foi verificada através da semeadura do inóculo em placas de Petri e determinação do número de Unidades Formadoras de Colônias (UFC/mL).

3.2.5.2 Meios de Cultura Utilizados

Mueller Hinton Agar (MHA)

Este meio de cultura foi utilizado para a semeadura dos micro-organismos *P. aeruginosa* e *E. coli*. Para cada 38g do meio de cultura desidratado MHA foram adicionados 1000,00 mL de água destilada e esterilizados em autoclave a 121° C por 15 minutos, segundo as instruções do fabricante.

Tryptone Soya Agar (TSA)

Este meio de cultura foi utilizado para a semeadura do micro-organismo *E. faecalis*. Para cada 40g do meio de cultura desidratado TSA foram adicionados 1000,00 mL de água destilada e esterilizados em autoclave a 121° C por 15 minutos, segundo as instruções do fabricante.

3.2.5.3. Teste de Difusão em Ágar

O método realizado foi semelhante ao estudo de Gjorgievskaa et al. (2013), com modificações. Os meios de cultura foram distribuídos em placas de Petri (90mm²) estéreis para obtenção da camada base de 8 mL. Seis corpos de prova de cada grupo foram posicionados em suas respectivas placas de Petri, com pinças esterilizadas, sobre a camada base solidificada (Figura 5).

Figura 5. Corpos de prova posicionados na placa de Petri sobre a camada base solidificada.

Em seguida 12 mL de solução do micro-organismo incorporado ao meio de cultura esterilizado foram distribuídos nas placas, com auxílio de pipeta de vidro, envolvendo os corpos de prova, sobre a camada base solidificada (Figuras 6 e 7).

Figura 6. Distribuição da solução do micro-organismo incorporado ao meio de cultura envolvendo os corpos de prova.

Figura 7. Placa de Petri com corpos de prova incorporados ao meio de cultura inoculado com micro-organismo.

As placas de Petri foram incubadas a 37°C em estufa microbiológica, durante 48 horas. Para a incubação da *Enterococcus faecalis* foi produzido um ambiente de Microaerofilia em jarras de anaerobiose (Permutation, E. J. Krieger e Cia Ltda., Curitiba, PR, Brasil).

Após 48 horas, as zonas de inibição (formação de halos) em volta dos corpos de prova foram mensuradas com auxílio de um compasso de pontas seca e régua milimetrada. As placas foram incubadas novamente sob as mesmas condições para a mensuração com 7 dias.

A zona de inibição foi determinada pela medição do diâmetro (mm). As medições para cada amostra foram repetidas três vezes e determinada a média aritmética.

3.2.6 Avaliação das Propriedades Físicas

Foram realizados três testes para avaliar propriedades físicas requeridas aos cimentos endodônticos: escoamento, radiopacidade e alteração de cor da estrutura dental.

Os testes foram realizados utilizando-se os quatro cimentos endodônticos propostos (Endofill, Sealer 26, AH Plus e Sealapex), frente aos três grupos com diferentes concentrações de AgVO_3 : 2,5%, 5%, 10% e o grupo controle (sem adição de AgVO_3). Para o teste de escoamento utilizou-se $n=6$ (96 amostras), para a radiopacidade foi $n=5$ (80 amostras), e para o teste de alteração de cor da estrutura dental utilizou-se $n=3$ (48 amostras).

3.2.6.1 Teste de Escoamento

O método realizado foi semelhante ao estudo de Siqueira et al. (2000), com modificações. Um total de 0,5 mL de cada amostra dos cimentos endodônticos recém manipulados foi depositada, com auxílio de seringa descartável, no centro de uma placa de vidro com peso de 300g. Em seguida, outra placa de vidro com peso de 560g foi colocada sobre a amostra durante 1 minuto (figura 8).

Figura 8. Cimento endodôntico colocado entre as duas placas de vidro.

Após 1 minuto a placa superior foi removida e o diâmetro do disco formado pelo cimento foi aferido três vezes e determinada a média aritmética, com o auxílio de um compasso de pontas secas e régua milimetrada (figura 9).

Figura 9. Aferição do diâmetro do disco formado pelo cimento com compasso de pontas secas.

3.2.6.2 Teste de Radiopacidade

O método realizado foi semelhante ao estudo de Carvalho-Junior et al. (2007), com modificações. Para esse teste foram confeccionadas, na oficina de precisão do Campus da USP de Ribeirão Preto, 20 placas de acrílico (2,2 cm largura x 4,5 cm comprimento x 1,0 mm espessura) contendo 4 poços (1,0 mm de profundidade x 5,0 mm de diâmetro), destinados à colocação dos cimentos endodônticos.

As placas de acrílico foram posicionadas sobre uma placa de vidro envolta em papel celofane, e em cada poço foram colocadas amostras do grupo controle e dos grupos com a incorporação de 2,5%, 5% e 10% de AgVO_3 , nesta sequência em cada placa. Em seguida, uma outra placa de vidro, também envolta em papel celofane, foi posicionada sobre os cimentos e os excessos foram removidos. As placas foram levadas à estufa a 37°C por 7 dias para a presa dos cimentos AH Plus, Sealer 26 e Endofill, e 21 dias para o Sealapex.

Cada uma das placas de acrílico contendo as amostras foi posicionada sobre o sensor radiográfico placa de fósforo VistaScan (© Dörr Dental AG, Bietigheim-Bissingen, Germany), e ao lado de outra placa de acrílico (1,3 cm largura x 4,5 cm comprimento x 1,0mm de espessura) contendo uma escala de alumínio, com espessura variando de 1 a 10 mm, em passos (degraus) uniformes de 1 mm cada (ANSI/ADA, 2000), confeccionadas na oficina de precisão do Campus da USP de Ribeirão Preto (Figura 10).

Figura 10. Placa de acrílico com os corpos de prova e escala de alumínio posicionados sobre a placa de fósforo.

As imagens radiográficas foram obtidas utilizando um aparelho de raios X digital modelo SPECTRO 70X (Dabi Atlante Indústrias Médico Odontológicas Ltda., Ribeirão Preto, Brasil) a 70kV e 8mA, o tempo de exposição foi de 0,25 segundos, à uma distância de 30 cm do foco.

A placa de fósforo foi digitalizada imediatamente após a exposição radiográfica, através do sensor digital, para obtenção das imagens radiográficas digitais (Figura 11). A placa de fósforo foi então apagada e reutilizada em todas as tomadas radiográficas para evitar possíveis variações nas radiografias. As imagens foram visualizadas utilizando o software DBSWIN 5.3.1.

Figura 11. Imagem radiográfica dos corpos de prova e escala

O valor médio dos tons de cinza da escala de alumínio e da imagem gerada pelos espécimes foi avaliado pelo software Image J. A mensuração dos valores de tons de cinza foi realizada selecionando uma região de 30 x 30 pixel (variação de ± 1) (Figura 12). O valor médio dos tons de cinza foi convertido para valores de alumínio equivalente (mmAl).

Figura 12. Mensuração dos valores de tons de cinza no software Image J

3.2.6.3 Teste de Alteração de cor da Estrutura Dental

O Comitê de Ética em Pesquisa aprovou a concessão dos dentes pelo Biobanco de dentes para este projeto – Número do processo: 42108815.0.0000.5419.

Foram selecionados, através do Biobanco de dentes da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto- USP, 48 incisivos, centrais e laterais, superiores e inferiores hígidos, livres de cáries, restaurações, lesões cervicais e descoloração coronal. Os mesmos foram limpos com ultrassom para retirar os detritos brutos, e com taça de borracha e pedra-pomes para a remoção do restante dos detritos.

Os dentes foram seccionados no plano horizontal no terço médio da raiz, e os seguimentos apicais foram removidos. As polpas foram extirpadas e as câmaras pulpares instrumentadas com limas tipo K (DENTSPLY, Petrópolis, RJ, Brasil), até a lima 40, através da abertura de acesso apical, irrigando com hipoclorito de sódio a 2,5% (Ciclo Farma, Serrana, SP, Brasil) e E.D.T.A. (E.D.T.A. Trissódico Líquido, Biodinâmica, Ibiporã, PR, Brasil) durante 3 minutos. Posteriormente, os canais foram irrigados com água destilada e

secos com cones de papel (DENTSPLY, Petrópolis, RJ, Brasil). Em seguida, as cavidades foram preenchidas pelos quatro tipos de cimentos endodônticos, nas três concentrações do AgVO_3 , e o grupo controle. Todos os dentes foram selados com sistema adesivo Single Bond 3M (3M ESPE, St. Paul, MN, EUA), fotopolimerizado por 20 segundos, e resina composta Filtek Z250TM (3M ESPE, St. Paul, MN, EUA), fotopolimerizada por 40 segundos. Os dentes foram armazenados em um recipiente devidamente identificado, contendo água destilada cobrindo a coroa dental, e levados à estufa a 37°C (Figura 13).

Figura 13. a. Dente preparado com cimento endodôntico inserido no canal. **b.** Armazenamento do dente em água destilada

A mensuração da cor dos dentes foi realizada antes e após a inserção dos cimentos endodônticos nos canais radiculares, através do Espectrofotômetro de Cor Portátil – Modelo SP 62S (Espectrofotômetro de Geometria Esférica, D/8°, XRITE Incorporated, USA, 11/2012), que avaliou a cor através do sistema CIE $L^*a^*b^*$, no qual o eixo L^* indica luminosidade ($L^*=0$ [preto] a $L^*=100$ [branco]), o eixo a^* indica a localização da cor entre as tonalidades de verde (-a) a vermelho (+a), e o eixo b^* , de azul (-b) a amarelo (+b). A alteração de cor foi expressa pelo ΔE ($\Delta E = \sqrt{\Delta L^* + \Delta a^* + \Delta b^*}$, onde o ΔL^* , Δa^* e Δb^* representam a diferença entre os eixos $L^*a^*b^*$ da amostra inicial e dos tempos de avaliação da cor). O ponto ativo do espectrofotômetro foi colocado no terço médio da face vestibular da coroa dental e avaliou a cor por 3 vezes, realizando a média aritmética dessas medidas. Para avaliação da cor dental sempre na mesma área do dente, estes foram incluídos individualmente em silicone de adição pesada (Adsil Putty Soft, Coltene, Vigodent S/A Indústria e Comércio, Rio de Janeiro – RJ, Brasil) e moldado no equipamento utilizado (Figura 14).

As alterações de cor foram avaliadas com 7, 30, 90 e 180 dias, assim a diferença de cor entre a amostra inicial e os diferentes tempos foi calculada através da diferença do ΔE de cada avaliação.

Figura 14. a. Equipamento Espectrofotômetro de Cor portátil. b. Dente incluído em silicone de adição e moldado no Espectrofotômetro.

3.2.7 Caracterização Físico-Química

A caracterização dos cimentos endodônticos quanto ao padrão de distribuição superficial do pó do AgVO_3 na composição dos mesmos foi avaliada por meio de Microscopia Confocal a Laser LEXT OLS4000[®] (Olympus, Tokyo, Japan). Para tanto, foram utilizados os quatro cimentos endodônticos propostos (Endofill, Sealer 26, AH Plus e Sealapex), frente aos quatro grupos com diferentes concentrações de AgVO_3 : 2,5%, 5%, 10% e o grupo controle (sem adição de AgVO_3). Para esse teste foram confeccionadas 80 amostras (n=5).

3.2.7.1 Padrão de distribuição superficial do AgVO_3

Foram utilizadas 20 placas de acrílico (2,2 cm largura x 4,5 cm comprimento x 1,0 mm espessura) contendo 4 poços (1,0 mm de profundidade x 5,0 mm de diâmetro), destinados à colocação dos cimentos endodônticos, confeccionadas na oficina de precisão do Campus da USP de Ribeirão Preto. As placas de acrílico foram posicionadas sobre uma placa de vidro envolta em papel celofane, e em cada poço foram colocadas amostras do grupo controle e dos grupos com a adição de 2,5%, 5% e 10% de AgVO_3 , nesta sequência em cada placa. Em seguida, uma outra placa de vidro, também envolta em papel celofane, foi posicionada sobre

os cimentos e os excessos foram removidos. As placas foram levadas à estufa a 37°C por 7 dias para a presa dos cimentos AH Plus, Sealer 26 e Endofill, e 21 dias para o Sealapex.

O padrão de distribuição superficial do AgVO_3 na composição dos cimentos endodônticos foi observado através da análise da superfície dos espécimes, realizada com Microscópio Confocal a Laser LEXT OLS4000® com a aquisição das imagens. Para tanto, os espécimes foram posicionados paralelamente à mesa do microscópio, foi selecionada a área mais representativa, e realizada a aquisição da imagem com a lente de aumento de 50x e zoom óptico de 1074 vezes de aumento (Figura 15). Após a aquisição das imagens, a superfície dos espécimes foi analisada qualitativamente.

Figura 15. a. Aquisição de imagem no Microscópio Confocal a Laser LEXT OLS4000®. **b.** Imagem da superfície do espécime.

3.2.8 Análise dos Dados

Para análise estatística, a normalidade (Kolmogorov-Smirnov test) e homogeneidade (Levene test) dos dados foi verificada. Realizou-se o teste paramétrico 2-Way ANOVA, seguido pelo teste de comparações múltiplas de Tukey honestly significant difference (HSD), com nível de significância de 5% ($\alpha=0,05$), para os Testes de Difusão em Ágar e de Escoamento, através do software (SPSS v17.1; SPSS Inc).

Os dados da radiopacidade foram comparados através do teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido de teste de permutação para comparações múltiplas, através do software R (R Foundation, Vienna, Austria), com nível de significância de 5% ($\alpha=0,05$).

Análise estatística descritiva foi realizada para a caracterização físico-química e para o teste de alteração de cor da estrutura dental, os dados numéricos foram analisados através do software SAS System Output, versão 9.4.

4. *RESULTADOS*

4.1 Morfologia do Vanadato de Prata

O AgVO_3 é constituído de nanofios com um diâmetro médio de 150 nm e comprimento de ordem micro. Os fios são revestidos com partículas semiesféricas metálicas de prata (Ag) de 25 nm (Figura 16).

Figura 16. Imagem da Microscopia Eletrônica de Transmissão do AgVO_3 decorado com AgNPs (ampliação de 200.000 x)

4.2 Concentração Inibitória Mínima do Nanomaterial Puro

A Tabela 2 mostra os resultados da Concentração Inibitória Mínima (CIM) do AgVO_3 puro.

O valor de CIM contra as estirpes de *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli* foi de 31,25 $\mu\text{g/mL}$, e para *Enterococcus faecalis* foi de 500 $\mu\text{g/mL}$. Estes valores demonstram a eficácia antimicrobiana do AgVO_3 contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas que podem estar presentes em reinfecções dos canais radiculares.

Tabela 2. Padrão dos micro-organismos utilizados nos testes antimicrobianos e valores de CIM para AgVO₃

Micro-organismo	Cepa	Características	CIM (µg/mL)
<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC 29212	Coco Gram-positivo, aeróbio facultativo	500
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853	Bastonete Gram-negativo, aeróbio	31,25
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922	Bastonete Gram-negativo, anaeróbio facultativo	31,25

4.3 Atividade Antimicrobiana dos Cimentos Endodônticos Modificados

4.3.1 Teste de Difusão em Ágar

O efeito da incorporação do AgVO₃ na atividade antimicrobiana dos cimentos endodônticos modificados em comparação com os cimentos puros (controle) encontra-se descrito a seguir.

A Figura 17 mostra os resultados da formação do halo de inibição de um dos cimentos.

Figura 17. Formação do halo de inibição do Sealapex incorporado com 10% de AgVO₃ frente a *E. faecalis*

4.3.1.1 *Enterococcus faecalis*

A incorporação de AgVO_3 não aumentou a atividade antimicrobiana inerente do AH Plus frente a *E. faecalis* ($p>0,05$), as zonas de inibição formadas pelos grupos modificados com AgVO_3 apresentaram resultados semelhantes ao controle. A atividade antimicrobiana inerente do Endofill aumentou a partir de 2,5% de AgVO_3 ($p<0,05$), e a maior zona de inibição foi observada com a incorporação de 5% de AgVO_3 . A atividade antimicrobiana inerente do Sealer 26 aumentou a partir da incorporação de 5% de AgVO_3 ($p<0,05$). A incorporação de AgVO_3 promoveu atividade antimicrobiana ao Sealapex, havendo um aumento na formação do halo de inibição proporcional à concentração de AgVO_3 ($p<0,01$) (Tabela 3) (Apêndice A).

Tabela 3. Média e Desvio Padrão (DP) do diâmetro do halo de inibição formado frente a *Enterococcus faecalis* (mm)

48 h	AH Plus	Endofill	Sealer 26	Sealapex
0%	7,83 $\pm$ 1,38 ^a	7,22 $\pm$ 0,62 ^a	7,52 $\pm$ 0,40 ^a	0 $\pm$ 0 ^a
2,5%	8,05 $\pm$ 0,88 ^a	13,33 $\pm$ 0,83 ^b	7,25 $\pm$ 0,69 ^a	12,44 $\pm$ 1,03 ^b
5%	7,52 $\pm$ 0,73 ^a	17,25 $\pm$ 0,90 ^c	9,25 $\pm$ 0,41 ^b	15,86 $\pm$ 0,98 ^c
10%	8,69 $\pm$ 1,00 ^a	15,55 $\pm$ 0,43 ^d	12,02 $\pm$ 0,67 ^c	18,52 $\pm$ 1,00 ^d
7 dias	AH Plus	Endofill	Sealer 26	Sealapex
0%	7,61 $\pm$ 1,43 ^a	7,33 $\pm$ 0,80 ^a	7,38 $\pm$ 0,40 ^a	0 $\pm$ 0 ^a
2,5%	7,88 $\pm$ 0,88 ^a	13,16 $\pm$ 0,81 ^b	7,05 $\pm$ 0,46 ^a	12,63 $\pm$ 0,98 ^b
5%	7,19 $\pm$ 0,71 ^a	16,94 $\pm$ 0,82 ^c	9,47 $\pm$ 0,41 ^b	16,22 $\pm$ 1,11 ^c
10%	7,86 $\pm$ 1,01 ^a	15,63 $\pm$ 0,35 ^d	12,08 $\pm$ 0,62 ^c	18,38 $\pm$ 1,00 ^d

Letras iguais representam semelhança estatística para a mesma coluna

4.3.1.2 *Pseudomonas aeruginosa*

Apenas a incorporação de 10% de AgVO_3 promoveu atividade antimicrobiana ao AH Plus e Endofill frente a *P. aeruginosa* ($p<0,01$). Os cimentos Sealer 26 e Sealapex não apresentaram tal capacidade para esse micro-organismo, independente da concentração de AgVO_3 (Tabela 4) (Apêndice A).

Tabela 4. Média e Desvio Padrão (DP) do diâmetro do halo de inibição formado frente a *Pseudomonas aeruginosa* (mm)

48 h	AH Plus	Endofill	Sealer 26	Sealapex
0%	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a
2,5%	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a
5%	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a
10%	5,83 ± 0,52 ^b	9,66 ± 0,35 ^b	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a
7 dias	AH Plus	Endofill	Sealer 26	Sealapex
0%	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a
2,5%	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a
5%	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a
10%	6,30 ± 0,24 ^b	9,72 ± 0,47 ^b	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a

Letras iguais representam semelhança estatística para a mesma coluna

4.3.1.3 *Escherichia coli*

Apenas a incorporação de 10% de AgVO₃ promoveu atividade antimicrobiana ao AH Plus e Sealer 26 frente a *E. coli* (p<0,01). Houve aumento da atividade antimicrobiana inerente do Endofill a partir da incorporação de 2,5% de AgVO₃ (p<0,01). As concentrações de 5% e 10% de AgVO₃ (p<0,01) promoveram atividade antimicrobiana ao Sealapex (Tabela 5) (Apêndice A).

Tabela 5. Média e Desvio Padrão (DP) do diâmetro do halo de inibição formado frente a *Escherichia coli* (mm)

48 h	AH Plus	Endofill	Sealer 26	Sealapex
0%	0 ± 0 ^a	13,58 ± 0,60 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a
2,5%	0 ± 0 ^a	14,94 ± 0,25 ^b	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a
5%	0 ± 0 ^a	15,52 ± 0,41 ^b	0 ± 0 ^a	7,30 ± 0,54 ^b
10%	5,77 ± 0,49 ^b	17,58 ± 0,73 ^d	6,00 ± 0 ^b	7,62 ± 0,15 ^b
7 dias	AH Plus	Endofill	Sealer 26	Sealapex
0%	0 ± 0 ^a	13,86 ± 0,67 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a
2,5%	0 ± 0 ^a	14,80 ± 0,30 ^b	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a
5%	0 ± 0 ^a	15,66 ± 0,33 ^c	0 ± 0 ^a	7,13 ± 0,49 ^b
10%	5,80 ± 0,43 ^b	17,66 ± 0,59 ^d	6,00 ± 0 ^b	8,16 ± 0,49 ^c

Letras iguais representam semelhança estatística para a mesma coluna

4.3.1.4 Correlação entre os tempos de 48h e 7 dias

Em relação ao fator tempo, houve um aumento na zona de inibição de 48h para 7 dias nos grupos Sealapex com 10% de AgVO₃ e Endofill com 5% de AgVO₃, frente a *E. coli*.

A correlação de Pearson foi utilizada para verificar a correlação existente entre os tempos de 48 horas e 7 dias.

Na análise de Pearson:

1. > 0,70 para mais ou para menos indicam uma forte correlação.
2. 0,30 a 0,70 positivo ou negativo indicam correlação moderada.
3. 0 a 0,30 indicam fraca correlação.

Houve correlação forte entre os tempos para *E. faecalis* (p=0,996), *P. aeruginosa* e *E. coli* (p=0,999).

4.4 Análises das Propriedades Físicas

4.4.1 Escoamento

O escoamento do AH Plus e do Endofill reduziu proporcionalmente ao aumento da concentração de AgVO₃ (p<0,05). Não houve influência da incorporação de AgVO₃ na capacidade de escoamento Sealer 26 e Sealapex, independente da concentração (p>0,05) (Tabela 6) (Apêndice B).

Tabela 6. Média e Desvio Padrão (DP) do diâmetro do disco formado pelo escoamento dos cimentos incorporados com diferentes concentrações de AgVO₃ (mm)

[AgVO ₃]	AH Plus	Endofill	Sealer 26	Sealapex
0%	36,2 ± 0,13 ^a	45,2 ± 0,39 ^a	43,6 ± 0,63 ^a	31,1 ± 0,11 ^a
2,5%	30,2 ± 0,15 ^{ab}	38,1 ± 0,15 ^b	40,0 ± 0,26 ^a	27,1 ± 0,28 ^a
5%	24,6 ± 0,18 ^b	37,5 ± 0,66 ^b	45,3 ± 0,10 ^a	27,4 ± 0,07 ^a
10%	18,2 ± 0,08 ^c	35,6 ± 0,21 ^b	42,4 ± 0,34 ^a	25,1 ± 0,05 ^a

Letras iguais representam semelhança estatística para a mesma coluna

4.4.2 Radiopacidade

A Tabela 7 apresenta a mediana da Radiopacidade, em Alumínio equivalente, dos cimentos endodônticos avaliados e modificados com diferentes concentrações de AgVO_3 (Apêndice C).

Tabela 7. Mediana da Radiopacidade, em milímetros de Alumínio equivalente (mmAl), de quatro cimentos endodônticos modificados com diferentes concentrações de AgVO_3

Cimento endodôntico	Controle	2,5%	5%	10%
Endofill	6,71 ^a	8,84 ^a	6,76 ^a	6,95 ^a
Sealapex	3,94 ^a	3,96 ^a	3,74 ^a	3,24 ^a
Sealer 26	7,30 ^a	8,42 ^b	7,08 ^a	7,67 ^a
AH Plus	4,43 ^a	5,58 ^b	4,98 ^{ab}	3,95 ^{ac}

Letras iguais representam semelhança estatística para a mesma linha

Para os cimentos Endofill e Sealapex não foi observada diferença significativa nas medianas comparadas entre o grupo controle e os grupos modificados com AgVO_3 ($p=0,399$ e $p=0,316$, respectivamente), e o maior valor de radiopacidade foi observado nos grupos incorporados com 2,5% para ambos os cimentos.

Para o cimento Sealer 26 observou-se diferença estatística entre os grupos ($p=0,008$). O grupo modificado com 2,5% de AgVO_3 apresentou o maior valor de radiopacidade quando comparado ao controle ($p=0,022$) e demais grupos modificados com AgVO_3 ($p<0,05$). O grupo controle não apresentou diferença estatística em relação aos grupos com 5% e 10% de AgVO_3 ($p=0,951$ e $p=0,973$, respectivamente), que também não diferiram entre si ($p=0,775$).

Para o AH Plus, o grupo controle apresentou menor valor de radiopacidade e diferença estatística em relação ao grupo modificado com 2,5% ($p=0,006$), e não apresentou diferença em relação aos demais grupos modificados ($p>0,05$). O grupo com 10% de AgVO_3 apresentou diferença estatística em relação aos grupos modificados com 2,5% e 5% ($p=0,002$ e $p=0,034$, respectivamente), que apresentaram os maiores valores de radiopacidade e por sua vez não diferiram entre si ($p=0,221$).

4.4.3 Alteração de cor da Estrutura Dental

O Gráfico 1 mostra os valores de alteração de cor (ΔE) para o cimento AH Plus, onde houve um aumento no ΔE com a modificação desse cimento com AgVO_3 nas concentrações de 2,5% e 10% em relação ao grupo controle. O grupo modificado com 5% de AgVO_3 apresentou médias semelhantes ao controle, com exceção do tempo de 180 dias, cujos grupos modificados com AgVO_3 apresentaram alterações de cor significativas (Apêndice D1).

Gráfico 1. Média e Desvio Padrão dos valores de ΔE da alteração de cor da estrutura dental do AH Plus

Para o cimento Sealapex houve um aumento no ΔE com a modificação desse cimento com AgVO_3 nas concentrações de 5% e 10% em relação ao grupo controle. O grupo modificado com 2,5% de AgVO_3 apresentou médias semelhantes ao controle, com exceção do tempo de 90 e 180 dias. A alteração de cor foi mais significativa decorridos 180 dias da preparação das amostras (Gráfico 2) (Apêndice D2).

Gráfico 2. Média e Desvio Padrão dos valores de ΔE da alteração de cor da estrutura dental do Sealapex

O grupo controle do cimento Sealer 26 não apresentou alterações de cor (ΔE) conforme o tempo analisado, e apenas a concentração de 10% de AgVO_3 apresentou valores de ΔE maiores em relação ao controle, considerando os tempos de 7 e 30 dias. As alterações de cor mais significativas foram observadas no tempo de 180 dias (Gráfico 3) (Apêndice D3).

Gráfico 3. Média e Desvio Padrão dos valores de ΔE da alteração de cor da estrutura dental do Sealer 26

O Gráfico 4 mostra que para o cimento Endofill, a maior alteração de cor, em relação ao grupo controle, foi observada no grupo modificado com 2,5% de AgVO_3 . E alterações de cor significativas foram observadas no tempo de 180 dias, com exceção do grupo com 10% de AgVO_3 que não apresentou alterações significativas nos tempos avaliados (Apêndice D4).

Gráfico 4. Média e Desvio Padrão dos valores de ΔE da alteração de cor da estrutura dental do Endofill

4.5 Caracterização Físico-Química

4.5.1 Padrão de distribuição superficial do AgVO_3

As Figuras 18 e 19 mostram que o pó do AgVO_3 apresentou um padrão de distribuição superficial circular, com nanopartículas menores dispersas e aglomerações em áreas aleatórias na superfície da composição dos cimentos endodônticos, padrão que foi observado independente da concentração e cimento analisado.

Figura 18. Imagens dos cimentos endodônticos no Microscópio Confocal a Laser (Aumento 1074x). **a.** AH Plus controle. **b.** AH Plus 2,5% de AgVO_3 . **c.** AH Plus 5% de AgVO_3 . **d.** AH Plus 10% de AgVO_3 . **e.** Endofill controle. **f.** Endofill 2,5% de AgVO_3 . **g.** Endofill 5% de AgVO_3 . **h.** Endofill 10% de AgVO_3 .

Figura 19. Imagens dos cimentos endodônticos no Microscópio Confocal a Laser (Aumento 1074x). **a.** Sealapex controle. **b.** Sealapex 2,5% de AgVO_3 . **c.** Sealapex 5% de AgVO_3 . **d.** Sealapex 10% de AgVO_3 . **e.** Sealer 26 controle. **f.** Sealer 26 2,5% de AgVO_3 . **g.** Sealer 26 5% de AgVO_3 . **h.** Sealer 26 10% de AgVO_3 .

5. DISCUSSÃO

A complexidade anatômica dos canais radiculares contribui para a persistência de micro-organismos, e mesmo com um preparo químico-mecânico, a eliminação completa dos mesmos torna-se difícil em situações clínicas típicas, ocasionando reinfecções subsequentes e insucesso do tratamento endodôntico (Pablo et al., 2010; Gjorgievskaa et al., 2013; Al-Shwaimi et al., 2016; Vanapatla et al., 2016).

A adição de agentes antimicrobianos aos cimentos endodônticos auxilia na erradicação desses micro-organismos restantes nos canais radiculares. Na literatura pode-se encontrar estudos que adicionaram clorexidina (Ruiz-Linares et al., 2013), cloreto de cetilpiridínio, cloreto de benzalcônio (Gjorgievskaa et al., 2013), antibióticos (Hoelscher; Bahcall; Maki, 2006; Baer; Maki, 2010; Vanapatla et al., 2016) e nanopartículas (Beyth et al., 2013; Rad et al., 2013; Barros et al., 2014a; Barros et al., 2014b; Wu et al., 2014; Carpio-Perochena et al., 2015) a esses materiais obturadores, com a finalidade de promover aumento da eficácia antimicrobiana. No entanto, apesar desses compostos apresentarem bons resultados em termos antimicrobianos, não há evidências de confiança que forneça uma verdadeira recomendação sobre a adição dos mesmos. Além disso, a incorporação desses agentes pode alterar as propriedades dos cimentos (Ruiz-Linares et al., 2013).

A prata é utilizada em diferentes campos da medicina há séculos, incluindo curativos, cateteres e próteses, devido às suas propriedades antimicrobianas. Esse composto em nanoescala, tem sido incorporado à biomateriais na área médica e odontológica, com aplicação na endodontia, próteses dentárias, implantodontia e odontologia restauradora, com a finalidade de diminuir a colonização microbiana sobre esses materiais (Corrêa et al., 2015). Além do efeito antimicrobiano, as nanopartículas de prata (AgNPs) apresentam baixa toxicidade às células humanas (Corrêa et al., 2015). No entanto, as mesmas tendem à aglomeração, sendo um desafio manter a homogeneidade de tamanho e forma, e a dispersão dessas nanopartículas (Zarbin, 2007; Jones; Hoek, 2010). Além de apresentarem uma cor acinzentada que compromete a estética e inviabiliza seu uso na odontologia.

O vanadato de prata nanoestruturado decorado com nanopartículas de prata (AgVO₃) é um nanomaterial desenvolvido com a finalidade de melhorar esses problemas inerentes às AgNPs. Sua primeira utilização foi em tintas à base d'água aplicada em ambiente hospitalar e doméstico, demonstrando atividade antimicrobiana contra as bactérias: *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, e *Salmonella entérica Typhimurium* (Holtz et al., 2010). Na odontologia, o AgVO₃ foi incorporado a resinas acrílicas odontológicas e apresentou atividade antimicrobiana frente aos micro-organismos *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*, *Streptococcus mutans* e *Staphylococcus aureus* (Castro et al., 2014, 2016).

De acordo com a literatura, além da atividade antimicrobiana efetiva, o AgVO_3 promove uma elevada dispersão para as AgNPs associando-as aos nanofios de vanadato, o que promove maior efeito e durabilidade da ação antimicrobiana, uma vez que mantém uma grande área de superfície em contato com os micro-organismos (Holtz et al., 2012). Outra vantagem é a coloração amarelada, que favorece esteticamente sua aplicação na odontologia.

Diante do exposto, esse trabalho propôs de forma inédita a incorporação do AgVO_3 à quatro cimentos endodônticos, com o objetivo de promover atividade antimicrobiana e avaliar sua influência em propriedades físicas como: escoamento, radiopacidade, alteração de cor dental, bem como analisar a distribuição superficial do nanomaterial na composição dos cimentos, por meio de um método simples de manipulação realizado de acordo com a prática clínica.

No presente estudo, a atividade antimicrobiana do AgVO_3 puro e incorporado aos cimentos endodônticos foi avaliada através da determinação da concentração inibitória mínima do nanomaterial e método de difusão em ágar, respectivamente, frente a *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*. Os resultados demonstraram que esse nanomaterial tem potencial para ser utilizado como agente antibacteriano, sendo capaz de inibir o crescimento dos micro-organismos testados, e a sua incorporação aos cimentos endodônticos melhorou a eficácia antibacteriana dos mesmos.

Há muitos cimentos endodônticos disponíveis no mercado que apresentam atividade antimicrobiana inerente frente aos micro-organismos presentes nos canais radiculares, em função da composição química, com formulações que contém hidróxido de cálcio, óxido de zinco e resina (Gjorgievskaa et al., 2013; Shakya et al., 2016). O cimento Endofill apresenta como principal componente o óxido de zinco e eugenol, que apresentam ação bactericida (Markowitz et al., 1992). O AH Plus, à base de resina epóxi, pode liberar monômero ou formaldeído residuais presentes nos materiais poliméricos (Gjorgievskaa et al., 2013), seu efeito antimicrobiano pode estar relacionado com a liberação de bisfenol-A diglicidil éter durante o processo de polimerização (Wang; Shen; Haapasalo, 2014; Shakya et al., 2016). A atividade antimicrobiana de materiais à base de hidróxido de cálcio, como dos cimentos Sealer 26 e Sealapex, depende da ionização, que libera íons hidróxido e causa aumento no pH (Leonardo et al., 2000). Um pH maior que 9 pode inativar enzimas da membrana celular do micro-organismo, o que resulta numa perda de atividade biológica da membrana citoplasmática (Estrela et al., 1995; Vitti et al., 2013b) ou destruição de fosfolípidios e ácidos graxos insaturados (Leonardo et al., 2000). Nesse estudo, todos os cimentos avaliados

apresentaram atividade antibacteriana inerente frente a *E. faecalis*, exceto o Sealapex, e apenas o Endofill apresentou atividade frente a *E. coli*.

Estudos que avaliaram a atividade antimicrobiana de cimentos endodônticos incorporados com agentes antimicrobianos demonstram aumento dessa propriedade após a adição dos mesmos. Gjorgievskaa et al. (2013) avaliou, através do método de difusão em ágar, a atividade antimicrobiana de cinco cimentos endodônticos (RoekoSeal, Endomethasone N, N2, Apexit Plus, AH Plus) incorporados com 2% de cloreto benzalcônio e 2% de cloreto de cetilpiridínio, frente a *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus casei* e *Actinomyces viscosus*. A adição dessas substâncias melhorou o efeito antimicrobiano dos cimentos avaliados, sendo a maior zona de inibição observada para o tempo de 2 dias, com diminuição progressiva da inibição com 7 e 21 dias.

Baer e Maki (2010) incorporaram amoxicilina em três cimentos endodônticos (Pulp Canal Sealer EWT, AH Plus and RealSeal SE) e avaliaram o efeito antimicrobiano contra *Enterococcus faecalis*. Os autores concluíram que os cimentos modificados com amoxicilina inibiram completamente o crescimento da *E. faecalis*, ao contrário dos cimentos puros. E não foram observadas diferenças na inibição do crescimento entre os tempos avaliados.

Hiraishi et al. (2009) avaliaram o efeito antimicrobiano de 1%, 2% e 3% de clorexidina (chlorhexidinecontaining polymethyl methacrylate - PMMA) incorporada ao cimento endodôntico SuperBond Sealer frente a *Enterococcus faecalis*. Os autores observaram que a incorporação de 2% e 3% de clorexidina ao cimento endodôntico teve um efeito antimicrobiano sustentado por pelo menos 4 e 8 semanas frente a *E. faecalis*.

Shakya et al. (2016) relataram que a atividade antimicrobiana do AH Plus frente a *E. faecalis* foi mais efetiva no tempo de 24 h, com redução dessa propriedade no tempo de 7 dias, assim, a atividade antimicrobiana de cimentos à base de resina é mais eficaz quando o mesmo está em seu estado fresco, recém-manipulado.

Nesse trabalho, foi observado um aumento na zona de inibição de 48h para 7 dias nos grupos Sealapex com 10% de AgVO₃ e Endofill com 5% de AgVO₃, frente a *E. coli*, sugerindo assim, um aumento do efeito inibidor com o tempo para esses cimentos modificados. Para os demais grupos, a atividade antibacteriana foi mantida até o tempo avaliado.

Bailón-Sánchez et al. (2014) avaliaram a atividade antimicrobiana e capacidade de inibir a formação de biofilme do AH Plus puro e modificado com 1% e 2% de clorexidina, 0,1%-0,5% de cetrimide, e combinações de ambos os agentes, frente a *E. faecalis*. Os autores observaram que diferentes concentrações dos agentes antimicrobianos proporcionaram

atividade antimicrobiana diversa. O AH Plus incorporado com clorexidina apresentou uma redução de 2% na atividade antimicrobiana em relação ao controle. Já o AH Plus incorporado com cetrimide apresentou uma relação direta entre a concentração e o efeito antimicrobiano. E com a combinação de ambos os agentes, concentrações menores foram efetivas na erradicação da *E. faecalis*.

No presente estudo, também foram observadas variações na atividade antibacteriana de acordo com as diferentes concentrações propostas. Para o AH Plus, não foram observadas alterações no seu efeito inibidor com o aumento da concentração de AgVO_3 , frente a *E. faecalis*. O Endofill apresentou maior efeito inibidor da *E. faecalis* com a adição do nanomaterial a partir da concentração de 2,5%, sendo observada maior atividade antibacteriana para a concentração de 5%. A incorporação de AgVO_3 aumentou proporcionalmente a atividade antibacteriana do Sealer 26 a partir de 5%, frente a *E. faecalis*, e promoveu essa atividade ao Sealapex proporcionalmente ao aumento da concentração.

A incorporação de 10% de AgVO_3 ao AH Plus e Endofill promoveu atividade antibacteriana frente a *P. aeruginosa*. Resultado semelhante pode ser observado para as concentrações de 10% do AH Plus e Sealer 26, e 5% e 10% do Sealapex frente a *E. coli*. A atividade antibacteriana do Endofill aumentou proporcionalmente à concentração de AgVO_3 frente a *E. coli*.

O cimento Endofill incorporado com 5% de AgVO_3 apresentou atividade antibacteriana significativamente maior do que o Endofill 10%, frente a *E. faecalis*. Baseado na observação da dispersão das diferentes concentrações de AgVO_3 , durante a manipulação dos cimentos, e nas imagens de distribuição superficial do AgVO_3 na composição dos cimentos, esse resultado sugere que podem ocorrer aglomerações entre as partículas de AgVO_3 de acordo com a concentração. Dessa forma, o contato entre a superfície das partículas de AgVO_3 e o cimento fica reduzido, reduzindo assim a atividade antibacteriana de acordo com a concentração de 10% para esse cimento. De acordo com Rai, Yadav e Gade (2009), o tamanho da nanopartícula implica na área de superfície que estará em contato com as células bacterianas, portanto, partículas menores terão uma interação maior. Nanopartículas menores que 10 nm interagem com as bactérias e produzem efeito eletrônico que aumentam a reatividade das nanopartículas (Rai; Yadav; Gade, 2009).

A cavidade bucal apresenta uma grande variedade de bactérias, sendo muitas delas capazes de causar danos à saúde bucal. Bactérias anaeróbias Gram-negativas e bactérias Gram-positivas, como a *Enterococcus faecalis*, são prevalentes em canais radiculares

infectados e com lesões periapicais (Gjorgievskaa et al., 2013; Al-Shwaimi et al., 2016), e muitas pesquisas endodônticas concentram-se na erradicação dessas bactérias (Paz, 2007).

A *E. faecalis* é um micro-organismo predominante em canais com lesões periapicais crônicas, devido à fatores de virulência como enzimas líticas, citolisina, substâncias de agregação, feromonas, ácido lipoteicóico, além da resistência a soluções irrigantes e agentes antimicrobianos, como o hidróxido de cálcio, com habilidade para inativá-los (Portenier et al., 2002; Wu et al., 2014). Canais radiculares infectados com esta bactéria geralmente permanecem assintomáticos, e com lesões periapicais em estado avançado, pois não corresponderam à terapia endodôntica convencional (Geijersstam et al., 2005). Nesse estudo, os cimentos Endofill, Sealer 26 e Sealapex apresentaram um aumento da atividade antibacteriana com a adição do AgVO₃ frente a *E. faecalis*, e o AH Plus demonstrou tal atividade inerente ao grupo controle, sendo esses cimentos potenciais agentes para a erradicação desse micro-organismo. Os cimentos Sealer 26 e Sealapex são à base de hidróxido de cálcio, e apesar da resistência dessa bactéria ao material, a ação antibacteriana desses associados ao AgVO₃ foi eficaz.

Em infecções periapicais persistentes a *P. aeruginosa* também é encontrada e apresenta resistência aos tratamentos endodônticos convencionais, como a irrigação com hipoclorito de sódio a 5,25%, elevadas concentrações de sais, corantes, antissépticos, incluindo o Digluconato de Clorexidina, e alguns antibióticos. Seu crescimento normalmente não é inibido pelos cimentos endodônticos frequentemente utilizados (Phee et al., 2013). Nesse estudo, o AH Plus e Endofill apresentaram atividade antibacteriana na concentração de 10% de AgVO₃ frente a *P. aeruginosa*, apesar de sua elevada resistência.

As infecções endodônticas apresentam característica polimicrobiana, assim, micro-organismos provenientes de infecções secundárias podem ser encontrados, principalmente em canais radiculares repetidamente abertos e fechados devido à presença de dor, em pacientes submetidos a tratamento inadequado, incluindo antibioticoterapia incorreta (Tronstad, 1992). Micro-organismos anaeróbios facultativos, como a *Escherichia coli*, são encontrados em 10 a 20% dos canais infectados, e interagem com micro-organismos estritamente anaeróbios, alterando a relação nutricional e a tensão de oxigênio, o que determina a sobrevivência desses micro-organismos (Leonardo et al., 2000). Diante disso, esse estudo também avaliou a atividade antibacteriana dos cimentos endodônticos frente a *E. coli*, e a incorporação do AgVO₃ na concentração de 10% para o AH Plus, Sealer 26 e Sealapex demonstrou atividade antibacteriana frente a esse micro-organismo, bem como a concentração de 5% do Sealapex.

O Endofill apresentou aumento da atividade antibacteriana com a incorporação do AgVO₃ frente a *E. coli*.

Os cimentos que não apresentaram capacidade antimicrobiana inerente, com a adição do AgVO₃ passaram a exibir essa atividade frente aos micro-organismos testados, como o Sealapex frente a *E. faecalis*, apresentando um aumento do efeito inibitório conforme o aumento das concentrações do nanomaterial; como o AH Plus e Endofill que apresentaram atividade antimicrobiana na concentração de 10% de AgVO₃ frente a *P. aeruginosa*; e o AH Plus e Sealer 26 que apresentaram atividade antimicrobiana na concentração de 10% de AgVO₃ frente a *E. coli*; assim como o Sealapex que apresentou essa propriedade para as concentrações de 5% e 10%.

O método de difusão em ágar apresenta limitações importantes que devem ser abordadas, como falta de padronização da concentração do inóculo, meio de cultura adequado, viscosidade do ágar, condições de armazenamento da placa, tempo e temperatura de incubação, contato entre o material e o ágar, e a solubilidade dos cimentos endodônticos (Leonardo et al., 2000). No entanto, se a maioria dessas variáveis forem cuidadosamente controladas e padronizadas, resultados consistentes e reprodutíveis podem ser obtidos (Siqueira et al., 2000).

Nesse trabalho buscou-se padronizar os possíveis fatores de variação acima citados, através da confirmação da concentração do inóculo bacteriano em espectrofotômetro (10⁸ células/mL), com leitura de absorbância específica para cada micro-organismo (0,120 para *P. aeruginosa* e *E. coli*, e 0,150 para *E. faecalis*). A confirmação da concentração celular foi ainda verificada pela determinação do número de Unidades Formadoras de Colônias (UFC/mL). O meio de cultura foi preparado seguindo todas as instruções e recomendações do fabricante, e a incubação das placas ocorreu sempre nas mesmas condições de temperatura. Além disso, o meio de cultura inoculado com os micro-organismos envolveu completamente os corpos de prova, garantindo o contato entre a bactéria e os cimentos endodônticos.

A padronização desses fatores permite-nos excluir algumas variações existentes *in vivo* (Leonardo et al., 2000). Os resultados podem indicar que os cimentos avaliados apresentaram propriedades antibacterianas, embora as zonas de inibição não confirmem um efeito antimicrobiano absoluto, uma vez que o tamanho dessas zonas pode ser afetado pela solubilidade e propriedades físicas do componente antimicrobiano do cimento endodôntico (Gjorgievskaa et al., 2013; Shakya et al., 2016).

O cimento Sealapex não tomou presa completamente, mesmo com o tempo adicional de 14 dias na estufa. Assim, no teste de difusão em ágar três corpos de prova (um modificado

com 5% de AgVO_3 e dois com 10%) se solubilizaram, impedindo a mensuração do halo de inibição. Essas amostras foram consideradas “Missing” para a análise estatística.

A adição de nanopartículas à cimentos endodônticos aumenta a sua capacidade antimicrobiana, auxiliando na desinfecção dos canais radiculares (Barros et al., 2014b), no entanto, pode alterar suas propriedades (Ruiz-Linares et al., 2013). A avaliação das propriedades físicas dos cimentos endodônticos são testes de controle que avaliam o comportamento de um produto estável. Esse estudo incorporou o AgVO_3 à quatro cimentos endodônticos e avaliou a influência desse nanomaterial no escoamento, na radiopacidade, na alteração de cor dental e no padrão de distribuição superficial na composição dos cimentos endodônticos.

O escoamento de cimentos endodônticos é eficaz na obturação dos canais radiculares, inclusive de canais acessórios, uma vez que preenche espaços vazios entre os cones de gutapercha. Embora o escoamento permita o preenchimento das irregularidades, quando elevado pode resultar na extrusão e injúrias aos tecidos periapicais (Arias-Moliz; Camilleri, 2016). Além do preenchimento das irregularidades, o vedamento hermético do canal radicular promovido por um escoamento adequado, associado a propriedades antimicrobianas, auxilia na eliminação de micro-organismos restantes em áreas confinadas, negando nutrientes aos mesmos (Siqueira et al., 2000; Baer; Maki, 2010; Ping Xu et al., 2010; Shakya et al., 2016).

Os cimentos Sealer 26 e Sealapex apresentaram valores de escoamento adequados e dentro dos padrões estabelecidos pela American National Standard/American Dental Association (ANSI/ADA, 2000), especificação nº 57, que preconiza que os discos formados devem apresentar pelo menos 20,0 milímetros (mm) de diâmetro. A adição de diferentes concentrações de AgVO_3 não influenciou no escoamento desses cimentos.

O cimento Endofill também apresenta valores adequados e dentro do mínimo estabelecido pela especificação nº 57 da ANSI/ADA (2000), apesar da redução no escoamento. O AH Plus apresentou valores de escoamento diminuídos conforme a adição do nanomaterial, no entanto, apenas a concentração de 10% não apresentou o valor recomendado pela ANSI/ADA (2000). Resultado semelhante foi observado no trabalho de Arias-Moliz et al. (2015), em que os autores observaram uma redução no escoamento do AH Plus modificado com 1%, 2% e 3% de cloreto benzalcônio conforme o aumento da concentração do agente antimicrobiano, em relação ao grupo controle.

O valor de escoamento do AH Plus controle nesse estudo foi semelhante ao encontrado por Arias-Moliz et al. (2015), no entanto foi maior que o observado por Barros et al. (2014b), onde também houve redução no escoamento do AH Plus modificado com 1% e

2% de nanopartículas de amônia quaternária de polietilenoimina (QPEI). Em comparação com o estudo de Duarte et al. (2010), o AH Plus controle apresentou menor valor de escoamento, e os autores também observaram uma redução nessa propriedade com a incorporação de 5% e 10% de hidróxido de cálcio P.A.

Garrido et al. (2010) avaliaram o escoamento dos cimentos endodônticos AH Plus, Sealer 26 e Endofill sem a adição de antimicrobianos, e em comparação com o presente estudo, observou-se que o escoamento do AH Plus e do Sealer 26 foi menor nesse trabalho, e maior para o Endofill. Essas diferenças nos resultados podem ser devido a variações na metodologia em relação ao peso correspondente à placa de vidro superior.

Nesse trabalho, foi aplicada metodologia semelhante ao estudo de Siqueira et al. (2000) para avaliar o escoamento dos cimentos endodônticos. No entanto, foram observadas diferenças nos valores do Sealer 26, que foi maior nesse estudo, e do AH Plus que foi menor em relação do trabalho de Siqueira et al. (2000).

O diagnóstico odontológico tem forte embasamento na radiologia, a fim de identificar e distinguir um material intra-oral de estruturas anatômicas adjacentes (Gu et al., 2006). A radiopacidade é uma propriedade física requerida aos cimentos endodônticos que permite a sua visualização no exame radiográfico, para verificar a qualidade da obturação (Candeiro et al., 2012). Assim, a vantagem da radiopacidade é a observação da interface radiográfica entre os materiais e o substrato dental. Devido à radiopacidade equivalente entre a dentina e o alumínio (Al) e o coeficiente de absorção linear semelhante ao do esmalte (Carvalho-Junior et al., 2007), a radiopacidade dos cimentos endodônticos foi quantitativamente analisada utilizando uma escala de alumínio graduada pela espessura equivalente às densidades radiográficas ópticas sob exposição de raio-X (Chen et al., 2014). A adição do AgVO_3 não influenciou negativamente na radiopacidade dos cimentos endodônticos avaliados.

As normas ISO 6876/2001 e ANSI/ADA 2000 (especificação nº 57) preconizam que a radiopacidade mínima de materiais obturadores deve ser superior ou equivalente a 3 mmAl (Chen et al., 2014; Candeiro et al., 2012; Carvalho-Junior et al., 2007). Nesse estudo, todos os grupos dos cimentos avaliados apresentaram valores de radiopacidade superiores ao recomendado pela ANSI/ADA (2000). A adição do AgVO_3 manteve a radiopacidade do Endofill e Sealapex, e a concentração de 2,5% aumentou a radiopacidade do AH Plus e Sealer 26.

O aumento da radiopacidade com a incorporação do AgVO_3 na concentração de 2,5% aos cimentos AH Plus e Sealer 26 não apresenta um impacto relevante no contexto clínico, uma vez que todos os grupos apresentaram valores de radiopacidade acima do mínimo

recomendado. Essa pequena diferença nos valores pode ser explicada pela área selecionada na amostra (30 x 30 pixel), que é menor em relação à área total da imagem radiográfica do corpo de prova, assim, podem ter sido selecionadas regiões com maior densidade de tons de cinza.

O método utilizado nesse estudo para avaliar a radiopacidade foi semelhante ao de Carvalho-Junior et al. (2007), com exceção do software utilizado. Os valores de radiopacidade do Endofill nesse estudo foi semelhante ao encontrado pelos autores. No entanto, a radiopacidade do AH Plus nesse estudo foi menor do que valores apresentados por outros autores (Silva et al., 2013; Candeiro et al., 2012; Carvalho-Junior et al., 2007). Guerreiro-Tanomaru et al. (2009) avaliaram a radiopacidade de cimentos endodônticos, incluindo o Sealer 26 e Sealapex, cujos valores de radiopacidade do Sealer 26 foi superior no presente estudo e inferior para o Sealapex.

Essas diferenças podem ser explicadas pelas variações de metodologias aplicadas na aquisição das radiografias, avaliação das imagens e na manipulação dos cimentos. Variações na metodologia de manipulação durante o processo de mistura podem apresentar mudanças nas posições dos componentes de cada cimento, assim os agentes radiopacificadores podem apresentar-se em menor quantidade nas porções superiores das amostras (Duarte et al., 2010).

A radiopacidade de cimentos endodônticos modificados com agentes antimicrobianos apresenta resultados distintos para outros estudos. No estudo de Ruiz-Linares et al. (2013), os autores observaram uma redução na radiopacidade do cimento AH Plus modificado com Cetrimide nas concentrações de 0,1%, 0,2%, 0,3% e 0,5%; no entanto, houve aumento da radiopacidade do AH Plus modificado com 1% e 2% de Clorexidina, em relação ao controle. Duarte et al. (2010) demonstraram que não houveram diferenças na radiopacidade do AH Plus puro e modificado com 5% e 10% de hidróxido de cálcio. Cimentos AH Plus e Portland (MTA) modificados com nano e micropartículas de Nióbio ou Óxido de zircônio, apresentaram radiopacidade média de 2,5 mmAl, com exceção do AH Plus puro, que apresentou valores inferiores (1,84 mmAl) (Viapiana et al., 2014).

A cor dos dentes é determinada por diferentes propriedades ópticas (Meincke et al., 2013). O CIE $L^* a^* b^*$ é um sistema tridimensional da cor no espaço, concebido para aproximar a percepção do olho humano para as cores. Nesse sistema a cor é definida por 3 parâmetros cromáticos, onde L^* é o valor que indica luminosidade ($L^*=0$ [preto] a $L^*=100$ [branco]), o eixo a^* indica a localização da cor entre as tonalidades verde (-a) a vermelho (+a), e o eixo b^* de azul (-b) a amarelo (+b). A diferença de cor pode ser expressa através do

ΔE (Kohli et al., 2015; Meincke et al., 2013). Um valor de ΔE acima de 3,7 é considerado como uma mudança de cor perceptível a olho nu (Kohli et al., 2015; Jang et al., 2013).

Meincke et al. (2013) avaliaram os efeitos dos cimentos endodônticos Sealer 26, Endofill, AH Plus e Endométhasone N, na alteração de cor de dentes humanos. A alteração de cor foi avaliada através do espectrofotômetro EasyShade Advance (Vita Zahnfabrik, Bad Sa'ckingen, Germany), utilizando as coordenadas de cor do sistema CIE $L^*a^*b^*$, em 24h e 6 meses. Após 6 meses, os cimentos endodônticos Sealer 26 e Endométhasone N apresentaram maiores alterações de cor do que o AH Plus e Endofill, porém todos os cimentos apresentaram alterações inaceitáveis, considerando $\Delta E \leq 3,3$ ou $\Delta E \leq 3,5$. Tais alterações podem ser explicadas pela presença de hidróxido cálcio no Sealer 26. Além disso, há relatos de que o eugenol forma uma ligação com óxido de zinco e provoca mudanças químicas que oxidam com o tempo. Esses componentes estão presentes na composição do Endofill.

Estudos que avaliaram alterações de cor ocasionadas por cimentos endodônticos em diferentes tempos, demonstram que alterações significativas ocorrem com maior tempo decorrido, como 180 dias (Kohli et al., 2015; Meincke et al., 2013) e 365 dias (Parsons; Walton; Ricks-Williamson, 2001).

Nesse estudo, todos os cimentos modificados com $AgVO_3$ apresentaram alterações de cor perceptíveis a olho nu com 180 dias, considerando $\Delta E > 3,7$ (Kohli et al., 2015; Jang et al., 2013), com exceção do Endofill 10% ($\Delta E = 2,57$). Para os grupos controle, apenas o Endofill apresentou alterações perceptíveis com 180 dias. Dentre todos os cimentos, maiores alterações foram observadas para o Sealer 26 (10%), em todos os tempos avaliados. Os grupos AH Plus (5%), Sealapex (2,5%), Sealer 26 (2,5% e 5%), e Endofill (5% e 10%) apresentaram resultados semelhantes aos seus respectivos grupos controle.

A presença do óxido de zinco na composição do Endofill, que sofre oxidação devido à ligação com o eugenol (Meincke et al., 2013), pode explicar as alterações perceptíveis para o grupo controle e aceitáveis para o grupo modificado com 10% de $AgVO_3$, no tempo de 180 dias. Sugere-se que, com a incorporação do $AgVO_3$ em maior concentração, há menos quantidade em massa dos componentes do cimento endodôntico, e proporcionalmente, menos óxidos, o que pode ser atribuído à menor alteração de cor.

Essas diferenças de resultados entre os grupos modificados com $AgVO_3$ correlacionam-se com o padrão de distribuição superficial das nanopartículas observado, apresentando nanopartículas menores e a presença de aglomerações aleatórias. As propriedades ópticas das nanopartículas são causadas pela ressonância de plasmon, que

determina que a absorção do comprimento de onda do espectro de luz visível é dependente do tamanho da nanopartícula (Bovero et al., 2013). Assim, nanopartículas menores absorvem a energia luminosa em comprimentos de onda menores e agregados de nanopartículas, em comprimentos de onda maiores, caracterizando assim, mudanças na cor transmitida (Kelly et al., 2003). Dessa forma, é provável que os cimentos endodônticos modificados, que demonstraram maiores alterações de cor, apresentem um maior número de nanopartículas aglomeradas.

Os cimentos endodônticos utilizados foram inseridos nos dentes de modo a preencher todo o canal, inclusive a câmara pulpar. Clinicamente, todos os vestígios de obturação devem ser removidos da câmara, pois restos de cimento podem resultar na alteração de cor dental (Parsons; Walton; Ricks-Williamson, 2001; Meincke et al., 2013). Além disso, as diferenças anatômicas entre os dentes podem estar associadas a maior potencial para alterações de cor de uns em relação a outros.

Nesse teste foram utilizados dentes extraídos e promovido um preparo endodôntico com apicectomia e preenchimento retrógrado com os cimentos, e apesar dos dentes serem mantidos com 100% de umidade, testes *in vitro* não reproduzem as condições clínicas e biológicas de um dente *in vivo*. O que pode ter potencializado a alteração de cor dental (Jang et al., 2013).

A prata e outros metais pesados, presentes na composição de materiais restauradores e obturadores, podem promover alteração de cor da dentina (Meincke et al., 2013). No presente estudo, o AgVO_3 contém nanopartículas de prata, o que pode ter contribuído para a maior alteração de cor dos grupos modificados.

Segundo Felman e Parashos (2013) a irrigação do canal radicular com hipoclorito de sódio pode induzir a um efeito clareador, o que pode afetar os dentes utilizados em estudos de descoloração dental. Além disso, o hipoclorito de sódio pode causar instabilidade de cor ao interagir com os componentes óxido de bismuto e fosfato tricálcico, presentes na composição dos cimentos Sealer 26 e Sealapex (Kohli et al., 2015).

Castro et al. (2016) relataram que o pó do AgVO_3 apresentou um padrão de dispersão circular limitado à área em torno das partículas poliméricas com maiores diâmetros das resinas acrílicas modificadas com o nanomaterial. Resultado semelhante foi observado na análise da distribuição superficial das nanopartículas nesse estudo, realizada através do Microscópio Confocal a Laser (CLM). Uma vez que, nas figuras 18 e 19 pôde-se observar a presença de nanopartículas menores e dispersas, bem como aglomerações aleatórias do AgVO_3 na composição dos cimentos endodônticos, independente da concentração do

nanomaterial ou do tipo de cimento. Esse fato pode ser atribuído a característica da mistura, uma vez que a mesma procedeu de acordo com a manipulação realizada na prática clínica.

Aglomerados de nanopartículas podem influenciar negativamente nas propriedades físicas de materiais (Cho et al., 2014), e apesar do padrão de distribuição superficial do AgVO_3 nesse estudo apresentar nanopartículas dispersas e aglomeradas, houve influência positiva das mesmas na radiopacidade dos cimentos endodônticos modificados, uma vez que a incorporação de 2,5% do nanomaterial aumentou a radiopacidade do AH Plus e do Sealer 26.

Diante do exposto, os resultados desse estudo indicam a possibilidade do uso do AgVO_3 como aditivo antibacteriano aos cimentos endodônticos, uma vez que o nanomaterial demonstrou capacidade antimicrobiana frente aos micro-organismos avaliados, além de manter e melhorar a atividade antibacteriana inerente dos cimentos endodônticos testados.

Além do mais, o nanomaterial não interferiu na radiopacidade dos cimentos, e melhorou essa propriedade para o AH Plus e Sealer 26. Quanto ao escoamento, os cimentos avaliados apresentaram valores dentro das especificações da ANSI/ADA (2000), com exceção do AH Plus 10%. No entanto, novos métodos, mais aproximados da realidade clínica, para avaliar a alteração de cor da estrutura dental devem ser realizados. Assim, a adição desse nanomaterial à cimentos endodônticos poderá contribuir para evitar casos de reinfecções endodônticas subsequentes.

Assim, apesar da necessidade da realização de outras análises para viabilizar o uso dos cimentos endodônticos modificados com Vanadato de prata, deve-se considerar que este trabalho buscou colaborar para o desenvolvimento tecnológico e científico do país.

6. CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos pode-se concluir que:

- 1 – A Concentração Inibitória Mínima do Vanadato de prata nanoestruturado decorado com nanopartículas de prata (AgVO_3) contra micro-organismos específicos evidenciou atividade do mesmo frente a *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*.
- 2 – A incorporação do AgVO_3 aos cimentos endodônticos testados foi capaz de promover atividade antibacteriana aos mesmos, frente aos micro-organismos avaliados, aumentando a capacidade antimicrobiana inerente à alguns cimentos.
- 3 – O escoamento dos cimentos Sealer 26 e Sealapex não foi afetado pela incorporação de AgVO_3 . E apesar da redução nessa propriedade dos cimentos Endofill e AH Plus, os valores dos mesmos apresentaram-se dentro das especificações da ANSI/ADA (2000), com exceção do AH Plus com 10% de AgVO_3 .
- 4 – A incorporação de AgVO_3 não interferiu na radiopacidade dos cimentos endodônticos avaliados, e a adição de 2,5% de AgVO_3 aumentou os valores de radiopacidade para o AH Plus e Sealer 26.
- 5 – A incorporação de AgVO_3 aos cimentos endodônticos testados influenciou na alteração de cor da estrutura dental dos dentes avaliados, sobretudo no tempo de 180 dias.
- 6 – Observou-se que independente do teor de AgVO_3 incorporado, há a presença do mesmo na composição dos cimentos endodônticos seguindo um padrão de distribuição superficial circular.

7.REFERÊNCIAS¹

¹ De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR 6023: Informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

- AL-SHWAIMI, E.; BOGARI, D.; AJAJ, R.; AL-SHAHRANI, S.; ALMAS, K.; MAJEED, A. *In Vitro* antimicrobial effectiveness of root canal sealers against *Enterococcus faecalis*: A Systematic Review. *Journal of Endodontics*, v. 42, n. 11, p. 1588-1597, 2016.
- AL-SHWAIMI, E. Evaluation of antimicrobial effect of root canal sealers. *Pakistan Oral and Dental Journal*, v. 31, n. 2, p. 432-435, 2011.
- ALVARES, D. C.; ALVARES JUNIOR, J. C. Endotoxina na Endodontia. *Revista Científica da UFPA*, v. 7, n. 1, p. 1-25, 2009.
- AMERICAN NATIONAL STANDARDS/AMERICAN DENTAL ASSOCIATION. Specification no. 57 for endodontic filling materials. Chicago: American National Standards/American Dental Association, 2000.
- ARIAS-MOLIZ, M. T.; CAMILLERI, J. The effect of the final irrigant on the antimicrobial activity of root canal sealers. *Journal of Dentistry*, v.52, p. 30-36, 2016.
- ARIAS-MOLIZ, M. T.; RUIZ-LINARES, M.; CASSAR, G.; FERRER-LUQUE, C. M.; BACA, P.; ORDINOLA-ZAPATA, R.; CAMILLERI, J. The effect of benzalkonium chloride additions to AH Plus sealer. Antimicrobial, physical and chemical properties. *Journal of Dentistry*, v. 43, n. 7, p. 846-854, 2015.
- ARTAL, M. C.; HOLTZ, R. D.; KUMMROW, F.; ALVES, O. L.; UMBUZEIRO, G. A. The role of silver and vanadium release in the toxicity of silver vanadate nanowires toward *Daphnia similes*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v. 32, n. 4, p. 1-5, 2013.
- BAER, J.; MAKI, J. S. *In vitro* evaluation of the antimicrobial effect of three endodontic sealers mixed with amoxicillin. *Journal of Endodontics*, v. 36, n. 7, p. 1170–1173, 2010.
- BAHAR, J.; ALSALIM, S.; DAYEM, R. N. A novel nano-calcium carbonate-polyurethane-based root canal obturation material: synthesis and evaluation of some physical properties. *International Arab Journal of Dentistry*, v. 4, n. 3, p. 98-102, 2013.
- BAILÓN-SÁNCHEZ, M. E.; BACA, P.; RUIZ-LINARES, M.; FERRER-LUQUE, C. M. Antibacterial and anti-biofilm activity of AH Plus with chlorhexidine and cetrimide. *Journal of Endodontics*, v. 40, n. 7, p. 997-981, 2014.
- BARROS, J.; SILVA, M. G.; RÔÇAS, I. N.; GONÇALVES, L. C.; ALVES, F. F.; LOPES, M. A.; PINA-VAZ, I.; SIQUEIRA JR, J. F. Antibiofilm effects of endodontic sealer containing quaternary ammonium polyethylenimine nanoparticles. *Journal of Endodontics*, v. 40, n. 8, p. 1167-1171, 2014a.

BARROS, J.; SILVA, M. G.; RODRIGUES, M. A.; ALVES, F. R. F.; LOPES, M. A.; PINA-VAZ, I.; SIQUEIRA JR, J. F. Antibacterial, physicochemical and mechanical properties of endodontic sealers containing quaternary ammonium polyethylenimine nanoparticles. *International Endodontic Journal*, v. 47, n. 8, p. 725-734, 2014b.

BEYTH, N.; KESLER SHVERO, D.; ZALTSMAN, N.; HOURI-HADDAD, Y.; ABRAMOVITZ, I.; DAVIDI, M. P.; WEISS, E. I. Rapid Kill—Novel Endodontic Sealer and *Enterococcus faecalis*. *PLoS ONE*, v. 8, n. 11, p. e78586-1-10, 2013.

BOVERO, E.; MAGEE, K. E. A.; YOUNG, E. C.; MENON, C. Dispersion of silver nanoparticles into polymer matrix dry adhesives to achieve antibacterial properties, increased adhesion, and optical absorption. *Macromolecular Reaction Engineering*, v. 7, n. 11, p. 624-631, 2013.

CANDEIRO, G. T. M.; CORREIA, F. C.; DUARTE, M. A. H.; RIBEIRO-SIQUEIRA, D. C.; GAVINI, G. Evaluation of radiopacity, pH, release of calcium ions, and flow of a bioceramic root canal sealer. *Journal of Endodontics*, v. 38, n. 6, p. 842-845, 2012.

CARPIO-PEROCHENA, A.; KISHEN, A.; SHRESTHA, A.; BRAMANTE, C. M. Antibacterial properties associated with chitosan nanoparticle treatment on root dentin and 2 types of endodontic sealers. *Journal of Endodontics*, v. 41, n. 8, p. 1353-1358, 2015.

CARVALHO-JUNIOR, J. R.; CORRER-SOBRINHO, L.; CORRER, A. B.; SINHORETI, M. A. C.; CONSANI, S.; SOUSA-NETO, M. D. Radiopacity of root filling materials using digital radiography. *International Endodontic Journal*, v. 40, n. 7, p. 514-520, 2007.

CASTRO, D. T.; VALENTE, M. L. C.; AGNELLI, J. A. M.; SILVA, C. H. L.; WATANABE, E.; SIQUEIRA, R. L.; ALVES, O. L.; HOLTZ, H. D.; REIS, A. C. *In vitro* study of the antibacterial properties and impact strength of dental acrylic resins modified with a nanomaterial. *Journal Prosthetic Dentistry*, v. 115, n. 2, p. 238-246, 2016.

CASTRO, D. T.; HOLTZ, R. D.; ALVES, O. L.; WATANABE, E.; VALENTE, M. L. C.; SILVA, C. H. L.; REIS, A. C. Development of a novel resin with antimicrobial properties for dental application. *Journal Applied Oral Science*, v. 22, n. 5, p. 442-449, 2014.

CHEN, C.; HSIEH, S. C.; TENG, N. C.; KAO, C. K.; LEE, S. Y.; LIN, C. K.; YANG, J. C. Radiopacity and cytotoxicity of Portland cement containing zirconia doped bismuth oxide radiopacifiers. *Journal of Endodontics*, v. 40, n. 2, p. 251-254, 2014.

CHO, H. W.; NAM, S.; LIM, S.; Kim, D.; Kim, H.; Sung, B. J. Effects of size and interparticle interaction of silica nanoparticles on dispersion and electrical conductivity of silver/epoxy nanocomposites. *Journal of Applied Physics*, v. 115, n.15, p. 154307, 2014.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. 6th ed. Wayne: CLSI, 2003.

CORRÊA, J. M.; MORI, M.; SANCHES, H. L.; CRUZ, A. D.; POIATE JR, E.; POIATE, I. A. V. P. Silver nanoparticles in dental biomaterials – Review Article. *International Journal of Biomaterials*, v. 2015, 2015.

ÇOBANKARA, F. K.; ALTINÖZ, H. C.; ERGANIS, O.; KAV, K.; BELLI, S. *In vitro* antibacterial activities of root-canal sealers by using two different methods. *Journal of Endodontics*, v. 30, n. 1, p. 57-60, 2004.

DAVIS, M. C.; WALTON, R. E.; RIVERA, E. M. Sealer distribution in coronal dentin. *Journal of Endodontics*, v. 28, n. 6, p. 464-466, 2002.

DUARTE, M. A. H.; ZAPATA, R. O.; BERNARDES, R. A.; BRAMANTE, C. M.; BERNARDINELLI, N.; GARCIA, R. B.; MORAES, I. G. Influence of calcium hydroxide association on the physical properties of AH Plus. *Journal of Endodontics*, v. 36, n. 6, p. 1048–1051, 2010.

ESTRELA, C.; SYDNEY, G. B.; BAMMANN, L. L.; FELIPPE, O. JR. Mechanism of action of calcium and hydroxyl ions of calcium hydroxide on tissue and bacteria. *Brazilian Dental Journal*, v. 6, n. 2, p. 85-90, 1995.

FELMAN, D.; PARASHOS, P. Coronal tooth discoloration and white Mineral Trioxide Aggregate. *Journal of Endodontics*, v. 39, n. 4, p. 484-487, 2013.

FERREIRA, F. B. A.; SILVA E SOUZA, P. A. R.; VALE, M. S.; TAVANO, O. Radiopacidade de cimentos endodônticos avaliada pelo sistema de radiografia digital. *Revista da Faculdade de Odontologia de Bauru*, v. 7, n. 1/2, p. 55-60, 1999.

GARRIDO, A. D. B.; LIA, R. C. C.; FRANÇA, S. C.; SILVA, J. F.; ASTOLFI-FILHO, S.; SOUSA-NETO, M. D. Laboratory evaluation of the physicochemical properties of a new root canal sealer based on *Copaifera multijuga* oil-resin. *International Endodontic Journal*, v. 43, n. 4, p. 283-291, 2010.

GEIJERSSTAM, A. R.; SORSA, T.; STACKELBERG, S.; TERVAHARTIALA, T.; HAAPASALO, M. Effect of *E. faecalis* on the release of serine proteases elastase and cathepsin G, and collagenase-2 (MMP-8) by human polymorphonuclear leukocytes (PMNs). *International Endodontic Journal*, v. 38, n. 9, p. 667-677, 2005.

GJORGIEVSKAA, E.; APOSTOLSKAB, S.; DIMKOVA, A.; NICHOLSONC, J. W.; KAFTANDZIEVAD, A. Incorporation of antimicrobial agents can be used to enhance the antibacterial effect of endodontic sealers. *Dental Materials*, v. 29, n. 3, p. e29-34, 2013.

GONG, S.; HUANG, Z.; SHI, W.; MA, B.; TAY, F. R.; ZHOU, B. *In vitro* evaluation of antibacterial effect of AH Plus incorporated with quaternary ammonium epoxy silicate against *Enterococcus faecalis*. Journal of Endodontics, v. 40, n. 10, p. 1611-1615, 2014.

GU, S.; RASIMICK, B. J.; DEUTSCH, A. S.; MUSIKANT, B. L. Radiopacity of dental materials using a digital X-ray system. Dental Materials, v. 22, n. 8, p. 765-770, 2006.

GUERREIRO-TANOMARU, J. M.; DUARTE, M. A. H.; GONÇALVES, M.; TANOMARU-FILHO, M. Radiopacity evaluation of root canal sealers containing calcium hydroxide and MTA. Brazilian Oral Research, v. 23, n. 2, p. 119-123, 2009.

HIRAISHI, N.; YIU, C. K. Y.; KING, N. M.; TAY, F. R. Antibacterial effect of experimental chlorhexidine-releasing polymethyl methacrylate-based root canal sealers. Journal of Endodontics, v. 35, n. 9, p. 1255-1258, 2009.

HOELSCHER, A. A.; BAHCALL, J. K.; MAKI, J. S. *In vitro* evaluation of the antimicrobial effects of a root canal sealer-antibiotic combination against *Enterococcus faecalis*. Journal of Endodontics, v. 32, n. 2, p. 145-147, 2006.

HOLTZ, R. D.; LIMA, B. A.; SOUZA FILHO, A. G.; BROCCHI, M.; ALVES, O. L. Nanostructured silver vanadate as a promising antibacterial additive to water-based paints. Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine, v. 8, n. 6, p. 935-940, 2012.

HOLTZ, R. D.; SOUZA FILHO, A. G.; BROCCHI, M.; MARTINS, D.; DURÁN, N.; ALVES, O. L. Development of nanostructured silver vanadates decorated with silver nanoparticles as a novel antibacterial agent. Nanotechnology, v. 21, n. 18, p. 185102, 2010.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. ISO 6876, dental root canal sealing materials. 2nd ed. Geneva, Switzerland: ISO, 2001.

JANG, J. H.; KANG, M.; AHN, S.; KIM, S.; KIM, W.; KIM, Y.; KIM, E. Tooth discoloration after the use of new pozzolan cement (endocem) and Mineral Trioxide Aggregate and the effects of internal bleaching. Journal of Endodontics, v. 39, n. 12, p. 1598-1602, 2013.

JONES, C. M.; HOEK, E. M. V. A review of the antibacterial effects of silver nanomaterials and potential implications for humans health and the environment. Journal of Nanoparticle Research, v. 12, n. 5, p. 1531-1551, 2010.

KELLY, K. L.; CORONADO, E.; ZHAO, L. L.; SCHATZ, G. C. The optical properties of metal nanoparticles: The influence of size, shape, and dielectric environment. Journal of Physical Chemistry B, v. 107, n. 3, p. 668-677, 2003.

KOHLI, M. R.; YAMAGUCHI, M.; SETZER, F. C.; KARABUCAK, B. Spectrophotometric analysis of coronal tooth discoloration induced by various bioceramic cements and other endodontic materials. *Journal of Endodontics*, v. 41, n. 11, p. 1862-1866, 2015.

KWAKYE-AWUAH, B.; WILLIAMS, C.; KENWARD, M. A.; RADECKA, I. Antimicrobial action and efficiency of silver- loaded zeolite X. *Journal of Applied Microbiology*, v. 104, n. 5, p. 1516-1524, 2008.

LAGHIOS, C. D.; BENSON, B. W.; GUTMANN, J. L.; CUTLER, C. W. Comparative radiopacity of tetracalcium phosphate and other root-end filling materials. *International Endodontic Journal*, v. 33, n. 4, p. 311-315, 2000.

LEONARDO, M. R.; SILVA, L. A. B.; TANOMARU FILHO, M.; BONIFÁCIO, K. C.; ITO, I. Y. *In vitro* evaluation of antimicrobial activity of sealers and pastes used in endodontics. *Journal of Endodontics*, v. 26, n. 7, p. 391-394, 2000.

MARIGO, L.; LAJOLO, C.; CASTAGNOLA, R.; ANGERAME, D.; SOMMA, F. Morphological confocal laser scanning microscope evaluation of four different “etch and rinse” adhesives in post endodontic restoration. *Dental Materials Journal*, v. 31, n. 6, p. 988-994, 2012.

MARKOWITZ, K.; MOYNIHAN, M.; LIU, M.; KIM, S. Biologic properties of eugenol and zinc oxide-eugenol. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology*, v. 73, n. 6, p. 729-737, 1992.

MEINCKE, D. K.; PRADO, M.; GOMES, B. P. F.; BONA, A. D.; SOUSA, E. L. R. Effect of endodontic sealers on tooth color. *Journal of Dentistry*, v. 41S, p. e93-e96, 2013.

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

NAIR, P. N.; HENRY, S.; CANO, V.; VERA, J. Microbial status of apical root canal system of human mandibular first molars with primary apical periodontitis after “one-visit” endodontic treatment. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology*, v. 99, n. 2, p. 231-252, 2005.

ÖNEM, E.; BAKSI, B. G.; ŞEN, B. H. Effect of exposure parameters on the radiopacity of root canal sealers. *Oral Science International*, v. 10, n. 1, p. 25-27, 2013.

PABLO, O. V.; ESTEVEZ, R.; SÁNCHEZ, M. P.; HEILBORN, C.; COHENCA, N. Root anatomy and canal configuration of the permanent mandibular first molar: A Systematic Review. *Journal of Endodontics*, v. 36, n. 12, p. 1919-1931, 2010.

PARSONS, J. R.; WALTON, R. E.; RICKS-WILLIAMSON, L. *In vitro* longitudinal assessment of coronal discoloration from endodontic sealers. *Journal of Endodontics*, v. 27, n. 11, p. 699-702, 2001.

PAZ, L. C. Redefining the persistent infection in root canals: possible role of biofilm communities. *Journal of Endodontics*, v. 33, n. 6, p. 652–662, 2007.

PHEE, A.; BONDY-DENOMY, J.; KISHEN, A.; BASRANI, B.; AZARPAZHOOH, A.; MAXWELL, K. Efficacy of bacteriophage treatment on *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Journal of Endodontics*, v. 39, n. 3, p. 364-369, 2013.

PING, X. U.; JICHAO, L.; GANG, D.; LIWEI, Z.; LING Y. Cytotoxicity of realseal on human osteoblast-like MG63 cells. *Journal of Endodontics*, v. 36, n. 1, p. 40–44, 2010.

PORTENIER, I.; HAAPASALO, H.; ORSTAVIK, D.; YAMAUCHI, M.; HAAPASALO, M. Inactivation of the antibacterial activity of iodine potassium iodide and chlorhexidine digluconate against *Enterococcus faecalis* by dentin, dentin matrix, type-I collagen, and heat-killed microbial whole cells. *Journal of Endodontics*, v. 28, n. 9, p. 634-637, 2002.

RAD, M. S.; KOMPANY, A.; ZAK, A. K.; JAVIDI, M.; MORTAZAVI, S. M. Microleakage and antibacterial properties of ZnO and ZnO:Ag nanopowders prepared via a sol–gel method for endodontic sealer application. *Journal of Nanoparticle Research*, v. 15, n. 9, p. 1-8, 2013.

RAI, M.; YADAV, A.; GADE, A. Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. *Biotechnology Advances*, v. 27, n. 1, p. 76-83, 2009.

REZENDE, G. C.; MASSUNARI, L.; QUEIROZ, I. O. A.; GOMES FILHO, J. E.; JACINTO, R. C.; LODI, C. S.; DEZAN JUNIOR, E. Antimicrobial action of calcium hydroxide-based endodontic sealers after setting, against *E. faecalis* biofilm. *Brazilian Oral Research*, v. 30, n.1, p. e38-1-6, 2016.

RUIZ-LINARES, M.; BAILÓN-SÁNCHEZ, M. E.; BACA, P.; VALDERRAMA, M.; FERRER-LUQUE, C. M. Physical properties of AH Plus with chlorhexidine and cetrimide. *Journal of Endodontics*, v. 39, n. 12, p. 1611-1614, 2013.

SHAKYA, V. K.; GUPTA, P.; TIKKU, A. P.; PATHAK, A. K.; CHANDRA, A.; YADAV, R. K.; BHARTI, R.; SINGH, R. K. An *in vitro* evaluation of antimicrobial efficacy and flow characteristics for AH Plus, MTA Fillapex, CRCS and Gutta Flow 2 root canal sealer. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, v. 10, n. 8, p. ZC104-ZC108, 2016.

SILVA, E. J. N. L.; ROSA, T. P.; HERRERA, D. R.; JACINTO, R. C.; GOMES, B. P. F. A.; ZAIA, A. A. Evaluation of cytotoxicity and physicochemical properties of calcium silicate-based endodontic sealer MTA Fillapex. *Journal of Endodontics*, v. 39, n. 2, p. 274-277, 2013.

SIQUEIRA, J. F.; FAVIERI, A.; GAHYVA, S. M. M.; MORAES, S. R.; LIMA, K. C.; LOPES, H. P. Antimicrobial activity and flow rate of newer and established root canal sealers. *Journal of Endodontics*, v. 26, n. 5, p. 274-277, 2000.

SLUTZKY-GOLDBERG, I.; SLUTZKY, H.; SOLOMONOV, M.; MOSHONOV, J.; WEISS, E. I.; MATALON, S. Antibacterial properties of four endodontic sealers. *Journal of Endodontics*, v. 34, n. 6, p. 735-738, 2008.

TAGGER, M.; KATZ, A. Radiopacity of endodontic sealers: development of a new method for direct measurement. *Journal of Endodontics*, v. 29, n. 11, p. 751-755, 2003.

TANOMARU-FILHO, M.; JORGE, E. G.; TANOMARU, J. M. G.; GONÇALVES, M. Radiopacity evaluation of new root canal filling materials by digitalization of images. *Journal of Endodontics*, v. 33, n. 3, p. 249-251, 2007.

TRONSTAD, L. Recent development in endodontic research. *Scandinavian Journal of Dental Research*, v. 100, n. 1, p. 52-59, 1992.

VANAPATLA, A.; VEMISETTY, H.; PUNNA, R.; VEERAMACHINENI, C.; VENKATA, R. P.; MUPPALA, J. N. K.; DANDOLU, R. Comparative evaluation of antimicrobial effect of three endodontic sealers with and without antibiotics – An *in vitro* study. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, v. 10, n. 4, p. ZC69-ZC72, 2016.

VAN DER BURGT, T. P.; MULLANEY, T. P.; PLASSCHAERT, A. J. Tooth discoloration induced by endodontic sealers. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology*, v. 61, n. 1, p. 84-89, 1986.

VIAPIANA, R.; FLUMIGNAN, D. L.; GUERREIRO-TANOMARU, J. M.; CAMILLERI, J.; TANOMARU-FILHO, M. Physicochemical and mechanical properties of zirconium oxide and niobium oxide modified Portland cement-based experimental endodontic sealers. *International Endodontic Journal*, v. 47, n. 5, p. 437-448, 2014.

VITTI, R. P.; PRATI, C.; SILVA, E. J. N. L.; SINHORETI, M. A. C.; ZANCHI, C. H.; SILVA, M. G. S.; OGLIARI, F. A.; PIVA, E.; GANDOLFI, M. G. Physical properties of MTA Fillapex sealer. *Journal of Endodontics*, v. 39, n. 7, p. 915-918, 2013a.

VITTI, R. P.; PRATI, C.; SINHORETI, M. A. C.; ZANCHI, C. H.; SILVA, M. G. S.; OGLIARI, F. A.; PIVA, E.; GANDOLFI, M. G. Chemical-physical properties of experimental root canal sealers based on butyl ethylene glycoldisalicylate and MTA. *Dental Materials*, v. 29, n. 12, p. 1287-1294, 2013b.

WANG, Z.; SHEN, Y.; HAAPASALO, M. Dentin extends the antibacterial effect of endodontic sealers against *Enterococcus faecalis* biofilms. *Journal of Endodontics*, v. 40, n. 4, p. 505-508, 2014.

WU, D.; FAN, W.; KISHEN, A.; GUTMANN, J. L.; FAN, B. Evaluation of the antibacterial efficacy of silver nanoparticles against *Enterococcus faecalis* biofilm. *Journal of Endodontics*, v. 40, n. 2, p. 285-290, 2014.

ZARBIN, A. J. G. Química de (Nano) Materiais. *Química Nova*, v. 30, n. 6, p. 1469 – 1479, 2007.

ZHANG, H.; SHEN, Y.; DORIN RUSE, N.; HAAPASALO, M. Antibacterial activity of endodontic sealers by modified direct contact test against *Enterococcus faecalis*. *Journal of Endodontics*, v. 35, n. 7, p. 1051–1055, 2009.

8. APÉNDICE

8.1 Apêndice A

Tabela A1. Diâmetro do halo de inibição (mm) do teste de difusão em ágar em 48h e 7 dias dos 3 micro-organismos avaliados para o AH Plus incorporado com AgVO_3

Grupos	48 h			7 dias		
	<i>E. faecalis</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>
Controle						
C1	10,0	0,0	0,0	9,8	0,0	0,0
C2	9,1	0,0	0,0	9,0	0,0	0,0
C3	6,8	0,0	0,0	6,6	0,0	0,0
C4	7,0	0,0	0,0	7,0	0,0	0,0
C5	7,0	0,0	0,0	6,6	0,0	0,0
C6	7,0	0,0	0,0	6,5	0,0	0,0
Média	7,83	0,0	0,0	7,61	0,0	0,0
(DP)	(1,38)	(0,0)	(0,0)	(1,43)	(0,0)	(0,0)
2,5%						
C1	8,8	0,0	0,0	8,6	0,0	0,0
C2	8,8	0,0	0,0	8,1	0,0	0,0
C3	8,8	0,0	0,0	9,0	0,0	0,0
C4	7,0	0,0	0,0	7,0	0,0	0,0
C5	7,6	0,0	0,0	7,6	0,0	0,0
C6	7,1	0,0	0,0	6,8	0,0	0,0
Média	8,06	0,0	0,0	7,89	0,0	0,0
(DP)	(0,88)	(0,0)	(0,0)	(0,88)	(0,0)	(0,0)
5%						
C1	7,5	0,0	0,0	6,5	0,0	0,0
C2	7,1	0,0	0,0	7,0	0,0	0,0
C3	7,1	0,0	0,0	6,8	0,0	0,0
C4	7,1	0,0	0,0	6,8	0,0	0,0
C5	9,0	0,0	0,0	8,5	0,0	0,0
C6	7,1	0,0	0,0	7,5	0,0	0,0
Média	7,53	0,0	0,0	7,19	0,0	0,0
(DP)	(0,73)	(0,0)	(0,0)	(0,71)	(0,0)	(0,0)
10%						
C1	10,3	5,8	6,0	9,8	6,5	6,0
C2	9,3	5,0	5,8	7,5	6,0	6,0
C3	7,5	6,0	5,7	7,0	6,3	5,5
C4	8,0	6,5	6,5	7,3	6,5	6,5
C5	8,5	6,1	5,7	8,0	6,5	5,5
C6	8,5	5,5	5,0	7,5	6,0	5,3
Média	8,69	5,83	5,77	7,86	6,31	5,80
(DP)	(1,00)	(0,52)	(0,49)	(1,01)	(0,24)	(0,43)

Tabela A2. Diâmetro do halo de inibição (mm) do teste de difusão em ágar em 48h e 7 dias dos 3 micro-organismos avaliados para o Endofill incorporado com AgVO₃

Grupos	48 h			7 dias		
	<i>E. faecalis</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. Coli</i>
Controle						
C1	8,1	0,0	14,3	8,5	0,0	14,7
C2	7,0	0,0	14,3	7,5	0,0	14,7
C3	7,5	0,0	13,5	8,0	0,0	13,8
C4	6,5	0,0	13,0	6,6	0,0	13,5
C5	6,6	0,0	13,1	6,8	0,0	13,0
C6	7,5	0,0	13,1	6,5	0,0	13,5
Média	7,22	0,0	13,58	7,33	0,0	13,86
(DP)	(0,62)	(0,0)	(0,60)	(0,80)	(0,0)	(0,67)
2,5%						
C1	14,5	0,0	15,3	14,5	0,0	15,0
C2	12,6	0,0	14,6	12,5	0,0	14,5
C3	13,3	0,0	15,0	13,1	0,0	15,0
C4	13,5	0,0	14,6	13,5	0,0	14,3
C5	12,1	0,0	15,0	12,1	0,0	15,0
C6	13,8	0,0	15,0	13,1	0,0	15,0
Média	13,33	0,0	14,94	13,17	0,0	14,80
(DP)	(0,83)	(0,0)	(0,25)	(0,81)	(0,0)	(0,30)
5%						
C1	18,6	0,0	15,5	17,8	0,0	15,5
C2	17,0	0,0	16,0	17,0	0,0	16,2
C3	17,0	0,0	15,5	16,0	0,0	15,5
C4	16,0	0,0	15,0	16,0	0,0	15,3
C5	17,0	0,0	16,0	17,0	0,0	16,0
C6	17,8	0,0	15,1	17,8	0,0	15,5
Média	17,25	0,0	15,52	16,94	0,0	15,66
(DP)	(0,90)	(0,0)	(0,41)	(0,82)	(0,0)	(0,33)
10%						
C1	16,3	10,0	16,1	16,3	10,0	16,7
C2	15,1	9,8	18,1	15,5	10,0	18,0
C3	15,1	9,0	17,6	15,3	8,8	17,3
C4	15,6	9,8	18,0	15,6	10,0	18,3
C5	15,5	9,6	17,5	15,5	10,0	17,7
C6	15,5	9,6	18,0	15,5	9,5	18,0
Média	15,56	9,67	17,58	15,64	9,72	17,66
(DP)	(0,43)	(0,35)	(0,73)	(0,35)	(0,47)	(0,59)

Tabela A3. Diâmetro do halo de inibição (mm) do teste de difusão em ágar em 48h e 7 dias dos 3 micro-organismos avaliados para o Sealer 26 incorporado com AgVO₃

Grupos	48h			7 dias		
	<i>E. faecalis</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>
Controle						
C1	8,0	0,0	0,0	8,0	0,0	0,0
C2	8,0	0,0	0,0	7,6	0,0	0,0
C3	7,3	0,0	0,0	7,5	0,0	0,0
C4	7,3	0,0	0,0	7,1	0,0	0,0
C5	7,0	0,0	0,0	7,0	0,0	0,0
C6	7,5	0,0	0,0	7,0	0,0	0,0
Média	7,53	0,0	0,0	7,39	0,0	0,0
(DP)	(0,40)	(0,0)	(0,0)	(0,40)	(0,0)	(0,0)
2,5%						
C1	8,0	0,0	0,0	7,5	0,0	0,0
C2	7,0	0,0	0,0	7,3	0,0	0,0
C3	6,6	0,0	0,0	6,5	0,0	0,0
C4	8,0	0,0	0,0	7,5	0,0	0,0
C5	6,3	0,0	0,0	7,0	0,0	0,0
C6	7,5	0,0	0,0	6,5	0,0	0,0
Média	7,25	0,0	0,0	7,06	0,0	0,0
(DP)	(0,69)	(0,0)	(0,0)	(0,46)	(0,0)	(0,0)
5%						
C1	9,0	0,0	0,0	9,0	0,0	0,0
C2	9,5	0,0	0,0	9,8	0,0	0,0
C3	9,0	0,0	0,0	9,5	0,0	0,0
C4	9,0	0,0	0,0	9,0	0,0	0,0
C5	9,0	0,0	0,0	9,5	0,0	0,0
C6	10,0	0,0	0,0	10,0	0,0	0,0
Média	9,25	0,0	0,0	9,47	0,0	0,0
(DP)	(0,41)	(0,0)	(0,0)	(0,41)	(0,0)	(0,0)
10%						
C1	12,8	0,0	6,0	12,5	0,0	6,0
C2	12,5	0,0	6,0	12,5	0,0	6,0
C3	12,3	0,0	6,0	12,6	0,0	6,0
C4	11,5	0,0	6,0	11,8	0,0	6,0
C5	11,0	0,0	6,0	11,0	0,0	6,0
C6	12,0	0,0	6,0	12,0	0,0	6,0
Média	12,03	0,0	6,0	12,08	0,0	6,0
(DP)	(0,67)	(0,0)	(0,0)	(0,62)	(0,0)	(0,0)

Tabela A4. Diâmetro do halo de inibição (mm) do teste de difusão em ágar em 48h e 7 dias dos 3 micro-organismos avaliados para o Sealapex incorporado com AgVO₃

Grupos	48h			7 dias		
	<i>E. faecalis</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. Coli</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. Coli</i>
Controle						
C1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
C2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
C3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
C4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
C5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
C6	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Média	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
(DP)	(0,0)	(0,0)	(0,0)	(0,0)	(0,0)	(0,0)
2,5%						
C1	13,0	0,0	0,0	13,5	0,0	0,0
C2	11,1	0,0	0,0	11,8	0,0	0,0
C3	12,0	0,0	0,0	11,8	0,0	0,0
C4	12,0	0,0	0,0	12,0	0,0	0,0
C5	12,3	0,0	0,0	12,5	0,0	0,0
C6	14,1	0,0	0,0	14,1	0,0	0,0
Média	12,44	0,0	0,0	12,64	0,0	0,0
(DP)	(1,03)	(0,0)	(0,0)	(0,98)	(0,0)	(0,0)
5%						
C1	16,6	0,0	8,1	17,3	0,0	8,0
C2	14,5	0,0	6,8	14,6	0,0	7,0
C3	15,8	0,0	7,0	16,1	0,0	6,8
C4	14,8	0,0	7,5	15,1	0,0	6,8
C5	16,6	0,0	M	17,3	0,0	M
C6	16,6	0,0	7,0	16,6	0,0	7,0
Média	15,86	0,0	7,30	16,22	0,0	7,13
(DP)	(0,98)	(0,0)	(0,54)	(1,11)	(0,0)	(0,49)
10%						
C1	20,0	0,0	7,6	19,8	0,0	7,8
C2	18,0	0,0	M	17,5	0,0	M
C3	17,1	0,0	M	17,1	0,0	M
C4	18,0	0,0	7,5	18,0	0,0	7,7
C5	19,0	0,0	7,8	18,8	0,0	8,5
C6	19,0	0,0	7,5	19,0	0,0	8,7
Média	18,53	0,0	7,62	18,39	0,0	8,16
(DP)	(1,00)	(0,0)	(0,15)	(1,00)	(0,0)	(0,49)

8.2 Apêndice B

Tabela B1. Diâmetro do disco formado pelo escoamento dos cimentos endodônticos incorporados com diferentes concentrações de AgVO_3 (mm)

Grupos	AH Plus	Endofill	Sealer 26	Sealapex
Controle				
C1	34,7	48,7	39,3	32,7
C2	37,0	49,0	44,0	31,7
C3	36,3	46,3	33,3	32,0
C4	37,7	38,3	50,3	30,0
C5	34,7	45,7	46,3	29,7
C6	37,3	43,3	48,7	31,0
Média	36,2	45,2	43,6	31,1
(DP)	(0,13)	(0,39)	(0,63)	(0,11)
2,5%				
C1	29,7	35,7	40,7	22,3
C2	29,0	38,7	36,7	26,0
C3	33,0	38,3	41,0	27,0
C4	30,7	38,0	41,7	28,7
C5	29,0	37,7	37,0	30,7
C6	30,0	40,3	43,3	28,3
Média	30,2	38,1	40,0	27,1
(DP)	(0,15)	(0,15)	(0,26)	(0,28)
5%				
C1	23,0	43,3	44,3	27,3
C2	22,7	39,7	44,7	27,0
C3	26,0	24,3	44,7	26,7
C4	25,0	38,7	45,3	28,3
C5	24,0	39,7	45,7	27,0
C6	27,3	39,3	47,3	28,3
Média	24,6	37,5	45,3	27,4
(DP)	(0,18)	(0,66)	(0,10)	(0,07)
10%				
C1	18,0	34,3	44,3	24,7
C2	17,3	37,3	46,3	25,3
C3	17,3	33,3	43,0	25,3
C4	19,0	39,0	39,3	25,3
C5	18,7	34,3	37,3	26,0
C6	19,3	35,7	44,3	24,3
Média	18,2	35,6	42,4	25,1
(DP)	(0,08)	(0,21)	(0,34)	(0,05)

8.3 Apêndice C

Tabela C1. Radiopacidade dos cimentos endodônticos incorporados com diferentes concentrações de AgVO_3 (mmAl)

Grupos	AH Plus	Endofill	Sealer 26	Sealapex
Controle				
C1	3,80	9,24	8,13	3,68
C2	4,21	6,71	7,00	3,41
C3	4,72	5,82	7,30	3,94
C4	4,71	8,27	7,37	4,68
C5	4,43	6,71	6,63	5,13
Média	4,37	7,35	7,28	4,16
(DP)	(0,38)	(1,37)	(0,55)	(0,71)
2,5%				
C1	4,81	10,69	9,27	3,47
C2	5,58	7,42	8,02	4,31
C3	5,79	6,70	8,46	3,96
C4	5,79	9,51	8,42	3,91
C5	5,25	8,84	8,38	4,53
Média	5,44	8,63	8,51	4,03
(DP)	(0,41)	(1,60)	(0,46)	(0,40)
5%				
C1	4,23	8,57	7,52	3,70
C2	5,07	6,76	7,33	3,74
C3	5,37	5,49	7,08	3,65
C4	4,98	7,59	7,05	3,92
C5	4,70	6,35	6,07	4,48
Média	4,86	6,95	7,01	3,89
(DP)	(0,43)	(1,17)	(0,56)	(0,33)
10%				
C1	3,50	9,16	8,08	3,24
C2	3,95	6,57	7,67	3,15
C3	4,80	6,02	7,98	3,21
C4	4,20	7,83	6,91	4,50
C5	3,80	6,95	6,64	3,71
Média	4,04	7,30	7,45	3,56
(DP)	(0,48)	(1,22)	(0,64)	(0,56)

8.4 Apêndice D

Tabela D1. Alteração de cor da estrutura dental do AH Plus incorporado com diferentes concentrações de AgVO_3 (ΔE)

Grupos	ΔE 7 dias	ΔE 30 dias	ΔE 90 dias	ΔE 180 dias
Controle				
C1	0,66	1,06	2,46	3,96
C2	1,38	1,56	0,64	0,92
C3	1,14	1,08	0,27	1,43
Média	1,06	1,23	1,12	2,10
(DP)	(0,37)	(0,28)	(1,17)	(1,62)
2,5%				
C1	5,46	5,25	4,77	14,44
C2	1,42	0,58	0,93	0,96
C3	3,92	1,69	2,28	7,59
Média	3,60	2,50	2,65	7,66
(DP)	(2,04)	(2,43)	(1,94)	(6,74)
5%				
C1	1,12	0,61	1,51	14,95
C2	0,48	0,53	0,48	13,26
C3	1,19	1,87	1,07	9,02
Média	0,93	1,00	1,01	12,41
(DP)	(0,39)	(0,75)	(0,51)	(3,05)
10%				
C1	1,63	1,74	2,32	3,61
C2	1,88	2,28	3,22	11,90
C3	4,84	4,11	5,27	6,23
Média	2,78	2,70	3,60	7,24
(DP)	(1,78)	(1,23)	(1,50)	(4,23)

Tabela D2. Alteração de cor da estrutura dental do Sealapex incorporado com diferentes concentrações de AgVO_3 (ΔE)

Grupos	ΔE 7 dias	ΔE 30 dias	ΔE 90 dias	ΔE 180 dias
Controle				
C1	1,78	0,94	0,74	3,72
C2	0,41	0,97	0,89	6,73
C3	1,00	1,38	1,17	0,72
Média	1,06	1,09	0,93	3,72
(DP)	(0,68)	(0,24)	(0,22)	(3,00)
2,5%				
C1	0,92	1,20	2,38	1,95
C2	0,25	2,37	3,14	2,30
C3	0,77	0,77	1,31	14,71
Média	0,64	1,44	2,27	6,31
(DP)	(0,35)	(0,83)	(0,91)	(7,27)
5%				
C1	0,90	1,44	0,80	14,18
C2	2,84	3,42	3,41	2,19
C3	2,89	3,37	4,45	4,20
Média	2,21	2,74	2,88	6,85
(DP)	(1,13)	(1,13)	(1,88)	(6,42)
10%				
C1	3,41	5,28	6,31	1,32
C2	3,40	2,64	3,11	14,27
C3	0,75	0,20	0,59	2,14
Média	2,52	2,70	3,33	5,90
(DP)	(1,53)	(2,53)	(2,86)	(7,25)

Tabela D3. Alteração de cor da estrutura dental do Sealer 26 incorporado com diferentes concentrações de AgVO_3 (ΔE)

Grupos	ΔE 7 dias	ΔE 30 dias	ΔE 90 dias	ΔE 180 dias
Controle				
C1	2,73	2,12	1,27	1,87
C2	3,35	3,55	2,68	0,84
C3	0,63	0,49	0,75	4,14
Média	2,23	2,05	1,56	2,28
(DP)	(1,42)	(1,53)	(1,00)	(1,69)
2,5%				
C1	3,45	3,61	8,09	6,39
C2	2,01	1,81	1,90	5,27
C3	2,18	2,17	1,65	2,48
Média	2,54	2,53	3,87	4,71
(DP)	(0,78)	(0,95)	(3,64)	(2,01)
5%				
C1	2,26	2,80	3,01	3,02
C2	3,60	3,71	3,47	3,15
C3	0,30	0,35	0,25	13,03
Média	2,05	2,28	2,24	6,40
(DP)	(1,66)	(1,73)	(1,73)	(5,74)
10%				
C1	6,26	5,86	5,97	6,08
C2	5,01	5,96	6,36	11,72
C3	8,97	9,29	9,36	7,84
Média	6,74	7,03	7,22	8,54
(DP)	(2,02)	(1,95)	(1,85)	(2,88)

Tabela D4. Alteração de cor da estrutura dental do Endofill incorporado com diferentes concentrações de AgVO_3 (ΔE)

Grupos	ΔE 7 dias	ΔE 30 dias	ΔE 90 dias	ΔE 180 dias
Controle				
C1	1,15	0,97	0,74	12,17
C2	2,28	2,95	3,32	6,19
C3	2,19	0,70	1,07	1,37
Média	1,87	1,54	1,71	6,57
(DP)	(0,62)	(1,22)	(1,40)	(5,41)
2,5%				
C1	3,12	3,25	4,29	6,30
C2	3,17	4,24	4,60	6,27
C3	2,22	0,70	1,64	3,27
Média	2,83	2,72	3,51	5,28
(DP)	(0,53)	(1,82)	(1,63)	(1,74)
5%				
C1	1,15	0,93	1,26	1,34
C2	2,06	2,20	2,51	3,72
C3	0,88	0,98	1,46	14,18
Média	1,36	1,36	1,74	6,41
(DP)	(0,61)	(0,71)	(0,67)	(6,83)
10%				
C1	0,30	0,64	0,77	1,01
C2	3,78	4,43	4,48	5,55
C3	0,95	0,96	1,03	1,17
Média	1,67	2,00	2,09	2,57
(DP)	(1,85)	(2,10)	(2,06)	(2,57)