

UNIVERSIDADE DE TAUBATÉ
Cláudia Auxiliadora Pinto

**Avaliação do efeito antimicrobiano sobre
Enterococcus faecalis e sua aderência
promovido pelo cimento MTA com ou sem
nanopartículas de prata**

Taubate – SP
2013

UNIVERSIDADE DE TAUBATÉ
Cláudia Auxiliadora Pinto

**Avaliação do efeito antimicrobiano sobre
Enterococcus faecalis e sua aderência
promovido pelo cimento MTA com ou sem
nanopartículas de prata**

Tese apresentada para obtenção do Título de Doutor pelo Programa de Pós-Graduação em Odontologia do Departamento de Odontologia da Universidade de Taubaté.

Área de Concentração: Endodontia

Orientador: Prof^a Dr^a Sandra Márcia Habitante

Co-Orientador: Prof^a Dr^a Silvana Soléo
Ferreira dos Santos

Taubate – SP
2013

**Ficha catalográfica elaborada por
Liliane Castro – Bibliotecária CRB-8/6748**

P659a Pinto, Cláudia Auxiliadora
Avaliação do efeito antimicrobiano sobre *Enterococcus faecalis* e sua aderência promovido pelo cimento MTA com ou sem nanopartículas de prata / Cláudia Auxiliadora Pinto. - 2013.
112f. : il.

Tese (doutorado) – Universidade de Taubaté, Departamento de Pós-graduação em Odontologia, 2013.
Orientação: Profa. Dra. Sandra Márcia Habitante, Departamento de Pós-graduação em Odontologia.
Co-orientação: Profa. Dra. Silvana Soléo Ferreira dos Santos, Departamento de Pós-graduação em Odontologia.

1. Nanopartículas metálicas. 2. *Enterococcus faecalis*. 3. Agregado trióxido mineral - MTA. 4. Endodontia. I. Título.

CLÁUDIA AUXILIADORA PINTO

Data: _____

Resultado: _____

BANCA EXAMINADORA

Prof.^a Dr.^a Sandra Márcia Habitante – Universidade de Taubaté

Assinatura: _____

Prof.^a Dr.^a Silvana Soléo Ferreira dos Santos – Universidade de Taubaté

Assinatura: _____

Prof. Dr. José Luiz da Silva Lage Marques – Universidade de Taubaté

Assinatura: _____

Prof.^a Dr.^a Igor Prokopowitch – Universidade de São Paulo-SP

Assinatura: _____

Prof. Dr. Celso Luiz Caldeira – Universidade de São Paulo-SP

Assinatura: _____

Dedico este trabalho,

*A Deus, que me permitiu chegar até aqui e me deu condições para que
eu alcançasse os meus objetivos.*

*À minha filha Luísa, luz da minha vida, que começou essa caminhada
juntinho a mim, e muitas vezes não entendeu as minhas ausências,
você é a razão maior de todos os meus esforços. Te amo!*

*Ao meu amor, Téo, que soube entender a minha indisponibilidade, a
minha tensão, a minha ansiedade, tendo sido pai-mãe da Luísa
inúmeras vezes para me suprir. Te amo!*

*A minha mãe Inês, que mostrou total desprendimento, ao vir para
Taubaté e cuidar da Luísa como só uma avó dedicada pode fazer. Mãe
te amo e não teria conseguido sem você!*

*Ao meu pai, Jair, “in memoriam”, que infelizmente não pode presenciar
esse momento. Que com seu exemplo me demonstrou a importância da
honestidade e retidão de caráter, minhas saudades eternas...*

*Ao meu mestre eterno, Prof. Dr. Nivaldo Zöllner, “in memoriam”, que
com sua maneira de ensinar me fez amar a Endodontia e com seu
apoio me fez seguir na carreira acadêmica. Muitas saudades...*

*A Disciplina de Endodontia, nas pessoas de meus amigos e queridos
mestres Prof^a Dr^a Sandra Márcia Habitante, Prof. Dr Nivaldo André
Zöllner e Prof. Dr. João Marcelo F. de Medeiros, vocês são meus exemplos,
me moldaram e fizeram de mim o que sou hoje! Adoro estar com vocês!*

*Aos meus queridos alunos, que me fazem querer ir sempre além, para
poder compartilhar com vocês a minha experiência, vocês são a razão
maior de todo o meu esforço!*

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora Prof^a Dr^a Sandra Márcia Habitante, que me apoiou frente às dificuldades que o tema deste trabalho me trouxe, me mostrando o caminho a tomar, clareando minhas dúvidas e incertezas. Muito obrigada por engrandecer esse trabalho com sua sabedoria e incentivar o meu crescimento. Você é um modelo para mim.

A minha co-orientadora Prof^a Dr^a Silvana Soléo Ferreira dos Santos, exemplo de força e determinação. Obrigada por acreditar nesse trabalho e seguir batalhando comigo nos inúmeros pilotos até a determinação da metodologia deste trabalho. Você é uma inspiração pra mim.

Aos amigos do Laboratório de Microbiologia da UNITAU, que não mediram esforços para me ajudar na execução da parte experimental do meu trabalho, com quem dividi minhas angústias e alegrias, em especial ao Prof. Ivan da Silva Faria, às técnicas Maitê Chagas Iglesias, Tânia Cristina Sumita e Juliana Santos e às funcionárias Cristiana de Moura e Marisa Fátima dos Santos Silva.

À amiga Nathalia Lobo e minha sobrinha Géssica Mota Pinto pela ajuda na confecção dos corpos de prova e fotografias deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Davi Romeiro Aquino pela ajuda na análise estatística deste trabalho.

Ao Prof. Dr. José Luíz da Silva Lage-Marques, que nos brindou com sua experiência durante suas aulas e discussões dos projetos .

À Profª Drª Denise Pontes Raldi, que sempre nos direcionou quer seja nos trabalhos durante o curso, quer seja no projeto de pesquisa da tese, com sua precisão e objetividade .

Ao Prof. Dr. João Marcelo Ferreira de Medeiros, pela amizade e apoio durante o curso.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade de Taubaté por muito contribuírem com a minha formação de pesquisadora.

Aos coordenadores do Programa de Pós-Graduação stricto-senso em Odontologia, Prof. Dr. José Roberto Cortelli e Profa. Dra. Ana Christina Claro Neves pela condução deste curso com seriedade e idoneidade.

Aos colegas e parceiros do Programa de Pós-Graduação: Celso Monteiro, Érica Carvalho, Graziela Salum, Rogério Hadid, Supercílio Barros, Luiz Felipe Rangel, Suzane Raslam, Alexandre Lustosa, Cyntia Ferreira, Ana Paula Lima, Denise Pedrini, Viviam Mársico, Ana Paula Grímiao, Vinícius Brigagão, Leonardo Silveira e Paulo Roberto Orzechowski, obrigada pelo convívio e pelos momentos de descontração.

Aos queridos companheiros das disciplinas de Endodontia, Clínica Integrada e Imagiologia, obrigada pelo apoio e compreensão as minhas ausências.

Ao Prof. Ms. José Roberto Moura , por me dar a honra de fazer parte de sua equipe e ser uma inspiração para que eu busque evoluir sempre.

À Diretora do Departamento de Saúde Bucal da Prefeitura Municipal de Cruzeiro, Luciene Dias Sansevero e coordenadoras Sonia Christina B. Barbosa e Patrícia Gibran L. Nunes, por me permitirem flexibilizar meu horário e assim permanecer no quadro de funcionários durante a vigência deste curso.

À Universidade de Taubaté, pelo incentivo dado na minha formação docente, com a concessão de bolsa de estudos.

*“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor,
mas lutei para que o melhor fosse feito.
Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus,
não sou o que era antes.”*

Marthin Luther King

Pinto CA. Avaliação do efeito antimicrobiano sobre *Enterococcus faecalis* e sua aderência promovido pelo cimento MTA com ou sem nanopartículas de prata [Tese de Doutorado]. Taubaté: Universidade de Taubaté, Departamento de Odontologia, 2013. 112p.

RESUMO

Objetivo: Avaliar se a adição de nanopartículas de prata ao cimento MTA branco irá melhorar a ação antimicrobiana sobre *Enterococcus faecalis* e prevenir a aderência deste microrganismo ao material. **Método:** Teste de contato direto utilizando corpos de prova dos materiais: MTA branco (n=10) – grupo B, MTA cinza (n=10) – grupo C, MTA branco + NPAg em pó a 1% em peso (n=10) – grupo P, MTA branco + solução de NPAg 50ppm (n=10) – grupo L, que foram mantidos a 35°C por 72 horas na suspensão de *Enterococcus faecalis* em SBF (0.085 UA; 660nm). Alíquotas de 100µL foram tomadas da suspensão a cada 24 horas, realizadas as diluições seriadas e semeadas em triplicata em placa de Petri contendo meio Nutriente acrescido de azul de bromotimol a 0,001%. As placas foram incubadas a 35°C por 48 horas e então realizadas as contagens de UFC. Ao final de 72 horas, corpos de prova em resina (n=10), que haviam sido mantidos na mesma suspensão juntamente com os demais grupos, tiveram a suspensão renovada, tendo sido ajustada para 0.1 UA (660nm). Permaneceram por mais 72 horas em estufa a 35°C e então foram submetidos ao teste de aderência. **Resultados:** Para a comparação intergrupos considerando a variação do número de UFC em dois períodos houve diferença significativa entre o grupo P e demais grupos no intervalo (T0-24h) e no intervalo (48-72h) para o grupo C comparado ao grupo L e P (Teste Anova – teste t; $\alpha=0.01$). **Conclusões:** Os cimentos MTA cinza e branco, com ou sem nanopartículas, apresentaram ação antimicrobiana sobre *Enterococcus faecalis* em todos os períodos do teste de contato direto; A adição da nanopartícula de prata em pó promoveu um efeito antimicrobiano em menor tempo sobre o *Enterococcus faecalis*, no teste de contato direto; O MTA branco, com nanopartículas não permitiu a aderência bacteriana ao final de 72 horas em contato com a suspensão bacteriana de *Enterococcus faecalis*.

Palavras-chave: Nanopartículas metálicas; *Enterococcus faecalis*; Aderência bacteriana; Agregado trióxido mineral – MTA; Endodontia.

Pinto, C.A. Evaluation of antimicrobial effect on *Enterococcus faecalis* and its adhesion promoted by MTA cement with or without silver nanoparticles [Tese de Doutorado]. Taubaté: Universidade de Taubaté, Departamento de Odontologia, 2013. 112p.

ABSTRACT

Aim: To evaluate if the addition of silver nanoparticles to white MTA cement will improve the antimicrobial action of *Enterococcus faecalis* and prevent adherence of this microorganism to the material. **Method:** Direct contact test using samples of materials: white MTA (n=10) – B group, gray MTA (n=10) – C group, white MTA + NPAG powder to 1wt% (n=10) – P group, white MTA + solution NPAG of 50ppm (n=10) – L group were kept at 35°C for 72 hours in *Enterococcus faecalis* in SBF(0.085AU; 660nm). Aliquots of the suspension were taken every 24 hours, serial dilutions carried out in triplicate and plated on Petri dishes containing nutrient medium plus bromothymol blue 0.001%. The plates were incubated at 35°C for 48 hours and then the CFU counts performed. At the end of 72 hours resin specimens (n=10) which had been kept at the same suspension together with the remaining groups all had renewed suspension having been adjusted to 0.1AU (660nm). Lasted for over 72 hours in an oven at 35°C and then were tested for adhesion. **Results:** Comparing between those groups consider the variation of numbers of CFU in two periods there was significant difference between the P group and other groups in the interval (T0-24h) and range (48-72h) for group C compared with group L and P (Anova test - t test; $\alpha=00:01$). **Conclusions:** The gray and white MTA, with or without nanoparticles showed antimicrobial activity on *Enterococcus faecalis* at all periods of direct contact test; the silver nanoparticle powder addition promoted an antimicrobial effect in less time on the *Enterococcus faecalis* in test direct contact; white MTA with nanoparticles prevented bacterial adherence at the end of 72 hours in contact with the bacterial suspension of *Enterococcus faecalis*.

Key-words: Metal Nanoparticles; *Enterococcus faecalis*; Bacterial Adhesion; Mineral Trioxide Aggregate – MTA; Endodontics.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Resultado do calculo do tamanho da amostra (ANOVA)	55
Tabela 2 – Média e desvio-padrão (DP) para o log de UFC/mL em diferentes tempos e variação do log de UFC/mL entre dois períodos de tempo para os grupos-teste	71
Tabela 3 – Resultado das comparações intragrupos considerando o log de UFC/mL nos diferentes tempos para cada grupo teste (teste <i>t</i> pareado e Wilcoxon), sendo $p < 0.01$	72
Tabela 4 – Resultado de ANOVA dois critérios (teste <i>t</i>) para comparações intragrupos considerando a variação do log de UFC/mL entre dois tempos, sendo $p < 0.01$	72
Tabela 5 – Resultado do teste <i>t</i> para comparações do controle positivo com grupos teste considerando o log de UFC/mL em cada um dos tempos, sendo $p < 0.01$	73
Tabela 6 – Resultado do teste <i>t</i> para comparações do controle positivo com grupos teste considerando a variação do log de UFC/mL entre dois períodos, sendo $p < 0.01$	74

Tabela 7 – Resultado de ANOVA um critério (teste <i>t</i>) para comparações intergrupos considerando a variação do log de UFC/mL entre dois períodos (T0-24h), sendo $p < 0.01$	75
Tabela 8 – Resultado do teste <i>t</i> para comparações intergrupos considerando a variação de nº UFC/mL entre dois períodos (24-48h), sendo $p < 0.01$	76
Tabela 9 – Resultado de ANOVA um critério (teste <i>t</i>) para comparações intergrupos considerando a variação do log de UFC/mL entre dois períodos (48-72h), sendo $p < 0.01$	76
Tabela 10 – Média e desvio-padrão para o log de UFC/mL após 72horas, sendo $p < 0.01$	76
Tabela 11 – Resultado do teste de Kruskal-Wallis para as comparações entre os grupos (log de UFC/mL das bactérias aderidas após 72horas), sendo $p < 0.01$	77

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Fotomicrografia (MET) das nanopartículas de prata de 20, 60 e 100nm fornecidas pela Sigma-Aldrich. Escala de 50nm	38
Figura 2 – Interações da nanopartícula de prata com as células bacterianas	39
Figura 3 – Nanopartícula de prata em pó (A) e líquida (B)	57
Figura 4 – Nanopartículas de prata (Sigma-Aldrich<100) aglomeradas	57
Figura 5 – Inserção do material no molde de Teflon	57
Figura 6 - Remoção dos corpos de prova dos moldes e esterilização	58
Figura 7 – Cultura de 24 horas de <i>Enterococcus faecalis</i> em BHI	60
Figura 8 – Placas em triplicata para contagem de UFC na suspensão no tempo zero	61
Figura 9 – Suspensão bacteriana (A) e contaminação dos corpos de prova (B)	61
Figura 10 – Remoção do corpo de prova da suspensão (A), enxague (B) e introdução no flaconete com pérolas de vidro (C e D)	64

Figura 11 – Diluição seriada (A) alíquota sendo pipetada (B) e semeada em placa (C)	65
Figura 12 – Teste de contato direto - controle negativo (SBF) em todos os tempos	67
Figura 13 – Teste de contato direto - controle negativo 24h (grupos B, C, L e P)	67
Figura 14 – Teste de contato direto - controle negativo 48h (grupos B, C, L e P)	67
Figura 15 – Teste de contato direto - controle negativo 72h (grupos B, C, L e P)	68
Figura 16 – Teste de contato direto - crescimento <i>E. faecalis</i> no grupo controle positivo em todos os tempos e nas diluições em que foram realizadas as contagens de UFC	68
Figura 17 – Teste de contato direto – crescimento <i>E. faecalis</i> no Grupo B em todos os tempos e nas diluições em que foram realizadas as contagens de UFC	68
Figura 18 – Teste de contato direto – crescimento <i>E. faecalis</i> no Grupo C em todos os tempos e nas diluições em que foram realizadas as contagens de UFC	68

Figura 19 – Teste de contato direto – crescimento <i>E. faecalis</i> no Grupo L em todos os tempos e nas diluições em que foram realizadas as contagens de UFC	69
Figura 20 – Teste de contato direto – crescimento <i>E. faecalis</i> no Grupo P em todos os tempos e nas diluições em que foram realizadas as contagens de UFC	69
Figura 21 – Teste de aderência – controle negativo (Tzero)	69
Figura 22 – Teste de aderência – controle negativo (72 horas)	70
Figura 23 – Teste de aderência – crescimento <i>E. faecalis</i> no grupo controle nas diluições em que foram realizadas as contagens de UFC	70
Figura 24 – Teste de aderência – crescimento <i>E. faecalis</i> aderido após 72 horas (grupos teste – B,C,L,P e R) nas diluições em que foram realizadas as contagens de UFC	70

LISTAS DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ag	prata
ANOVA	Análise de Variância
ATCC	American Type Culture Collection
<i>B. atrophaeus</i>	<i>Bacillus Atrophaeus</i>
BHI	Brain Heart Infusion
<i>C. albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
CIM	Concentração Inibitória Mínima
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>E. faecalis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
G	Grupo
H	Horas
ISO	International Organization Standardization
MTA	Agregado Trióxido Mineral
nm	nanômetro
NP	nanopartícula
<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PPM	Partes por milhão
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>S. mutans</i>	<i>Streptococcus mutans</i>
<i>S. mutans</i>	<i>Streptococcus mutans</i>
SBF	Simulted Body Fluid
UFC	Unidade formadora de Colônias
µL	microlitro

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
2. REVISÃO DE LITERATURA	20
2.1 Microbiologia Endodôntica	20
2.1.1 <i>Enterococcus faecalis</i>	21
2.2 MTA (Agregado de Trióxido Mineral)	27
2.2.1 Efeitos antimicrobianos do MTA	30
2.3 Nanopartículas de prata	35
2.3.1 Ação antimicrobiana da nanopartícula de prata na Odontologia	42
2.3.2 Biocompatibilidade da nanopartícula de prata	50
3. PROPOSIÇÃO	53
4. MÉTODO	54
4.1 Estudo prévio - Concentração Inibitória Mínima(CIM)	54
4.2 Tamanho da amostra	55
4.3 Teste de contato direto	55
4.3.1 Preparo dos corpos-de-prova	56
4.3.2 Preparo do Flúido Corpóreo Simulado (SBF)	59
4.3.3 Preparo da suspensão microbiana	59
4.3.4 Contaminação dos corpos de prova	61
4.3.5 Cinética de morte bacteriana	62
4.4 Teste de Aderência	63
4.5 Análise estatística	66
5. RESULTADOS	67
5.1 Teste de contato Direto	71
5.1.1 Análise intragrupos	71
5.1.2 Análise intergrupos	73
5.2 Teste de Aderência	76
6. DISCUSSÃO	78
7. CONCLUSÕES	88
REFERÊNCIAS	89
APÊNDICE	95
ANEXO	111

1. INTRODUÇÃO

Os microrganismos são os grandes responsáveis pelo desenvolvimento e progressão das doenças da polpa e do periápice e o tratamento endodôntico busca erradicá-los do sistema de canais associando instrumentos, substâncias químicas e um selamento tridimensional deste sistema. Entretanto isso pode não ser suficiente para atingir a cura ao final do tratamento endodôntico. Isso porque as manobras de instrumentação e substâncias químicas utilizadas podem não alcançar os microrganismos que estão colonizando esse espaço, protegidos por uma anatomia complexa, que dificulta a difusão dos antissépticos. Soma-se a isso o fato de que existem alguns microrganismos que resistem ao preparo do canal radicular e aos fármacos utilizados nesse procedimento e permanecem colonizando o canal após a conclusão do tratamento endodôntico, perpetuando a infecção periapical e impedindo a reparação.

Quando todas as alternativas terapêuticas via canal para a resolução do quadro infeccioso são esgotadas resta intervir diretamente na região apical, realizando a cirurgia parendodôntica. Este procedimento busca extirpar in loco os microrganismos que já formaram ali no ápice radicular um biofilme bacteriano, passando a subsistir independentes da infecção intracanal. Realizam-se neste momento as manobras de apicectomia, retropreparo e retrobturação, de forma a descontaminar essa região e criar um ambiente inóspito aos microrganismos que por ventura persistam nesta região. Para isso, além de uma técnica cirúrgica precisa, preparo apical e selamento corretamente realizados, é necessário usar um material

selador que tenha um bom vedamento, seja biocompatível e tenha uma marcante ação antisséptica dificultando a recolonização da retrobturação por microrganismos.

Atualmente o MTA (agregado mineral trióxido) tem sido o material de primeira escolha para este procedimento devido a sua estabilidade dimensional, bom selamento, biocompatibilidade e efeito antimicrobiano (Parirokh & Torabinejad, 2010). Entretanto a literatura especializada tem apresentado resultados conflitantes quando o objetivo da pesquisa é testar o efeito antimicrobiano do MTA contra *Enterococcus faecalis* (Leiss de Leimburg et al., 2004; Miyagak et al., 2006; Eldeniz et al., 2006; Al-Hezaimi et al., 2006; Ribeiro et al., 2006; Tanomaru-Filho et al., 2007; Holt et al., 2007). Esse é apontado como o microrganismo prevalente em periodontite apical secundária persistente (Nair et al., 1990; Gomes et al., 1996; Molander et al., 1998; Sundqvist et al., 1998; Peciulienė et al., 2000; Siqueira Jr. & Roças, 2004; Gomes et al., 2006; Sedgley et al., 2006).

Partindo desta premissa seria adequada a incorporação de uma substância antisséptica eficaz contra esse microrganismo na composição do cimento MTA. Essa substância deveria ter uma liberação lenta e contínua e manter a biocompatibilidade desse material favorecendo a reparação após a cirurgia paraendodôntica.

Em vista das últimas pesquisas uma boa opção para essa associação com o MTA seria a nanopartícula de prata. A prata já tem reconhecida sua ação antisséptica desde os tempos mais remotos. Em forma de nanopartículas a prata apresenta seu espectro ampliado e sua biocompatibilidade melhorada, o que faz com que esteja amplamente utilizada na área de saúde na confecção de cateteres vasculares e urinários, impedindo a fixação de microrganismos na superfície destes instrumentos, entre outras aplicações (Silver et al., 2006).

Na Odontologia a nanopartícula tem sido testada como substância antisséptica com ótimos resultados. Em 2008, Kreth et al. (2008), incorporaram ions prata ao cimento Kerr Pulp Canal Sealer e testaram contra *S. mutans* obtendo um incremento na ação antisséptica deste cimento. Utilizada como solução irrigante a nanopartícula também inibiu *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* e *Candida albicans*, demonstrando ação antisséptica residual, na pesquisa desenvolvida por Carreira (2009), bem como no trabalho de Lofti et al. (2011), onde teve ação antisséptica semelhante ao hipoclorito de sódio a 5.25% contra o *E. faecalis*, porém em concentrações muito mais baixas. Mais recentemente Onoda (2011) incorporou as nanopartículas de prata a vários cimentos endodônticos obtendo uma maior ação antisséptica para os cimentos a base de óxido de zinco e eugenol.

Assim justificam-se estudos incorporando nanopartículas de prata ao cimento MTA com o intuito de melhorar a capacidade antimicrobiana deste cimento.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Microbiologia Endodôntica

Bactérias e seus produtos estão, na grande maioria das vezes, associadas à indução e à perpetuação das doenças pulpo-perirradiculares. Acidentes como desvios, degraus, perfurações, instrumentos fraturados e sobreobturações, resultam em fracasso quando associados a um processo infeccioso. Mesmo quando o tratamento endodôntico é executado de forma adequada, o fracasso pode advir. Neste caso, bactérias localizadas em lacunas de reabsorção cementária, no cimento, em canais laterais e deltas apicais, em túbulos dentinários e na lesão perirradicular podem ser responsáveis pela falha (Ørstavik & Pitt Ford, 2004).

De acordo com Gomes et al. (2004) a infecção primária do canal radicular (a infecção prévia a manipulação) tem como características ser polimicrobiana ou mista, tendo no mínimo três espécies e podem atingir 10 espécies, com predominância de bactérias anaeróbias estritas. Citam como as mais frequentemente isoladas: *Peptostreptococcus micros*, *Prevotella prevotti*, *Fusobacterium necrophorum*, *Prevotella intermedia/nigrescens*, *Streptococcus consellatus*, *Streptococcus anginosus*, *Streptococcus sanguis*, *Fusobacterium nucleatum*, *Gemella morbillorum*, *Streptococcus mitis*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella loeschii* e *Lactobacillus acidophilus*. Associaram os casos sintomáticos a Gram-negativas como *Prevotella* ssp., *Porphyromonas* ssp. e fusobactérias, bem como Gram-positivos como *P. micros*.

Nas infecções secundárias, ou seja, aquelas ocorridas em dentes tratados endodonticamente nas quais persiste a periodontite apical, não tendo ocorrido à reparação apical por falha na execução dos procedimentos endodônticos ou reabilitadores, os microrganismos isolados são semelhantes àqueles presentes nas infecções primárias, pois os procedimentos endodônticos inadequados pouco modificaram a microbiota existente, que continua ser polimicrobiana e com grande número de células bacterianas (Pinheiro et al., 2003). Entretanto os casos em que o tratamento endodôntico é bem conduzido e não há reparo apical por mais de quatro anos denomina-se periodontite apical persistente (European Society of Endodontology, 2006). Nestes casos predominam Gram-positivos principalmente os gêneros *Enterococcus*, *Streptococcus* e *Actinomyces*, estando presentes de uma a duas espécies apenas (Gomes et al., 2004).

2.1.1 *Enterococcus faecalis*

Enterococcus faecalis, anaeróbio facultativo Gram-positivo, tem sido isolado frequentemente em casos de periodontite apical resistente ao tratamento endodôntico. Estes microrganismos produzem fatores de virulência como elastase, proteases e hemolisinas, importantes para o estabelecimento de reações periapicais. Eles podem ser resistentes a uma ampla variedade de antimicrobianos, além de várias cepas produzirem betalactamases, o que os torna capazes de causar infecções de difícil tratamento. Além disso, podem sobreviver em ambientes com restrição nutricional por longo período e com baixa atividade metabólica e quando da

mudança de condições nutricionais por microinfiltração coronária, passam a proliferar (Nair et al., 1990; Molander et al., 1998).

Gomes et al. (1996) demonstraram que o preparo químico cirúrgico diminuía a frequência de isolamento de diferentes espécies bacterianas em sessões subsequentes do tratamento endodôntico, utilizando hipoclorito a 2,5% como solução irrigante. Sem fazer uso de medicação antisséptica entre as sessões, observaram que canais inicialmente com infecções mistas passavam a ter monoinfecções nas quais predominavam *Enterococcus faecalis*, sobretudo na última sessão.

Sundqvist et al. (1998) ao analisarem a microbiota existente em dentes apresentando infecções persistentes após o tratamento endodôntico, encontraram predominância de monoinfecções, com presença de *Enterococcus faecalis* em 38% dos casos após o preparo, o que sugeriu que ele seja um importante agente no insucesso da terapia endodôntica. Afirmaram que esta espécie pode ser altamente resistente aos medicamentos usados durante o tratamento endodôntico e um dos poucos microrganismos que tem mostrado resistir, *in vitro*, ao efeito antibacteriano do hidróxido de cálcio. Além disso, é capaz de sobreviver em canais radiculares sem o suporte de outras bactérias. Sua presença em raros casos de infecção primária indica que esta espécie pode ser favorecida pela mudança da ecologia no canal radicular após o preparo químico cirúrgico, sobrevivendo e estabelecendo infecções que são difíceis de tratar e persistindo após a obturação do canal. Se este microrganismo está em pequeno número antes do preparo, pode ser facilmente eliminado, porém uma vez estabelecido no sistema de canais radiculares é um organismo difícil de erradicar.

Peciulienė et al. (2000) analisaram por meio de amostras bacteriológicas a microbiota existente em canais tratados endodonticamente que necessitavam de reintervenção devido à persistência de lesões periapicais. Constataram na amostra inicial do canal, realizada após a desobturação, a predominância de *Enterococcus faecalis* em catorze dos vinte dentes infectados. Em cinco casos este microrganismo estava em cultura pura e em outros nove casos eram os microrganismos predominantes. Foi realizado o preparo químico cirúrgico com instrumentação manual e uso de hipoclorito de sódio a 2,5% (2mL) e EDTA a 17% (5mL) como soluções irrigantes. Mesmo tendo sido constatada a redução bacteriana nas culturas positivas, observou-se que *E. faecalis* ainda estava presente em cinco dos sete dentes que apresentaram culturas positivas. Quatro dos cinco espécimes apresentavam monoinfecções nas amostras iniciais por essa espécie. Concluíram que *E. faecalis* é a espécie dominante nas infecções persistentes.

Examinando duzentos dentes sob tratamento endodôntico e com rarefação óssea periapical, Chávez de Paz et al. (2003) identificaram microrganismos resistentes aos procedimentos endodônticos. Coletaram amostra após a abertura do canal, ao final do preparo do canal após a medicação intracanal. Mesmo após o preparo e medicação intracanal anaeróbios facultativos Gram-positivos ainda foram detectados enquanto que os anaeróbios Gram-negativos estavam em menos de 20% dos casos. As espécies prevalentes foram *Lactobacillus* ssp; *Streptococcus* não mutans e *Enterococcus* ssp. Concluíram que as manobras endodônticas poderiam selecionar cepas mais resistentes. Atribuíram uma maior resistência destas bactérias aos procedimentos endodônticos à estrutura de sua parede celular, secreção de metabólitos e resistência a medicamentos.

Siqueira Jr. & Roças (2004) utilizaram a Reação de Polimerase em Cadeia para identificar microrganismos associados às lesões periapicais, resistentes a terapia endodôntica. Examinaram 22 dentes indicados para retratamento endodôntico, realizando uma coleta logo após a remoção do material obturador. As amostras foram processadas com *primers* indicados para a identificação de bactérias específicas e detectaram *E. faecalis* em 77%, seguido de *Pseudoramibacter alactolyticus* (52%), *Propionibacterium propionicum* (52%), *Dialister pneumosintes* (48%) e *Filifactor alocis* (48%). *Candida albicans* foi encontrada em 9% das amostras. O número médio de espécies em amostras com obturação até dois milímetros aquém do ápice radiográfico era de três (intervalo de 1-5), ao passo que os casos em que o preenchimento estava aquém mais de dois milímetros do vértice resultaram em uma média de cinco espécies (variação: 2-11). Esta diferença foi estatisticamente significativa ($P < 0,05$). Concluíram que existiram microrganismos em todos os casos de dentes obturados e com lesões periradiculares associadas, o que reforça a idéia de que as falhas do tratamento são predominantemente de etiologia infecciosa, causada por infecções intraradiculares secundárias persistentes.

Stuart et al. (2006) afirmaram que *E. faecalis* são microrganismos capazes de sobreviver em ambiente muito hostil, incluindo pH extremamente alcalino, crescendo em temperaturas que variam de 10° a 45°C e resistindo a uma temperatura de 60°C por trinta minutos.

Realizando coletas em dentes com insucesso endodôntico, Gomes et al. (2006) reportaram a prevalência de *E. faecalis* no canal radicular. Afirmaram que sua prevalência pode variar consideravelmente devido a variações na coleta das amostras e análises das amostras. Compararam a técnica de cultura e de PCR em

tempo real (qPCR) para detectar e quantificar *E. faecalis* na mesma amostra do canal radicular. Amostras consecutivas do canal radicular obtidas de casos de infecções primárias (n=40) e retratamentos (n=48) foram divididas em duas alíquotas iguais que eram analisadas independentemente usando cultura e PCR em tempo real por investigadores cegados para analisar os resultados de outra amostra. *E. faecalis* foi detectado em 10.2% e 79.5% das amostras por cultura e PCR em tempo real respectivamente ($p < 0.0001$; teste de McNemar). *E. faecalis* foi detectado em mais amostras de retratamento que em infecção primária (89.6% versus 67.5%; $p = 0.01$, teste exato de Fisher). O PCR em tempo real apresentou uma prevalência significativamente maior de *E. faecalis* nas amostras endodônticas que as técnicas de cultura.

Sedgley et al. (2006), investigando a presença de *E. faecalis* na infecção endodôntica pelas técnicas de cultura e PCR quantitativo, obtiveram amostras de cinquenta dentes com polpa necrótica (infecção primária) e de cinquenta dentes com falha no tratamento endodôntico (infecção secundária). Cultura e PCR detectaram as bactérias testadas em 23 de cem e 79 de cem dentes, respectivamente. *E. faecalis* foi recuperado em dois (4%) dos cinquenta dentes com infecção primária e 21 (42%) dos cinquenta dentes com infecção secundária. PCR detectou as espécies marcadas em 41 (82%) e 38 (76%) dos cinquenta dentes com infecção primária e secundária respectivamente.

Observar a ocorrência de nove espécies em casos de insucesso endodôntico por meio de PCR e a relação destas espécies com os sintomas clínicos foi o objetivo de Gomes et al. (2008) nesta pesquisa. O DNA foi extraído a partir de 45 amostras colhidas de canais obturados com lesões periapicais. Um ensaio de PCR utilizando iniciadores específicos para a espécie de DNAr 16S foi usado. *E. faecalis* foi a

espécie mais prevalente, detectado em 77,8% dos dentes de estudo, seguido por *Peptostreptococcus micros*, detectado em 51,1%. *Porphyromonas gingivalis*, *Porphyromonas endodontalis*, *Prevotella intermedia* e *Prevotella nigrescens* foram detectados em 35,6%, 22,2%, 11,1% e 11,1% dos dentes da amostra, respectivamente. Além disso, PCR detectou *Filifactor alocis* em 26,7%, *Treponema denticola* em 24,4%, e *Tannerella forsythia* em 4,4% das amostras. *T. denticola* e *P. micros* foram estatisticamente associadas com sensibilidade à percussão ($p < 0,05$). *P. nigrescens* foi associada com a presença de dor espontânea e abscesso ($p < 0,05$). *P. Endodontalis* e *P. nigrescens* foram associados à exsudatos purulentos ($p < 0,05$). Também foi observada relação sinérgica entre algumas espécies. Os resultados deste estudo indicaram que *E. faecalis* foi a espécie mais frequentemente identificada por PCR em dentes com falha do tratamento endodôntico, detectaram *E. faecalis* em 77,8% dos 45 dentes examinados. Os tratamentos haviam sido realizados há no mínimo quatro anos e havia em média 2,67 espécies por canal.

Subramanian & Mickel em 2009 selecionaram 33 dentes com tratamento endodôntico e periodontite apical persistente para cirurgia paraendodôntica. A lesão apical e o fragmento apical foram analisados por meio de *Real Time-PCR*. Foi identificado DNA bacteriano em 27 dos casos, sendo o perfil microbiano característico de infecção polimicrobiana. As bactérias estavam em maior número na porção apical da raiz que na lesão, sendo o microrganismo prevalente *E. faecalis* (14,6%) tanto na lesão quanto no ápice radicular. Esse resultado sugere que esse microrganismo pode contribuir para a persistência de lesão periapical, tanto na adesão quanto na invasão da lesão.

Como bem observou Ferrari (2010), há que se distinguir a periodontite apical secundária da periodontite apical secundária persistente, ou refratária. Neste último

caso o tratamento endodôntico foi adequadamente realizado e o perfil da microbiota é diferente. No primeiro caso os microrganismos isolados são semelhantes aos encontrados na periodontite apical primária, pois os procedimentos endodôntico pouco efeito fizeram sobre eles, existindo uma infecção com presença de uma variedade de espécies. Já no segundo caso os microrganismos estão em uma ou duas espécies, predominando anaeróbios facultativos Gram-positivos, sobretudo *Enterococcus*, *Streptococcus* e *Actinomyces*.

Frente a estes estudos, que apresentam *E. faecalis* como o microrganismo mais prevalente em infecções persistentes torna-se pertinente testar um material a ser utilizado em cirurgia paraendodôntica contra este patógeno.

2.2 MTA (Agregado de Trióxido Mineral)

Desenvolvido na Universidade de Loma Linda, seu uso foi reportado por Lee et al. em 1993, que relatam que o cimento apresenta em sua composição o silicato tricálcico, aluminato tricálcico, óxido tricálcico, óxido de silicato e óxido de bismuto. De acordo com os fabricantes esse cimento seria composto por cimento de Portland (75 a 80%), óxido de bismuto (20%) e sulfato de cálcio desidratado. Lage-Marques et al. (2005) enumeram como compostos deste cimento o Dióxido de silício, Potássio, Alumina, Óxido de sódio, Óxido de ferro, Trióxido de enxofre, Óxido de enxofre, Óxido de cálcio, Óxido de bismuto, Óxido de magnésio, Sílica cristalina, Óxido de cálcio e Sulfato de potássio e sódio.

Este cimento foi introduzido inicialmente na coloração cinza, mas devido ao seu potencial de escurecimento da estrutura dentária foi posteriormente produzido na coloração branca. Na composição do MTA branco existe uma menor quantidade de ferro, alumínio e magnésio (Estrela et al., 2000; Asgary et al., 2005).

É um material constituído de finas partículas hidrofílicas que em contato com a umidade se convertem em um gel coloidal que se cristaliza sofrendo expansão, o que lhe confere um bom selamento marginal. A presa final acontece após três a quatro horas resultando em uma sólida estrutura. As propriedades físicas podem ser influenciadas pela proporção pó-liquido quantidade de ar retido, pressão de condensação, umidade do meio, tipo do veículo, período de tempo entre a mistura e utilização, espessura do material e temperatura. Quando o pó do MTA é misturado com a água ocorre a formação de hidróxido de cálcio e silicato de cálcio hidratado. A quantidade de silicato de cálcio diminui devido à formação de cálcio precipitado, produzindo mais hidróxido de cálcio, que é responsável pela alta alcalinidade do material, o que cria um ambiente inóspito para as bactérias. O pH inicial do material é de 10.2 e sobe para 12.5 após três horas, quando passa a se manter constante (Parirokh & Torabinejad, 2010).

Realizando um estudo em subcutâneo de ratos, Holland et al. (1999) concluíram que o MTA e o hidróxido de cálcio têm o mesmo mecanismo de ação. Segundo os autores o óxido de cálcio presente no pó do MTA ao entrar em contato com a umidade seria convertido em hidróxido de cálcio, que em contato com os fluidos tissulares se dissociaria em íons cálcio e hidroxila. Os íons cálcio reagiriam com o gás carbônico dos tecidos dando origem a granulações de calcita e junto a essas granulações haveria acúmulo de fibronectina, que permite adesão e diferenciação celular levando a formação de uma ponte de tecido mineralizado.

Faraco Jr. & Holland (2004) demonstraram que o MTA também pode ser aplicado com sucesso como capeador pulpar, induzindo a formação de ponte de dentina e mantendo o dente livre de inflamação. Realizaram uma pesquisa observaram a resposta da polpa dental de cães para MTA branco quando usado como capeador pulpar. A polpa dos dentes de 15 cães foi experimentalmente exposta e capeada com MTA branco. Os animais foram sacrificados dois meses mais tarde e os espécimes foram preparados para estudo histomorfológico. A polpa capeada com MTA branco mostrou um processo de reparação com a formação de ponte de dentina completa em todas as amostras. Em alguns casos, não houve uma forma tubular da dentina, mas apenas uma estrutura com um aspecto morfológico interessante vedando o local da exposição. Apenas dois casos apresentaram inflamação da polpa.

Em outro estudo realizando perfurações experimentais na lateral da raiz de cães, Holland et al. (2007) observaram na análise histológica além de deposição de cimento neoformado na perfuração, ausência de inflamação do ligamento periodontal, o que retrata bem a biocompatibilidade e capacidade de induzir formação de tecido mineralizado, favorecendo a reparação.

Este material reúne características como insolubilidade aos fluídos bucais, estabilidade dimensional e biocompatibilidade, que fizeram dele, ao longo destes anos, o material de primeira escolha para selamento de retrocavidades, ápices incompletos e perfurações radiculares (Parirokh & Torabinejad, 2010).

2.2.1 Efeitos antimicrobianos do MTA

Utilizando a técnica de PCR, Leiss de Leimburg et al. (2004) buscaram detectar infiltração de *E. faecalis* através de obturação apical com MTA de dentes com ápice aberto. Utilizaram 34 dentes extraídos simulando o forame aberto e realizaram obturação apical com MTA, em espessuras variando de um, dois e três milímetros (grupos 1, 2 e 3). Os espécimes esterilizados foram inoculados com *E. faecalis* e incubados em meio estéril. O DNA extraído dos espécimes foi amplificado por PCR, que produziu um segmento específico para *E. faecalis* 16S DNA. Até o décimo dia de incubação nenhum meio foi contaminado. No 50º dia, 17% dos espécimes estavam contaminados, sem diferença estatisticamente significativa entre os grupos. Concluíram que o MTA promoveu um selamento adequado nos casos de obturação apical de dentes com ápice aberto.

Eldeniz et al. (2006) avaliaram a atividade antibacteriana dos componentes desprendidos dos materiais retrobturadores: amalgama, MTA ProRoot, IRM, Super Bond C&S, Geristone, Dyract, Clearfil APX com SE Bond, ou Protect Bond por meio do teste de contato direto com *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853). Os materiais foram testados imediatamente após aplicação (amostras frescas) e após três dias (amostras pós presa). Dez microlitros de suspensão bacteriana foi adicionada a cada poço para contato direto com cada material por uma hora a 37°C. O crescimento das bactérias sobreviventes foi analisado de hora em hora durante 15 horas em um espectrofotômetro de microplacas a 620nm. As amostras frescas de todos os materiais mostraram um atraso de três horas no crescimento exponencial

de *E. faecalis* e *S. aureus* e de cinco horas para *P. aeruginosa*. As amostras pós presa de IRM e MTA ProRoot mostraram maior atividade antimicrobiana que os outros materiais: ambos inibiram completamente *P. aeruginosa* e ambos atrasaram ou limitaram o crescimento de *E. faecalis*. Concluíram que IRM e MTA ProRoot foram inibidores mais potentes de crescimento bacteriano que os demais materiais testados.

Miyagak et al. (2006) avaliaram a capacidade antimicrobiana dos cimentos obturadores de canal: N-Rickert, Sealapex, AH Plus e também do Agregado Trióxido Mineral (MTA) e Cimento de Portland. O método utilizado foi a difusão em Ágar, em placas previamente inoculadas com os seguintes microrganismos: *C. albicans*, *S. aureus*, *E. faecalis*, *E. coli*. A leitura do diâmetro do halo de inibição do crescimento microbiano foi realizada, após 24 horas de incubação em estufa a 37°C. De acordo com a metodologia empregada, os autores concluíram que: somente os cimentos obturadores AH Plus e N-Rickert apresentaram atividade antimicrobiana contra *C. albicans*, *S. aureus* e *E. coli*; não foi observada atividade antimicrobiana no cimento de Portland, MTA e Sealapex. O cimento N-Rickert apresentou halos de inibição maiores variando de 8 a 18 milímetros. O microrganismo *E. faecalis* foi resistente contra todos os cimentos testados.

Tanomaru-Filho et al (2007) avaliaram a atividade antimicrobiana dos cimentos: Sealer 26, Sealapex, Óxido de zinco e eugenol, Cimento de Portland branco e cinza, MTA – Angelus branco e cinza, Pro-Root cinza contra os microrganismos: *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosas*, *Candida albicans* e *Enterococcus faecalis*. Foi utilizado o método de difusão em ágar usando ágar Müller-Hinton. Foi vertido 10mL de ágar esterilizado em cada placa e depois 5mL de ágar contendo os microrganismos

testados (10^6) e foi aguardada a solidificação. Os materiais foram colocados imediatamente após manipulação em poços no ágar (4 por material) e as placas foram deixadas a temperatura ambiente para a pré-difusão do material por duas horas e então incubadas a 37°C por 24 horas. Gel de cloreto de trifeniltetrazolio a 0.05% foi adicionado para otimização, e as zonas de inibição foram mensuradas. Os dados foram submetidos a análise estatística (Kruskal-Wallis e Dunn, 5% de significância). Os resultados mostraram que todos os materiais tiveram atividade antimicrobiana contra todas as cepas testadas. Os cimentos Sealapex com OZ, OZE e Sealer 26 apresentaram halos de inibição maiores que os cimentos a base de MTA e de Portland, com diferenças significantes.

Ribeiro et al. (2006) compararam o efeito antimicrobiano do MTA Dentsply, MTA Angelus, hidróxido de cálcio e cimento Portland sobre quatro cepas bacterianas: *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Escherichia coli* (ATCC 33780), *Bacteroides fragilis* (ATCC 23749) e *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212). Placas contendo ágar Muller-Hinton suplementadas com 5% de sangue de carneiro, hemina e menadiona foram inoculadas com as suspensões bacterianas. Poços foram confeccionados com auxílio de perfuradores e imediatamente preenchidos com os materiais. As placas foram incubadas a 37°C por 48 horas em atmosfera de anaerobiose, exceto *P. aeruginosa*. O diâmetro dos halos de inibição foi medido e os dados analisados usando o teste estatístico ANOVA e o de Tukey com nível de significância de 1%. O MTA Dentsply, MTA Angelus e Cimento Portland inibiram o crescimento da *P. aeruginosa*. O hidróxido de cálcio foi efetivo contra *P. aeruginosa* e *B. fragillis*. Sob atmosfera de anaerobiose, condição que pode impedir a formação de espécies reativas do oxigênio, nenhum dos materiais foi capaz de exercer efeitos sobre *E. faecalis* e *E. coli*.

Al-Hezaimi et al. (2006) analisaram o efeito antimicrobiano do MTA cinza e branco (ProRoot) sobre *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) e *Streptococcus sanguis* (ATCC 10560) em um estudo in vitro utilizando teste de diluição. Alíquotas de cada um dos microrganismos testados foram obtidas a partir de uma cultura de estoque e adicionado a tubos contendo o meio Saboraud em caldo ($DO=10^4$). Foi adicionado a cada um dos tubos o MTA recém misturado em diluições seriadas em água destilada desde cinquenta até 1.56mg/mL e os tubos foram incubados a 37°C e avaliados por turvação do meio nos tempos: zero, uma, 24, 48 e 72 horas. Uma correlação direta foi encontrada entre as concentrações de MTA cinza e MTA branco e seu efeito antibacteriano. Tubos contendo MTA cinza em concentrações de cinquenta, 25 e 12,5mg/mL não mostrou crescimento de *Enterococcus faecalis* em nenhum dos períodos de tempo testado enquanto os tubos contendo MTA branco mostrou crescimento *E. faecalis* em todas as concentrações e períodos de tempo testados. Estatisticamente, foram encontradas diferenças significativas entre os tubos contendo MTA cinza nas concentrações de cinquenta, 25 e 12,5mg/mL e os tubos contendo concentrações semelhantes de MTA branco ($p<0,001$). Nos tubos contendo MTA cinza nas concentrações de cinquenta, 25, 12,5, 6,25 e 3,12mg/mL e os tubos contendo MTA branco em concentrações de cinquenta, 25 e 12,5mg/mL não houve crescimento de *S. sanguis* em qualquer dos períodos de tempo testados. Estatisticamente, foram encontradas diferenças significativas entre os tubos contendo MTA cinza nas concentrações 6,25 e 3,12mg/mL e os tubos contendo concentrações semelhantes de MTA branco ($p<0,001$). Concluíram que a suscetibilidade de *E. faecalis* e *S. sanguis* ao MTA difere e que o MTA cinza requer concentrações menores que o MTA branco para exercer o mesmo efeito antibacteriano contra cada um dos microrganismos testados.

Holt et al. (2007) realizaram um estudo in vitro com dois propósitos: comparar o efeito antimicrobiano do MTA cinza e branco quando misturados à água esterilizada ou clorexidina a 2% e também comparar a resistência à compressão do MTA e clorexidina versus MTA e água esterilizada. O teste sobre o efeito antimicrobiano foi realizado pela colocação de amostras recém-misturadas em poços nas placas de Agar TSA (Tripticase Soy Ágar) inoculada com *Enterococcus faecalis* (ATCC 4082) e as zonas de inibição foram comparadas após incubação por 24 horas a 37°C. No teste de resistência a compressão, porções de MTA foram deixadas para tomar presa por 72 horas e então comprimidas até a fratura usando uma máquina de teste Instron. No teste antimicrobiano as zonas de inibição foram significativamente mais largas para as amostras misturadas com clorexidina a 2%, independente do tipo do MTA. O MTA cinza com água mostrou uma zona de inibição maior que o MTA branco. No teste de resistência a compressão não houve diferença significativa entre os grupos, mas o MTA misturado com água esterilizada sempre apresentou uma resistência à compressão mais alta que o MTA misturado com clorexidina.

Zhang et al. (2009) testaram o efeito antibacteriano do MTA e Bioagregado (BA) sobre *Enterococcus faecalis* (VP3-181). O pó fresco de BA e MTA, o pó produzido a partir dos materiais endurecidos e esmagados e pedaços dos materiais endurecidos foram suspensos em água esterilizada em concentrações de 10-100mg/mL para o teste de exposição direta. Também o efeito antimicrobiano dos materiais misturados com quantidade igual de pó de dentina humana também foi testado. Os materiais foram misturados a suspensão de *E. faecalis* (3×10^7 UFC/mL) e incubados a temperatura ambiente e coletadas amostras após um, seis, 15 e sessenta minutos e quatro horas e plaqueadas em diluições seriadas. Os dois

materiais foram igualmente efetivos na eliminação de bactérias e causou uma significativa diminuição na viabilidade bacteriana dentro de seis minutos. O pó dos materiais após presa triturados teve um efeito bactericida tão ou mais efetivo que o pó fresco. A adição de quantidades iguais de pó de dentina à suspensão tanto no MTA quanto no BA (fresco ou após presa) resultou em eliminação rápida da bactéria.

Bidar et al. (2012) comparam diferentes concentrações de gluconato de clorexidina (0.12, 0.2 e 2%) associado ao MTA e CEM (mistura enriquecida de cálcio) na amplificação do efeito antimicrobiano sobre *E. faecalis* (ATCC 29212), *E. coli* (ATCC 33780), *S. mutans* (ATCC 25175), *C. albicans* (ATCC 10231) e *A. viscosus* (ATCC 15987). Foi realizado o teste de contato direto com as suspensões ajustadas na escala 0.5 de Mc Farland ($1,5 \times 10^8$) e os microrganismos foram testados isolados e misturados. Foi realizada semeadura em placa com ágar sangue nos tempos zero, 24, 48 e 72 horas. A ação antimicrobiana dos cimentos aumentou com o tempo, mas ambos não tiveram nenhum efeito antimicrobiano sobre *E. faecalis* e sobre os microrganismos misturados, sendo que o maior efeito do MTA foi sobre *C. albicans* e do CEM sobre *A. viscosus*. A adição do gluconato de clorexidina aumentou o efeito antimicrobiano, independente da concentração desta substância.

2.3 Nanopartícula de prata

A prata possui um grande potencial antimicrobiano, conhecida pelo homem desde os remotos tempos. Em forma de vários compostos é utilizada para

tratamento de infecções bacterianas severas pela milenar medicina indiana Ayurveda desde sempre. Existem relatos do uso de nitrato de prata no tratamento de doenças venéreas em meados de 1700. No Século XIX o nitrato de prata passou a ser utilizado no tratamento de queimados. Acreditava-se que essa substância favoreceria a epitelização e protegeria a ferida de contaminação formando uma crosta sobre ela. Em 1881, Carl S. F. Crede propôs o uso do colírio de nitrato de prata para curar oftalmia neonatal, um tipo de conjuntivite, procedimento este realizado até os dias atuais. Entretanto, com a descoberta das penicilinas, a prata foi relegada a segundo plano, passando a ter seu uso restrito ao tratamento de feridas e queimaduras, como antisséptico (Rai et al., 2012).

Na Endodontia a prata também sempre foi utilizada na composição de materiais diversos. Como irrigante do canal radicular na técnica de irrigação por Mario Badan em 1930, a oxigenoargentoterapia, que liberava oxigênio nascente e íons prata. Na obturação do canal com o uso dos cones de prata, posteriormente abandonados por sofrer oxidação e em cimentos endodônticos como o N-Rickert, AH-26 e ProcoSol, que apesar do inconveniente de mancharem a estrutura dentária se mantidos na coroa, ainda são utilizados com ótimos resultados (Carreira & Bombana, 2010).

O prefixo nano é derivado da palavra grega *nanos* que significa “anão”. É um termo técnico usado em qualquer unidade de medida, significando um bilionésimo dessa unidade, por exemplo, um nanômetro equivale a um bilionésimo de um metro (Poletto & Pohlmann, 2008). A palavra usada para denominar essa ciência em nanoescala - nanotecnologia, sugerida por Feynman, surgiu em 1974, quando um pesquisador da Universidade de Tóquio, Norio Taniguchi, fez a distinção entre engenharia em escala micrométrica e o novo campo da engenharia, em escala

submicrométrica, que estava começando a emergir. As nanopartículas variam de um a 100nm e apresentam propriedades físicas e químicas diferentes dos materiais em escala macroscópica. Essas características permitiram criar novos produtos bem como sua aplicação em ciência e biotecnologia (Singh & Nalwa, 2011).

A Nanomedicina é um campo emergente, que está expandindo rapidamente devido ao desenvolvimento e incorporação de novos nanocompositos em uma gama de produtos e tecnologias, trazendo inovações para os campos de imagem molecular, carreador de fármacos, diagnóstico e tratamento de doenças cardiovasculares, reparação de feridas e desenvolvimento de materiais e dispositivos médicos com propriedades antimicrobianas (Martinez-Gutierrez et al., 2012).

Os materiais em nano-escala apresentam uma taxa superfície-área-volume alta, que resulta em um aumento de sua reatividade e também pode melhorar a sua biocompatibilidade. As nanopartículas metálicas como cobre, titânio, magnésio, zinco e ouro tem um forte potencial bactericida, mas entre todas elas as nanopartículas de prata provaram ser as mais efetivas como agente antimicrobiano contra bactérias, vírus e outros microrganismos eucariontes (Rai et al., 2012).

Devido a esse amplo espectro a nanopartículas de prata vem sendo utilizada em uma gama enorme de produtos desde filtros para purificação de água e ar, embalagens para evitar contaminação de gêneros alimentícios, roupas, cosméticos até instrumentos médicos, revestindo cateteres e também fazendo parte da composição de materiais utilizados como curativos. Considera-se esse nanomaterial um agente biocida de longa duração, estável em altas temperaturas e de baixa volatilidade (Marambio-Jones & Hock, 2010).

Lara et al. (2010) destacam as propriedades físico-químicas únicas e atividades antimicrobianas notáveis das nanopartículas de prata. Enumeram sua eficácia biocida sobre um amplo espectro de bactérias, incluindo cepas resistentes a antibióticos, de rápida ação fungicida contra fungos incluindo *Aspergillus*, *Candida* e *Saccharomyces*. Segundo os autores a nanopartículas de prata de cinco a 20nm de diâmetro podem inibir a replicação do vírus HIV-1.

A susceptibilidade à prata de bactérias Gram-negativas e Gram-positivas é diferente. Isto é devido a diferenças estruturais na composição da parede celular das mesmas. Nas espécies Gram-positivas é composta principalmente por uma grossa camada de peptidoglicana (20-80nm), consistindo em cadeias de polissacarídeos lineares ligados a curtos peptídeos formando uma estrutura rígida tridimensional. A rigidez e extensa ligação não apenas deixa a parede da célula com menos locais de ancoragem para as nanopartículas, mas dificulta a sua penetração (Kawahara et al., 2000; Fayaz et al., 2010).

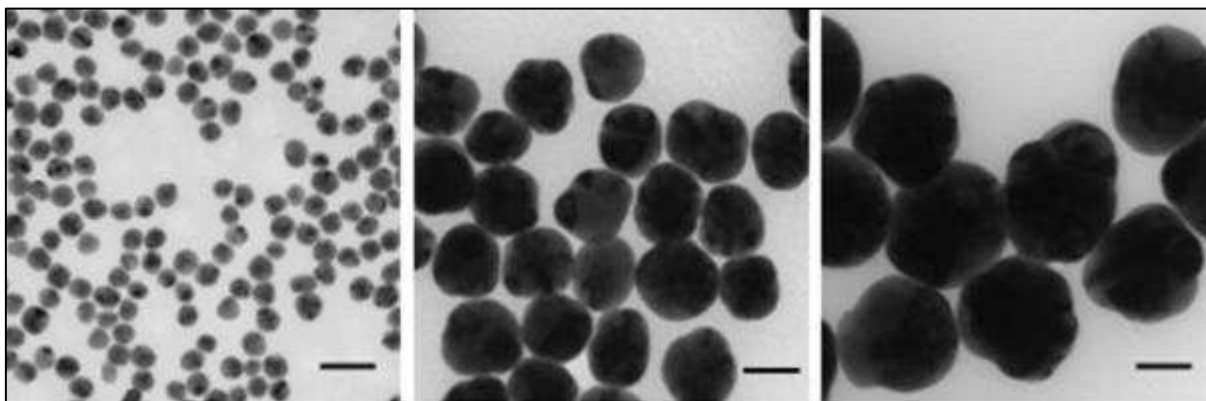


Figura 1 – Fotomicrografia (MET) das nanopartículas de prata de 20, 60 e 100nm fornecidas pela Sigma-Aldrich. Escala de 50nm. Fonte: Sigma-Aldrich

O mecanismo de ação da nanopartícula de prata na célula bacteriana não está totalmente elucidado, mas de acordo com Marambio-Jones & Hoek (2010) ocorre em três etapas:

1. Absorção de íons prata livre (Ag^+) levando à interrupção de produção de ATP e da replicação de DNA;
2. Geração de ROS (reactive oxygen species - radicais livres) que produzem estresse oxidativo;
3. Dano direto sobre a membrana celular por dissolução oxidativa (proteína da membrana e permeabilidade).

De acordo com os autores supracitados, em concentrações submicromolares, os íons de prata são internalizados e reagem com grupos tiol de proteínas celulares, que levam a desacoplamento da síntese de ATP a partir da respiração, a perda de força motriz próton, e interferência com o sistema de efluxo de fosfato. Em níveis de mili-molares, nanopartículas de prata induzem o descolamento da membrana de parede celular a partir do citoplasma, com a possível libertação do conteúdo intracelular, a condensação do DNA e perda da capacidade de replicação. Os radicais livres produzem estresse oxidativo resultando em danos à membrana e ao DNA. Finalmente, as nanopartículas de prata aumentam a permeabilidade da membrana celular e, subsequentemente, penetram dentro das células induzindo um ou toda a cascata de efeitos acima descritos (Figura 2).

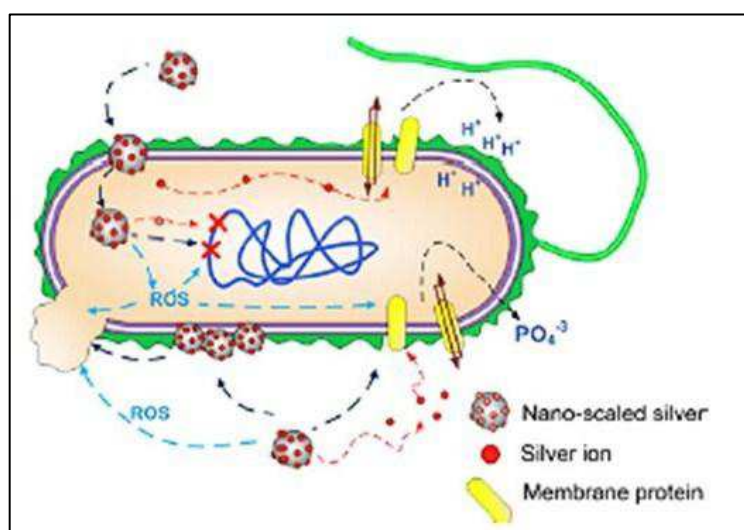


Figura 2 – Interações da nanopartícula de prata com as células bacterianas
Fonte: Marambio-Jones & Hoek (2010)

O mecanismo de ação de inibição de íons prata sobre microrganismos mostrou que em íons prata faz com que o DNA perca sua habilidade de replicação e expressão das proteínas ribossomais subunitárias, bem como outras proteínas celulares e enzimas essenciais para a produção de ATP, tornando-se inativada (Yamanaka et al., 2005). Também tem sido hipotetizado que íons prata primeiramente afetam a função da membrana sujeita a enzimas, na cadeia respiratória. A carga positiva no íon prata é um fator importante para sua natureza antimicrobiana, através da interação eletrostática entre a membrana celular dos microrganismos carregada negativamente e as nanopartículas carregadas positivamente. É proposto que a força eletrostática pode ser uma causa adicional para a interação das nanopartículas com a bactéria (Tiwari et al., 2008).

De acordo com Monteiro et al. (2009) os fatores que podem interferir na efetividade antimicrobiana da nanopartícula de prata são:

- Tamanho da partícula. Quanto menor a partícula maior a superfície de contato e maior a liberação de íons. Como o tamanho da partícula diminui, uma área de superfície específica aumenta deixando um alto número de átomos expostos na superfície, disponível para reações de redox, fotoquímicas e bioquímicas em adição as interações físico-químicas com as células. A liberação de íons é proporcional à área de superfície da partícula, nanopartículas menores podem liberar íons mais rapidamente que grandes partículas e materiais macroscópicos. A área de superfície efetiva também influencia a geração de RO, por exemplo, na mesma concentração de prata, nanopartículas de 15nm geram mais altos

níveis de ROS em macrófagos que partículas de 30 ou 50nm (Carlson et al., 2008).

- Forma da partícula. A diferença pode ser explicada pelo percentual de facetas ativas nas nanopartículas de diferentes formas. Alta densidade atômica nas facetas aumenta a toxicidade das nanopartículas a diversas cepas bacterianas, o aumento da toxicidade é resultado de alta reatividade presente nas facetas (Morones et al., 2005). Pal et al. (2007) observaram maior atividade biocida da nanopartícula de prata triangular sobre *E. coli* que a nanopartícula em forma de haste ou esférica.
- Estabilização da partícula. A associação de nanopartículas à polímeros tem sido reportada como mais importante que o tamanho das nanopartículas, aumentando sua estabilidade contra agregação e sua biocompatibilidade (Monteiro et al., 2009). Polímeros hiperamificados, dendrímeros, dióxido de titânio e canais de zeolite – previnem precipitação do íon prata e mantém prata dispersa no meio até que atinja o seu sítio da ação. Entretanto alguns ligantes-tampão das nanopartículas apesar de promover alta estabilidade e monodispersão na suspensão são menos bioativos porque o agente capeador (tampão) prejudica a liberação de íons prata (Smetana et al., 2008).
- Características do meio. Meios biológicos e ambientais contendo cloro (Cl^-) que se liga aos íons prata formando o composto AgCl , de solubilidade muito baixa e que rapidamente precipita para fora da solução. A presença de proteínas também pode inativar os íons

prata liberados devido à alta afinidade da prata por proteína, assim deve haver íons prata disponíveis durante tempo suficiente para exceder aqueles perdidos pela ligação com a proteína (Furno et al., 2004). Deve-se considerar que os dados presentes na literatura são obtidos em pesquisas utilizando principalmente meios relativamente simples como água destilada ou meio de cultura, que não refletem o meio líquido dentro dos organismos vivos ou meio ambiente. Por isso, a superfície química, reatividade e estado de dispersão alcançados em laboratório podem não ser relevantes para avaliar o comportamento em sistemas reais. No interior de um organismo pode existir grande variação de pH, força iônica, composição iônica e presença de substância orgânica que poderá induzir diferentes estados de agregação de nanopartículas de prata; assim, resultando em grande variação de atividade antimicrobiana e toxicidade. Nos meios de cultura, ricos em nutrientes a vulnerabilidade dos microrganismos e de células as nanopartículas podem ser diferentes daquela quando o contato acontece no interior do organismo ou no meio ambiente.

2.3.1 Ação antimicrobiana da nanopartícula de prata na Odontologia

A associação de um cimento endodôntico a um íon de prata foi utilizada no trabalho de Kreth et al. (2008) buscando observar seu efeito antimicrobiano sobre *S.*

mutans (UA159). Prata em pó (hidrogeno-fosfato de sódio de prata zircônio) inicialmente foi testada diluída na concentração de 1,5 e 10mg/mL e 30µL foram colocados em poços perfurados em placas de Petri contendo BHI e recobertos por uma fina camada do meio contendo *S. mutans* ($1,0 \times 10^5$ CFU/mL). As placas foram incubadas a 37°C em anaerobiose por 24 horas e então as zonas de inibição mensuradas. Houve inibição nas placas contendo cinco e 10mg/mL da solução de prata. Para o teste de difusão em ágar foram preparados corpos de prova com o cimento Kerr Pulp Canal Sealer contendo a prata nas concentrações de 0,5, dez e 20% nas dimensões de dez milímetros de diâmetro por um milímetro de espessura e colocados sobre placa de Petri contendo meio BHI e recobertos pela suspensão bacteriana em ágar como descrito anteriormente. As placas foram incubadas por 24 horas a 37°C em anaerobiose e as zonas de inibição mensuradas em milímetros. A adição de prata ao cimento aumentou as zonas de inibição, sendo que o maior diâmetro foi obtido pela concentração de 20% seguida pela de 10% e essas concentrações apresentaram diferença estatisticamente significativa quando comparadas a concentração de 5%. Quando foi avaliado o efeito da adição de prata (20%) ao cimento sobre bactéria na fase planctônica, os cimentos foram preparados diretamente na placa de Petri e esterilizados por luz ultravioleta por uma hora e então 50mL de meio BHI foi vertido nas placas contendo cultura de *S. mutans* diluída 1:30 e incubados em anaerobiose por 24h a 37°C. A zona de inibição foi mensurada e foi observada diferença estatística para os halos de inibição com ou sem a prata. Por fim foi analisada a viabilidade bacteriana após contato com os corpos de prova. Cem microlitros da cultura de *S. mutans* foi colocada sobre o corpo de prova e mantidos em anaerobiose por 85 minutos e 190 minutos. Então uma alíquota de 5µL foi retirada e colocada em lâminas, coradas com BacLight Bacterial

Viability Kit e observadas em microscópio de varredura confocal a laser (CLSM). As bactérias apresentaram maior perda da integridade da membrana quando expostas ao cimento com nanopartículas que ao cimento puro.

Avaliando a descontaminação de limas endodônticas Carreira *et al* (2010) encontraram bons resultados com a solução de nanopartículas de prata (NP-Ag). Utilizaram limas endodônticas contaminadas por 24 horas com suspensões de *S. aureus*, *S. mutans*, *E. faecalis*, *E. coli* e *C. albicans*, que foram imersas em solução de NP- Ag e permaneceram em contato com a mesma por cinco, dez, 15 e trinta minutos. Suspensão de *B. atrophaeus*, na forma esporulada, foi adicionada diretamente na solução NP-Ag e, sua ação foi avaliada nos mesmos tempos. Os resultados mostraram que as nanopartículas de prata promoveram redução superior a 90% de UFC/mL sobre as leveduras e demais bactérias testadas e, para todos os grupos, diferença estatisticamente significante entre o grupo controle (solução fisiológica a 0,9%) com os demais tempos experimentais (teste de Tukey, $p < 0.05$). Concluíram que a solução de nanopartículas de prata foi efetiva na descontaminação de instrumentos, e sua eficácia está diretamente relacionada com o tempo de contato.

A capacidade de controlar microrganismos e neutralizar endotoxinas da solução de nanopartículas de prata foi avaliada por Carreira (2009), utilizando esta solução como irrigante e medicação intracanal. Utilizou 48 raízes de dentes humanos padronizadas em 16 mm e com diâmetro apical correspondente a lima #30. Os canais foram contaminados por 28 dias com *E. coli* e por 21 dias com *E. faecalis* e *C. albicans* e os espécimes foram divididos em quatro grupos (n=12), de acordo com as substâncias utilizadas como irrigante e medicação intracanal respectivamente: G1) solução salina e solução salina (grupo controle); G2)

hipoclorito de sódio 1% associado ao creme Endo-PTC e hidróxido de cálcio; G3) solução de nanopartículas de prata 50ppm e hidróxido de cálcio associado à solução de nanopartículas de prata; e G4) solução de nanopartículas de prata 50ppm e solução de nanopartículas de prata 50ppm. Foram realizadas cinco coletas do conteúdo do canal radicular para avaliar a atividade antimicrobiana: coleta de confirmação, imediatamente após a instrumentação (1ª coleta) e outra após sete dias (2ª coleta); imediatamente após a remoção da medicação (3ª coleta) e outra após sete dias (4ª coleta). A neutralização da endotoxina foi avaliada apenas nas quatro últimas coletas. Observaram que todas as soluções irrigadoras promoveram redução significativa dos microrganismos após a instrumentação (1ª coleta) ($p < 0,05$). Após sete dias houve aumento do número de microrganismos em todos os grupos, voltando ao número inicial nos grupos instrumentados com solução salina e hipoclorito de sódio. Ocorreu recolonização dos microrganismos no canal radicular dos espécimes instrumentados com solução de nanopartículas de prata, entretanto foi mantida redução estatisticamente significativamente do número de UFC/mL quando comparada à coleta inicial ($p < 0,05$), demonstrando efeito residual. A medicação de hidróxido de cálcio eliminou 100% dos microrganismos e manteve os resultados após sete dias (4ª coleta) no grupo 2. No grupo 4 houve recolonização de *E. faecalis* e *C. albicans* após sete dias de incubação. O hidróxido de cálcio foi a única substância avaliada que promoveu redução significativa ($p < 0,05$) das endotoxinas. Concluiu que o hipoclorito de sódio e a solução de NP-Ag reduziram significativamente a microbiota do canal, no entanto somente com a associação ao hidróxido de cálcio houve eliminação dos microrganismos em profundidade nos túbulos dentinários e redução das endotoxinas presentes no canal radicular.

Pagonis et al. (2010) associaram nanopartículas à terapia fotodinâmica. Estudaram os efeitos in vitro das nanopartículas poliácido glicólico láctico (PLGA) carregadas com fotosensibilizador azul de metileno e da luz sobre *E. faecalis* (ATCC 29212). A captação e distribuição de nanopartículas na suspensão de *E. faecalis* foram investigadas por microscópio eletrônico de transmissão após incubação com PLGA combinado com partículas coloidais de ouro por 2,5, cinco e dez minutos. *E. faecalis* foram sensibilizados na fase planctônica e em canais radiculares experimentalmente infectados de dentes humanos extraídos com nanopartículas carregadas com azul de metileno por dez minutos seguido de exposição à luz vermelha de 665nm. Encontraram nanopartículas concentradas principalmente na parede das células dos microrganismos em todos os três tempos. O sinergismo de luz e nanopartículas carregadas com azul de metileno levou a redução de unidades formadoras de colônia (UFC) a aproximadamente dois e um \log_{10} na fase planctônica e canal radicular, respectivamente. Em ambos os casos, os níveis médios de UFC \log_{10} foram significativamente menores que os controles e nanopartículas carregadas com azul de metileno sem luz. Concluíram que a utilização de nanopartículas de PLGA encapsuladas com drogas fotoativas pode ser um tratamento antimicrobiano endodôntico complementar promissor.

Lotfi et al. (2011) compararam a ação antimicrobiana da solução de nanopartícula de prata (35nm), solução de gluconato de clorexidina e hipoclorito de sódio sobre *E. faecalis* (ATCC 2367). O teste de concentração inibitória mínima (CIM) utilizou diluições seriadas das substâncias em caldo BHI (Brain Heart Infusion) contaminadas com 100 μ L de uma suspensão de *E. faecalis* (0.11UA a 570nm) e incubados a 37°C por 48 horas. A mesma quantidade da suspensão foi semeada em placas contendo ágar BHI para o teste de diluição. As placas receberam discos de

filtro de papel contendo as soluções: solução de hipoclorito de sódio a 5.25% e 0.33%, solução de nanopartícula de prata a 0.4%, 0.005% e 0.0025% e solução de gluconato de clorexidina a 2%, além de discos de vancomicina como controle, sendo incubadas a 37°C por 24 horas. A solução de clorexidina foi excluída do teste de CIM por precipitar em contato com o meio em caldo. Após 6 horas de incubação a solução de nanopartículas de prata a 0.00125% e a solução de hipoclorito a 0.082% mostraram inibição do crescimento bacteriano e após 18 horas 0.005% e 0.328% respectivamente foram eficazes, se mantendo as mesmas concentrações por 48 horas. No teste de zona de inibição as médias e desvios padrão para a vancomicina foram 21.12±0.14mm, para as soluções de hipoclorito de sódio a 5.25% e 0.33% foram 12.16±1.46 e 6.91±0.66mm, para a solução de nanopartícula de prata a 0.0025%, 0.005% e 0.4% foram 10.00±0.42, 12.00±0.60 e 13.33±1.23mm e para a solução de clorexidina a 2% 24.80±1.11, respectivamente, havendo diferença significativa entre os grupos ($p < 0.001$). Não houve diferença significativa entre a solução de hipoclorito a 5.25% e as de nanopartículas nas três concentrações, o que fez os autores concluírem que a nanopartícula de prata em uma concentração notadamente inferior tem efeito bactericida semelhante ao hipoclorito de sódio a 5,25%.

Onoda (2011) avaliou in vitro o efeito antimicrobiano de alguns cimentos endodônticos acrescidos de nanopartículas de prata (<100nm) sobre *E. faecalis* (ATCC 10542). Foram utilizados três tipos de cimentos: Endofill, Pulp Canal Sealer e AH Plus. Os grupos experimentais foram subdivididos em quatro subgrupos de acordo com a concentração de nanopartícula adicionada aos materiais: 0.0%, 0.1%, 0.5% e 1% em peso. Foram confeccionados corpos de prova de dois milímetros de diâmetro por sete milímetros de altura inserindo o cimento manipulado em tubos de

polietileno. Foi preparada uma suspensão de *E. faecalis* a partir de uma cultura de 24 horas em SBF (Fluído Corpóreo simulado) ajustada no espectrofotômetro para uma concentração inicial de 10^7 (0.08 a 0.1UA para 660nm) e colocada em um flaconete contendo o corpo de prova. A cada 24 horas, alíquotas de 100µL eram retiradas de cada flaconete, diluídas em série e plaqueadas em triplicata para observar o tempo de morte das bactérias. Os resultados mostraram que, cimentos à base de óxido de zinco e eugenol empregados neste estudo são mais eficazes na eliminação de *E. faecalis* do que o cimento AH Plus e a adição mínima de 0,1% de nanopartículas de prata àqueles cimentos foi eficaz na melhoria de suas propriedades bactericidas, exceto para o AHPlus.

Utilizando o teste de infiltração bacteriana Shantiaee et al. (2011) observaram o efeito do revestimento de cones de guta percha com nanopartículas de prata. Para tanto utilizaram 58 raízes divididas em dois grupos: guta-percha com e sem revestimento de nanopartículas e três raízes de cada grupo serviram como controle. Os dentes foram preparados e obturados endodonticamente, utilizando guta percha e cimento AH26 e técnica da condensação lateral. Para impedir a contaminação bacteriana externa as superfícies radiculares externas foram cobertas com esmalte de unhas. As raízes fixadas em um microtubo usando a técnica de duas câmaras para mensurar a infiltração bacteriana e foram expostas a esterilização por óxido de etileno por 12 horas. Tubos de vidro contendo o meio TSB foram autoclavados e incubados a 37°C. Em uma câmara de fluxo laminar o microtubo foi montado dentro do tubo de vidro com a ponta da raiz em contato com o meio. O aparato foi incubado por três dias a 37°C e a limpidez do meio confirmou a esterilização. Foi preparada uma suspensão na escala 0.5 de McFarland (1.5×10^8 bactérias/mL) e inoculado 100µL na porção do microtubo em contato com o acesso ao canal radicular a cada

cinco dias, num total de sessenta dias, sendo mantidos a 37°C e a turvação do meio monitorada diariamente. Após sessenta dias as amostras foram enxaguadas com clorexidina e água destilada, secas, imersas em solução de azul de metileno a 1% e mantidas em uma jarra dessecadora conectada a uma bomba a vácuo e assim mantidas por 72 horas, quando foram removidos do corante, lavados e tiveram o milímetro apical da raiz removido com um disco. Sob estereoscópio de quarenta aumentos foi observada a penetração do corante entre o material obturador e as paredes do dente. Nos controles positivos houve turvação do meio em três dias e o controle negativo não turvou durante sessenta dias. Não houve diferença estatística entre os grupos para os dois testes, sendo que o método de infiltração bacteriana mostrou grande infiltração, não sendo confirmada pela infiltração de corante.

Odabaş et al. (2011) incorporaram prata-zeolite (SZ) ao agregado trióxido mineral (MTA) e testaram sua atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Candida albicans* (ATCC 90028), *Porphyromonas gingivalis* (ATCC 33277), *Actinomyces israelii* (ATCC 12102) e *Prevotella intermedia* (ATCC 15032). SZ foi adicionado a 0,2% e a 2% do peso do pó do MTA e o grupo controle sem SZ. Foi realizado o teste de zona de inibição, comparando os halos em 24, 48 e 72 horas. Foi mensurada a quantidade de íons prata liberados a partir das amostras de MTA utilizando espectrofotometria atômica de absorção nos períodos de dez minutos, 24, 48 e 72 horas. O pH das amostras foi medido com um pHmetro em dez minutos, 24, 48 e 72 horas períodos. O MTA contendo na concentração de 0,2% e 2% mostrou efeitos inibitórios sobre alguns microrganismos em todos os períodos de tempo, enquanto que nenhuma atividade antimicrobiana foi observada para *P. intermedia* e *A. israelii*. MTA sem SZ inibiu *C.*

albicans, *E. coli* e *P. intermedia*. A liberação máxima de prata foi detectada no MTA com 2% SZ em 24 horas. Concluíram que a incorporação de SZ pode aumentar a atividade antimicrobiana do MTA.

2.3.2 Biocompatibilidade da nanopartícula de prata

Por causa de seu pequeno tamanho, as nanopartículas podem potencialmente passar através das membranas biológicas e alcançar mais órgãos e tecidos diferentes onde a prata pode exercer seus efeitos antibacterianos. Uma vez que a visão predominante é que a prata é relativamente não tóxica. A geração de estresse oxidativo de nano-prata pode ser atribuído à características da partícula, como a grande superfície e associados alta reatividade. A questão é se é possível fazer uma clara distinção entre prata “regular” e nano prata. A prata regular é uma suspensão coloidal de partículas prata de vários tamanhos, incluindo partículas micro e nanométricas. Assim, nanoprata pode não ser considerada nova, já que a prata coloidal tem sido utilizada há mais de cem anos como aplicação médica. Os estudos cinéticos e de toxicidade feito até agora, demonstram que as composições da nanopartículas de prata variam amplamente. Também as descrições das formulações de prata usadas divergem muito e são limitadas, em especial ao tamanho, solubilidade e agregação das nanopartículas. Esta informação é altamente relevante, já que uma boa dispersão das partículas de nanoprata é necessária para eficaz atividade antibacteriana e podem influenciar sua subsequente toxicidade. (Wijnhoven et al., 2009).

A prata em partículas maiores (micrométricas) causam a obstrução das membranas celulares promovendo argiria, que é o envenenamento por prata. Nanopartículas de prata finamente dispersas e em baixa concentração circulam pelas membranas celulares sem ocasionar danos a microrganismos superiores. Normalmente a concentração eficaz para uma ação biocida da nanopartículas de prata gira em torno de 0,1µg/mL, enquanto que a concentração toxica para humanos é de 10mg/mL, sendo influenciada pelo tempo de contato com a nanopartículas (Marambio-Jones & Hoek, 2010).

Gomes-Filho et al. (2010) avaliaram a reação tecidual da dispersão de nanopartículas de prata como solução irrigante alternativa. Neste estudo os autores avaliaram a resposta tecidual ao implante de tubos de polietileno preenchidos com esponja de fibrina embebida com solução de nanopartículas de prata. Para tanto trinta ratos receberam os implantes preenchidos com uma esponja embebida em solução de nanopartícula de prata a 47ppm e 23ppm. Como grupo controle foi utilizado o hipoclorito de sódio a 2,5%. Os períodos de observação foram de sete, 15, trinta, sessenta e noventa dias. Após cada período de tempo, seis animais foram sacrificados e os tubos e tecidos adjacentes foram removidos, fixados e preparados para serem analisados em microscópio de luz com incorporação de metacrilato. Os materiais provocaram reações moderadas em sete dias. A resposta foi semelhante ao controle no 15º dia, para soluções de nanopartículas de prata a 23ppm e de hipoclorito de sódio a 2,5% e no 30º dia para a solução de nanopartículas de 47ppm. Concluíram que a solução de nanopartículas de prata foi biocompatível, especialmente na concentração mais baixa.

Tendo em vista todos esses estudos e a necessidade de um material que favoreça a manutenção da desinfecção obtida após os procedimentos cirúrgicos na

região periapical é que justificam-se novos estudos que possam contribuir com o estágio atual do conhecimento.

3. PROPOSIÇÃO

Avaliar se a adição de nanopartículas de prata ao cimento MTA melhora a ação antimicrobiana sobre *Enterococcus faecalis* e a aderência deste microrganismo aos materiais testados.

4. MÉTODO

4.1 Estudo prévio - Concentração Inibitória Mínima(CIM)

Para estabelecer a Concentração Inibitória Mínima (CIM) para *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) da nanopartícula em pó e líquida foi realizado um experimento prévio. A nanopartícula de prata em pó (<100nm) foi diluída em água destilada utilizando um homogenizador ultrassônico HD2070 (Byosystems, Paraná, Brasil) resultando em uma concentração inicial de 12800 µg/mL. Essa solução foi adicionada na proporção 1:1 a uma suspensão de *Enterococcus faecalis* ($2,0 \times 10^5$ UFC), realizando diluições seriadas até a concentração de 200 µg/mL. Para o teste com a nanopartícula líquida (10nm), a solução de 30ppm foi diluída na proporção de 1:1 na suspensão bacteriana resultando numa concentração de 15ppm e em outro grupo as bactérias foram semeadas diretamente na solução de nanopartículas a 30ppm. Após 24 horas aliquotas de cada diluição foram semeadas em placas de petri contendo ágar BHI e estas incubadas por 48 horas, quando realizou-se a leitura. Observou-se que a inibição do crescimento bacteriano, ocorreu nos tubos contendo nanopartícula em pó na concentração de 800µg/mL e nos tubos contendo a nanopartícula líquida na concentração de 15ppm.

4.2 Tamanho da amostra

Utilizando os dados do experimento piloto foi calculado o tamanho da amostra com o teste ANOVA (Programa BioEstat 5.3), conforme Tabela 1.

Tabela 1 – Resultado do calculo do tamanho da amostra (ANOVA)

DADOS	VALORES
Diferença mínima entre as médias dos tratamentos=	260
Desvio padrão do erro=	12
Número de tratamentos=	4
Poder do teste=	0.9999
Nível alfa=	0.0100
Número de repetições	6

4.3 Teste de contato direto

Para avaliação da atividade antimicrobiana sobre *Enterococcus faecalis* foram testados o agregado trióxido mineral (MTA) branco e cinza, associado ou não a nanopartículas de prata de acordo com os grupos a seguir:

GB – MTA branco (Angelus Indústria de Produtos Odontológicos S/A, Paraná, Brasil).

GC – MTA cinza (Angelus Indústria de Produtos Odontológicos S/A, Paraná, Brasil).

GL – MTA branco (Angelus Indústria de Produtos Odontológicos S/A, Paraná, Brasil) + solução de nanopartícula de prata 50ppm e 10nm (Khemia, IPEN, Brasil).

GP – MTA branco (Angelus Indústria de Produtos Odontológicos S/A, Paraná, Brasil) + 1% de nanopartícula (>100nm) de prata em pó (576832, Sigma-Aldrich Brasil Ltda, São Paulo, Brasil) em peso.

4.3.1 Preparo dos corpos-de-prova

Foram confeccionados quarenta corpos de prova, sendo dez para cada grupo, seguindo a recomendação do fabricante. No grupo B foi incorporada ao MTA branco a nanopartícula de prata em pó (Fig.3A e 4) correspondente a 1% de peso do pó (balança de precisão, Ohaus Corporation Pine Brook, New Jersey, EUA. No grupo L a água destilada foi substituída pela solução de nanopartículas de prata a 50ppm (Fig.3B) na manipulação do MTA branco. Os cimentos foram manipulados em uma placa de vidro (Prisma, São Paulo, Brasil) utilizando uma espátula nº 24 (Hu–Friedy, Carolina do Norte, EUA) e inseridos em molde de Teflon bipartido (Figura 5) de dois milímetros de diâmetro e cinco milímetros de altura (Metalcard, São José dos Campos, Brasil) utilizando um porta-amálgama plástico (Jon Produtos Odontológicos, São Paulo, Brasil) e condensados (condensador nº 3, Hu–Friedy, Carolina do Norte, EUA). Após a condensação dos cimentos, os moldes foram estocados em potes plásticos cobertos com gazes úmidas e mantidos à temperatura ambiente por 24 horas para aguardar a presa final dos mesmos.

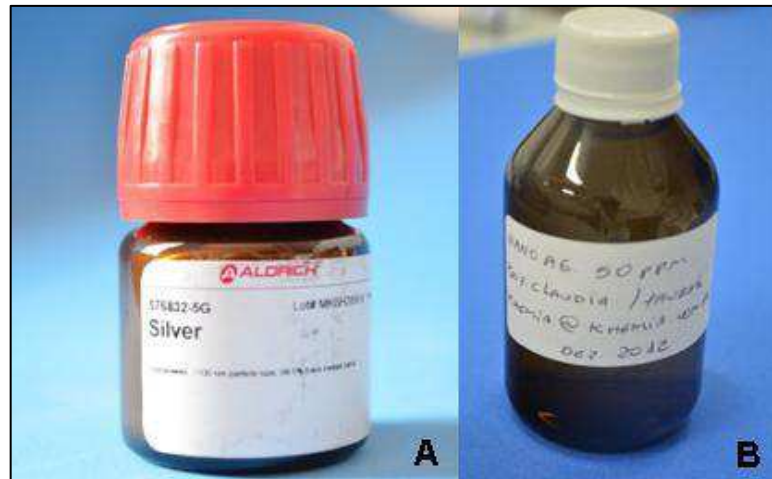


Figura 3 – Nanopartícula de prata em pó (A) e líquida (B)

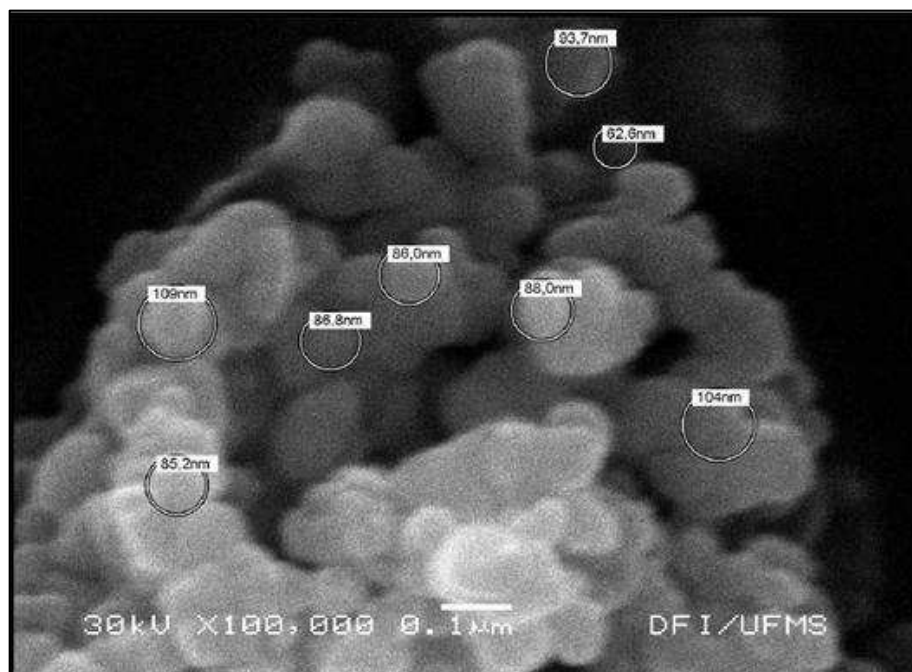


Figura 4 – Nanopartículas de prata (Sigma-Aldrich<100) aglomeradas
Fonte: Onoda (2011)



Figura 5 – Inserção do material no molde de Teflon

Passado o tempo de presa, cada corpo de prova foi removido do molde e colocado em flaconete de polipropileno com capacidade para 1,5 mililitros (Eppendorf do Brasil Ltda., São Paulo, Brasil), embalados em envelopes autoclaváveis (Sispack, São Paulo, Brasil) e esterilizados em autoclave (Cristófoli Equipamentos de Biossegurança LTDA., Paraná, Brasil) a 121°C por trinta minutos (Fig.06).

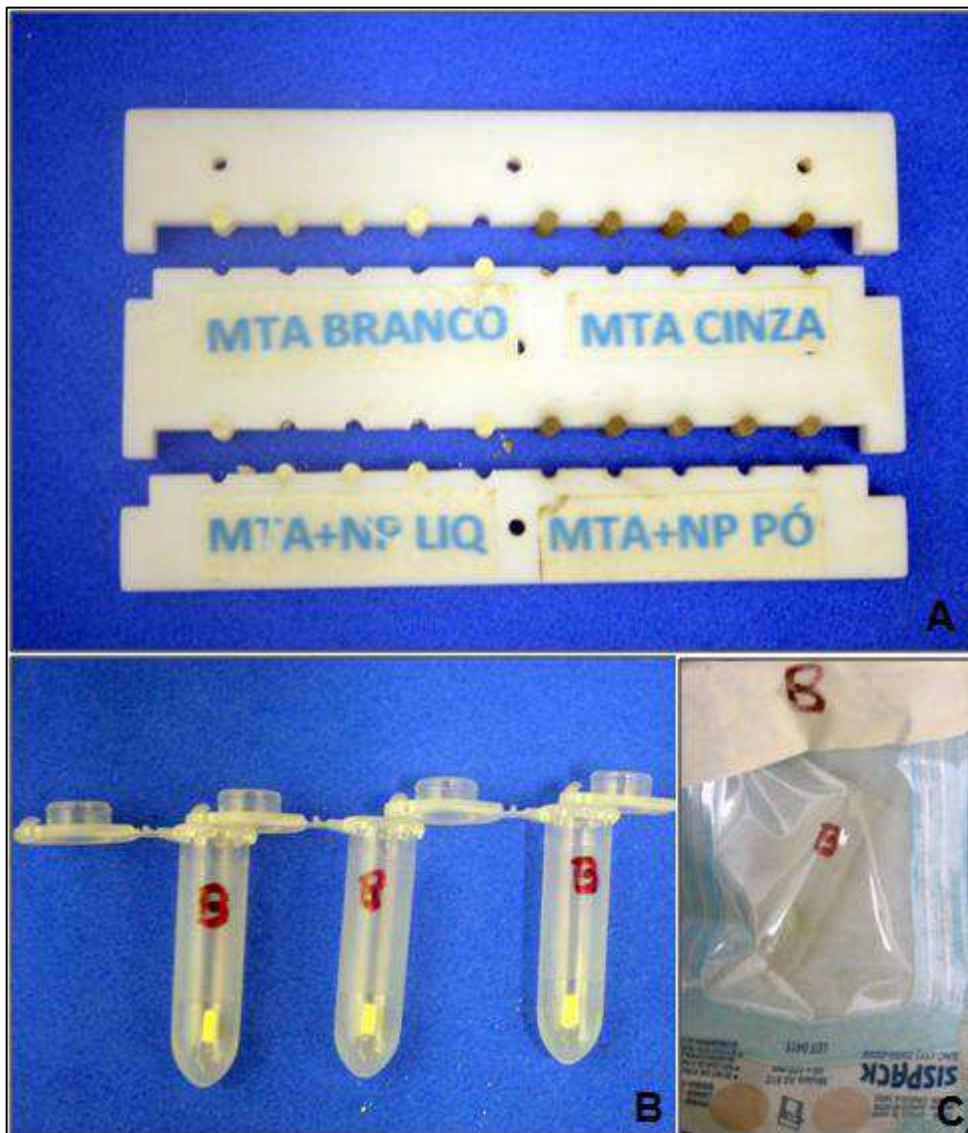


Figura 6 - Remoção dos corpos de prova dos moldes (A), inserção no microtubo (B) e esterilização (C)

4.3.2 Preparo do Fluido Corpóreo Simulado (SBF)

Seguindo o protocolo descrito em Onoda (2011) foi preparado o Fluido Corpóreo Simulado (descrito no Anexo 1), que apresenta concentrações de íons semelhantes ao plasma sanguíneo humano (Quadro 1).

Quadro 1 - Concentração de íons no SBF e plasma sanguíneo

Componentes químicos	Concentração (10^{-3}) mol em	
	SBF	Plasma sanguíneo
Na ⁺	142,0	142,0
K ⁺	5,0	5,0
Mg ²⁺	1,5	1,5
Ca ²⁺	2,5	2,5
Cl ⁻	147,8	103,0
HCO ₃ ⁻	4,2	27,0
HPO ₄ ²⁻	1,0	1,0
SO ₄ ²⁻	0,5	0,5
pH	7,40	7,2 a 7,4

Fonte: ISO/FDI 23317

Após o preparo o SBF foi filtrado utilizando um filtro com poros de 0,22 μm (filtro Millex Durapore, Millipore, Barueri, São Paulo, Brasil).

4.3.3 Preparo da suspensão microbiana

Uma cepa padrão de *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) foi semeada em ágar BHI (Difco, Becton Dickinson, França) e incubada por 24 horas a 37 °C (Fig.07).



Figura 7 – Cultura de 24 horas de *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212)

A partir desta cultura de 24 horas foi preparada uma suspensão, em SBF, ajustada em espectrofotômetro (FEMTO 432C, FEMTO Ind. e Com. de Instrumentos, São Paulo, Brasil) a 0.085 UA (Unidades de Absorbância) utilizando 660nm de comprimento de onda, o que corresponde a $1,0 \times 10^7$ (Fig.8).

Para a confirmação da quantidade de microrganismos presentes na suspensão padrão, a mesma foi diluída até a sexta potência em solução salina (NaCl a 0,9%) esterilizada, e alíquotas de cem microlitros de cada diluição foram semeadas em triplicata em placas de Petri contendo ágar Nutriente (Difco) acrescido de 0,001% de azul de bromotimol (Merck, São Paulo, Brasil). Todas as placas foram incubadas a 35°C por 48 horas. A contagem das unidades formadoras de colônias (UFC) foi realizada com auxílio de contador de colônias (CP 600 Plus, Phoenix, Araraquara, São Paulo, Brasil) nas placas que apresentaram crescimento entre trinta e trezentas colônias (Fig.8). Após obtenção das médias de UFC foi calculado o número de UFC/mL. Todos os procedimentos foram realizados em uma câmara de fluxo laminar.

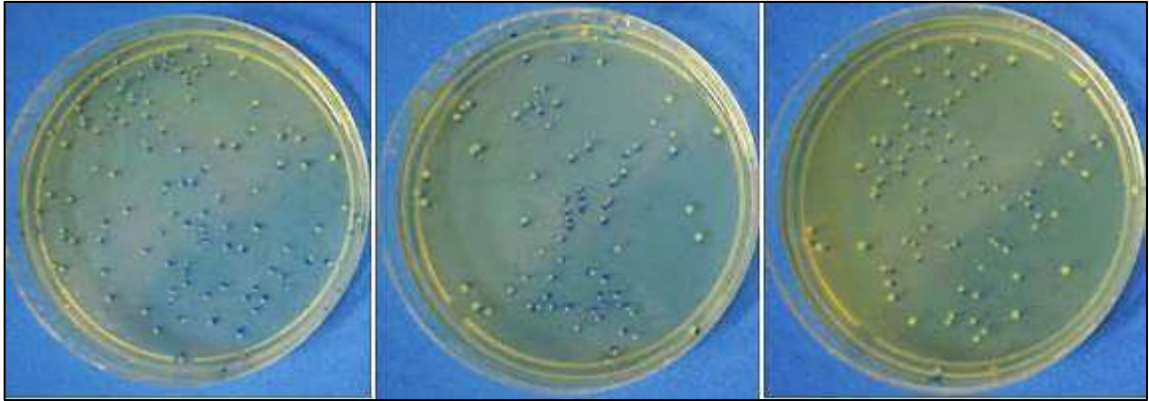


Figura 8 – Placas em triplicata para contagem de UFC (10^6) na suspensão padrão

4.3.4 Contaminação dos corpos de prova

Foi transferido 1,2mL da suspensão bacteriana em SBF, assepticamente, com uma pipeta automática (Micropipeta Monocal de Volume Variável - 100 a 1000 μ L - Modelo LM-1000 Soft, S Plabor, São Paulo, Brasil) para cada flaconete contendo um corpo de prova esterilizado, estabelecendo a proporção 1:10 de peso volume (Fig.09). Os corpos de prova contaminados foram mantidos em estufa a 35°C por 72 horas.

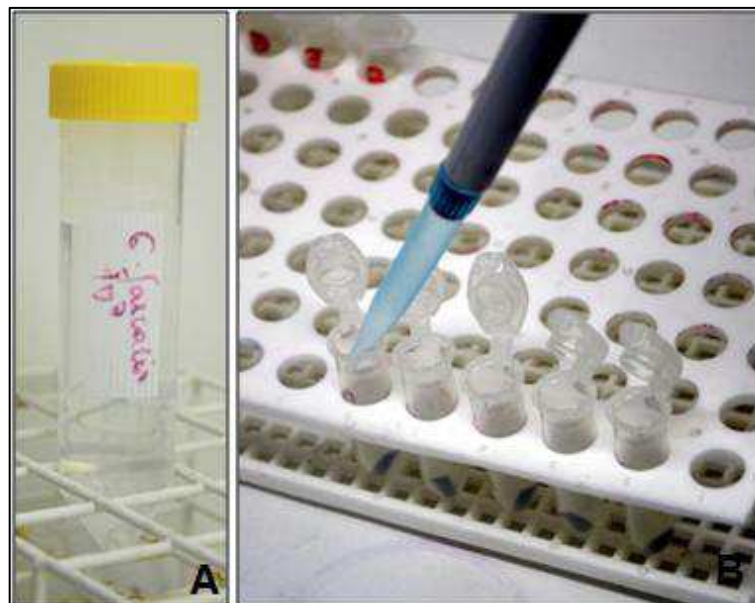


Figura 9 – Suspensão bacteriana (A) e contaminação dos corpos de prova (B)

Para controle positivo (controle do crescimento bacteriano durante o período experimental) foi colocado 1,2mL da suspensão em um flaconete esterilizado que também foi incubado a 35°C por 72 horas. Para o controle negativo (ausência de crescimento bacteriano), foram mantidos em estufa bacteriológica a 35°C por 72 horas um flaconete esterilizado contendo 1,2mL de SBF e um corpo de prova de cada grupo, além de um flaconete esterilizado contendo apenas 1,2mL de SBF.

Todos os procedimentos descritos foram realizados em uma câmara de fluxo laminar.

4.3.5 Cinética de morte bacteriana

Para verificar a cinética de morte das células de *E. faecalis*, a cada intervalo de 24 horas de incubação, após agitação por trinta segundos em agitador de tubos (Vortex AP 56, Phoenix, Araraquara, São Paulo, Brasil) foi retirada de cada flaconete contendo um corpo de prova (grupos teste e grupos controle) alíquota de 100µl, para diluições decimais em solução salina esterilizada (10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3}). Cem microlitros de cada diluição foi semeado, em triplicata, em placas de Petri contendo ágar Nutriente (DIFCO) acrescido de 0,001% de azul de bromotimol (Merck, São Paulo, Brasil) e incubadas a 35°C por 48 horas. A contagem das unidades formadoras de colônias (UFC) foi realizada com auxílio de contador de colônias (CP 600 Plus, Phoenix, Araraquara, São Paulo, Brasil) para a diluição que apresentou crescimento entre trinta e trezentas colônias. Após obtenção das médias de UFC foi calculado o

número de UFC/mL para cada um dos tempos. Todos os procedimentos descritos foram realizados em uma câmara de fluxo laminar.

4.4 Teste de Aderência

Ao final do teste de cinética de morte bacteriana, toda a suspensão restante nos flaconetes (grupos teste) foi removida e cada flaconete foi novamente preenchido com uma nova suspensão de *Enterococcus faecalis* ajustada em um espectrofotômetro para 0,1UA utilizando um comprimento de onda de 660nm, o que corresponde a aproximadamente $2,0 \times 10^7$ UFC. Os corpos de prova permaneceram imersos nesta suspensão por 72 horas a 35°C. Como grupo controle positivo foi realizado o mesmo procedimento utilizando corpos de prova em resina acrílica (Artigos Odontológicos Clássico, São Paulo, Brasil).

Após o período de incubação, cada corpo de prova foi retirado do flaconete, assepticamente, com o auxílio de pinças esterilizadas (Fig.10A) e transferido sequencialmente para dois flaconetes contendo 1mL de água destilada esterilizada, para remoção das células não aderidas (Fig.10B e 10C), e então transferido para um terceiro flaconete contendo 1µµµmL de água destilada (Fig.10D) e cinco pérolas de vidro esterilizados.

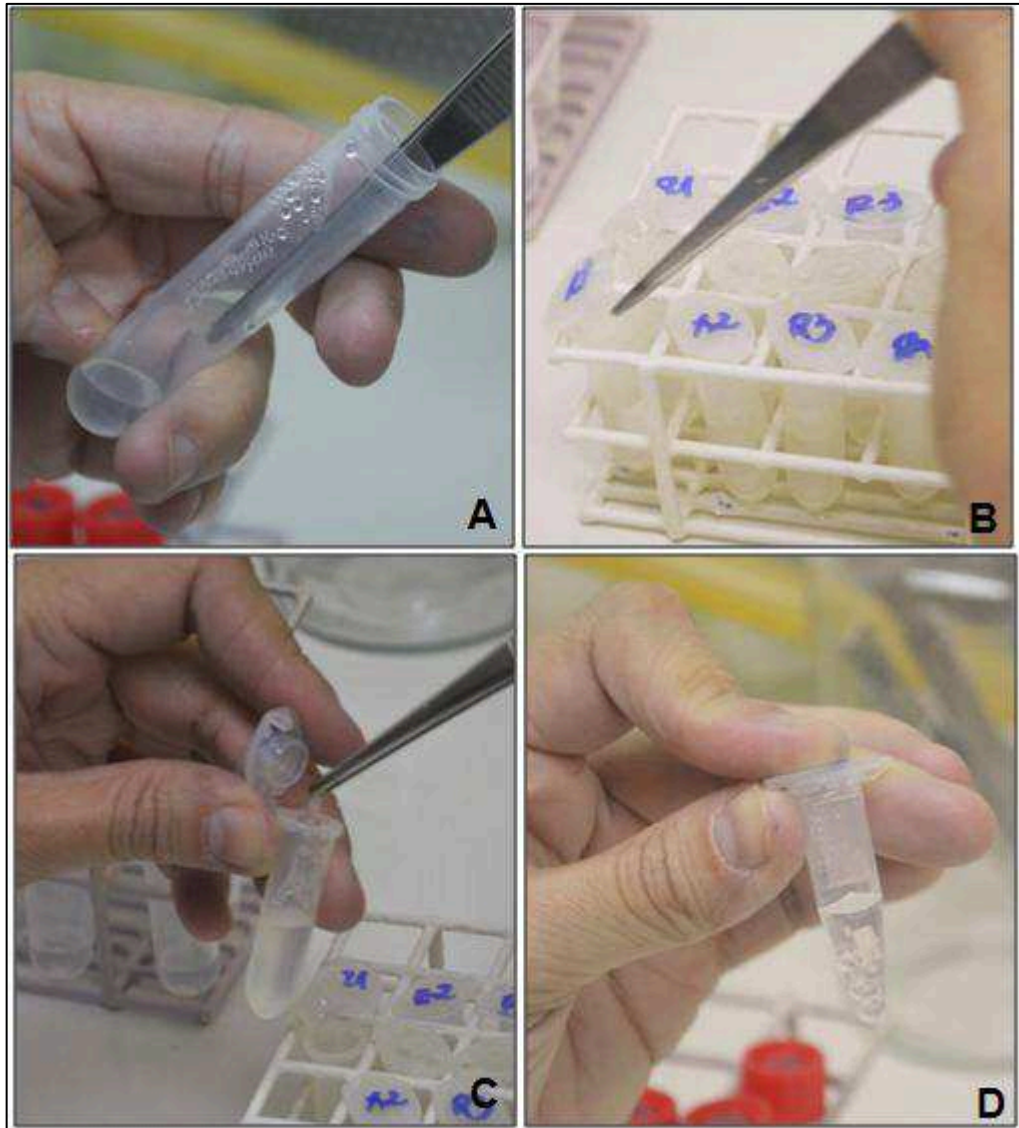


Figura 10 – Remoção do corpo de prova da suspensão (A), enxague (B) e introdução no flaconete com pérolas de vidro (C e D)

Este flaconete foi tampado e submetido a agitação na graduação mínima por trinta segundos (agitador de tubos Vortex AP 56, Phoenix, Araraquara, São Paulo, Brasil). A partir da solução obtida, foram realizadas diluições decimais (10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3}) em solução salina (NaCl 0,9%) esterilizada (Fig.11A), das quais alíquotas de 100 μ L foram semeadas, em triplicata, em placas de Petri contendo ágar nutriente (Difco) acrescido de azul de bromotimol a 0.001% (Fig.11B e 11C). As placas foram incubadas a 35°C por 48 horas. A contagem das unidades formadoras de colônias (UFC) foi realizada com auxílio de contador de colônias (CP 600 Plus, Phoenix,

Araraquara, São Paulo, Brasil) para a diluição que apresentou crescimento entre trinta e trezentas colônias. Todos os procedimentos descritos foram realizados em uma câmara de fluxo laminar.

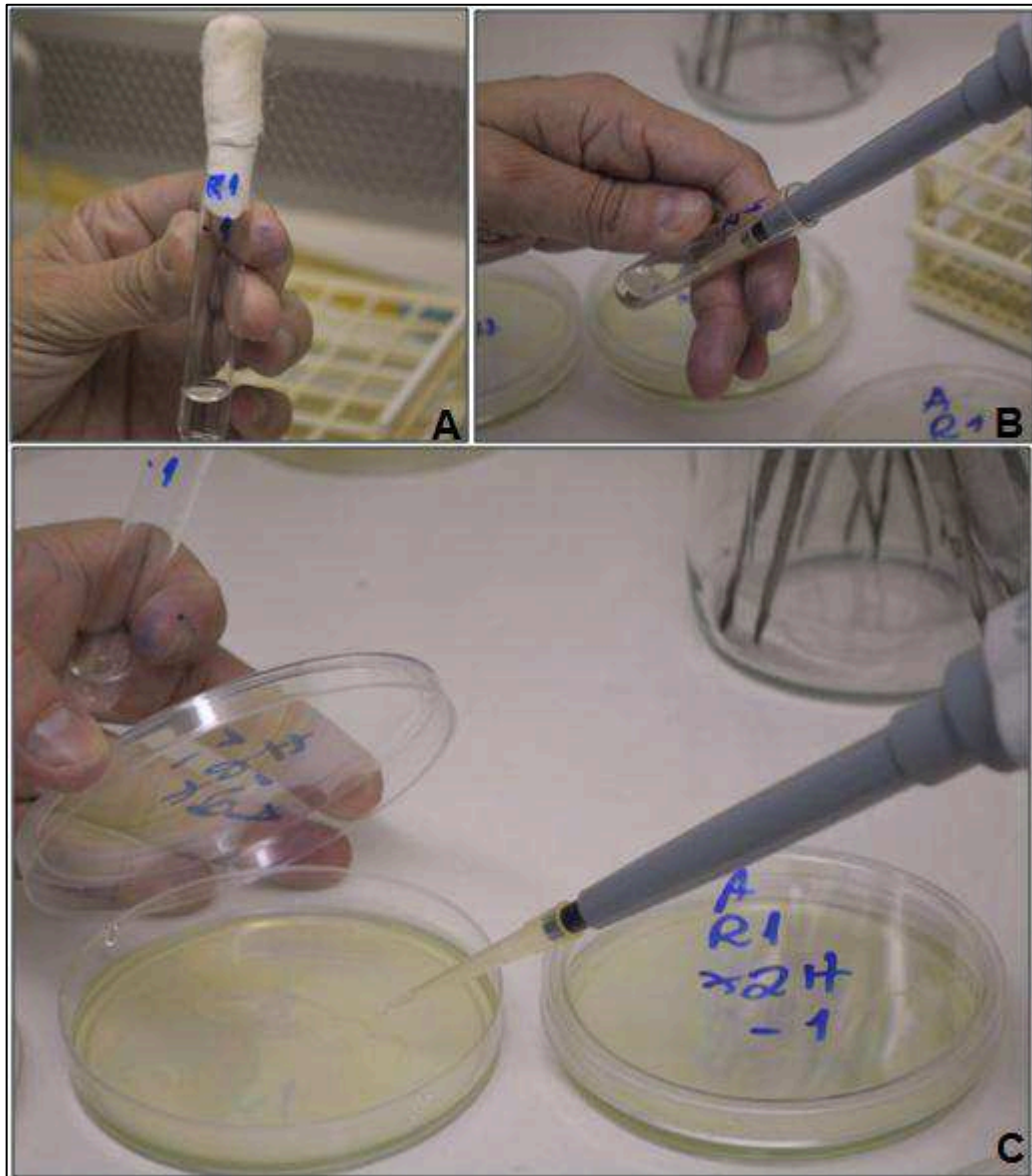


Figura 11 – Diluição seriada (A) alíquota sendo pipetada (B) e semeada em placa (C)

Após obtenção das médias de UFC foi determinado o número de UFC/mL para cada uma das amostras em cada um dos tempos. Estes dados foram tabulados, transformados em logaritmo de base dez e submetidos aos testes estatísticos.

4.5 Análise estatística

A análise estatística foi realizada com o auxílio do Programa Bioestat 5.3. Inicialmente foi feito o teste de Kolmogorov-Smirnov para determinar a normalidade dos dados (Apendice D e E). Baseado neste resultado selecionou-se os testes estatísticos a serem aplicados.

No teste de contato direto foi realizada a análise intragrupos (Apêndice F) utilizando como dado o log do número de UFC/mL em cada um dos tempos e foi aplicado o teste T pareado (distribuição amostral normal) e o teste de Wilcoxon (distribuição amostral não normal). Quando se comparou a diferença na quantidade de bactérias em cada intervalo de tempo: tempo zero-24 horas; 24-48 horas; 48-72 horas para cada uma das amostras de cada grupo teste foi utilizado o teste ANOVA dois critérios (Teste T – LSD). Nas comparações dos grupos-teste com os respectivos controles (Apêndice G) foram utilizados como dados o log do número de UFC/mL ao final de cada período e também a diferença no log de UFC/mL em cada período e utilizado o teste T para amostras independentes. Nas comparações intergrupos (Apêndice H) foram utilizados os testes Anova um critério (teste T-LSD) e o teste t para amostras independentes.

Para a análise dos dados do Teste de Aderência como haviam grupos com distribuição amostral normal e não normal realizou-se a comparação de todos do dados (Apêndice I) usando o teste de Kruskal-Wallis, que é utilizado para comparações com mais de dois grupos independentes.

Foi considerado o nível de significância de 0.01%.

5. RESULTADOS

Foi quantificadas as unidades formadoras de colônias por mililitros (UFC/mL) de *Enterococcus faecalis* das placas semeadas em triplicata no teste de contato direto e de aderência (Apêndices A, B e C). O crescimento bacteriano característico de cada grupo está representado nas figuras a seguir das placas contadas (Fig.12 a 24).

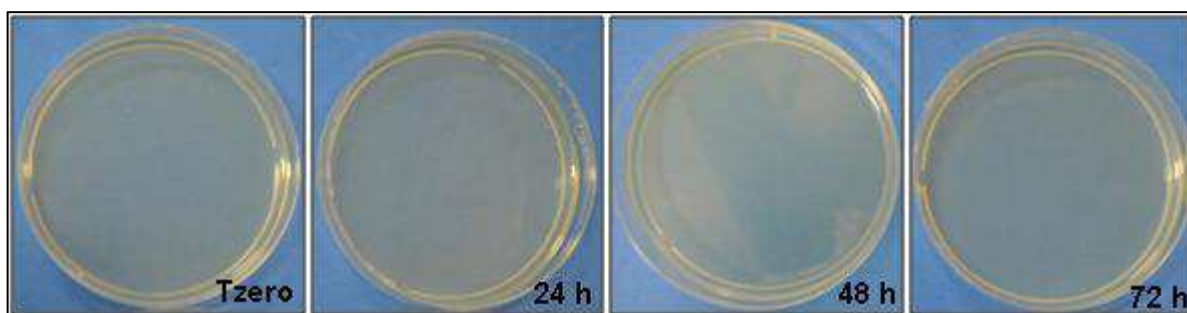


Figura 12 – Teste de contato direto - controle negativo (SBF) em todos os tempos

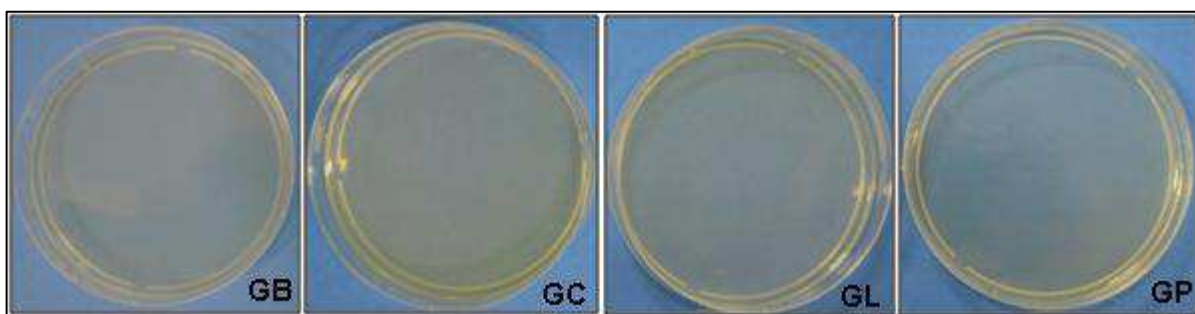


Figura 13 – Teste de contato direto - controle negativo 24h (grupos teste – B,C, L e P)

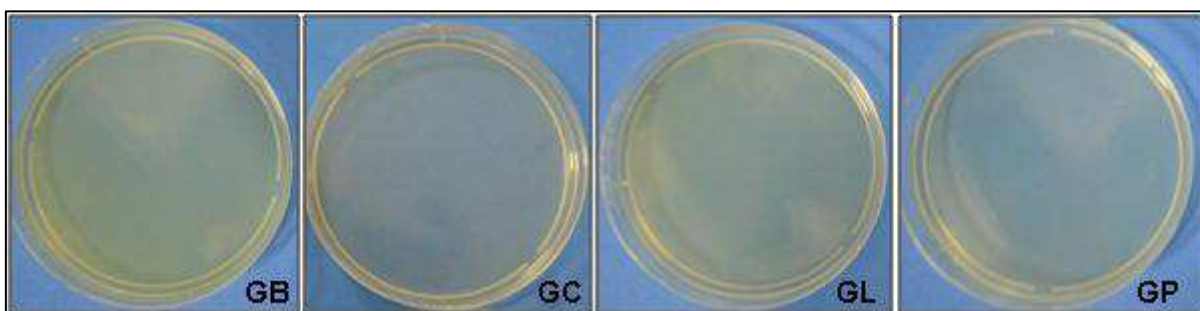


Figura 14 – Teste de contato direto - controle negativo 48h (grupos teste – B, C, L e P)

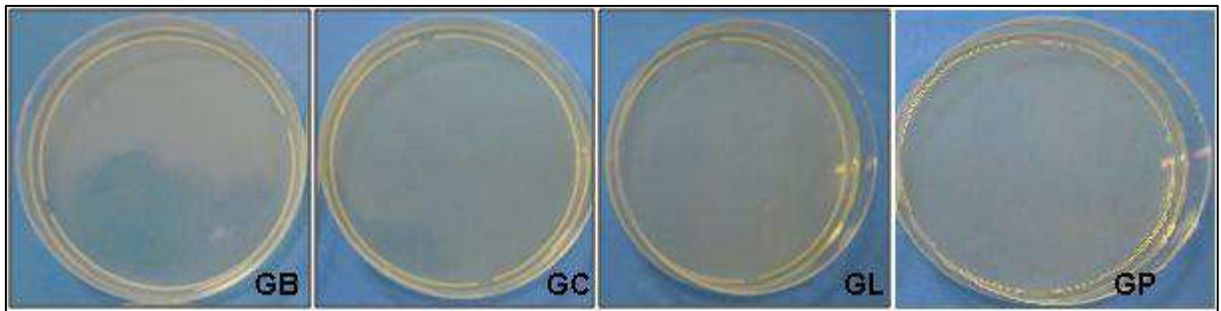


Figura 15 – Teste de contato direto - controle negativo 72h (grupos teste– B, C, L e P)

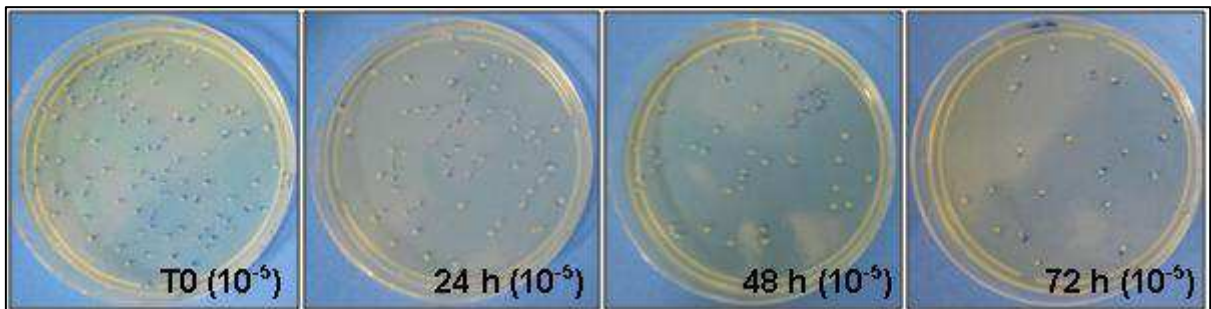


Figura 16 – Teste de contato direto - crescimento *E. faecalis* no grupo controle positivo em todos os tempos e nas diluições em que foram realizadas as contagens de UFC

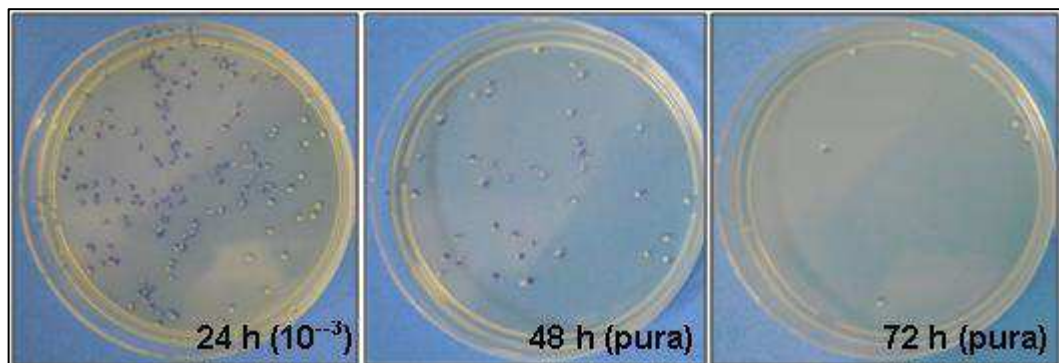


Figura 17 – Teste de contato direto – crescimento *E. faecalis* no Grupo B em todos os tempos e nas diluições em que foram realizadas as contagens de UFC

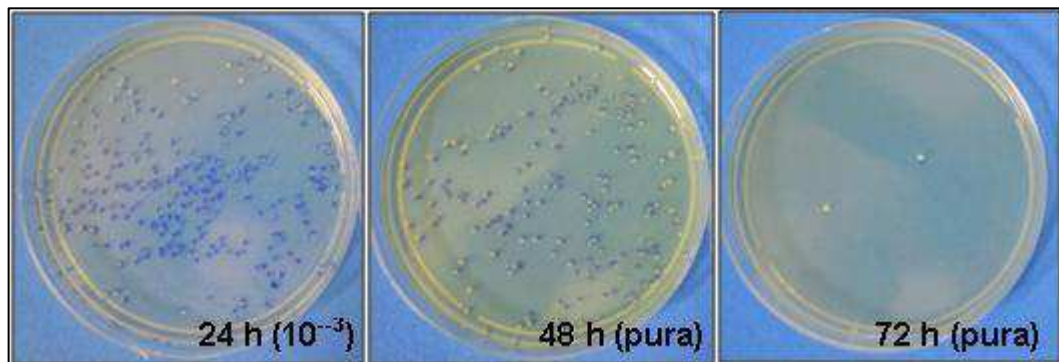


Figura 18 – Teste de contato direto – crescimento de *E. faecalis* no Grupo C em todos os tempos e nas diluições em que foram realizadas as contagens de UFC

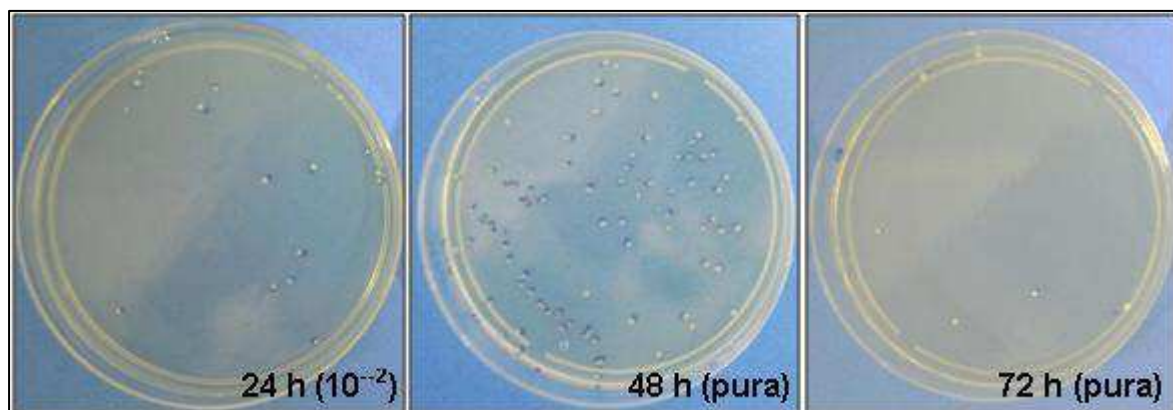


Figura 19 – Teste de contato direto – crescimento *E. faecalis* no Grupo L em todos os tempos e nas diluições em que foram realizadas as contagens de UFC

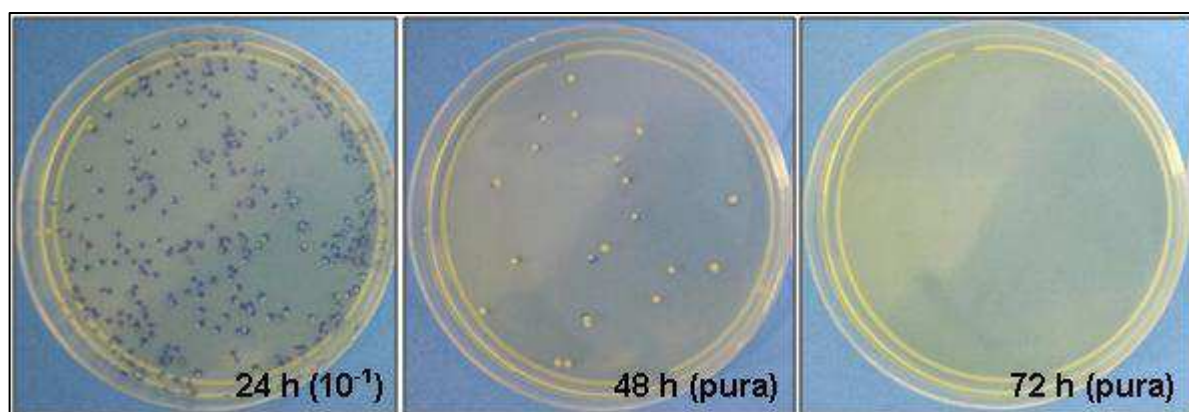


Figura 20 – Teste de contato direto – crescimento *E. 5.2 faecalis* no Grupo P em todos os tempos e nas diluições em que foram realizadas as contagens de UFC

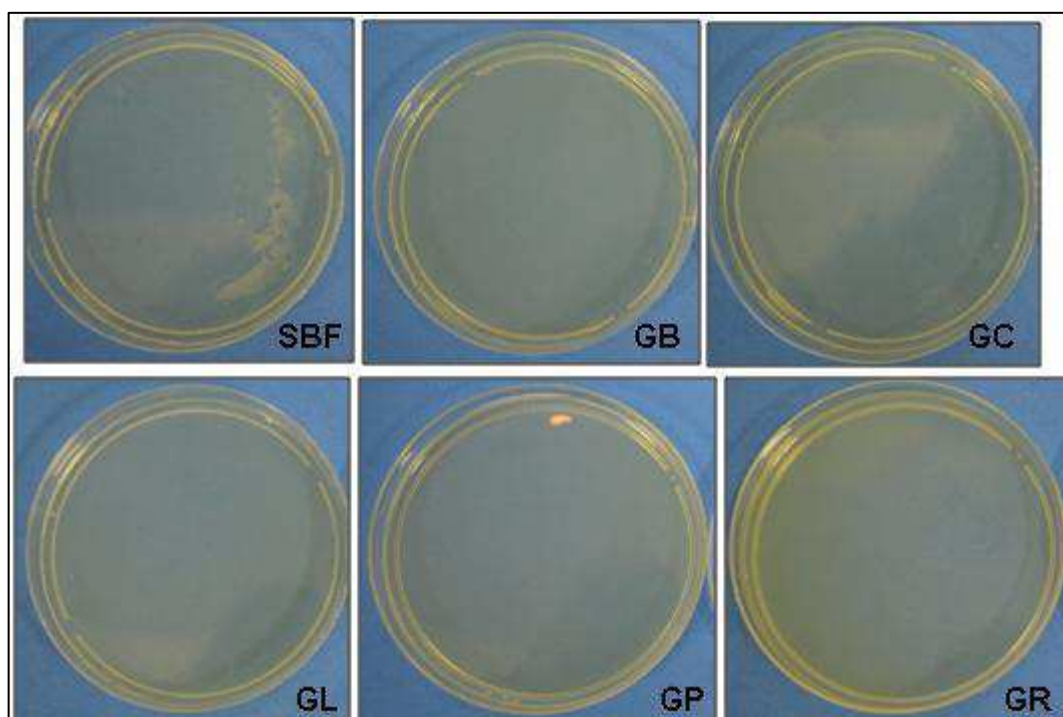


Figura 21 – Teste de aderência – controle negativo (Tzero)

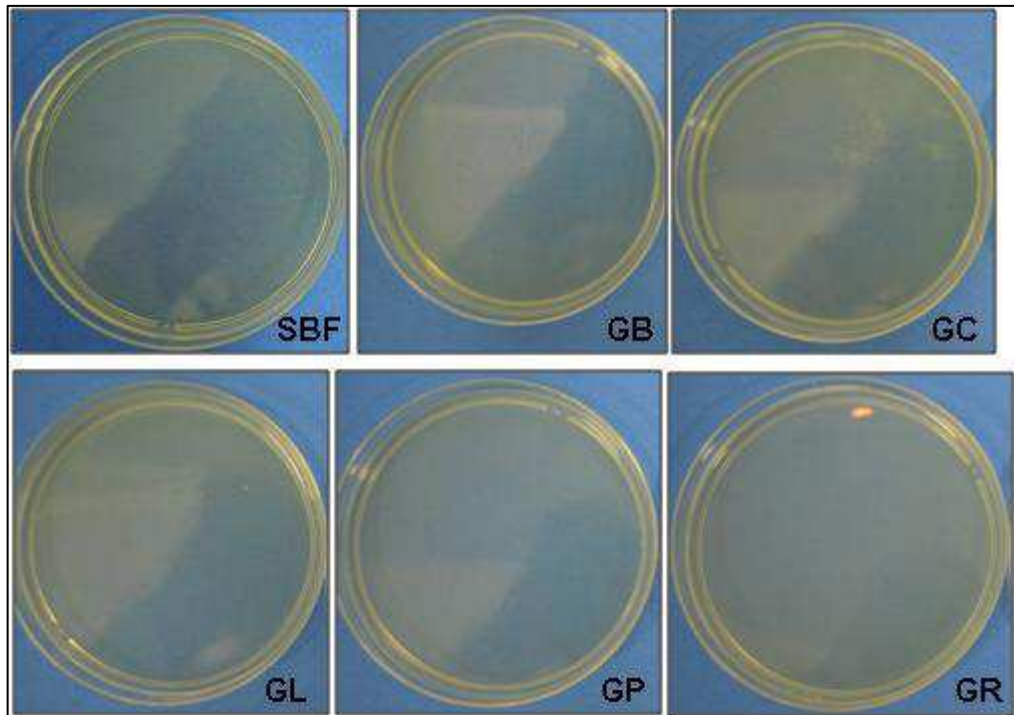


Figura 22 – Teste de aderência – controle negativo (72 horas)

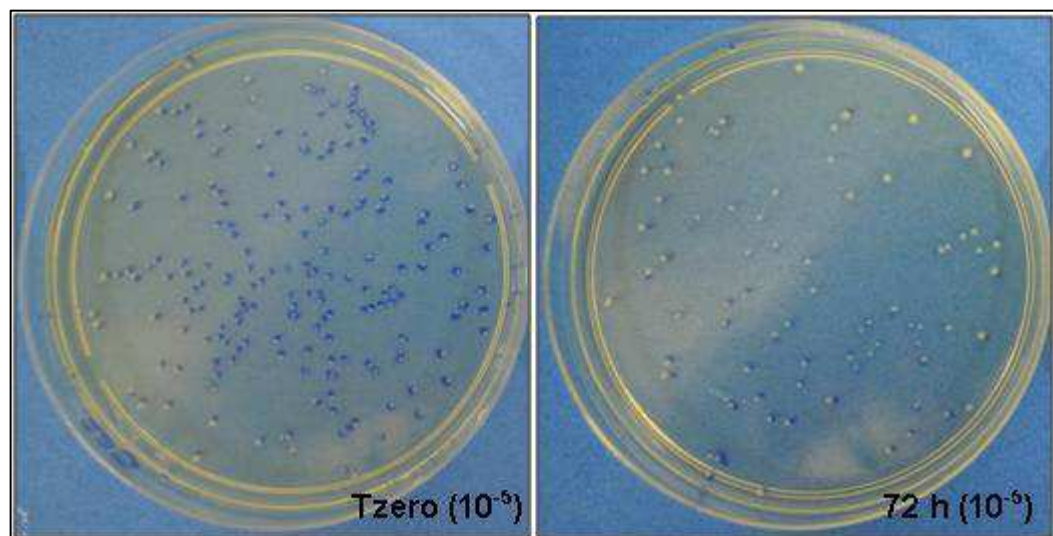


Figura 23 – Teste de aderência – crescimento *E. faecalis* no grupo controle positivo no tempo zero e após 72 h nas diluições em que foram realizadas as contagens de UFC



Figura 24 – Teste de aderência – crescimento *E. faecalis* aderido após 72 horas (grupos teste – B,C,L,P e R) nas diluições em que foram realizadas as contagens de UFC

Todos os grupos controle negativos não apresentaram crescimento nas placas durante todo o período experimental. Os grupos controle positivos permitiram contagem das placas em todos os tempos experimentais. Os dados resultantes da contagem de UFC e os dados transformados em logaritmo de base dez estão expressos nos Apêndices A, B e C.

5.1 Teste de Contato Direto

As médias e desvio-padrão do log das contagens de UFC/mL nos diferentes tempos, bem como a variação no log de UFC/mL entre dois intervalos de tempo para cada grupo estão expressos na Tabela 2.

Tabela 2 – Média e desvio-padrão (DP) para o log de UFC/mL em diferentes tempos e variação do log de UFC/mL entre dois períodos de tempo para os grupos-teste

	GRUPO B		GRUPO C		GRUPO L		GRUPO P	
	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP
TZERO	7.0145	0.0037	7.018	0.0048	7.0145	0.0037	7.0145	0.0037
24H	4.5371	0.2507	5.1007	0.5913	4.5009	0.5620	2.9757	0.4830
48H	1.3740	0.7164	2.0948	0.8208	1.4800	1.2349	0.5373	0.9554
72H	0.3924	0.5244	0.3348	0.4631	0.7248	0.7994	0.0165	0.2396
0-24h	2.4774	0.2534	1.9175	0.5920	2.5138	0.5654	4.0390	0.4860
24-48h	3.1615	0.5397	3.0060	0.6195	3.0210	0.7597	2.4386	0.5865
48-72h	0.9815	0.3001	1.7599	0.4645	0.7552	0.5978	0.5208	0.9320

5.1.1 Análise intragrupos

A Tabela 3 expressa o resultado dos testes estatísticos comparando as amostras de um mesmo grupo ao longo do tempo. A Tabela 4 utiliza os dados de

variação do crescimento bacteriano comparando dois períodos de tempo em um mesmo grupo.

Tabela 3 – Resultado das comparações intragrupos considerando o log de UFC/mL nos diferentes tempos para cada grupo teste (Teste T pareado e Wilcoxon) sendo $p < 0.01$

Grupo	P(valor)*
B (T0x24h)	0.0001
B (24x48h)	0.0001
B (48x72h)	0.0001
C (T0x24h)**	0.0051
C (24x48h)	0.0001
C (48x72h)	0.0001
L (T0x24h)	0.0001
L (24x48h)	0.0001
L (48x72h)	0.0031
P (T0x24h)	0.0001
P (24x48h)	0.0001
P (48x72h)	0.1109

* $\alpha = 0.01$ (1%)

** teste de Wilcoxon

Tabela 4 – Resultado de Anova dois critérios (teste T) para comparações intragrupos considerando a variação do log de UFC/mL entre dois tempos, sendo $p < 0.01$

Grupo	P(valor)*
B (T0-24h)x(24-48h)	0.0018
B (T0-24h)x(48-72h)	0.001
B (24-48h)x (48-72h)	0.001
C (T0-24h)x(24-48h)	0.0017
C (T0-24h)x(48-72h)	0.6014
C (24-48h)x (48-72h)	0.001
L (T0-24h)x(24-48h)	0.1330
L (T0-24h)x(48-72h)	0.001
L (24-48h)x (48-72h)	0.001
P (T0-24h)x(24-48h)	0.001
P (T0-24h)x(48-72h)	0.001
P (24-48h)x (48-72h)	0.001

* $\alpha = 0.01$ (1%)

5.1.2 Análise intergrupos

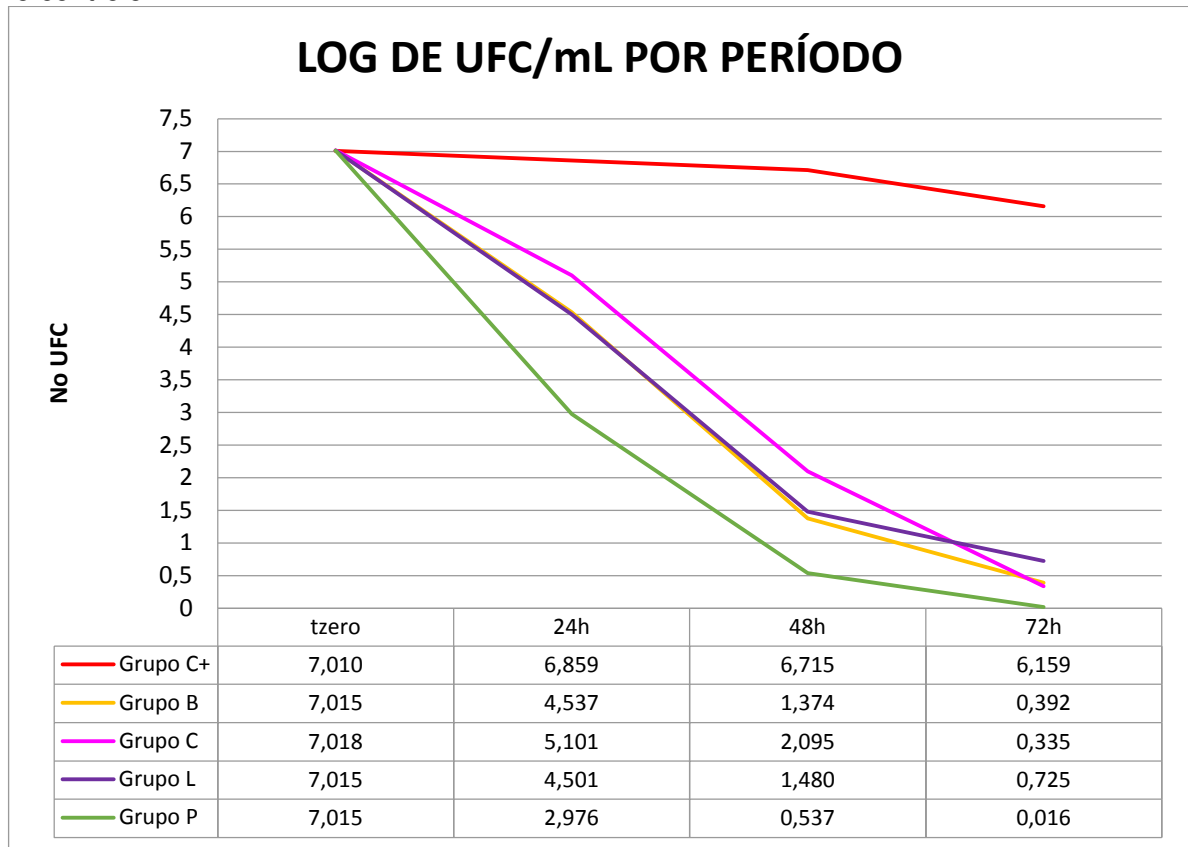
Inicialmente todos os grupos foram comparados com o respectivo controle, considerando o log de UFC/mL nos diferentes tempos (Tabela 5 e Gráfico 1) e a variação de crescimento bacteriano entre dois períodos de tempo (Tabela 6 e Gráfico 2).

Tabela 5 – Resultado do teste T para comparações do controle positivo com grupos teste considerando o log de UFC/mL em cada um dos tempos, sendo $p < 0.01$

Grupos comparados	P(valor)*
Controle+ x B (24h)	0.0001
Controle+ x B (48h)	0.0001
Controle+ x B (72h)	0.0001
Controle+ x C (24h)	0.0001
Controle+ x C (48h)	0.0001
Controle+ x C (72h)	0.0001
Controle+ x L (24h)	0.0001
Controle+ x L (48h)	0.0001
Controle+ x L (72h)	0.0001
Controle+ x P (24h)	0.0001
Controle+ x P (48h)	0.0001
Controle+ x P (72h)	0.0001

* $\alpha = 0.01$ (1%)

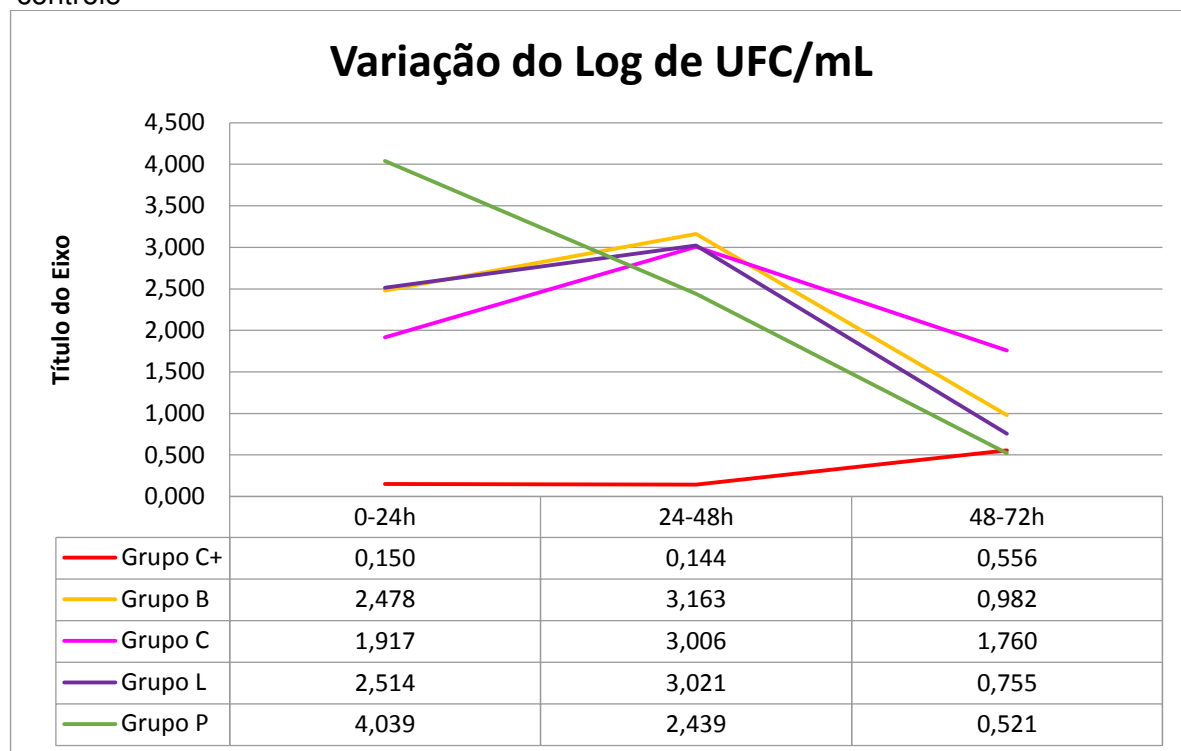
Gráfico 1 – Curva de crescimento bacteriano nos diferentes tempos para os grupos-teste e controle

Tabela 6 – Resultado do teste T para comparações do controle positivo com grupos teste considerando a variação do log de UFC/mL entre dois períodos, sendo $p < 0.01$

Grupos comparados	P(valor)*
Controle+ x B (T0-24h)	0.0001
Controle+ x B (24-48h)	0.0001
Controle+ x B (48-72h)	0.0359
Controle+ x C (T0-24h)	0.0001
Controle+ x C (24-48h)	0.0001
Controle+ x C (48-72h)	0.0001
Controle+ x L (T0-24h)	0.0001
Controle+ x L (24-48h)	0.0001
Controle + x L (48-72h)	0.5804
Controle+ x P (T0-24h)	0.0001
Controle+ x P (24-48h)	0.0001
Controle+ x P (48-72h)	0.8058

* $\alpha = 0.01$ (1%)

Gráfico 2 – Variação do número de UFC nos diferentes tempos para os grupos-teste e controle



A seguir foi realizada a comparação dos grupos entre si (Tabela 7, 8 e 9) comparando a variação de crescimento bacteriano traduzido pela contagem de UFC nas placas (log) entre dois períodos de tempo.

Tabela 7 – Resultado de Anova um critério (teste T) para comparações intergrupos considerando a variação do log de UFC/mL entre dois períodos (T0-24h) , sendo $p < 0.01$

Grupos comparados	P(valor)*
BxC (T0-24h)	0.0154
BxL (T0-24h)	>0.01
BxP (T0-24h)	0.001
CxL (T0-24h)	0.0103
CxP (T0-24h)	0.001
LxP (T0-24h)	0.001

* $\alpha = 0.01$ (1%)

Tabela 8 – Resultado do Teste T para comparações intergrupos considerando a variação do log de UFC/mL entre dois períodos (24-48h), sendo $p < 0.01$

Grupos comparados	P(valor)*
BxC (24-48h)	0.5530
BxL (24-48h)	0.6366
BxP (24-48h)	0.0101
CxL (24-48h)	0.9619
CxP (24-48h)	0.0497
LxP (24-48h)	0.0709

Tabela 9 – Resultado de Anova um critério (teste T) para comparações intergrupos considerando a variação do log de UFC/mL entre dois períodos (48-72h), sendo $p < 0.01$

Grupos comparados	P(valor)*
BxC (48-72h)	0.0079
BxL (48-72h)	>0.01
BxP (48-72h)	>0.01
CxL (48-72h)	0.001
CxP (48-72h)	0.001
LxP (48-72h)	>0.01

5.2 Teste de Aderência

As médias e desvio-padrão do log das contagens de UFC após 72 horas resultante do teste de aderência estão expressos na Tabela 10.

Tabela 10 – Média e desvio-padrão para a contagem de UFC/mL (log) após 72 horas

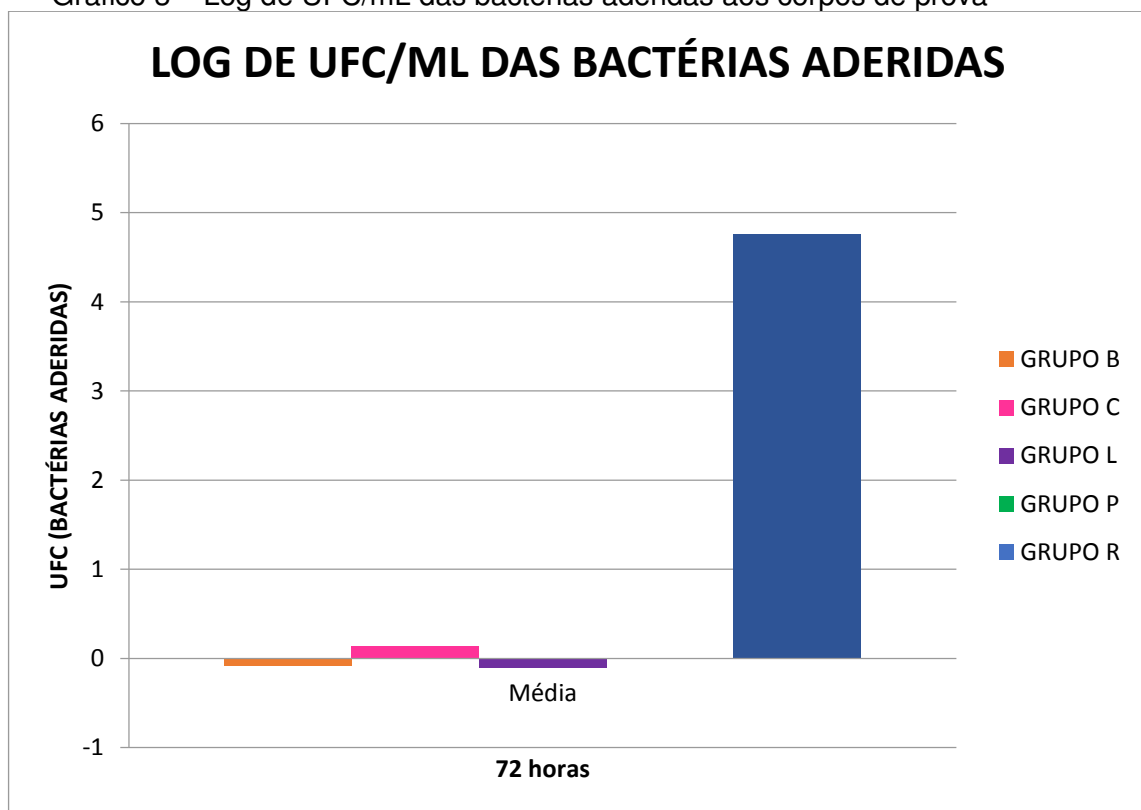
	Média	Desvio-padrão
GRUPO B	-0.0836	0.2125
GRUPO C	0.1390	0.6403
GRUPO L	-0.1130	0.2006
GRUPO P	0.0	0.0
GRUPO R	4.7610	0.1749

Tabela 11 – Resultado do teste de Kruskal-Wallis para as comparações entre os grupos (log de UFC/mL das bactérias aderidas após 72horas) , sendo $p < 0.01$

Grupos comparados	P(valor)*
BxC	0.7766
BxL	0.6344
BxP	0.7300
BxR	0.0001
CxL	0.4477
CxP	0.9511
CxR	0.0003
LxP	0.4118
LxR	<0.0001
PxR	0.0004

$\alpha = 0.01$ (1%)

Gráfico 3 – Log de UFC/mL das bactérias aderidas aos corpos de prova



6. DISCUSSÃO

Quando temos um tratamento endodôntico realizado dentro do rigor da técnica e a reparação não se processa a grande responsável é persistência de microrganismos patogênicos no interior deste canal. Nessa condição o perfil microbiológico dessa infecção difere daquela de um canal que apresenta infecção, mas nunca foi submetido ao tratamento endodôntico (Ferrari, 2010).

A infecção inicial do canal radicular, denominada infecção endodôntica primária ou periodontite periapical primária, tem como característica ser uma infecção polimicrobiana ou mista, podendo existir até 12 espécies de bactéria por canal, com predominância de anaeróbias estritas Gram-positivas e Gram-negativas, que num primeiro momento estão limitadas à luz do canal e pré-dentina, progredindo para o interior dos túbulos dentinários com o passar do tempo (Nair et al., 1990; Ørstavik & Pitt Ford 2004; Gomes et al., 2004; Ferrari, 2010).

A manutenção de infecção após o tratamento endodôntico adequadamente realizado, que persiste por mais de quatro anos, denomina-se infecção endodôntica secundária ou periodontite apical secundária persistente (European Society of Endodontology, 2006). Essa condição tem um perfil microbiológico bastante diverso da infecção primária do canal radicular, havendo predominância de anaeróbios facultativos Gram-positivos, geralmente em monoinfecções ou com a presença de no máximo três gêneros por canal. Esses microrganismos costumam resistir aos procedimentos endodônticos, assim essas manobras acabam por selecionar esses patógenos. Além disso, os anaeróbios facultativos podem sobreviver em condições adversas como pouca nutrição, por períodos extensos de tempo, em estado latente

(Nair et al.,1990; Gomes et al.; 1996, Molander et al.; 1998, Sundqvist et al.;1998, Siqueira Jr. & Roças, 2004; Ferrari & Bombana, 2010).

Enterococcus faecalis tem sido apontado como o microrganismo prevalente na periodontite apical secundária persistente, numa porcentagem que varia de 14,06% a 77,8% (Sundqvist et al., 1998; Chaves de Paz et al., 2003; Siqueira Jr. & Roças, 2004; Gomes et al., 2006; Sedgley et al., 2006; Gomes et al., 2008; Subramanian & Mickel, 2009). Essa espécie é um anaeróbio facultativo Gram-positivo, que tem características que o qualificam a sobreviver num ambiente inóspito para a maioria dos microrganismos, como temperatura elevada e pH extremamente alcalino. Além disso, possuem grande número de fatores de virulência e a possibilidade de manter-se em uma fase estacionária, sem proliferar, quando privada de nutrição (Stuart et al., 2006; Ferrari, 2010). Com base nessas informações fica claro o porquê da escolha deste microrganismo para a presente pesquisa.

Os casos de periodontite apical secundária persistente tem como tratamento eletivo a cirurgia paraendodôntica. As taxas de sucesso para este procedimento costumam variar grandemente em função das condições clínicas pré-operatórias do elemento dental, do grupo dental operado, das técnicas utilizadas e material retrobturador utilizado, que pode variar de 44.3% a 92% (Kim & Kratchman, 2006).

O MTA tem sido o material de escolha para as retrobturações por reunir como características insolubilidade aos fluidos bucais, estabilidade dimensional, prover um bom selamento apical, ter um pH elevado e ser biocompatível (Holland et al., 1999; Estrela et al., 2000; Faraco Jr. & Holland, 2004; Lage-Marques et al., 2005; Asgary et al., 2005; Holland et al., 2007; Parirokh & Torabinejad, 2010).

Entretanto os trabalhos acerca da ação antimicrobiana do MTA frente à *Enterococcus faecalis* são conflitantes. A que se considerar que foram pesquisas realizadas com métodos diversos de exposição ao material, diferentes cepas padrão e diferentes métodos de resgatar os microrganismos. Em quatro trabalhos utilizando o halo de inibição, os trabalhos de Miyagak et al. (2006) e Ribeiro et al. (2006) não apresentaram inibição enquanto que os de Tanomaru-Filho et al. (2007) e Holt et al. (2007) apresentaram inibição. Nos testes de contato direto, realizado em diferentes tempos, Zhang et al. (2009) observaram inibição em até quatro horas, enquanto que Al-Hezaimi et al. (2006) observaram inibição apenas quando foi utilizado o MTA cinza, o MTA branco permitiu o crescimento. Já no trabalho de Eldeniz et al. (2006) houve apenas atraso no crescimento. Já Bidar et al. (2012) não observaram qualquer efeito sobre o microrganismo, assim como Odabaş et al. (2011). Leiss de Leimburg et al. (2004), utilizando o método de infiltração bacteriana, tiveram ao final do experimento, que durou cinquenta dias, 17% dos espécimes contaminados. Visto isso parece pertinente acrescentar alguma substância que venha a melhorar sua ação sobre microrganismos resistentes como *Enterococcus faecalis*.

A nanopartícula de prata foi proposta por ter apresentado nos trabalhos aqui expostos uma ação antimicrobiana efetiva contra *Enterococcus faecalis* (Carreira, 2009; Carreira et al., 2010; Pagonis et al., 2010; Lotfi et al. 2011; Onoda 2011; Odabaş et al., 2011) e já ter sido associada a cimentos endodônticos com bons resultados (Onoda, 2011; Odabaş et al., 2011).

O primeiro desafio a ser vencido para o desenvolvimento deste trabalho foi descobrir como esse material reage ao ser colocado em contato com outras substâncias. Inicialmente foi realizado como piloto um teste de difusão em ágar, utilizando os meios BHI e Müller-Hinton contendo *Enterococcus faecalis* e não foi

observado qualquer halo utilizando MTA branco e cinza, a nanopartícula líquida pura e associada ao MTA branco e cinza. O halo de inibição só aconteceu em torno dos discos de amoxicilina (controle). Situação semelhante foi observada quando, no segundo piloto, realizado na tentativa de estabelecer a Concentração Inibitória Mínima (CIM) não houve também qualquer inibição do crescimento bacteriano. A nanopartícula pó foi utilizada em diluições seriadas desde a concentração de 6400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ até 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e a líquida a 15ppm e 30ppm e os materiais diluídos em água foram acrescentados ao meio Müller-Hinton em caldo contendo *Enterococcus faecalis*. Provavelmente tenha ocorrido uma reação da nanopartícula com o meio, inativando-a. A seguir foi realizado um piloto para estabelecer a CIM em que a nanopartícula em diluições seriadas (6400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a 2000 $\mu\text{g}/\text{mL}$) foi mantida em água destilada, juntamente com a suspensão bacteriana e realizada a semeadura em placa (duplicata). Dessa maneira foi possível observar a inibição do crescimento do *Enterococcus faecalis* na concentração de 6400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ após 24 horas. O questionamento junto ao fabricante teve como resposta apenas que a nanopartícula utilizada é organicamente revestida para permitir dispersão em um veículo polar e é incompatível com ácidos fortes e bases fortes.

A metodologia da presente pesquisa baseou-se em grande parte na pesquisa de Onoda (2011) para permitir comparação de resultados apesar de ter sido realizada com cimentos diferentes do MTA. Assim foi utilizada uma quantidade de nanopartícula em pó de 1% em peso da quantidade de MTA (uma medida MTA=128500 μg), ou seja, 1285 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Não havia trabalhos anteriores demonstrando o uso da nanopartícula na forma dispersa (líquida) associada a um cimento. Foi realizado um piloto com a

concentração de 30ppm, com bons resultados. Optou-se por aumentar a concentração para 50ppm, na busca de melhores resultados.

O uso de moldes em teflon bipartidos foi baseado no trabalho de Holt et al. (2007), após frustradas tentativas de confeccionar os corpos de prova utilizando moldes de silicone, que favoreciam a fratura dos mesmos quando da sua remoção. Foi aguardado o tempo de presa mantendo o corpo de prova em temperatura ambiente, no interior de um pote fechado e recoberto por gaze umedecida buscando criar em ambiente favorável à presa do MTA que necessita de um ambiente úmido. De acordo com Parirokh & Torabinejad (2010) o tempo de presa do MTA é de aproximadamente 165 minutos. Entretanto a remoção dos moldes após esse período resultou em frequente fratura dos corpos de prova, então ficou estabelecido que os corpos de prova fossem removidos dos moldes após 24 horas, o que evitou essa ocorrência.

O uso do MTA cinza puro comparado com o MTA branco puro e com nanopartículas foi proposto baseado nos resultados de Al-Hezaimi et al. (2006), que não observaram inibição utilizando o MTA branco em diferentes concentrações e tempos enquanto o cinza nas maiores concentrações teve inibição em todos os tempos.

A suspensão foi preparada em SBF (Simulated Body Fluid), que é uma solução desenvolvida por Kokubo et al. (1990) que tem uma concentração de íons semelhante a do plasma sanguíneo humano para criar uma condição mais próxima a do ápice dentário.

No teste de contato direto todos os materiais mostraram redução no crescimento bacteriano de *Enterococcus faecalis* em todos os tempos do experimento, sendo que ao final do experimento, ou seja, 72 horas, não houve

crescimento ou quando existiu foi pequeno. Considerando os dados de cada grupo isoladamente percebe-se que houve ação antisséptica dos materiais durante todo o período do experimento, com diferença estatisticamente significativa para todos os grupos (Teste T pareado e Wilcoxon $\alpha=0.01$). Exceção feita ao grupo P no período entre 48 horas e 72 horas, quando não houve diferença significativa entre os grupos por haver em 48 horas já uma quantidade bastante pequena de microrganismos, com pouca diferença para o crescimento de 72 horas. Já quando se analisa a diferença entre o crescimento de dois períodos num mesmo grupo é possível observar se a ação das substâncias foi constante durante todo o período do experimento. A observação destes dados demonstra que a maior variação de crescimento ocorreu no intervalo de 24-48h para os grupos B, C e L. Enquanto no Grupo P essa variação maior ocorreu no intervalo de 0-24h. O que pode ser interpretado como uma ação antisséptica efetiva já no contato inicial do material com a bactéria no Grupo P. Quando se compara a variação entre dois períodos, apesar da diferença numérica entre eles, nos testes estatísticos para os grupos: C (T0-24hx48-72h) e L(T0-24hx24-48h) não foi significativa (Anova teste T $\alpha=0.01$) o que demonstra que a diferença de crescimento nesses dois períodos foi aproximada, então a ação antisséptica se manteve.

Comparado ao grupo controle positivo, que reflete a morte natural das bactérias nesse período, sem a ação dos corpos de prova, observa-se uma diferença expressiva no número de microrganismos. Enquanto no controle positivo a quantidade de bactéria pouco variou até o final do experimento, nos grupos-teste essa variação foi expressiva, mostrando diferença estatística para todos os grupos em todos os tempos o que demonstra ter havido ação antisséptica efetiva de todos os materiais. Quando se analisa a diferença de crescimento entre dois períodos de

tempo comparando o grupo controle com os grupos teste percebe-se que existe diferença estatisticamente significativa para os dois grupos nos dois primeiros intervalos (T0-24 e 24-48h), mas não entre os grupos B, L e P e o controle no intervalo de tempo final (48-72h), isso porque ao final de 48 horas estes três grupos já tinham uma contagem de UFC pequena, que variou pouco até 72 horas enquanto que no grupo C em 48 horas ainda havia uma contagem expressiva então a diferença de contagem entre os dois tempos foi maior.

A comparação entre os grupos considerando a variação de UFC entre dois períodos de tempo mostra diferença estatisticamente significativa considerando o intervalo de tempo inicial (T0-24h) para o grupo P comparado a todos os grupos. Esses dados podem ser traduzidos como uma ação mais efetiva da associação do MTA com a nanopartícula em pó nas primeiras 24 horas. No intervalo de tempo 24-48h não foi observada diferença estatística entre os grupos, o que reflete uma variação de crescimento homogênea entre os grupos. No intervalo final (48-72h) houve diferença estatisticamente significativa entre o grupo C e os demais, isso porque ao final de 48 horas este grupo tinha um crescimento maior comparado aos outros grupos, diferindo da quantidade de microrganismos após 72 horas. Nos demais grupos essa contagem já era pequena, então essa variação foi pequena, menor que no grupo C.

Os resultados do presente trabalho para o MTA branco e cinza diferem dos apresentados na literatura. No trabalho de Holt et al. (2007), usando como método a difusão em ágar os halos de inibição foram maiores para o MTA cinza que para o MTA branco. No trabalho de Tanomaru-Filho et al. (2007), também com o método de difusão em ágar, os diâmetros para os dois tipos de MTA foram iguais. Já no trabalho utilizando o teste de contato direto desenvolvido por Al-Hezaimi et al. (2006)

ele pode observar que o MTA cinza independentemente da concentração e do tempo de contato promoveu a inibição de *Enterococcus faecalis* enquanto que o MTA branco só inibiu nas concentrações mais altas (50, 25 e 12,5mg/mL) em todos os tempos.

A nanopartícula de prata em pó promoveu uma redução considerável no número de microrganismos em todos os tempos, o que vem de encontro com os resultados obtidos por Onoda (2011) ao adicionar a mesma nanopartícula de prata aos cimentos endodônticos a base de óxido de zinco eugenol.

Também é corroborado pelos resultados de Odabaş et al. (2011), que incorporaram Prata-zeolite (2%) ao MTA e realizaram teste de difusão em ágar, conseguindo inibição do *Enterococcus faecalis*, que aumentou em função do tempo, enquanto que o MTA sozinho não apresentou inibição. Outro dado bastante interessante é que, ao realizar o teste para observar a liberação dos íons prata do corpo de prova de MTA associado à prata-zeolite, os autores observaram uma maior liberação de prata, o que vem de encontro aos achados deste trabalho, onde a maior ação na inibição dos microrganismos aconteceu nas primeiras 24 horas.

Transportando estes dados para a situação clínica é possível imaginar que uma ação mais efetiva nas primeiras 24 horas após cirurgia é importante como forma de eliminar de imediato os microrganismos que resistiram ao procedimento cirúrgico, diminuindo a chance de recontaminação.

Enquanto que a nanopartícula líquida adicionada ao MTA não promoveu uma atividade antisséptica maior deste material, levando a supor que foi neutralizada quando da mistura com este cimento. Num estudo piloto a nanopartícula líquida apresentou um resultado superior, inibindo *Enterococcus faecalis* em níveis muito parecidos com a nanopartícula em pó, entretanto nessa ocasião a nanopartícula foi

utilizada na concentração de 30ppm. Neste trabalho ela foi utilizada a 50ppm, o que poderia se supor que melhoraria a ação antisséptica. Mas não, na maior concentração pouca diferença fez sua adição, Como essa substância é bastante estável pode-se pensar que este comportamento foi resultado de uma concentração mais alta, o que pode ter feito com que os íons prata liberados aglutinassem, não alcançando a parede das bactérias e, portanto não tendo ação antisséptica.

Quanto ao teste de aderência, o objetivo de sua realização foi avaliar se a incorporação de nanopartículas ao MTA inibiu a adesão bacteriana neste cimento. A metodologia utilizada, que consistiu em enxaguar os corpos de prova em dois flaconetes com água destilada, após estes estarem em contato com a suspensão, objetivou a remoção das bactérias não aderidas. Na sequência os corpos de prova foram agitados no agitador de tubos com pérolas de vidro na agitação mínima para evitar a dissolução dos mesmos. Este procedimento buscou remover as bactérias que estavam aderidas ao corpo de prova e da solução presente neste ultimo flaconete foi realizada a semeadura de 100µL em placa de petri contendo o ágar nutriente com 0.001% de azul de bromo timol. A aderência nos grupos B, C e L foi mínima e no grupo P inexistente, não havendo, porém diferenças entre eles. Só houve diferença significativa na comparação dos grupos com o grupo controle positivo constituído de corpos de prova em resina acrílica, que favorecem a aderência bacteriana. Neste grupo, de fato, a aderência aconteceu de maneira extensiva. Desse modo pode-se dizer que a nanopartícula, no período de tempo do estudo, pouco contribuiu para evitar a aderência do *Enterococcus faecalis*, visto que o MTA por si só já não favorece essa aderência.

Isso posto pode-se dizer que, dentro da metodologia utilizada a nanopartícula de prata em pó teve papel importante na inibição do *Enterococcus faecalis*

associada ao MTA, tendo uma compatibilidade química com este cimento, fazendo com que essa associação tivesse resultados superiores.

7. CONCLUSÕES

Com base na metodologia empregada e nos resultados obtidos, pode-se concluir que:

1. O MTA cinza e branco, com ou sem nanopartículas, apresentaram ação antimicrobiana sobre *Enterococcus faecalis* em todos os períodos do teste de contato direto;
2. A adição da nanopartícula de prata em pó promoveu um efeito antimicrobiano em menor tempo sobre o *Enterococcus faecalis*, no teste de contato direto;
3. O MTA branco, com nanopartículas não permitiu a aderência bacteriana ao final de 72 horas em contato com a suspensão bacteriana de *Enterococcus faecalis*.

REFERÊNCIAS¹

1. Parirokh M, Torabinejad M. Mineral trioxide aggregate: a comprehensive literature review--Part I: chemical, physical, and antibacterial properties. J Endod 2010;36(1):16-27.
2. Leiss de Leimburg ML, Angeretti A, Ceruti P, Lendini M, Pasqualini D, Berutti E. MTA obturation of pulpless teeth with open apices: bacterial leakage as detected by polymerase chain reaction assay. J Endod 2004;30(12):883-886.
3. Miyagak DC, Carvalho EMOF, Robazza CRC, Chavasco JK, Levorato GL. In vitro evaluation of the antimicrobial activity of endodontic sealers. Braz Oral Res 2006;20(4):303-6.
4. Eldeniz AU, HadimLi HH, Ataoglu H, Orstavik D. Bactericidal effect of root-end fillings. J Endod 2006;32(4):345-9.
5. Al-Hezaimi K, Al-Shalan T, Naghshbandi J, Oglesby S, Simon JHS, Rotstein I. Antibacterial effect of two mineral trioxide aggregate (MTA) preparations against *Enterococcus faecalis* and *Streptococcus sanguis* in vitro. J Endod 2006;32(11):1053-6.
6. Ribeiro CS, Kuteken FA, Hirata Jr R, Scelza MFZ. Avaliação comparativa da ação antimicrobiana do MTA, hidróxido de cálcio e cimento Portland. J Appl Oral Sci. 2006;14(5):330-3
7. Tanomaru-Filho M, Tanomaru JMG, Barros DB, Watanabe B, Ito IY. In vitro antimicrobial activity of endodontic sealers, MTA-based cement and Portland cement. J Oral Science 2007;49(1):41-5.
8. Holt DM, Watts JD, Beeson TJ, Kirkpatrick TC, Rutledge, RE. The anti-microbial effect against *Enterococcus faecalis* and the compressive strength of two types of mineral trioxide aggregate mixed with sterile water or 2% chlorhexidine liquid. J Endod 2007;33(7):844-7.
9. Nair PN, Sjögren U, Krey G, Kahnberg KE, Sundqvist G. Intraradicular bacteria and fungi in root-filled, asymptomatic human teeth with therapy-resistant periapical lesions: a long-term light and electron microscopic follow-up study. J Endod 1990;16(12):580-8.
10. Gomes BP, Lilley JD, Drucker DB. Associations of endodontic symptoms and signs with particular combinations of specific bacteria. Int Endod J. 1996;29(2):69-75.
11. Molander A, Reit C, Dählen G, Kvist T. Microbiological status of root-filled teeth with apical periodontitis. Int Endod J 1998;31(1):1-7.

¹Referências elaboradas de acordo com modelo Vancouver

12. Sundqvist G, Figdor D, Persson S, Sjögren U. Microbiologic analysis of teeth with failed endodontic treatment and the outcome of conservative re-treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1998;85(1):86-93.
13. Peciuliene V, Balciuniene I, Eriksen HM, Haapasalo M. Isolation of *Enterococcus faecalis* in previously root-filled canals in a Lithuanian population. *J Endod* 2000;26(10):593-5.
14. Siqueira Jr JF, Roças IN. Polymerase chain reaction based analysis of microorganisms associated with failed endodontic treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2004;97(1):85-94.
15. Gomes BPF, Pinheiro ET, Jacinto RC, Zaia AA, Ferraz CCR, Souza-Filho FJ. *Enterococcus faecalis* in dental root canals detected by culture and by polymerase chain reaction analysis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2006;102(2):247-53.
16. Sedgley C, Nagel A, Dahlén G, Reit C, Molander A. Real-time quantitative polymerase chain reaction and culture analyses of *Enterococcus faecalis* in root canals. *J Endod* 2006;32(3):173-7.
17. Silver S, Phung LT, Silver G. Silver as biocides in burn and wound dressing and bacterial resistance to silver compounds. *J Ind Microbiol Biotechnol* 2006;33(7):627-34.
18. Kreth J, Kim D, Nguyen M, Hsiao G, Mito R, Kang MK, Chugal N, Shi W. The antimicrobial effect of silver ion impregnation into endodontic sealer against *streptococcus mutans*. *The Open Dentistry Journal* 2008;2:18-23.
19. Carreira CM, Bombana AC. Nanopartículas de prata: momento atual e novas perspectivas. In: Ferrari PHP, Bombana AC. *A infecção endodôntica e sua resolução*. São Paulo: Santos; 2010. p.319-328.
20. Lofti M, Vosoughhosseini S, Ranjkesh B, Khani S, Saghini M, Zand V. Antimicrobial efficacy of nanosilver, sodium hypochlorite and chlorhexidine gluconate against *Enterococcus faecalis*. *Afr J Biotechnol* 2011;10(35):6799-803.
21. Onoda HK. Avaliação in vitro da ação antimicrobiana de três cimentos endodônticos modificados com nanopartículas de prata [Dissertação de Mestrado]. Campo Grande: Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, 2011. 62p.
22. Ørstavik D, Pitt Ford T. Fundamentos da endodontia: prevenção e tratamento. São Paulo: Santos; 2004. p.7.
23. Gomes BPF, Pinheiro ET, Gade-Neto CR, Souza ELT, Ferraz CCR, Zaia AA, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. Microbiological examination of infected dental root canals. *Oral Microbiol Immunol* 2004;19(2):71-6.

24. Pinheiro ET, Gomes, BPFA, Ferraz CCR, Souza ELR, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. Microorganisms from canals of root-filled teeth with periapical lesions. *Int Endod J* 2003;36(1):1-11.
25. European Society of Endodontology. Quality guidelines for endodontic treatment: consensus report of the European Society of Endodontology. *Int Endod J* 2006;39:921-30.
26. Chávez de Paz LE, Dählen G, Molander A, Möller A, Bergenholtz G. Bacteria recovered from teeth with apical periodontitis after antimicrobial endodontic treatment. *Int Endod J* 2003;36(7):500-8.
27. Stuart CH, Schwartz SA, Beeson TJ. *Enterococcus faecalis*: Its role in root canal treatment failure and current concepts in retreatment. *J Endod* 2006;32(2):93-8.
28. Gomes BPFA, Pinheiro ET, Jacinto RC, Zaia AA, Ferraz CCR, Souza-Filho FJ. Microbial analysis of canals of root-filled teeth with periapical lesions using polymerase chain reaction. *J Endod* 2008;102(5):247-53.
29. Subramanian K, Mickel AK. Molecular analysis of persistent periradicular lesions and root ends reveals a diverse microbial profile. *J Endod* 2009;35(7):950-7.
30. Ferrari PHP. Lesões persistentes em endodontia. In: Ferrari PHP, Bombana AC. *A infecção endodôntica e sua resolução*. São Paulo: Santos; 2010. p.207-225.
31. Lee SJ, Monsef M, Torabinejad M. Sealing ability of a mineral trioxide aggregate for repair of lateral root perforations. *J Endod* 1993;19(11):541-4.
32. Lage-Marques JL, Malheiros CF, Amorin CVG. A Endodontia e o MTA – uma abordagem clínica. In: Rode SM, Gentil SN. *Atualização em odontologia (Endodontia/Laser)*. São Paulo: Artes Médicas, 2005. p.3-34.
33. Estrela C, Bammann LL, Estrela CRA, Silva RS, Pécora JD. Antimicrobial and chemical study of MTA, Portland cement, calcium hydroxide paste, Sealapex and Dycal. *Braz Dent J* 2000;11(1):3-9.
34. Asgary S, Parirokh M, Eghbal MJ, Brink F. Chemical differences between white and gray mineral trioxide aggregate. *J Endod* 2005;31(2):101-3.
35. Holland R, Souza V, Nery MJ, Otoboni Filho JA, Bernabé PFE, Dezan E. Reaction of rat connective tissue to implanted dentin tubes filled with mineral trioxide aggregate or calcium hydroxide. *J Endod* 1999;25(3):161-6.
36. Faraco Jr IM, Holland R. Histomorphological response of dogs' dental pulp capped with white mineral trioxide aggregate. *Braz Dent J* 2004;15(2):104-8.
37. Holland R, Bisco Ferreira L, de Souza V, Otoboni Filho JA, Murata SS, Dezan Jr E. Reaction of the lateral periodontium of dogs' teeth to contaminated and noncontaminated perforations filled with mineral trioxide aggregate. *J Endod* 2007;33(10):1192-7.

38. Zhang H, Pappen FG, Haapasalo M. Dentin enhances the antibacterial effect of mineral trioxide aggregate and bioaggregate. *J Endod* 2009;35(2):221-4.
39. Bidar M, Naderinasab M, Talati A, Ghazvini K, Asgari S, Hadizadeh B, Gharechahi M, Mashadi NA. The effects of different concentrations of chlorhexidine gluconate on the antimicrobial properties of mineral trioxide aggregate and calcium enrich mixture. *Dent Res J* 2012;9(4):466–71.
40. Rai MK, Deshmukh SD, Ingle AP, Gade AK. Silver particles: the powerfull nanoweapon against multidrug-resistant bacteria. *J Apl Microb* 2012;112(5):841-52.
41. Poletto FS, Pohlmann AR. Uma pequena grande revolução. *Ciência Hoje* 2008;43(255):27-31.
42. Singh R, Nalwa HS. Medical applications of nanoparticles in biological imaging, cell labeling, antimicrobial agents and anticancer nanodrugs. *J Biomed Nanotec* 2011;7(4):489-503.
43. Martinez-Gutierrez F, Silverman JM, Oliveira CC, Svensson SL, Hoek AV, Sánchez EM, Reiner NE, Gaynor EC, Pryzdial ELG, Conway EM, Orrantia E, Ruiz F, Av-Gay Y, Bach H. Antibacterial activity, inflammatory response, coagulation and cytotoxicity effects of silver nanoparticles. *Nanomed Nanotec Biol and Med* 2012;8(3):328-36.
44. Marambio-Jones C, Hoek EMV. A review of the antibacterial effects of silver nanomaterials and potential implications for human health and the environment. *J Nanopart Res* 2010;12(5):1531-51.
45. Lara HH, Yala-Núñez NV, Turrent, LCI, Padilha CR. Bactericidal effect of silver nanoparticles against multidrug-resistant bacteria. *World J Microbiol Biotechnol* 2010;26(4):615–21.
46. Kawahara K, Tsuruda K, Morishita M, Uchida M. Antibacterial effect of silver-zeolite on oral bacteria under anaerobic conditions. *Dent Mater* 2000;16(6):452-5.
47. Fayaz AM, Balaji K, Girilal M, Yadav R, Kalaichelvan PT, Venketesan R. Biogenic synthesis of silver nanoparticles and their synergistic effect with antibiotics: a study against gram-positive and gram-negative bacteria. *Nanomed Nanotec Biol and Med* 2010;6(1):103-9.
48. Yamanaka M, Hara K, Kudo J. Bactericidal actions of a silver ion solution on escherichia coli studied by energy-filtering Transmission Electron Microscopy and proteomic analysis. *Apl Env Microbiol* 2005;71(11):7589–93.
49. Tiwari DK, Behari J, Sen P. Time and dose-dependent antimicrobial potential of Ag nanoparticles synthesized by top-down approach. *Current Science* 2008;95(5):647-55.
50. Monteiro DR, Gorup LF, Takamiya AS, Ruvollo-Filho, AC, Camargo ER, Barbosa DB. The growing importance of materials that prevent microbial adhesion:

antimicrobial effect of medical devices containing silver. *Int J Antimicrob Ag* 2009;34(2):103-10.

51. Carlson C, Hussain SM, Schrand AM, Braydich-Stolle LK, Hess KL, Jones RL, Schlager JJ. Unique cellular interaction of silver nanoparticles: size-dependent generation of reactive oxygen species. *J Phys Chem B* 2008;112(43):13608-19.

52. Morones JR, Elechiguerra JL, Camacho A, Holt K, Kouri JB, Ramírez JT, Yacaman MJ. The bactericidal effect of silver nanoparticles. *Nanotechnology* 2005;16(10):2346.

53. Pal S, Tak YK, Song JM. Does the antibacterial activity of silver nanoparticles depend on the shape of the nanoparticle? A study of the Gram-negative bacterium *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* 2007;73(6):1712.

54. Smetana AB, Klabunde K, Marchin G, Sorensen C. Biocidal activity of nanocrystalline silver powders and particles. *Langmuir* 2008;24(14):7457-64.

55. Carreira CM, Pereira CA, Bombana AC, Jorge AOC. Eficácia antimicrobiana das nanopartículas de prata sobre esporos, leveduras e bacterias. In: XIII Encontro Latino Americano de Iniciação Científica e IX Encontro Latino Americano de Pós-Graduação – Universidade do Vale do Paraíba. Disponível em: <http://www.scribd.com/doc/56563185/Eficacia-antimicrobiana-das-nanopartículas-de-prata-sobre-esporos-leveduras-e-bacterias>.

56. Furno F, Morley KS, Wong B, Sharp BL, Arnold PL, Howdle SM, Bayston R, Brown PD, Winship PD, Reid HJ. Silver nanoparticles and polymeric medical devices: a new approach to prevention of infection? *J Antimicrob Chemot* 2004;54(6):1019–24.

57. Carreira CM. Avaliação in vitro do controle microbiano e da neutralização de endotoxinas presentes nos canais radiculares por nanopartículas de prata [Tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2009. 119p.

58. Pagonis TC, Chen J, Fontana CR, Devalapally H, Ruggiero K, Song X, Foschi F, Dunham J, Skobe Z, Yamazaki H, Kent R, Tanner ACR, Amiji MM, Soukos NS. Nanoparticle-based endodontic antimicrobial photodynamic therapy. *J Endod* 2010;36(2):322-8.

59. Shantiaee Y, Maziar F, Dianat O, Mahjour F. Comparing microleakage in root canals obturated with nanosilver coated gutta-percha to standard gutta-percha by two different methods. *IEJ* 2011;6(4):140-5.

60. Odabaş ME, Çinar Ç, Akça G, Araz I, Ulusu T, Yücel H. Short-term antimicrobial properties of mineral trioxide aggregate with incorporated silver-zeolite. *Dental Traumatol* 2011;27(3):189-94.

61. Wijnhoven WP, Dekkers S, Hagens WI, Jong WH. Exposure to nanomaterials in consumer products. RIVM Letter report 2009;340370001.

62. Gomes-Filho JE, Silva FO, Watanabe S, Cintra LTA, Tendoro KV, Dalto LG, Pacanaro SV, Lodi CS, Melo FFF. Tissue reaction to silver nanoparticles dispersion as an alternative irrigating solution. *J Endod* 2010;36(10):1698-702.
63. Kim S, Kratchman S. Modern endodontic surgery concepts and practice:a review. *J Endod* 2006;32(7):601–23.
64. Kokubo T, Kushitani H, Sakka S, Kitsugi T, Yamamuro T. Solutions able to reproduce in vivo surface-structure changes in bioactive glass-ceramic A-W³. *J. Biomed Mater Res* 1990;24(6):721-34.

APÊNDICE

APÊNDICE A – Médias e log das contagens de UFC por grupo nos diferentes tempos (Teste de Contato Direto)

	Amostras	Tzero		24 horas		48 horas		72 horas	
		Média	Log	Média	Log	Média	Log	Média	Log
GRUPO B (MTA branco)	B1	$1,02 \times 10^7$	7,01	$7,05 \times 10^4$	4,85	78,33	1,89	3,00	0,48
	B2	$1,02 \times 10^7$	7,01	$5,80 \times 10^4$	4,76	76,67	1,88	8,67	0,94
	B3	$1,02 \times 10^7$	7,01	$9,12 \times 10^4$	4,96	536,67	2,73	36,33	1,56
	B4	$1,02 \times 10^7$	7,01	$3,24 \times 10^4$	4,51	41,33	1,61	2,67	0,43
	B5	$1,02 \times 10^7$	7,01	$3,15 \times 10^4$	4,50	53,67	1,73	3,33	0,52
	B6	$1,02 \times 10^7$	7,02	$1,71 \times 10^4$	4,23	9,33	0,97	0,00	0,00
	B7	$1,02 \times 10^7$	7,02	$2,31 \times 10^4$	4,36	7,33	0,87	0,00	0,00
	B8	$1,02 \times 10^7$	7,02	$2,44 \times 10^4$	4,39	10,33	1,01	0,00	0,00
	B9	$1,02 \times 10^7$	7,02	$3,69 \times 10^4$	4,57	2,33	0,37	0,00	0,00
	B10	$1,02 \times 10^7$	7,02	$1,71 \times 10^4$	4,23	4,67	0,67	0,00	0,00
GRUPO C (MTA cinza)	C1	$1,02 \times 10^7$	7,01	$6,10 \times 10^4$	4,79	89,00	1,95	0,00	0,00
	C2	$1,02 \times 10^7$	7,01	$3,58 \times 10^5$	5,55	382,00	2,58	7,00	0,85
	C3	$1,02 \times 10^7$	7,01	$2,76 \times 10^5$	5,44	309,00	2,49	2,67	0,42
	C4	$1,05 \times 10^7$	7,02	$3,70 \times 10^5$	5,57	10,00	1,00	0,00	0,00
	C5	$1,05 \times 10^7$	7,02	$1,14 \times 10^5$	5,06	83,33	1,92	4,00	0,60
	C6	$1,05 \times 10^7$	7,02	$2,40 \times 10^4$	4,38	13,33	1,12	0,67	-0,17
	C7	$1,05 \times 10^7$	7,02	$6,97 \times 10^3$	3,84	10,00	1,00	0,33	-0,48
	C8	$1,05 \times 10^7$	7,02	$2,63 \times 10^5$	5,42	1050,00	3,02	4,33	0,64
	C9	$1,05 \times 10^7$	7,02	$2,42 \times 10^5$	5,39	1113,33	3,05	6,67	0,82
	C10	$1,05 \times 10^7$	7,02	$3,73 \times 10^5$	5,57	650,00	2,81	4,67	0,67
GRUPO L (MTA branco+NP(fq))	L1	$1,02 \times 10^7$	7,01	$9,35 \times 10^4$	4,97	723,33	2,86	78,33	1,89
	L2	$1,02 \times 10^7$	7,01	$1,12 \times 10^5$	5,05	636,67	2,80	59,00	1,77
	L3	$1,02 \times 10^7$	7,01	$1,13 \times 10^5$	5,06	117,33	2,07	14,67	1,17
	L4	$1,02 \times 10^7$	7,01	$1,30 \times 10^5$	5,12	416,67	2,62	16,00	1,20
	L5	$1,02 \times 10^7$	7,01	$8,90 \times 10^4$	4,95	250	2,40	16,33	1,21
	L6	$1,04 \times 10^7$	7,02	$7,17 \times 10^3$	3,86	0,33	-0,48	0,00	0,00
	L7	$1,04 \times 10^7$	7,02	$1,06 \times 10^4$	4,03	0,00	0,00	0,00	0,00
	L8	$1,04 \times 10^7$	7,02	$1,18 \times 10^4$	4,07	2,67	0,43	0,00	0,00
	L9	$1,04 \times 10^7$	7,02	$1,01 \times 10^4$	4,01	7,33	0,87	0,00	0,00
	L10	$1,04 \times 10^7$	7,02	$8,00 \times 10^3$	3,90	17,33	1,24	0,00	0,00
GRUPO P (MTA branco+NP(pó))	P1	$1,02 \times 10^7$	7,01	$1,01 \times 10^3$	3,01	9,00	0,95	1,00	0,00
	P2	$1,02 \times 10^7$	7,01	$1,02 \times 10^3$	3,01	13,00	1,11	1,00	0,00
	P3	$1,02 \times 10^7$	7,01	$3,56 \times 10^3$	3,55	43,33	1,64	1,33	0,12
	P4	$1,02 \times 10^7$	7,01	$4,11 \times 10^3$	3,61	23,33	1,37	0,33	-0,48
	P5	$1,02 \times 10^7$	7,01	$4,20 \times 10^3$	3,62	82,67	1,92	3,33	0,52
	P6	$1,04 \times 10^7$	7,02	310,00	2,49	0,33	-0,48	0,00	0,00
	P7	$1,04 \times 10^7$	7,02	763,33	2,88	0,33	-0,48	0,00	0,00
	P8	$1,04 \times 10^7$	7,02	473,33	2,68	0,33	-0,48	0,00	0,00
	P9	$1,04 \times 10^7$	7,02	413,33	2,62	0,67	-0,17	0,00	0,00
	P10	$1,04 \times 10^7$	7,02	193,33	2,29	0,00	0,00	0,00	0,00

APÊNDICE B - Médias e log das contagens de UFC por grupo após 72 horas
(Teste de Aderência)

Amostras	GRUPO B		GRUPO C		GRUPO L		GRUPO P		GRUPO R	
	Média	Log	Média	Log	Média	LOG	Média	LOG	Média	Log
1	0,00	0,00	4,00	0,60	0,00	0,00	0,00	0,00	$6,90 \times 10^4$	4,84
2	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	$6,60 \times 10^4$	4,82
3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	$5,30 \times 10^4$	4,72
4	0,00	0,00	0,00	0,00	0,33	-0,48	0,00	0,00	$6,00 \times 10^4$	4,78
5	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	$4,40 \times 10^4$	4,64
6	0,33	-0,48	0,33	-0,48	0,33	-0,48	0,00	0,00	$2,92 \times 10^4$	4,47
7	0,00	0,00	56,67	1,75	0,67	-0,17	0,00	0,00	$3,83 \times 10^4$	4,58
8	0,33	-0,48	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	$8,50 \times 10^4$	4,93
9	1,33	0,12	0,33	-0,48	0,00	0,00	0,00	0,00	$1,27 \times 10^5$	5,10
10	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	$5,40 \times 10^4$	4,73

APÊNDICE C – Médias da contagem de UFC dos grupos controle positivo e respectivos log

Grupos	Tzero		24 horas		48 horas		72 horas	
	Média	Log	Média	Log	Média	Log	Média	Log
C+ (BLP)¹	1,03 x 10 ⁷	7,01	8,23 x 10 ⁶	6,91	3,88 x 10 ⁶	6,590	1,32 x 10 ⁶	6,123
C+ (C)²	1,03 x 10 ⁷	7,01	7,40 x 10 ⁶	6,86	5,63 x 10 ⁶	6,751	1,70 x 10 ⁶	6,231
C+ (TA)³	2,24 x 10 ⁷	7,35	-	-	-	-	4,83 x 10 ⁶	6,684

¹Controle positivos dos grupos BLP (teste de contato direto)

²Controle positivo do grupo C (teste de contato direto)

³Controle positivo do teste de aderência

APÊNDICE D – Resultados dos testes de normalidade (Kolmogorov-Smirnov) para todos os grupos nos diferentes tempos e para diferença entre os tempos (Teste de Contato Direto)

	TEMPO	Média	Desvio-padrão	p(valor)bilateral	Resultado
GRUPO B	TZERO	7.0145	0.0037	ns	normal
	24h	4.5371	0.2507	ns	normal
	48h	1.3740	0.7164	ns	normal
	72h	0.3924	0.5244	ns	normal
	0-24h	2.4774	0.2534	ns	normal
	24-48h	3.1615	0.5397	ns	normal
	48-72h	0.9815	0.3001	ns	normal
GRUPO C	TZERO	7.018	0.0048	0.05	não normal
	24h	5.1007	0.5913	ns	normal
	48h	2.0948	0.8208	ns	normal
	72h	0.3348	0.4631	ns	normal
	0-24h	1.9175	0.5920	ns	normal
	24-48h	3.0060	0.6195	ns	normal
	48-72h	1.7599	0.4645	ns	normal
GRUPO L	TZERO	7.0145	0.0037	ns	normal
	24H	4.5009	0.5620	ns	normal
	48H	1.4800	1.2349	ns	normal
	72H	0.7248	0.7994	ns	normal
	0-24h	2.5138	0.5654	ns	normal
	24-48h	3.0210	0.7597	ns	normal
	48-72h	0.7552	0.5978	ns	normal
GRUPO P	TZERO	7.0145	0.0037	ns	normal
	24H	2.9757	0.4830	ns	normal
	48H	0.5373	0.9554	ns	normal
	72H	0.0165	0.2396	ns	normal
	0-24h	4.0390	0.4860	ns	normal
	24-48h	2.4386	0.5865	ns	normal
	48-72h	0.5208	0.9320	ns	normal

APÊNDICE E – Resultados dos testes de normalidade (Kolmogorov-Smirnov) para todos os grupos (Teste de Aderência)

	Média	Desvio-padrão	p(valor)bilateral	Resultado
GRUPO B	-0.0836	0.2125	<0.05	não normal
GRUPO C	0.1390	0.6403	ns	normal
GRUPO L	-0.1130	0.2006	<0.05	não normal
GRUPO P	0.0	0.0	-	não normal
GRUPO R	4.7610	0.1749	ns	normal

APÊNDICE F – Resultados dos testes estatísticos intragrupo (Teste de Contato Direto)

Grupo B

t - Teste: amostras pareadas

	- 1 - B Tzero	- 2 - B 24h
Indivíduos	10	10
Média	7.0145	4.5371
Desvio Padrão	0.0037	0.2507
Erro Padrão	0.0012	0.0793
Desv. Padrão da Diferença	0.2534	---
Erro Padrão da Diferença	0.0801	---
Média das diferenças	2.4774	---
(t)=	30.9111	---
Graus de Liberdade	9	---
(p) unilateral =	< 0.0001	---
(p) bilateral =	< 0.0001	---
IC (95%)	2.2961 a 2.6587	---
IC (99%)	2.2169 a 2.7379	---

t - Teste: amostras pareadas

	- 2 - B 24h	- 3 - B 48h
Indivíduos	10	10
Média	4.5371	1.3740
Desvio Padrão	0.2507	0.7164
Erro Padrão	0.0793	0.2265
Desv. Padrão da Diferença	0.5406	---
Erro Padrão da Diferença	0.1709	---
Média das diferenças	3.1631	---
(t)=	18.5042	---
Graus de Liberdade	9	---
(p) unilateral =	< 0.0001	---
(p) bilateral =	< 0.0001	---
IC (95%)	2.7764 a 3.5498	---
IC (99%)	2.6075 a 3.7187	---

t - Teste: amostras pareadas

	- 3 - B 48h	- 4 - B 72h
Indivíduos	10	10
Média	1.3740	0.3924
Desvio Padrão	0.7164	0.5224
Erro Padrão	0.2265	0.1652
Desv. Padrão da Diferença	0.3001	---
Erro Padrão da Diferença	0.0949	---
Média das diferenças	0.9816	---
(t)=	10.3421	---
Graus de Liberdade	9	---
(p) unilateral =	< 0.0001	---
(p) bilateral =	< 0.0001	---
IC (95%)	0.7669 a 1.1963	---
IC (99%)	0.6731 a 1.2901	---

Teste ANOVA: dois critérios

FONTES DE VARIAÇÃO	GL	SQ	QM
Tratamentos	2	24.8915	12.446
Blocos	9	0.827	0.092
Erro	18	3.186	0.177
F (tratamentos) =	70.3207		
p (tratamentos) =	< 0.0001		
F (blocos) =	0.5192		
p (blocos) =	0.8422		
Médias (tratamentos):			
Média (Coluna 5) =	2.4775		
Média (Coluna 6) =	3.1631		
Média (Coluna 7) =	0.9815		
Teste t (LSD)	t	(p)	
* Médias (1 e 2) =	3.644	0.0018	
Médias (1 e 3) =	7.951	< 0.001	
Médias (2 e 3) =	11.596	< 0.001	

* 1(0-24h); 2 (24-48h); 3 (48-72h)

Grupo C

Teste de Wilcoxon

- 1 - C Tzero	- 2 - C 24h		
7.011	4.785		
7.011	5.554		
7.011	5.441		
7.021	5.568		
7.021	5.057		
7.021	4.381		
7.021	3.843		
7.021	5.421		
7.021	5.385		
7.021	5.572		
		T =	0
		Número de pares =	10
		Z =	2.8031
		p-valor (unilateral) =	0.0025
		p-valor (bilateral) =	0.0051

t - Teste: amostras pareadas

	- 2 - C 24h	- 3 - C 48h
Indivíduos	10	10
Média	5.1007	2.0948
Desvio Padrão	0.5913	0.8208
Erro Padrão	0.1870	0.2596
Desv. Padrão da Diferença	0.6194	---
Erro Padrão da Diferença	0.1959	---
Média das diferenças	3.0059	---
(t)=	15.3453	---
Graus de Liberdade	9	---
(p) unilateral =	< 0.0001	---
(p) bilateral =	< 0.0001	---
IC (95%)	2.5628 a 3.4490	---
IC (99%)	2.3693 a 3.6425	---

t - Teste: amostras pareadas

	- 3 - C 48h	- 4 - C 72h
Indivíduos	10	10
Média	2.0948	0.3348
Desvio Padrão	0.8208	0.4631
Erro Padrão	0.2596	0.1465
Desv. Padrão da Diferença	0.4646	---
Erro Padrão da Diferença	0.1469	---
Média das diferenças	1.7600	---
(t)=	11.9785	---
Graus de Liberdade	9	---
(p) unilateral =	< 0.0001	---
(p) bilateral =	< 0.0001	---
IC (95%)	1.4276 a 2.0924	---
IC (99%)	1.2825 a 2.2375	---

Teste ANOVA: dois critérios

FONTES DE VARIAÇÃO	GL	SQ	QM
Tratamentos	2	9.2081	4.604
Blocos	9	0.646	0.072
Erro	18	7.905	0.439
F (tratamentos) =	10.4837		
p (tratamentos) =	0.0012		
F (blocos) =	0.1633		
p (blocos) =	0.9950		
Médias (tratamentos):			
Média (Coluna 5) =	1.9175		
Média (Coluna 6) =	3.0060		
* Média (Coluna 7) =	1.7599		
Teste t (LSD)	t	(p)	
Médias (1 e 2) =	3.673	0.0017	
Médias (1 e 3) =	0.532	0.6014	
Médias (2 e 3) =	4.205	< 0.001	

* 1(0-24h); 2 (24-48h); 3 (48-72h)

Grupo L

t - Teste: amostras pareadas

	- 1 - L Zero	- 2 - L 24h
Indivíduos	10	10
Média	7.0145	4.5009
Desvio Padrão	0.0037	0.5620
Erro Padrão	0.0012	0.1777
Desv. Padrão da Diferença	0.5656	---
Erro Padrão da Diferença	0.1789	---
Média das diferenças	2.5136	---
(t)=	14.0530	---
Graus de Liberdade	9	---
(p) unilateral =	< 0.0001	---
(p) bilateral =	< 0.0001	---
IC (95%)	2.1090 a 2.9182	---
IC (99%)	1.9323 a 3.0949	---

t - Teste: amostras pareadas

	- 2 - L 24h	- 3 - L 48h
Indivíduos	10	10
Média	4.5009	1.4800
Desvio Padrão	0.5620	1.2349
Erro Padrão	0.1777	0.3905
Desv. Padrão da Diferença	0.7595	---
Erro Padrão da Diferença	0.2402	---
Média das diferenças	3.0209	---
(t)=	12.5774	---
Graus de Liberdade	9	---
(p) unilateral =	< 0.0001	---
(p) bilateral =	< 0.0001	---
IC (95%)	2.4776 a 3.5642	---
IC (99%)	2.2403 a 3.8015	---

t - Teste: amostras pareadas

	- 3 - L 48h	- 4 - L 72h
Indivíduos	10	10
Média	1.4800	0.7248
Desvio Padrão	1.2349	0.7994
Erro Padrão	0.3905	0.2528
Desv. Padrão da Diferença	0.5978	---
Erro Padrão da Diferença	0.1891	---
Média das diferenças	0.7552	---
(t)=	3.9946	---
Graus de Liberdade	9	---
(p) unilateral =	0.0016	---
(p) bilateral =	0.0031	---
IC (95%)	0.3276 a 1.1828	---
IC (99%)	0.1408 a 1.3696	---

Teste ANOVA: dois critérios

FONTES DE VARIAÇÃO	GL	SQ	QM
Tratamentos	2	28.2793	14.140
Blocos	9	1.933	0.215
Erro	18	9.355	0.520
F (tratamentos) =	27.2051		
p (tratamentos) =	< 0.0001		
F (blocos) =	0.4133		
p (blocos) =	0.9113		
Médias (tratamentos):			
Média (Coluna 5) =	2.5138		
Média (Coluna 6) =	3.0210		
Média (Coluna 7) =	0.7552		
Teste t (LSD)	t	(p)	
* Médias (1 e 2) =	1.573	0.1330	
Médias (1 e 3) =	5.455	< 0.001	
Médias (2 e 3) =	7.028	< 0.001	

* 1(0-24h); 2 (24-48h); 3 (48-72h)

Grupo P

t - Teste: amostras pareadas

	- 1 - P Tzero	- 2 - P 24h
Indivíduos	10	10
Média	7.0145	2.9757
Desvio Padrão	0.0037	0.4830
Erro Padrão	0.0012	0.1527
Desv. Padrão da Diferença	0.4861	---
Erro Padrão da Diferença	0.1537	---
Média das diferenças	4.0388	---
(t)=	26.2728	---
Graus de Liberdade	9	---
(p) unilateral =	< 0.0001	---
(p) bilateral =	< 0.0001	---
IC (95%)	3.6911 a 4.3865	---
IC (99%)	3.5392 a 4.5384	---

t - Teste: amostras pareadas

	- 2 - P 24h	- 3 - P 48h
Indivíduos	10	10
Média	2.9757	0.5373
Desvio Padrão	0.4830	0.9554
Erro Padrão	0.1527	0.3021
Desv. Padrão da Diferença	0.5862	---
Erro Padrão da Diferença	0.1854	---
Média das diferenças	2.4384	---
(t)=	13.1532	---
Graus de Liberdade	9	---
(p) unilateral =	< 0.0001	---
(p) bilateral =	< 0.0001	---
IC (95%)	2.0191 a 2.8577	---
IC (99%)	1.8359 a 3.0409	---

t - Teste: amostras pareadas

	- 3 - P 48h	- 4 - P 72h
Indivíduos	10	10
Média	0.5373	0.0165
Desvio Padrão	0.9554	0.2396
Erro Padrão	0.3021	0.0758
Desv. Padrão da Diferença	0.9320	---
Erro Padrão da Diferença	0.2947	---
Média das diferenças	0.5208	---
(t)=	1.7671	---
Graus de Liberdade	9	---
(p) unilateral =	0.0555	---
(p) bilateral =	0.1109	---
IC (95%)	-0.1458 a 1.1874	---
IC (99%)	-0.4370 a 1.4786	---

Teste ANOVA: dois critérios

FONTES DE VARIAÇÃO	GL	SQ	QM
Tratamentos	2	62.0566	31.028
Blocos	9	0.173	0.019
Erro	18	12.866	0.715
F (tratamentos) =	43.4105		
p (tratamentos) =	< 0.0001		
F (blocos) =	0.0268		
p (blocos) =	1.0000		
Médias (tratamentos):			
Média (Coluna 5) =	4.0390		
Média (Coluna 6) =	2.4386		
Média (Coluna 7) =	0.5208		
* Teste t (LSD)	t	(p)	
Médias (1 e 2) =	4.233	< 0.001	
Médias (1 e 3) =	9.305	< 0.001	
Médias (2 e 3) =	5.072	< 0.001	

* 1(0-24h); 2 (24-48h); 3 (48-72h)

APÊNDICE G – Resultados dos testes estatísticos comparando grupo controle e grupos teste (Teste de Contato Direto)

24H (número de UFC)

Controle positivo x Grupo B

t - Teste: Amostras Independentes

	- 1 - C+ 24H	- 2 - B 24H
Tamanho =	6	10
Média =	6.9102	4.5371
Variância =	0.0051	0.0628
	Heterocedasticidade	
Variância =	0.0071	--
t =	28.1004	--
Graus de liberdade =	11.23	--
p (unilateral) =	< 0.0001	--
p (bilateral) =	< 0.0001	--
Poder (0.05) =	1.0000	--
Poder (0.01) =	1.0000	--
Diferença entre as médias =	2.3731	--
IC 95% (Dif. entre médias) =	2.1559 a 2.5902	--
IC 99% (Dif. entre médias) =	2.0326 a 2.7136	--

Controle positivo x Grupo C

t - Teste: Amostras Independentes

	- 1 - C+24H	- 2 - C24H
Tamanho =	6	10
Média =	6.8520	5.1007
Variância =	0.0181	0.3496
	Heterocedasticidade	
Variância =	0.0380	--
t =	8.9858	--
Graus de liberdade =	10.48	--
p (unilateral) =	< 0.0001	--
p (bilateral) =	< 0.0001	--
Poder (0.05) =	1.0000	--
Poder (0.01) =	1.0000	--
Diferença entre as médias =	1.7513	--
IC 95% (Dif. entre médias) =	1.2502 a 2.2524	--
IC 99% (Dif. entre médias) =	0.9655 a 2.5371	--

Controle positivo x Grupo L

t - Teste: Amostras Independentes

	- 1 - C+ 24H	- 3 - L 24H
Tamanho =	6	10
Média =	6.9102	4.5009
Variância =	0.0051	0.3158
	Heterocedasticidade	
Variância =	0.0324	--
t =	13.3787	--
Graus de liberdade =	9.48	--
p (unilateral) =	< 0.0001	--
p (bilateral) =	< 0.0001	--
Poder (0.05) =	1.0000	--
Poder (0.01) =	1.0000	--
Diferença entre as médias =	2.4093	--
IC 95% (Dif. entre médias) =	1.9463 a 2.8723	--
IC 99% (Dif. entre médias) =	1.6832 a 3.1354	--

Controle positivo x Grupo P

t - Teste: Amostras Independentes

	- 1 - C+ 24H	- 4 - P 24H
Tamanho =	6	10
Média =	6.9102	2.9757
Variância =	0.0051	0.2333
	Heterocedasticidade	
Variância =	0.0242	--
t =	25.9025	--
Graus de liberdade =	9.64	--
p (unilateral) =	< 0.0001	--
p (bilateral) =	< 0.0001	--
Poder (0.05) =	1.0000	--
Poder (0.01) =	1.0000	--
Diferença entre as médias =	3.9345	--
IC 95% (Dif. entre médias) =	3.5347 a 4.3342	--
IC 99% (Dif. entre médias) =	3.3075 a 4.5614	--

48H

Controle positivo x Grupo B

t - Teste: Amostras Independentes

	- 1 - C+48H	- 2 - B48H
Tamanho =	6	10
Média =	6.5825	1.3740
Variância =	0.1099	0.5132
	Heterocedasticidade	
Variância =	0.0696	--
t =	19.7370	--
Graus de liberdade =	13.48	--
p (unilateral) =	< 0.0001	--
p (bilateral) =	< 0.0001	--
Poder (0.05) =	1.0000	--
Poder (0.01) =	1.0000	--
Diferença entre as médias =	5.2085	--
IC 95% (Dif. entre médias) =	4.5301 a 5.8870	--
IC 99% (Dif. entre médias) =	4.1445 a 6.2726	--

Controle positivo x Grupo C

t - Teste: Amostras Independentes

	- 1 - C+48H	- 2 - C48H
Tamanho =	6	10
Média =	6.7342	2.0948
Variância =	0.0212	0.6737
	Heterocedasticidade	
Variância =	0.0709	--
t =	17.4233	--
Graus de liberdade =	9.92	--
p (unilateral) =	< 0.0001	--
p (bilateral) =	< 0.0001	--
Poder (0.05) =	1.0000	--
Poder (0.01) =	1.0000	--
Diferença entre as médias =	4.6394	--
IC 95% (Dif. entre médias) =	3.9548 a 5.3240	--
IC 99% (Dif. entre médias) =	3.5857 a 5.7130	--

Controle positivo x Grupo L

t - Teste: Amostras Independentes

	- 1 - C+48H	- 3 - L48H
Tamanho =	6	10
Média =	6.5825	1.4800
Variância =	0.1099	1.5250
	Heterocedasticidade	
Variância =	0.1708	---
t =	12.3456	---
Graus de liberdade =	11.01	---
p (unilateral) =	< 0.0001	---
p (bilateral) =	< 0.0001	---
Poder (0.05) =	1.0000	---
Poder (0.01) =	1.0000	---
Diferença entre as médias =	5.1025	---
IC 95% (Dif. entre médias) =	4.0399 a 6.1651	---
IC 99% (Dif. entre médias) =	3.4361 a 6.7890	---

Controle positivo x Grupo P

t - Teste: Amostras Independentes

	- 1 - C+48H	- 4 - P48H
Tamanho =	6	10
Média =	6.5825	0.5373
Variância =	0.1099	0.9127
	Heterocedasticidade	
Variância =	0.1096	---
t =	18.2604	---
Graus de liberdade =	12.10	---
p (unilateral) =	< 0.0001	---
p (bilateral) =	< 0.0001	---
Poder (0.05) =	1.0000	---
Poder (0.01) =	1.0000	---
Diferença entre as médias =	6.0452	---
IC 95% (Dif. entre médias) =	5.1941 a 6.8964	---
IC 99% (Dif. entre médias) =	4.7104 a 7.3800	---

72H

Controle positivo x Grupo B

t - Teste: Amostras Independentes

	- 1 - C+72H	- 2 - B72H
Tamanho =	6	10
Média =	5.9798	0.3924
Variância =	0.0062	0.2729
	Heterocedasticidade	
Variância =	0.0283	---
t =	33.1986	---
Graus de liberdade =	9.67	---
p (unilateral) =	< 0.0001	---
p (bilateral) =	< 0.0001	---
Poder (0.05) =	1.0000	---
Poder (0.01) =	1.0000	---
Diferença entre as médias =	5.5874	---
IC 95% (Dif. entre médias) =	5.1547 a 6.0201	---
IC 99% (Dif. entre médias) =	4.9088 a 6.2660	---

Controle positivo x Grupo C

t - Teste: Amostras Independentes

	- 1 - C+72H	- 2 - C72H
Tamanho =	6	10
Média =	6.1843	0.3348
Variância =	0.0504	0.2145
	Homocedasticidade	
Variância =	0.1559	---
t =	28.6892	---
Graus de liberdade =	14	---
p (unilateral) =	< 0.0001	---
p (bilateral) =	< 0.0001	---
Poder (0.05) =	1.0000	---
Poder (0.01) =	1.0000	---
Diferença entre as médias =	5.8495	---
IC 95% (Dif. entre médias) =	5.4122 a 6.2869	---
IC 99% (Dif. entre médias) =	5.2425 a 6.4565	---

Controle positivo x Grupo L

t - Teste: Amostras Independentes

	- 1 - C+72H	- 3 - L72H
Tamanho =	6	10
Média =	5.9798	0.7248
Variância =	0.0062	0.6390
	Heterocedasticidade	
Variância =	0.0649	---
t =	20.6221	---
Graus de liberdade =	9.29	---
p (unilateral) =	< 0.0001	---
p (bilateral) =	< 0.0001	---
Poder (0.05) =	1.0000	---
Poder (0.01) =	1.0000	---
Diferença entre as médias =	5.2550	---
IC 95% (Dif. entre médias) =	4.5998 a 5.9101	---
IC 99% (Dif. entre médias) =	4.2275 a 6.2824	---

Controle positivo x Grupo P

t - Teste: Amostras Independentes

	- 1 - C+72H	- 4 - P72H
Tamanho =	6	10
Média =	5.9798	0.0165
Variância =	0.0062	0.0574
	Heterocedasticidade	
Variância =	0.0068	---
t =	72.4471	---
Graus de liberdade =	11.85	---
p (unilateral) =	< 0.0001	---
p (bilateral) =	< 0.0001	---
Poder (0.05) =	1.0000	---
Poder (0.01) =	1.0000	---
Diferença entre as médias =	5.9633	---
IC 95% (Dif. entre médias) =	5.7517 a 6.1749	---
IC 99% (Dif. entre médias) =	5.6314 a 6.2952	---

0-24H (variação no número de UFC)

Controle positivo x Grupo B

t - Teste: Amostras Independentes

	- 1 - C+0-24H	- 2 - B0-24H
Tamanho =	6	10
Média =	0.1033	2.4775
Variância =	0.0077	0.0642
	Heterocedasticidade	
Variância =	0.0077	---
t =	-27.0631	---
Graus de liberdade =	12.08	---
p (unilateral) =	< 0.0001	---
p (bilateral) =	< 0.0001	---
Poder (0.05) =	1.0000	---
Poder (0.01) =	1.0000	---
Diferença entre as médias =	-2.3742	---
IC 95% (Dif. entre médias) =	-2.5997 a - 2.1466	---
IC 99% (Dif. entre médias) =	-2.7279 a - 2.0205	---

Controle positivo x Grupo C

t - Teste: Amostras Independentes

	- 1 - C+0-24H	- 2 - C0-24H
Tamanho =	6	10
Média =	0.1577	1.9175
Variância =	0.0180	0.3505
	Heterocedasticidade	
Variância =	0.0380	---
t =	-9.0222	---
Graus de liberdade =	10.47	---
p (unilateral) =	< 0.0001	---
p (bilateral) =	< 0.0001	---
Poder (0.05) =	1.0000	---
Poder (0.01) =	1.0000	---
Diferença entre as médias =	-1.7598	---
IC 95% (Dif. entre médias) =	-2.2613 a - 1.2583	---
IC 99% (Dif. entre médias) =	-2.5463 a - 0.9734	---

Controle positivo x Grupo L

t - Teste: Amostras Independentes

	- 1 - C+0-24H	- 3 - L0-24H
Tamanho =	6	10
Média =	0.1033	2.5138
Variância =	0.0077	0.3197
	Heterocedasticidade	
Variância =	0.0332	---
t =	-13.2196	---
Graus de liberdade =	9.71	---
p (unilateral) =	< 0.0001	---
p (bilateral) =	< 0.0001	---
Poder (0.05) =	1.0000	---
Poder (0.01) =	1.0000	---
Diferença entre as médias =	-2.4105	---
IC 95% (Dif. entre médias) =	-2.8783 a - 1.9417	---
IC 99% (Dif. entre médias) =	-3.1457 a - 1.6753	---

Controle positivo x Grupo P

t - Teste: Amostras Independentes

	- 1 - C+0-24H	- 4 - P0-24H
Tamanho =	6	10
Média =	0.1033	4.0390
Variância =	0.0077	0.2362
	Heterocedasticidade	
Variância =	0.0249	---
t =	-24.9434	---
Graus de liberdade =	9.95	---
p (unilateral) =	< 0.0001	---
p (bilateral) =	< 0.0001	---
Poder (0.05) =	1.0000	---
Poder (0.01) =	1.0000	---
Diferença entre as médias =	-3.9357	---
IC 95% (Dif. entre médias) =	-4.3413 a - 3.5300	---
IC 99% (Dif. entre médias) =	-4.5719 a - 3.2955	---

24-48H (variação no número de UFC)

Controle positivo x Grupo B

t - Teste: Amostras Independentes

	- 1 - C+24-48H	- 2 - B24-48H
Tamanho =	6	10
Média =	0.3282	3.1631
Variância =	0.0850	0.2916
	Homocedasticidade	
Variância =	0.2178	---
t =	-11.7628	---
Graus de liberdade =	14	---
p (unilateral) =	< 0.0001	---
p (bilateral) =	< 0.0001	---
Poder (0.05) =	1.0000	---
Poder (0.01) =	1.0000	---
Diferença entre as médias =	-2.8349	---
IC 95% (Dif. entre médias) =	-3.3519 a - 2.3180	---
IC 99% (Dif. entre médias) =	-3.5524 a - 2.1175	---

Controle positivo x Grupo C

t - Teste: Amostras Independentes

	- 1 - C+24-48H	- 2 - C24-48H
Tamanho =	6	10
Média =	0.1178	3.0060
Variância =	0.0052	0.3838
	Heterocedasticidade	
Variância =	0.0393	---
t =	-14.5780	---
Graus de liberdade =	9.41	---
p (unilateral) =	< 0.0001	---
p (bilateral) =	< 0.0001	---
Poder (0.05) =	1.0000	---
Poder (0.01) =	1.0000	---
Diferença entre as médias =	-2.8882	---
IC 95% (Dif. entre médias) =	-3.3975 a - 2.3788	---
IC 99% (Dif. entre médias) =	-3.6870 a - 2.0894	---

Controle positivo x Grupo L

t - Teste: Amostras Independentes

	- 1 - C+24-48H	- 3 - L24-48H
Tamanho =	6	10
Média =	0.3282	3.0210
Variância =	0.0850	0.5772
	Heterocedasticidade	
Variância =	0.0719	---
t =	-10.0441	---
Graus de liberdade =	12.59	---
p (unilateral) =	< 0.0001	---
p (bilateral) =	< 0.0001	---
Poder (0.05) =	1.0000	---
Poder (0.01) =	1.0000	---
Diferença entre as médias =	-2.6928	---
IC 95% (Dif. entre médias) =	-3.3821 a - 2.0035	---
IC 99% (Dif. entre médias) =	-3.7738 a - 1.6119	---

Controle positivo x Grupo P

t - Teste: Amostras Independentes

	- 1 - C+24-48H	- 4 - P24-48H
Tamanho =	6	10
Média =	0.3282	2.4386
Variância =	0.0850	0.3440
	Homocedasticidade	
Variância =	0.2515	---
t =	-8.1500	---
Graus de liberdade =	14	---
p (unilateral) =	< 0.0001	---
p (bilateral) =	< 0.0001	---
Poder (0.05) =	1.0000	---
Poder (0.01) =	1.0000	---
Diferença entre as médias =	-2.1104	---
IC 95% (Dif. entre médias) =	-2.6659 a - 1.5550	---
IC 99% (Dif. entre médias) =	-2.8813 a - 1.3395	---

48-72H (variação no número de UFC)

Controle positivo x Grupo B

t - Teste: Amostras Independentes

	- 1 - C+48-72H	- 2 - B48-72H
Tamanho =	6	10
Média =	0.6028	0.9815
Variância =	0.1179	0.0900
	Homocedasticidade	
Variância =	0.1000	---
t =	-2.3191	---
Graus de liberdade =	14	---
p (unilateral) =	0.0180	---
p (bilateral) =	0.0359	---
Poder (0.05) =	0.7354	---
Poder (0.01) =	0.4778	---
Diferença entre as médias =	-0.3787	---
IC 95% (Dif. entre médias) =	-0.7289 a - 0.0284	---
IC 99% (Dif. entre médias) =	-0.8647 a 0.1074	---

Controle positivo x Grupo C

t - Teste: Amostras Independentes

	- 1 - C+48-72H	- 2 - C48-72H
Tamanho =	6	10
Média =	0.5498	1.7599
Variância =	0.1353	0.2158
	Homocedasticidade	
Variância =	0.1870	---
t =	-5.4181	---
Graus de liberdade =	14	---
p (unilateral) =	< 0.0001	---
p (bilateral) =	< 0.0001	---
Poder (0.05) =	1.0000	---
Poder (0.01) =	0.9994	---
Diferença entre as médias =	-1.2101	---
IC 95% (Dif. entre médias) =	-1.6891 a - 0.7310	---
IC 99% (Dif. entre médias) =	-1.8749 a - 0.5452	---

Controle positivo x Grupo L

t - Teste: Amostras Independentes

	- 1 - C+48-72H	- 3 - L48-72H
Tamanho =	6	10
Média =	0.6028	0.7552
Variância =	0.1179	0.3574
	Homocedasticidade	
Variância =	0.2719	---
t =	-0.5659	---
Graus de liberdade =	14	---
p (unilateral) =	0.2902	---
p (bilateral) =	0.5804	---
Poder (0.05) =	0.1481	---
Poder (0.01) =	0.0262	---
Diferença entre as médias =	-0.1524	---
IC 95% (Dif. entre médias) =	-0.7299 a 0.4252	---
IC 99% (Dif. entre médias) =	-0.9539 a 0.6492	---

Controle positivo x Grupo P

t - Teste: Amostras Independentes

	- 1 - C+48-72H	- 4 - P48-72H
Tamanho =	6	10
Média =	0.6028	0.5208
Variância =	0.1179	0.8886
	Heterocedasticidade	
Variância =	0.1065	---
t =	0.2514	---
Graus de liberdade =	12.39	---
p (unilateral) =	0.4029	---
p (bilateral) =	0.8058	---
Poder (0.05) =	0.0725	---
Poder (0.01) =	0.0335	---
Diferença entre as médias =	0.0820	---
IC 95% (Dif. entre médias) =	-0.7570 a 0.9211	---
IC 99% (Dif. entre médias) =	-1.2338 a 1.3979	---

APÊNDICE H – Resultados da análise intergrupo comparando a variação do número de UFC em dois intervalos de tempo (Teste de Contato Direto)

0-24H

Teste ANOVA: um critério

- 0-24H (LOG) -

- 1 - B0-24H	- 2 - C0-24H	- 3 - L0-24H	- 4 - P0-24H
2.163	2.226	2.040	4.006
2.248	1.458	1.960	4.000
2.051	1.571	1.955	3.460
2.500	1.453	1.894	3.397
2.513	1.964	2.062	3.388
2.783	2.640	3.163	4.527
2.653	3.178	2.991	4.135
2.629	1.600	2.946	4.343
2.450	1.636	3.012	4.402
2.785	1.449	3.115	4.732

FONTES DE VARIAÇÃO	GL	SQ	QM
Tratamentos	3	24.839	8.280
Erro	36	8.735	0.243
F =	34.1228	---	---
(p) =	< 0.0001	---	---
Média (Coluna 1) =	2.4775	---	---
Média (Coluna 2) =	1.9175	---	---
Média (Coluna 3) =	2.5138	---	---
Média (Coluna 4) =	4.0390	---	---
Teste t:	Diferença	t	(p)
Médias (1 e 2) =	0.5600	2.5421	0.0154
Médias (1 e 3) =	0.0363	0.1648	ns
Médias (1 e 4) =	1.5615	7.0883	< 0.001
Médias (2 e 3) =	0.5963	2.7068	0.0103
Médias (2 e 4) =	2.1215	9.6303	< 0.001
Médias (3 e 4) =	1.5252	6.9235	< 0.001

24-48H

BxC

t - Teste: Amostras Independentes

	- 1 - B24-48H	- 2 - C24-48H
Tamanho =	10	10
Média =	3.1631	3.0060
Variância =	0.2916	0.3838
	Homocedasticidade	---
Variância =	0.3377	---
t =	0.6045	---
Graus de liberdade =	18	---
p (unilateral) =	0.2765	---
p (bilateral) =	0.5530	---
Poder (0.05) =	0.1479	---
Poder (0.01) =	0.0261	---
Diferença entre as médias =	0.1571	---
IC 95% (Dif. entre médias) =	-0.3889 a 0.7031	---
IC 99% (Dif. entre médias) =	-0.5908 a 0.9050	---

BxL

t - Teste: Amostras Independentes

	- 1 - B24-48H	- 3 - L24-48H
Tamanho =	10	10
Média =	3.1631	3.0210
Variância =	0.2916	0.5772
	Homocedasticidade	---
Variância =	0.4344	---
t =	0.4821	---
Graus de liberdade =	18	---
p (unilateral) =	0.3178	---
p (bilateral) =	0.6355	---
Poder (0.05) =	0.1205	---
Poder (0.01) =	0.0085	---
Diferença entre as médias =	0.1421	---
IC 95% (Dif. entre médias) =	-0.4772 a 0.7614	---
IC 99% (Dif. entre médias) =	-0.7062 a 0.9904	---

BxP

t - Teste: Amostras Independentes

	- 1 - B24-48H	- 4 - P24-48H
Tamanho =	10	10
Média =	3.1631	2.4386
Variância =	0.2916	0.3440
	Homocedasticidade	
Variância =	0.3178	---
t =	2.8738	---
Graus de liberdade =	18	---
p (unilateral) =	0.0050	---
p (bilateral) =	0.0101	---
Poder (0.05) =	0.8904	---
Poder (0.01) =	0.7067	---
Diferença entre as médias =	0.7245	---
IC 95% (Dif. entre médias) =	0.1948 a 1.2542	---
IC 99% (Dif. entre médias) =	-0.0011 a 1.4501	---

CxL

t - Teste: Amostras Independentes

	- 2 - C24-48H	- 3 - L24-48H
Tamanho =	10	10
Média =	3.0060	3.0210
Variância =	0.3838	0.5772
	Homocedasticidade	
Variância =	0.4805	---
t =	-0.0484	---
Graus de liberdade =	18	---
p (unilateral) =	0.4810	---
p (bilateral) =	0.9619	---
Poder (0.05) =	0.0447	---
Poder (0.01) =	0.0729	---
Diferença entre as médias =	-0.0150	---
IC 95% (Dif. entre médias) =	-0.6663 a 0.6363	---
IC 99% (Dif. entre médias) =	-0.9072 a 0.8772	---

CxP

t - Teste: Amostras Independentes

	- 2 - C24-48H	- 4 - P24-48H
Tamanho =	10	10
Média =	3.0060	2.4386
Variância =	0.3838	0.3440
	Homocedasticidade	
Variância =	0.3639	---
t =	2.1033	---
Graus de liberdade =	18	---
p (unilateral) =	0.0248	---
p (bilateral) =	0.0497	---
Poder (0.05) =	0.6766	---
Poder (0.01) =	0.4103	---
Diferença entre as médias =	0.5674	---
IC 95% (Dif. entre médias) =	0.0006 a 1.1342	---
IC 99% (Dif. entre médias) =	-0.2090 a 1.3438	---

LxP

t - Teste: Amostras Independentes

	- 3 - L24-48H	- 4 - P24-48H
Tamanho =	10	10
Média =	3.0210	2.4386
Variância =	0.5772	0.3440
	Homocedasticidade	
Variância =	0.4606	---
t =	1.9189	---
Graus de liberdade =	18	---
p (unilateral) =	0.0355	---
p (bilateral) =	0.0709	---
Poder (0.05) =	0.6079	---
Poder (0.01) =	0.3405	---
Diferença entre as médias =	0.5824	---
IC 95% (Dif. entre médias) =	-0.0553 a 1.2201	---
IC 99% (Dif. entre médias) =	-0.2911 a 1.4559	---

48-72H

- 48-72h(LOG)diferença -

	- 1 - B48-72H	- 2 - C48-72H	- 3 - L48-72H	- 4 - P48-72H
	1.417	1.949	.965	.954
	.947	1.737	1.033	1.114
	1.169	2.063	.903	1.513
	1.190	1.000	1.416	1.849
	1.207	1.319	1.185	1.395
	.970	1.299	-.481	-.481
	.865	1.481	.000	-.481
	1.014	2.385	.427	-.481
	.367	2.222	.865	-.174
	.669	2.144	1.239	.000

Teste ANOVA: um critério

FONTES DE VARIAÇÃO	GL	SQ	QM
Tratamentos	3	8.673	2.891
Erro	36	13.786	0.383
F =	7.5499	---	---
(p) =	0.0007	---	---
Média (Coluna 1) =	0.9815	---	---
Média (Coluna 2) =	1.7599	---	---
Média (Coluna 3) =	0.7552	---	---
Média (Coluna 4) =	0.5208	---	---
Teste t:	Diferença	t ⁻	(p) ⁺
Médias (1 e 2) =	0.7784	2.8126	0.0079
Médias (1 e 3) =	0.2263	0.8177	ns
Médias (1 e 4) =	0.4607	1.6647	ns
Médias (2 e 3) =	1.0047	3.6304	< 0.001
Médias (2 e 4) =	1.2391	4.4773	< 0.001
Médias (3 e 4) =	0.2344	0.8470	ns

APÊNDICE I – Resultados da análise intergrupo (teste de aderência)

- Teste de aderência- todos os dados -

	- 1 - B	- 2 - C	- 3 - L	- 4 - P	- 5 - R
1	.000	.600	.000	.000	4.840
2	.000	.000	.000	.000	4.820
3	.000	.000	.000	.000	4.720
4	.000	.000	-.480	.000	4.780
5	.000	.000	.000	.000	4.640
6	-.480	-.480	-.480	.000	4.470
7	-.480	1.750	-.170	.000	4.580
8	.000	.000	.000	.000	4.930
9	.125	-.480	.000	.000	5.100
10	.000	.000	.000	.000	4.730

Teste de Kruskal-Wallis

	Resultados	- 2 -
H =	31.1438	
Graus de liberdade =	4	
(p) Kruskal-Wallis =	0.0000	
R 1 (posto médio) =	20.2500	
R 2 (posto médio) =	22.1000	
R 3 (posto médio) =	17.1500	
R 4 (posto médio) =	22.5000	
R 5 (posto médio) =	45.5000	
Comparações Student-Newman-Keuls	Dif. Postos	p-valor
Grupos (1 e 2) =	1.8500	0.7766
Grupos (1 e 3) =	3.1000	0.6344
Grupos (1 e 4) =	2.2500	0.7300
Grupos (1 e 5) =	25.2500	0.0001
Grupos (2 e 3) =	4.9500	0.4477
Grupos (2 e 4) =	0.4000	0.9511
Grupos (2 e 5) =	23.4000	0.0003
Grupos (3 e 4) =	5.3500	0.4118
Grupos (3 e 5) =	28.3500	< 0.0001
Grupos (4 e 5) =	23.0000	0.0004

ANEXO

ANEXO 1 – Protocolo para preparação de Fluido Simulado Corpóreo (SBF) segundo Kokubo et al. (1990 apud Onoda, 2011):

1. Lavar bem a parede de uma garrafa de polietileno e de um bastão de vidro de 1NHCl, detergente neutro e água destilada deionizada. Secar bem;
2. Colocar 500mL de água destilada deionizada da garrafa de polietileno e fechá-la com tampa de vidro;
3. Com a agitação da água em um agitador magnético, dissolver totalmente os reagentes, um a um na ordem dada na tabela abaixo:

Tabela 12 – Reagente para a preparação de SBF (pH7,4/1L)

Ordem	Reagente	Quantidade
1	NaCl	7.996 g
2	NaHCO ₃	0.350 g
3	KCl	0.224 g
4	K ₂ HPO ₄ . 3H ₂ O	0.228 g
5	MgCl ₂ . 6H ₂ O	0.305 g
6	1M – HCl	40 ml
7	CaCl ₂	0.278 g
8	Na ₂ SO ₄	0.071 g
9	(CH ₂ OH) ₃ CNH ₂	6.057 g

4. Ajustar a temperatura da solução a 36,5°C em banho Maria, e ajustar o pH da solução em 7.4, agitando-a e titulando com uma solução de HCl 1N gota a gota;
5. Transferir a solução da garrafa de polietileno para um frasco volumétrico de vidro. Adicione água usada para lavar a garrafa de polietileno ao frasco de solução;
6. Ajustar o volume total da solução a um litro pela adição de água destilada deionizada, e agite o frasco a 20°C;

7. Transferir a solução do frasco à garrafa de polietileno e estoque a garrafa no refrigerador a 5-10°C (se houver precipitado, não use essa solução nem seu contêiner novamente).

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

Cláudia Auxiliadora Pinto

Taubaté, Abril de 2013.