



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

ADLA RENATA DOS SANTOS SILVA

**BIOSSÍNTESE E INVESTIGAÇÃO *IN VITRO* e *EX VIVO* DE NANOPARTÍCULAS DE
PRATA SOBRE *ENTEROCOCCUS FAECALIS***

Maceió

2021

ADLA RENATA DOS SANTOS SILVA

BIOSSÍNTESE E INVESTIGAÇÃO *IN VITRO* e *EX VIVO* DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA SOBRE *ENTEROCOCCUS FAECALIS*

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Alagoas, como um dos requisitos para obtenção do grau de mestre em Ciências da Saúde.

Orientador(a): Profa. Dra. Camila Braga Dornelas

Coorientador(a): Profa. Dra. Isabel Cristina Celerino de Moraes Porto

Maceió

2021

Catlogação na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico

Bibliotecário: Marcelino de Carvalho Freitas Neto – CRB-4 - 1767

S586b Silva, Adla Renata dos Santos.
Biossíntese e investigação *in vitro* e *ex vivo* de nanopartículas de prata sobre
Enterococcus faecalis / Adla Renata dos Santos Silva. – 2021.
98 f. : il.

Orientadora: Camila Braga Dornelas.
Co-orientadora: Isabel Cristina Celerino de Moraes Porto.
Dissertação (mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade Federal de
Alagoas. Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde. Programa de Pós-Graduação
em Ciências da Saúde. Maceió, 2021.

Bibliografia: f. 65-76.

Apêndices: f. 77-96.

Anexos: f. 97-98.

1. Nanopartículas metálicas. 2. Materiais biocompatíveis. 3. Própole- Brasil. 4.
Controle de infecções dentárias. 5. Endodontia regenerativa. I. Título.

CDU: 616.314

AGRADECIMENTOS

A Deus por Sua bondade.

Aos meus familiares pelo incentivo e apoio constante, em especial a minha mãe, Marcia Susan dos Santos Silva, e a minha irmã, Adna Juliana dos Santos Silva.

Aos colegas do TecNano pelos auxílios diários.

À Dayane Mendonça que me acompanhou nos experimentos por alguns meses e durante minha graduação na clínica integrada.

Aos professores Luciano Grillo, Irinaldo Diniz, Ticiano Gomes do Nascimento e Mário Meneghetti por disporem seus laboratórios e ao Josiel por sua assistência.

Aos professores Valter Alvino e Uéslen Rocha Silva por estarem dispostos a esclarecer dúvidas no decorrer deste trabalho.

À professora Fernanda Cristina de Albuquerque Maranhão pela cooperação nos testes antimicrobianos e nos questionamentos que surgiram, e à Emmily Margarete por seu auxílio para a realização dos experimentos.

Às professoras Ana Catarina Rezende Leite e Fernanda Cristina de Albuquerque Maranhão por terem aceitado compor a banca de qualificação e colaborar com seus conhecimentos para esta pesquisa.

Aos professores Fábio Correia Sampaio e Fernanda Cristina de Albuquerque Maranhão por comporem à banca de defesa, contribuindo para o aperfeiçoamento deste trabalho.

Às professoras Camila Braga Dornelas e Isabel Cristina Celerino de Moraes Porto pela orientação e disponibilidade em ajudar para o crescimento deste estudo.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde por contribuir para a continuidade do aprendizado.

RESUMO

Enterococcus faecalis tem um papel importante nas infecções endodônticas persistentes, contribuindo para isso sua alta resistência ao hidróxido de cálcio (Ca(OH)_2), o principal medicamento intracanal na odontologia. Assim, o desenvolvimento de novas formulações antimicrobianas é de fundamental relevância, sobressaindo-se nanomateriais contendo prata, e a síntese biogênica se apresenta como uma alternativa à redução da toxicidade das nanopartículas (NPs). O objetivo desta pesquisa foi sintetizar NPs de prata com própolis vermelha de Alagoas (NPsAg-PV) para avaliar seu potencial antibacteriano frente a *E. faecalis*. NPsAg-PV foram sintetizadas através da redução dos sais de prata por extrato hidroalcoólico de própolis vermelha de Alagoas (EHPV), caracterizadas na forma de suspensão coloidal pela técnica de espectrofotometria ultravioleta e visível (UV-Vis), espalhamento dinâmico da luz (EDL) e potencial zeta. O coloide foi submetido à centrifugação e levado à estufa para obtenção das NPs em forma de pó. A atividade antimicrobiana contra *E. faecalis* foi observada pela determinação de CIM e CBM. Foram avaliados Ca(OH)_2 ; EHPV; nanopartículas de prata (NPsAg), sintetizadas pelo método químico; NPsAg+EHPV; NPsAg-PV e as combinações de Ca(OH)_2 +EHPV; Ca(OH)_2 +NPsAg; Ca(OH)_2 +NPsAg+EHPV e Ca(OH)_2 +NPsAg-PV. Seguindo-se a avaliação *ex vivo* das substâncias pelos períodos experimentais de 1, 3 e 7 dias sobre biofilme formado por 21 dias em dentina de dentes humanos extraídos. A análise espectral demonstrou absorvância de 425 e 421 nm, após 24 h e 72 h, respectivamente, valores característicos da formação de NPs de prata de formato esférico. O EDL mostrou um diâmetro de 132,5 nm \pm 1,19 e índice de polidispersão (PDI) de 0,266, sugerindo a homogeneidade na distribuição das NPs quanto ao diâmetro, o potencial zeta foi de -61 mV \pm 1,59, indicando a estabilidade do coloide de prata, quanto à tendência à aglomeração. *In vitro*, em comparação à pasta de Ca(OH)_2 , as NPsAg-PV isoladas exibiram eficácia 16 vezes superior quanto ao efeito bacteriostático e 32 vezes quanto ao bactericida, as NPsAg-PV associadas ao Ca(OH)_2 atividade bacteriostática 2 vezes superior. O ensaio *ex vivo* demonstrou a efetividade das substâncias à 2.000 $\mu\text{g/mL}$ sobre biofilme de *E. faecalis*, observando-se UFCs apenas para NPsAg no intervalo de um dia. Diante disso, é possível afirmar que a própolis vermelha de Alagoas utilizada como agente estabilizante e de revestimento das NPs de prata contribuiu para o aperfeiçoamento de sua atividade antimicrobiana.

Palavras-chave: Nanopartículas metálicas. Biomateriais. Própolis brasileira. Infecção intracanal persistente. Tratamento endodôntico.

ABSTRACT

Enterococcus faecalis plays an important role in persistent endodontic infections, contributing to its high resistance to calcium hydroxide ($\text{Ca}(\text{OH})_2$), the main intracanal drug in dentistry. Thus, the development of new antimicrobial formulations is of fundamental importance, nanomaterials containing silver have been standing out and biogenic synthesis presents itself as an alternative to reducing the toxicity of nanoparticles (NPs). The aim of this research was to synthesize silver NPs with red propolis from Alagoas (NPsAg-PV) to evaluate their antibacterial potential against *E. faecalis*. NPsAg-PV were synthesized by the reduction of silver salts by hydroalcoholic extract of red propolis from Alagoas (EHPV), characterized in the form of colloidal suspension by ultraviolet and visible spectrophotometry (UV-Vis), dynamic light scattering (EDL) technique and zeta potential. The colloid was subjected to centrifugation and taken to an oven to obtain the NPs in powder form. The antimicrobial activity against *E. faecalis* was observed by the determination of MIC and MBC performed by microdilution in broth. Were evaluated $\text{Ca}(\text{OH})_2$; EHPV; silver nanoparticles (NPsAg), synthesized by the chemical method; NPsAg+EHPV; NPsAg-PV and the combinations $\text{Ca}(\text{OH})_2$ +EHPV; $\text{Ca}(\text{OH})_2$ +NPsAg; $\text{Ca}(\text{OH})_2$ +NPsAg+EHPV and $\text{Ca}(\text{OH})_2$ +NPsAg-PV. Following the ex vivo evaluation of substances for experimental periods of 1, 3 and 7 days on biofilm formed for 21 days in dentin of extracted human teeth. Spectral analysis showed absorbance of 425 and 421 nm, after 24 h and 72 h, respectively, characteristic values of the formation of spherical silver NPs. The EDL showed a diameter of $132.5 \text{ nm} \pm 1.19$ and a polydispersion index (PDI) of 0.266, suggesting the homogeneity in the distribution of NPs in terms of diameter, the zeta potential was $-61 \text{ mV} \pm 1.59$, indicating the stability of the silver colloid, regarding the tendency to agglomeration. In vitro, compared to $\text{Ca}(\text{OH})_2$ paste, the NPsAg-PV isolated exhibited 16 times the bacteriostatic effect and 32 times the bactericidal effect, the NPsAg-PV associated with $\text{Ca}(\text{OH})_2$ bacteriostatic activity 2 times higher. The ex vivo assay demonstrated the effectiveness of the substances at $2,000 \text{ } \mu\text{g}/\text{mL}$ on *E. faecalis* biofilm, observing CFUs only for NPsAg within one day. Therefore, it is possible to affirm that the red propolis from Alagoas used as a stabilizing and coating agent for silver NPs contributed to the improvement of its antimicrobial activity.

Keywords: Metal nanoparticles. Biomaterials. Brazilian propolis. Persistent intracanal infection. Endodontic treatment.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Representação do aumento da área superficial relacionado à redução do tamanho das partículas.....	21
Figura 2- Comprimentos de onda relacionados ao formato do material.	26
Figura 3- Representação da mobilidade eletroforética das partículas em suspensão.	27
Figura 4- Variações na intensidade da luz pela movimentação das nanopartículas em suspensão.	28
Figura 5- Teor total de compostos fenólicos e flavonoides nas própolis marrom, verde e vermelha (média \pm desvio padrão; n = 9).	32
Figura 6- Organograma dos experimentos realizados.....	34
Figura 7- Representação da microplaca para obtenção da concentração inibitória mínima.	40
Figura 8- Blocos de dentina.....	42
Figura 9- Blocos de dentina fixados em cera.....	43
Figura 10- Espectro ultravioleta e visível das nanopartículas de prata. (A) Após 24 h. (B) Após 72 h.	46
Figura 11- Espectros ultravioleta e visível das nanopartículas de prata com própolis vermelha de Alagoas. (A) Após 24 h. (B) Após 72 h.	47
Figura 12- Raio hidrodinâmico médio das nanopartículas de prata.....	48
Figura 13- Raio hidrodinâmico médio das nanopartículas de prata com própolis vermelha de Alagoas.....	48
Figura 14- Potencial zeta das nanopartículas de prata.	49
Figura 15- Potencial zeta das nanopartículas de prata com própolis vermelha de Alagoas	50
Figura 16- Picos máximos de absorção das nanopartículas à espectrofotometria ultravioleta e visível. (a) Nanopartículas biossintetizadas com o extrato de própolis indiana de pH 10,62. (b) Nanopartículas biossintetizadas com o extrato de própolis indiana de pH 8,05.	51
Figura 17- Valores do potencial zeta (em mV e em módulo) dos materiais estudados.	52
Figura 18- Valores do escoamento horizontal (em mm) dos materiais estudados. ..	53

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 19- Certificado de Apresentação de Apreciação Ética.	97
Figura 20- Visão geral da cepa ATCC 29212 de <i>Enterococcus faecalis</i>	98

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Descrição dos grupos experimentais do teste <i>in vitro</i> da avaliação antimicrobiana.....	39
Tabela 2- Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) das substâncias testadas e classificação quanto à atividade bacteriostática.	54

LISTA DE QUADROS

Quadro 1- Fatores associados à persistência de <i>Enterococcus faecalis</i> no sistema de canais radiculares.	20
Quadro 2- Produtos contendo nanopartículas de prata no setor odontológico.	24

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

a.C.	Antes de Cristo
AMH	Ágar Mueller Hinton
ATCC	do inglês, <i>American Type Culture Collection</i>
BHI	Brain Heart Infusion
EDL	Espalhamento de Luz Dinâmico
CIM	Concentração inibitória mínima
CBM	Concentração bactericida mínima
EHPV	Extrato hidroalcoólico de própolis vermelha de Alagoas
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FPS	Fator de proteção solar
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio
NPs	Nanopartículas
NPsAg	Nanopartículas de prata
NPsAg-PV	Nanopartículas de prata com própolis vermelha de Alagoas
PDI	do inglês, <i>Polydispersity Index</i>
pH	Potencial hidrogeniônico
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MET	Microscopia Eletrônica de Transmissão
PEG	Polietilenoglicol
RPS	Ressonância Plasmônica de Superfície
TSA	Teste de Susceptibilidade a Antimicrobianos
UV-Vis	Ultravioleta-Visível

LISTA DE SÍMBOLOS

Ca(OH)_2	Hidróxido de cálcio
m	Metro
PO_4^{3-}	Íon fosfato
C	Carbono
H	Hidrogênio
nm	Nanômetro
m^2	Metro quadrado
cm^3	Centímetro cúbico
mV	Milivolts
μg	Microgramas
$^\circ\text{C}$	Grau Celsius
mL	Mililitros
mg	Miligramas
AgNO_3	Nitrato de prata
NaOH	Hidróxido de sódio
NaCl	Cloreto de sódio
g	Gramas
rpm	Rotação por minuto
AlCl_3	Cloreto de alumínio
μM	Micromolar
s	Segundo
M	Molar
h	Hora
NaBH_4	Borohidreto de sódio

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
2.1 Alterações pulpares	14
2.1.1 Microbiota da infecção intracanal.....	15
2.1.2 Tratamento da infecção intracanal.....	17
2.2 Nanociência	21
2.2.1 Nanopartículas de prata.....	23
2.2.2. Propriedades das nanopartículas de prata	25
2.2.2.1 Ressonância plasmônica de superfície (RPS).....	25
2.2.2.2 Potencial zeta	26
2.2.2.3 Tamanho	27
2.2.3 Nanopartículas biogênicas.....	29
2.3 Própolis	30
3 OBJETIVOS	33
3.1 Objetivo geral	33
3.2 Objetivos específicos	33
4 METODOLOGIA	34
4.1 Delineamento do estudo	34
4.2 Materiais	34
4.3 Preparo do extrato hidroalcoólico de própolis vermelha de Alagoas	35
4.4 Síntese de nanopartículas de prata	36
4.5 Síntese de nanopartículas de prata com própolis vermelha de Alagoas ..	36
4.6 Obtenção de nanopartículas na forma de pó	36
4.7 Preparo dos grupos experimentais para teste de escoamento e avaliação do potencial antibacteriano	37

SUMÁRIO

4.8 Caracterização	37
4.8.1 Espectrofotometria ultravioleta e visível.....	37
4.8.2 Espalhamento dinâmico da luz	38
4.8.3 Potencial zeta	38
4.8.4 Teste de escoamento horizontal.....	38
4.9 Avaliação do potencial antibacteriano	39
4.9.1 Ensaio <i>in vitro</i>	39
4.9.2 Ensaio <i>ex vivo</i>	41
4.9.2.1 Preparo dos dentes	42
4.9.2.2 Inoculação dos blocos de dentina com <i>Enterococcus faecalis</i>	43
4.9.2.3 Aplicação do medicamento intracanal	44
4.9.2.4 Coleta das raspas de dentina e atividade antimicrobiana.....	44
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
5.1 Obtenção do extrato hidroalcoólico de própolis vermelha de Alagoas	45
5.2 Caracterização	46
5.2.1 Espectrofotometria ultravioleta e visível.....	46
5.2.2 Espalhamento dinâmico da luz	47
5.2.3 Potencial zeta	49
5.2.4 Teste de escoamento horizontal.....	52
5.3 Avaliação antibacteriana	54
5.3.1 Ensaio <i>in vitro</i>	54
5.3.2 Ensaio <i>ex vivo</i>	61
6 CONCLUSÃO	63
REFERÊNCIAS	65
APÊNDICE	77
ANEXOS	97

1 INTRODUÇÃO

Das doenças da cavidade oral, as pulpares são as causas principais da procura pelos serviços odontológicos, Siqueira e Lopes (2010) indicaram que aproximadamente 90% das urgências relacionadas à sintomatologia dolorosa são de natureza odontogênica e que para a resolução do caso o tratamento endodôntico é necessário. Bezerra *et al.* (2015) mostraram que a maioria dos casos recebidos nas urgências odontológicas possui etiologia endodôntica. Apesar da utilização de um protocolo adequado, para todos os tipos de tratamento das doenças humanas existe uma taxa de insucesso, que na terapia endodôntica pode corresponder a cerca de 10 a 15%, um percentual significativo (LIEBLICH, 2012). A principal causa do insucesso é a permanência de micro-organismos no interior do sistema de canais radiculares, cepas de *Enterococcus faecalis* apresentam frequentemente resistência a agentes antimicrobianos, como o hidróxido de cálcio ($\text{Ca}(\text{OH})_2$) e comumente encontrada nas falhas endodônticas, e, por isso, seus mecanismos de atuação são amplamente investigados (LIEBLICH, 2012; LIMA *et al.*, 2015; NACIF; ALVES, 2010; JAIN; MULAY; MULLANY, 2016; PANÁČEK, *et al.*, 2006).

A nanotecnologia vem despertar o interesse da comunidade científica quanto à criação de novos agentes terapêuticos que apresentem características melhoradas. O prefixo “nano” é originado do grego, significa anão, e se refere a um bilionésimo (10^{-9}) de medida, ou seja, em relação ao metro, um nanômetro representa a bilionésima parte (10^{-9} m), as moléculas e os átomos estão enquadrados nessa mesma escala de tamanho (ABDI, 2010). Esse diminuto tamanho confere aos nanomateriais propriedades promissoras, por poderem ser combinados a outros materiais sem alterar as características destes. Na odontologia, tem contribuído para a expansão do desenvolvimento de materiais preventivos e curativos com propriedades melhoradas, nas variadas subáreas: odontologia restauradora, ortodontia, periodontia, endodontia e estomatologia (BAPAT *et al.*, 2018).

Entre as nanopartículas (NPs) mais comercializadas estão as NPs de prata (NPsAg), com uma ampla aplicação na medicina e odontologia, destacando-se especialmente por sua atividade antimicrobiana, o que permite utilizá-la como agente antimicrobiano e antisséptico, e por apresentarem uma alta reatividade que resulta em maior eficácia, possibilitando a redução de sua dose terapêutica e expressando

melhores resultados quando comparadas à prata em sua forma macroscópica (FERNANDES, 2014; NESRIN *et al.*, 2020; ŞUHANI *et al.*, 2018; TIAN *et al.*, 2007). Têm sido incorporadas a materiais odontológicos, como resina composta fotopolimerizável e produtos endodônticos, demonstrando uma efetiva ação antibacteriana (NEVES *et al.*, 2014; JADHAV *et al.*, 2016).

Apesar do surgimento da nanomedicina ter contribuído para o desenvolvimento de novas possibilidades diagnósticas e terapêuticas e o crescente investimento em nanomateriais movimentar o mercado mundial, as pesquisas ainda não atingiram um consenso sobre os mecanismos e grau de toxicidade, e o alargamento da síntese e uso de NPs pode acarretar efeitos prejudiciais aos organismos vivos e ao meio ambiente (LAPRESTA-FERNÁNDEZ; FERNÁNDEZ; BLASCO, 2012). A aplicação da biotecnologia destaca-se por dispor de métodos simplificados de produção, proporcionar uma redução significativa da toxicidade, aperfeiçoamento das propriedades, apresentar baixo custo, permitir a síntese de NPs em grande escala e a obtenção de nanomateriais com potente atividade antimicrobiana (MASHWANI *et al.*, 2015; SHARMA; YNGARD; LIN, 2009).

Própolis possui características físicas resinosas e uma composição química variável, coletada de variadas espécies vegetais e que sofre adição de secreções da abelha, classificada como opoterápico (ANVISA, 2011), e tem sido amplamente investigada para diversas aplicações na odontologia, por suas propriedades biológicas benéficas, mostrando-se como um agente antimicrobiano biocompatível contra microorganismos da cavidade oral, fator associado principalmente aos seus constituintes fenólicos e flavonoides (RIGHI *et al.*, 2011; MARTINS *et al.*, 2018; NAZERI, GHAIOUR; ABBASI, 2019). A própolis vermelha do estado de Alagoas, Nordeste do Brasil, é um produto com selo de certificação geográfica (denominação de origem) devido a sua composição diferenciada, atividades biológicas distintas e processo de produção padronizado com envolvimento de produtores e pesquisadores (ALMEIDA *et al.*, 2017).

Dado isso, este trabalho teve por objetivo avaliar se a utilização de extrato hidroalcoólico de própolis vermelha (EHPV) como agente redutor proporciona a potencialização da atividade biológica de NPs_{Ag} frente a *E. faecalis*, podendo assim, apresentar-se como um método alternativo ao desenvolvimento de um fármaco com propriedades biológicas melhoradas em comparação aos já existentes no mercado.

Dessa forma, pode contribuir para a redução dos casos de fracasso da terapia endodôntica relacionados à persistência bacteriana.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Alterações pulpares

A polpa é um tecido conjuntivo frouxo que pode sofrer agressão de natureza física, química ou biológica. A evolução das alterações pulpares está relacionada ao sistema de defesa imunológico do hospedeiro, frequência e intensidade do agente nocivo, possuindo o tecido pulpar uma grande possibilidade de reparo diante de processos inflamatórios, que está associada ao seu ativo metabolismo (COOPER; CHICCA; HOLDER; MILWARD, 2017). As doenças da polpa são classificadas em pulpite reversível e irreversível e necrose pulpar. Quando o agente nocivo não é removido pode ocorrer o desequilíbrio entre a resposta imune e inflamatória gerando um processo inflamatório irreversível, que se não tratado evoluirá para necrose (LEONARDI *et al.* 2011).

Processos cariosos, traumas e anomalias congênitas estão entre as principais causas das desordens pulpares, sendo a cárie a causa mais comum (FOUAD, 2017; SAOUD; RICUCCI; LIN; GAENGLER, 2016). Quando a cárie é o agente etiológico, as bactérias cariogênicas alcançam o tecido pulpar através dos túbulos dentinários, desencadeando respostas moleculares e celulares. Na tentativa de limitar a progressão do dano, os odontoblastos respondem com a formação de dentina terciária, à medida que a agressão progride ocorre a morte dos odontoblastos e a resposta é efetuada pelas células da polpa, a exemplo das células-tronco, dos fibroblastos, das células imunes e das células endoteliais, responsáveis pela ativação de padrões moleculares associados a patógenos. Quando os mecanismos de agressão se sobrepõem aos mecanismos de defesa, ocorre o desequilíbrio e a doença instala-se (COOPER; CHICCA; HOLDER; MILWARD, 2017; FOUAD, 2017).

A necrose pulpar é a perda de vitalidade tecidual, caracterizada pela ausência de vascularização e interrupção dos processos metabólicos tornando o sistema de canais radiculares um ambiente inacessível aos mecanismos de defesa do sistema imune inato e adaptativo. Dessa maneira, tem-se um ambiente propício para a proliferação de micro-organismos, que podem disseminar-se para os tecidos

perirradiculares dando início a processos infecciosos, como os abscessos e periodontites periapicais (LEONARDI *et al.* 2011; SAOUD; RICUCCI; LIN; GAENGLER, 2016).

Silva (2017) caracterizou proteínas presentes na polpa sadia, nas condições de inflamação reversível e irreversível e na necrose tecidual, indicando que no estado necrótico há uma redução do metabolismo, da atividade das vias energéticas e da morte celular programada em comparação ao estado normal e às condições inflamatórias, proteínas envolvidas na diferenciação das células nervosas e na remodelação tecidual não foram identificadas. Por outro lado, identificaram-se várias proteínas com função imunológica, com prevalência de imunoglobulinas. Essas proteínas remanescentes foram encontradas em diferentes espaços celulares, e considerando uma ordem decrescente, em maior número no citoplasma, no meio extracelular, no núcleo, na membrana plasmática, no retículo endoplasmático, nas mitocôndrias, nos ribossomos e 3% das proteínas em localização desconhecida.

2.1.1 Microbiota da infecção intracanal

A microbiota da infecção intracanal é composta por variados tipos de patógenos que formam um biofilme bacteriano, no qual pode haver predomínio das espécies que sofreram mutações, adquirindo características adaptativas vantajosas, tornando-se mais virulentas (SAMIEI *et al.*, 2016). Na infecção primária o biofilme é polimicrobiano com dominância das espécies anaeróbias estritas, mas também abrange *Lactobacillus* spp., espécies anaeróbias facultativas Gram-positivas de *Streptococcus* spp., cocos anaeróbios Gram-positivos, bacilos Gram-positivos anaeróbios estritos e facultativos e bacilos anaeróbios Gram-negativos. Já nas infecções persistentes há a predominância de micro-organismos resistentes aos agentes antimicrobianos, incluindo *E. faecalis*, que também podem ser identificados nas infecções primárias (JAIN; MULAY; MULLANY, 2016; SAMIEI *et al.*, 2016; ZHANG; DU; PENG, 2015). E, em comparação às infecções primárias, mesmo naquelas que não foram resolvidas, as denominadas infecções crônicas, *E. faecalis* são identificados numa maior prevalência nas persistentes, o que sugere sua capacidade de adaptação em ambientes críticos ao metabolismo bacteriano, como nos canais radiculares já obturados (SAMIEI *et al.*, 2016; ZHANG; DU; PENG, 2015; SIQUEIRA; LOPES, 2010).

A infecção persistente no interior dos canais radiculares é descrita como a principal causa das falhas naqueles dentes que receberam tratamento adequado, sendo necessária a utilização de potentes agentes antimicrobianos. Contudo, a resistência das bactérias a antimicrobianos convencionais tem se apresentado como um empecilho à resolução das infecções endodônticas, têm sido descrita cepas de *E. faecalis* resistentes a múltiplos agentes antimicrobianos, a exemplo da doxiciclina (EBRAHIMZADEH *et al.*, 2020).

E. faecalis é uma bactéria Gram-positiva capaz de formar biofilme, aspecto que se mostra como um importante fator de virulência, e sua cepa ATCC 29212 possui genes de resistência a antimicrobianos, incluindo estreptomicina, pela expressão do gene *aadK*, que produz a proteína aminoglicosídeo 6-adenililtransferase; glicopeptídeos, como a vancomicina, pelo gene *vanYB*, codificando a proteína D-alanil-D-alanina carboxipeptidase) e tetraciclinas, como a doxiciclina e minociclina. Estas segundo Andrade (2014) apresentam um amplo espectro de ação, e a atuação de *E. faecalis* está associada a ativação do efluxo da tetraciclina, diminuindo a concentração do fármaco na célula, associada ao gene *tetA* (SENEVIRATNE *et al.*, 2017; ATCC, 2020).

Anderson *et al.* (2016) indicaram que cepas orais de *E. faecalis* apresentaram alta capacidade de transferência horizontal de genes, o que contribui para sua virulência, e através da técnica de Reação em Cadeia de Polimerase (RCP) identificaram genes codificadores de gelatinase, substância de agregação, citolisina e proteína de superfície enterocócica, que atuam favorecendo sua sobrevivência e patogenicidade. Também demonstraram que *E. faecalis* encontrados na cavidade bucal possuíam genes de resistência a antibióticos, como a eritromicina, e que 10 dos 28 isolados endodônticos apresentaram resistência à tetraciclina e 1 à linezolida. As cepas foram classificadas como resistentes de acordo com os resultados de concentração inibitória mínima (CIM), considerando-se variados fármacos. Sobre a capacidade de formar biofilme, 73,7% dos isolados endodônticos mostraram essa capacidade, percentual maior ao atribuído a *E. faecalis* isolados de alimentos, dos quais 60% não apresentaram habilidade de formar biofilme. A superior capacidade de formar e proporcionar uma estrutura mais consistente de biofilme foi atribuída à maior prevalência da substância de agregação presente nas cepas clínicas. Também descreveram que o ambiente oral dispõe de características que favorecem a formação e organização de um

biofilme persistente, devido à presença de proteínas, como as adesinas, e a atuação de outros microorganismos, sendo formado um biofilme polimicrobiano.

Seneviratne *et al.* (2017) isolaram dezoito cepas clínicas de *E. faecalis* obtidas de pacientes com falha no tratamento endodôntico, demonstrando que todas os isolados foram capazes de formar biofilme. Ademais, todos os biofilmes formados se mostraram resistentes à vancomicina, através da análise da CIM, independentemente de serem classificados como fortes ou frágeis, e os biofilmes fortes apresentaram uma maior quantidade de células viáveis.

No estudo transcriptômico, através da técnica RNA-Seq, que é uma abordagem de sequenciamento de RNA, Seneviratne *et al.* (2017) indicaram genes putativos associados ao desenvolvimento do biofilme e resistência à vancomicina. Foram encontrados 163 genes com distintas regulações nas bactérias planctônicas e organizadas em biofilme, mostrando diferenças nas regulações positivas e negativas dos genes, como na codificação de protease sintase, proteínas do choque frio, proteínas da família ArsR, endonuclease III, fatores de iniciação da tradução, fatores de alongamento da tradução e fatores de terminação da transcrição. Em relação aos biofilmes sem tratamento e aos tratados com vancomicina, estes exibiram alterações mais significativas quanto à regulação positiva na codificação de *ATP-binding cassette* (transportadores ABC) e proteínas de ligação à penicilina.

No interior dos canais radiculares *E. faecalis* produzem ácidos que promovem a desmineralização da dentina, que ocorre pela dissolução dos seus componentes inorgânicos, principalmente dos íons cálcio e fosfato. Cepeda-Pérez *et al.* (2016) identificaram diferenças significativas na intensidade da banda Raman referente aos íons fosfato e às ligações carbono-hidrogênio ($\text{PO}_4^{3-}/\text{C-H}$) nas dentinas de primeiros molares humanos tratados endodonticamente e naqueles não tratados, atribuídas à desmineralização tecidual que afetou os dentes que necessitaram de tratamento devido a um prévio processo infeccioso.

2.1.2 Tratamento da infecção intracanal

A infecção no sistema de canais radiculares é mediada por biofilme bacteriano e o tratamento consiste na sua eliminação, nesses casos, o tratamento endodôntico radical é empregado. E, como medicamento intracanal produtos à base de Ca(OH)_2

se destacam por suas excelentes propriedades biológicas, com atividade antimicrobiana, anti-inflamatória e capacidade de induzir a formação de tecido mineralizado, aspectos favoráveis à reabilitação dental, sendo utilizado desde 1947 (ESTRELA *et al.*, 1995; DIAS *et al.*, 1988; ATHANASSIADIS; WALSH, 2017). Essas propriedades possibilitam o emprego do Ca(OH)_2 no tratamento endodôntico de dentes com necrose pulpar e rizogênese incompleta, que são considerados casos de difícil tratamento, devido a fatores relacionados à anatomia dental e à ausência de vitalidade da polpa, o que favorece o desenvolvimento do processo inflamatório nos tecidos perirradiculares (TOLEDO *et al.* 2010). Como forma de potencializar a atividade antimicrobiana, determinados agentes são associados ao Ca(OH)_2 , a exemplo do paramonoclorofenol canforado, iodofórmio e óleo de silicone (SIQUEIRA; LOPES, 2010; AFKHAMI *et al.*, 2015; TOLEDO *et al.*, 2010).

Na odontologia, é preconizado medicamento intracanal composto por Ca(OH)_2 entre as sessões do tratamento em dentes com infecção intracanal associada ou não à lesão perirradicular, posto que o estabelecimento do processo infeccioso demanda tempo e, por isso, não se restringe apenas ao conduto radicular principal, mas ao sistema de canais. Assim, sua aplicação tem a finalidade de eliminar os micro-organismos que resistiram ao preparo químico-mecânico do sistema de canais, além de evitar novas contaminações até que seja realizada sua obturação definitiva. Contudo, tem sido descrita uma alta resistência de *E. faecalis* ao Ca(OH)_2 , sendo apontado como o micro-organismo mais resistente (NACIF; ALVES, 2010), e devido a sua forte contribuição para as infecções intracanaís é utilizado como padrão nos estudos em endodontia (LEONARDI *et al.* 2011; ESTRELA *et al.*, 1995; SAOUD; RICUCCI; LIN; GAENGLER, 2016). Diferente dos antimicrobianos convencionais, como as penicilinas, a atividade antimicrobiana do Ca(OH)_2 ocorre devido ao seu elevado pH, pois sua dissociação gera íons cálcio e hidroxila. Os altos níveis de liberação dos íons hidroxila contribuem fortemente para que o pH do Ca(OH)_2 possa chegar a um valor de 12,6, e esses íons são capazes de interferir na atividade enzimática e causar danos à membrana citoplasmática bacteriana, inviabilizando o metabolismo bacteriano, e, conseqüentemente, o crescimento e a divisão celular. Somado a isso, os íons cálcio atuam na remineralização do tecido dental, e vale ressaltar que a eficácia do material também depende da velocidade de liberação desses íons, do grau de permeabilidade e de calcificação da dentina (ESTRELA *et al.*,

1995). O veículo utilizado influencia diretamente as propriedades físicas e químicas do $\text{Ca}(\text{OH})_2$, inclusive o grau de dissociação dos íons. Os aquosos, como a água destilada e solução salina, embora, sejam amplamente utilizados, ficam ativos por um menor período em comparação aos viscosos, como o propilenoglicol, a glicerina e o polietilenoglicol (PEG), pois estes atuam como reservatório, proporcionando a liberação de íons de forma gradual, assim, o medicamento permanece ativo por mais tempo, outra vantagem destes é sua melhor capacidade solvente e seu pH alcalino. Assim, esta associação disponibiliza um medicamento com maior eficácia e biocompatibilidade (ATHANASSIADIS; WALSH, 2017).

Koc e Fabbro (2020) analisaram o índice de sucesso do tratamento endodôntico regenerativo em dentes com polpa necrosada, que é o tipo de tratamento realizado em dentes com desenvolvimento radicular incompleto, aqueles que apresentam ápice aberto e camada fina de dentina, considerando diferentes fatores etiológicos, cárie, trauma e *dens invaginatus*, não encontrando diferenças significativas nesses índices para cada variante, indicando, assim, que o fator etiológico da necrose não tem influência nas falhas do tratamento.

E. faecalis tem uma elevada prevalência nas infecções resistentes ao tratamento em comparação às infecções primárias, e pode contribuir para o início do desenvolvimento de desordens periapicais (ZHANG; DU; PENG, 2015).

Isso tem sido atribuído a determinadas características desse micro-organismo, merecem destaque sua resistência aos antimicrobianos, como o $\text{Ca}(\text{OH})_2$, que é a substância mais utilizada como medicamento intracanal, porém não exerce a mesma eficácia antimicrobiana sobre os diferentes patógenos presentes no sistema de canais radiculares, devido às mutações genéticas das cepas e seus fatores de virulência, a exemplo da capacidade de formar biofilme no interior dos túbulos dentinários, de suportar condições de estresse ambiental e privação nutricional e de resistir a pH altamente alcalino, Stuart *et al.* (2006) elencaram diversos fatores relacionados a persistência de *E. faecalis* no sistema de canais (Quadro 1). Assim, a terapêutica precisa ter efetividade sobre os micro-organismos persistentes e ser capaz de compensar prejuízos causados por seus fatores de virulência (LIMA *et al.*, 2015; NACIF; ALVES, 2010; JAIN; MULAY; MULLANY, 2016; KOC; FABBRO, 2020; STUART *et al.*, 2006; ALABDULMOHSEN; SAAD, 2017; PANÁČEK, *et al.*, 2006).

Quadro 1- Fatores associados à persistência de *Enterococcus faecalis* no sistema de canais radiculares.

- Suporta longos períodos de privação nutricional
- Utiliza soro que se origina do ligamento periodontal como fonte nutricional
- Penetra eficazmente nos túbulos dentinários
- Capaz de alterar as respostas do hospedeiro
- Possui enzimas líticas, citolisina e ácido lipoteicoico
- Suprime a ação dos linfócitos
- Resiste a medicamentos intracanáis
- Mantém o equilíbrio do pH
- Compete com outras células
- Aptidão em formar biofilme

Fonte: Stuart *et al.*, 2006.

A busca de outras substâncias, a fim de minimizar o insucesso do tratamento endodôntico associado à presença de bactérias remanescentes no sistema de canais radiculares, apresenta-se como um desafio para o setor de materiais odontológicos. Diante disso, os agentes antimicrobianos contendo prata na forma nanoparticulada destacam-se, e os íons de prata são efetivos sobre mais de 650 organismos patogênicos eucariontes e procariontes, incluindo-se espécies bacterianas e fúngicas presentes na cavidade bucal, como *E. faecalis*, *S. mutans* e *Candida albicans* (SOUZA; RODRIGUES; SILVA; GUERRA, 2013; ALLAHVERDIYEV *et al.*, 2011; KRISHNAN; ARUMUGAM; VASAVIAH, 2015; KISCHKEL *et al.* 2020).

A prata é um elemento químico, classificada como metal de transição, de cor brilhante e utilizada desde os tempos da Pré-História, os alquimistas a consideravam como o elemento mais semelhante ao ouro, atribuindo-lhe a designação de “metal quase perfeito”. Há séculos é empregada com fins antimicrobianos, mas teve seu uso reduzido com a criação dos antibióticos, mas com o aumento do desenvolvimento de mecanismos de resistência bacteriana aos antibióticos e por suas notáveis propriedades físico-químicas seu uso tem sido ampliado. Na indústria farmacêutica, tem sido combinada a substâncias antimicrobianas ativas, como a sulfadiazina e o norfloxacino, com o intuito de potencializar sua atividade, e no Brasil, o setor de

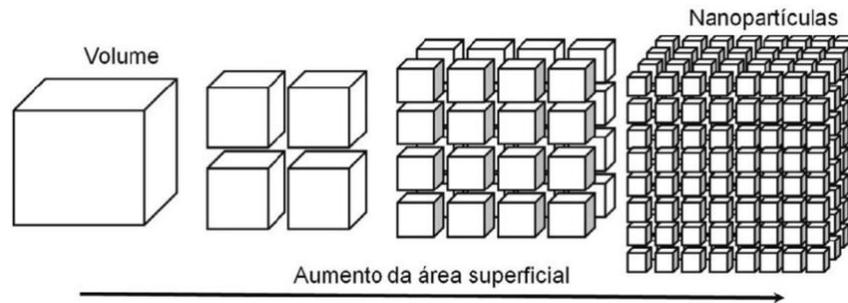
materiais odontológicos está entre os segmentos que mais a utilizam (SOUZA; RODRIGUES; SILVA; GUERRA, 2013; SALOMONI *et al.*, 2017).

2.2 Nanociência

As nanoestruturas estão presentes de variadas formas na natureza, os dentes são exemplos, formados por um sistema nanoestruturado que lhes conferem resistência mecânica e impede a perda de sua integridade física quando exposto a diferentes forças, como a da mastigação. No entanto, o termo nanotecnologia foi utilizado pela primeira vez somente em 1957, por Norio Taniguchi, e abrangia máquinas que tivessem níveis de tolerância inferiores a 1000 nm (ABDI, 2010). E, em 2010, surgiu uma nova definição, quando a Comissão Europeia (2011) descreveu que um material enquadrado como nanomaterial atende ao menos um dos seguintes critérios: consiste em partículas com uma ou mais dimensões externas na faixa de tamanhos de 1 a 100 nm para mais de 1% de sua distribuição numérica, possui estruturas internas ou de superfície em uma ou mais dimensões na faixa de tamanho de 1 a 100 nm e uma área superficial específica em volume superior a $60 \text{ m}^2/\text{cm}^3$, excluindo materiais constituídos por partículas de dimensão inferior a 1 nm.

A nanociência destaca-se por evidenciar que um mesmo material em variados tamanhos, possui diferentes características físicas, químicas e biológicas. Os nanomateriais têm propriedades únicas quando comparados às partículas macroscópicas, apresentando uma atividade aumentada, associada principalmente a sua elevada área superficial (Figura 1), o que proporciona materiais com especificidades promissoras (BAPAT *et al.*, 2018; RÓZ; LEITE.; FERREIRA; JÚNIOR, 2015).

Figura 1- Representação do aumento da área superficial relacionado à redução do tamanho das partículas.



Fonte: Róz; Leite; Ferreira; Júnior, 2015.

Isso tem contribuído para a aplicação da engenharia de nanomateriais em diversas áreas, como no mercado industrial, aplicações no tratamento da água, na tecnologia ambiental e na fabricação de produtos agrícolas, além da área da saúde com fins preventivos, diagnósticos e terapêuticos (ABDI, 2010; OGUNSONA *et al.*, 2020). Na medicina, seu emprego tem apresentado bons resultados, mostrando uma expressiva diminuição da sobrevivência e propagação de micro-organismos, com uma vasta aplicação, utilizadas em procedimentos cirúrgicos, incorporadas a materiais descartáveis, aparatos médicos e contribuindo também com a elaboração de novas formulações químicas (OGUNSONA *et al.*, 2020). E, além de sua atividade antimicrobiana, ressalta-se sua utilização como veículos de administração de fármacos, agentes de contraste, marcadores na sinalização celular e como agentes antitumorais na quimioterapia antilástica (KIM; RUTCKA; CHAN, 2010).

As NPs carregadas com substâncias antimicrobianas, como a prata, são apontadas como potentes agentes capazes de atuar na desorganização do biofilme e desempenhar ação contra bactérias multirresistentes, apresentando diferentes mecanismos de ação quando comparadas aos antibióticos (OGUNSONA *et al.*, 2020). Além disso, seu pequeno tamanho lhes conferem uma maior superfície de contato que permite sua maior interação com os micro-organismos, bem como viabiliza seu alcance a espaços protegidos por barreiras de tamanho nanométrico, as quais partículas macroscópicas não poderiam atravessar. Por essas características, que lhes proporcionam maior eficácia em comparação aos agentes antimicrobianos formados por macromoléculas, as NPs são empregadas na terapêutica de doenças infecciosas de difícil resolução, contribuindo para o controle da proliferação de micro-organismos que desenvolvem mecanismos de sobrevivência. Distinguem-se as NPs

sintetizadas a partir de metais, como a prata, o ouro, o cobre, o óxido de zinco e o alumínio, que também possuem uma boa relação custo-benefício (OGUNSONA *et al.*, 2020; KIM; RUTCKA; CHAN, 2010).

2.2.1 Nanopartículas de prata

As NPs de prata podem ser sintetizadas através do método químico, físico ou biológico (RAI, 2013). Em comparação à rota física, a possibilidade de planejar NPs com características variáveis, as diversas metodologias e a maior simplicidade de síntese, bem como a obtenção de NPs mais homogêneas são algumas das vantagens da utilização da síntese química, que permite um melhor controle do tamanho das NPs, além de facilitar a associação dos agentes estabilizantes às NPs. Na síntese química, o citrato de sódio tem sido indicado como adequado agente redutor e estabilizante (ŠILEIKAITĖ *et al.*, 2016; RODRIGUES *et al.*, 2019), além de que Nagaoka *et al.* (2010) demonstraram seu efeito antimicrobiano frente a *Fusobacterium nucleatum*, *S. mutans* e *S. pneumoniae*.

Embora, ainda não haja um consenso na literatura quanto as bases do mecanismo antimicrobiano das NPs de prata, alguns autores têm atribuído sua ação às lesões celulares associadas à liberação de espécies reativas de oxigênio (EROs) devido à interação com a prata e outros associaram à capacidade da estrutura física das NPs causar dano celular (BRAYDICH-STOLLE; HUSSAIN; SCHLAGER; HOFMANN, 2005; ASHARANI; MUN; HANDE; VALIYAVEETIL, 2009). Estudos também descrevem que NPs de prata penetram a membrana plasmática e interagem com ácidos nucleicos e constituintes citoplasmáticos, alterando a permeabilidade da membrana e inibindo enzimas da cadeia respiratória, este último efeito provoca o acúmulo de glicose intracelular e extracelular em comparação a células não tratadas com NPs de prata. Assim, a alteração do metabolismo pode culminar com a morte celular (LOPEZ-ABARRATEGUI *et al.*, 2015; KIM *et al.*, 2009).

Dentre os variados benefícios, as propriedades antimicrobianas das NPs de prata são amplamente investigadas, bem como sua atuação no controle da inflamação, com a redução da síntese de citocinas inflamatórias, que auxilia no processo de cicatrização (ŞUHANI *et al.*, 2018). Na endodontia, vem se mostrando como uma alternativa antimicrobiana moderna e com propriedades físico-químicas melhoradas, apresentando-se como uma alternativa inovadora capaz de transformar

a prática clínica, sendo o nanomaterial mais estudado na endodontia, devido ao seu potencial antimicrobiano (SAMIEI *et al.*, 2016). No Quadro 2, os principais materiais odontológicos contendo NPs de prata são indicados.

Quadro 2- Produtos contendo nanopartículas de prata no setor odontológico.

Produto	Efeito proposto	Local	Nome comercial
Dentifrício	Atividade antimicrobiana.	Coreia	Nano-silver Toothpaste
Dentifrício	Redução da placa dentária, prevenção da cárie, diminuição do mau hálito e promoção o clareamento dental.	Coreia	Nanoseal Toothpaste
Dentifrício	Prevenir gengivite, periodontite. Ação contra vírus, bacilos e colitis	Coreia	NANOVER™ Toothpaste
Dentifrício	Clareamento, prevenção de cárie, antiplaca e redução do mau hálito.	Coreia	Oragan Nano Silver Toothpaste
Dentifrício	Prevenção de periodontite, halitose e outras doenças, clareamento, proteção aos tecidos orais e efetividade contra bactérias e vírus.	China	Quan Zhou Hu Zheng Nano Technology Co., Ltd.® Nano-silver Toothpaste
Dentifrício com phytoncide	Atividade antimicrobiana e potencialização do efeito do phytoncides.	Coreia	Ag Nano Phytoncide Toothpaste
Dentifrício em gel	Proteção antimicrobiana dos tecidos dentais e gengivais.	Coreia	Toothpaste Gel
Escova dental	Eliminar 99,9% das bactérias da escova dental.	Estados Unidos	Antibacterial Powered Toothbrush
Escova dental	Associar o efeito mecânico da remoção do biofilme à atividade antimicrobiana.	Coreia	Lucky Silver Nano Toothbrush
Escova dental	Eliminar 99,9% das bactérias da escova dental.	Estados Unidos	Mouth Watchers Nano Silver Toothbrush
Escova dental	Ação antimicrobiana.	Taiwan	Nano Toothbrush
Escova dental	Atividade antimicrobiana.	Coreia	Nano-silver Toothbrush

Escova dental	Atividade antibacteriana contínua.	Canadá	Norwex's Silver Care Plus Self Sanitizing Toothbrush
Escova dental para crianças	Proteção antimicrobiana.	Coreia	Nano Finger Teeth Brush
Gel dental	Potente atividade antimicrobiana.	República Checa	Dentasil Gel

Fonte: Wilson Center, 2019.

2.2.2. Propriedades das nanopartículas de prata

2.2.2.1 Ressonância plasmônica de superfície (RPS)

É um fenômeno observado nas NPs metálicas, ocorre devido à oscilação dos elétrons livres na superfície da banda de condução em resposta ao campo elétrico da luz incidente. Esses elétrons são capazes de absorver os fótons de luz e gerar a ressonância dos plasmons de superfície (ZHANG e NOGUEZ, 2008).

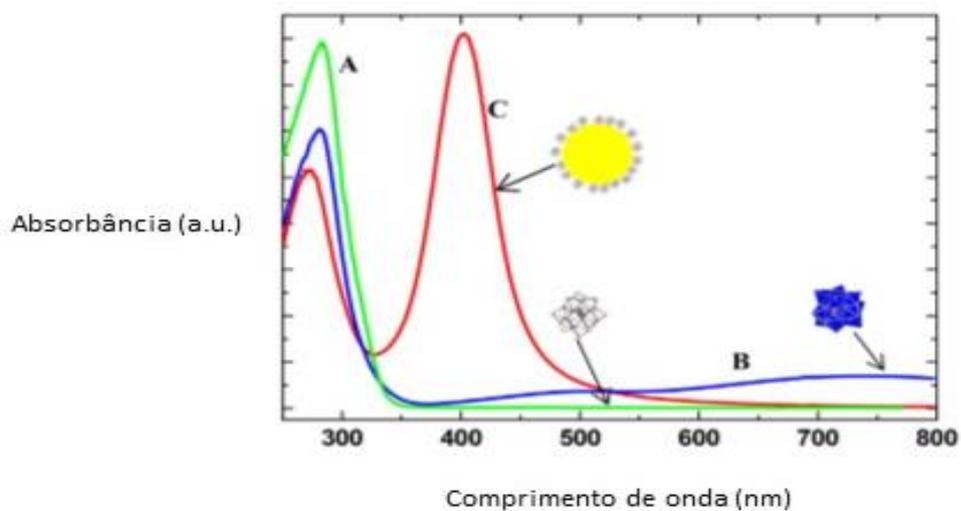
A formação de NPs de prata exhibe respostas espectrais características, com absorção de luz numa determinada faixa de comprimento de onda, atribuída às bandas de RPS. Assim, NPs de prata podem ser investigadas a partir das regiões visível e ultravioleta do espectro, devido às mudanças nas bandas de RPS da prata, que lhes conferem características ópticas bem definidas. Ainda, a prata destaca-se por apresentar uma intensa RPS, o que permite uma alta sensibilidade à espectroscopia ultravioleta e visível (UV-Vis), e na formação de NPs essa ressonância exhibe um valor de 400 nm, mas que pode variar entre 400 a 500 nm (NETO; RIBEIRO; ZUCOLOTTO, 2008; PAIVA; THIRÉ; SOARES, 2012).

Além disso, a frequência e a largura das bandas de RPS estão relacionadas à estrutura das NPs, como tamanho, forma e arranjo das moléculas, e à quantidade de partículas presentes na solução coloidal, por exemplo, a maior largura e intensidade das bandas de RPS indicam uma maior quantidade e tamanho das NPs. O conhecimento desses aspectos possibilita o planejamento de NPs com características específicas de acordo com a aplicação pretendida (SANTOS *et al.*, 2016; PAIVA;

THIRÉ; SOARES, 2012; NETO; RIBEIRO; ZUCOLOTTI, 2008; ZHANG e NOGUEZ, 2008; PARMAR; KAPIL; SACHAR; SHARMA, 2020).

Exemplificando isso, Panáček *et al.* (2006) indicaram que NPs de prata de tamanho entre 25 a 50 nm, à análise por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET), demonstraram uma absorbância entre 390 a 420 nm por espectrofotometria UV-Vis. Por sua vez, Berbec, Zoładek, Kulesza e Palys (2019) sintetizaram NPs de prata com banda de RPS formada em um comprimento de onda próximo de 400 nm (Curva C), apontando que tal valor é característico de estruturas esféricas, já para as soluções utilizadas como agentes estabilizantes das NPs foi indicada a presença de estrutura correspondente à estrutura de Keggin heteropoliânion, formato indicado nas curvas A e B (Figura 2).

Figura 2- Comprimentos de onda relacionados ao formato do material.



Fonte: Adaptado de Berbec; Zoładek; Kulesza; Palys, 2019.

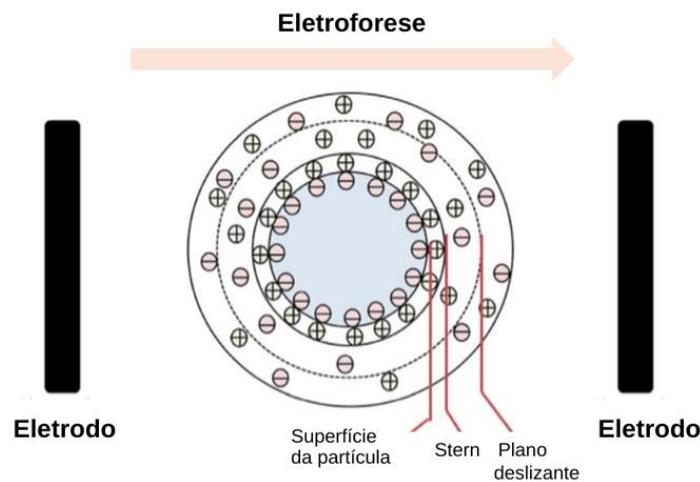
2.2.2.2 Potencial zeta

O potencial zeta ou potencial de superfície é medido por um experimento de eletroforese, a partir da mobilidade eletroforética, e com a aplicação da Laser Doppler Velocimetria calcula a medida da direção e velocidade do movimento de uma partícula em um campo elétrico bem definido. Em suspensão cada NP é circundada por uma dupla camada elétrica, que possui uma região interna, denominada Stern, a qual os

íons estão unidos firmemente, e uma região externa, onde as interações são consideradas fracas. Nesta última, os íons estão dentro de uma área envolta por um limite imaginário, conhecido como plano hidrodinâmico de cisalhamento, quando ocorre o movimento de uma NP os íons acompanham o movimento, sem, no entanto, ultrapassar esse limite. O potencial zeta indica a quantidade de carga presente nesse plano, e pode ser definido como a quantidade de energia necessária para deslocar uma carga positiva do infinito para a superfície sem o auxílio de uma força aceleradora quando da aplicação de um campo elétrico externo (Figura 3) (MALVERN, 2004; BHATTACHARJEE, 2016).

Em relação ao potencial zeta, é indicada a estabilidade e a resistência à aglomeração entre as partículas na suspensão quando esse é maior que ± 30 mV, essas propriedades são melhores quanto maior o valor do potencial zeta em módulo (NETO; RIBEIRO; ZUCOLOTTI, 2008; ALBERNAZ, 2014; PARMAR; KAPIL; SACHAR; SHARMA, 2020).

Figura 3- Representação da mobilidade eletroforética das partículas em suspensão.



Fonte: Adaptado de Bhattacharjee, 2016.

2.2.2.3 Tamanho

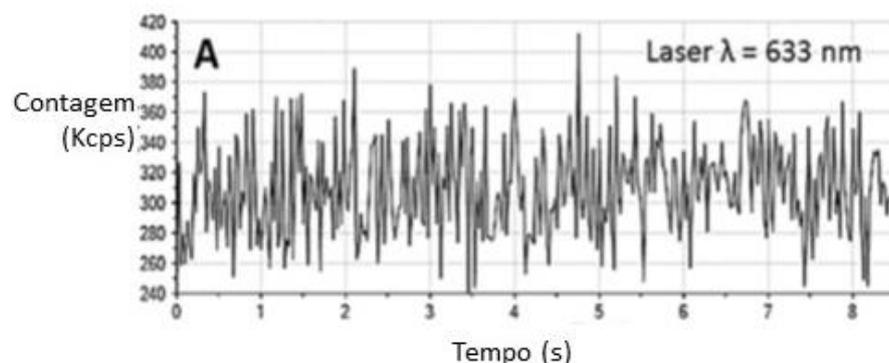
O tamanho das NPs está relacionado a sua atividade e aos seus efeitos citotóxicos. Quanto menor seu tamanho maior a reatividade química, assim, para as

NPs de prata é observado um maior potencial antimicrobiano, mas também maior genotoxicidade (ABDI, 2010; PASCHOALINO; MARCONE; JARDIM, 2010). Choi *et al.* (2008) sustentam essa questão referindo que NPs menores que 10 nm atravessam mais facilmente as membranas celulares, e, devido ao acúmulo intracelular podem interferir nas funções celulares. Isso sugere que quanto menor o diâmetro das NPs menores concentrações devem ser empregadas, objetivando-se a redução da toxicidade, como também é importante a utilização de métodos de síntese que proporcionem a redução da toxicidade, como a síntese biogênica.

O tamanho das NPs podem ser avaliados por várias técnicas como Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), MET e Espalhamento Dinâmico da Luz (EDL). Enquanto a técnica EDL mede o raio hidrodinâmico das partículas dispersas em suspensão, as técnicas de microscopia analisam as partículas desidratadas. Por isso, menores valores de diâmetro são obtidos à análise microscópica, visto que por EDL é feita a mensuração não apenas da parte metálica das NPs de prata, mas também se considera os componentes aderidos a sua superfície e a espessura da dupla camada elétrica, fornecendo um maior tamanho (BHATTACHARJEE, 2016).

Para a determinação do tamanho na técnica EDL sobre a suspensão coloidal incide um laser e a intensidade da luz espalhada é identificada através do EDL. Com o movimento das partículas são geradas interferências destrutivas e construtivas, por isso, observa-se a flutuação da luz espalhada em um determinado intervalo de tempo (Figura 4).

Figura 4- Variações na intensidade da luz pela movimentação das nanopartículas em suspensão.



Fonte: Adaptado de Bhattacharjee, 2016.

2.2.3 Nanopartículas biogênicas

As NPs metálicas podem ser biossintetizadas pelo método verde utilizando micro-organismos como agentes redutores e estabilizantes, a exemplo de bactérias, fungos, leveduras e algas, e pelo uso do extrato de plantas, tendo diferentes rotas de síntese (PATIL; KIM, 2018). Um dos grandes desafios da aplicação de NPs na indústria e biomedicina é a alta toxicidade daquelas sintetizadas por métodos físicos e químicos. E, dentre os fatores capazes de influenciar os efeitos citotóxicos das NPs estão a morfologia, a técnica de síntese, a metodologia dos experimentos, a pureza e o tamanho (ABDI, 2010).

Diante disso, a síntese biogênica vem revelar NPs efetivas produzidas a partir de recursos biológicos não tóxicos, degradáveis e ecológicos, contornando essa barreira. A síntese que utiliza plantas medicinais tem se apresentado como um processo simples e uma alternativa viável à redução da toxicidade das NPs (OGUNSONA *et al.*, 2020; BARUA *et al.*, 2013). A baixa citotoxicidade da biossíntese tem sido bem descrita na literatura, Kischkel *et al.* (2020) sintetizaram NPs de prata com própolis verde, de tamanho entre 2 e 40 nm à análise por MET, indicando a redução da citotoxicidade em comparação ao nitrato de prata (AgNO_3) pela avaliação da atividade mitocondrial através do ensaio colorimétrico do Brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio (MTT) utilizando células humanas tumorais e linhagem de células não tumorais de macaco verde africano, e ausência de citotoxicidade e mutagenicidade no emprego do teste de Ames (Ensaio de Mutagenicidade Salmonella/ microssoma). Por sua vez, Rónavári *et al.* (2018) avaliaram a viabilidade celular de células HaCaT de queratinócitos derivadas da pele humana tratadas com NPs de prata biologicamente sintetizadas. Ensaio de citotoxicidade demonstraram que as NPs de prata de tamanho médio de $4,1 \pm 1,44$ nm à análise por MET, em concentrações de 0-60 $\mu\text{g/mL}$, não reduziram a viabilidade de células HaCaT, já células submetidas ao agente terapêutico cisplatina a uma concentração de 5 $\mu\text{g/mL}$ revelaram uma perda significativa da atividade metabólica dos queratinócitos, mostrando uma maior citotoxicidade desse agente quando comparado às NPs.

Ademais, Chandra *et al.* (2020) realizaram busca na literatura referente a NPs metálicas sintetizadas a partir de plantas, indicando diversas propriedades

terapêuticas, dentre elas, atividade antimicrobiana e antioxidante. Barua *et al.* (2013) demonstraram eficácia contra espécies Gram-positivas e Gram-negativas semelhante à da gentamicina e ampicilina para NPs de prata obtidas através do método de síntese verde com extrato aquoso de folhas preparado a partir da espécie *Thuja occidentalis* sob condições ambiente, contudo, o mesmo extrato não exerceu ação antibacteriana isoladamente. Ainda, ressaltaram que NPs de prata quando sintetizadas considerando a importância de suas propriedades, como a estabilidade, são agentes úteis para aplicações biomédicas.

Dentre a diversidade de substâncias disponíveis, o emprego da própolis tem sido investigado especialmente por sua disponibilidade natural e relevância biológica, além da alta eficiência de seus extratos etanólicos e aquosos na síntese rápida de NPs de prata (ROY *et al.*, 2010). Coletada por abelhas, desempenha papel antimicrobiano nas colmeias, proporcionando um ambiente asséptico, tem sido largamente estudada no âmbito das ciências da saúde por sua atividade antibacteriana, antiprotozoária, antifúngica, antiviral, anti-inflamatória, antioxidante, antineoplásica e hepatoprotetora (ANJUM *et al.*, 2019). Dentre essas propriedades, vale destacar sua ampla atividade antimicrobiana, inclusive sobre bactérias da cavidade oral, como *Porphyromonas gingivalis*, *S. mutans*, *L. acidophilus* e *E. faecalis* (YOSHIMASU *et al.*, 2018; VELOZ; ALVEAR; SALAZAR, 2019; NAZERI; GHAIOUR; ABBASI, 2019).

2.3 Própolis

Registros históricos indicam o uso da própolis desde épocas remotas, na Grécia Antiga foi utilizada como agente antisséptico e antimicrobiano em infecções orais e cutâneas, e no Egito era empregada para embalsamento dos mortos em 3.000 a.C. A própolis possui variadas composições químicas, que estão relacionadas a fatores diversos como sua origem, vegetação de cada localidade, período de coleta e características genéticas das abelhas, sua atividade biológica também depende do tipo de extração e solvente utilizado e do tratamento da própolis coletada. De forma geral, são compostas por fenóis, flavonoides e derivados de terpeno, seus constituintes lhes proporcionam propriedades distintas, sendo caracterizada como uma substância com vários atributos benéficos à saúde. Assim, é inerente a

observação desses aspectos na investigação dos seus efeitos biológicos (ZABAIYOU *et al.*, 2017).

Segundo Franchin *et al.* (2018), no Brasil são encontrados ao menos treze tipos diferentes de própolis, classificadas conforme sua localização e características físico-químicas, que são constituídas por moléculas biologicamente ativas, como a apigenina, apresentando ação anti-inflamatória, antimicrobiana, antioxidante, antiviral e antitumoral (MAURYA *et al.*, 2014; FRANCHIN, 2016; BYLKA; MATLAWSKA; PILEWSKI, 2004; LEI-XIONG *et al.*, 2019; SANTOS; RODRIGUES, 2017). Por sua vez, Yoshimasu *et al.* (2018) investigaram a termoestabilidade do extrato etanólico derivado de própolis brasileira, demonstrando que sua atividade antimicrobiana não foi alterada quando submetido a uma temperatura de 100 °C durante 20 minutos.

Entre os tipos de classificação, a própolis vermelha representa o décimo terceiro tipo, sendo uma combinação de resina natural, e apresenta diversas propriedades terapêuticas como atividade antioxidante, anti-inflamatória, antimicrobiana, antiparasitária, metabólica e antineoplásica, além de substâncias não identificadas em outros tipos de própolis. Também pode ser encontrada em outros países, especialmente naqueles que possuem características geográficas similares às brasileiras, a exemplo de Cuba, Nigéria e México (FREITAS *et al.*, 2018; RUFATTO *et al.*, 2017).

Própolis verde, marrom e vermelha da região Nordeste do Brasil foram investigadas quanto à sua composição, sendo sua bioatividade correlacionada principalmente aos constituintes fenólicos e flavonoides. A própolis vermelha indicou um teor mais alto de fenóis totais, já a verde a de flavonoides (Figura 5). A própolis vermelha também revelou melhor atividade antioxidante, com redução de 90,72% do radical livre 2,2- difenil-1-picril-hidrazil (DPPH). Os quatro compostos encontrados em maior concentração na própolis vermelha foram a luteolina, a naringenina, a pinocembrina e o Kaempferol (ANDRADE *et al.*, 2017), atividade anti-inflamatória, antioxidante e antimicrobiana são atribuídas a esses compostos (CALDERÓN-MONTAÑO *et al.*, 2011; SADEGHI; AKABERI; VALIZADEH, 2014; MAHENDRAN; RAHMAN, 2020). O vestitol, um isoflavonoide com um importante potencial anti-inflamatório, também foi detectado na própolis vermelha brasileira, seu mecanismo de ação consiste na diminuição da migração de neutrófilos nos processos inflamatórios,

em razão do bloqueio do influxo de cálcio e da inibição ou redução da liberação de determinadas quimiocinas, como a interleucina-8 (FRANCHIN *et al.*, 2016).

Figura 5- Teor total de compostos fenólicos e flavonoides nas própolis marrom, verde e vermelha (média \pm desvio padrão; n = 9).

Própolis	Compostos fenólicos totais (mg de ácido gálico/g de própolis)	Conteúdo de flavonoides totais (mg de quercetina/g de própolis)
Marron	55,74 \pm 0,48	30,89 \pm 0,20
Verde	90,55 \pm 1,52	59,45 \pm 0,82
Vermelha	91,32 \pm 0,49	31,48 \pm 0,56

Fonte: Andrade *et al.*, 2017.

Santos *et al.* (2019) identificaram 14 compostos no extrato de própolis vermelha encontrada no estado de Alagoas e suas frações, no Nordeste brasileiro, que foram associados ao tratamento do câncer de colón, entre esses compostos a formononetina, que é considerada o principal marcador químico da própolis vermelha. A formononetina é um isoflavonoide de atividade antioxidante semelhante à atribuída às vitaminas A e E, além de possuir atividade antimicrobiana, anti-inflamatória e antinociceptiva (MORAES, 2009; OLIVEIRA, 2016; BUENO-SILVA *et al.*, 2017; LIMA *et al.*, 2015). Almeida *et al.* (2019) investigaram os benefícios da combinação de própolis vermelha de Alagoas a um filtro solar com filtro UVA-UVB 5%, obtendo um produto com características de proteção melhoradas, apresentando um aumento relativo do Fator de Proteção Solar (FPS) e ação antioxidante, esta última tem sido atribuída principalmente aos compostos fenólicos presentes na própolis (ANDRADE *et al.*, 2017).

Quanto à atividade antimicrobiana, Rufatto *et al.* (2018) indicaram a ação bacteriostática de compostos presentes em própolis vermelha originada do estado de Alagoas sobre *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*. Por sua vez, Vasconcelos *et al.* (2014) indicaram que própolis vermelha brasileira possui melhor atividade contra patógenos orais quando

comparada à própolis verde brasileira. Righi *et al.* (2011) também demonstraram que a própolis vermelha exerce função antimicrobiana sobre *E. faecalis*.

Além de desempenhar os efeitos já mencionados, sua capacidade remineralizante tem despertado o interesse de novos estudos. Gargouri *et al.* (2020) associaram xilitol à própolis marrom da Tunísia demonstrando atividade remineralizante, com aumento significativo dos níveis de cálcio e fosfato, da microdureza e diminuição da rugosidade da dentina nos grupos tratados com própolis em relação aos não tratados. Martins *et al.* (2018) encontraram uma menor taxa de desmineralização do esmalte dental para os elementos dentais submetidos a tratamento com extrato hidroalcolólico de própolis vermelha, originária do estado da Paraíba, na região Nordeste do Brasil, no qual a luteolina foi o flavonoide identificado em maior proporção, estando essa redução da desmineralização correlacionada à atividade bactericida sobre *S. mutans*, resultando na redução da colonização por esses patógenos e menor produção de ácidos que provocam a perda mineral. Essa atuação na redução da desmineralização é de grande valia na reabilitação da estrutura dentária, resultando no seu fortalecimento e pode contribuir para a diminuição da frequência de fraturas dentais e na manutenção do dente, reduzindo, dessa forma, os índices de extração do elemento dental (BARAS *et al.*, 2019).

Para uso em odontologia, a própolis pode acarretar manchamento dentinário quando utilizada em concentrações de 2%, segundo Silva e Lewgoy (2012), que sugeriram a realização de estudos com concentrações mais baixas de própolis. Nesse contexto, Almeida (2014) demonstrou que própolis vermelha brasileira nas concentrações de 0,3% e 0,6% pode ser utilizada em dentina sem comprometimento da estética.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Biossintetizar nanopartículas de prata com própolis vermelha de Alagoas (NPsAg-PV) para investigação do efeito antibacteriano sobre *E. faecalis*.

3.2 Objetivos específicos

- Produzir EHPV para a síntese de NPsAg-PV;
- Caracterizar NPsAg-PV através de diferentes metodologias;

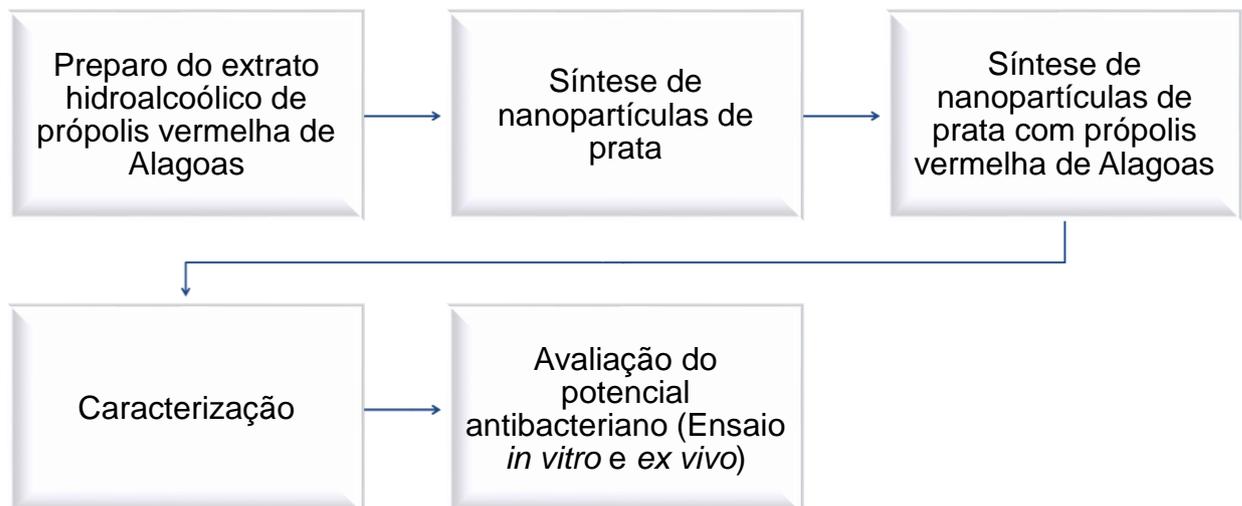
- Comparar a atividade antimicrobiana entre Ca(OH)_2 ; EHPV; NPsAg, sintetizadas pelo método químico; NPsAg+EHPV, NPsAg-PV e suas associações com Ca(OH)_2 sobre *E. faecalis*.

4 METODOLOGIA

4.1 Delineamento do estudo

Este estudo apresenta uma abordagem descritiva, experimental e laboratorial, *in vitro* e *ex vivo*, que consistiu nos estágios de preparo do EHPV, síntese de NPs, caracterização por diferentes metodologias dos grupos experimentais e avaliação do potencial antibacteriano de variados compostos sobre *E. faecalis*, a sequência das etapas é representada em organograma abaixo.

Figura 6- Organograma dos experimentos realizados.



Fonte: Própria autora, 2021.

4.2 Materiais

Na síntese das NPs foram empregados os seguintes produtos: nitrato de prata (AgNO_3) P.A. (Dinâmica, Brasil), citrato de sódio tribásico (Dinâmica, Brasil), hidróxido de sódio- NaOH- (Vetec, Brasil). Como solventes utilizou-se água deionizada (Nalgon, Brasil) e álcool etílico absoluto (Química moderna, Brasil). No preparo dos grupos experimentais e na avaliação antimicrobiana, além das NPs: Ca(OH)_2 pró-análise (P.A.) (Biodinâmica, Brasil), EHPV, PEG 400 (Vetec, Brasil), *Brain Heart Infusion*- BHI- (Kasvi, Espanha), ágar *Mueller Hinton*- AMH- (Kasvi, Espanha), meio *Mueller Hinton*-MH- (Kasvi, Itália) solução salina - 0,9% de NaCl - (Sigma-Aldrich, Alemanha), resazurina (Sigma-Aldrich, EUA), broca Peeso número 1, 2 e 3 (Dentsply Maillefer, Brasil), hipoclorito de sódio 5,25%- NaOCl- (Fórmula, Brasil), ácido etilenodiamino tetra-acético 17%- EDTA- (Biodinâmica, Brasil), cera utilidade (Clássico, Brasil), esmalte de unhas vermelho (Colorama, Brasil), lima endodôntica número 100 (Injecta, Brasil), cones de papel absorvente número 70 (Tanari, Brasil), CHROMagar Orientation (BD, Inglaterra), cristal de violeta, solução de lugol e fucsina (Sigma-Aldrich, Alemanha), peróxido de hidrogênio (Laborclin, Brasil), além dos materiais anteriormente citados.

A própolis vermelha foi obtida em março de 2019 do apiário Primavera, localizado na cidade de Marechal Deodoro, Alagoas, na região Nordeste do Brasil, com as seguintes coordenadas geográficas de latitude sul, latitude oeste e altura, respectivamente: $9^\circ 42.258'$, $35^\circ 54.391'$ e 35,5 metros. O acesso e transporte da própolis foram previamente autorizados pelos órgãos reguladores para o controle do Patrimônio Genético Brasileiro e Conservação da Biodiversidade (protocolo SISGEN-A88DA2B).

4.3 Preparo do extrato hidroalcoólico de própolis vermelha de Alagoas

O EHPV foi obtido segundo Mendonça *et al.* (2015), a 50 g de própolis vermelha macerada e protegida da luz adicionou-se 200 mL de álcool etílico 80% e após um período de 48 horas em repouso, o sobrenadante foi filtrado e armazenado no escuro, esse processo foi repetido por 3 vezes. O líquido extraído foi concentrado em rotoevaporador (IKA® RV10, Alemanha) a uma temperatura de 50°C . Para ser utilizado na síntese de NPs_{Ag}-PV seguiu-se a ressuspensão do extrato no mesmo solvente a uma concentração de 25 mg/mL, para sua dissolução foi submetido à agitação a uma velocidade de 200 rpm em placa agitadora.

O teor de flavonoides totais foi calculado pelo método espectrofotométrico da reação do cloreto de alumínio (AlCl_3) a 5% em metanol, conforme Alves e Kubota

(2013), com alterações. Foram utilizadas amostras de EHPV diluídos nas concentrações de 100, 150, 200, 250 e 300 µg/mL em balão volumétrico de 5 mL. A absorbância foi lida à 425 nm e a concentração dos flavonoides determinada utilizando uma curva padrão de quercetina, através da equação 1:

$$y = 0,046x - 0,018 \quad (1)$$

Na qual, y = absorbância e x = concentração.

A quantificação dos flavonoides totais foi representada como miligramas de equivalentes de quercetina por grama de EHPV.

4.4 Síntese de nanopartículas de prata

A síntese seguiu o preconizado por Šileikaitė *et al.* (2016), com alterações. Um volume de 50 mL a uma concentração 1.500 µM de AgNO₃ foi aquecido até atingir a temperatura de ebulição, e por gotejamento, na velocidade de 1 gota/s, acrescentou-se 5 mL de solução de citrato de sódio sob agitação a uma rotação de 200 rpm. Quando observada a alteração de cor da solução, de incolor para amarelo claro, a agitação foi interrompida e a solução armazenada ao abrigo da luz.

4.5 Síntese de nanopartículas de prata com própolis vermelha de Alagoas

Esta etapa foi conduzida de acordo com Barbosa *et al.* (2019) e Roy *et al.* (2010). Para a redução do AgNO₃ à forma de prata nanométrica empregou-se o EHPV, e todas as etapas foram realizadas à temperatura de 32 ± 2 °C. O EHPV ressuspenso na concentração de 25 mg/mL foi diluído em água resultando numa solução de concentração de 30 µg/mL, sob agitação de 200 rpm. O pH dessa solução foi ajustado para 10,6 pelo gotejamento de uma solução de NaOH de concentração 0,1 M, com auxílio de medidor de pH (TecnoPON mPA210, Brasil). Após esse estágio, por gotejamento na velocidade de 1 gota/s adicionou-se à solução AgNO₃, sob agitação de 200 rpm e ao abrigo da luz, obtendo-se uma solução coloidal de 1.500 µM de AgNO₃, após um período de 30 minutos o coloide foi retirado da placa agitadora e armazenado.

4.6 Obtenção de nanopartículas na forma de pó

O coloide obtido, tanto na síntese de NPsAg convencional (método químico) quanto na síntese de NPsAg-PV, após o período de 24 h foi submetido à centrifugação com centrífuga RXII series (Hitachi, Japão) por 20 minutos com uma força centrífuga relativa (RCF) de 4.120, à 15.000 rpm e 25 °C, após cada ciclo de centrifugação o sobrenadante foi descartado e o precipitado resultante ressuspensão em água deionizada, esse processo foi repetido por 2 vezes e ao final o precipitado foi centrifugado por 3 vezes nas mesmas condições já descritas, realizando-se a lavagem em cada ciclo, terminado esse processo colocado em placa de petri e levado à estufa NI1512i (Nova Instruments, Brasil) à temperatura de 50 °C por 24 h. Barbosa *et al.* (2019) indicaram o período de 24 h como o mais indicado para centrifugação do coloide de NPs, considerando dois fatores: formação de NPs e estabilidade.

4.7 Preparo dos grupos experimentais para teste de escoamento e avaliação do potencial antibacteriano

Foram preparados grupos experimentais com as substâncias $\text{Ca}(\text{OH})_2$, EHPV, NPsAg e NPsAg-PV através da homogeneização de cada uma delas com o PEG 400, utilizado como veículo. Também foram feitas associações entre as substâncias, que se justifica para a avaliação da atividade de cada composto em diferentes formulações. Seguiu-se a proporção 1:1 nos grupos compostos por mais de uma substância, em relação ao volume.

4.8 Caracterização

As NPsAg-PV e NPsAg foram caracterizadas na forma de suspensão coloidal por espectrofotometria UV-Vis e EDL. Cada grupo experimental também foi caracterizado através do potencial zeta e teste de escoamento horizontal.

4.8.1 Espectrofotometria ultravioleta e visível

Foi utilizado espectrofotômetro com leitor de placas (Flexstation® 3, EUA), um volume de 100 µL de cada grupo foi depositado em placa de poliestireno de 96 poços com fundo chato e a absorbância obtida pela leitura dos comprimentos de onda em um intervalo de 200 a 850 nm. O uso desta técnica possibilita averiguar a redução da

prata para a forma de NPs, além de fornecer informações sobre as características das NPs.

4.8.2 Espalhamento dinâmico da luz

As análises foram feitas no equipamento Malvern Zetasizer Nano ZS90 (Malvern Instruments, UK), em triplicata, com a obtenção do valor médio, com a utilização de uma cubeta de poliestireno (Square polystyrene cuvettes - DTS0012 - Malvern Instruments, UK). Esta técnica permite a determinação do tamanho médio das partículas através da medição do movimento browniano, as partículas recebem iluminação de um laser, para que se procedam as análises das variações de intensidade na luz espalhada. Por esta, também podem ser identificado o índice de polidispersão (PDI) das NPs.

4.8.3 Potencial zeta

Foi realizada no equipamento Malvern Zetasizer Nano ZS90 (Malvern Instruments, UK). As amostras foram lidas em triplicata, resultando em um valor médio, utilizando-se uma célula eletroforética (Folded Capillary Zeta Cell - DTS1070 - Malvern Instruments, UK). A determinação do potencial zeta justifica-se pela caracterização das NPs quanto a sua estabilidade.

4.8.4 Teste de escoamento horizontal

As análises se deram de acordo com os parâmetros da ISO 6876:2012, com adaptações. Os materiais foram preparados conforme as especificações descritas acima. Um volume de 0,05 mL de cada material foi colocado no centro de uma placa de vidro medindo 15 mm x 7 mm x 10 mm. Em seguida, uma placa de vidro de 49,18 g foi colocada sob os materiais e no centro do conjunto posicionado um peso de 116,3 g, totalizando um peso de 165,48 g. O diâmetro inicial foi medido e após 7 minutos avaliado o diâmetro final, utiliza-se um paquímetro (Mitutoyo MTI Corporation, Japão), para calcular a diferença entre eles. As avaliações foram feitas em triplicata e a média das três leituras de cada grupo foi considerada como o resultado do escoamento.

4.9 Avaliação do potencial antibacteriano

4.9.1 Ensaio *in vitro*

Para este ensaio, determinadas substâncias foram preparadas e testadas contra cepas de *E. faecalis*, conforme a Tabela 1.

Tabela 1- Descrição dos grupos experimentais do teste *in vitro* da avaliação antimicrobiana.

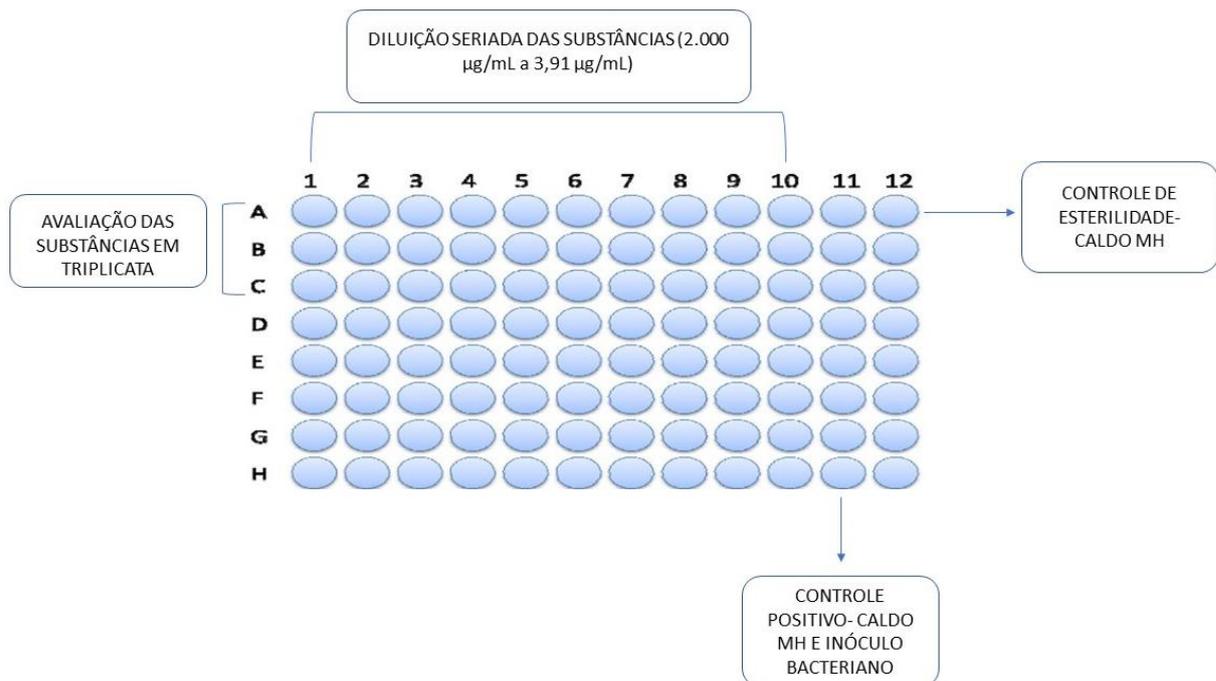
Composição	Descrição de cada grupo experimental	Proporção
Pasta de Ca(OH) ₂	Pasta de hidróxido de cálcio	-
EHPV	Extrato hidroalcoólico de própolis vermelha de Alagoas	-
NPsAg	Nanopartículas de prata	-
NPsAg+EHPV	Nanopartículas de prata combinada a extrato hidroalcoólico de própolis vermelha de Alagoas	1:1
NPsAg-PV	Nanopartículas de prata com própolis vermelha de Alagoas	-
Pasta de Ca(OH) ₂ +EHPV	Pasta de hidróxido de cálcio combinada a extrato hidroalcoólico de própolis vermelha de Alagoas	1:1
Pasta de Ca(OH) ₂ +NPsAg	Pasta de hidróxido de cálcio combinada a nanopartículas de prata	1:1
Pasta de Ca(OH) ₂ +NPsAg+EHPV	Pasta de hidróxido de cálcio combinada a nanopartículas de prata e extrato hidroalcoólico de própolis vermelha de Alagoas	1:1:1
Pasta de Ca(OH) ₂ +NPsAg-PV	Pasta de hidróxido de cálcio combinada a nanopartículas de prata com própolis vermelha de Alagoas	1:1
PEG 400	Polietilenoglicol 400 (Controle negativo)	-
MH+inóculo bacteriano	Caldo Mueller Hinton e inóculo bacteriano (Controle positivo)	-
MH	Caldo Mueller Hinton (Controle de esterilidade)	-

Fonte: Própria autora, 2021.

A cepa de referência de *E. faecalis* (ATCC 29212) foi obtida do Laboratório de Controle e Qualidade de Alimentos da Faculdade de Nutrição, Universidade Federal de Alagoas, sendo reativada em meio BHI por 48 horas à 37 °C. Dessa cultura foi retirada uma alíquota para cultivo em meio AMH para a incubação por 24h à 37 °C, esse período pode compreender um intervalo de 18-24 horas (NCCLS, 2003; CLSI,

2012), visando o uso na elaboração do inóculo na concentração de $1,5 \times 10^8$ em solução salina à 0,9%, de acordo com a escala 0,5 Mcfarland. Para o Teste de Susceptibilidade a Antimicrobianos (TSA) por microdiluição foi feita a diluição do inóculo com solução salina 0,9 % para a concentração de $1,5 \times 10^5$. A CIM e concentração bactericida mínima (CBM) foram determinadas pela técnica delineada em Métodos para Testes de Susceptibilidade de Diluição Antimicrobiana para Bactérias que Crescem Aerobicamente (CLSI, 2012). Inicialmente, foram dispostos em microplacas de poliestireno estéreis de 96 poços de fundo chato 100 μ l do caldo MH, seguido de 100 μ l das substâncias a serem testadas e 5 μ l do inóculo bacteriano. Soluções estoques estavam a uma concentração de 2.000 μ g/mL na primeira coluna da microplaca e nos poços seguintes foram feitas diluições seriadas, com a retirada de uma alíquota de 100 μ l da coluna 1 para a sucessora, em uma faixa de concentração de 2000 μ g/mL a 3,91 μ g/mL como concentração final. As diluições foram feitas no sentido horizontal da placa dos poços 1 ao 10 (Figura 6). O controle positivo foi constituído de MH e inóculo bacteriano, que permitiu avaliar o crescimento bacteriano nas condições do experimento, sem interferência de componentes possivelmente inibidores. Para o controle de qualidade da técnica foi realizado o teste de esterilidade do meio de cultura utilizando apenas o caldo MH, na última coluna.

Figura 7- Representação da microplaca para obtenção da concentração inibitória mínima.



Fonte: Adaptado de Vieira, 2016.

A avaliação da CIM se deu através da análise da viabilidade celular, através do método colorimétrico, com a aplicação de 25 µl de resazurina 0,01% decorrido o período de 24 h de incubação em condições de aerobiose. Os resultados da CIM foram observados na concentração que não houve alteração da cor de azul para rosa no poço após o período de 6 horas de aplicação, proporcionada pela presença de células bacterianas viáveis capazes de reagir com a resazurina através de uma reação de oxirredução, indicando o metabolismo bacteriano (SCIMONE, *et al.* 2021). A partir da CIM os produtos foram classificados da seguinte forma quanto à atividade bacterios-tática: excelente, valores abaixo de 100 µg/mL; moderada, entre 100 e 500 µg/mL; baixa, valores acima de 500 a 1.000 µg/mL e inativos quando essa concentração foi superior a 1.000 µg/mL, conforme a classificação empregada por Holetz *et al.* (2002), que investigaram plantas brasileiras para o tratamento de doenças infecciosas.

Para determinação da CBM foram retirados 10 µl do poço correspondente à CIM e dos poços anteriores, ou seja, aqueles com maiores concentrações da substância ativa, a alíquota foi semeada em placas de Petri em AMH. A CBM foi indicada na concentração em que foi detectada a ausência do crescimento de colônias nas placas de Petri.

Os ensaios para determinação da CIM e CBM foram realizados em triplicata e incubados a 37 °C durante 24 horas, e o diluente PEG 400 constituiu o controle negativo.

4.9.2 Ensaio *ex vivo*

Este experimento foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Alagoas (UFAL), sob o número 18101219.6.0000.5013, sendo a amostragem composta de 54 dentes humanos, unirradiculares, sem cárie, permanentes, erupcionados, com raiz completa e extração indicada por razões terapêuticas, os elementos dentais foram armazenados em cloramina T 0,5% até seu uso.

A efetividade das substâncias intracanais foi avaliada utilizando-se cepa de *E. faecalis* (ATCC 29212) para formação de biofilme, seguindo-se a observação de unidades formadoras de colônias (UFCs). O ensaio foi realizado conforme Parolia *et al.* (2020), com modificações.

4.9.2.1 Preparo dos dentes

Foram padronizados blocos radiculares de 6 mm de comprimento através de dois cortes perpendiculares ao longo eixo do dente, um corte a 1 mm abaixo do limite amelo-cementário e outro no terço cervical, utiliza-se um disco diamantado em cortadeira metalográfica sob refrigeração a água (Isomet 5000; Buehler Ltd, Lake Bluff, IL), na velocidade de 800 rpm. O conduto radicular foi alargado com broca Peeso número 1,2 e 3 (Dentsply Maillefer, Brasil), nesta sequência, acoplada a um contra-ângulo, em baixa rotação. Ao final, o canal radicular dos corpos de prova apresentava 0,9 mm de diâmetro interno (Figura 7).

Figura 8- Blocos de dentina



Fonte: Própria autora, 2021.

Os canais radiculares dos corpos de prova foram irrigados com NaOCl 5,25% (Fórmula, Brasil), seguido de EDTA 17% de pH 4,0 (Biodinâmica, Brasil) por 2 minutos, sob agitação sônica, para remover a smear layer. Os blocos foram lavados em solução salina estéril após cada irrigação. A seguir, as superfícies externas foram cobertas com dupla camada de esmalte de unhas vermelho (Colorama, Brasil) para evitar o contato de *E. faecalis* e dos medicamentos com a superfície externa e os corpos

de prova foram esterilizados em autoclave por 20 min à 121 °C. Placas de Petri contendo uma superfície com cera utilidade (Clássico, Brasil) foram preparadas e a superfície desinfetada com álcool 70% e secas com ar em uma câmara de fluxo laminar antes do uso. Os corpos de prova foram fixados nas placas de Petri com cera através de sua porção apical, com um pequeno quadrado de parafilme obliterando o forame apical para evitar penetração de cera no canal radicular (Figura 8).

Figura 9- Blocos de dentina fixados em cera.



Fonte: Própria autora, 2021.

4.9.2.2 Inoculação dos blocos de dentina com *Enterococcus faecalis*

E. faecalis foram suspensos em 20 mL caldo MH, as células em suspensão foram ajustadas até alcançar a turbidez de $1,5 \times 10^8$ UFCs/mL, equivalente ao padrão 0,5 da escala McFarland. Um volume de 10 μ l do inóculo de *E. faecalis* foi inserido no interior do canal radicular em câmara de fluxo laminar. A porção coronal dos blocos de dentina foram selada imediatamente com parafilme, e houve a incubação dos blocos de dentina à 37°C por 21 dias, com renovação de *E. faecalis* a cada três dias para a formação do biofilme bacteriano.

4.9.2.3 Aplicação do medicamento intracanal

Depois do período de inoculação, os blocos de dentina foram aleatoriamente distribuídos em grupos (n=2) de acordo com a substância colocada: pasta de Ca(OH)_2 ; EHPV; NPsAg; NPsAg+EHPV; NPsAg-PV; Ca(OH)_2 +EHPV; Ca(OH)_2 +NPsAg; Ca(OH)_2 +NPsAg+EHPV e Ca(OH)_2 +NPsAg-PV. Cada grupo foi dividido de acordo com o intervalo de 1, 3 e 7 dias de incubação, e no canal radicular aplicado um volume de 5 μl de cada substância a uma concentração de 2.000 $\mu\text{g}/\text{mL}$, de modo a preencher totalmente o canal. O orifício coronal foi selado com parafilme e os blocos mantidos a 37 °C pelos períodos experimentais.

Quanto à concentração das substâncias, foi empregada concentração superior à CIM, adotando-se o maior valor obtido para a CBM no ensaio *in vitro*, considerando-se também que o inóculo bacteriano estava mais concentrado no ensaio *ex vivo* ($1,5 \times 10^8$) em relação aos ensaios *in vitro* ($1,5 \times 10^5$), isso é fundamentado na literatura por alguns autores como Melani (2009) e Carli (2007).

4.9.2.4 Coleta das raspas de dentina e atividade antimicrobiana

Decorridos os períodos experimentais, os blocos de dentina foram removidos das placas de Petri e os canais foram secos com pontas de papel absorvente número 70 (Tanari, Brasil). Amostras de raspas de dentina foram coletadas com auxílio de uma lima endodôntica número 100 (Injecta, Brasil).

As raspas de dentina foram transferidas para microtubos contendo 1 mL de meio de solução salina estéril, que foi agitado em vórtex por 30 s. Uma ponteira estéril foi utilizada para transferir uma alíquota de 100 μl da solução salina com raspas de dentina para outro tubo contendo 900 μl de solução salina estéril. O conteúdo de cada tubo foi serialmente diluído de 10^{-1} até 10^{-6} . Posteriormente, 25 μl das raspas de dentina diluídas foram espalhadas uniformemente usando alças de Drigalsky em placas de Petri em triplicata. As placas foram incubadas por 24 horas a 37°C. Após a incubação, procedeu-se a observação da formação de colônias.

Na presença de colônias, foram feitas análises para atestar confirmação do gênero *Enterococcus* através de variados ensaios, incluindo a coloração de Gram, para verificar a presença de estruturas s cocos, seguido do uso do meio cromogênico

CHROMagar Orientation (BD, Inglaterra), meio que permite diferenciar o gênero *Enterococcus* spp., sem a necessidade de testes de confirmação adicionais, teste de catalase e meio de tolerância ao sal (MTS), este composto de caldo BHI acrescido de NaCl 6,5%, que é um meio de cultura líquido que diferencia *Streptococcus* spp. de *Enterococcus* spp., visto que os *Streptococcus* não crescem nesse meio, os testes foram realizados conforme Koneman *et al.* (2016) e CHROMagar (2020), com modificações.

A coloração de Gram foi realizada a partir de um esfregaço bacteriano fixado pelo calor em lâmina de vidro polido, com uso sequencial dos reagentes cristal de violeta, lugol, álcool absoluto e fucsina. Ao término da coloração, as lâminas preparadas foram levadas a microscópio óptico (Olympus, Japão) e observadas em aumento de 40x e 100x.

Para identificação em meio cromogênico, colônias foram semeadas em placas de Petri e incubadas por um período de 24 h para observação pelo método visual. Na realização do teste de catalase, foi gotejada uma solução de peróxido de hidrogênio (Laborclin, Brasil) sobre amostra bacteriana em lâmina de vidro polido, o resultado é considerado positivo quando há formação de bolhas, indicando a presença da enzima catalase. Quanto à investigação no MTS, colônias foram cultivadas no caldo, e os resultados também obtidos após 24 h, o turvamento do meio indica o crescimento de *Enterococcus* spp.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Obtenção do extrato hidroalcoólico de própolis vermelha de Alagoas

O EHPV foi obtido com um rendimento de aproximadamente 40%, apresentando consistência viscosa e cor vinho. O cálculo do conteúdo de flavonoides do EHPV resultou em um maior valor para o resíduo seco do extrato, $\approx 52,63$ mg de quercetina/g, quando comparado ao do extrato etanólico, $\approx 36,58$ mg de quercetina/g. O teor de flavonoides encontrado neste estudo se assemelha ao identificado por Andrade *et al.* (2017), que avaliaram um extrato etanólico de própolis vermelha de Sergipe, indicando 31,48 mg de quercetina/g de própolis, e a pequena variação pode estar relacionada a aspectos geográficos da região de origem da própolis, como a

sazonalidade, ou até mesmo a fatores associados ao método de preparo do extrato (ZABAIYOU *et al.*, 2017). E, Righi *et al.* (2011) na investigação de extrato metanólico de própolis vermelha, coletada de apiários da cidade de Maceió, apontaram um conteúdo de 32,91 mg de quercetina/g de própolis.

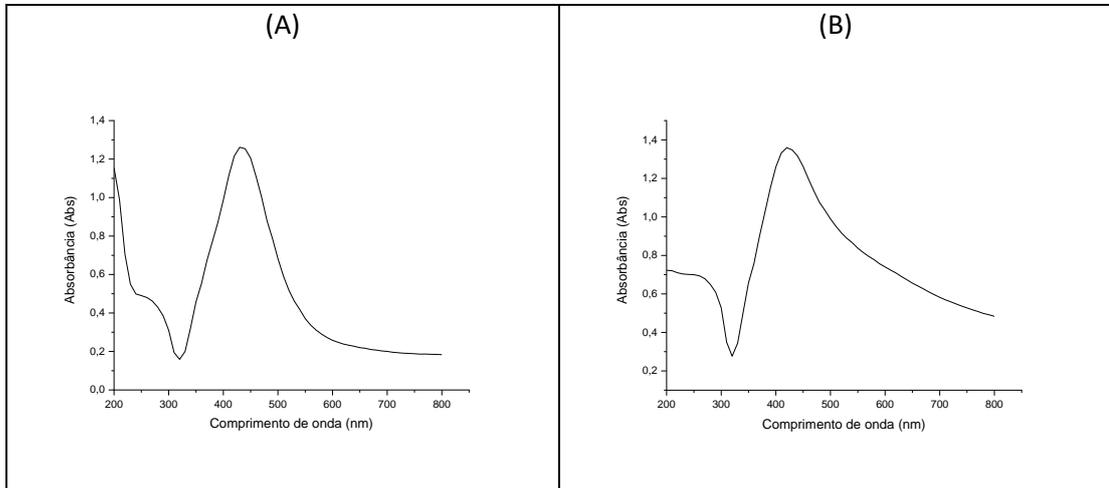
5.2 Caracterização

5.2.1 Espectrofotometria ultravioleta e visível

Na análise por espectrofotometria UV-Vis, o maior pico de absorção das NPsAg exibiu um valor próximo de 426 nm para um período de 24 h e 423 nm em um intervalo de 72 h da síntese (Figura 7), indicando a redução da prata à forma nanométrica. Valores de absorção máxima em torno de 400 nm são característicos da formação de NPsAg em formato esférico, e na presença de bandas de RPS no intervalo de 400 a 500 nm também pode ser observada a formação de NPsAg (NETO; RIBEIRO; ZUCOLOTTI, 2008; PAIVA; THIRÉ; SOARES, 2012; BERBEC; ZOŁAŁDEK; KULESZA; PAŁYS, 2019). Validando isso, as NPsAg-PV apresentaram um pico em 425 nm e 421 nm, decorridas 24 h e 72 h, respectivamente (Figura 8). Esses dados das bandas de RPS apontam a formação de NPs e sugerem que possuem configuração esférica. Esses períodos de avaliação foram indicados através da análise do estudo de Barbosa *et al.* (2019), que encontraram variações significativas nesses intervalos.

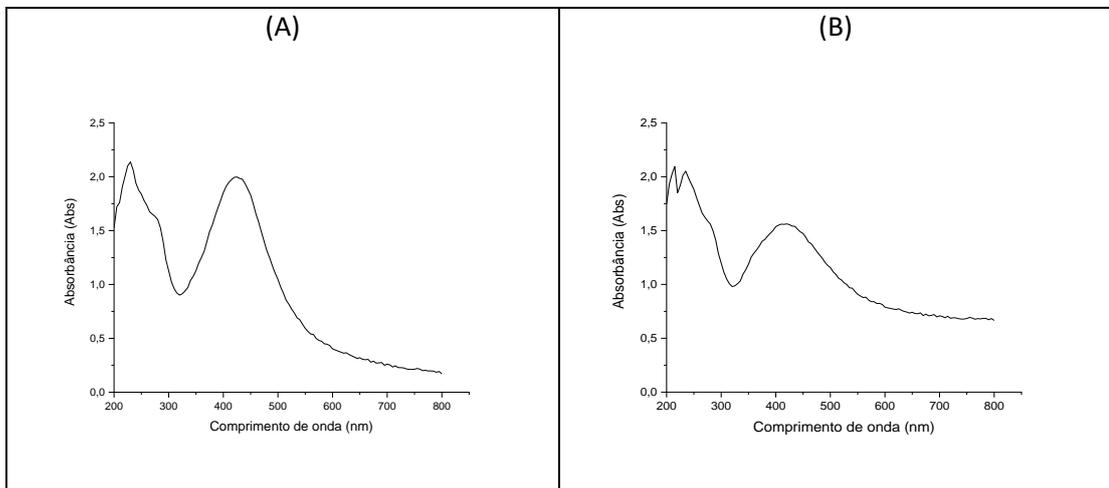
Nesse sentido, Roy *et al.* (2010) demonstraram que NPs de prata sintetizadas usando própolis indiana apresentaram o pico máximo em 421 nm, já Barbosa *et al.* (2019) encontraram um valor de 420 nm para NPs de prata com própolis de formato esférico, que foram sintetizadas em condições semelhantes às empregadas neste estudo, após 24 h da síntese.

Figura 10- Espectro ultravioleta e visível das nanopartículas de prata. (A) Após 24 h. (B) Após 72 h.



Fonte: Própria autora, 2021.

Figura 11- Espectros ultravioleta e visível das nanopartículas de prata com própolis vermelha de Alagoas. (A) Após 24 h. (B) Após 72 h.

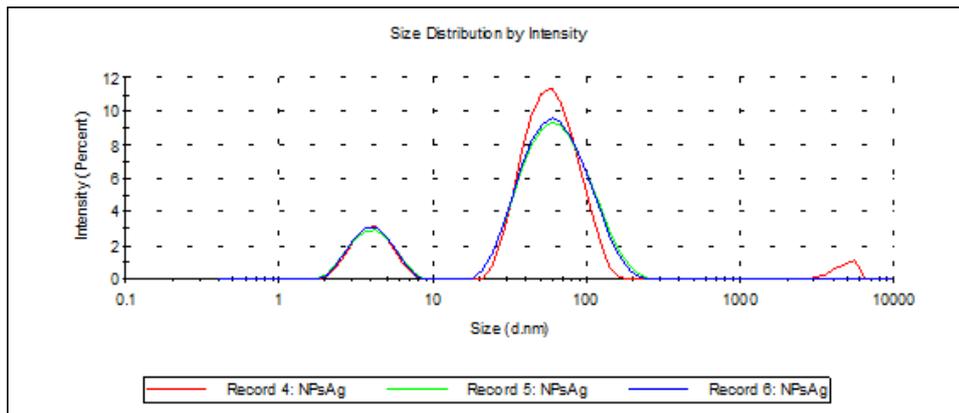


Fonte: Própria autora, 2021.

5.2.2 Espalhamento dinâmico da luz

As NPsAg exibiram um raio hidrodinâmico de $26,06 \pm 0,83$ e PDI de $0,79 \pm 0,146$, este sugere menor homogeneidade na distribuição das NPs quanto ao tamanho (Figura 9), posto que valores abaixo de 0,3 indicam a ausência de aglomerados e uma distribuição homogênea do diâmetro das NPs (GREULICH *et al.* 2011).

Figura 12- Raio hidrodinâmico médio das nanopartículas de prata.

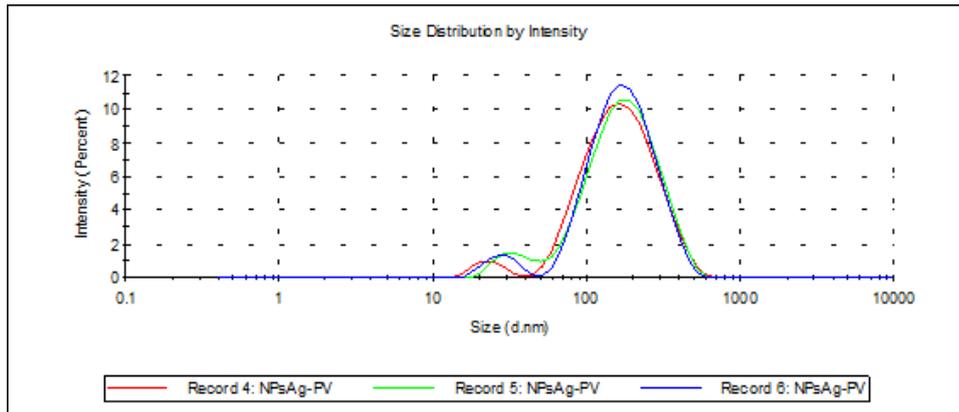


Fonte: Própria autora, 2021.

As análises por EDL mostraram NPsAg-PV com raio hidrodinâmico de $132,5 \text{ nm} \pm 1,19$ (Figura 10), valor que tende a ser menor quando da análise por microscopia. O PDI foi de $0,264 \pm 0,006$, o que sugere a homogeneidade do tamanho das NPs do coloide.

Nesse contexto, Greulich *et al.* (2011) obtiveram NPs de prata revestidas com polivinilpirrolidona que à análise por EDL exibiram um tamanho de 80 nm, ao passo que por MEV foi observado um menor tamanho, 50 ± 20 nm. Para NPs de prata bio-sintetizadas com óleo de patchouli por Parmar, Kapil, Sachar e Sharma (2020) o EDL revelou um tamanho de 110 nm, e para as sintetizadas por Albernaz (2014) com extrato aquoso de folhas de *Brosimum gaudichaudii*, de 189,7 nm, valores que se assemelham ao exibido pelas NPsAg-PV deste estudo.

Figura 13- Raio hidrodinâmico médio das nanopartículas de prata com própolis vermelha de Alagoas.

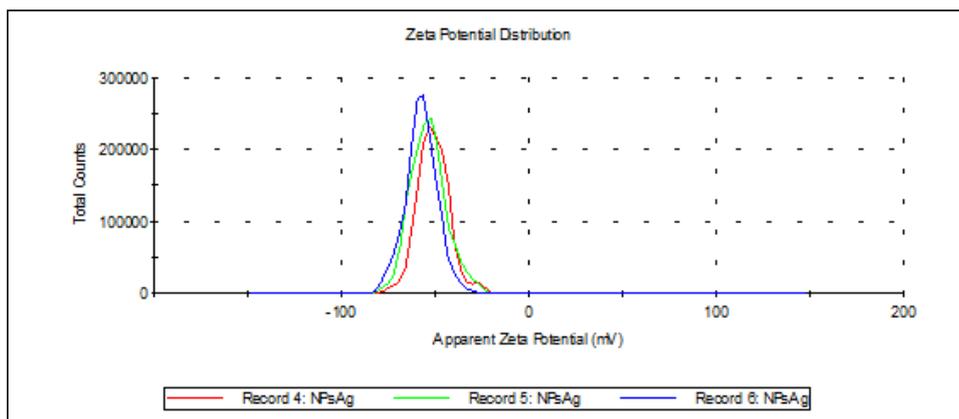


Fonte: Própria autora, 2021.

5.2.3 Potencial zeta

Por sua vez, o potencial zeta das NPsAg de $-54,1 \text{ mV} \pm 3,17$ aponta a carga negativa do coloide, além de sua estabilidade e oposição à agregação das NPs, conforme a Figura 11.

Figura 14- Potencial zeta das nanopartículas de prata.

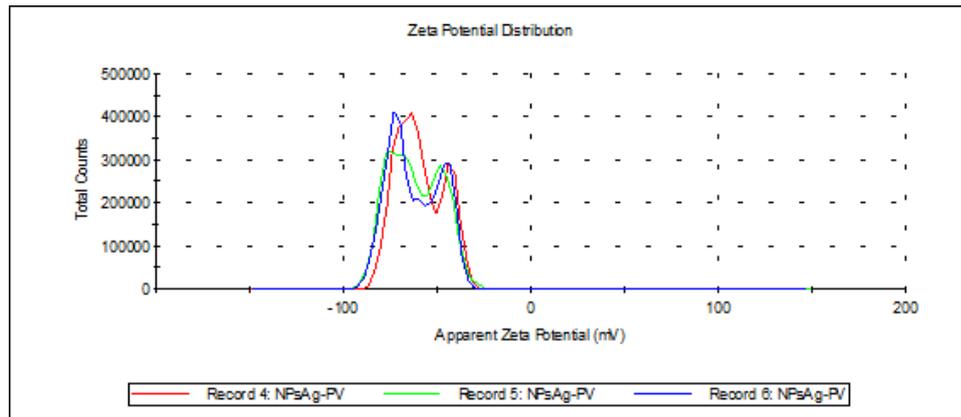


Fonte: Própria autora, 2021.

As NPsAg-PV demonstraram potencial zeta de $-61 \text{ mV} \pm 1,59$, indicando que em meio aquoso as NPs estão carregadas negativamente, a estabilidade do coloide e a resistência à agregação das partículas (Figura 12). Esse valor representa uma

significante estabilidade das NPsAg-PV. A utilização de extrato hidroalcoólico de própolis pode ter contribuído para isso, visto que possui uma notável capacidade estabilizante, permitindo a obtenção de NPs estáveis durante um longo período (ROY *et al.*, 2010).

Figura 15- Potencial zeta das nanopartículas de prata com própolis vermelha de Alagoas

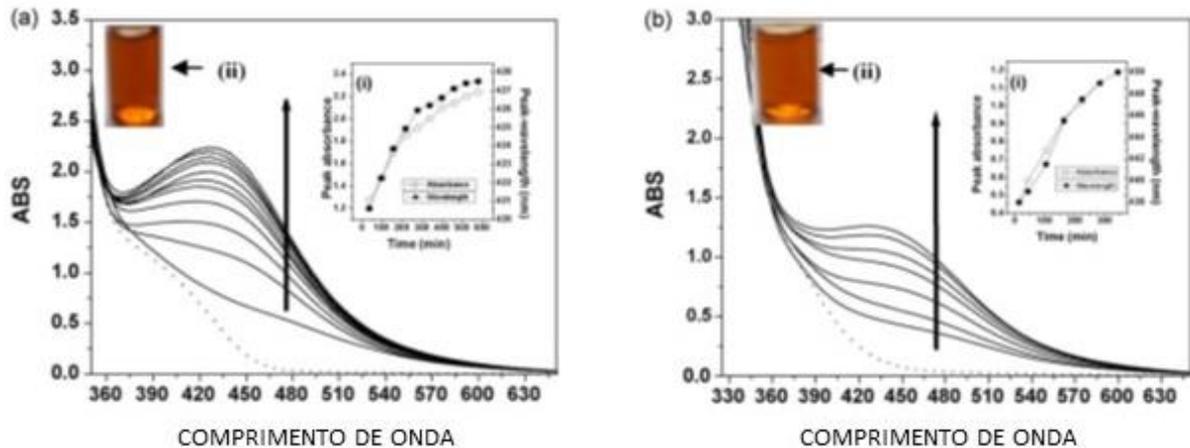


Fonte: Própria autora, 2021.

O potencial zeta significativamente alto das NPsAg e NPsAg-PV pode estar relacionado às condições de síntese, como o uso do citrato de sódio e a alcalinidade do EHPV, este de pH 10,6, visto que a estabilidade dos colóides está associada à alcalinidade do pH no início da reação de síntese (ALBERNAZ, 2014). Neto, Ribeiro e Zucolotto (2008) relacionaram o pH à estabilidade das suspensões, descrevendo que os sistemas com pH maiores que 10 apresentam uma melhor estabilidade. Ainda, Roy *et al.* (2010) mostraram que a formação de NPs de prata biossintetizadas com extrato etanólico de própolis indiana de pH 8,06 se deu em condições mais rígidas, em um intervalo de tempo superior e com controle da temperatura em torno de 40 °C, quando comparada à reação que utilizou extrato de própolis indiana de pH 10,62, que ocorreu à temperatura ambiente. Como também, a absorvância máxima foi de 421 nm e 438 nm, para o colóide de prata preparado com o extrato em pH 10,62 e 8,05, respectivamente, sugerindo que NPs de maiores tamanho foram obtidas com o uso do extrato de menor pH (Figura 13). Por sua vez, Albernaz (2014) descreveu que nos pHs de 4 e 5 não houve a formação de NPs de prata, mas nos pHs de 6, 7 e 8 as mudanças nas bandas de RPS indicaram a formação de NPs de prata. Isso sustenta

que ambientes básicos são mais favoráveis à formação de NPs de prata e a sua estabilidade.

Figura 16- Picos máximos de absorção das nanopartículas à espectrofotometria ultravioleta e visível. (a) Nanopartículas biossintetizadas com o extrato de própolis indiana de pH 10,62. (b) Nanopartículas biossintetizadas com o extrato de própolis indiana de pH 8,05.



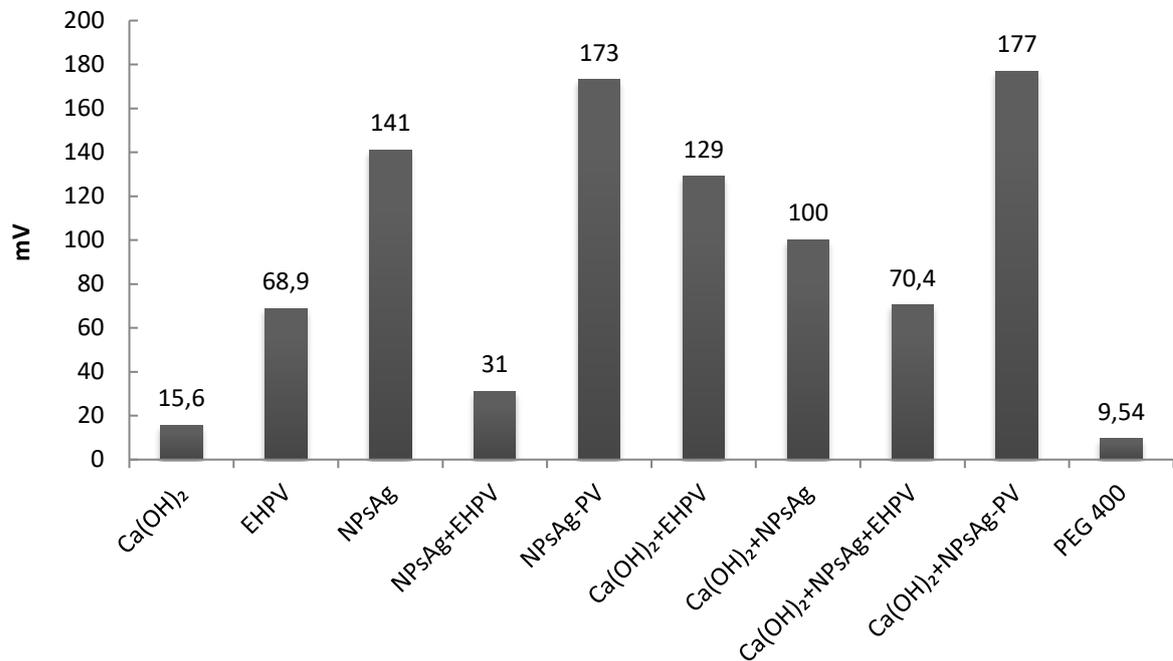
Fonte: Adaptado de Roy *et al.*, 2010.

Para as NPs de prata biogênicas sintetizadas por Albernaz (2014) com extrato aquoso de folhas de *Brosimum gaudichaudii* o valor do potencial zeta foi de -29,2 mV, já para as revestidas com óleo de patchouli, produzidas por Parmar, Kapil, Sachar e Sharma (2020), o valor obtido foi de -20,73 mV, exibindo uma menor estabilidade em relação às NPs_{Ag}-PV sintetizadas neste trabalho.

NPs de prata sintetizadas pelo método químico por Rodrigues *et al.* (2019), tendo o citrato de sódio como agente redutor, também mostraram estabilidade com potencial zeta variando de -29,55 a -40,53 mV e diâmetro por EDL de 34,45 a 51,07, de acordo com o volume de borohidreto de sódio (NaBH₄) adicionado.

Em relação ao potencial zeta dos grupos experimentais, a pasta de Ca(OH)₂ mostrou potencial de superfície de -15,6 mV, EHPV de -68,9 mV, NPs_{Ag} de -141 mV, NPs_{Ag}+EHPV de -31 mV, NPs_{Ag}-PV de -173 mV, Ca(OH)₂+EHPV de -129 mV, Ca(OH)₂+NPs_{Ag} de -100 mV, Ca(OH)₂+NPs_{Ag}+EHPV de -70,4 mV, Ca(OH)₂+NPs_{Ag}-PV -177 mV e PEG 400 de -9,54 mV (Figura 14).

Figura 17- Valores do potencial zeta (em mV e em módulo) dos materiais estudados.



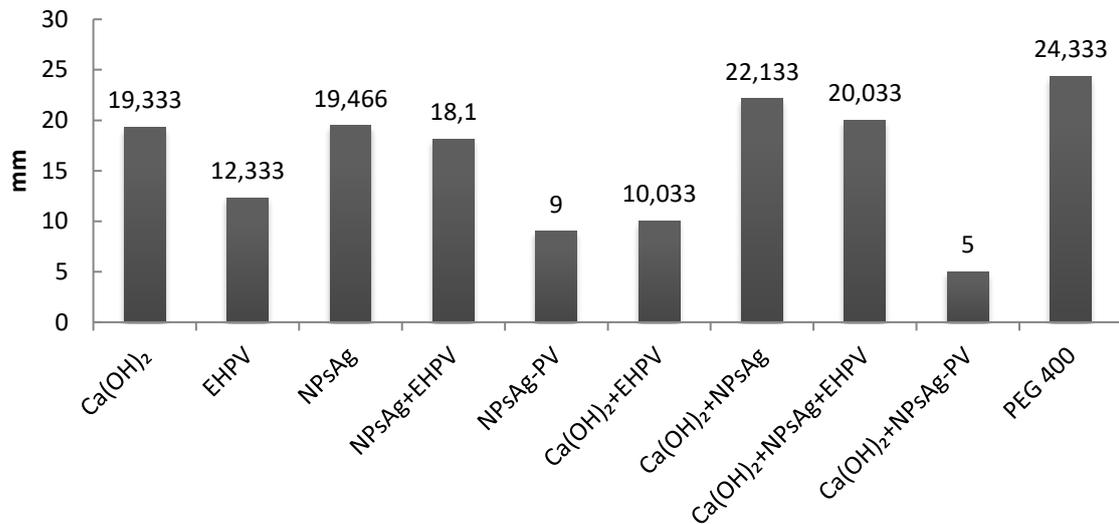
Fonte: Própria autora, 2021.

Esses valores indicam a estabilidade dos compostos solubilizados no PEG 400, também mostram uma melhor estabilidade para as NPs em pó quando suspensas que a do coloide de prata anteriormente ao processo de obtenção do pó, cujos valores foram indicados anteriormente.

5.2.4 Teste de escoamento horizontal

No teste de escoamento horizontal, a pasta de Ca(OH)₂ mostrou escoamento de $\approx 19,33 \pm 0,49$ mm, EHPV de $\approx 12,33 \pm 0,38$ mm, NPsAg de $\approx 19,47 \pm 0,36$ mm, NPsAg+EHPV de $18,1 \pm 0,33$ mm, NPsAg-PV de $9 \pm 0,27$ mm, Ca(OH)₂+EHPV de $\approx 10,03 \pm 0,36$ mm, Ca(OH)₂+NPsAg de $\approx 22,13 \pm 0,24$ mm, Ca(OH)₂+NPsAg+EHPV de $\approx 20,03 \pm 0,31$ mm, Ca(OH)₂+NPsAg-PV $5 \pm 0,67$ mm e PEG 400 de $\approx 24,33 \pm 0,44$ mm (Figura 15).

Figura 18- Valores do escoamento horizontal (em mm) dos materiais estudados.



Fonte: Própria autora, 2021.

A pasta de Ca(OH)_2 +NPsAg-PV apresentou o menor escoamento, seguida das NPsAg-PV, indicando a menor capacidade de difusão desses compostos em relação aos demais. A própolis estava presente nesses grupos, e seu extrato foi alcalinizado a um pH de 10,6 para a síntese das NPs, o que pode ter contribuído para um baixo escoamento em relação ao Ca(OH)_2 . Mello (2013) indicou uma maior viscosidade de extrato aquoso de própolis com maiores pHs, relacionando a uma maior capacidade de extração de compostos fenólicos e flavonoides, como também de cera. Para extrato de pH 8 mostrou um aumento aproximado de 40% na extração de fenóis e também houve uma maior concentração de flavonoides, em comparação ao extrato sem alteração do pH. Além disso, o extrato etanólico mostrou capacidade de extração de cera e uma maior extração de flavonoides e polifenóis em relação ao extrato aquoso de pH 8, aspectos que podem contribuir para aumento de sua viscosidade. Ca(OH)_2 +EHPV apresentou o terceiro menor escoamento, que pode estar associado à adição do extrato de própolis, conforme o descrito por Mello (2013) e Sanchez-Ayala, Silveira e Santos (2008).

Segundo Athanassiadis e Walsh (2017), essa menor capacidade de difusão pode resultar em uma menor atividade antimicrobiana quando considerados períodos curtos em relação aos mais prolongados, pois o medicamento demandará mais tempo para alcançar o alvo biológico. Contudo, isso também se mostra como um aspecto

positivo, pois essas substâncias com maior viscosidade têm a capacidade de ficarem retidas no meio, promovendo um efeito antibacteriano mais duradouro. Sanchez-Ayala, Silveira e Santos (2008) demonstraram que a menor capacidade de difusão de um composto à base de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ resultou em uma menor atividade antimicrobiana desse, quando avaliado por um período de 24-48h, já que a liberação do fármaco se deu de forma mais lenta.

O PEG 400 apresentou a maior capacidade de escoamento, conforme o esperado, pois não estava combinado a um soluto, seguido da pasta de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ +NPsAg. Esse composto apresenta NPsAg em sua composição que apresentou uma significativa fluidez entre os grupos, que pode estar relacionada ao pequeno tamanho das NPsAg, inclusive menor que o das NPsAg-PV, já demonstrado em seção anterior por EDL. Corroborando isso, Berto (2000) descreve que partículas de menor tamanho proporcionam menor viscosidade e maior fluidez ao material.

Além disso, as variações entre o grau de escoamento de cada grupo experimental podem estar relacionadas a outros fatores, como a solubilidade e a interação entre as substâncias (BERTO, 2000; SANCHEZ-AYALA; SILVEIRA; SANTOS, 2008; MELLO, 2013; ATHANASSIADIS; WALSH, 2017).

5.3 Avaliação antibacteriana

5.3.1 Ensaio *in vitro*

Todas as substâncias produzidas demonstraram-se efetivas sobre *E. faecalis*, conforme os resultados apresentados na Tabela 2.

Tabela 2- Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) das substâncias testadas e classificação quanto à atividade bacteriostática.

	CIM ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Potencial bacteriostático*	CBM ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
Pasta de $\text{Ca}(\text{OH})_2$	500	Moderado	1.000
EHPV	250	Moderado	1.000
NPsAg	500	Moderado	2.000
NPsAg+EHPV	500	Moderado	1.000
NPsAg-PV	31,25	Excelente	31,25
Pasta de $\text{Ca}(\text{OH})_2$+EHPV	500	Moderado	2.000

Pasta de Ca(OH) ₂ +NPsAg	500	Moderado	1.000
Pasta de Ca(OH) ₂ +NPsAg+EHPV	500	Moderado	1.000
Pasta de Ca(OH) ₂ +NPsAg-PV	250	Moderado	1.000
PEG 400	Não encontrada	Inativo	Não encontrada

*Conforme Holetz *et al.* (2002).

Fonte: Própria autora, 2021.

A pasta de Ca(OH)₂, apresentou melhor efeito bactericida que as NPsAg, CBM 2 vezes melhor (1.000 µg/mL frente à 2.000 µg/mL e igual CIM 500 µg/mL). Já frente ao EHPV apresentou uma pior atividade bacteriostática, mas igual CBM, em relação às NPsAg-PV, o Ca(OH)₂ mostrou-se menos efetivo sobre *E. faecalis*.

O EHPV desempenhou o segundo melhor efeito dentre todos os compostos, com CIM e CBM de 250 µg/mL e 1.000 µg/mL, respectivamente, apresentando melhor atividade bacteriostática que o Ca(OH)₂ e melhor efeito bacteriostático e bactericida que as NPsAg, com a vantagem de ser composto por matéria prima de origem vegetal. Isso demonstra a eficácia da própolis vermelha sobre *E. faecalis*. Em comparação às NPsAg-PV mostrou um inferior desempenho, isso pode ser justificado pelo sinergismo que ocorreu entre a prata e a própolis vermelha e somado a isso a maior área de superfície das NPs, que proporciona um maior potencial antimicrobiano, como já explicado em seção anterior.

As NPsAg apresentaram o menor desempenho antimicrobiano sobre *E. faecalis*, com CIM de 500 µg/mL e CBM de 2.000 µg/mL. Revelou CIM inferior à do EHPV e igual à do Ca(OH)₂, mas para a atividade bactericida foi necessário o uso de uma concentração duas vezes maior que à do Ca(OH)₂ e EHPV. Apesar de não haver um consenso na literatura quanto ao mecanismo de ação das NPsAg, isso demonstra a menor eficácia da prata reduzida por citrato de sódio em relação ao Ca(OH)₂ e EHPV, que são materiais formados por macropartículas, e também em relação às NPsAg-PV.

Por sua vez, o grupo NPsAg+EHPV demonstrou melhor CBM que as NPsAg e igual valor de CIM, sendo esta maior que a do EHPV. Assim, infere-se que quanto à atividade bacteriostática as NPsAg não foram capazes de melhorar a atividade do EHPV, pois no poço ele estava a uma concentração de 250 µg/mL.

As NPsAg-PV exerceram a melhor atividade antimicrobiana, com CIM e CBM de 31,25 µg/mL, comparadas às NPsAg um desempenho significativamente superior, considerando-se que ambos os coloides possuíam a mesma concentração de AgNO₃. Diante disso, fica evidente que neste estudo a biossíntese viabilizou a obtenção de NPs com propriedades antimicrobianas melhoradas, o que já tem sido descrito por diversos autores (LEDIGA *et al.*, 2018; MASHWANI *et al.*, 2015; SHARMA; YNGARD; LIN, 2009). E, destacamos que ocorreu sinergismo entre a prata e o EHPV no nanomaterial, segundo Andrade (2014), o efeito de sinergismo ocorre quando a interação entre as substâncias ativas produz um efeito farmacológico drasticamente superior ao esperado quando da aplicação delas de forma isolada.

Dentre as associações, Ca(OH)₂+EHPV mostrou o menor efeito sobre *E. faecalis*, com CIM e CBM de 500 e 2.000 µg/mL, com inferior efeito bactericida em comparação ao Ca(OH)₂. Ca(OH)₂+NPsAg demonstrou CIM e CBM de 500 µg/mL e 1.000 µg/mL, respectivamente, valores iguais ao do grupo Ca(OH)₂+NPsAg+EHPV.

A formulação Ca(OH)₂+NPsAg-PV exibiu a melhor atividade antimicrobiana entre as associações e a segunda melhor considerando-se todas as substâncias, igualmente ao EHPV. A CIM foi de 250 µg/mL, o que retrata uma menor atividade bacteriostática em relação às NPsAg-PV, mas melhor quanto à pasta de Ca(OH)₂. Já a CBM de 1.000 µg/mL corresponde à da pasta de Ca(OH)₂, mas revela uma significativa redução frente ao efeito bactericida das NPsAg-PV. Isso pode estar relacionado à capacidade de escoamento do composto (5 ± 0,67 mm), a menor dentre os grupos experimentais, dificultando a difusão do Ca(OH)₂ e das NPsAg-PV, Sanchez-Ayala, Silveira e Santos (2008) também vincularam a menor atividade de um composto contendo Ca(OH)₂ e própolis à alteração da capacidade de difusão do produto. A significativa densidade de carga negativa do composto aliada ao baixo escoamento pode ter contribuído para essa redução da atividade, devido à menor atração eletrostática do composto pela célula bacteriana, Araújo *et al.* (2010) descreveram que compostos carregados negativamente apresentam interação repulsiva com a célula bacteriana, já que estas possuem grupos fosforil e carboxil em sua superfície, que também apresentam cargas negativas. Além disso, segundo Felten, Magnus, Santos e Souza (2015), uma interação química antagônica entre as substâncias pode estar associada à redução da atividade.

As associações Ca(OH)_2 +NPsAg, Ca(OH)_2 +NPsAg+EHPV, NPsAg+EHPV apresentaram igual eficácia antimicrobiana sobre *E. faecalis* em relação ao Ca(OH)_2 . O PEG 400 não apresentou efeito antimicrobiano. Silva *et al.* (2016), Abinader (2005) e Gomes *et al.* (2002) indicaram a ausência de efetividade do PEG 400 sobre *E. faecalis* através do teste de difusão em Ágar. O controle positivo confirmou o crescimento bacteriano e no teste de esterilidade não foi observada viabilidade celular, comprovando a qualidade da técnica.

Esses resultados demonstram que NPsAg-PV se mostraram como os agentes mais eficazes frente a *E. faecalis*, seguidas pela associação Ca(OH)_2 +NPsAg-PV e também pelo EHPV. A própolis vermelha de Alagoas estava presente em todos esses grupos, o que indica a marcante atividade desse produto natural sobre *E. faecalis*, que apresentou melhor efeito bacteriostático que o Ca(OH)_2 , isso pode estar relacionado à alta concentração de substâncias com atividade antimicrobiana em sua composição, descrita por Andrade *et al.* (2017), Santos *et al.* (2019) e Silva *et al.* (2020).

Diante do exposto, vale ressaltar que diferenças na metodologia dos ensaios microbiológicos, como o tipo de micro-organismo utilizado e as condições de cultivo, bem como na composição das amostras e o tipo de veículo utilizado podem ter influência nas diferenças entre os resultados encontrados neste estudo em relação a outros publicados na literatura científica. Como também, diversos parâmetros são capazes de influenciar a atividade biológica das NPs de prata, dentre eles, pH, concentração de AgNO_3 , tempo de síntese, temperatura, método de extração de vegetais ou micro-organismo empregado na síntese, no caso da biogênica, tipo de síntese (química, física ou biológica), morfologia e tamanho. Assim, espera-se distintos resultados para NPs produzidas em diferentes condições e com diferentes materiais (ALABDULMOHSEN; SAAD, 2017; NAZERI, GHAIOUR; ABBASI, 2019; EBRAHIMZADEH *et al.*, 2020; PATIL; KIM, 2018; ABDI, 2010).

Para o Ca(OH)_2 tanto sua eficácia como sua baixa atividade sobre *E. faecalis* é apontada na literatura, Santos *et al.* (2016) não atribuíram atividade antimicrobiana na concentração de 1.200 $\mu\text{g/mL}$ ao Ca(OH)_2 com PEG através do teste de disco-difusão. Uma CIM de 10.000 $\mu\text{g/mL}$ também foi indicada para Ca(OH)_2 com propilenoglicol, um veículo semelhante ao PEG, e na formulação que teve como veículo a água destilada (REZENDE, 2009). Por outro lado, Abbaszadegan *et al.* (2016) utilizando

Ca(OH)₂ com PEG 400 indicaram uma CIM e CBM de 100 e 1.000 µg/mL, respectivamente, sobre *E. faecalis*, o que corrobora a obtenção de diferentes resultados a depender do protocolo de estudo aplicado.

Righi *et al.* (2011) investigaram própolis vermelha do estado de Alagoas, seu extrato metanólico também demonstrou ação bacteriostática moderada sobre *E. faecalis*, CIM de 512 µg/mL. Contudo, a CBM não foi determinada na faixa de concentração testada, e a concentração necessária para inibir o crescimento de *E. faecalis* foi maior em comparação às espécies bacterianas *P. aeruginosa*, *B. subtilis* e ao fungo *C. albicans*.

Ainda, Nazeri, Ghaiour e Abbasi (2019) compararam a atividade sobre *E. faecalis*, *S. mutans* e *L. acidophilus* de um enxaguatório bucal a base de própolis obtida da região ocidental da província de Isfahan, no Irã, na primavera de 2017, com enxaguatórios utilizados tradicionalmente na odontologia e de ação antimicrobiana comprovada (clorexidina e Listerine), descrevendo melhor eficiência para o produto que possuía a própolis como princípio ativo. Esse estudo mostrou que sobre *E. faecalis* o extrato etanólico de própolis iraniana teve uma CIM de 300 µg/mL, que foi igual a obtida para *S. mutans* e maior que a de *S. aureus*, cuja CIM foi de 150 µg/mL, e quando comparado à clorexidina e ao Listerine sobre *E. faecalis* e *S. mutans* foi considerado mais eficiente.

Frente a *S. mutans*, micro-organismo fortemente associado à patogênese da cárie dental, extrato hidroalcoólico de própolis vermelha obtida da região Nordeste do Brasil, produzido por Martins *et al.*, 2018, mostrou CIM e CBM de 293 µg/mL e 1.172 µg/mL, respectivamente, possuindo um efeito bacteriostático moderado, como já indicado na literatura.

Esses estudos comprovam a efetividade da própolis contra bactérias presentes em importantes doenças estomatológicas. As variações quanto à atividade biológica podem ser associadas a diferenças no protocolo do preparo do extrato e na composição química da própolis utilizada.

Em relação às NPs de prata, Krishnan, Arumugam e Vasaviah (2015) encontraram CIM e CBM de 5.000 µg/mL para NPs de prata comerciais sobre *E. faecalis*, um valor dez vezes maior ao encontrado neste estudo, que pode ter sido influenciado pela diferente metodologia de síntese empregada, que não foi detalhada em sua pesquisa. E, Barbosa *et al.* (2019) também indicaram uma menor atividade de NPs de

prata sintetizadas por método químico sobre espécies bacterianas e fúngicas em relação a NPs de prata biossintetizadas com própolis vermelha.

Referente à síntese de NPs de prata com própolis, Kischkel *et al.* (2020) sintetizaram NPs de prata utilizando extrato etanólico de própolis verde, obtida de colmeias do estado do Paraná (região Sul do Brasil) atestando sua atividade antifúngica sobre diversas espécies, dentre elas, *C. albicans*, *C. krusei* e *C. glabrata*, espécies que podem estar presentes na infecção dos canais radiculares (JAFARI *et al.*, 2017). Barbosa *et al.* (2019) sintetizaram NPs de prata com própolis vermelha alagoana comprovando sua efetividade antifúngica sobre *Cryptococcus neoformans* e *C. albicans*, além da antibacteriana sobre *S. aureus*, *S. epidermidis*, *E. coli* e *P. aeruginosa*.

Por sua vez, Panáček *et al.* (2006) através da síntese verde obtiveram quatro tipos de NPs de prata reduzidas pelos dissacarídeos maltose e lactose, indicando uma CIM correspondente à CBM sobre cepa de *E. faecalis* padrão ATCC de 13,5 µg/mL e 54 µg/mL, respectivamente, e na redução utilizando os mononossacarídeos glicose e galactose a CIM e CBM não foram encontradas nas concentrações testadas. Essas NPs também foram agentes bacteriostáticos e bactericidas sobre cepas clínicas de *S. aureus* resistente à meticilina, *S. epidermidis* resistente à meticilina, *E. faecium* resistente à vancomicina, *Klebsiella pneumoniae* produtoras de Beta-Lactamase de Espectro Estendido (ESBL-positivo), para *E. faecalis* a CIM e CBM foram maiores ou iguais às empregadas para as cepas clínicas resistentes.

Já Ebrahimzadeh *et al.* (2020) sintetizaram NPs de prata tendo como agente redutor extrato dos frutos oriundos de espinheiro da espécie *Crataegus pentagyna* com CBM maiores para cepas de *K. pneumoniae* (ATCC 700603) e *S. aureus* (ATCC 29213), quando comparadas a de *E. faecalis* (ATCC 29212), e CIM maior apenas para *K. pneumoniae*. Quanto à sensibilidade ao ciprofloxacino, a CIM foi menor para *K. pneumoniae* em relação à encontrada para *S. aureus* e *E. faecalis*. Também demonstraram que *E. faecalis* resistente à ampicilina, canamicina, eritromicina, levofloxacino, teicoplanina, tetraciclina e vancomicina foi sensível a essas NPs de prata biossintetizadas.

Nesrin *et al.* (2020) biossintetizaram NPs de prata a partir de extrato aquoso de planta da espécie *Rhododendron ponticum* demonstrando CIM e CBM de 250 µg/mL e 500 µg/mL, respectivamente, e utilizando-se o extrato etanólico da mesma planta a inibição do crescimento bacteriano não foi comprovada sobre *E. faecalis*.

Ainda, Lediga *et al.* (2018), testaram NPs biossintetizadas a partir de plantas medicinais originárias do Sul da África, na aplicação da espécie *Sclerocarya birrea*, denominada popularmente como marula ou canhoeiro, sobre *E. faecalis* foi mostrada CIM de 30 µg/mL, resultado que se assemelha ao das NPs Ag-PV deste estudo, e com o uso da planta da espécie *Eucomis autumnalis*, conhecida como lírio de abacaxi do outono, uma CIM de 130 µg/mL, já para as NPs biossintetizadas com o extrato aquoso das mesmas plantas 8.000 µg/mL e maior que 8.000 µg/mL, respectivamente. Isso ilustra as diferentes atividades biológicas das NPs relacionadas às diversas variáveis, ressaltando-se que a alteração de apenas uma variável da síntese, o tipo de agente redutor, foi suficiente para causar uma significativa diferença entre o potencial antibacteriano das diferentes NPs.

Apesar das diferenças citológicas entre as células Gram-positivas e Gram-negativas, Barbosa *et al.* (2019) indicaram que NPs de prata com própolis apresentaram desempenho variável em relação a esses tipos celulares, já quanto ao extrato hidroalcoólico de própolis vermelha para o efeito bacteriostático uma maior concentração foi necessária para inibição das espécies Gram-negativas *P. aeruginosa* e *E. coli*, em comparação às Gram-positivas *S. aureus* e *S. epidermidis*. Por sua vez, a concentração bactericida mínima desse extrato sobre *P. aeruginosa* e *E. coli* foi igual à encontrada para *S. epidermidis*. Já Silva *et al.* (2020) indicaram que extrato de própolis vermelha de Alagoas exerceu atividade antimicrobiana sobre bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, mostrando maior eficácia sobre as Gram-positivas

Rezende (2009) associaram extrato seco de própolis de Ribeirão Preto, São Paulo, Ca(OH)₂ e propilenoglicol, este um veículo viscoso semelhantemente ao PEG, demonstrando uma CIM de 10.000 µg/mL contra *E. faecalis*, valor que corresponde a vinte vezes ao encontrado neste estudo, que pode estar relacionado às diferenças entre os materiais e os protocolos utilizados, e em espécimes de dentina essa associação não foi capaz de inibir o biofilme de *E. faecalis*. Isso também ilustra a importância dos ensaios *ex vivo*, nos quais podem se avaliar o efeito da substância a ser testada no biofilme formado sobre uma superfície. E, Sanchez-Ayala, Silveira e Santos (2008) compararam o potencial antibacteriano sobre *E. faecalis* entre uma pasta de Ca(OH)₂ e sua combinação com extrato etanólico de própolis, demonstrando redução da atividade para a associação, atribuindo a isso a sua menor capacidade de difusão, acarretada pela incorporação da própolis.

Quanto ao $\text{Ca}(\text{OH})_2$ combinado a NPs de prata convencionais, Alabdulmohsen e Saad (2017) compararam o efeito entre uma pasta de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ comercial (Calasept® Plus, Nordiska Dental, Suécia) e NPs de prata comerciais na forma de gel (Huzheng® Nano Technology Co, Ltd, Shanghai, China) com concentração de 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$, indicando melhor desempenho para a pasta de $\text{Ca}(\text{OH})_2$, seguida pela mistura entre pasta de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ e NPs de prata, na proporção de 1:2 em relação ao volume, e menor desempenho para as NPs de prata, que foram consideradas como inefetivas, o estudo considerou o período de uma e duas semanas. Dessa forma, as NPs de prata apresentaram um inferior efeito antibacteriano em comparação ao $\text{Ca}(\text{OH})_2$ e à combinação de ambas as substâncias. Por outro lado, Afkhami *et al.* (2015) demonstraram melhor efeito para uma combinação entre pasta de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ à 30% e coloide de prata à 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, na proporção de 1:1 quanto ao volume, em relação à pasta de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ à 30%, após um período de sete dias. Essas discordâncias podem estar associadas a diferenças na composição química e nas concentrações das substâncias avaliadas, bem como nas metodologias empregadas nos experimentos.

Não foram encontrados estudos que avaliaram a eficácia de NPs de prata sintetizadas com própolis e sua associação com $\text{Ca}(\text{OH})_2$, nem entre NPs de prata sintetizadas convencionalmente associadas a extrato de própolis frente a *E. faecalis*.

5.3.2 Ensaio *ex vivo*

Decorridos os períodos experimentais, a avaliação demonstrou que na concentração de 2.000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ todas as substâncias se mostraram efetivas sobre biofilme de *E. Faecalis*, não exibindo nenhuma UFC, à exceção das NPs_{Ag} que para o período experimental de um dia apresentou UFCs. Os resultados deste estudo se assemelham aos já indicados na literatura, como descrito abaixo.

Quanto às UFCs presentes no tratamento com NPs_{Ag}, à coloração de Gram foi observado arranjo compatível ao observado para cocos Gram-positivos, ao CHRO-Magar Orientation as colônias mostraram-se características do padrão para *Enterococcus*, com coloração azul-esverdeado, o teste de catalase foi negativo, característica do gênero *Enterococcus*, e ao MTS houve a turvação do meio indicando o crescimento bacteriano, após o teste do MTS foi feita nova coloração de Gram, sendo observada a presença de morfologia compatível com a apresentada por cocos Gram-

positivos, sendo possível indicar que não foram *Streptococcus* spp. que se desenvolveram, mas *Enterococcus* spp.

Quanto à pasta de Ca(OH)_2 , Plutzer, Zilm, Ratnayake e Cathro (2017) indicaram a redução de UFCs em mais que 99,9% após um período de 24 h e 48 h, sobre biofilme de *E. faecalis* (ATCC 29212 e 51299) formado em dentina humana, já Chai *et al.* (2007) demonstraram que a pasta de Ca(OH)_2 apresentou efetividade de 100% sobre biofilme de *E. faecalis* (ATCC 29212) formado sobre discos de filtro de membrana de nitrato de celulose estéril, após o intervalo de 1 hora.

Madhubala, Srinivasan e Ahamed (2011) testaram amostra de própolis comercial obtida de um produtor da cidade de Calgary do Canadá sobre biofilme de *E. faecalis* (ATCC 29212), formado em dentina de incisivos centrais maxilares permanentes extraídos, demonstrando redução de 92,54% após 1 dia e 100% após 2 e 7 dias na contagem de UFCs.

Por sua vez, Almeida *et al.* (2015) utilizando NPs de prata comerciais à 10.000 $\mu\text{g/mL}$ em suspensão como irrigante intracanal indicaram uma redução de 97,6% na contagem de UFCs, após um período de 7 dias, em biofilme de *E. faecalis* (ATCC 29212) formado em dentina obtida de dentes humanos. Almeida *et al.* (2015) não detalhou a síntese das NPs de prata utilizadas, e vale ressaltar que as NPs_{Ag} sintetizadas com citrato de sódio apresentam a vantagem de que este possui atividade antimicrobiana quando considerados métodos que apresentam apenas o nitrato de prata com atividade sobre micro-organismos (NAGAOKA *et al.*, 2010).

Ao associar Ca(OH)_2 na concentração de 350 mg/mL a extrato etanólico de própolis (5 mg), própolis obtida dos laboratórios Apiter, localizados em Montevidéu no Uruguai, Carpio-Perochena *et al.* (2017) indicaram uma redução de 95% na contagem de UFCs após um período de 7 e 14 dias quando aplicado sobre biofilme de *E. faecalis* (ATCC 29212) formado sobre dentina, o estudo também utilizou dentes humanos.

Balto *et al.* (2020) combinaram Ca(OH)_2 a NPs de prata na concentração de 200 $\mu\text{g/mL}$, na proporção de 1:1 quanto à concentração, indicando uma redução das células viáveis de 90,85% e 98,49% após 14 e 28 dias, respectivamente, referente a biofilme de *E. faecalis* (ATCC 29212) formado em blocos de dentina de dentes extraídos. Já Afkhami *et al.* (2015), também sobre biofilme de *E. faecalis* (ATCC 29212) formado em blocos de dentina humana, indicaram a redução de quase 100% de UFCs

quando aplicado tratamento com Ca(OH)_2 à 300 mg/mL combinado a NPs de prata à 100 $\mu\text{g/mL}$, na proporção de 1:1 em relação volume, pelos períodos de 7 e 30 dias.

Diante do que já é descrito na literatura, é observada a indicação da efetividade das substâncias acima citadas sobre biofilme de *E. faecalis*, o que está em concordância com os resultados obtidos neste estudo, com variações que podem estar associadas às diferenças na metodologia dos ensaios, aspecto que já foi bem discutido em seções anteriores. Não foram encontrados estudos que investigaram o tratamento de biofilme de *E. faecalis* em dentes humanos extraídos empregando NPs de prata combinadas a extrato de própolis vermelha, NPs de prata sintetizadas com própolis vermelha, Ca(OH)_2 combinado a NPs de prata e extrato de própolis vermelha e Ca(OH)_2 associado a NPs de prata sintetizadas com própolis vermelha.

Também vale ressaltar o já descrito por Seneviratne *et al.* (2017), Anderson *et al.* (2016) e Samiei *et al.* (2016), que o biofilme formado no interior da cavidade bucal é caracteristicamente mais persistente que o formado de modo *ex vivo*, apresentando uma estrutura mais organizada, sendo formado por variadas micro-organismos, que constituem um biofilme polimicrobiano, com atuação de fatores de regulação que atuam para seu fortalecimento, de modo que em ensaios *in vivo* pode ser necessário o aumento da concentração das formulações utilizadas para que seja observada efetividade antimicrobiana.

Assim, diante das dificuldades na terapia endodôntica relacionadas à persistência bacteriana, as NPs_{Ag}-PV produzidas neste estudo destacam-se por seu excelente efeito sobre *E. faecalis*. A análise de seu potencial antimicrobiano sobre biofilme foi de grande valia para avanços das pesquisas quanto à sua contribuição na área da endodontia, pois os ensaios *ex vivo* podem apresentar resultados contrastantes aos obtidos nos experimentos *in vitro*, como demonstrado por Rezende (2009).

6 CONCLUSÃO

Através deste estudo foram sintetizadas NPs_{Ag}-PV estáveis, com tamanho condizente com o descrito na literatura e PDI dentro do intervalo considerado adequado, que apresentaram atividade frente a *E. faecalis* superior em relação aos outros compostos, sendo classificada como uma substância de excelente ação bacteriostática, cuja concentração correspondeu à bactericida.

Tendo em visto isso, é possível afirmar que a própolis vermelha de Alagoas utilizada como agente estabilizante e de revestimento das NPs de prata contribuiu para o aperfeiçoamento de sua atividade antimicrobiana. Na associação com o Ca(OH)_2 demonstrou a melhor atividade bacteriostática em relação às demais combinações com o Ca(OH)_2 , demonstrando potencial antimicrobiano igual ao do EHPV, o segundo melhor em relação às demais substâncias.

Destaca-se o maior desempenho de tais compostos em comparação ao Ca(OH)_2 , um antimicrobiano utilizado tradicionalmente na endodontia. Desse modo, as NPsAg-PV mostram-se como agentes promissores ao tratamento de infecções persistentes no canal radicular, nas quais tem sido descrita a alta prevalência de *E. faecalis*, um patógeno com grande capacidade de adaptação.

Além disso, o ensaio *ex vivo* demonstrou que na concentração de 2.000 $\mu\text{g/mL}$ as substâncias foram efetivas sobre biofilme de *E. faecalis*, observando-se UFCs apenas para o intervalo de um dia ao tratamento com NPsAg.

REFERÊNCIAS

ABBASZADEGAN, Abbas *et al.* Antimicrobial and Cytotoxic Activity of Cinnamomum zeylanicum, Calcium Hydroxide, and Triple Antibiotic Paste as Root Canal Dressing Materials. **The Journal of Contemporary Dental Practice**, v. 12, n. 2, p. 105–113, 2016.

ABINADER, Cláudia Dias. **Avaliação *In Vitro* da Atividade Antimicrobiana da Pasta De Hidróxido De Cálcio Associada a Diferentes Veículos Frente à *Candida Albicans* e ao *Enterococcus faecalis***. 2005. 141 p. Dissertação (Mestrado Multidisciplinar em Patologia Tropical) - Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2005.

AFKHAMI, Farzaneh *et al.* Antibiofilm efficacy of silver nanoparticles as a vehicle for calcium hydroxide medicament against *Enterococcus faecalis*. **Journal of Dentistry**, v. 43, n. 12, p. 1573–1579, 2015.

Agência Brasileira de Desenvolvimento Industrial. **Cartilha sobre Nanotecnologia**. Brasília: ABDI, 2010.

Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **RESOLUÇÃO – RDC Nº 24, DE 14 DE JUNHO DE 2011**. Brasília: ANVISA, 2011.

ALABDULMOHSEN, Zainab Ali; SAAD, Abdelhamied Yousef. Antibacterial effect of silver nanoparticles against *Enterococcus faecalis*. **Saudi Endodontic Journal**, v. 7, n. 1, p. 29–35, 2017.

ALBERNAZ, Vanessa Lima. **Síntese verde de nanopartículas de prata com extrato aquoso de folhas de *Brosimum gaudichaudii*, caracterização físicoquímica, morfológica e suas aplicações no desenvolvimento de um nanobiossensor eletroquímico**. 2014. 121 p. Dissertação (Mestrado em Nanociência e Nanobiotecnologia) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, Brasília, 2014.

ALMEIDA, Dayse Chaves Cardoso de. **Efeito da própolis vermelha brasileira sobre a cor e a resistência de união da interface dentina/resina**. 2014. 47 p. Dissertação (Mestrado Profissional Pesquisa em Saúde) - Programa de Pós-Graduação Pesquisa em Saúde, Centro Universitário CESMAC, Maceió, 2014.

ALMEIDA, Eryka Tayse da Cruz *et al.* Chemical and microbiological characterization of tinctures and microcapsules loaded with Brazilian red propolis extract. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v. 7, n. 5, p. 280–287, 2017.

ALMEIDA, Josiane *et al.* Tratamento do biofilme intracanal de *Enterococcus faecalis* com suspensões de diferentes nanopartículas e irrigantes convencionais. **Arquivos em Odontologia**, v. 51, n. 1, p. 32–38, 2015.

- ALMEIDA, Wanessa A. da S. *et al.* Photoprotective activity and increase of SPF in sunscreen formulation using lyophilized red propolis extracts from Alagoas. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 29, n. 3, p. 373–380, 2019.
- ALVES, Elizângela; KUBOTA, Ernesto Hashime. Conteúdo de fenólicos, flavonoides totais e atividade antioxidante de amostras de própolis comerciais. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 34, n. 1, p. 37–41, 2013.
- American Type Culture Collection (ATCC). **ATCC Genome Portal**. Virgínia: ATCC (company). Disponível em: genomes.atcc.org/genomes/0141a04d6a684bef?tab=annotations-tab. Acesso em: 21 jun. 2021.
- ANDERSON, Annette C. *et al.* *Enterococcus faecalis* from Food, Clinical Specimens, and Oral Sites: Prevalence of Virulence Factors in Association with Biofilm Formation. **Frontiers in Microbiology**, v.6. n. 1534, 2016.
- ANDRADE, Eduardo Dias de. **Terapêutica Medicamentosa em Odontologia**. 3 ed. São Paulo: Artes Médicas, 2014.
- ANDRADE, Julianna Karla Santana *et al.* Evaluation of bioactive compounds potential and antioxidant activity of brown, green and red propolis from Brazilian northeast region. **Food Research International**, v. 101, p. 129–138, 2017.
- ANJUM, Syed Ishtiaq *et al.* Composition and functional properties of propolis (bee glue): A review. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 26, n. 7, p. 1695–1703, 2019.
- ARAÚJO, Emiliane Andrade *et al.* Aspectos coloidais da adesão de micro-organismos. **Química Nova**, v. 33, n. 9, p. 1940–1948, 2010.
- ASHARANI, P.V; MUN, G. L. K, HANDE, M. P; VALIYAVEETTIL, S. Cytotoxicity and genotoxicity of Silver nanoparticles in human cells. **Acs Nano**, v. 3. n. 2, p. 279–290, 2009.
- ATHANASSIADIS, Basil; WALSH, Laurence J. Aspects of Solvent Chemistry for Calcium Hydroxide Medicaments. **Materials**, v. 10, n. 10, p. 1219, 2017.
- BALTO, Hanan *et al.* Combined effect of a mixture of silver nanoparticles and calcium hydroxide against *Enterococcus faecalis* biofilm. **Journal of Endodontics**, v. 46, n. 11, p. 1689–1694, 2020.
- BAPAT, Ranjeet Ajit *et al.* An overview of application of silver nanoparticles for biomaterials in dentistry. **Materials Science and Engineering C**, v. 91, p. 881–898, 2018.
- BARAS, Bashayer H. *et al.* Novel bioactive root canal sealer with antibiofilm and remineralization properties. **Journal of Dentistry**, v. 83, p. 67–76, 2019.
- BARBOSA, Valcilaine Teixeira *et al.* Biogenic synthesis of silver nanoparticles using Brazilian propolis. **Biotechnology Progress**, 35: e2888, 2019.

BARUA, Shaswat *et al.* Non-hazardous anticancerous and antibacterial colloidal “green” silver nanoparticles. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 105, p. 37–42, 2013.

BERBEĆ, Sylwia; ZOŁĄDEK, Sylwia; KULESZA, Paweł J.; PAŁYS, Barbara. Silver nanoparticles stabilized by polyoxotungstates. Influence of the silver – Polyoxotungstate molar ratio on UV/Vis spectra and SERS characteristics. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 854, 2019, 113537.

BERTO, Arnaldo Moreno. Adequação das propriedades de tintas e vidrados aos sistemas de aplicação e técnicas decorativas. Parte I: Esmaltação. **Cerâmica Industrial**, v. 5, n. 5, p. 11–18, 2000.

BEZERRA, Patricia Amanda da Silva Andrade Macêdo *et al.* Principais Patologias Orofaciais Recorrentes em Serviços de Urgências Odontológicas: Uma Revisão da Literatura. **Revista de Psicologia**, v. 9, n. 27, p. 167–177, 2015.

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

BRAYDICH-STOLLE, L.; HUSSAIN, S.; SCHLAGER, J. J.; HOFMANN, M. C. *In vitro* cytotoxicity of nanoparticles in mammalian germline stem cells. **Toxicological Sciences**, v. 88, p. 412–419, 2005.

BUENO-SILVA, Bruno *et al.* The effect of seasons on Brazilian red propolis and its botanical source: chemical composition and antibacterial activity. **Natural Product Research**, v. 31, n. 11, p. 1318–1324, 2017.

BYLKA, Wiesława; MATLAWSKA, Irena; PILEWSKI, N. A. Natural flavonoids as antimicrobial agents. **Jana**, v. 7, n. 2, p. 9–16, 2004.

CALDERÓN-MONTAÑO, Jose Manuel; BURGOS-MORÓN, Estefania; PÉREZ-GUERRERO, Concepción; LÓPEZ-LÁZARO, Miguel. A Review on the Dietary Flavonoid Kaempferol. **Mini reviews in medicinal chemistry**, v. 11, n. 4, p. 298–344, 2011.

CARLI, A. D. **Capacidade antibacteriana da própolis de *Apis mellifera* associada ao fluoreto de sódio no controle do biofilme dental**. 2007. 115 p. Dissertação (Mestrado em Saúde e Desenvolvimento) - Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, 2007.

CARPIO-PEROCHENA, Aldo del *et al.* Antibacterial Properties of Chitosan Nanoparticles and Propolis Associated with Calcium Hydroxide against Single- and Multispecies Biofilms: An *In Vitro* and *In Situ* Study. **Journal of Endodontics**, v. 43, n. 8, p. 1332–1336, 2017.

CAVENDISH, Rodrigo Lima *et al.* Antinociceptive and anti-inflammatory effects of Brazilian red propolis extract and formononetin in rodents. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 173, p. 127–133, 2015.

CEPEDA-PÉREZ, Elisa *et al.* Evaluation of bacterial presence in the root canal by Raman spectroscopy: A preliminary study. **Biomedical Physics and Engineering Express**, v. 2, n. 6, 2016.

CHAI, WEN L. *et al.* Susceptibility of *Enterococcus faecalis* biofilm to antibiotics and calcium hydroxide. **Journal of Oral Science**, v. 49, n. 2, p. 161–166, 2007.

CHANDRA, Harish; KUMARI, Pragati; BONTEMPI, Elza; YADAV, Saurabh. Medicinal plants: Treasure trove for green synthesis of metallic nanoparticles and their biomedical applications. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 24, p. 101518, 2020.

CHOI, Okkyoung *et al.* The inhibitory effects of silver nanoparticles, silver ions, and silver chloride colloids on microbial growth. **Water Research**, v. 42, n. 12, p. 3066–3074, 2008.

Clinical and Laboratory Standards Institute. **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically**. CLSI document M07. Wayne: CLSI, 2012.

Comissão Europeia. **O que são nanomateriais? Comissão europeia abre novos caminhos como uma definição comum**. União Europeia, 2011.

COOPER, Paul R.; CHICCA, Ilaria J.; HOLDER, Michael J.; MILWARD, Michael R. Inflammation and Regeneration in the Dentin-pulp Complex: Net Gain or Net Loss? **Journal of Endodontics**, v. 43, n. 9, p. S87–S94, 2017.

CHROMAGAR. **CHROMagar™ Orientation Instructions for Use**. CHROMAGAR: CHROMagar Microbiology, 2020.

DAUGSCH, Andreas; MORAES, Cleber S.; FORT, Patricia; PARK, Yong K. Brazilian red propolis - Chemical composition and botanical origin. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 5, n. 4, p. 435–441, 2008.

DEVEQUI-NUNES, Danielle *et al.* Chemical characterization and biological activity of six different extracts of propolis through conventional methods and supercritical extraction. **PLoS ONE**, v. 13, n. 12, p. e0207676, 2018.

DIAS, Denise Bianchini; BAUSELLS, HELDA, Ilka Iost; LIA, Raphael Carlos Comelli; ESBERARD, Roberto Miranda. **Efeito de materiais**. v. 17, p. 27–42, 1988.

DIAS, Luís G.; PEREIRA, Ana Paula; ESTEVINHO, Leticia M. Comparative study of different Portuguese samples of propolis: pollinic, sensorial, physicochemical, microbiological characterization and antibacterial activity. **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, n. 12, p. 4246–53, 2012.

EBRAHIMZADEH, Mohammad Ali *et al.* Green and facile synthesis of Ag nanoparticles using *Crataegus pentagyna* fruit extract (CP-AgNPs) for organic pollution dyes degradation and antibacterial application. **Bioorganic Chemistry**, v. 94, 2020.

ESTRELA, Carlos; SYDNEY, Gilson Blitzkow; BAMMANN, Lili Luschke; OSWALDO, Felipe Júnior. 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.

FELTEN, Rafaela Dutra; MAGNUS, Karen; SANTOS, Lidiane dos; SOUZA, Alessandra Hubner de. Interações medicamentosas associadas a fitoterápicos fornecidos pelo Sistema Único de Saúde. **Inova Saúde**, v. 4, n. 1, p. 47–64, 2015.

FERNANDES, Patrícia Érica. **Síntese, caracterização e ação antimicrobiana de nanopartículas de prata**. 2014. 87 p. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2014.

FOUAD, Ashraf F. Microbial Factors and Antimicrobial Strategies in Dental Pulp Regeneration. **Journal of Endodontics**, v. 43, n. 9, p. S46–S50, 2017.

FRANCHIN, Marcelo *et al.* The use of Brazilian propolis for discovery and development of novel anti-inflammatory drugs. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 153, p. 49–55, 2018.

FRANCHIN, Marcelo *et al.* Vestitol Isolated from Brazilian Red Propolis Inhibits Neutrophils Migration in the Inflammatory Process: Elucidation of the Mechanism of Action. **Journal of Natural Products**, v. 79, n. 4, p. 954–960, 2016.

FRANCHIN, Marcelo. **Atividade *in vivo* e *in vitro* de compostos isolados de própolis brasileiras sobre a modulação do processo inflamatório**. 2016. 100 p. Tese (Doutorado em Odontologia) – Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas, Piracicaba, 2016.

FREITAS, Marcia Christina Dornelas de *et al.* Biological Activities of Red Propolis: A Review. **Recent Patents on Endocrine, Metabolic & Immune Drug Discovery**, v. 11, n. 1, p. 3–12, 2018.

GARGOURI, Wafa *et al.* Effect of xylitol chewing gum enriched with propolis on dentin remineralization in vitro. **Archives of Oral Biology**, v. 112, p. 104684, 2020.

GOMES, Brenda Paula Figueiredo de Almeida *et al.* Microbial Susceptibility to Calcium Hydroxide Pastes and Their Vehicles. **Journal of Endodontics**, v. 28, n. 11, p. 758–761, 2002.

GREULICH, Christina Sengstock *et al.* Uptake and intracellular distribution of silver nanoparticles in human mesenchymal stem cells. **Acta Biomaterialia**, v. 7, p. 347–354, 2011.

HOLETZ, Fabíola Barbiéri *et al.* Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 7, p. 1027–1031, 2002.

International Standardization Organization. ISO 6876: Dentistry – root canal sealing materials. Geneva: **ISO**, 2012.

- JADHAV, Rajashree Dhananjay *et al.* Silver nanoparticles: a new perspective in endodontic therapy. **IIOAB Journal**, v. 7, n. 6, p. 77–81, 2016.
- JAFARI, Farnaz *et al.* Antifungal Activity of Two Root Canal Sealers against Different Strains of *Candida*. **Iranian Endodontic Journal**, v. 12, n. 1, p. 98–102, 2017.
- JAIN, Hansa; MULAY, Sanjyot; MULLANY, Peter. Persistence of endodontic infection and *Enterococcus faecalis*: Role of horizontal gene transfer. **Gene Reports**, v. 5, p. 112–116, 2016.
- JUNGES, Alexander. Estudo da síntese de nanopartículas metálicas de paládio para uso em catalase heterogênea. 2011. 86 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Processos) - Centro de Tecnologia, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2011.
- KIM, Betty Y. S.; Rutcka James T.; Chan Warren C. W. Nanomedicine. **New England Journal of Medicine**, v. 363, n.25, p. 2434-43, 2010.
- KIM, Keuk Jun *et al.* Antifungal activity and mode of action of silver nano-particles on *Candida albicans*. **BioMetals**, v. 22, n. 2, p. 235–242, 2009.
- KISCHKEL, Brenda *et al.* Silver nanoparticles stabilized with propolis show reduced toxicity and potential activity against fungal infections. **Future Microbiology**, v. 15, n. 7, p. 521–539, 2020.
- KOC, Simay; FABRO, Massimo Del. Does the Etiology of Pulp Necrosis affect Regenerative Endodontic Treatment Outcomes? A Systematic Review and Meta-Analyses. **Journal of Evidence Based Dental Practice**, v. 20, n. 1, p. 101400, 2020.
- KONEMAN E.W. *et al.* **Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology**. 7 ed. Filadélfia: Lippincott, 2016.
- KRISHNAN, Ramesh; ARUMUGAM, Vijay; VASAVIAH, Suresh Kumar. The MIC and MBC of Silver Nanoparticles against *Enterococcus faecalis* - A Facultative Anaerobe. **Journal of Nanomedicine & Nanotechnology**, v. 6, n.3, 2015.
- LAPRESTA-FERNÁNDEZ, Alejandro; FERNÁNDEZ, Asuncion; BLASCO, Julian. Nanoecotoxicity effects of engineered silver and gold nanoparticles in aquatic organisms. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 32, n. 797, p. 40–59, 2012.
- LEDIGA, Mahlatse Evah *et al.* Biosynthesis and characterisation of antimicrobial silver nanoparticles from a selection of fever-reducing medicinal plants of South Africa. **South African Journal of Botany**, v. 119, 2018.
- LEI-XIONG *et al.* Enzymolysis-ultrasonic assisted extraction of flavanoid from *Cyclocarya paliurus* (Batal) Iljinskaja:HPLC profile, antimicrobial and antioxidant activity. **Industrial Crops and Products**, v. 130, p. 615–626, 2019.
- LEONARDI, Denise Piotto *et al.* Alterações pulpares e periapicais. **Revista Sul Brasileira de Odontologia**, v. 8, n. 4, p. 47–61, 2011.

LIEBLICH, Stuart E. Endodontic surgery. **Dental Clinics of North America**, v. 56, p. 121–132, 2012.

LIMA, Stella Maris de Freitas *et al.* Antimicrobial peptide-based treatment for endodontic infections - Biotechnological innovation in endodontics. **Biotechnology Advances**, v. 33, n. 1, p. 203–213, 2015.

LÓPEZ-ABARRATEGUI, Carlos *et al.* Nanoparticles: A Promise for Host Defense Peptide Therapeutics. **Biological and Pharmaceutical Applications of Nanomaterials**, p. 131–150, 2015.

MADHUBALA, Manavalan Madhana; NARASIMHAN, Srinivasan; SHAFIE, Ahamed. Comparative Evaluation of Propolis and Triantibiotic Mixture as an Intracanal Medicament against *Enterococcus faecalis*. **Journal of Endodontics**, v. 37, n. 9, p. 1287–1289, 2011.

MAHENDRAN, Ganesan; RAHMAN, Laiq Ur. Ethnomedicinal, phytochemical and pharmacological updates on Peppermint (*Mentha x piperita* L.)– A review. **Phytotherapy Research**, p. 1–52, 2020.

MALVERN. **Zetasizer Nano Series User Manual**. Malvern: Malvern Instruments, 2004.

MARTINS, Mariana Leonel *et al.* Efficacy of red propolis hydro-alcoholic extract in controlling *Streptococcus mutans* biofilm build-up and dental enamel demineralization. **Archives of Oral Biology**, v. 93, p. 56–65, 2018.

MASHWANI, Zia-ur-Rehman; KHAN, Tariq; KHAN, Mubarak Ali; NADHMAN, Akhtar. Synthesis in plants and plant extracts of silver nanoparticles with potent antimicrobial properties: current status and future prospects. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 99, n. 23, p. 9923–9934, 2015.

MAURYA, Anil *et al.* α -(-)-bisabolol Reduces Pro-inflammatory Cytokine Production and Ameliorates Skin Inflammation. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v. 15, n. 2, p. 173–181, 2014.

MELANI, Andréa Carla Franchini. **Atividade antibacteriana da própolis de *Apis Mellifera* sobre *Enterococcus Faecalis*: Estudo *In Vitro* e *Ex Vivo***. 2009. 63 p. Dissertação (Mestrado em Saúde e Desenvolvimento) - Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, 2009.

MELLO, Beatriz Camargo Barros de Silveira. **Extração de própolis em meio aquoso e concentração dos extratos por nanofiltração**. 2013. 183 p. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2013.

MENDONÇA, Izabel Cristina Gomes de *et al.* Brazilian red propolis: phytochemical screening, antioxidant activity and effect against cancer cells. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 15, n. 357, 2015.

MORAES, Cleber Silveira. **Própolis de João pessoa-PB, estudo de sua sazonalidade e avaliação de suas atividades biológicas**. 2009. 188 p. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2009.

NACIF, Maria Christina André Moreira; ALVES, Flávio Rodrigues Ferreira. *Enterococcus faecalis* in Endodontics: a challenge to success. **Revista Brasileira de Odontologia**, v. 67, n. 2, p. 209–14, 2010.

NAGAOKA, Seiji *et al.* Antimicrobial activity of sodium citrate against *Streptococcus pneumoniae* and several oral bacteria. **Letters in Applied Microbiology**, v. 51, p. 546–551, 2010.

NAZERI, Rahman; GHAIOUR, Marzieh; ABBASI, Shima. Evaluation of Antibacterial Effect of Propolis and Its Application in Mouthwash Production. **Frontiers in Dentistry**, v. 16, n. 1, p. 1–12, 2019.

NCCLS. **Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard— Eighth Edition**. NCCLS document M2-A8. Wayne: NCCLS, 2003.

NESRIN, Korkmaz *et al.* Biogenic silver nanoparticles synthesized from *Rhododendron ponticum* and their antibacterial, antibiofilm and cytotoxic activities. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 179, 2020.

NETO, Elias Antonio Berni; RIBEIRO, Caue; ZUCOLOTTI, Valtencir. **Síntese de nanopartículas de prata para aplicação na sanitização de embalagens**. Embrapa Instrumentação, Comunicado Técnico, n.99, 2008.

NEVES, Patrícia Bolzan Agnelli das *et al.* Addition of Silver Nanoparticles to Composite Resin: Effect on Physical and Bactericidal Properties *In Vitro*. **Brazilian Dental Journal**, v. 25, n. 2, p. 141–145, 2014.

OGUNSONA, Emmanuel O. *et al.* Engineered nanomaterials for antimicrobial applications: A review. **Applied Materials Today**, v. 18, p. 100473, 2020.

OLIVEIRA, Juciele Valéria Ribeiro de. **Efeito neuroprotetor da formononetina em modelo animal para estudo da doença de Parkinson**. 2016. 86 p. Tese (Doutorado em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia)– Ponto Focal Sergipe, Universidade Federal de Sergipe, Aracaju, 2016.

PAIVA, Lilian Fernanda Santos; THIRÉ, Rossana Mara da Silva Moreira; SOARES, Glória Dulce de Almeida. **Síntese e caracterização de nanopartículas de prata em solução de poli(ácido acrílico)**. In: Programa de Pós-Graduação em Engenharia Metalúrgica e de Materiais, 2012, Rio de Janeiro. Painel. Rio de Janeiro: Instituto Alberto Luiz Coimbra de Pós-Graduação e Pesquisa de Engenharia, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2012.

PANÁČEK, Aleš *et al.* Silver colloid nanoparticles: Synthesis, characterization, and their antibacterial activity. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 110, n. 33, p. 16248–16253, 2006.

- PARMAR, Ankush; KAPIL, Shikha; SACHAR, Shilpee; SHARMA, Shweta. Design of experiment based methodical optimization and green syntheses of hybrid patchouli oil coated silver nanoparticles for enhanced antibacterial activity. **Current Research in Green and Sustainable Chemistry**, v. 3, p. 100016, 2020.
- PAROLIA, Abhishek *et al.* Effectiveness of chitosan-propolis nanoparticle against *Enterococcus faecalis* biofilms in the root canal. **BMC Oral Health**, v. 20, n. 339, 2020.
- PASCHOALINO, Matheus P.; MARCONE, Glauciene P. S.; JARDIM, Wilson F. Os nanomateriais e a questão ambiental. **Química Nova**, v. 33, n. 2, p. 421–430, 2010.
- PATIL, Maheshkumar Prakash; KIM, Gun-Do. Marine microorganisms for synthesis of metallic nanoparticles and their biomedical applications. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 172, p. 487–495, 2018.
- PIMENTA, Hévelin Couto. **Potencial antimicrobiano de medicações intracanáis a base de própolis marrom sobre *Enterococcus faecalis***. 2013. 103 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Odontológicas Integradas) – Universidade de Cuiabá-UNIC, Cuiabá, 2013.
- PLUTZER B.; ZILM, P.; RATNAYAKE, J.; CATHRO, P. Comparative efficacy of endodontic medicaments and sodium hypochlorite against *Enterococcus faecalis* biofilms. **Australian Dental Journal**, v. 63, n. 2, p. 208–216, 2017.
- RAI, Mahendra. Nanobiotecnologia verde: biossínteses de nanopartículas metálicas e suas aplicações como nanoantimicrobianos. **Ciência e Cultura**, v. 65, n. 3, p. 44–48, 2013.
- REZENDE, Giovanna Pires da Silva Ribeiro de. **Atividade antimicrobiana e propriedades físico-químicas de medicamento endodôntico experimental à base de própolis e hidróxido de cálcio: estudo in vitro**. 2009. 106 p. Tese (Doutorado em Ciências da Saúde) - Convênio Rede Centro-Oeste UnB/UFG/UFMS, Universidade Federal de Goiás, Universidade de Brasília, Universidade de Brasília, 2009.
- RIGHI, Adne A *et al.* Brazilian red propolis: Unreported substances, antioxidant and antimicrobial activities. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 91, n. 13, p. 2363–2370, 2011.
- RODRIGUES, José Filipe Bacalhau *et al.* Aplicação de método estatístico no estudo da influência do peróxido de hidrogênio e do borohidreto de sódio na síntese de nanopartículas de prata (AGNPS). **Matéria**, v. 24, n. 3, e12395, 2019.
- RÓNAVÁRI, Andrea *et al.* Biosynthesized silver and gold nanoparticles are potent antimycotics against opportunistic pathogenic yeasts and dermatophytes. **International Journal of Nanomedicine**, v. 13, p. 695–703, 2018.
- ROY, Nayan *et al.* Biogenic synthesis of Au and Ag nanoparticles by Indian propolis and its constituents. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 76, n. 1, p. 317–325, 2010.

RÓZ, Alessandra Luzia da; LEITE, Fabio Lima; FERREIRA, Marystela; JÚNIOR, Osvaldo Novais de Oliveira. **Nanociência & Nanotecnologia: Nanoestruturas - Princípios e Aplicações**. 1. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2015.

RUFATTO, Luciane Corbellini *et al.* Brazilian red propolis: Chemical composition and antibacterial activity determined using bioguided fractionation. **Microbiological Research**, v. 214, p. 74–82, 2018.

RUFATTO, Luciane Corbellini *et al.* Red propolis: Chemical composition and pharmacological activity. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 7, n. 7, p. 591–598, 2017.

SADEGHI, Zahra; AKABERI, Maryam; VALIZADEH, Jafar. *Otostegia persica* (Lamiaceae): A review on its ethnopharmacology, phytochemistry, and pharmacology. **Avicenna journal of phytomedicine**, v. 4, n. 2, p. 79–88, 2014.

SALOMONI, R. *et al.* Antibacterial effect of silver nanoparticles in *Pseudomonas aeruginosa*. **Nanotechnology, Science and Applications**, v. 10, p. 115–121, 2017.

SAMIEI, Mohammad; FARJAMI, Afsaneh; DIZAJ, Solmaz Maleki; LOTFIPOUR, Farzaneh. Nanoparticles for antimicrobial purposes in Endodontics: A systematic review of in vitro studies. **Materials Science & Engineering C: Materials for Biological Applications**, v. 58, p. 1269–1278, 2016.

SANCHEZ-AYALA, Alfonso; SILVEIRA, Camila Maggi Maia; SANTOS, Elizabete Brasil dos. Adição de própolis ao hidróxido de cálcio e sua influência na ação antibacteriana. **Ciência odontológica brasileira**, v. 11, n. 3, p. 81–86, 2008.

SANTOS, Daniel Sousa dos; FARIAS RODRIGUES, Mayara Mikelle. Atividades farmacológicas dos flavonoides: um estudo de revisão. **Estação Científica**, v. 7, n. 3, p. 29–35, 2017.

SANTOS, Denis Amilton dos *et al.* Brazilian red propolis extracts: study of chemical composition by ESI-MS/MS (ESI+) and cytotoxic profiles against colon cancer cell lines. **Biotechnology Research and Innovation**, v. 3, n. 1, p. 120–130, 2019.

SANTOS, Jacqueline Ferreira Leite *et al.* RESSONÂNCIA DE PLASMON DE SUPERFÍCIE LOCALIZADO E APLICAÇÃO EM BIOSSENSORES E CÉLULAS SOLARES. **Química Nova**, v. 39, n. 9, p. 1098–1111, 2016.

SANTOS, Lucinea Barbosa de Oliveira *et al.* Antimicrobial analysis of copaiba oil extract from *Passiflora cincinnata* and endodontic substances. **Journal of Microbiology and Antimicrobials**, v. 8, n. 6, p. 34–38, 2016.

SANTOS, Sónia A. O. *et al.* Unveiling the Chemistry behind the Green Synthesis of Metal Nanoparticles. **ChemSusChem**, v. 7, n. 9, p. 2704–2711, 2014.

SAOUD, Tarek; RICUCCI, Domenico; LIN, Louis; GAENGLER, Peter. Regeneration and Repair in Endodontics—A Special Issue of the Regenerative Endodontics—A New Era in Clinical Endodontics. **Dentistry Journal**, v. 4, n. 1, p. 3–17, 2016.

SCIMONE, Antony *et al.* Development of a rapid method for assessing the efficacy of antibacterial photocatalytic coatings. **Talanta**, v. 225, 2021.

SENEVIRATNE, Chaminda J. *et al.* Transcriptomics Analysis Reveals Putative Genes Involved in Biofilm Formation and Biofilm-associated Drug Resistance of *Enterococcus faecalis*. **Journal of Endodontics**, v. 43, n. 6, p. 949–955, 2017.

SHARMA, Virender K.; YNGARD, Ria A.; LIN, Yekaterina. Silver nanoparticles: Green synthesis and their antimicrobial activities. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 145, n. 1–2, p. 83–96, 2009.

ŠILEIKAITĖ, Asta *et al.* Investigation of Silver Nanoparticles Formation Kinetics During Reduction of Silver Nitrate with Sodium Citrate. **Materials Science**, v. 15, p. 21–27, 2016.

SILVA, Heloiza Fernanda Oliveira da. **Nanopartículas de prata conjugadas com hiclato de doxiciclina: síntese, caracterização e avaliação da atividade antimicrobiana contra *Escherichia coli***. 2015. 90 p. Dissertação (Mestrado em Química) - Centro de Ciências Exatas e da Terra, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2015.

SILVA, Maurício Bacarin *et al.* Avaliação *in vitro* da atividade antimicrobiana de pastas endodônticas à base de extrato glicólico de *Musa paradisiaca* frente a *Enterococcus faecalis*. **Full dentistry in science**, v. 4, n. 14, p. 352–357, 2016.

SILVA, Maria de Lourdes; LEWGOY, Hugo Roberto. Avaliação através da espectrofotometria das alterações de cor em duas resinas compostas com o uso de solução à base de própolis tipificada associada ou não à ingestão de café. *In*: IV Jornada de Iniciação Científica e Tecnológica UNIBAN. São Paulo, 2012.

SILVA, Poliana Amanda Oliveira. **Análise proteômica da polpa dentária humana com diferentes condições clínicas endodônticas**. 2017. 140 p. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) -Universidade de Brasília, Brasília, 2017.

SILVA, Valdemir da Costa *et al.* New Insights for Red Propolis of Alagoas-Chemical Constituents, Topical Membrane Formulations and Their Physicochemical and Biological Properties. **Molecules**, v. 25, n. 5811, 2020.

SIQUEIRA, José Freitas Júnior; LOPES, Hélio Pereira. **Endodontia: biologia e técnica**. 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010.

SOARES, Tânia Sofia Couto. Efeito de nanopartículas de prata em neutrófilos humanos. 2014. 92 p. Dissertação (Mestrado em Controle de Qualidade) - Faculdade de Farmácia, Universidade do Porto, Porto, 2014.

SOUZA, Gustavo Duarte de; RODRIGUES, Mônica Aparecida; SILVA, Priscila Pereira; GUERRA, Wendell. Silver: Brief history, properties and applications. **Educación Química**, v. 24, n. 1, p. 14–16, 2013.

STUART, Charles Harris; SCHWARTZ, Scott A.; BEESON, Thomas J.; OWATZ, Christopher B. *Enterococcus faecalis*: Its Role in Root Canal Treatment Failure and

Current Concepts in Retreatment. **Journal of Endodontics**, v. 32, n. 2, p. 93–98, 2006.

ŞUHANI, Mihai Flaviu *et al.* Current perspectives regarding the application and incorporation of silver nanoparticles into dental biomaterials. **Clujul Medical**, v. 91, n. 3, p. 274–279, 2018.

TIAN, Jun *et al.* Topical delivery of silver nanoparticles promotes wound healing. **ChemMedChem**, v. 2, n. 1, p. 129–136, 2007.

TOLEDO, Roseli *et al.* Hidróxido de Cálcio e Iodofórmio no tratamento endodôntico de dentes com Rizogênese Incompleta Calcium hydroxide and Iodoform on endodontic treatment of immature teeth. **International Journal of Dentistry**, v. 9, n. 1, p. 28–37, 2010.

VASCONCELOS, Walison A. *et al.* Bioactive glass-green and Red Propolis association: antimicrobial activity against oral pathogen bacteria. **Natural Products Chemistry e Research**, v. 2, n. 6, 2014.

VEIGA, Andressa. **Padronização e validação do método de microdiluição para determinação da concentração inibitória mínima de compostos antimicrobianos**. 2016. 96 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2016.

VELOZ, Jorge Jesús; ALVEAR, Marysol; SALAZAR, Luis A. Antimicrobial and Antibiofilm Activity against *Streptococcus mutans* of Individual and Mixtures of the Main Polyphenolic Compounds Found in Chilean Propolis. **BioMed Research International**, p. 1–11, 2019.

Wilson International Center for Scholars. **Project on Emerging Nanotechnologies**. Washington: Wilson Center. Disponível em: [web.archive.org/web/20200331135412/http://www.nanotechproject.org/process/assets/files/7039/silver_database_fauss_sept2_final.pdf](http://www.nanotechproject.org/process/assets/files/7039/silver_database_fauss_sept2_final.pdf). Acesso em: 20 dez. 2019.

YOSHIMASU, Yuri *et al.* Rapid Bactericidal Action of Propolis against *Porphyromonas gingivalis*. **Journal of Dental Research**, v. 97, n. 8, p. 928–936, 2018.

ZABAIU, Nada *et al.* Biological properties of propolis extracts: Something new from an ancient product. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 207, p. 214–222, 2017.

ZHANG, Chenjiao; DU, Jianrong; PENG, Zhixiang. Correlation between *Enterococcus faecalis* and Persistent Intraradicular Infection Compared with Primary Intraradicular Infection: A Systematic Review. **Journal of Endodontics**, v. 41, n. 8, p. 1207–1213, 2015.

ZHANG, Jin Z.; NOGUEZ, Cecilia. Plasmonic optical properties and applications of metal nanostructures. **Plasmonics**, v. 3, n. 4, p. 127–150, 2008.

APÊNDICE

APÊNDICE 1- ARTIGO- BIOSÍNTESE E INVESTIGAÇÃO DE UM NANOMATERIAL À BASE DE PRATA E PRÓPOLIS SOBRE *ENTEROCOCCUS FAECALIS*

**Adla R. dos S. Silva¹, Fernanda C. de A. Maranhão¹, Isabel C. de M. Porto²,
Camila B. Dornelas^{1,3}**

¹Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de Alagoas

²Faculdade de Odontologia, Universidade Federal de Alagoas

³Instituto de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Alagoas

Correspondente

Camila B. Dornelas, Instituto de Ciências Farmacêuticas,

Universidade Federal de Alagoas,

Av. Lourival Melo Mota, S/N, Maceió,

AL 57072-900, Brasil

E-mail: camila.dornelas@esenfar.ufal.br

RESUMO

OBJETIVO: Biossintetizar NPs de prata com própolis vermelha de Alagoas (NPsAg-PV) para investigar o potencial antimicrobiano frente a *Enterococcus faecalis*.

METODOLOGIA: NPsAg-PV foram sintetizadas através da redução dos sais de prata por extrato hidroalcoólico de própolis vermelha de Alagoas (EHPV), caracterizadas na forma de suspensão coloidal pela técnica de espectrofotometria ultravioleta e visível (UV-Vis), espalhamento dinâmico da luz (EDL) e potencial zeta. O coloide de prata foi

submetido à centrifugação e levado à estufa para obtenção das NPs na forma de pó. A atividade antimicrobiana contra *E. faecalis* foi observada pela determinação de CIM, realizada por microdiluição em caldo, e CBM, *in vitro*. Foram avaliados hidróxido de cálcio (Ca(OH)₂); EHPV; nanopartículas de prata (NPsAg), sintetizadas pelo método químico; NPsAg+EHPV; NPsAg-PV e as combinações de Ca(OH)₂+EHPV; Ca(OH)₂+NPsAg; Ca(OH)₂+NPsAg+EHPV e Ca(OH)₂+NPsAg-PV. Seguindo-se a avaliação *ex vivo* das substâncias pelos períodos experimentais de 1, 3 e 7 dias sobre biofilme formado por 21 dias em dentina de dentes humanos extraídos.

RESULTADOS: A análise espectral demonstrou absorvância de 425 e 421 nm, após 24 h e 72 h, respectivamente, valores característicos da formação de NPs de prata de formato esférico. O EDL mostrou diâmetro hidrodinâmico de 132,5 nm ± 1,19 e índice de polidispersão (PDI) de 0,266, sugerindo a homogeneidade na distribuição do tamanho das NPs, o potencial zeta foi de -61 mV ± 1,59, indicando a estabilidade do coloide, quanto à tendência à aglomeração. *In vitro*, em comparação à pasta de Ca(OH)₂, as NPsAg-PV isoladas exibiram eficácia 16 vezes superior quanto ao efeito bactericida e bacteriostático, e as NPsAg-PV associadas ao Ca(OH)₂ atividade bacteriostática 2 vezes superior. O ensaio *ex vivo* demonstrou a efetividade das substâncias à 2.000 µg/mL sobre biofilme de *E. faecalis*, observando-se UFCs apenas para NPsAg no intervalo de um dia.

CONCLUSÃO: Neste estudo as NPsAg-PV exibiram atividade antibacteriana, contra *E. faecalis*, superior em relação aos outros compostos *in vitro*, mostrando-se eficazes também sobre modelo de biofilme *ex vivo*.

PALAVRAS-CHAVE: Nanopartículas metálicas. Biomateriais. Própolis brasileira. Infecção intracanal persistente. Tratamento endodôntico.

INTRODUÇÃO

As alterações pulpares são as principais causas da procura pelos serviços odontológicos (Bezerra *et al.* 2015). A polpa é um tecido conjuntivo frouxo que pode apresentar alterações que variam de pulpite reversível à necrose pulpar (Leonardi *et*

al. 2011, Cooper *et al.* 2017). A microbiota da infecção intracanal é composta por um biofilme polimicrobiano, no qual pode haver predomínio de espécies que sofreram mutações, tornando-se mais virulentas (Samiei *et al.*, 2016). A principal causa do insucesso do tratamento endodôntico é a permanência de micro-organismos no interior do sistema de canais radiculares, sendo *Enterococcus faecalis* uma bactéria resistente a antimicrobianos, como o hidróxido de cálcio (Ca(OH)₂), e comumente encontrada nas falhas endodônticas (Nacif e Alves 2010, Lieblich, 2012, Lima *et al.* 2015, Jain *et al.* 2016).

Atualmente, o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos tem sido favorecido pela nanotecnologia. O prefixo “nano” se refere a um bilionésimo (10⁻⁹) de medida (ABDI 2010), esse diminuto tamanho confere aos nanomateriais propriedades promissoras. Na odontologia, a nanociência tem contribuído para a expansão do desenvolvimento de materiais com propriedades melhoradas (Bapat *et al.* 2018).

Dentre as nanopartículas (NPs) mais comercializadas, as NPs de prata (NPsAg) se destacam por sua atividade antimicrobiana e por apresentarem uma alta reatividade, possibilitando a redução de sua dose terapêutica quando comparadas à prata em sua forma macroscópica (Tian *et al.* 2007, Nesrin *et al.* 2020).

Apesar da nanomedicina ter contribuído para o desenvolvimento de novas possibilidades terapêuticas, as pesquisas ainda não atingiram um consenso sobre o grau e mecanismos de toxicidade das NPs (Lapresta-fernández *et al.* 2012). Assim, a aplicação da biotecnologia destaca-se por proporcionar uma redução significativa da toxicidade e aperfeiçoamento das propriedades das NPs (Mashwani *et al.* 2015).

Própolis possui características físicas resinosas e uma composição química variável, coletada de variadas espécies vegetais e que sofre adição de secreções da abelha, classificada como opoterápico (ANVISA, 2011), e tem sido amplamente investigada para diversas aplicações na odontologia, mostrando-se como um agente antimicrobiano biocompatível contra micro-organismos da cavidade oral, fator associado principalmente aos seus constituintes fenólicos e flavonoides (Righi *et al.* 2011, Martins *et al.* 2018). A própolis vermelha do estado de Alagoas, Brasil, é um produto com selo de certificação geográfica devido a sua composição diferenciada, atividades biológicas distintas e processo de produção padronizado (Almeida *et al.* 2017).

Assim, este estudo com a associação de própolis, prata e nanotecnologia, na síntese de NPs de prata com própolis vermelha de Alagoas (NPsAg-PV), visou obter um produto com melhor atividade antimicrobiana, em especial contra *E. faecalis*, que é uma bactéria presente nas infecções endodônticas persistentes.

Materiais e Métodos

Materiais

Foram empregados os seguintes produtos: nitrato de prata (AgNO_3) P.A. (Dinâmica, Brasil), citrato de sódio tribásico (Dinâmica, Brasil), hidróxido de sódio- NaOH- (Vetec, Brasil), Ca(OH)_2 pró-análise (P.A.) (Biodinâmica, Brasil), polietilenoglicol 400 (PEG) (Vetec, Brasil), *Brain Heart Infusion*- BHI- (Kasvi, Espanha), ágar *Mueller Hinton*- AMH- (Kasvi, Itália), meio *Mueller Hinton* -MH- (Kasvi, Itália), resazurina (Sigma-Aldrich, EUA), hipoclorito de sódio 5,25%- NaOCl- (Fórmula, Brasil), ácido etilenodiamino tetra-acético 17%- EDTA- (Biodinâmica, Brasil).

Preparo do extrato hidroalcoólico de própolis vermelha de Alagoas

A própolis vermelha foi obtida em março de 2019, do apiário Primavera, localizado na cidade de Marechal Deodoro, Alagoas, na região Nordeste do Brasil, com as seguintes coordenadas geográficas de latitude sul, latitude oeste e altura, respectivamente: $9^\circ 42.258'$, $35^\circ 54.391'$ e 35,5 metros. O acesso e transporte da própolis foram previamente autorizados pelos órgãos reguladores para o controle do Patrimônio Genético Brasileiro e Conservação da Biodiversidade (protocolo SISGEN-A88DA2B).

O extrato hidroalcoólico de própolis vermelha de Alagoas (EHPV) foi obtido segundo Mendonça *et al.* (2015). Para a síntese de NPsAg-PV seguiu-se a ressuspensão do EHPV em álcool etílico a uma concentração de 25 mg/mL. O teor de flavonoides totais foi calculado pelo método espectrofotométrico da reação do cloreto de alumínio (AlCl_3) a 5% em metanol, conforme Alves e Kubota (2013), com alterações. A absorbância foi lida à 425 nm e a concentração dos flavonoides determinada utilizando uma curva padrão de quercetina, através da equação: $y = 0,046x - 0,018$. Na qual, y representa a absorbância e x a concentração.

Síntese de nanopartículas de prata

Seguiu-se o método preconizado por Šileikaitė *et al.* (2016), com alterações. Um volume de 50 mL de AgNO_3 na concentração 1.500 μM foi aquecido até a temperatura de ebulição e acrescentou-se 5 mL de solução de citrato de sódio, na velocidade de 1 gota/s e sob agitação constante à 200 rpm. Quando foi observada a alteração de cor da solução, de incolor para amarelo claro, a agitação foi interrompida e a solução armazenada.

Síntese de nanopartículas de prata com própolis vermelha de Alagoas

Esta etapa foi conduzida de acordo com Barbosa *et al.* (2019) e Roy *et al.* (2010). Empregou-se EHPV para a redução do AgNO_3 . As etapas foram realizadas à temperatura de 32 ± 2 °C. O EHPV foi diluído em água sob agitação à 200 rpm, resultando em uma solução com uma concentração de 30 $\mu\text{g/mL}$ de própolis. O pH foi ajustado para 10,6 pelo gotejamento de solução de NaOH à 0,1 M. Na velocidade de 1 gota/s adicionou-se a solução AgNO_3 sob agitação de 200 rpm e ao abrigo da luz, obtendo-se uma solução coloidal de 1.500 μM de AgNO_3 .

Obtenção de nanopartículas na forma de pó

Após 24 h, o coloide obtido foi submetido à centrifugação (Centrífuga RXII series - Hitachi, Japão) por 20 minutos com uma força centrífuga relativa (RCF) de 4.120, à 15.000 rpm e 25 °C e levado à estufa (NI1512i - Nova Instruments, Brasil) à 50 °C por 24 h.

Preparo dos grupos experimentais para teste de escoamento e avaliação do potencial antibacteriano

Foram preparados grupos experimentais com as substâncias $\text{Ca}(\text{OH})_2$, EHPV, NPsAg e NPsAg-PV, usando PEG 400 como veículo. Também foram feitas associações entre as substâncias, seguindo-se a proporção 1:1, em relação ao volume.

Caracterização

As NPsAg-PV e NPsAg foram caracterizadas na forma de suspensão coloidal por espectrofotometria ultravioleta e visível (UV-Vis) e espalhamento dinâmico da luz (EDL). Cada grupo experimental também foi caracterizado através do potencial zeta e teste de escoamento horizontal.

Para espectrofotometria, foi utilizado espectrofotômetro com leitor de placas (Flexstation® 3, EUA), um volume de 100 µL de cada grupo foi depositado em placa de poliestireno e a absorbância obtida no intervalo de comprimento de onda de 200 a 850 nm. As análises do EDL e do potencial zeta foram feitas no equipamento Malvern Zetasizer Nano ZS90 (Malvern Instruments, UK), em triplicata.

Os testes de escoamento se deram de acordo com os parâmetros da ISO 6876:2012, com adaptações. Um volume de 0,05 mL de cada material foi colocado numa placa de vidro. Em seguida, uma placa de vidro de 49,18 g foi colocada sob os materiais e no centro do conjunto foi posicionado um peso de 116,3 g. O diâmetro inicial foi medido e após 7 minutos avaliado o diâmetro final, calculando-se a diferença entre eles. As avaliações foram feitas em triplicata e a média das três leituras de cada grupo foi considerada como o resultado do escoamento.

Avaliação do potencial antibacteriano

Ensaio in vitro

Cepa de referência de *E. faecalis* (ATCC 29212), obtida do Laboratório de Controle e Qualidade de Alimentos da Universidade Federal de Alagoas, foi reativada em meio BHI por 48 horas à 37 °C. Dessa cultura foi retirada uma alíquota para cultivo em meio AMH para a incubação por 24 h à 37 °C e uso na elaboração do inóculo na concentração de $1,5 \times 10^8$ em solução salina, de acordo com a escala 0,5 Mcfarland. Para o Teste de Susceptibilidade a Antimicrobianos (TSA) por microdiluição foi feita a diluição do inóculo em solução salina para a concentração de $1,5 \times 10^5$. Os ensaios foram determinados pela técnica delineada em Métodos para Testes de Susceptibilidade de Diluição Antimicrobiana para Bactérias que Crescem Aerobicamente (CLSI, 2012).

Para determinação da concentração inibitória mínima (CIM) foram dispostos em microplacas de poliestireno 100 µl do AMH, 100 µl das substâncias, conforme quadro 3, e 5 µl do inóculo bacteriano. Soluções estoques estavam à 2.000 µg/mL no primeiro poço da placa e através de diluições seriadas obtida uma concentração final de aproximadamente 3,91 µg/mL. O AMH e inóculo bacteriano constituíram o controle positivo e o teste de esterilidade, utilizando o caldo AMH, o controle de qualidade da

técnica. A avaliação da CIM se deu através do método colorimétrico, com a aplicação de 25 µl de resazurina 0,01% decorridas 24 h.

Para a concentração bactericida mínima (CBM) foram retirados 10 µl do poço correspondente à CIM e daqueles com maiores concentrações da substância ativa, a alíquota foi semeada em placas de Petri com AMH. A CBM foi indicada na concentração em que foi detectada a ausência do crescimento de colônias nas placas de Petri.

Os ensaios para determinação da CIM e CBM foram realizados em triplicata e incubados a 37 °C durante 24 horas. O diluente, PEG 400, constituiu o controle negativo.

Ensaio *ex vivo*

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Alagoas (UFAL), sob o número 18101219.6.0000.5013 e realizado conforme Parolia *et al.* (2020), com modificações. A amostragem foi composta de 54 dentes humanos, unirradiculares, sem cárie, permanentes, erupcionados, com raiz completa e extração indicada por razões terapêuticas, que foram armazenados em cloramina T 0,5% até o uso. A efetividade das substâncias foi avaliada utilizando-se cepa de *E. faecalis* (ATCC 29212) para formação de biofilme, seguindo-se a observação de unidades formadoras de colônias (UFCs).

Foram padronizados blocos radiculares de 6 mm de comprimento através de dois cortes perpendiculares ao longo eixo do dente. Um corte a 1 mm abaixo do limite amelo-cementário e outro no terço cervical, utiliza-se um disco diamantado em cortadeira metalográfica sob refrigeração (Isomet 5000; Buehler Ltd, Lake Bluff, IL) na velocidade de 800 rpm. O conduto radicular foi alargado com broca Peeso número 1, 2 e 3 (Dentsply Maillefer, Brasil), nesta sequência, acoplada a um contra-ângulo, em baixa rotação. Ao final, o canal radicular dos corpos de prova apresentava 0,9 mm de diâmetro interno.

Os canais radiculares dos corpos de prova foram irrigados com NaOCl 5,25% (Fórmula, Brasil), seguido de EDTA 17% de pH 4,0 (Biodinâmica, Brasil) por 2 minutos, sob agitação sônica, para remover a smear layer. Os blocos foram lavados em solução salina após cada irrigação. As superfícies externas foram cobertas com dupla camada de esmalte de unhas (Colorama, Brasil) e os corpos de prova esterilizados

em autoclave por 20 min à 121 °C. Placas de Petri com cera utilidade (Clássico, Brasil) foram preparadas e a superfície desinfetada com álcool 70% e secas em uma câmara de fluxo laminar. Os corpos de prova foram fixados nas placas de Petri através de sua porção apical, com um pequeno quadrado de parafilme obliterando o forame apical.

Para a formação do biofilme bacteriano, *E. faecalis* foi suspenso em 20 mL de meio de cultura MH. As células em suspensão foram ajustadas até a turbidez de $1,5 \times 10^8$ UFCs/mL, equivalente ao padrão 0,5 da escala McFarland. Um volume de 10 µl do inóculo de *E. faecalis* foi inserido no canal radicular e a porção coronal selada com parafilme, feita a incubação à 37°C por 21 dias, com renovação de *E. faecalis* a cada três dias.

Após o período de inoculação, os blocos de dentina foram aleatoriamente distribuídos em grupos (n=2) de acordo com a substância colocada: pasta de Ca(OH)_2 ; EHPV; NPsAg; NPsAg+EHPV; NPsAg-PV; Ca(OH)_2 +EHPV; Ca(OH)_2 +NPsAg; Ca(OH)_2 +NPsAg+EHPV e Ca(OH)_2 +NPsAg-PV. Cada grupo foi dividido de acordo com o intervalo de 1, 3 e 7 dias de incubação, e 5 µl da substância inserido no canal radicular à 2.000 µg/ mL, de modo a preencher totalmente o canal. O orifício coronal foi selado com parafilme e os blocos mantidos a 37 °C pelos períodos indicados.

Decorridos os períodos experimentais, os blocos de dentina foram removidos das placas de Petri e os canais secos com pontas de papel absorventes. Amostras de raspas de dentina foram coletadas com uma lima endodôntica número 100 (Injecta, Brasil) e transferidas para microtubos contendo 1 mL de meio de solução salina. Uma alíquota de 100 µl da solução salina com raspas de dentina foi transferida para outro tubo contendo 900 µl de solução salina estéril. O conteúdo de cada tubo foi serialmente diluído de 10^{-1} até 10^{-6} . Posteriormente, 25 µl das raspas de dentina foram espalhadas uniformemente usando alças de Drigalsky em placas de Petri, em triplicata. As placas foram incubadas por 24 horas a 37°C e observada a formação de colônias.

RESULTADOS

Obtenção do extrato hidroalcoólico de própolis vermelha de Alagoas

O cálculo do conteúdo de flavonoides do EHPV resultou em um maior valor para o resíduo seco do extrato, $\approx 52,63$ mg de quercetina/g, quando comparado ao do extrato etanólico, $\approx 36,58$ mg de quercetina/g.

Caracterização

Na análise por espectrofotometria UV-Vis (Figura 1), a absorbância das NPsAg foi próxima de 426 nm para um intervalo de 24 h e 423 nm para 72 h. As NPsAg-PV apresentaram um pico em 425 nm e 421 nm, decorridas 24 h e 72 h, respectivamente. As NPsAg exibiram um raio hidrodinâmico de $26,06 \pm 0,83$ e índice de polidispersão (PDI) de $0,79 \pm 0,146$, as NPsAg-PV de $132,5 \text{ nm} \pm 1,19$ e PDI foi de $0,264 \pm 0,006$ (Figura 2).

Figura 1- Espectro ultravioleta e visível. (A) Nanopartículas de prata em 24 h (curva preta) e 72 h (curva azul). (B) Nanopartículas de prata com própolis vermelha de Alagoas em 24 h (curva preta) e 72 h (curva azul).

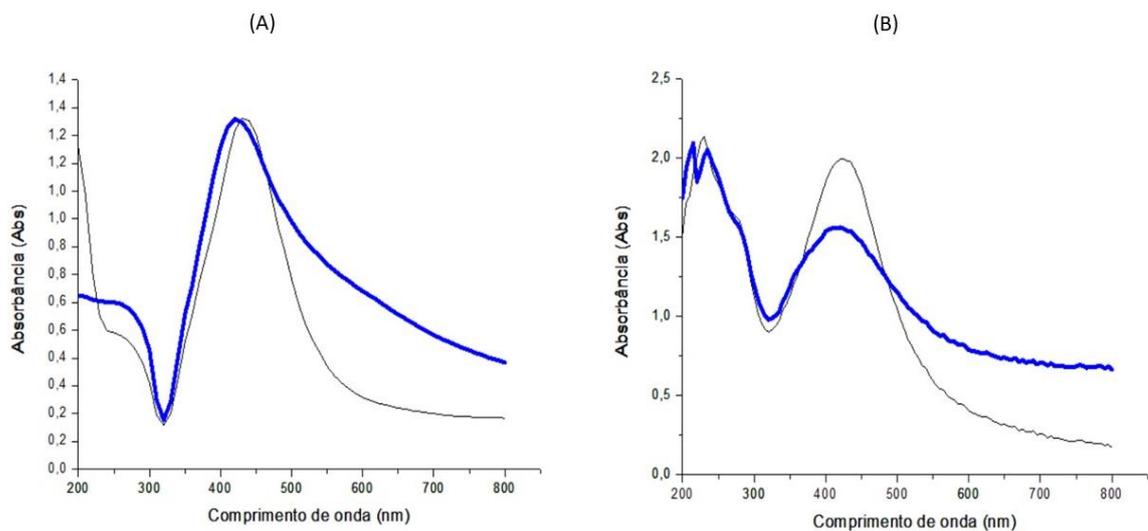
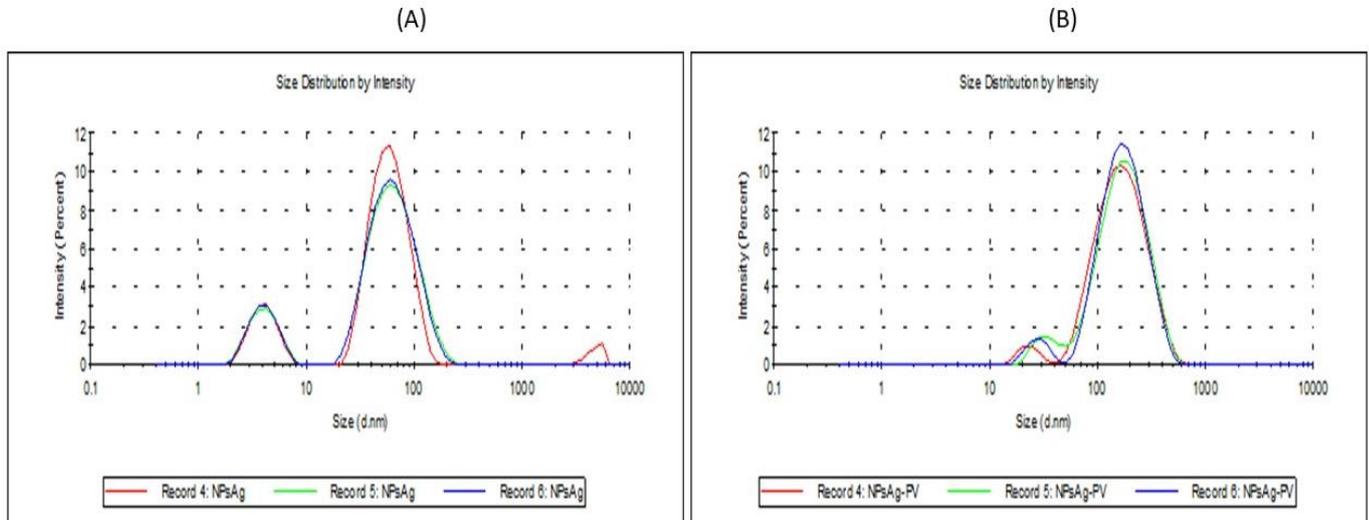


Figura 2- Raio hidrodinâmico. (A) Nanopartículas de prata. (B) Nanopartículas de prata com própolis vermelha de Alagoas.



O potencial zeta foi de $-54,1 \text{ mV} \pm 3,17$ e $-61 \text{ mV} \pm 1,59$ das NPsAg e NPsAg-PV, respectivamente (Figura 3). Em relação ao potencial zeta dos grupos experimentais, a pasta de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ mostrou potencial de $-15,6 \text{ mV}$, EHPV de $-68,9 \text{ mV}$, NPsAg de -141 mV , NPsAg+EHPV de -31 mV , NPsAg-PV de -173 mV , $\text{Ca}(\text{OH})_2$ +EHPV de -129 mV , $\text{Ca}(\text{OH})_2$ +NPsAg de -100 mV , $\text{Ca}(\text{OH})_2$ +NPsAg+EHPV de $-70,4 \text{ mV}$, $\text{Ca}(\text{OH})_2$ +NPsAg-PV -177 mV e PEG 400 de $-9,54 \text{ mV}$ (Figura 4). No teste de escoamento horizontal, a pasta de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ mostrou escoamento de $\approx 19,33 \pm 0,49 \text{ mm}$, EHPV de $\approx 12,33 \pm 0,38 \text{ mm}$, NPsAg de $\approx 19,47 \pm 0,36 \text{ mm}$, NPsAg+EHPV de $18,1 \pm 0,33 \text{ mm}$, NPsAg-PV de $9 \pm 0,27 \text{ mm}$, $\text{Ca}(\text{OH})_2$ +EHPV de $\approx 10,03 \pm 0,36 \text{ mm}$, $\text{Ca}(\text{OH})_2$ +NPsAg de $\approx 22,13 \pm 0,24 \text{ mm}$, $\text{Ca}(\text{OH})_2$ +NPsAg+EHPV de $\approx 20,03 \pm 0,31 \text{ mm}$, $\text{Ca}(\text{OH})_2$ +NPsAg-PV $5 \pm 0,67 \text{ mm}$ e PEG 400 de $\approx 24,33 \pm 0,44 \text{ mm}$ (Figura 5).

Figura 3- Potencial zeta das nanopartículas de prata. (A) Nanopartículas de prata. (B) Nanopartículas de prata com própolis vermelha de Alagoas.

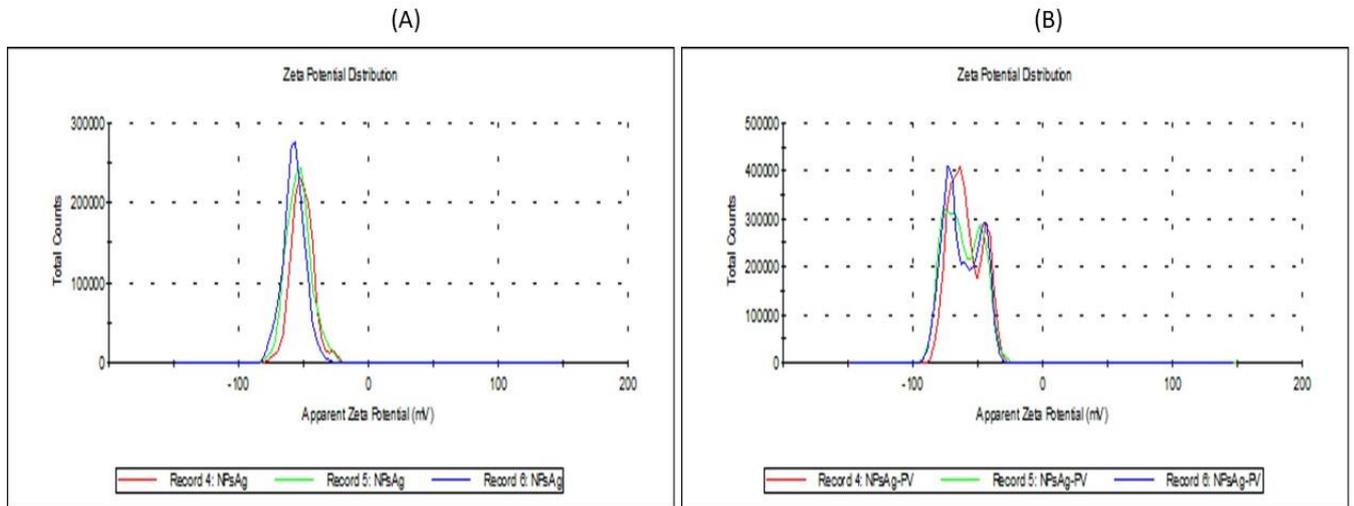


Figura 4- Valores do potencial zeta (em mV e em módulo) dos materiais estudados.

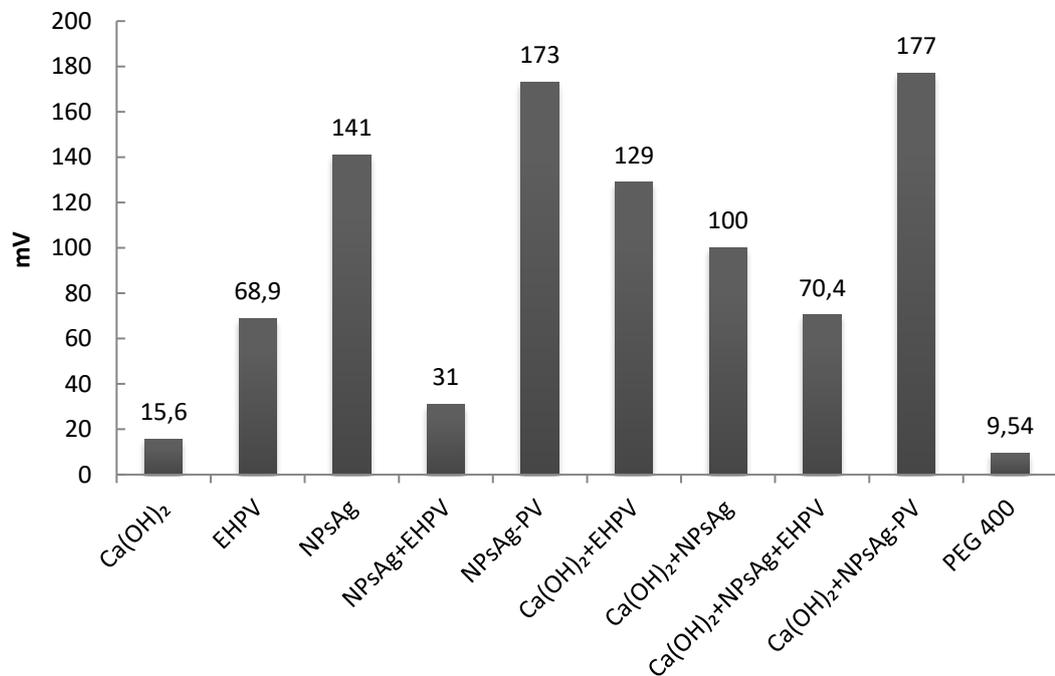
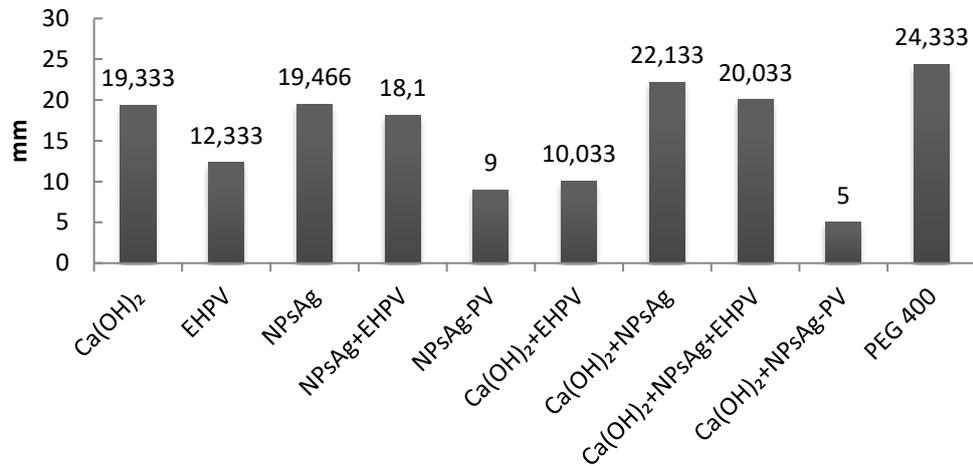


Figura 5- Valores do escoamento horizontal (em mm) dos materiais estudados.



Avaliação antibacteriana

Ensaio *in vitro*

Todas as substâncias produzidas demonstraram-se efetivas sobre *E. faecalis* (Tabela 1). A CIM e CBM, em sequência para cada material são, Ca(OH)₂ 500 e 1.000 µg/mL; EHPV 250 e 1.000 µg/mL; NPsAg 500 e 2.000 µg/mL; NPsAg+EHPV 500 e 1.000 µg/mL; NPsAg-PV 31, 25 µg/mL. para ambos testes; Ca(OH)₂+EHPV 500 e 2.000 µg/mL; Ca(OH)₂+NPsAg 500 e 1.000 µg/mL; Ca(OH)₂+NPsAg+EHPV 500 e 1.000 µg/mL; Ca(OH)₂+NPsAG-PV 250 e 1.000 µg/mL. O PEG 400 não demonstrou CIM E CBM nas concentrações testadas.

Tabela 1- Concentração inibitória mínima e concentração bactericida mínima das substâncias testadas.

Grupos experimentais	CIM (µg/mL)	CBM (µg/mL)
Pasta de Ca(OH) ₂	500	1.000
EHPV	250	1.000
NPsAg	500	2.000
NPsAg+EHPV	500	1.000
NPsAg-PV	31,25	31,25

Pasta de Ca(OH)₂+EHPV	500	2.000
Pasta de Ca(OH)₂+NPsAg	500	1.000
Pasta de Ca(OH)₂+NPsAg+EHPV	500	1.000
Pasta de Ca(OH)₂+NPsAg-PV	250	1.000
PEG 400	Não encontrada	Não encontrada

Ensaio *ex vivo*

A avaliação demonstrou que na concentração de 2.000 µg/mL todas as substâncias se mostraram efetivas sobre biofilme de *E. faecalis*, não exibindo nenhuma UFC, à exceção das NPsAg que para o período experimental de um dia apresentou UFCs.

DISCUSSÃO

O teor de flavonoides encontrado para o EHPV neste estudo se assemelha ao identificado por Andrade *et al.* (2017), que avaliaram um extrato etanólico de própolis vermelha de Sergipe, indicando a presença de 31,48 mg de quercetina/g de própolis. Quanto à espectrofotometria, valores de absorção máxima em torno de 400 nm são característicos da formação de NPsAg em formato esférico (Neto *et al.* 2008; Berbeć *et al.* 2019). Assim, os dados das bandas de Ressonância plasmônica de superfície (RPS) deste estudo apontam a formação de NPs e sugerem que possuam configuração esférica. Para o PDI, valores abaixo de 0,3 indicam a ausência de aglomerados e uma distribuição homogênea do diâmetro das NPs (Greulich *et al.* 2011).

O potencial zeta aponta a carga negativa do coloide, sua estabilidade e oposição à agregação. A utilização de extrato hidroalcoólico de própolis pode ter contribuído para a estabilidade das NPsAg-PV, já que possui uma notável capacidade estabilizante (Roy *et al.* 2010). O potencial zeta das NPsAg e NPsAg-PV também pode estar relacionado ao uso do citrato de sódio e a alcalinidade do EHPV, já que a estabilidade dos coloides está associada ao pH alcalino no início da reação de síntese, segundo Neto *et al.* (2008) e Roy *et al.* (2010). Os valores referentes aos compostos

indicam sua estabilidade quando solubilizados no PEG 400 e mostram uma melhor estabilidade para as NPs em pó quando suspensas.

A pasta de Ca(OH)_2 +NPsAg-PV apresentou o menor escoamento, seguida das NPsAg-PV e do Ca(OH)_2 +EHPV. A própolis estava presente nesses grupos, e seu extrato foi alcalinizado a um pH de 10,6 para a síntese das NPs, o que pode ter contribuído para um baixo escoamento em relação ao Ca(OH)_2 . Mello (2013) indicou uma maior viscosidade de extrato aquoso de própolis com maiores pHs, acima de 8, relacionando a uma maior capacidade de extração de compostos fenólicos e flavonoides. Além disso, o extrato etanólico mostrou maior capacidade de extração de flavonoides e polifenóis em relação ao extrato aquoso de pH 8.

Segundo Athanassiadis e Walsh (2017), essa menor capacidade de difusão pode resultar em uma menor atividade antimicrobiana quando considerados períodos curtos, pois o medicamento demandará mais tempo para alcançar o alvo biológico. Contudo, isso também é um aspecto positivo, pois essas substâncias têm a capacidade de ficarem retidas no meio, promovendo um efeito antibacteriano mais duradouro.

Quanto à atividade antimicrobiana *in vitro* Silva *et al.* (2016) também indicaram a inefetividade do PEG 400 sobre *E. faecalis*. E, a biossíntese viabilizou a obtenção de NPs com propriedades antimicrobianas melhoradas, o que já tem sido descrito por Mashwani *et al.* (2015) que sintetizou NPs de prata com plantas e seus extratos. As NPsAg-PV exerceram a melhor atividade antimicrobiana, comparadas às NPsAg um desempenho significativamente superior, considerando-se que ambos os coloides possuíam a mesma concentração de AgNO_3 . Destacamos que ocorreu sinergismo entre a prata e o EHPV no nanomaterial. A formulação Ca(OH)_2 +NPsAg-PV exibiu a melhor atividade antimicrobiana entre as associações e a segunda melhor dentre todas as substâncias, igualmente ao EHPV.

Esses resultados demonstram que NPsAg-PV se mostraram como os agentes mais eficazes, seguidas pela associação Ca(OH)_2 +NPsAg-PV e também pelo EHPV. A própolis vermelha estava presente em todos esses grupos, o que indica sua marcante atividade sobre *E. faecalis*, que pode estar relacionada à alta concentração de substâncias com atividade antimicrobiana em sua composição, descrita por Andrade *et al.* (2017).

Para o Ca(OH)_2 tanto sua eficácia como sua baixa atividade sobre *E. faecalis* é apontada na literatura. Santos *et al.* (2016) não atribuíram atividade antimicrobiana na concentração de 1.200 $\mu\text{g/mL}$ ao Ca(OH)_2 com PEG. Por outro lado, Abbaszadegan *et al.* (2016) utilizando Ca(OH)_2 com PEG 400 indicaram uma CIM e CBM de 100 e 1.000 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente, sobre *E. faecalis*.

Righi *et al.* (2011) investigaram própolis vermelha do estado de Alagoas, seu extrato metanólico demonstrou CIM de 512 $\mu\text{g/mL}$ sobre *E. faecalis*. Contudo, a CBM não foi determinada na faixa de concentração testada, e a concentração necessária para inibir o crescimento de *E. faecalis* foi maior em comparação às espécies bacterianas *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis* e ao fungo *Candida albicans*. Quanto à associação, Sanchez-Ayala *et al.* (2008) compararam o potencial antibacteriano sobre *E. faecalis* entre uma pasta de Ca(OH)_2 e sua combinação com extrato etanólico de própolis, demonstrando redução da atividade para a associação, atribuindo isso a sua menor capacidade de difusão, acarretada pela incorporação da própolis, semelhantemente ao observado neste estudo.

Em relação às NPs de prata sintetizadas de modo convencional, Krishnan *et al.* (2015) encontraram CIM e CBM de 5.000 $\mu\text{g/mL}$ para NPs de prata comerciais sobre *E. faecalis*, um valor dez vezes maior ao encontrado neste estudo, que pode ter sido influenciado pela diferente metodologia de síntese empregada. Quanto ao Ca(OH)_2 combinado a Nps de prata convencionais, Alabdulmohsen e Saad (2017) compararam o efeito entre uma pasta de Ca(OH)_2 comercial (Calasept® Plus, Nordiska Dental, Suécia) e NPs de prata comerciais na forma de gel (Huzheng® Nano Technology Co, Ltd, Shanghai, China) com concentração de 20 $\mu\text{g/mL}$, indicando melhor desempenho para a pasta de Ca(OH)_2 , seguida pela mistura entre pasta de Ca(OH)_2 e NPs de prata, na proporção de 1:2 em relação ao volume, e menor desempenho para as NPs de prata.

Referente à síntese de NPs de prata com própolis, Kischkel *et al.* (2020) sintetizaram NPs de prata com extrato etanólico de própolis verde, obtida do Paraná, atestando sua atividade antifúngica sobre espécies como *C. albicans*, *C. krusei* e *C. glabrata*, que podem estar presentes na infecção dos canais radiculares.

Os ensaios *ex vivo* da literatura utilizando dentina humana de dentes extraídos apresentam resultados semelhantes aos deste estudo, como descrito abaixo, com variações que podem estar associadas às diferenças na metodologia dos ensaios (Alabulmohsen e Saad 2017). E, vale ressaltar o já descrito por Seneviratne *et al.* (2017), que o biofilme formado no interior da cavidade bucal é caracteristicamente mais persistente que o formado de modo *ex vivo*, apresentando uma estrutura mais organizada.

Quanto à pasta de Ca(OH)_2 , Plutzer *et al.* (2017) indicaram a redução de UFCs em mais que 99,9% após um período de 24 e 48 h, sobre biofilme de *E. faecalis* (ATCC 29212 e 51299), já Chai *et al.* (2007) demonstraram que a pasta de Ca(OH)_2 apresentou efetividade de 100% sobre biofilme de *E. faecalis* (ATCC 29212) formado sobre discos de filtro de membrana de nitrato de celulose estéril, após o intervalo de 1 hora.

Madhubala *et al.* (2011) testaram amostra de própolis comercial sobre biofilme de *E. faecalis* (ATCC 29212), demonstrando redução de 92,54% após 1 dia e 100% após 2 e 7 dias na contagem de UFCs. Ao associar Ca(OH)_2 na concentração de 350 mg/mL a extrato etanólico de própolis (5 mg), própolis comercial, Carpio-Perochena *et al.* (2017) indicaram uma redução de 95% na contagem de UFCs após um período de 7 e 14 dias sobre biofilme de *E. faecalis* (ATCC 29212).

Por sua vez, Almeida *et al.* (2015) utilizando NPs de prata comerciais à 10.000 $\mu\text{g/mL}$ em suspensão como irrigante intracanal indicaram uma redução de 97,6% na contagem de UFCs, após um período de 7 dias, em biofilme de *E. faecalis* (ATCC 29212). Balto *et al.* (2020) combinaram Ca(OH)_2 a NPs de prata na concentração de 200 $\mu\text{g/mL}$, na proporção de 1:1 quanto à concentração, indicando uma redução das células viáveis de 90,85% e 98,49% após 14 e 28 dias, respectivamente, sobre biofilme de *E. faecalis* (ATCC 29212). Já Afkhami *et al.* (2015), em biofilme de *E. faecalis* (ATCC 29212), indicaram a redução de quase 100% de UFCs quando aplicado tratamento com Ca(OH)_2 à 300 mg/mL combinado a NPs de prata à 100 $\mu\text{g/mL}$, pelos períodos de 7 e 30 dias.

CONCLUSÃO

Através deste estudo foram sintetizadas NPsAg-PV estáveis, com tamanho condizente com o descrito na literatura e PDI dentro do intervalo considerado adequado, que apresentaram atividade frente a *E. faecalis* superior em relação aos outros compostos, mostrando-se como agentes promissores ao tratamento de infecções intracanais persistentes. Assim, é possível afirmar que a própolis vermelha de Alagoas utilizada como agente estabilizante e de revestimento das NPs de prata contribuiu para o aperfeiçoamento de sua atividade antimicrobiana. A associação das NPsAg-PV com o Ca(OH)_2 demonstrou a melhor atividade bacteriostática em relação às demais combinações com o Ca(OH)_2 .

O ensaio *ex vivo* demonstrou a efetividade das substâncias à 2.000 $\mu\text{g/mL}$ sobre biofilme de *E. faecalis*, sendo observadas UFCs apenas para NPsAg no intervalo de um dia.

AGRADECIMENTOS

Este estudo foi parcialmente financiado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Código Financeiro 001.

CONFLITOS DE INTERESSE

Os autores declaram a inexistência de conflitos de interesse em relação a este artigo.

REFERÊNCIAS

Abbaszadegan A *et al.* (2016) Antimicrobial and Cytotoxic Activity of Cinnamomum zeylanicum, Calcium Hydroxide, and Triple Antibiotic Paste as Root Canal Dressing Materials. *The Journal of Contemporary Dental Practice*, **12** (2),105–13.

Afkhami F, Pourhashemi SJ, Sadegh M, Saleh Y, Fard MJK (2015) Antibiofilm efficacy of silver nanoparticles as a vehicle for calcium hydroxide medicament against *Enterococcus faecalis*. *Journal of Dentistry* **43** (12), 1573-79.

Agência Brasileira de Desenvolvimento Indústria (2010) Cartilha sobre Nanotecnologia 58 (2 edição) Brasília, Brasil: ABDI.

Agência Nacional de Vigilância Sanitária (2011) RESOLUÇÃO – RDC Nº 24, DE 14 DE JUNHO DE 2011 Brasília, Brasil: ANVISA.

- Alabdulmohsen ZA, Saad AY (2017) Antibacterial effect of silver nanoparticles against *Enterococcus faecalis*. Saudi Endodontic Journal **7** (1), 29-35.
- Almeida ETC *et al.* (2017) Chemical and microbiological characterization of tinctures and microcapsules loaded with Brazilian red propolis extract. Journal of Pharmaceutical Analysis **7**, 280–287.
- Almeida J, Santos GV, Orsi MT, Cechella BC, Bernardi AV, Felipe WT (2015) Tratamento do biofilme intracanal de *Enterococcus faecalis* com suspensões de diferentes nanopartículas e irrigantes convencionais. Arquivos em Odontologia **51** (1), 32–8.
- Alves E, Kubota EH (2013) Conteúdo de fenólicos, flavonoides totais e atividade antioxidante de amostras de própolis comerciais. Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada **34** (1), 37–41.
- Andrade JKS, Denadai M, Oliveira CS, Nunes ML, Narain N (2017) Evaluation of bioactive compounds potential and antioxidant activity of brown, green and red propolis from Brazilian northeast region. Food Research International **101**, 129–38.
- Athanassiadis B, Walsh LJ (2017) Aspects of Solvent Chemistry for Calcium Hydroxide Medicaments. Materials **10** (10), 1219.
- Balto H, Bukhary S, Al-Omran O, BaHamam A, Al-Mutairi B (2020) Combined effect of a mixture of silver nanoparticles and calcium hydroxide against *Enterococcus faecalis* biofilm. Journal of Endodontics **46** (11), 1689-94.
- Bapat RA *et al.* (2018) An overview of application of silver nanoparticles for biomaterials in dentistry. Materials Science and Engineering C **91**, 881–98.
- Barbosa VT *et al.* (2019) Biogenic synthesis of silver nanoparticles using Brazilian propolis. Biotechnology Progress **35**, e2888.
- Berbeć S, Zołądek Sylwia, Kulesza Paweł J, Pałys Barbara (2019) Silver nanoparticles stabilized by polyoxotungstates. Influence of the silver – Polyoxotungstate molar ratio on UV/Vis spectra and SERS characteristics. Journal of Electroanalytical Chemistry **854**, 113537.
- Bezerra PASA, Oliveira MEM, Gomes TN, Barbosa JS, Medeiros EF (2015) Principais Patologias Orofaciais Recorrentes em Serviços de Urgências Odontológicas: Uma Revisão da Literatura. Revista de Psicologia **9** (1), 167–77.
- Carpio-perocheda AD *et al.* (2017) Antibacterial Properties of Chitosan Nanoparticles and Propolis Associated with Calcium Hydroxide against Single- and Multispecies Biofilms: An *In Vitro* and *In Situ* Study. Journal of Endodontics **43** (8), 1332-36.
- Chai WL, Hamimah H, Cheng SC, Sallam AA, Abdullah M (2007) Susceptibility of *Enterococcus faecalis* biofilm to antibiotics and calcium hydroxide. Journal of Oral Science **49** (2), 161–66.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (2012) Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically CLSI document M07. Wayne, EUA: CLSI.

- Cooper PR, Chicca IJ, Holder MJ, Milward MR (2017) Inflammation and Regeneration in the Dentin-pulp Complex: Net Gain or Net Loss? *Journal of Endodontics* **43** (9), S87–94.
- Greulich CS, Diendorf J, Simon T, Eggeler G, Epple M, Köller M (2011) Uptake and intracellular distribution of silver nanoparticles in human mesenchymal stem cells. *Acta Biomaterialia* **7**, 347–54.
- International Standardization Organization (2012) ISO 6876: Dentistry – root canal sealing materials. Geneva, Suíça: ISO.
- Jain H, Mulay S, Mullany P (2016) Persistence of endodontic infection and *Enterococcus faecalis*: Role of horizontal gene transfer. *Gene Reports* **5**, 112–6.
- Kischkel Brenda *et al.* (2020) Silver nanoparticles stabilized with propolis show reduced toxicity and potential activity against fungal infections. *Future Microbiology* **15** (7), 521-39.
- Krishnan R, Arumugam V, Vasaviah SK (2015) The MIC and MBC of Silver Nanoparticles against *Enterococcus faecalis* - A Facultative Anaerobe. *Journal of Nanomedicine & Nanotechnology* **6** (3), 1000285.
- Lapresta-fernández A, Fernández A, Blasco J (2012) Nanoecotoxicity effects of engineered silver and gold nanoparticles in aquatic organisms. *Trends in Analytical Chemistry* **32** (797), 40–59.
- Leonardi DP, Giovanini AF, Almeida S, Schramm CA, Baratto-Filho F (2011) Alterações pulpares e periapicais. *Revista Sul Brasileira de Odontologia* **8** (4), 47–61.
- Lieblich SE (2012) Endodontic surgery. *Dental Clinics of North America* **56**, 121–32.
- Lima SMF (2015) Antimicrobial peptide-based treatment for endodontic infections - Biotechnological innovation in endodontics. *Biotechnology Advances* **33** (1), 203–13.
- Madhubala MM, Narasimhan S; Shafie A (2011) Comparative Evaluation of Propolis and Triantibiotic Mixture as an Intracanal Medicament against *Enterococcus faecalis*. *Journal of Endodontics* **37** (9), 1287-189.
- Martins ML *et al.* (2018) Efficacy of red propolis hydro-alcoholic extract in controlling *Streptococcus mutans* biofilm build-up and dental enamel demineralization. *Archives of Oral Biology* **93**, 56–65.
- Mashwani ZR, Khan T, Khan MA, Nadhman A (2015) Synthesis in plants and plant extracts of silver nanoparticles with potent antimicrobial properties: current status and future prospects. *Applied Microbiology and Biotechnology* **99** (23), 9923–34.
- Mello BCBS (2013) Extração de própolis em meio aquoso e concentração dos extratos por nanofiltração (Tese). Campinas, BR: Universidade Estadual de Campinas.
- Mendonça ICG *et al.* (2015) Brazilian red propolis: phytochemical screening, antioxidant activity and effect against cancer cells. *BMC Complementary and Alternative Medicine* **15** (357).

- Nacif MCAM, Alves FRF (2010) *Enterococcus faecalis* in Endodontics: a challenge to success. *Revista Brasileira de Odontologia*. **67** (2), 209–14.
- Nesrin K *et al.* (2020) Biogenic silver nanoparticles synthesized from *Rhododendron ponticum* and their antibacterial, antibiofilm and cytotoxic activities. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **179**, 112993.
- Neto EAB, Ribeiro C, Zucolotto V (2008) Síntese de nanopartículas de prata para aplicação na sanitização de embalagens. *Embrapa Instrumentação, Comunicado Técnico* 99.
- Parolia A, Kumar H, Ramamurthy S, Davamani F, Pau A (2020) Effectiveness of chitosan-propolis nanoparticle against *Enterococcus faecalis* biofilms in the root canal. *BMC Oral Health* **20** (339).
- Plutzer B, Zilm, P, Ratnayake J, Cathro P (2018) Comparative efficacy of endodontic medicaments and sodium hypochlorite against *Enterococcus faecalis* biofilms. *Australian Dental Journal* **63** (2), 208–16.
- Righi AA, Alves TR, Negri G, Marques LM, Breyer H, Salatino, A (2011) Brazilian red propolis: Unreported substances, antioxidant and antimicrobial activities. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **91** (13), 2363–70.
- Roy N, Mondal S, Laskar RA, Basu S, Mandal D, Begum NA (2010) Biogenic synthesis of Au and Ag nanoparticles by Indian propolis and its constituents. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **76** (1), 317–25.
- Samiei M, Farjami A, Dizaj SM, Lotfipour F (2016) Nanoparticles for antimicrobial purposes in Endodontics: A systematic review of in vitro studies. *Materials Science & Engineering C: Materials for Biological Applications* **58** 1269–78.
- Sanchez-ayala A, Silveira CMM, Santos EB (2008) Adição de própolis ao hidróxido de cálcio e sua influência na ação antibacteriana. *Ciência odontológica brasileira* **11** (3), 81–6.
- Santos LBO, Leitão CS, Cavalcante AM, Silva MAB, Porfirio Z, Santana AEG (2016) Antimicrobial analysis of copaiba oil extract from *Passiflora cincinnata* and endodontic substances. *Journal of Microbiology and Antimicrobials* **8** (6), 34–8.
- Seneviratne CJ, Suriyanarayanan T, Swarup S, Chia KHB, Nagarajan N, Zhang C (2017) Transcriptomics Analysis Reveals Putative Genes Involved in Biofilm Formation and Biofilm-associated Drug Resistance of *Enterococcus faecalis*. *Journal of Endodontics* **43** (6), 949–55.
- Šileikaitė A *et al.* (2016) Investigation of Silver Nanoparticles Formation Kinetics During Reduction of Silver Nitrate with Sodium Citrate. *Materials Science* **15**, 21–7.
- Silva MB, Garrido ADB, Leomil L, Miyamoto (2016) Avaliação in vitro da atividade antimicrobiana de pastas endodônticas à base de extrato glicólico de *Musa paradisiaca* frente a *Enterococcus faecalis*. *Full dentistry in Science* **4** (14), 352–57.
- Tian J *et al.* (2007) Topical delivery of silver nanoparticles promotes wound healing. *ChemMedChem*, **2** (1), 129-36.

ANEXOS

ANEXO 1- PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Figura 19- Certificado de Apresentação de Apreciação Ética.



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: EFEITO DA INCORPORAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA BIOSINTETIZADAS COM PRÓPOLIS VERMELHA DE ALAGOAS EM MATERIAL

Pesquisador: Teresa de Lisieux Guedes Ferreira Lôbo

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 18101219.6.0000.5013

Instituição Proponente: Escola de Enfermagem e Farmácia da UFAL

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.606.144

Fonte: Plataforma Brasil, 2019.

ANEXO 2- Dados sobre a cepa de *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212)

Figura 20- Visão geral da cepa ATCC 29212 de *Enterococcus faecalis*.

Assembly Level		Organism Summary	
Date Published	February 26, 2020	Name	ATCC® 29212™
Length	3.041.813 bp	Isolation	Urine
Sequencing Technology ⓘ	Illumina + Oxford Nanopore Hybrid Assembly	Biosafety Level	2
Number of Contigs ⓘ	3 (2 Circularized) 	Type Strain	No
Assembly Summary ⓘ	Chromosome		
N50	2.933.501 bp		
%GC	37.37%		
Annotations Summary		Input Reads Summary	
Number of CDS	2.902	Oxford Nanopore Read Count	362.678
Number of Hypothetical Proteins	1.226	Oxford Nanopore Median Q Score ⓘ	16
Number of tRNA	60	Illumina Read Count	5.451.865
Number of 5s rRNA	4	Illumina Mean Coverage Depth	440,489x
Number of 16s rRNA	4	Illumina Median Q Score	38
Number of 23s rRNA	4		

Fonte: ATCC, 2020.