

Universidade do Grande Rio - UNIGRANRIO
Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia - INMETRO
Universidade Estadual do Rio de Janeiro - UERJ/ZO

**Programa Interinstitucional de Pós-graduação em Biomedicina Translacional
BIOTRANS**

MARJORIE DARDIS MURUCCI

**CIMENTO ENDODÔNTICO AGREGADO TRIÓXIDO MINERAL (MTA)
MODIFICADO COM NANOPARTÍCULAS DE PRATA: SÍNTESE,
CARACTERIZAÇÃO, CAPACIDADE ANTIMICROBINA E CITOTOXICIDADE**

Duque de Caxias
2024

MARJORIE DARDIS MURUCCI

**CIMENTO ENDODÔNTICO AGREGADO TRIÓXIDO MINERAL (MTA)
MODIFICADO COM NANOPARTÍCULAS DE PRATA: SÍNTESE,
CARACTERIZAÇÃO, CAPACIDADE ANTIMICROBINA E CITOTOXICIDADE**

Tese apresentada ao Programa Interinstitucional de Pós-graduação em Biomedicina Translacional, da UNIGRANRIO, INMETRO e UERJ, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Ciências Biomédicas.

Orientadores: PhD Leonardo da Cunha Boldrini Pereira e PhD Victor Talarico Leal Vieira.

Duque de Caxias
2024

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UNIGRANRIO – NÚCLEO DE COORDENAÇÃO DE BIBLIOTECAS

M984i Murucci, Marjorie Dardis.

Cimento endodôntico Agregado Trióxido Mineral (MTA) modificado com nanopartículas de prata: síntese, caracterização, capacidade antimicrobiana e citotoxicidade / Marjorie Dardis Murucci. – Duque de Caxias, 2024.
79 f. il.

Tese (doutorado) UNIGRANRIO, Escola de Ciência da Saúde, Programa de Pós Graduação em Biomedicina Translacional, Rio de Janeiro, 2024

Orientadores: Dr. Leonardo da Cunha Boldrini Pereira.
Dr. Victor Talarico Leal Vieira.

1.Nanopartícula de prata. 2. Cimento endodôntico. 3. Efeito antimicrobiano. 4. Citotoxicidade. I. Pereira, Leonardo da Cunha Boldrini. II. Vieira, Victor Talarico Leal. III. UNIGRANRIO. IV. Título.

CDD – 610.28

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho ao único que é digno de toda honra e glória: **Deus**.

Ó profundidade das riquezas, tanto da sabedoria, como da ciência de Deus. Quão insondáveis são os seus juízos, e quão inescrutáveis os seus caminhos.

Por que quem compreendeu a mente do Senhor? Ou quem foi seu conselheiro?

Ou quem lhe deu primeiro a ele, para que lhe seja recompensado?

Porque dele e por ele, e para ele, são todas as coisas; glória, pois, a ele eternamente.

(Romanos 11: 33-36)

AGRADECIMENTOS

Ao meu Deus e Pai, sou profundamente grata por me permitir vivenciar esta trajetória, pelo amadurecimento que ela me proporcionou e pelas pessoas queridas que ele enviou para caminhar ao meu lado. Sou grata pelo sustento e pela provisão que nunca me faltaram, e pela paz e refrigério que encontro nEle.

Ao meu marido, Gabriel, sou grata pelo companheirismo e apoio nesta trajetória. A minha mãe, Nancy, e meu pai, Buttu, por acreditarem no meu potencial e me incentivarem a estudar e buscar novos desafios. Agradeço pelos dias em que pude contar com sua ajuda e cuidado. Às minhas filhas, Laura e Olivia, pela compreensão em minha ausência, pela ajuda nos dias mais exigentes e pelo carinho que sempre tiveram comigo.

Aos meus orientadores, profs. Leonardo e Victor, pela confiança no meu trabalho, pela disponibilidade em me orientar e aconselhar. Especialmente, ao prof. Leonardo por ter compreendido as etapas da minha maternidade e minha ausência. Além também da paciência, tempo e espera para que eu desenvolvesse as habilidades e competências que tenho hoje.

Ao Biotrans, pela oportunidade de desenvolver este trabalho. Ao Inmetro pela infraestrutura. A CAPES, Faperj e Rede NanoSaúde pelos recursos financeiros. E ao prof. Granjeiro, pela compra de material.

Agradeço especialmente à Barbara por ter sido minha dupla, minha parceira e companheira em todas as etapas do desenvolvimento desse trabalho. Pela amizade e atenção nos mínimos detalhes. À Cecilia, agradeço por seu auxílio na execução de experimentos, inclusive pela companhia em dias além horário de expediente. Barbara e Ciça, vocês trouxeram alegria e leveza aos dias de trabalho e serão sempre amigas queridas.

À Bia Kopke também agradeço pela amizade, pelo auxílio em experimentos e por termos estado unidas em momentos desafiadores. Aos meus colegas de laboratório, Mônica, Bia Lima, Natália, Diego, Wanderson, Ivone, Rebeca, Lorena Maduro,

Marceli, Larissa e Luths pelo carinho, incentivo, auxílio em experimentos e discussão de ideias.

À profa. Alane, Verônica e Maria Cristina, agradeço não somente pela ajuda e parceria nos experimentos microbiológicos, mas por terem me recebido no Bioinovar de braços abertos.

Agradeço à Vânia e ao dr. Thiago pela disponibilidade em me auxiliar no planejamento e execução dos experimentos no ICP-MS e pela receptividade no Labin.

Agradeço a dra Paola pelo auxílio no desenho experimental e discussão dos resultados dos experimentos de citotoxicidade. Agradeço à Ana Carolina pelo treinamento em esferoides.

Agradeço aos professores da banca pelas contribuições valiosas.

Também gostaria de expressar minha gratidão a todos que contribuíram nas fases anteriores ao doutorado, pois cada degrau subido foi fundamental para alcançar esta conquista. Em especial, sou grata a Jacque, que não apenas por me abrir as portas para o mundo da pesquisa, mas também se tornou uma grande amiga. Grata ao professor Leonardo por me aceitar como aluna desde a iniciação científica e ao professor Victor por me orientar desde o mestrado. E à Pri Gion que muito me auxiliou nos ensaios durante o mestrado.

Finalmente, ao relembrar minha trajetória, afirmo o quanto sou abençoada e privilegiada por ter tido o companheirismo e auxílio de cada um de vocês. Muito obrigada!

RESUMO

Bactérias remanescentes do canal radicular podem gerar necessidade de retratamento. Portanto, a ação antimicrobiana do cimento endodôntico é desejável para o sucesso do tratamento endodôntico. Nanopartículas de prata (AgNPs) são conhecidas por sua ação antimicrobiana. Resultados da sua adição em cimentos endodônticos relatados na literatura são conflitantes. Além disso, não existem informações suficientes sobre o seu potencial citotóxico aos tecidos adjacentes. Diante disso, o objetivo desse trabalho foi sintetizar, caracterizar AgNPs e testar seu efeito antimicrobiano em quatro cepas remanescentes do canal – *E. faecalis*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *E. coli*, para posteriormente adicionar AgNPs ao cimento endodôntico MTA e avaliar seu potencial citotóxico *in vitro*. Seis lotes foram sintetizados por rota química em aquecimento e resfriamento, alvejando diâmetro médio 30 ± 10 nm. Após a síntese foram centrifugados, tendo seu sobrenadante separado e *pellet* ressuspendido, obtendo então, amostra original, sobrenadante e precipitado de cada lote (18 amostras). Com base em critérios de exclusão (coloração, turbidez e UV- visível) e caracterização (MET, DRX, PZ, EDS acoplado ao MEV), quatro lotes foram previamente aprovados, tendo sua atividade antimicrobiana testada pela MIC e MBC, em 24h, nas concentrações de diluição seriada de 250 a 1,95 µg/mL. As AgNPs sintetizadas por resfriamento apresentaram maior atividade bactericida. A amostra S2 PVA apresentou melhores valores de MIC (32,25 ou 125 µg/mL a depender da bactéria), portanto, foi a escolhida para adição no cimento MTA. Após um ensaio preliminar de citotoxicidade por MTT (125 a 750 µg/mL), a concentração de incorporação escolhida foi 500 µg. Então, corpos de prova foram preparados substituindo a água destilada pela solução de AgNPs. A citotoxicidade dos cimentos foi determinada pelos ensaios de MTT, LDH e ROS, baseando-se na norma ISO 10993-5 e 12, na qual quatro concentrações do extrato (25, 50, 75 e 100%) foram expostas às células FGH e MG-63 por 24h. Os resultados demonstraram morte celular com necrose e presença de estresse oxidativo. Ensaio futuros são necessários para melhor determinação do efeito antimicrobiano dos cimentos modificados, bem como o perfil de liberação de Ag⁺ e estabilidade físico-química do cimento proposto.

Palavras-chave: nanopartícula de prata; efeito antimicrobiano; cimento endodôntico; citotoxicidade

ABSTRACT

Bacteria remaining in root canal may require retreatment. Therefore, antimicrobial action of endodontic sealers is desirable for successful endodontic treatment. Silver nanoparticles (AgNPs) are known for their antimicrobial action. Results of their addition to endodontic sealers reported in the literature are conflicting. Furthermore, there is insufficient information on their cytotoxic potential to adjacent tissues. Therefore, the objective of this study was to synthesize, characterize AgNPs and test their antimicrobial effect on four strains of root canal remnants – *E. faecalis*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* and *E. coli*, to subsequently add AgNPs to MTA endodontic sealer and evaluate their cytotoxic potential in vitro. Six batches were synthesized by chemical route under heating and cooling, aiming for a mean diameter of 30 ± 10 nm. After synthesis, they were centrifuged, their supernatant separated and the pellet resuspended, thus obtaining the original sample, supernatant and precipitate of each batch (18 samples). Based on exclusion criteria (color, turbidity and UV-visible) and characterization (TEM, XRD, PZ, EDS coupled to SEM), four batches were previously approved, having their antimicrobial activity tested by MIC and MBC, in 24h, at serial dilution concentrations of 250 to 1.95 $\mu\text{g/mL}$. The AgNPs synthesized by cooling showed greater bactericidal activity. Sample S2 PVA showed better MIC values (32.25 or 125 $\mu\text{g/mL}$ depending on the bacteria), therefore, it was chosen for addition to the MTA cement. After a preliminary cytotoxicity test by MTT (125 to 750 $\mu\text{g/mL}$), the chosen incorporation concentration was 500 μg . Then, specimens were prepared by replacing distilled water with AgNPs solution. The cytotoxicity of the cements was determined by MTT, LDH and ROS tests, based on ISO 10993-5 and 12 standards, in which four concentrations of the extract (25, 50, 75 and 100%) were exposed to FGH and MG-63 cells for 24h. The results demonstrated cell death with necrosis and presence of oxidative stress. Future tests are needed to better determine the antimicrobial effect of the modified cements, as well as the Ag^+ release profile and physicochemical stability of the proposed cement.

Keywords: silver nanoparticle; antimicrobial effect; endodontic sealer; cytotoxicity

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
1.1 Contextualização	15
1.2 Agregado Trióxido Mineral (MTA)	17
1.3 Microbiologia das infecções endodônticas	20
1.3 Efeito antimicrobiano de nanopartículas de prata (AgNPs)	21
1.4 Síntese química e propriedade plasmônica de AgNPs	22
2. JUSTIFICATIVA	24
3. OBJETIVOS	25
3.1 Objetivo Geral	25
3.2 Objetivos Específicos	25
4. MATERIAIS E MÉTODOS	26
4.1 Fluxograma de ensaios	26
4.2 Materiais	26
4.3 Síntese de nanopartículas de prata	27
4.3.1 Lavagem de vidrarias	27
4.3.2 Síntese por rota química	27
4.4 Caracterização das nanopartículas de prata	30
4.4.1 Espectroscopia de Absorção Ultravioleta-Visível (UV-visível)	30
4.4.2 Espalhamento de luz dinâmico (DLS)	31
4.4.3 Potencial Zeta (PZ)	31
4.4.4 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)	31
4.4.5 Microscopia eletrônica de varredura (MEV) e energia dispersiva de raios X (EDS)	31
4.4.6 Determinação da concentração das amostras de AgNPs	32
4.5 Determinação do potencial antimicrobiano	32
4.5.1 Concentração Inibitória Mínima (MIC), IC ₅₀ e Concentração Bactericida Mínima (MBC)	32
4.6 Avaliação da citotoxicidade	34
4.6.1 Cultivo Celular	34
4.6.2 Ensaio de viabilidade celular por MTT frente às concentrações candidatas à incorporação	35
4.6.3 Preparo dos corpos de prova	36
4.6.4 Preparo dos extratos	37
4.6.5 Plaqueamento e exposição das células aos extratos	38
4.6.6 Ensaio de viabilidade celular por MTT por contato indireto	39

4.6.7 Ensaio de atividade de lactato desidrogenase (LDH).....	39
4.6.8 Ensaio de quantificação de espécie reativas de oxigênio (ROS).....	40
4.7 Análise estatística	40
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
5.1 Síntese química de AgNPs e escolha das amostras para ensaios	41
5.2 Caracterização das amostras aprovadas.....	53
5.7 Determinação do potencial antimicrobiano	57
5.9 Avaliação do potencial citotóxico dos cimentos modificados com AgNPs por MTT, LDH e ROS	64
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	70

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Visão geral do trabalho dividida em quatro macro etapas: 1) síntese e caracterização, 2) ensaio antimicrobiano e 3) ensaios de citotoxicidade.	13
Figura 2 - Etapas de síntese e caracterização de AgNPs.	21
Figura 3 - Esquema do ensaio de MTT para determinação da concentração não citotóxica para incorporação nos cimentos	27
Figura 4 - Preparo dos corpos de prova.	28
Figura 5 - Esquema do preparo dos extratos seguindo a ISO 10993-12:2012.	31
Figura 6 - Lotes de síntese de AgNPs, resultando em diversas amostras.	33
Figura 7 - Primeiro lote sintetizado pelo protocolo em aquecimento.	34
Figura 8 - Lotes S1 e S2 Aquecimento sintetizados.	35
Figura 9 - Etapas inicial e final da síntese de AgNP em resfriamento.	36
Figura 10 - O espectro de UV-Visível das amostras de AgNPs.	37
Figura 11 - Distribuição populacional, tamanho hidrodinâmico médio (dm) e índice de polidispersão (PDI) das amostras AgNPs em água ultrapura.	39
Figura 12. Diâmetro hidrodinâmico médio (dm) e PDI das amostras de AgNPs em água ao longo (0h, 7, 30 e 60 dias).	40
Figura 13 - Tamanho e PDI de AgNPs em meios de cultivo DMEM low glucose e high glucose suplementados com 10% SFB.	41
Figura 14 - Potencial Zeta (PZ) das AgNPs em meios de cultivo DMEM low (DL) e high (DH).	42
Figura 15 - Tamanho e morfologia de AgNPs por Microscopia Eletrônica de Transmissão.	42
Figura 16 - Composição elementar por Energia Dispersiva de Raios X das amostras de AgNPs.	45
Figura 17 - Viabilidade celular em ensaio de redução de MTT.	46
Figura 19 - Citotoxicidade celular em ensaio de liberação de LDH.	47
Figura 20 - Ensaio de quantificação de ROS intracelulares.	48

LISTA DE TABELA

Tabela 1. Valores do diâmetro médio e PDI das amostras sintetizadas.	46
Tabela 2. Valores de MIC e IC ₅₀ das AgNPs para diferentes cepas bacterianas	46

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AgNPs	Nanopartículas de Prata
°C	Celsius
µg	Micrograma
µL	Microlitro
µm	Micrômetro
Ag ⁺	Íons de prata
AgNO ₃	Nitrato de Prata
ADA	<i>American Dental Association</i>
ANSI	<i>American National Standards Institute</i>
Ca ²⁺	Íons de cálcio
CO ₂	Gás Carbônico
cm	Centímetros
d	Dia
dm	Diâmetro médio
DL	DMEM low glucose
DH	DMEM high glucose
DLS	Espalhamento de Luz Dinâmico
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DO	Densidade Óptica
DRX	Difração de Raios-X
EDS	Espectroscopia de Energia Dispersiva de Raios-X
h	Hora
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
ISO	Organização Internacional de Normalização
LDH	Lactato Desidrogenase

m	Metro
M	Molar
MET	Microscopia Eletrônica de Transmissão
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
mg	Miligrama
MIC	Concentração Inibitória Mínima
MBC	Concentração Bactericida Mínima
min	Minutos
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mol	Molar
MTA	Mineral Trióxido Agregado
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3,4-diphenyl)-4-methyltetrazolium bromide
NaBH ₄	Borohidreto de Sódio
nm	Nanômetro
O ₂	Gás Oxigênio
PBS	Solução Salina Tamponada com Fosfato
PDI	Índice de Polidispersão
PEAD	Polietileno de alta densidade
PEG	Polietilenoglicol
pH	Potencial Hidrogeniônico
PVA	Álcool Polivinílico
PZ	Potencial Zeta
ROS	Espécies Reativas de Oxigênio
SFB	Soro Fetal Bovino

1. INTRODUÇÃO

1.1 Contextualização

A estrutura de um dente saudável é dividida em coroa e raiz. A coroa é formada por três tecidos diferentes: o esmalte (camada mais externa), a dentina (camada intermediária) e a polpa coronária (tecido conjuntivo interno). A raiz possui uma organização semelhante, mas sua camada mais externa é o cimento.

Os tecidos duros do dente incluem o esmalte, a dentina e o cimento. O esmalte é um tecido altamente mineralizado, composto predominantemente por hidroxiapatita. O cimento, por sua vez, é o tecido periodontal mineralizado, similar à matriz óssea. Adentrando o esmalte e cimento, encontra-se a dentina, que é uma estrutura tubular, caracterizada por túbulos dentinários que se estendem até a polpa dentária.

Já a polpa dentária é um tecido mole, constituída de tecido conjuntivo, vasos sanguíneos e nervos, localizando-se na parte central do dente, no interior do canal radicular. A dentina e a polpa estão intimamente ligadas, formando o complexo dentino-pulpar. O canal radicular atua como o elo de comunicação entre a coroa e a raiz.

O periodonto, por sua vez, é o constituído por tecidos que circundam e suportam os dentes, fixando-os ao osso alveolar e mantendo a integridade da cavidade oral. Sendo a gengiva e o ligamento periodontal, tecidos conjuntivos moles, vascularizados e celulares. (Katchburian e Arana, 2017; Pitts *et al.*, 2017).

A maioria das injúrias e alterações patológicas que acometem a polpa e tecidos perirradiculares são de natureza inflamatória e de etiologia infecciosa. A cárie é o principal estímulo que desencadeia a inflamação do tecido pulpar. Essa doença é causada por biofilme bacteriano que promove a destruição do esmalte e dentina até a exposição da polpa, intensificando a resposta inflamatória durante a sua progressão (Lopes & Siqueira Jr, 2020).

A presença de sintomas leves e responsivos a estímulos, como calor, frio e à mastigação, indica um quadro de pulpite reversível. Em contrapartida, sintomas como dor espontânea e persistente caracteriza um quadro de pulpite irreversível, associado ao avanço da lesão cariosa. Quando as bactérias conseguem colonizar a polpa, ocorre a necrose pulpar, e, se o conteúdo necrótico bacteriano extravasa através do forame apical, forma-se um abscesso perirradicular (Taha e Khazali, 2017, Berman et

al., 2021).

O tratamento da pulpíte depende do diagnóstico da condição pulpar, podendo ser indicado um tratamento conservador da polpa ou o tratamento endodôntico. De maneira geral, eles consistem na remoção do tecido cariado, utilização de biomateriais reparadores e/ou obturadores para formação barreira física contra migração coronal-apical de bactérias e subprodutos da cavidade oral (Lopes e Siqueira Jr, 2020).

Os tratamentos conservadores são intervenções minimamente invasivas que visam à manutenção da vitalidade pulpar, o estímulo da produção de dentina reacional, selamento do complexo dentino-pulpar e preservação máxima da estrutura dental sadia (Guimarães *et al.*, 2017, Rangel *et al.*, 2023). Durante o tratamento, após a remoção da lesão cariosa, havendo exposição da polpa, realiza-se o capeamento pulpar direto. Já quando a polpa não é exposta, realiza-se o capeamento indireto. Em casos de pulpíte irreversível, a pulpotomia (curetagem da polpa coronária) ou a pulpectomia (coronária e radicular) podem ser uma das opções de tratamento (Gonçalves, 2022).

Em casos de necrose pulpar devido ao avanço da infecção ou falha no tratamento conservador, o tratamento endodôntico torna-se necessário (Taha e Khazali, 2017). Este tratamento consiste no preparo químico-mecânico do canal radicular, visando remoção completa da polpa infectada, modelamento, desinfecção e, por fim, selamento tridimensional do canal radicular com materiais obturadores, como cones de guta percha e cimento endodôntico. O sucesso do tratamento endodôntico depende da eficiência do preparo mecânico, desinfecção e vedamento completo do canal radicular (Schilder, 1974).

Falhas no tratamento endodôntico, do ponto de vista mecânico, estão associadas a erros e iatrogenias durante a instrumentação do canal, como alargamento excessivo, desvios de trajeto, perfurações (de furca, radicular e apical) e fratura de instrumentos. Algumas situações não iatrogênicas também apresentam alto grau de dificuldade para a resolução clínica, como reabsorções, variações anatômicas e presença de calcificações na câmara pulpar (Clauder e Shin; 2006; Torabinejad, 2018).

No entanto, a principal causa do insucesso do tratamento endodôntico corresponde à desinfecção ineficaz do canal radicular, permitindo a presença de bactérias remanescentes e seus metabólitos, além da falha no sistema de vedação, possibilitando infiltração bacteriana (Brito-Júnior *et al.*, 2009). A persistência da

infecção e, conseqüentemente, a persistência da dor, torna necessário o retratamento do canal radicular (Tourè *et al.*, 2011). Em situações de prognóstico desfavorável para desinfecção do canal, bem como em casos de perfurações e fraturas que ocorrem no terço apical, a cirurgia parendodôntica é indicada como uma alternativa ao tratamento (Almeida-Filho *et al.*, 2011).

Em todas as opções de tratamento apresentadas, é essencial o uso de um biomaterial reparador e/ou obturador que garanta um adequado selamento e vedamento das condições clínicas a serem tratadas. Esses materiais devem ter boa adesão à estrutura dentária, proporcionar uma vedação eficaz, ser insolúveis aos tecidos orgânicos, manter estabilidade dimensional, não ser reabsorvíveis, ser radiopacos e não citotóxicos (Barbosa *et al.*, 2021). Idealmente, também devem eliminar as bactérias remanescentes dos canais radiculares, serem capazes de otimizar a regeneração do ligamento periodontal, promover a apicificação e reparar perfuração (Lima *et al.*, 2017).

Diferentes cimentos endodônticos reparadores e obturadores foram desenvolvidos visando atender às características citadas, como cimentos à base de: óxido de zinco e eugenol, hidróxido de cálcio, resinas epóxi, resina de salicilato, biocerâmicos e o Agregado de Trióxido Mineral (MTA).

Devido suas propriedades físico-químicas e biológicas, o MTA mostrou-se superior a outros materiais em termos de vedação, estabilidade dimensional, tolerância à umidade, efeito antimicrobiano e regeneração de tecidos perirradiculares (Song *et al.*, 2006, Cervino *et al.*, 2020.). Por isso, tem sido utilizado em reparo de perfurações, como barreira apical em tratamento de apicificação, agente de proteção em polpas vitais, pulpotomia, reparação de reabsorção e como cimento endodôntico (Torabinejad e Chivian, 1999; Rodrigues *et al.*, 2023). E é considerado cimento reparador e obturador, além de ser classificado como cimento hidráulico e biocerâmico (Torabinejad *et al.*, 1993 e Sousa *et al.*, 2020).

1.2 Agregado Trióxido Mineral (MTA)

O MTA foi introduzido na endodontia para o reparo de perfurações e para obturação apical e é considerado o melhor dentre os materiais retrobturadores. Este cimento foi desenvolvido pelo professor Mahmoud Torabinejad da Universidade de

Loma Linda, nos EUA, em 1993, a partir do cimento Portland, um material usualmente conhecido na construção civil, como componente básico de concreto, argamassa e graute (Lee *et al.*, 1993). Embora semelhantes, o MTA passa por um processo de purificação removendo a maioria dos metais tóxicos (Islam *et al.*, 2006). Ele é uma mistura de partículas hidrofílicas em pó, e entre os seus principais constituintes estão o silicato tricálcico, óxido de tricálcio e o óxido de silicato (Song *et al.*, 2006, Lavôr *et al.*, 2017).

A primeira apresentação comercial disponível no mercado foi o ProRoot MTA (Dentsply – Tulsa Dental Products, Oklahoma, USA), aprovado em 1998 pelo FDA e, no Brasil, a empresa Angelus (Angelus Soluções Odontológicas, Paraná, Brasil) lançou o MTA-Angelus. Ele pode ser encontrado basicamente em duas apresentações: o MTA branco, destacando-se o tricálcio fosfato e óxido de bismuto como os diferenciais na sua composição, e o MTA cinza, destacando-se ferro e alumínio na sua composição que conferem sua coloração. (Sánchez, 2019),

O MTA em pó é misturado com água estéril fornecido pelo fabricante em uma proporção de pó/líquido de 3:1. O processo de presa é descrito como uma reação de hidratação do tricálcio silicato ($3\text{CaO} \cdot \text{SiO}_2$) e silicato dicálcico ($2\text{CaO} \cdot \text{SiO}_2$) - considerado responsável pelo desenvolvimento de resistência do material (Barbosa *et al.*, 2021). O tempo de trabalho é de aproximadamente 5 minutos e o tempo de presa de 3 a 4 horas. O pH no momento da espatulação é de 10,2, aumentando para aproximadamente 12,5 até a presa (Román, 2021). A expansão do material após a presa é responsável por conferir bom selamento hermético do local da lesão (Angelus, 2022).

Uma vantagem prática do MTA é sua capacidade de vedação mesmo em ambientes úmidos onipresentes na endodontia. Quando em contato com a umidade, seu principal componente, o óxido de cálcio, se converte em hidróxido de cálcio e se dissocia liberando íons cálcio e hidroxila. Em seguida, a proporção de silicato de cálcio decai originando precipitado de cálcio, o que eleva o pH após a hidratação (Hoppe *et al.*, 2011; Barbosa *et al.*, 2021). O processo de reparação do MTA tem relação com liberação de íons cálcio, que estimula formação de hidroxiapatita e com acúmulo de hidroxila, elevando o pH, o que estimula fosfatase alcalina, induzindo a formação de tecido mineralizado ao redor do cimento como o tecido ósseo, cementário e dentinário (Román, 2021). E ainda, o selamento biológico feito pela proliferação de células diretamente sobre o cimento durante o processo de reparação (Angelus, 2022).

O contato com os tecidos circundantes do ligamento periodontal, torna a biocompatibilidade uma característica muito importante. Diversos estudos investigaram citotoxicidade, genotoxicidade e potencial inflamatório do MTA utilizando diferentes metodologias, como ensaios *in vitro*, implantação subcutânea e mandibular em animais, estudos clínicos em humanos, e todos concluíram que o MTA é biocompatível (Lavôr *et al.*, 2017; Román, 2021; Barbosa *et al.*, 2021; Rodrigues *et al.*, 2023).

O efeito antimicrobiano proporcionado pelo MTA está relacionando ao seu elevado pH que torna o ambiente básico e inóspito para a proliferação bacteriana. O pH alto danifica as membranas das bactérias e os seus DNAs, assim como promove a desnaturação dos seus conteúdos proteicos (Angelus, 2022). Entretanto, após o período de presa, o cimento se torna quase inerte (Ceci *et al.*, 2015) e os microrganismos remanescentes e resistentes tendem a se proliferar novamente (da Silva *et al.*, 2011).

Alterações na composição do MTA têm sido propostas com o objetivo de melhorar suas propriedades antimicrobianas. A substituição da água utilizada na manipulação do MTA por solução de clorexidina apresentou efeito antimicrobiano aumentado, porém, a biocompatibilidade e resistência à compressão do MTA foi diminuída (Stowe *et al.*, 2004; Sumer *et al.*, 2006; Holt *et al.*, 2007). A adição de iodofórmio não foi eficiente (Saatchi *et al.*, 2012). E a incorporação de nanopartículas de óxido de zinco e zircônio e os antibióticos tetraciclina e clindamicina resultou no efeito negativo nas propriedades físico-químicas do cimento (Nazam, 2013; Guerreiro-Tanomaru *et al.*, 2015). O MTA misturado com nanopartículas lipofílicas de bismuto apresentou efeito contra três cepas, em 24h (Hernández-Delgadillo *et al.*, 2017). Outro estudo avaliou a adição de moléculas liberadoras de óxido nítrico (NO) contra bactérias como *Enterococcus faecalis*, mas o efeito se manteve somente até a presa do cimento (Shin *et al.*, 2021). Já a incorporação de nanopartículas de prata (AgNPs) na mistura do cimento potencializou o efeito antimicrobiano do MTA contra três microrganismos, avaliado pelo método de difusão em ágar (Samiei *et al.*, 2013). Demonstrando que a modificação do cimento MTA com AgNPs é uma proposta promissora, que necessita de avaliação por métodos mais eficazes, além de avaliação da citotoxicidade e propriedades físico-químicas.

1.3 Microbiologia das infecções endodônticas

Apesar da cavidade oral abrigar uma complexa microbiota, o tecido pulpar normalmente é protegido da infecção pela presença dos tecidos mineralizados coronários (esmalte e dentina) e radiculares (dentina e cimento). Diante do comprometimento dessas barreiras, cria-se uma via de acesso para microrganismos e seus subprodutos adentrarem a cavidade pulpar.

As infecções endodônticas são de natureza polimicrobiana, com predomínio de bactérias anaeróbias restritas. A composição da microbiota varia entre indivíduos, entre os tipos de infecção, de acordo com o tempo, quadro clínico e localização geográfica (Siqueira e Roças, 2008).

De acordo com dinâmica da infecção endodôntica, ela pode ser classificada como infecção primária ou secundária. A primária representa a infecção inicial, decorrente da colonização do canal radicular após a necrose do tecido pulpar. A infecção secundária é caracterizada por microrganismos que são introduzidos no canal durante o tratamento endodôntico. Ainda é possível ocorrer infecções persistentes que são causadas por microrganismos remanescentes de infecções primárias ou secundárias, que resistiram aos procedimentos químico-mecânicos intracanaís de desinfecção (Siquera Jr. *et al.*, 2011).

A microbiota envolvida nestes tipos de infecção é diferente podendo variar também de acordo com o tempo da infecção (Siqueira Jr. e Roças 2009). Nas infecções endodônticas primárias predominam as espécies anaeróbias facultativas, como *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Lactobacillus* e microrganismos filamentosos (Siqueira Jr, 2002). Nas infecções secundárias predominam as espécies *Pseudomonas aeruginosa*, *Escheria coli* e *Stapylococcus aureus*. Já a infecção persistente normalmente é composta por uma única espécie, sendo mais comum bactérias anaeróbias gram-positivas, como *Streptococcus sp.*, *Parvimona micra*, *Actinomyces spp.*, *Propionibacterium spp.*, *Pseudoramibacter alactolyticus*, *Lactobacilos sp.*, *Olsenella uli*, *Enterococcus faecalis* e infecção fúngica causada por *Candida albicans*. Completando, a microbiota de dentes com insucesso do tratamento endodôntico é composta predominantemente de bactérias gram-positivas anaeróbias facultativas (Tavares *et al.*, 2011; Rôças & Siqueira, 2012).

Diversos estudos têm descrito o *E. faecalis* como importante agente associado aos casos de infecção persistente ou secundária, chegando a uma prevalência de

90% dos casos. Isso se dá pela sua excelente capacidade de adaptação a condições adversas; a capacidade de crescimento na forma de biofilme ou colônia única; a capacidade de penetrar nos túbulos dentinários e de resistir ao efeito do hidróxido de cálcio. Além disso, o *E. faecalis* também apresenta a capacidade de se manter em um estado viável mas não cultivável, que é um mecanismo de adaptação às condições adversas do microambiente, como pouca concentração de nutrientes, alta salinidade e extremo pH, no qual o micro-organismo perde a capacidade de crescimento em cultura, porém mantém sua patogenicidade e viabilidade de voltar a se dividir no momento que o microambiente se tornar novamente favorável (Siqueira e Rôças, 2008; Lacerda *et al.*, 2016; Nascimento *et al.*, 2023).

1.3 Efeito antimicrobiano de nanopartículas de prata (AgNPs)

A prata é conhecida por sua atividade antibacteriana desde a antiguidade e por isto, antes da descoberta da penicilina, em 1928, a prata coloidal era utilizada na profilaxia de infecções e no tratamento de doenças, infecções e queimaduras (Neves, 2013; Lopes, 2017).

Ao contrário do que acontece com antibióticos convencionais que possuem alvo de ação específico, a prata ataca microrganismos em diferentes alvos, sendo uma explicação plausível para dificuldade da criação de resistência contra ela, pois seria impossível que bactérias desenvolvessem uma série de mutações, simultaneamente, para se protegerem (Misirli *et al.*, 2020).

As nanopartículas de prata (AgNPs) agem por diferentes mecanismos na estrutura e moléculas da célula bacteriana, levando a sua morte. As nanopartículas de prata contêm de 20 a 15.000 átomos de prata e possuem dimensão entre 1 a 100 nm. Devido a uma grande relação superfície-volume, atração eletrostática e afinidade com proteínas de enxofre as AgNPs permitem o aumento da superfície de contato entre íons de prata e a parede e a membrana celular bacteriana (Yin *et al.*, 2020). Por isso, o seu principal mecanismo de ação é formação de poros na parede celular e na membrana externa bacteriana, alterando a permeabilidade celular, provocando também a liberação de lipopolissacarídeo (LPS) e proteínas de membrana, fator fundamental para o efeito bactericida nas AgNPs (Sondi e Salopek-Sondi, 2004, Misirli *et al.*, 2020).

As AgNPs também são capazes de destruir o biofilme bacteriano, pois sua

interação eletrostática com a camada de fosfolípidos da membrana plasmática, permite sua travessia, internalizando-se no interior da célula. Uma vez que íons de prata livres estão no interior da célula, as enzimas respiratórias podem ser desativadas, gerando espécies reativas de oxigênio, mas interrompendo a produção de trifosfato de adenosina. As espécies reativas de oxigênio podem ser um agente principal na provocação da ruptura da membrana celular e modificação do ácido desoxirribonucleico (DNA). Como o enxofre e o fósforo são componentes importantes do DNA, a interação dos íons de prata com o enxofre e o fósforo do DNA pode causar problemas na replicação do DNA, na reprodução celular ou até mesmo resultar na terminação dos microrganismos. Além disso, os íons de prata podem inibir a síntese de proteínas ao desnaturar os ribossomos no citoplasma (Panácek *et al.*, 2006; Durán *et al.*, 2016; Misirli *et al.*, 2020).

O tamanho e morfologia das AgNPs podem influenciar diretamente na sua atividade microbiológica e, assim como, no maior ou menor risco de toxicidade. Diferentes condições de síntese determinam fatores como tamanho, morfologia, estabilidade, dentre outros aspectos (Lee e Jun, 2020; Almatroudi, 2020).

1.4 Síntese química e propriedade plasmônica de AgNPs

As AgNPs podem ser preparadas a partir de diversas rotas sintéticas. As propriedades ópticas, elétricas e magnéticas das nanopartículas dependem diretamente da forma, tamanho e composição (Lee e Jun, 2019).

A síntese química é o método mais comum para produzir AgNPs. Consiste na redução química de sais em meio aquoso (síntese coloidal) e, de modo geral, precisa de quatro componentes: meio, precursor, agente redutor e estabilizante (Ottoni *et al.*, 2018). E ocorre em três fases sequenciais: redução do íon prata ao estado metálico, nucleação e crescimento (Melo *et al.*, 2012; Agnihotri *et al.*, 2014).

Assim, o agente precursor é o sal do metal, o nitrato de prata (AgNO_3), responsável por fornecer a prata. O agente redutor, normalmente o citrato de sódio e/ou borohidreto (NaBH_4) é um composto químico que fornece elétrons para reduzir o íon, transformando-o na espécie metálica. O agente estabilizante ou de revestimento é a molécula que recobre a superfície das nanopartículas, mantendo-as afastadas e dispersas no meio, promovendo uma suspensão coloidal estável (Abbasi *et al.*, 2016). Nanopartículas são termodinamicamente instáveis. Uma vez que possuem grande

área superficial por volume, elas tendem a agregar-se para minimizar a energia total ou interfacial do sistema. Forças repulsivas podem ser alcançadas pela estabilização estérica ou eletrostática (Garcia, 2011).

A estabilização estérica ocorre pela adsorção de um polímero não carregado ou surfactantes não iônicos sobre a superfície das AgNPs, o que impede a agregação por meio de repulsão estérica. Os agentes estabilizantes poliméricos mais usais são: o PVP (polivinilpirrolidona), o PVA (álcool polivinílico) e o PAA (ácido poliacrílico) (Lee e Jun, 2020; Almatroudi, 2020). Já a estabilização eletrostática é geralmente obtida por meio de espécies aniônicas, como o citrato, que interage com as AgNPs para conferir uma carga negativa na superfície de AgNPs (Lee e Jun, 2020).

Um aspecto interessante das AgNPs é o comportamento óptico observado em decorrência das alterações do tamanho, distribuição populacional, morfologia (esferas, bastões, cubos ou triângulos), dispersão e estabilidade, levando a diferentes tonalidades da suspensão coloidal. Esse fenômeno é conhecido como ressonância plasmônica de superfície, que é a excitação coletiva de elétrons de superfície que foram excitados por radiação eletromagnética (Sosa *et al.*, 2003; Berni Neto, 2010).

Geralmente a coloração amarela indica AgNPs esféricas entre 20 a 40 nm e a cor amarelo-alaranjado indica AgNPs esféricas entre 50 a 70 nm. A alteração da cor para tons amarronzado, avermelhado e esverdeado indica agregação, sendo que tonalidade acinzentada indica tamanhos macroscópicos (Melo Jr, *et al.*, 2012).

O espectro de absorção óptica das AgNPs ocorre no comprimento de onda aproximado de 400 nm. Quando as partículas aumentam de tamanho, o espectro de absorção óptica desloca para comprimentos de onda maiores. Além disso, uma nova banda, mais alargada pode surgir diante da agregação das nanopartículas ou variação populacional (Brause *et al.*, 2002, Melo Jr *et al.*, 2012).

Finalmente, após a síntese das AgNPs, os próximos passos envolvem a caracterização, cujas análises confirmam a formação e investigam as propriedades ópticas, o tamanho, a morfologia, a área de superfície, a cristalinidade, a composição e a estabilidade. Algumas técnicas que são comumente utilizadas para essa finalidade são: espectrofotometria UV-Vis, espalhamento de luz dinâmico (DLS), microscopia eletrônica de transmissão (TEM), difração de raio-X (DRX), microscopia de força atômica, espectroscopia de infravermelho próximo (FT-IR), espectroscopia de plasma indutivamente acoplado (ICP) (Gamboa *et al.*, 2019).

2. JUSTIFICATIVA

Embora fatores de natureza química ou física possam induzir uma patologia pulpar ou perirradicular, os microrganismos representam os principais agentes etiológicos das patologias pulpares e periapicais. A preparação biomecânica e a modelagem do canal radicular reduzem eficientemente o número de microrganismos nos canais radiculares, mas não podem removê-los dos istmos, canais laterais e deltas apicais. As bactérias remanescentes no canal radicular, formam biofilmes que penetram nos túbulos dentinários, dificultando sua eliminação, podendo ocasionar a manutenção ou o aparecimento de uma lesão perirradicular, determinando o fracasso do tratamento e, em alguns casos, a necessidade da cirurgia parendodôntica. Com a persistência desses microorganismos, a atividade antimicrobiana do cimento endodôntico, seja ele reparador ou obturador, tem papel fundamental na contribuição para o sucesso do tratamento. Seu agente antimicrobiano necessita ter a capacidade de se difundir e atingir túbulos dentinários e áreas contaminadas.

As nanopartículas de prata (AgNPs) apresentam propriedades antimicrobianas únicas, que as tornam um aditivo promissor para potencialização do efeito antimicrobiano do cimento MTA (Mineral Trióxido Agregado). Além de serem eficazes contra uma ampla variedade de microrganismos, as AgNPs possuem uma liberação gradual de íons de prata, proporcionando uma proteção mais duradoura.

Assim, avaliar o efeito antimicrobiano das AgNPs, bem como estudar o potencial citotóxico do MTA modificado em tecidos adjacentes, é essencial para assegurar a segurança e eficácia clínica do material proposto.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Sintetizar e caracterizar nanopartículas de prata (AgNPs), avaliar o potencial antimicrobiano das AgNPs para incorporação em cimento endodôntico MTA e avaliar o potencial citotóxico cimento incorporado MTA modificado com AgNPs.

3.2 Objetivos Específicos

- I. Sintetizar nanopartículas de prata (AgNPs) por síntese química por redução, utilizando dois protocolos distintos: em aquecimento e em resfriamento.
- II. Realizar a caracterização físico-química das AgNPs baseada nas normas ISO 19337:2023, ISO 22412:2017 e NIST 1200-29, utilizando técnicas de espectroscopia de absorbância de UV-Visível, Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS), Potencial Zeta (PZ), Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) com análise EDS e Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET).
- III. Avaliar a estabilidade das AgNPs ao longo do tempo em relação ao tamanho e dispersão, utilizando DLS e definir a(s) melhor(es) amostra(s) para seguir para os ensaios de biológicos.
- IV. Determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM ou MIC) da(s) amostra(s) escolhida(s) desafiando quatro cepas bacterianas: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* e *Pseudomonas aeruginosa*.
- V. Determinar a melhor concentração para incorporação de AgNPs em cimento MTA, através do ensaio de viabilidade celular.
- VI. Preparar corpos de prova do cimento MTA puro (controle) e MTA com AgNPs incorporadas seguindo a ISO 10993-5:2012.
- VII. Preparar extratos de exposição com os corpos de prova seguindo a ISO 10993-12:2012.
- VIII. Avaliar a citotoxicidade induzida em fibroblastos gengivais humanos (FGH) e osteoblastos humanos (MG-63) por contato indireto, seguindo a ISO 10993-5:2012, através dos ensaios de MTT, LDH e quantificação de espécies reativas de oxigênio (ROS).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Fluxograma de ensaios

O presente trabalho foi dividido em quatro macro etapas: 1) síntese e caracterização, 2) ensaio antimicrobiano e 3) ensaios de citotoxicidade conforme apresentado na Figura 1.



Figura 1. Visão geral do trabalho dividida em quatro macro etapas: 1) síntese e caracterização, 2) ensaio antimicrobiano e 3) ensaios de citotoxicidade

4.2 Materiais

Para síntese das AgNPs foram utilizados os seguintes reagentes:

- Borohidreto de sódio (NaBH_4) - Sigma-Aldrich (lote: 45283-23G)
- Citrato trissódico (CTS) - Sigma-Aldrich (lote: BCCG6934)
- Nitrato de prata (AgNO_3), $\geq 99\%$ de pureza - Sigma-Aldrich (lote: 209139-25G)
- Álcool polivinílico (PVA) - Sigma-Aldrich (lote: 3LCM5091)

Para o preparo dos corpos de prova foi utilizado o cimento reparador MTA (agregado de trióxido mineral) – MTA Angelus® (lote: 74811)

4.3 Síntese de nanopartículas de prata

4.3.1 Lavagem de vidrarias

Para remoção de resíduos orgânicos, as vidrarias foram lavadas com detergente neutro, enxaguadas abundantemente em água corrente, posteriormente, passaram por três banhos em água destilada de 30 min cada. Após esse processo, foram secas em estufa.

Para remoção de contaminantes metálicos, as vidrarias ficaram de molho na solução de água-régia, preparada na proporção 3:1 (3 HCl + HNO₃), durante 30 min. Ao final, a solução foi transferida para o frasco de descarte de ácidos fortes e as vidrarias foram rinsadas 3 vezes com água ultrapura, para completa remoção da solução. Novamente, seguiram para estufa até secagem completa.

4.3.2 Síntese por rota química

As AgNPs foram sintetizadas por redução química a partir de dois protocolos distintos: 1) em aquecimento, utilizando NaBH₄ como redutor primário e CTS como redutor secundário e estabilizante (Agnihotri et al., 2014). 2) em resfriamento, NaBH₄ como redutor e PVA como estabilizante (Melo Jr et al. 2012). Com algumas alterações baseadas no sucesso sintético de Carvalho, 2024. Todos os reagentes foram pesados e preparados conforme a necessidade de cada protocolo.

Resumidamente, sete lotes foram sintetizados alvejando diâmetro médio 30 ± 10 nm, com coloração amarelo coloidal. Após a síntese, foram centrifugados, tendo seu sobrenadante separado e *pellet* ressuspendido, exceto um inicialmente reprovado, obtendo-se então, amostra original, sobrenadante e precipitado de seis lotes (18 amostras).

Como critério de exclusão dos lotes, foram utilizadas análise da coloração e turbidez, e as técnicas de espectroscopia de absorção ultravioleta visível (UV-visível) e espalhamento de luz dinâmico (DLS) para avaliação da dispersão, tamanho e presença de agregados.

Como critério inclusão, a estabilidade de tamanho e dispersão a longo prazo foram avaliadas por DLS e a carga superficial por potencial zeta, sugerindo estabilidade no meio de cultura suplementado com proteínas. Finalmente, as amostras aprovadas seguiram para a caracterização por microscopia eletrônica de

transmissão (MET) para avaliação da morfologia e espectroscopia de energia dispersiva de raios-X (EDS) acopladas ao microscópio de varredura (MEV) para análise elementar. Os critérios foram determinados de acordo com o guia NIST 1200-29 (*Preparation, characterization, and biological activity of stability-enhanced polyethyleneimine-conjugated gold nanoparticles (Au-PEI@NIST) for biological application*) (Hackley et al., [s.d.]).

1) Síntese em aquecimento

Para a síntese de 100 mL de AgNPs, duas soluções aquosas (2 mL cada) recentemente preparadas contendo NaBH_4 ($1,0 \times 10^{-3}$ mol/L) e CTS ($1,06 \times 10^{-3}$ mol/L), respectivamente, foram misturadas em água ultrapura (94 mL) num Erlenmeyer de 250 mL. Em seguida, uma barra magnética (peixinho) de 6 cm e um termômetro foram adicionados ao frasco e o conjunto foi levado à placa de aquecimento e agitação, ao abrigo da luz (envolto por alumínio).

O primeiro lote sintetizado (Reprovado) foi aquecido até atingir 60 °C (por 30 min), com agitação branda (velocidade 2 da placa agitadora) para garantir homogeneidade sem perda no sistema. Durante esse período, uma solução aquosa de AgNO_3 ($2,0 \times 10^{-3}$ mol/L) foi preparada em 2 mL de água ultrapura. Ao final dos 30 min, essa solução foi adicionada gota a gota à mistura (1 gota por seg, cada gota = 50 μL). Em seguida, a temperatura foi aumentada para 90 °C e mantida durante 20 min. Esse lote apresentou mudança de coloração, passando de transparente para amarelo coloidal, indicando a formação das AgNPs antes que atingisse 90 °C. Até o final desse processo, ou seja, até atingir 90 °C, a coloração passou de amarelo coloidal para marrom. A síntese foi interrompida e o frasco foi colocado em gelo até o resfriamento.

O segundo lote (S1 Aquecimento) foi sintetizado seguindo as mesmas etapas acima, entretanto, a síntese foi interrompida no momento da mudança de coloração de amarelo coloidal para amarelo-alaranjado, durante a etapa de aumento da temperatura, mas ainda não chegando aos 90 °C. O pH foi medido e a solução sintetizada foi transferida para dois tubos tipo falcon de 50 mL.

O terceiro lote (S2 Aquecimento) foi sintetizado seguindo as mesmas etapas, entretanto, a síntese foi interrompida logo após o atingimento da coloração amarelo-coloidal, ainda em 60 °C. O pH foi medido e a solução sintetizada foi transferida para dois tubos tipo falcon de 50 mL.

Por último, 50 mL de cada amostra de AgNPs não reprovada foi centrifugado a 12000 *g* por 15 min para originar o sobrenadante e precipitado da solução. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo tipo falcon (S1 Aquecimento Sobrenadante e S2 Aquecimento Sobrenadante) e o *pellet* foi ressuscitado em 50 mL de água ultrapura (S1 Aquecimento Precipitado e S2 Aquecimento Precipitado). A Figura 2a apresenta um esquema das etapas de sínteses. A Figura 2c apresenta etapas pós sínteses.

2) Síntese em resfriamento

Previamente, uma solução aquosa de PVA a 3% foi preparada, utilizando 100 mL de água ultrapura e 300 mg de PVA. Ambos foram adicionados a uma garrafa *shot* de 150 mL, em seguida homogeneizados manualmente e a garrafa foi preparada para autoclavação. O PVA apresenta baixa solubilidade em água a temperatura ambiente, necessitando da etapa de autoclavação.

Para a síntese de 100 mL de AgNPs, 2 mL de uma solução aquosa recentemente preparada contendo NaBH_4 ($2,0 \times 10^{-3}$ mol/L) foi misturada em água ultrapura (75 mL) num Erlenmeyer de 250 mL, que estava inserido num banho de gelo. Em seguida, uma barra magnética (peixinho) de 6 cm foi adicionada ao frasco e o conjunto foi levado à placa de e agitação, ao abrigo da luz (envolto por alumínio).

O primeiro lote sintetizado (S1/F1 PVA) permaneceu em agitação branda (velocidade 2 da placa agitadora) por 15 min para garantir homogeneidade sem perda no sistema. Durante esse período, uma solução aquosa de AgNO_3 ($1,0 \times 10^{-3}$ mol dm^{-3}) foi prepara em 25 mL de água ultrapura. Ao final dos 15 min, essa solução foi adicionada em gotejamento gota a gota à mistura por 5 min, sendo possível observar a mudança de coloração para amarelo coloidal. Em seguida, 5 gotas de PVA 3% foram adicionadas (1 gota por seg, cada gota = 50 μL) ao sistema e a síntese foi interrompida. O pH foi medido e a solução sintetizada foi transferida para dois tubos tipo falcon de 50 mL.

O segundo, terceiro e quarto lote sintetizados - S1/F2 PVA, S2 PVA e S3 PVA, respectivamente – seguiram as mesmas etapas acima, entretanto, houve mudança no tempo de adição da solução aquosa de AgNO_3 , sendo 8, 10 e 13 min respectivamente.

Por último, 50 mL de cada amostra AgNPs foi centrifugado a 12000 *g* por 15 min para originar o sobrenadante e precipitado da solução. O sobrenadante foi

transferido para um novo tubo tipo falcon (S1/F1 Sobrenadante, S1/F2 Sobrenadante, S2 Sobrenadante e S3 Sobrenadante) e o *pellet* foi ressuspendido em 50 mL de água ultrapura (S1/F1 Precipitado, S1/F2 Precipitado, S2 Precipitado e S3 Precipitado). A Figura 2b apresenta um esquema das etapas de sínteses. A Figura 2c apresenta etapas pós sínteses.

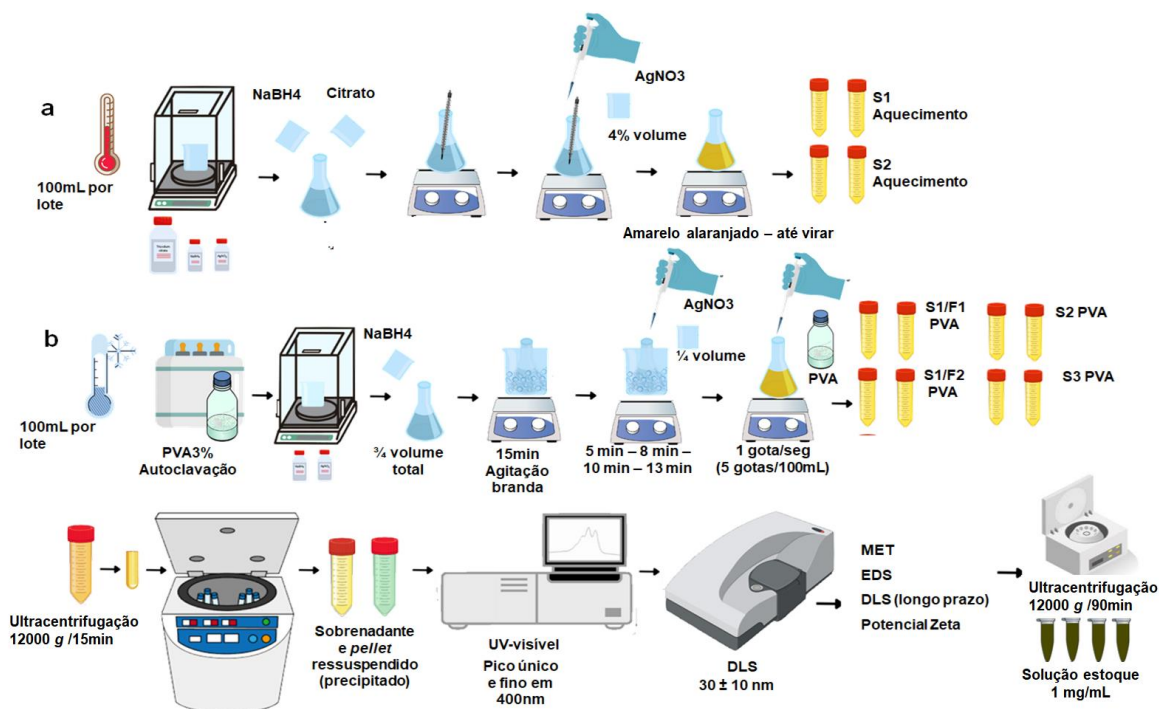


Figura 2. Etapas de síntese e caracterização de AgNPs. (a) Síntese em aquecimento resultando em dois lotes originais (S1 Aquecimento e S2 Aquecimento). (b) Síntese em resfriamento resultando em quatro lotes originais (S1/F1 PVA, S2/F2 PVA, S2 PVA e S3 PVA). (c) Ultracentrifugação de parte das amostras, separação do sobrenadante e ressuspensão do *pellet*, análise em UV-visível e DLS. Posterior caracterização e preparo de soluções estoque.

4.4 Caracterização das nanopartículas de prata

4.4.1 Espectroscopia de Absorção Ultravioleta-Visível (UV-visível)

Para a confirmação da produção de AgNPs, após a síntese e também a presença de AgNPs após centrifugação e ressuspensão, 100 uL de todas as amostras foram lidas por UV-visível. A absorbância foi medida nos comprimentos de onda na faixa de 200 a 800 nm, a uma resolução de 2 nm, em placa de 96 poços (Corning®), utilizando espectrofotômetro de UV-Visível Molecular Devices Spectra Max 190 (Sunnyvale, EUA).

4.4.2 Espalhamento de luz dinâmico (DLS)

O tamanho hidrodinâmico, a dispersão (índice de polidispersão – PDI) e a presença de agregados nas amostras após a síntese, centrifugação e ressuspensão, além da estabilidade de tamanho e dispersão a longo prazo (7, 30 e 60 dias), foram determinados por espalhamento de luz dinâmico (DLS - Dynamic Light Scattering), utilizando o equipamento Zetasizer (Nano ZS, Malvern Instruments GmbH). As AgNPs foram analisadas em sua suspensão coloidal (água) e nos meios de cultivo *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) *Low Glucose* e *High Glucose* (Sigma-Aldrich) suplementados com 10% de soro fetal bovino (SFB, Gibco). Para análise da suspensão coloidal, 1 mL da amostra foi depositado a uma cubeta de poliestireno de 10 mm. Para análise da amostra em meio de cultura suplementado com SFB, 500 uL da amostra mais 500 uL do meio suplementado foram misturados, homogeneizados e depositados a uma cubeta de poliestireno de 10 mm. A análise performou a 25 °C.

4.4.3 Potencial Zeta (PZ)

Para determinar a carga superficial e a estabilidade da suspensão coloidal em meio de cultura suplementado com proteínas, importante para determinação das interações de AgNPs no ambiente *in vivo*, 600 uL das amostras foram acrescentadas em cubeta ômega para PZ e foram analisadas no equipamento Zetasizer (Nano ZS, Malvern Instruments GmbH).

4.4.4 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

Para todas as análises de MET referentes ao tamanho e morfologia das AgNPs, uma gota correspondente a 5µL das amostras foi depositada em grades de cobre 200 mesh revestidas por Formvar/Carbon e secas no dessecador a vácuo. Para cada amostra, 500 partículas foram analisadas. As micrografias foram obtidas após análise no MET (Tecnai Spirit G2, FEI, USA) operando a 80 kV.

4.4.5 Microscopia eletrônica de varredura (MEV) e energia dispersiva de raios X (EDS)

Com a finalidade de obter a composição elementar das nanopartículas

produzidas, foram realizadas análises utilizando a técnica de espectroscopia de raios X por dispersão em energia (EDS) em microscópio eletrônico de varredura (MEV-Quanta FEG 450 (FEI Company, Hillsboro, Oregon, EUA), operando a 5kV e utilizando detector para emissão de raios X. Para obter precipitado da suspensão coloidal de AgNPs, 500 μ L de cada amostra foi depositado em eppendorfs para secagem em um Speedvac Vacufuge Plus (Eppendorf, Hamburg, Germany) por 24 horas. Posteriormente, foram depositadas em um suporte (*stub*) para MEV previamente recoberto por fita dupla face de carbono e seguiram para análise.

4.4.6 Determinação da concentração das amostras de AgNPs

Para determinar a concentração das amostras, a massa de AgNPs contida em 1 mL foi pesada da seguinte forma: primeiramente, 5 microtubos (Eppendorf®) para cada amostra, previamente identificados, foram pesados vazios em balança ultramicro analítica de 7 casas decimais (Cubis® II Ultra-Microbalance). Sequencialmente, 1 mL de cada amostra previamente homogeneizada foi adicionada em cada microtubo por amostra ($n = 5$), e tiveram seu volume líquido completamente seco, pelo concentrador à vácuo, durante 12 horas (Speed vac, Eppendorf®). Em seguida, os microtubos contendo apenas as AgNPs concentradas, sem volume líquido, foram pesados novamente na mesma balança. Foi feita a média aritmética dos valores obtidos para os microtubos das mesmas amostras, descobrindo-se então a concentração pela proporção massa/volume. Posteriormente, as amostras foram ajustadas para uma solução estoque na concentração de 1 mg/mL.

4.5 Determinação do potencial antimicrobiano

4.5.1 Concentração Inibitória Mínima (MIC), IC₅₀ e Concentração Bactericida Mínima (MBC)

Para determinar a concentração inibitória mínima, foi utilizado o método de microdiluição em caldo, seguindo a metodologia proposta por Soberón *et al.* (2007), com algumas modificações. Além das AgNPs sintetizadas, o efeito das AgNPs do projeto NANoREG, do Ministério da Ciência Tecnologia e Inovação (MCTI), também foi testado em caráter de comparação, uma vez que é material de referência.

Primeiramente, 100 μL de caldo Mueller Hinton foram distribuídos em cada poço de placas de microtitulação de 96 poços (Corning®). Uma alíquota de 100 μL da solução-estoque (1mg/mL) de cada AgNPs foi adicionada aos primeiros poços da primeira linha da placa, logo homogeneizadas ao caldo já depositado. Em seguida 100 μL da mistura foram transferidos para os poços das linhas seguintes (de A para B), e assim sucessivamente (até a linha H). Sequencialmente, 100 μL do inóculo bacteriano a 1×10^8 UFC/mL foram adicionados aos poços da placa que continham as diluições das AgNPs, obtendo-se, então, as concentrações das amostras (250 a 1,95 $\mu\text{g/mL}$). As cepas utilizadas foram *Escherichia coli* (CDC 42370), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Enterococcus faecalis* (ATCC 19429), *Pseudomonas aeruginosa* (INCQS 00313). Como controle negativo (crescimento microbiano) foi utilizado o caldo (com volume substituto às nanopartículas) e como branco apenas o caldo. As placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 36 °C por 24h. Três repetições foram realizadas para cada cepa e AgNPs.

Após esse período, o crescimento microbiano foi observado pela turbidez do meio nos poços da placa. A ausência de crescimento bacteriano foi interpretada como MIC. A viabilidade foi quantificada pelo ensaio de MTT, de acordo com Ghanwate *et al.*, 2016, no qual 20 μL de uma solução aquosa de MTT (Sigma-Aldrich) (preparada na concentração 1 mg/mL) foi adicionada em cada poço. Como controle positivo (de morte) foi utilizado 5 μL de DMSO por poço. Como controle de eficiência foram utilizados antibióticos específicos de cada cepa (oxacilina, vancomicina e ciprofloxacina). As placas foram novamente incubadas pelo período de 3 horas e a densidade óptica foi lida utilizando espectrofotômetro (SynergyH4 Hibrid Reader, Biotek, EUA) a 570 nm.

A citotoxicidade da formulação foi expressa em percentual de viabilidade celular, que é calculada pela razão entre o número de células tratadas e o controle. A concentração citotóxica de 50% (IC_{50}) foi determinada com base na curva de citotoxicidade. O valor da MIC foi considerado como a menor concentração da amostra capaz de causar inibição visual do crescimento microbiano. A figura 2 apresenta as etapas do ensaio de determinação da MIC.

A concentração bactericida mínima (MBC) foi determinada da seguinte maneira: 50 μL do volume foi removido dos poços das placas de onde nenhum crescimento foi observado, ou seja, dos poços que representam a MIC. Essa alíquota foi então inoculada na superfície das placas de Petri contendo meio Mueller Hinton.

4.6.2 Ensaio de viabilidade celular por MTT frente às concentrações candidatas à incorporação

Após determinar as concentrações inibitórias mínimas da amostra de interesse frente às diferentes cepas bacterianas, foi realizado o ensaio de MTT por exposição direta às células FGH e MG-63, a fim de determinar a concentração ideal para incorporação no cimento MTA (bactericida e não citotóxica). O ensaio de MTT é uma técnica colorimétrica utilizada para avaliar a viabilidade celular. Nas condições normais de integridade celular, as desidrogenases mitocondriais reduzem o sal tetrazólio MTT, gerando um produto chamado formazana. Se a atividade mitocondrial estiver comprometida, a produção de formazana diminui, indicando uma redução na atividade mitocondrial e, portanto, uma possível diminuição na viabilidade.

As células foram cultivadas em placas de microtitulação de 96 poços (Corning®) na densidade de 5×10^3 células/poço (previamente determinadas por curva de crescimento para os tempos específicos) e tratadas com diferentes concentrações (125, 250, 350, 500 e 750 µg/ml) de AgNP por 24, 48 e 72 horas e incubadas em estufa úmida a 37 °C e 5% de CO₂. Após o tempo de exposição às AgNPs, 50 µL de uma solução de MTT (Sigma-Aldrich) em meio de cultura (preparada na concentração 1 mg/mL) foi adicionada em cada poço. Como controle negativo (vida) foi utilizado células não expostas e como branco apenas o meio de cultura suplementado. Como controle positivo (de morte) foi utilizado Triton™ X-100 a 0,1%. As placas foram novamente incubadas pelo período de 2 horas, sequencialmente, o sobrenadante foi removido e os cristais de formazana foram dissolvidos em 100 µL de isopropanol por 40 min. E a absorbância foi lida utilizando espectrofotômetro (SynergyH4 Hibrid Reader, Biotek, EUA) a 570 nm.

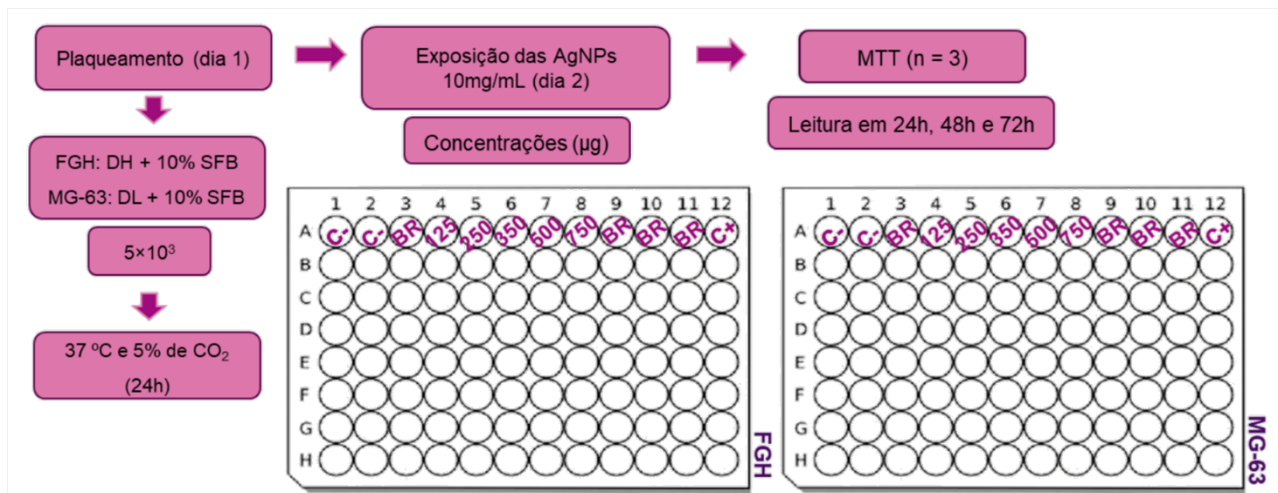


Figura 3. Esquema do ensaio de MTT para determinação da concentração não citotóxica para incorporação nos cimentos. O plaqueamento das células ocorreu no primeiro dia na densidade de 5×10^3 células por poço. No segundo dia foi realizada a exposição das AgNPs nas concentrações de 125, 250, 350, 500 e 750 μg . Em 24, 48 e 72h após exposição foram realizadas análises de MTT e LDH (n=3).

4.6.3 Preparo dos corpos de prova

Os cimentos foram moldados em uma matriz de inox (Figura X) com 6 mm de altura, 4 mm de diâmetro e 2 mm de raio, formando cilindros de 1 cm². Os moldes/corpos de prova foram preparados em ambiente estéril e os materiais para manipulação foram previamente autoclavados a 121°C por 30 min.

Os corpos de prova produzidos para controle foram preparados com cimento puro (apenas o MTA). Esse cimento foi manipulado de acordo com a bula do fabricante: o pó do MTA foi espatulado com a água estéril contida na embalagem, numa placa de vidro, até se tornar uma massa firme, porém moldável (Figura 4a). Sequencialmente, a massa foi transferida para a cavidade da matriz, de forma a preenche-la totalmente, não deixando espaço para formação de bolhas. Os corpos de prova teste (MTA + AgNPs) foram produzidos substituindo a água estéril pela solução de AgNPs. Ao final do processo, os corpos de prova foram condicionados numa caixa vedada e foram removidos da matriz (em ambiente estéril) após 24h.

Cada caixa de apresentação de 0,14 g continha 2 sachês (280 mg) suficientes para formar dois corpos de prova. Para os ensaios de MTT, LDH e ROS.

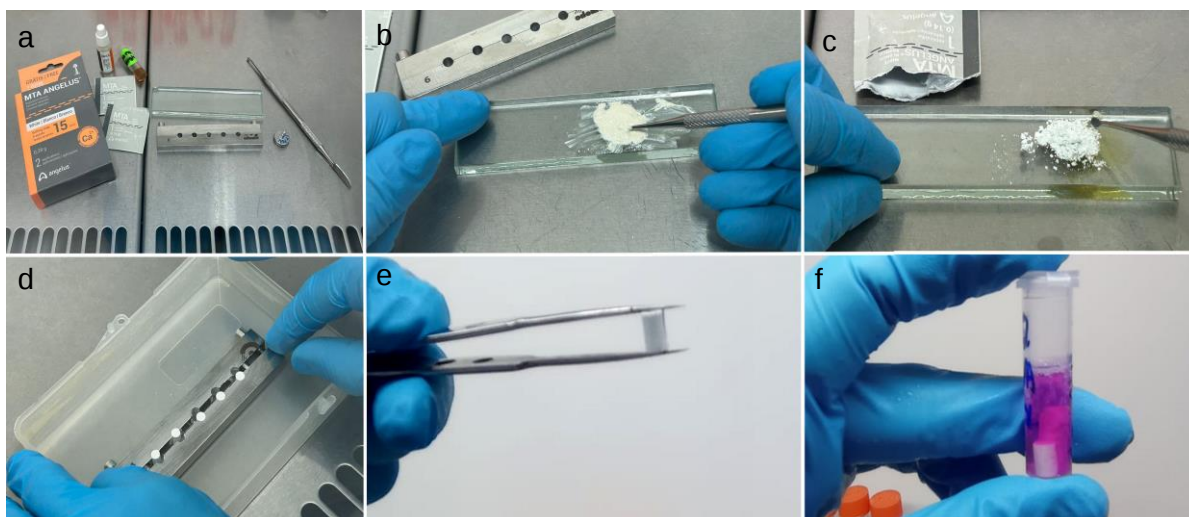


Figura 4. Preparo dos corpos de prova. (a) Material utilizado: cimento MTA, AgNPs, matriz, placa de vidro e espátula (b) Processo de espatulação do cimento MTA puro (c) Processo de espatulação do cimento MTA com AgNPs (d) Etapa de desmoldagem dos corpos de prova. (e) Corpo de prova do cimento MTA puro (f) Preparo do extrato do cimento.

4.6.4 Preparo dos extratos

Para os ensaios de citotoxicidade dos cimentos incorporados com AgNPs, adotou-se o método de contato indireto previsto na ISO 10993-5:2009 (Avaliação biológica de dispositivos médicos — Parte 5: Testes de citotoxicidade *in vitro*). Para isto, foram preparados os extratos, conforme a ISO 10.993-12:2012 (Avaliação biológica de dispositivos médicos — Parte 12: Preparação de amostras e materiais de referência), no qual 0,2g dos moldes foram adicionados a 1 mL de meio de cultura DL + 10% SFB, para células MG-63 e DH + 10% SFB para células FGH, ou seja, dois corpos de prova a cada 1,4 mL de extrato, tanto corpos de prova MTA puro, quanto corpos de prova MTA + AgNP. Também foram produzidos extratos controle, como o extrato de polietileno de alta densidade (PEAD), um material conhecidamente não citotóxico, também preparado na proporção 0,2 g/mL e o controle de extração, que consistiu em meio de cultura puro (DL + 10% SFB e DH + 10% SFB) deixado sobre as mesmas condições ambientais que os demais extratos. Os microtubos (Eppendorf®) contendo os extratos em produção permaneceram em estufa a 37 °C e 5% de CO₂, pelo tempo necessário dos ensaios (24 horas), que foram realizados em triplicata. A Figura 5 apresenta o esquema representativo do preparo dos extratos.

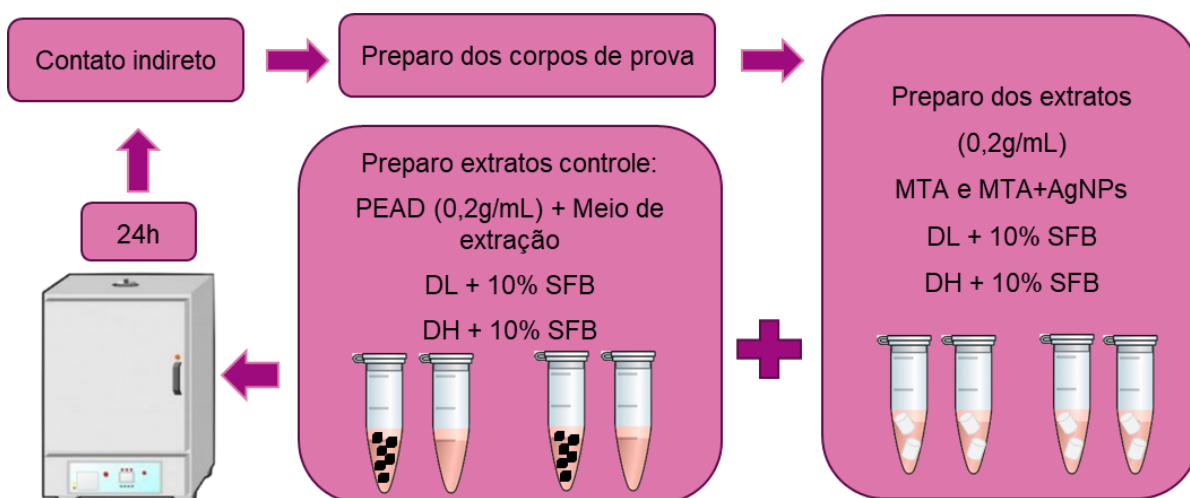


Figura 5. Esquema do preparo dos extratos seguindo a ISO 10993-12:2012. Extratos contendo corpos de prova de cimento foram produzidos para os ensaios de citotoxicidade por contato indireto. 1,4 mL de cada extrato de cada condição foi produzido por replicada (n=3).

4.6.5 Plaqueamento e exposição das células aos extratos

A norma na ISO 10993-5:2009 prevê o uso da linhagem de murino L929 para ensaios de citotoxicidade. Entretanto, este estudo adaptou a norma às linhagens de interesse: FGH e MG-63 e manteve a densidade celular determinada de 1×10^4 células por poço, em placas de 96 poços. Finalizado o plaqueamento (placas de 96 poços Corning®), as placas foram mantidas em estufa úmida a 37°C e a 5% de CO₂ por 24 horas (dia 1). Após esse período, as células foram tratadas com 100 µL dos extratos nas condições específicas de estudo (25%, 50%, 75% e 100%). Como controle negativo (vida) foi utilizado células não expostas (com meio de cultura fresco) e extrato de PEAD. Ainda como controle de comparação, foi utilizado o meio de extração. Como controle positivo (de morte) foi utilizado Triton™ X-100 a 0,1% e como branco apenas o meio de cultura suplementado. Sequencialmente, foram novamente incubadas em estufa úmida de 37 °C e 5 % de CO₂ por mais 24 horas (dia 2). E então, os sobrenadantes foram coletados para ensaio de LDH e as células seguiram para o ensaio de MTT (dia 3), conforme representado na Figura 6.

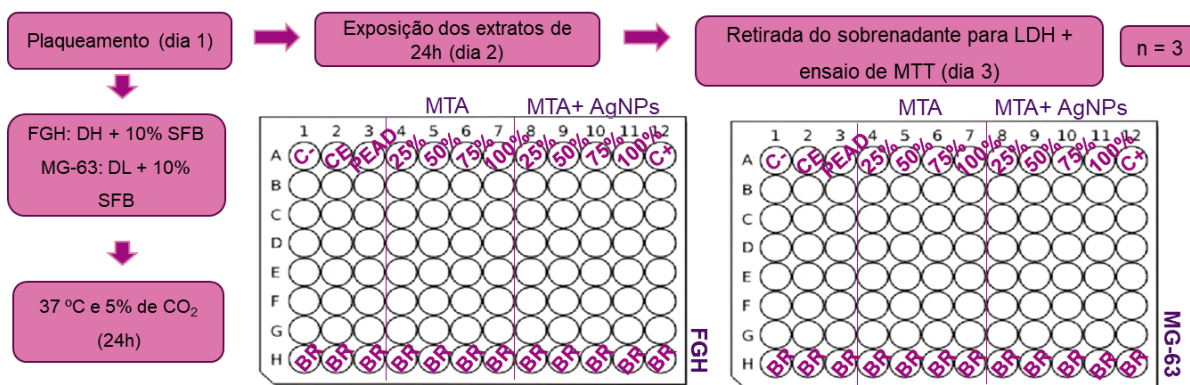


Figura 6. Esquema do plaqueamento dos extratos seguindo a ISO 10993-5:2012. O plaqueamento das células ocorreu no primeiro dia na densidade de 1×10^4 células por poço. No segundo dia foi realizada a exposição dos extratos nas concentrações de 25, 50, 75 e 100% por 24h. No terceiro dia foi realizada análises de MTT e LDH (n=3).

4.6.6 Ensaio de viabilidade celular por MTT por contato indireto

Após o período de exposição aos extratos, 50 μ L de uma solução de MTT (Sigma-Aldrich) em meio de cultura (preparada na concentração 1 mg/mL) foi adicionada em cada poço e as células foram incubadas em estufa úmida à 37°C e 5% por 2 horas. Em seguida, os sobrenadantes foram descartados, e foi adicionado aos poços 100 μ L de isopropanol 40 min. E a absorbância foi lida utilizando espectrofotômetro (SynergyH4 Hibrid Reader, Biotek, EUA) a 570 nm). Três replicatas independentes foram realizadas para este ensaio.

4.6.7 Ensaio de atividade de lactato desidrogenase (LDH)

A presença da enzima citoplasmática LDH no sobrenadante representa perda de integridade da membrana celular, geralmente relacionada com necrose. A liberação de LDH foi dosada através do kit de bioluminescência LDH-Glo™ *Citotoxicity Assay* (Promega). Os volumes de sobrenadantes suficientes coletados (5 μ L por poço) foram transferidos para uma placa de sobrenadante (Kasvi) e misturados com 95 μ L do tampão preparados antecipadamente, conforme instrução do kit. Numa placa completamente preta (Greiner Bio-one), 50 μ L de PBS foram adicionadas em cada poço), sequencialmente, 25 μ L da mistura da amostra foi transferida e incubada com 20 μ L do substrato de detecção. A placa ficou armazenada em temperatura ambiente, ao abrigo luz por 60 min. Em seguida, luminescência foi medida utilizando

espectrofotômetro (SynergyH4 Hibrid Reader, Biotek, EUA).

4.6.8 Ensaio de quantificação de espécie reativas de oxigênio (ROS)

As ROS intracelulares foram detectadas utilizando o kit fluorométrico ROS intracelular (MAK143, Sigma-Aldrich), seguindo as recomendações do fabricante. Este kit fornece um sensor fluorogênico que reage com espécie reativa de oxigênio, resultando em um produto fluorométrico proporcional à quantidade de ROS presente nas células vivas. Para realizar esses experimentos, as células FGH e MG-63 foram plaqueadas a densidade celular de 1×10^4 células por poço, em placas de 96 poços (Corning®), e as placas foram mantidas em estufa úmida a 37°C e a 5% de CO₂ por 24 horas. Após esse período, as células foram expostas aos extratos nas diferentes concentrações (25, 50, 75, 100%). Como controle negativo (vida) foi utilizado células não expostas. Como controle positivo foi utilizado peróxido de hidrogênio (H₂O₂) a 5M, E como branco, o meio de cultura suplementado. Após 24h, um volume de 20 µL por poço de Master Reaction Mix contendo o sensor fluorogênico foi adicionado aos poços e incubado por 1h. Então, a intensidade de fluorescência foi medida em λ excitação = 490 nm e λ emissão = 525 nm.

4.7 Análise estatística

Para normalização dos dados brutos foi utilizado o Excel (Microsoft). Em seguida, os dados foram transferidos para GraphPad Prism 8 (GraphPad software Inc), afim de realizar a construção dos gráficos e análise estatística. As análises de significância estatística foram avaliadas usando o teste t não pareado e teste *one-way* ANOVA com múltiplas comparações de Tukey ou Dunnett, comparados ao respectivo grupo controle e o valor-p definido em *p<0,05, **p<0,01 e ***p<0,001.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Síntese química de AgNPs e escolha das amostras para ensaios

As sínteses de AgNPs utilizando dois protocolos distintos (aquecimento e resfriamento) resultaram em um lote reprovado e seis lotes originais previamente aceitos (Figura 6a), que após centrifugação originaram cada lote duas amostras a mais (sobrenadante e precipitado) (Figura 6b e c), totalizando 18 amostras de AgNPs (Figura 6d). Sendo 6 obtidas pelo protocolo em aquecimento e 12 obtidas pelo protocolo em resfriamento, conforme apresentado abaixo:

Síntese em aquecimento

- 1-Síntese reprovada
- 2-S1 Aquecimento Original
- 3-S1 Aquecimento Sobrenadante
- 4-S1 Aquecimento Precipitado
- 5-S2 Aquecimento Original
- 6-S2 Aquecimento Sobrenadante
- 7-S2 Aquecimento Precipitado

Síntese em resfriamento

- | | |
|---------------------------|-------------------------|
| 1- S1/F1 PVA Original | 7- S2 PVA Original |
| 2- S1/F1 PVA Sobrenadante | 8- S2 PVA Sobrenadante |
| 3- S1/F1 PVA Precipitado | 9- S2 PVA Precipitado |
| 4- S1/F2 PVA Original | 10- S3 PVA Original |
| 5- S1/F2 PVA Sobrenadante | 11- S3 PVA Sobrenadante |
| 6- S1/F2 PVA Precipitado | 12- S3 PVA Precipitado |

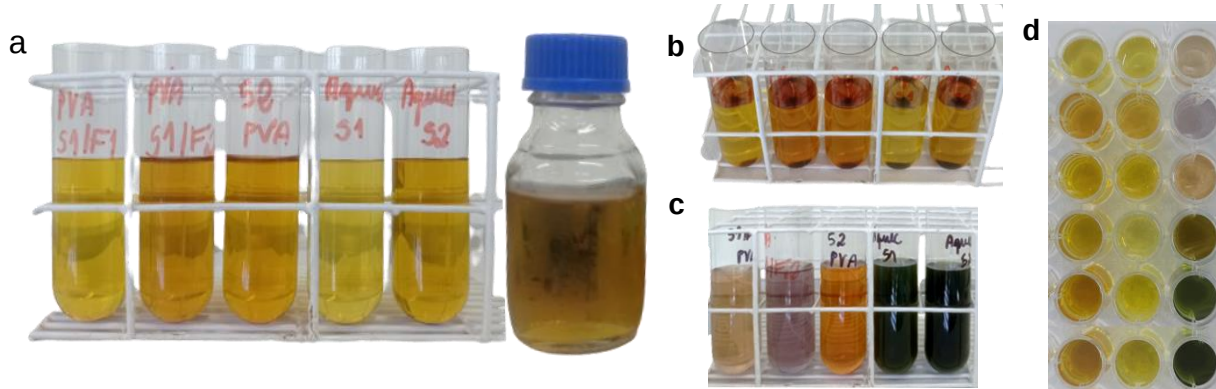


Figura 6. Lotes de AgNPs sintetizados. (a) Síntese de AgNPs a partir de diferentes protocolos, originando 6 lotes de AgNPs (S1/F1 PVA, S2/F2 PVA, S2 PVA, S1 Aquecimento, S2 Aquecimento e S3 PVA, respectivamente). (b) Lotes sintetizados após centrifugação a 12000 g /15min. (c) Ressuspensão dos *pallets* em água ultrapura no mesmo volume antes da extração do sobrenadante, formando o precipitado. (d) Amostras dispostas na seguinte ordem: da esquerda para a direita - lote original, sobrenadante e precipitado, de cima para baixo - S1/F1 PVA, S2/F2 PVA, S2 PVA, S1 Aquecimento, S2 Aquecimento e S3 PVA).

Dentre os critérios de exclusão pré-determinados, a coloração e turbidez foram os primeiros parâmetros analisados em cada amostra. O aspecto turvo ou leitoso da suspensão pode ser um indício de excesso de reagentes ou contaminantes oriundos da vidraria mal lavada (Melo Jr *et al.*, 2012). Nenhuma das amostras apresentou turbidez.

Esperava-se sintetizar amostras com de cor amarelo-coloidal até amarelo-alaranjado, visto que indicam maior homogeneidade e AgNPs esféricas com diâmetro desejado. Além disso, o escurecimento da tonalidade da suspensão coloidal indica AgNPs maiores e tons avermelhado e esverdeado indicam agregação (Melo Jr, *et al.*, 2012, Almeida *et al.*, 2015).

Na síntese do primeiro lote realizada pelo protocolo de aquecimento, seguiu-se as etapas sintéticas previamente descritas no trabalho de Agnihotri e colaboradores (2014). Entretanto, até que o sistema atingisse 90 °C, a coloração passou de amarelo-alaranjado para marrom-avermelhado e por fim, 35 min após a síntese, a coloração mudou para marrom escuro (Figura 7). Diante disso, o primeiro lote sintetizado foi reprovado antes mesmo de avançar as análises.



Figura 7. Primeiro lote sintetizado pelo protocolo em aquecimento. (a) Sistema em 60 °C, solução amarelo-alaranjado. (b) Final da síntese, coloração mudou para marrom-avermelhado (c) Após 35 min do fim da síntese, a coloração mudou para marrom escuro.

O segundo (S1 Aquecimento) e o terceiro (S2 Aquecimento) lotes sintetizados em aquecimento tiveram suas sínteses interrompidas antes do sistema chegar em 90 °C, visando manter a coloração esperada. S1 Aquecimento foi interrompida na coloração amarelo-alaranjada (Figura 8b) e S2 Aquecimento foi interrompida na coloração amarelo-coloidal (Figura 8c).

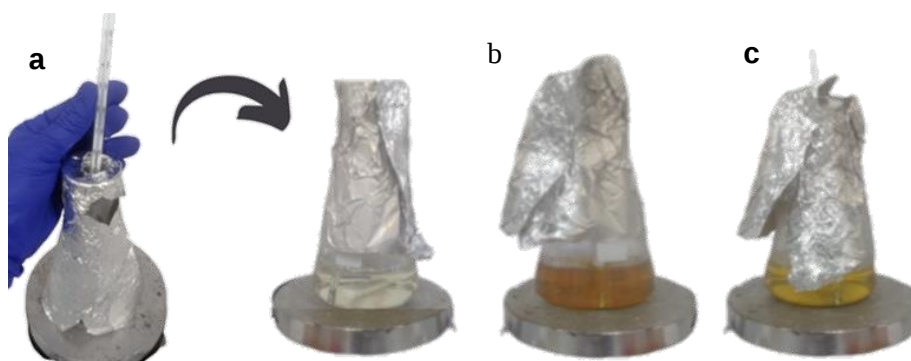


Figura 8. Lotes S1 e S2 Aquecimento sintetizados. (a) Estágio inicial de síntese. (b) Coloração final da S1 Aquecimento, amarelo-alaranjado. (c) Coloração final da S2 Aquecimento, amarelo coloidal.

A nucleação e o crescimento de nanopartículas são governados por vários parâmetros de reação, incluindo temperatura, pH, concentração, precursores, redutores, condição cinética e presença de estabilizadores (Lee e Jun, 2019). Nas sínteses em aquecimento alterações na temperatura resultaram em amostras diferentes. Já na síntese em resfriamento, as modificações no gotejamento de AgNO_3 resultaram em sínteses visualmente similares, todas com coloração amarelo coloidal. A figura 9 apresenta o início e o fim da síntese de em resfriamento.

O PVA foi utilizado com estabilizador na síntese em resfriamento. Ele adsorve na superfície das nanopartículas, promovendo repulsão elétrica e mantendo a suspensão coloidal estável (Lee e Jun, 2020). A presença de PVA explica a manutenção da coloração/estabilidade da amostra.

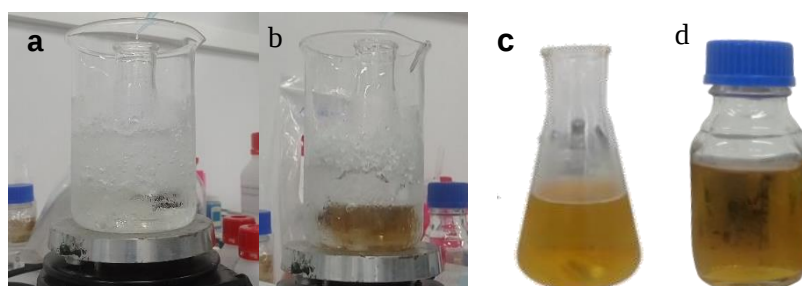


Figura 9. Etapas inicial e final da síntese de AgNP em resfriamento. (a) Estágio inicial de síntese com NaBH_4 em agitação. (b) Etapa pós gotejamento de AgNO_3 . Mudança de coloração para amarelo coloidal indica boa formação das AgNPs. (c) S3 PVA após adição do PVA. (d) S3 PVA 35 min após síntese.

Adicionalmente, os últimos critérios de exclusão selecionados, foram a análise das amostras por UV-Visível e DLS para verificar a presença de prata, tamanho e a dispersão coloidal das partículas.

A formação das AgNPs foi confirmada pela banda plasmônica característica próxima a 400 nm, observado no espectro UV-visível obtido das amostras. A figura 10 apresenta os espectros resultantes das bandas de absorção das amostras. Foi possível observar que os lotes originais sintetizados em aquecimento (Figura 10 a) apresentaram picos menores, mais arredondados e mais largos, quando comparados aos picos dos lotes originais sintetizados em resfriamento (Figura 10b e c).

As amostras sobrenadante das sínteses em resfriamento (Figura 10b e c) apresentaram picos reduzidos, em comparação aos lotes originais. Assim como as amostras precipitado da síntese em resfriamento apresentaram picos muito inferiores quando comparados às demais amostras. As amostras sobrenadante das sínteses em aquecimento (Figura 10a) apresentaram picos divergentes. Enquanto a amostra

S1 aquecimento sobrenadante apresentou pico baixo, a amostra S2 aquecimento sobrenadante apresentou pico aumentado. As amostras precipitado das sínteses em aquecimento apresentaram picos altos, irregulares e bimodais (Figura 10 a).

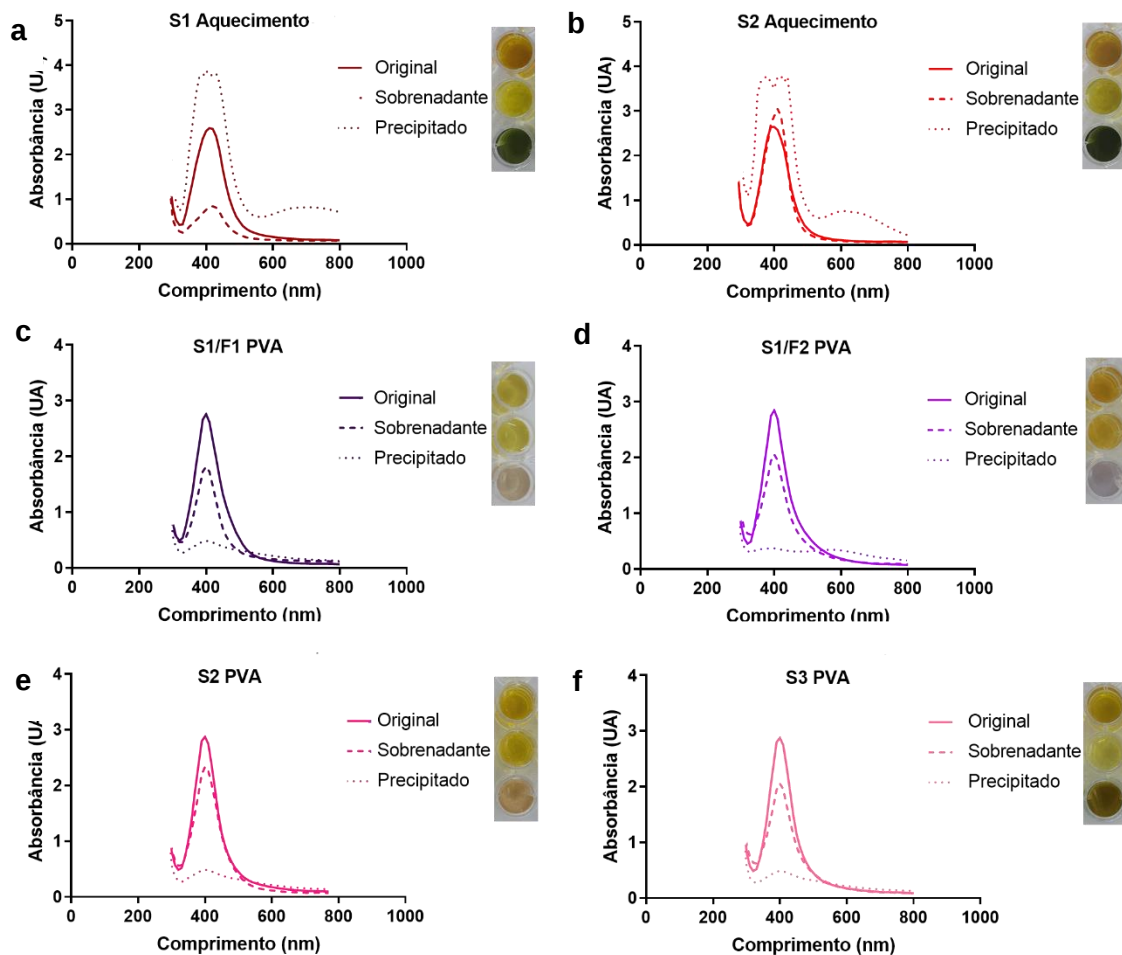


Figura 10. O espectro de UV-Visível das amostras de AgNPs. Bandas plasmônicas evidenciadas próximo a 400 nm indicam a formação de AgNPs.

A largura e o pico da banda plasmônica possuem relação direta com tamanho e forma das nanopartículas. É possível observar formação de AgNPs entre 380 e 450 nm, tendo diâmetros médios de 5 a 60 nm (Sólomon *et al.*, 2007). Picos únicos no comprimento de onda de 420 nm indicam nanopartículas esféricas de aproximadamente 30 nm (Pinheiro e Pandoli, 2015). Todas as amostras originais e sobrenadantes apresentaram esse pico característico, sugerindo que os diâmetros das AgNPs estão na faixa de tamanho desejada.

O alargamento da base pode sugerir heterogeneidade na amostra (Melo Jr *et al.*, 2012). Este alargamento foi mais evidenciado nas amostras sintetizadas em aquecimento (Figura 10a). E ainda, o surgimento de uma nova banda mais alargada

ou bimodal pode surgir diante da agregação das nanopartículas (Brause *et al.*, 2002). Foi possível observar esse comportamento no espectro das amostras S1 e S2 Aquecimento Precipitado (Figura 10 a e b). Uma hipótese para isto, é que as AgNPs tenham agregado durante a centrifugação.

Segundo a Lei de Beer, quanto maior a absorbância do pico, mais concentrada tende a ser a solução. Picos a partir de 1,5 UA são considerados bons. A maioria das amostras ultrapassou esse valor, exceto as amostras precipitado das sínteses em resfriamento (Figura 10 b, c, d e d) e a amostra S1 Aquecimento sobrenadante (Figura 10 a), que tiveram o pico abaixo de 1,0 UA. Diante desses resultados, as amostras precipitado de todas as sínteses já poderiam ter sido reprovadas, entretanto, ainda foram analisadas por DLS para confirmar tamanho e homogeneidade.

Como mencionado, todas as amostras foram analisadas por DLS, a fim de identificar o tamanho hidrodinâmico, a dispersão (índice de polidispersão – PDI) e a presença de agregados. Os resultados de diâmetro médio (dm) e PDI apresentados pelas amostras estão na tabela 1 abaixo:

Tabela 1. Valores do diâmetro médio e PDI das amostras sintetizadas.

Amostra de AgNPs	Diâmetro médio (nm)	PDI
S1 Aquecimento Original	29,55 ± 2,09	0,649 ± 0,05
S1 Aquecimento Sobrenadante	22,15 ± 0,42	0,658 ± 0,01
S1 Aquecimento Precipitado	25,04 ± 0,33	0,914 ± 0,01
S2 Aquecimento Original	36,90 ± 0,33	0,358 ± 0,05
S2 Aquecimento Sobrenadante	19,44 ± 0,09	0,307 ± 0,001
S2 Aquecimento Precipitado	21,98 ± 0,14	0,809 ± 0,003
S1/F1 PVA Original	20,97 ± 0,47	0,564 ± 0,03
S1/F1 PVA Sobrenadante	45,92 ± 0,45	0,452 ± 0,004
S1/F1 PVA Precipitado	174,1 ± 11,83	0,374 ± 0,009
S1/F2 PVA Original	13,97 ± 0,25	0,533 ± 0,007
S1/F2 PVA Sobrenadante	20,15 ± 0,43	0,403 ± 0,01
S1/F2 PVA Precipitado	293,1 ± 20,48	0,721 ± 0,07
S2 PVA Original	22,98 ± 0,08	0,569 ± 0,003
S2 PVA Sobrenadante	22,97 ± 0,61	0,377 ± 0,004
S2 PVA Precipitado	77,92 ± 2,41	0,441 ± 0,04

S3 PVA Original	$32,08 \pm 0,33$	$0,487 \pm 0,02$
S3 PVA Sobrenadante	$25,89 \pm 1,4$	$0,453 \pm 0,1$
S3 PVA Precipitado	$26,42 \pm 3,17$	$0,502 \pm 0,07$

A Figura 11 apresenta os gráficos de distribuição populacional de todas as amostras, o diâmetro médio das populações, o diâmetro médio geral e o seu PDI.

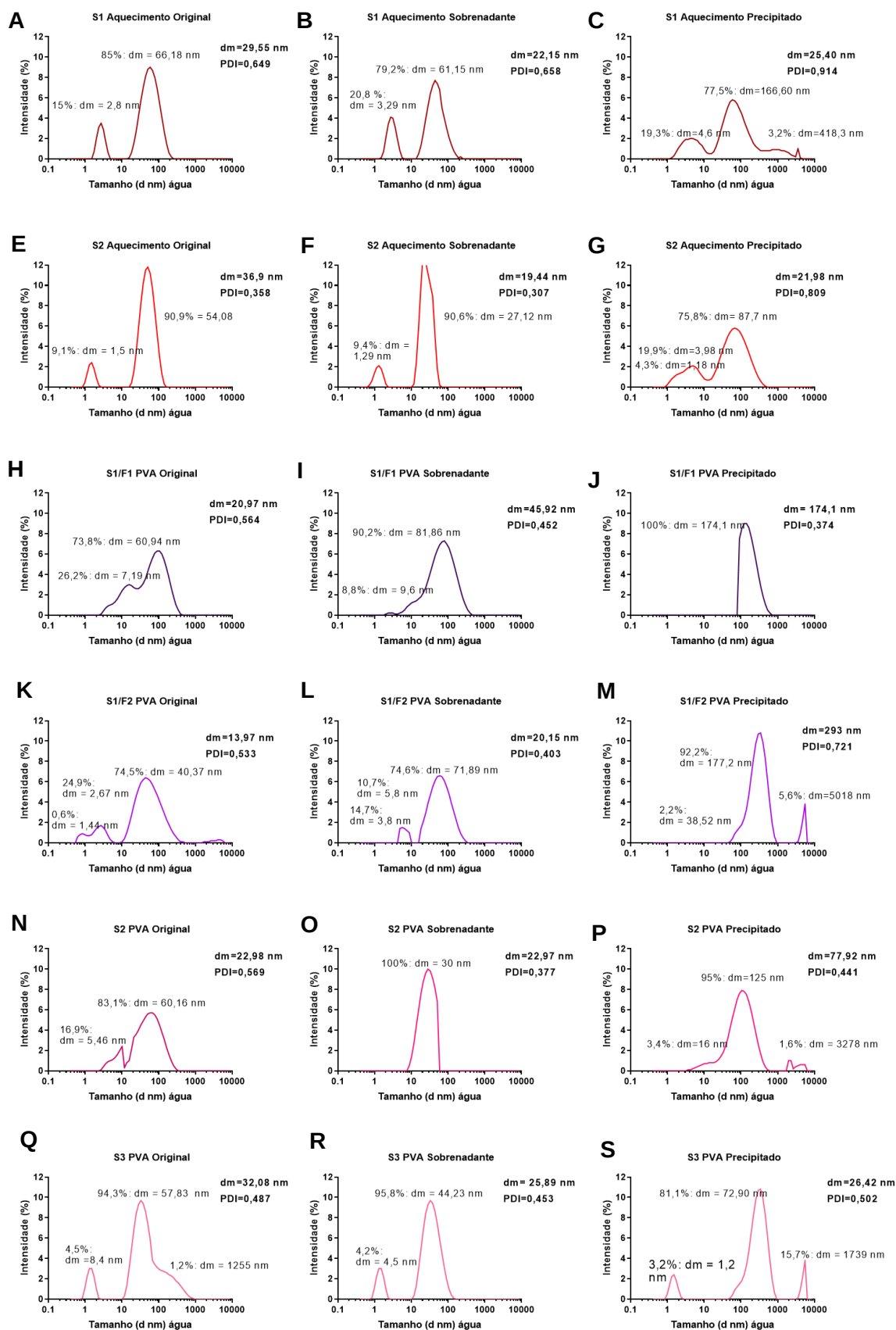


Figura 11. Distribuição populacional, tamanho hidrodinâmico médio (dm) e índice de polidispersão (PDI) das amostras AgNPs em água ultrapura.

Foi possível observar que todas as amostras apresentaram heterogeneidade populacional. O índice de polidispersão (PDI) é o principal indicativo de uma população variada em tamanho. Ele varia de 0 a 1, sendo 0 para amostras homogêneas e 1 para amostras muito heterogêneas. Também pode ser indicativo de agregação/aglomeração de nanopartículas (Daniel *et al.*, 2018). O limite de aceitação das amostras foi PDI: 0,5, visto que as AgNPs NANoREG apresentam PDI 0,51 (Klein *et al.*, 2018). Metade das amostras apresentaram PDI dentro do limite de aceitação: S2 Aquecimento Original (PDI: $0,358 \pm 0,05$), S2 Aquecimento Sobrenadante (PDI: $0,307 \pm 0,001$), S1/F1 PVA Sobrenadante (PDI: $0,452 \pm 0,004$), S1/F1 PVA Precipitado (PDI: $0,374 \pm 0,009$), S1/F2 PVA Sobrenadante (PDI: $0,403 \pm 0,01$), S2 PVA Sobrenadante (PDI: $0,377 \pm 0,004$), S2 PVA Precipitado (PDI: $0,441 \pm 0,04$), S3 PVA Original (PDI: $0,487 \pm 0,02$) e S3 PVA Sobrenadante (PDI: $0,453 \pm 0,1$).

Além do PDI, a presença de mais de um pico no gráfico indica populações bem diferentes entre si e, o alargamento da base da curva indica AgNPs de tamanhos distintos. Apenas duas amostras apresentaram um único pico: S1/F1 PVA Precipitado (100%: dm: 174,1 nm) e S2 PVA sobrenadante (100%: dm: 30 nm) (Figura 11 i e n).

A amostra S3 PVA Sobrenadante (95,8%: dm: 44,23 nm e 4,2%: dm: 4,5 nm) e as amostras em aquecimento original e sobrenadante: S1 Aquecimento Original (85%: dm: 66,18 nm e 15%: dm: 2,8 nm), S1 Aquecimento Sobrenadante (79,2%: dm: 61,15 nm e 20,8 %: dm: 3,29 nm), S2 Aquecimento Original (90,9%: dm: 54,08, 9,1%: dm: 1,5 nm) e S2 Aquecimento Sobrenadante (90,6%: dm: 27,12 nm e 9,4%: dm: 1,29 nm) apresentaram duas populações diferentes, com pico bem definidos e não alargados (Figura 11 A, B, D, E e Q).

As demais amostras apresentaram heterogeneidade: S1 Aquecimento Precipitado (77,5%: dm: 166,60 nm, 19,3%: dm: 4,6 nm, 3,2%: dm: 418,3 nm), S2 Aquecimento Precipitado (75,8%: dm: 87,7 nm, 19,9%: dm: 3,98 nm, 4,3%: dm: 1,18 nm), S1/F1 Original (73,8%: dm: 60,94 nm, 26,2%: dm: 7,19 nm), S1/F1 Sobrenadante (90,2%: dm: 81,86 nm, 8,8%: dm: 9,6 nm), S1/F2 Original 74,5%: dm: 40,37 nm, 24,9%: dm: 2,67 nm, 0,6%: dm: 1,44 nm), S1/F2 Sobrenadante 74,6%: dm: 71,89 nm, 10,7%: dm: 5,8 nm, 14,7%: dm: 3,8 nm), S1/F2 Precipitado (92,2%: dm: 177,2 nm, 5,6%: dm: 5018 nm, 2,2%: dm: 38,52 nm), S2 PVA Original (83,1%: dm: 60,16 nm, 16,9%: dm: 5,46 nm), S2 PVA Precipitado (95%: dm: 125 nm, 3,4%: dm: 16 nm, 1,6%: dm: 3278 nm), S3 PVA Original (94,3%: dm: 57,83 nm, 4,5%: dm: 8,4 nm, 1,2%: dm: 1255 nm) e S3 PVA Precipitado (81,1%: dm: 72,90 nm, 15,7%: dm: 1739 nm e 3,2%: dm: 1,2

nm) (Figura 11 C, G, H, J, K, L, M, O, P e R).

Com o intuito de separar populações maiores das menores, decidiu-se centrifugar os lotes originais por pouco tempo (15 min). Esperava-se que AgNPs maiores precipitassem e as menores continuassem suspensas. Esse método foi eficaz para a maioria das amostras, exceto S1/F1 e S1/F2, que apresentaram populações maiores nas amostras sobrenadante: S1/F1 Original (73,8%: dm: 60,94 nm, 26,2%: dm: 7,19 nm) e S1/F1 Sobrenadante (90,2%: dm: 81,86 nm, 8,8%: dm: 9,6 nm); S1/F2 Original (74,5%: dm: 40,37 nm, 24,9%: dm: 2,67 nm, 0,6%: dm: 1,44 nm) e S1/F2 Sobrenadante 74,6%: dm: 71,89 nm, 10,7%: dm: 5,8 nm, 14,7%: dm: 3,8 nm) (Figura 11 G, H, J e K).

As demais amostras sobrenadante possuem populações com diâmetro menor, em comparação às suas amostras originais: S1 Aquecimento Sobrenadante (79,2%: dm: 61,15 nm e 20,8 %: dm: 3,29 nm) e S1 Aquecimento Original (85%: dm: 66,18 nm e 15%: dm: 2,8 nm); S2 Aquecimento Sobrenadante (90,6%: dm: 27,12 nm e 9,4%: dm: 1,29 nm) e S2 Aquecimento Original (90,9%: dm: 54,08, 9,1%: dm: 1,5 nm); S2 PVA sobrenadante (100%: dm: 30 nm) e S2 PVA Original (83,1%: dm: 60,16 nm, 16,9%: dm: 5,46 nm); S3 PVA Sobrenadante (95,8%: dm: 44,23 nm e 4,2%: dm: 4,5 nm) e S3 PVA Original (94,3%: dm: 57,83 nm, 4,5%: dm: 8,4 nm, 1,2%: dm: 1255 nm) (Figura B, A, E, D, N, M, Q e P).

Enquanto as amostras precipitado apresentaram populações diâmetro maior: S1 Aquecimento Precipitado (77,5%: dm: 166,60 nm, 19,3%: dm: 4,6 nm, 3,2%: dm: 418,3 nm), S2 Aquecimento Precipitado (75,8%: dm: 87,7 nm, 19,9%: dm: 3,98 nm, 4,3%: dm: 1,18 nm), S1/F1 PVA Precipitado (100%: dm: 174,1 nm), S1/F2 Precipitado (92,2%: dm: 177,2 nm, 5,6%: dm: 5018 nm, 2,2%: dm: 38,52 nm), S2 PVA Precipitado (95%: dm: 125 nm, 3,4%: dm: 16 nm, 1,6%: dm: 3278 nm) e S3 PVA Precipitado (81,1%: dm: 72,90 nm, 15,7%: dm: 1739 nm e 3,2%: dm: 1,2 nm) (Figura 11 C, F, I, L, O e R). Além disso, foi possível observar que populações maiores foram formadas, possivelmente devido à agregação no processo de centrifugação.

Uma vez que o diâmetro médio da amostra é calculado por todas as populações, decidiu-se nesse trabalho considerar o diâmetro médio da maioria populacional (moda), pois representa melhor a quase totalidade da amostra. O objetivo era produzir AgNPs com 30 ± 10 nm. Sabe-se que quanto menor o tamanho das AgNPs, maior a área interfacial e maior a interação da nanopartícula com as células, facilitando assim, o efeito citotóxico e antimicrobiano (Shahverdi *et al.*, 2007;

Durán *et al.*, 2019). Há um consenso na literatura de que AgNPs até 20 nm são as mais citotóxicas para diferentes linhagens celulares (Hernández-Sierra, 2011; Gliga *et al.*, 2014). Além disso, o formato das AgNPs influencia o mecanismo de captação celular, que por sua vez também modula a citotoxicidade (Akter *et al.*, 2018). AgNPs triangulares são mais citotóxicas que as esféricas (Agnihotri *et al.*, 2014). Diante disso, o diâmetro de escolha foi o diâmetro de 30 ± 10 nm.

Foi possível identificar que a maioria das amostras sobrenadante atendem os requisitos de tamanho: S2 Aquecimento Sobrenadante (80%: dm: 20,9 nm), S1F2 PVA Sobrenadante (84%: dm: 40 nm), S2 PVA Sobrenadante (100%: dm: 30 nm), S3 PVA Sobrenadante (80%: dm: 39,6 nm).

O diâmetro hidrodinâmico médio e a dispersão também foram analisados a longo prazo (7, 30 e 60 dias após a síntese), com o objetivo de avaliar a estabilidade das amostras e decidir as que continuariam na etapa de ensaios biológicos. As amostras que apresentaram diâmetro maior que 40 nm e PDI maior que 0,5 foram excluídas. A Figura 12 apresenta os dados de diâmetro médio (dm) e PDI das amostras após síntese e ao longo tempo. A linha preta nos gráficos representa o corte de exclusão.

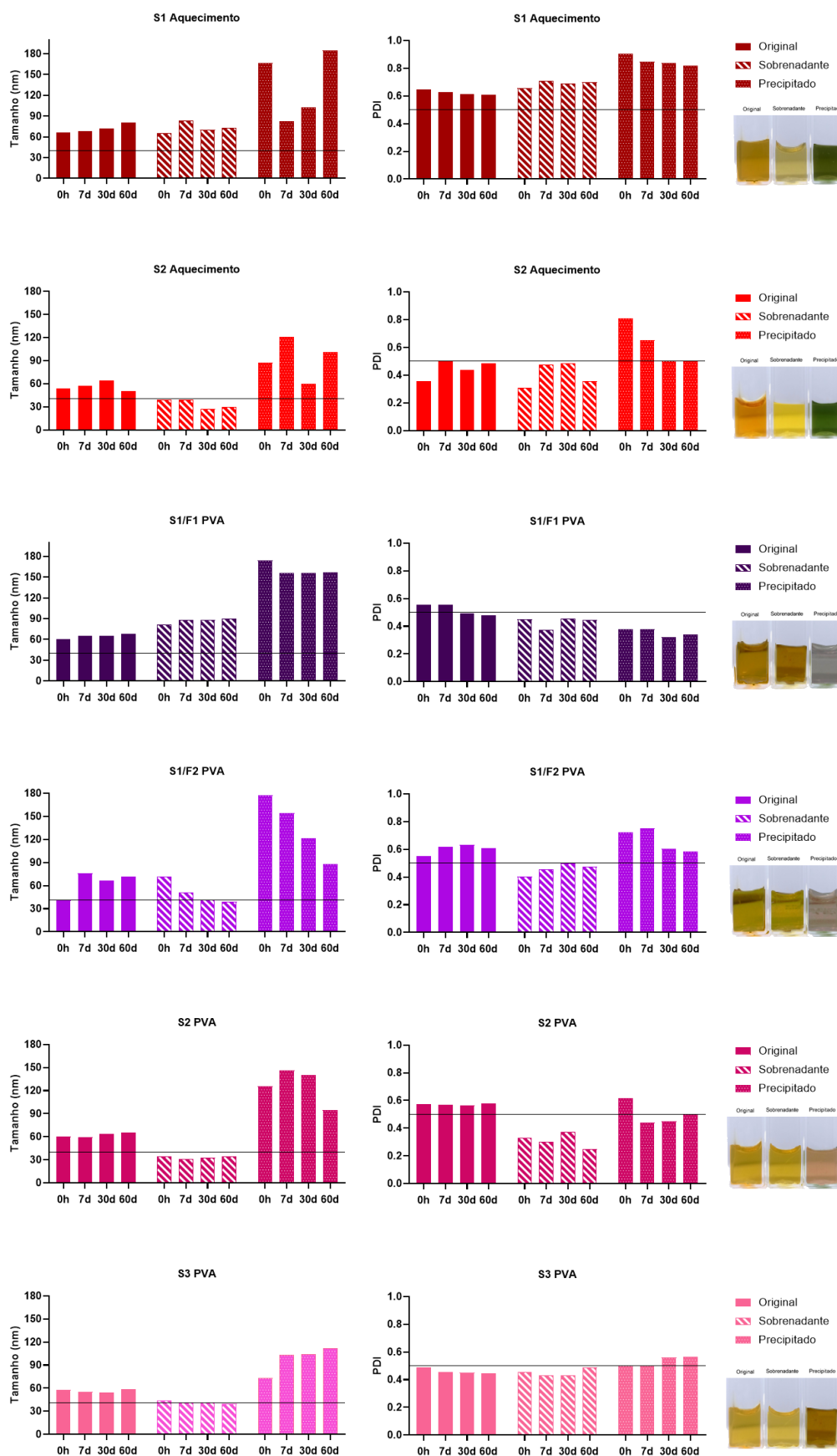


Figura 12. Diâmetro hidrodinâmico médio (dm) e PDI das amostras de AgNPs em água ao longo (0h, 7, 30 e 60 dias). A linha de corte representa limite para aprovação das amostras (dm: até 40 nm, PDI: até 0,5).

Foi possível observar que todas as amostras em precipitado sintetizadas em aquecimento ou em resfriamento, apresentam diâmetro médio da maioria populacional bem acima do estipulado, mesmo ao final dos 60 dias de análise (S1 Aquecimento Precipitado: dm: 184,95 nm, S2 Aquecimento Precipitado: dm: 101,10 nm, S1/F1 PVA Precipitado: dm: 157,10 nm, S1/F2 PVA Precipitado: dm: 87,79 nm, S2 PVA Precipitado: dm: 94,67 nm e S3 PVA Precipitado: dm 112,40 nm). Esses dados também corroboram com a coloração esverdeada e amarronzada, indicando agregação. Portanto, todas as amostras precipitado foram excluídas.

As amostras S1 Aquecimento (original e sobrenadante) extrapolaram os limites estipulados para dm e PDI, por isso também foram excluídas (60 dias: S1 Aquecimento Original: dm: 80,35 nm e PDI: 0,61; S1 Aquecimento Sobrenadante: dm: 73,45 nm e PDI: 0,7).

As amostras S1/F1 PVA (original e sobrenadante) apesar de terem apresentado PDI dentro limite (60 dias: S1/F1 PVA Original: PDI: 0,48 e S1/F1 PVA Sobrenadante PDI: 0,445), demonstrando estabilidade populacional, o diâmetro médio extrapolou o estipulado (60 dias: S1/F1 PVA Original: dm: 80,35 nm e S1/F1 PVA Sobrenadante: dm: 73,45 nm).

As demais amostras originais, sintetizadas tanto em aquecimento, quanto em resfriamento, apresentaram diâmetro médio além do estipulado (60 dias: S2 Aquecimento Original: dm: 50,46 nm, S1/F2 PVA Original dm: 71,55 nm, S2 PVA Original dm: 65,83 nm, S2 PVA Original dm: 58,50 nm), portanto, todas foram excluídas.

Já as amostras S2 Aquecimento Sobrenadante (60 dias: dm: 29,79 nm e PDI: 0,496), S1/F2 PVA sobrenadante (dm: 39,22 nm e PDI: 0,584) e S3 PVA sobrenadante (dm: 39,60 nm e PDI 0,490) apresentaram dm e PDI dentro do limite aceitável, por isso foram aprovadas. Completando, a amostra S2 PVA Sobrenadante apresentou o menor e mais estável tamanho hidrodinâmico médio, mantendo 100% da sua população com dm: 30 nm e PDI abaixo do esperado, 0,377, sendo, portanto, a amostra mais promissora.

Finalmente, as quatro amostras aprovadas: S2 Aquecimento Sobrenadante, S1F2 PVA Sobrenadante, S2 PVA Sobrenadante e S3 Sobrenadante, seguiram para outros ensaios de estabilidade e caracterização.

5.2 Caracterização das amostras aprovadas

Com o objetivo de verificar o comportamento das AgNPs diante das condições experimentais, o tamanho hidrodinâmico e o PDI das amostras diluídas em meios de cultura DMEM *low glucose* (DL) e *high glucose* (DH) suplementados com 10% SFB também foram analisados por DLS.

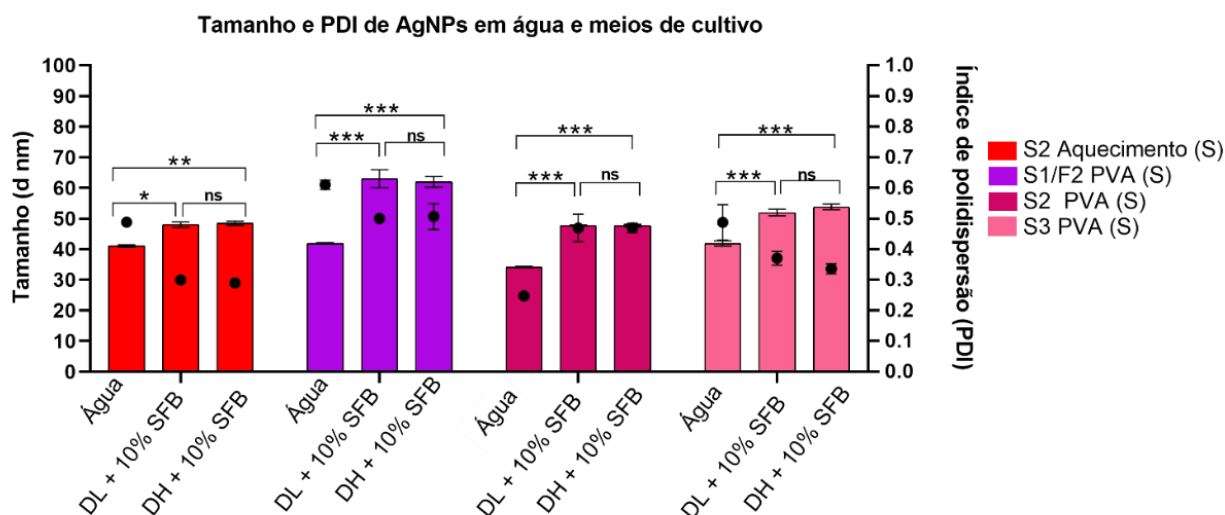


Figura 13. Tamanho e PDI de AgNPs em meios de cultivo DMEM *low glucose* (DL) e *high glucose* (DH) suplementados com 10% SFB. Os dados foram expressos em média $\pm$ DP ($n=3$). A análise estatística foi realizada através do teste one-way ANOVA com múltiplas comparações de Dunnett (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$, ns: não significativo).

Como esperado, o tamanho médio (dm) das amostras aumentou quando em contato com os meios de cultura (DL e DH) suplementados com 10% SFB. Não houve diferença significativa entre os tipos de meio. A amostra S2 Aquecimento Sobrenadante foi significativamente mais estável nos meios de cultura (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$) em comparação às amostras em resfriamento (*** $p < 0,001$).

Uma maneira de avaliar a adsorção espontânea e inespecífica de proteínas na superfície das AgNPs é através da carga superficial, que foi avaliada através do Potencial Zeta (PZ) das amostras, tanto das amostras em água, quanto em meio de cultura suplementado com 10% de SFB. A Figura 14 apresenta os resultados nominais do PZ de cada amostra em água e em meio de cultura.

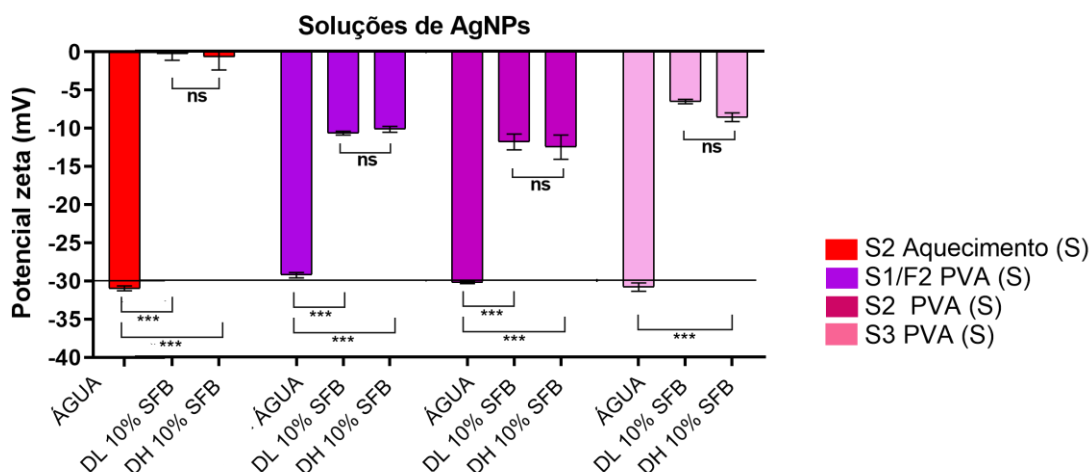


Figura 14. Potencial Zeta (PZ) das AgNPs em meios de cultivo DMEM *low* (DL) e *high* (DH). Os dados foram expressos em média $\pm$ DP ($n=3$). A análise estatística foi realizada através do teste one-way ANOVA com múltiplas comparações de Dunnett (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$, ns: não significativo).

Para a amostra S2 Aquecimento Sobrenadante, o valor nominal do PZ em água foi de -30,97 mV e em meios de cultivo: -0,31 mV (DL) e -0,71 mV (DH). Para a amostra S1/F2 Sobrenadante em água foi de -29,30 mV e em meios de cultivo: -10,7 mV (DL) e -10,19 mV (DH). Para a amostra S2 PVA Sobrenadante em água foi de -30,02 mV e em meios de cultivo: -11,84 mV (DL) e -12,53 mV (DH). Por fim, o valor encontrado para a amostra S3 PVA Sobrenadante em água foi de -30,87 mV e em meios de cultivo: -6,55 mV (DL) e -8,62 mV (DH).

No ambiente *in vivo*, ao entrarem em contato com fluidos biológicos, as AgNPs podem ser revestidas por uma coroa biomolecular, formando uma estrutura chamada proteína-corona. A proteína-corona é um sistema dinâmico formado principalmente por proteínas que revestem as AgNPs conferindo uma nova identidade, resultando em perda ou ganho de função (Mirsili *et al.*, 2022). De maneira geral, para que uma suspensão de AgNPs seja considerada estável, o valor nominal de PZ precisa ser inferior à -30 mV ou superior à +30 mV, enquanto as regiões intermediárias a esses valores indicam condições instáveis (Câmara *et al.*, 2021).

A amostra S2 PVA Sobrenadante analisada em água apresentou valor nominal de PZ (-30,02 mV) mais próximo do valor de estabilidade (-30mV), dentre todas as amostras em água. Embora as outras amostras também tenham apresentado valor muito próximo da estabilidade (S2 Aquecimento: -30,97 mV, S2/F2 PVA Sobrenadante: -30,02 mV, S3 PVA Sobrenadante: -30,87 mV).

Já as amostras analisadas em meio de cultura indicaram maior instabilidade de

carga, sendo possivelmente causada pela interação com as proteínas. E não houve diferença estatística entre os meios DH e DL em todos os grupos. Além disso, foi possível observar que as amostras PVA são mais estáveis, uma causa provável é a estabilidade gerada pela adsorção do PVA na sua superfície das AgNPs.

Para avaliar a morfologia e distribuição de tamanho das AgNPs, foi utilizada a análise em microscopia eletrônica de transmissão (MET). Na imagem é possível observar que as AgNPs das quatro amostras apresentaram morfologia predominantemente arredondada e heterogeneidade de tamanhos. Além disso, todas as amostras apresentaram tamanho na escala nanométrica (até 100 nm).

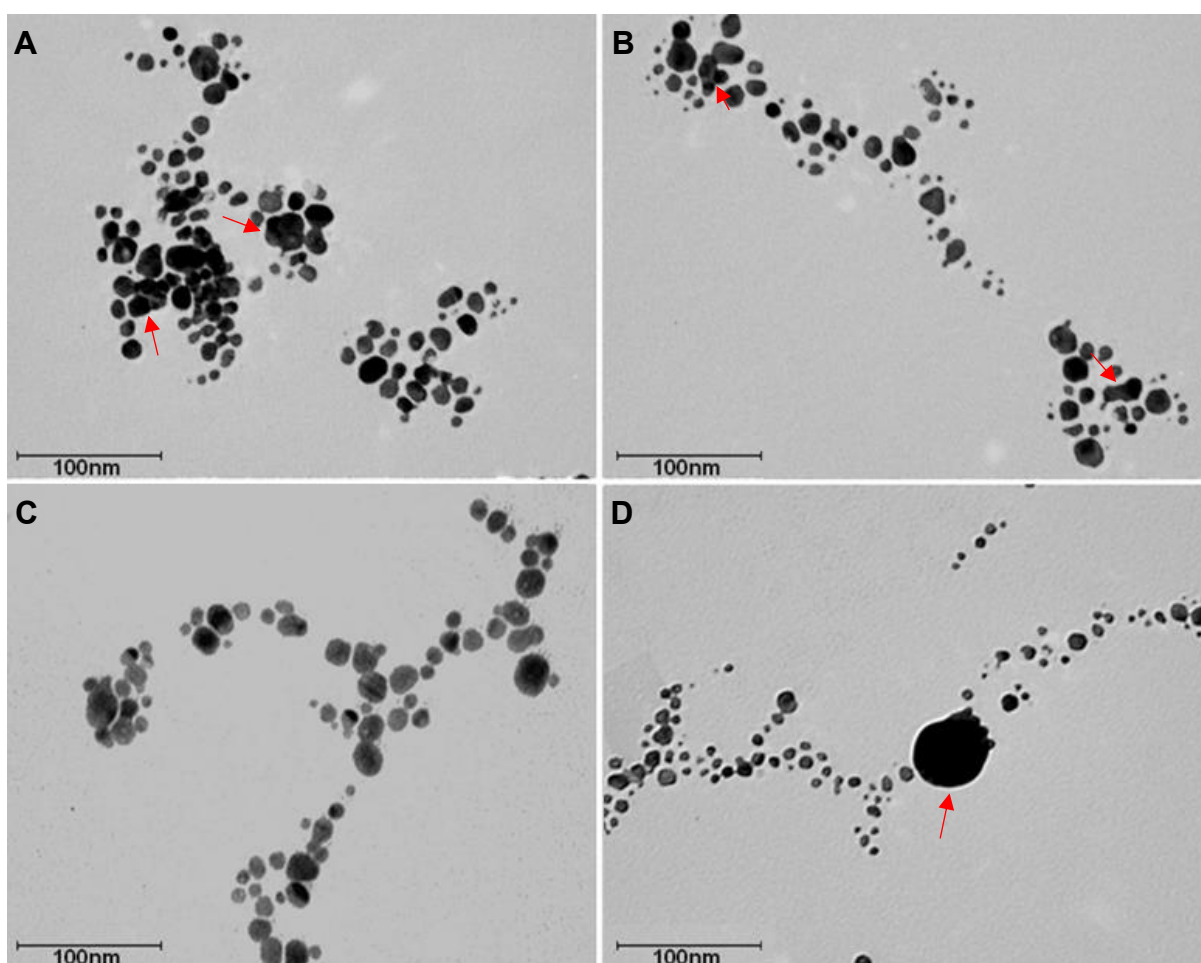


Figura 15. Tamanho e morfologia de AgNPs por Microscopia Eletrônica de Transmissão. (a) Amostra S2 Aquecimento Sobrenadante. (b) Amostra S2/F2 PVA Sobrenadante. (c) Amostra S2 PVA Sobrenadante, (d) Amostra S2 PVA Sobrenadante. A micrografia demonstra que as AgNPs apresentam morfologia majoritariamente esférica, populações variadas, sendo possível observar aglomerados/agregados (setas vermelhas). Escala: 100 nm.

Uma vez que a suspensão coloidal das AgNPs é pingada na grade de microscopia e aguarda-se até sua completa secagem para análise, é esperada a aproximação das AgNPs. No entanto, foi possível observar presença de agregados/aglomerados nas amostras S2 Aquecimento sobrenadante (Figura 15 A), S1/F2 PVA sobrenadante (Figura 15 B) e S3 PVA sobrenadante (Figura 15 D), indicados por setas vermelhas. A diferença entre aproximação e agregação/aglomeração é a impossibilidade de estabelecer o limite de borda das AgNPs.

Também foi possível observar que a amostra S2 PVA sobrenadante apresentou uma maior dispersão e homogeneidade, sem presença de aglomerados e agregados (Figura 15 C). Esse resultado corrobora com os dados obtidos de diâmetro médio das AgNPs por DLS, cuja amostra manteve-se estável ao longo dos 60 dias, apresentando um único pico com dm : 30 nm.

A análise elementar por EDS confirmou a natureza química das AgNPs. Na Figura 16, é possível verificar graficamente a presença majoritária dos elementos prata (Ag) e carbono (C), além dos elementos sódio (Na), oxigênio (O) e contaminante, o cloro (Cl), presente na amostra S3 PVA Sobrenadante. O carbono pode ser explicado pela composição da fita que recobre o *stub* de amostra (fita de carbono). Os demais elementos, foram oriundos dos reagentes utilizados para a síntese (TSC ou PVA, $NaBH_4$ e $AgNO_3$). Já o cloro (Cl), possivelmente foi oriundo do ácido de lavagem da vidraria. A presença de impurezas é um ponto negativo, visto que podem ser sítios de nucleação para AgNPs, tornando a amostra instável (Melo Jr et al., 2012).

O pico de intensidade do espectro está diretamente relacionado a quantidade de elemento na amostra. As amostras S1/F2 PVA e S2 PVA Sobrenadante foram as que mais apresentaram intensidade de pico de Ag. E a amostra S2 Aquecimento Sobrenadante foi a amostra com menor intensidade de prata.

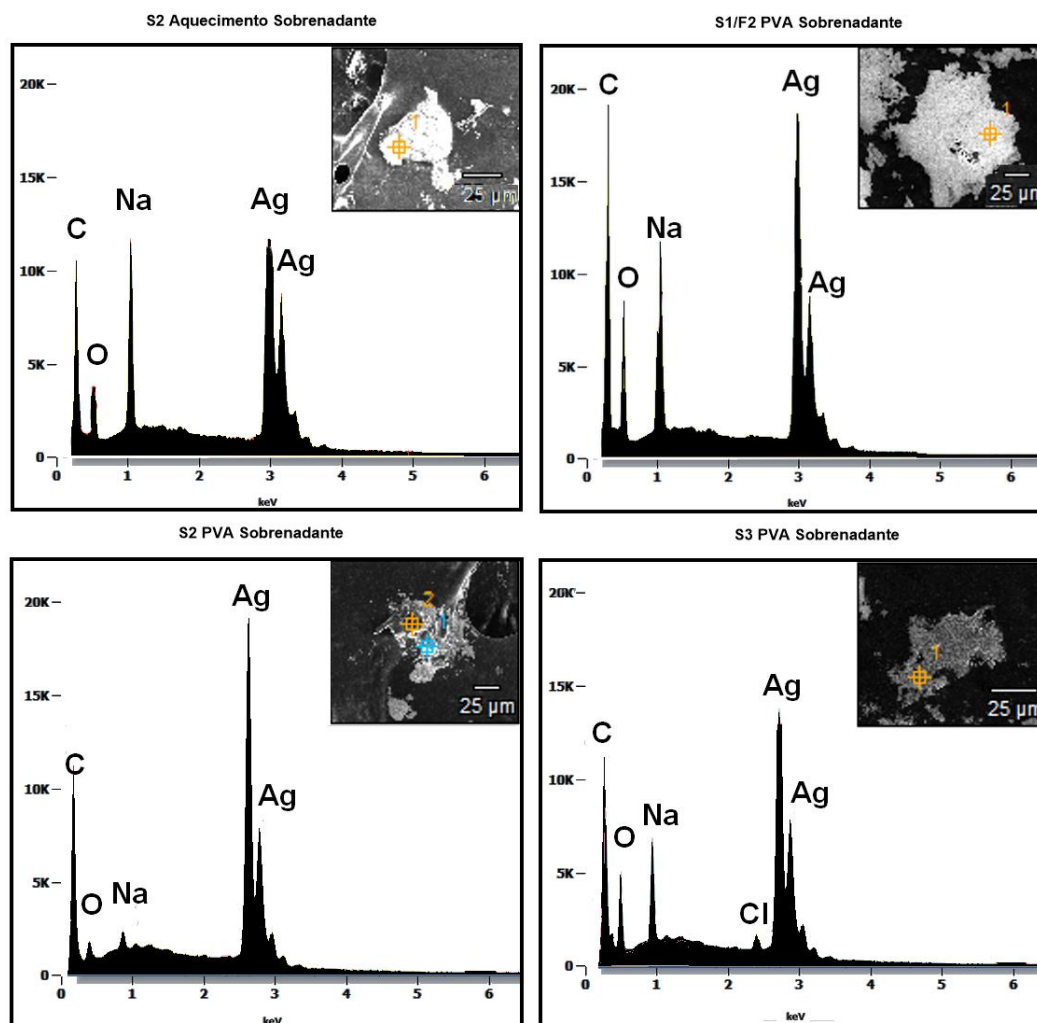


Figura 16. Composição elemental por Energia Dispersiva de Raios X as amostras de AgNPs. Ag (prata), O (oxigênio), Na (sódio), C (carbono) e Cl (cloro). Imagens provenientes da análise no MEV na escala de 25 μm.

5.7 Determinação do potencial antimicrobiano

O efeito de um antimicrobiano contra um microrganismo é frequentemente medido como a concentração inibitória mínima (CIM ou MIC) associada a 50% do efeito (IC_{50}) ou a concentração bactericida mínima (CBM) (Bury-Moné, 2014). Para calcular a CIM, foram feitas diluições seriadas das AgNPs que desafiaram as cepas bacterianas resistentes do canal radicular (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterococcus faecalis*). A viabilidade bacteriana foi determinada através do ensaio de MTT. O IC_{50} calculado a partir da curva logarítmica dos dados de citotoxicidade. Os resultados de MIC e IC_{50} das diferentes amostras de AgNPs estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 2. Valores de MIC e IC₅₀ das AgNPs para diferentes cepas bacterianas

	S2 Aquecimento (µg/mL)		S1F2PVA (µg/mL)		S2PVA (µg/mL)		S3PVA (µg/mL)		NANoREG (µg/mL)	
	MIC	IC ₅₀	MIC	IC ₅₀	MIC	IC ₅₀	MIC	IC ₅₀	MIC	IC ₅₀
<i>Escherichia coli</i>	> 250	> 250	> 250	> 250	250	104,301± 8,994	>250	> 250	250	109,55± 2,430
<i>Staphylococcus aureus</i>	> 250	148,155± 8,894	125	64,895± 20,875	125	54,827± 6,876	125	43,431± 6,769	62,5	28,753± 3,909
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	250	128,571± 5,495	62,5	19,353± 1,048	31,25	17,817± 2,554	31,25	27,612± 0,937	31,25	24,550± 2,387
<i>Enterococcus faecalis</i>	250	143,484± 15,321	125	52,611± 4,384	125	40,851± 2,846	250	54,833± 5,136	61,25	41,885± 6,512

Foi possível observar que para *E. coli* todas as amostras de AgNPs apresentaram MIC, pelo menos, a partir de 250 µg/mL. A amostra S2 Aquecimento Sobrenadante foi a que apresentou maiores valores de MIC (a partir de 250 µg/mL) e IC₅₀ (a partir de 128,571 ± 5,495 µg/mL).

As amostras em resfriamento, S1F2 PVA Sobrenadante, S2 PVA Sobrenadante e S3 PVA Sobrenadante, apresentaram valores similares de MIC. Para *S. aureus* apresentaram MIC igual a 125 µg/mL; para *P. aeruginosa* apresentaram MIC igual 62,5 µg/mL (S1/F2 PVA) e 31,25 µg/mL (S2 PVA e S3 PVA); para *E. faecalis* apresentaram MIC igual a 125 µg/mL (S1/F2 PVA e S2 PVA) e 250 µg/mL (S3 PVA). A amostra S2 PVA Sobrenadante foi a que apresentou MIC e IC₅₀ e mais próximo das AgNPs NANoREG.

A MIC é a menor concentração de um agente antimicrobiano capaz de inibir o crescimento visível. A MBC é a menor concentração de antibiótico necessária para matar 99,9% do inóculo inicial (Pankey e Sabath, 2004). A MBC de todas as amostras foi igual à MIC, este é um ponto positivo, pois os antimicrobianos só são considerados bactericidas, se a MBC não for mais do que quatro vezes o valor da MIC.

As amostras em resfriamento (S1F2 PVA, S2 PVA e S3 PVA Sobrenadante) foram mais bactericidas, quando comparadas a amostra S2 Aquecimento Sobrenadante. Este é um resultado inesperado, visto que as AgNPs em resfriamento possuem PVA recobrindo sua superfície e, modificações da superfície das nanopartículas modulam sua toxicidade. Polímeros como PVA e PEG tendem a diminuir a citotoxicidade da AgNPs (Durán, 2018). Uma possível explicação para tal resultado, seria a pouca quantidade de prata na amostra S2 Aquecimento Sobrenadante observada por EDS.

Um dos mecanismos de ação da prata são principalmente atribuídos aos íons de prata. As AgNPs liberam continuamente íons de prata em um microambiente aquoso (Lok *et al.*, 2007) e devido à maior área de superfície, elas mostram um efeito bactericida potencializado (Akter *et al.*, 2018). Bactérias Gram-negativas são mais suscetíveis a ação de íons Ag⁺ do que bactérias Gram-positivas, a razão para a suscetibilidade diferente está no peptidoglicano, que é um componente presente na membrana celular bacteriana. A parede celular em bactérias Gram-positivas é composta por uma camada de peptidoglicano com carga negativa de aproximadamente 30 nm de espessura, enquanto as bactérias Gram-negativas possuem apenas 3 a 4 nm (Jun e Lee, 2019; Meike *et al.*, 2020).

Escherichia coli e *Pseudomonas aeruginosa* são bacilos Gram-negativos, enquanto *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus faecalis* são cocos Gram-positivos, ambos presentes em infecções secundárias do canal radicular. Ainda *E. faecalis* tem sido associada aos casos de infecção persistente (Siqueira e Rôças, 2008). Portanto, esperava-se que as AgNPs fossem mais eficientes para *E. coli* e *P. aeruginosa*. Evidenciou-se que os valores de MIC para *P. aeruginosa* foram as menores, entretanto, para *E. coli* foram os maiores.

É comumente reconhecido que AgNPs menores que 10 nm podem alterar diretamente a permeabilidade celular, entrar em células bacterianas e causar danos celulares. Parvekar e colaboradores (2020) investigaram a MIC e MBC de AgNPs com 5 nm frente *Staphylococcus aureus*, também pelo método de diluição em caldo, e encontram MIC e MBC igual a 0,625 mg/mL (Parvekar *et al.*, 2020). Esse valor é 5x maior ao que encontramos (125 µg/mL). Outro estudo anterior demonstrou que MIC e MBC de AgNPs de 10 nm está em concentrações de 1,35 mg/mL contra *S. aureus* (Vanesa *et al.*, 2009). Esse valor é 10x maior ao que demonstramos. Agnihotri e colaboradores (2014) avaliaram diferentes tamanhos de AgNPs e demonstraram que AgNPs com tamanho menor que 10 nm apresentam maior efeito antimicrobiano. Apesar das AgNPs usadas neste estudo terem tamanho médio aproximado a 30 nm, os resultados de efeito antimicrobiano foram mais desejáveis para *S. aureus*.

Para *Pseudomonas aeruginosa*, os valores de MIC foram bem divergentes. Enquanto dois estudos encontraram valores de MIC baixos, outro se aproximou aos nossos achados. Veorica e colaboradores (2017) sintetizaram AgNPs esféricas, com 19 ± 2 nm, por síntese verde e apresentaram MIC igual a 6,25 µg/mL. Brown e colaboradores realizaram síntese por redução, utilizando citrato e encontraram MIC igual a 4 µg/mL. Já Amirulhusni e colaboradores (2012) realizaram síntese por rota química, produzindo AgNPs com 20 nm e encontraram MIC igual a 100 µg/mL e MBC igual a 200 µg/mL.

Lesões perirradiculares resistentes, associado a falhas endodônticas e infecções secundárias são predominantemente causadas por *Enterococcus faecalis*. Por ser uma bactéria anaeróbica facultativa, pode suportar condições extremas e ainda possui resistência a antibióticos, soluções irrigantes convencionais (como hipoclorito de sódio e clorexidina), medicamentos intracanaís e alto pH alcalino (Alghamdi e Shakir, 2020). Buscando mitigar os problemas relatados, soluções intracanaís, contendo AgNPs, vêm sendo estudadas (Kaukab *et al.*, 2023). Devido

suas características de resistência, espera-se que as concentrações de AgNPs eficazes contra *E. faecalis* sejam altas. Um estudo demonstrou concentração de MIC igual a 300 µg/mL e CBM igual a 900 µg/mL (Marín-Correa *et al.*, 2020). Felizmente, nossos valores encontrados de MIC e MBC para *E. faecalis* foram 125 µg/mL e 250 µg/mL, a depender da amostra.

Finalmente, os efeitos antibacterianos dos medicamentos são rotineiramente avaliados por difusão em ágar. A vantagem do ensaio de microdiluição em caldo sobre o método de difusão em ágar é que ele é independente das propriedades de difusão do material e do meio testados. Uma limitação importante deste estudo é que ele foi realizado em bactérias planctônicas. As infecções endodônticas são principalmente polimicrobianas e apresentam propriedades diferentes no biofilme. O biofilme é tolerante às AgNPs e sua difusão tem relação com o seu tamanho e suas características físico-químicas. AgNPs maiores que 50 nm terão dificuldade de difusão pelo biofilme (Yin *et al.*, 2020). Estudos adicionais são necessários para avaliar o efeito antimicrobiano das nanopartículas de prata em biofilme.

Diante do exposto até aqui, considerando que a amostra S2 PVA Sobrenadante apresentou bom desempenho no ensaio antimicrobiano e maior estabilidade ao longo do tempo, diâmetro médio dentro do esperado (dm: 30 nm) e baixo PDI (0,377), decidiu-se usá-la na adição ao cimento MTA. E para determinar a melhor concentração para incorporação, foi realizado ensaio de viabilidade celular por MTT nas células FGH e MG-63.

5.8 Ensaio de viabilidade celular por MTT frente às concentrações candidatas à incorporação

Usar apenas a MIC não é suficiente para eliminar completamente as populações bacterianas, especialmente em casos de microrganismos persistentes e que formam biofilme bacteriano. Por isso, a utilização de concentrações de antimicrobianos acima da MIC é uma prática recomendada para garantir a eficácia do tratamento e prevenir a resistência bacteriana (Russell e McDonnell, 2000; Prashik *et al.*, 2020; Jones e Joshi, 2021). Partiu-se então das maiores concentrações de MIC (125 e 250 µg/mL) e testou-se a citotoxicidade destas concentrações e de concentrações ainda maiores (350, 500 e 750 µg/mL) às células FGH e MG-63, em

diferentes tempos (24, 48 e 72h). Os resultados da exposição das AgNPs S2 PVA às linhagens estão apresentados na Figura 17.

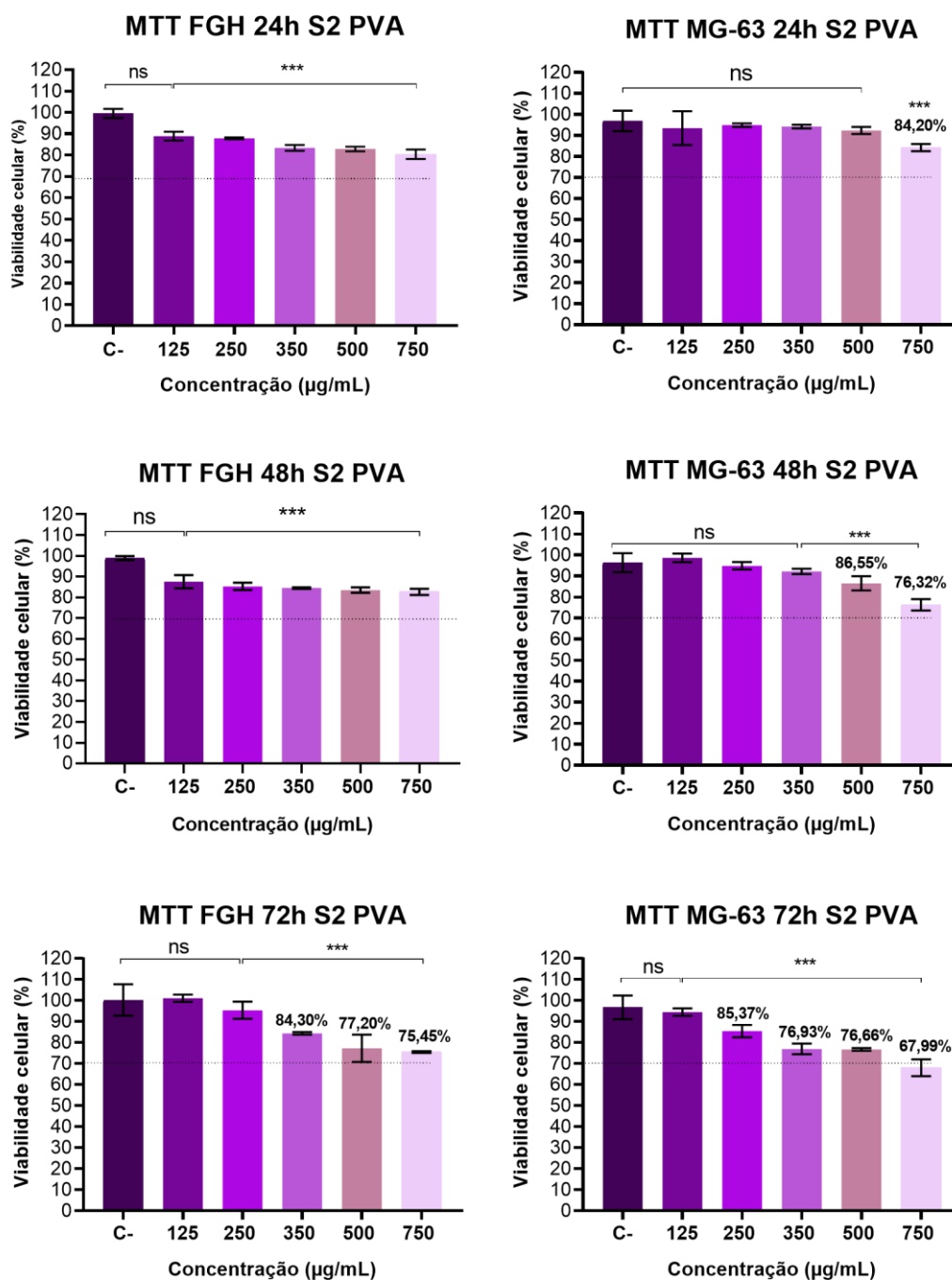


Figura 17. Viabilidade celular. Ensaio de redução de MTT realizado em exposição das linhagens FGH e MG-63 às AgNPs S2 PVA, nas concentrações de 125, 250, 350, 500 e 750 µg/mL, nos tempos de 24, 48 e 72h. O controle positivo foram células não expostas. O controle de morte foi Triton™ X-100 0,1%. Foram realizados três experimentos independentes. A análise estatística foi realizada através do teste one-way ANOVA com múltiplas comparações de Dunnett comparado ao grupo controle (células viáveis) (*p <0,05; **p <0,01; ***p <0,001, ns: não significativo).

Os resultados apresentam redução significativa da atividade mitocondrial das células FGH, quando comparadas ao controle ($***p < 0,001$), em todos os tempos (24, 48 e 72h). Essa redução é ainda maior ($***p < 0,001$) em 72h, sobretudo nas concentrações de 350, 500 e 750 $\mu\text{g/mL}$ de AgNPs S2 PVA Sobrenadante (viabilidade: $84,30\% \pm 0,65$, $77,20\% \pm 6,50$, $75,45\% \pm 0,40$, respectivamente).

Os resultados também demonstram que, em 24h, houve redução significativa da atividade mitocondrial das células MG-63, quando comparadas ao controle ($***p < 0,001$), apenas na concentração de 750 $\mu\text{g/mL}$ de AgNPs S2 PVA Sobrenadante (viabilidade: $84,20\% \pm 1,74$). Em 48h, houve redução ($***p < 0,001$) em 500 e 750 $\mu\text{g/mL}$ de AgNPs S2 PVA Sobrenadante (viabilidade: $86,45\% \pm 3,40$ e $76,32\% \pm 2,67$, respectivamente). Já em 72h, a redução ($***p < 0,001$) foi evidente a partir de 250 $\mu\text{g/mL}$ de AgNPs S2 PVA Sobrenadante (viabilidade: $85,37\% \pm 2,92$, $76,93\% \pm 2,55$, $76,66\% \pm 0,64$ e $67,99\% \pm 3,99$ respectivamente).

Halkai e colaboradores (2019) investigaram a citotoxicidade de AgNPs, em 24h, em fibroblastos gengivais humanos e encontraram o IC_{50} de 260 $\mu\text{g/mL}$. Hernández-Sierra e colaboradores (2011) demonstraram que AgNPs de 15-20 nm apresentam citotoxicidade, por MTS, para fibroblastos do ligamento periodontal humano a partir de 25 $\mu\text{g/mL}$, em 24, 48 e 72h, tendo a diminuição da viabilidade aumentada com o tempo. Já AgNPs de 80-100 nm não apresentaram diminuição da viabilidade. Nós encontramos redução da atividade mitocondrial de células FGH e MG-63 também tempo-dose dependente, a partir de 250 $\mu\text{g/mL}$. Esses dados demonstram que nossas AgNPs são menos citotóxicas, podendo ser explicadas pelo recobrimento das AgNPs com PVA, corroborando com os resultados de Niska e colaboradores (2016) que encontraram diferença estatisticamente significativa na redução da citotoxicidade de AgNPs nas células FGH, quando recobertas com ácido tânico, polietileno glicol (PEG) e ácido lipoico.

Conforme estabelecido na ISO 10993-5:2009 (Avaliação biológica de dispositivos médicos – testes de citotoxicidade *in vitro*), a redução de viabilidade celular é considerada biologicamente significativa quando atinge uma diminuição de 30%. Em 72h, na concentração de 750 $\mu\text{g/mL}$, a viabilidade das células MG-63 foi de $67,99\% \pm 3,99$, evidenciando citotoxicidade. Diante dos resultados, considerando ainda que a resposta citotóxica frente a AgNPs relatada na literatura é dose-tempo-dependente (Padmini *et al.*, 2022; Matysiak-kucharek *et al.*, 2023), decidiu-se usar a concentração de 500 $\mu\text{g/mL}$ para incorporação no cimento MTA.

5.9 Avaliação do potencial citotóxico dos cimentos modificados com AgNPs por MTT, LDH e ROS

Após o período de preparo de extratos (24h), foi realizado o ensaio de MTT por contato indireto a fim de verificar o potencial citotóxico do cimento MTA modificado com 500 µg da amostra S2 PVA Sobrenadante, comparado ao cimento MTA puro, nas linhagens celulares FGH e MG-63. Os ensaios ocorreram em 24h e concentrações de extrato (25 %, 50%, 75% e 100%) diferentes. Os resultados da viabilidade celular estão apresentados na Figura 18.

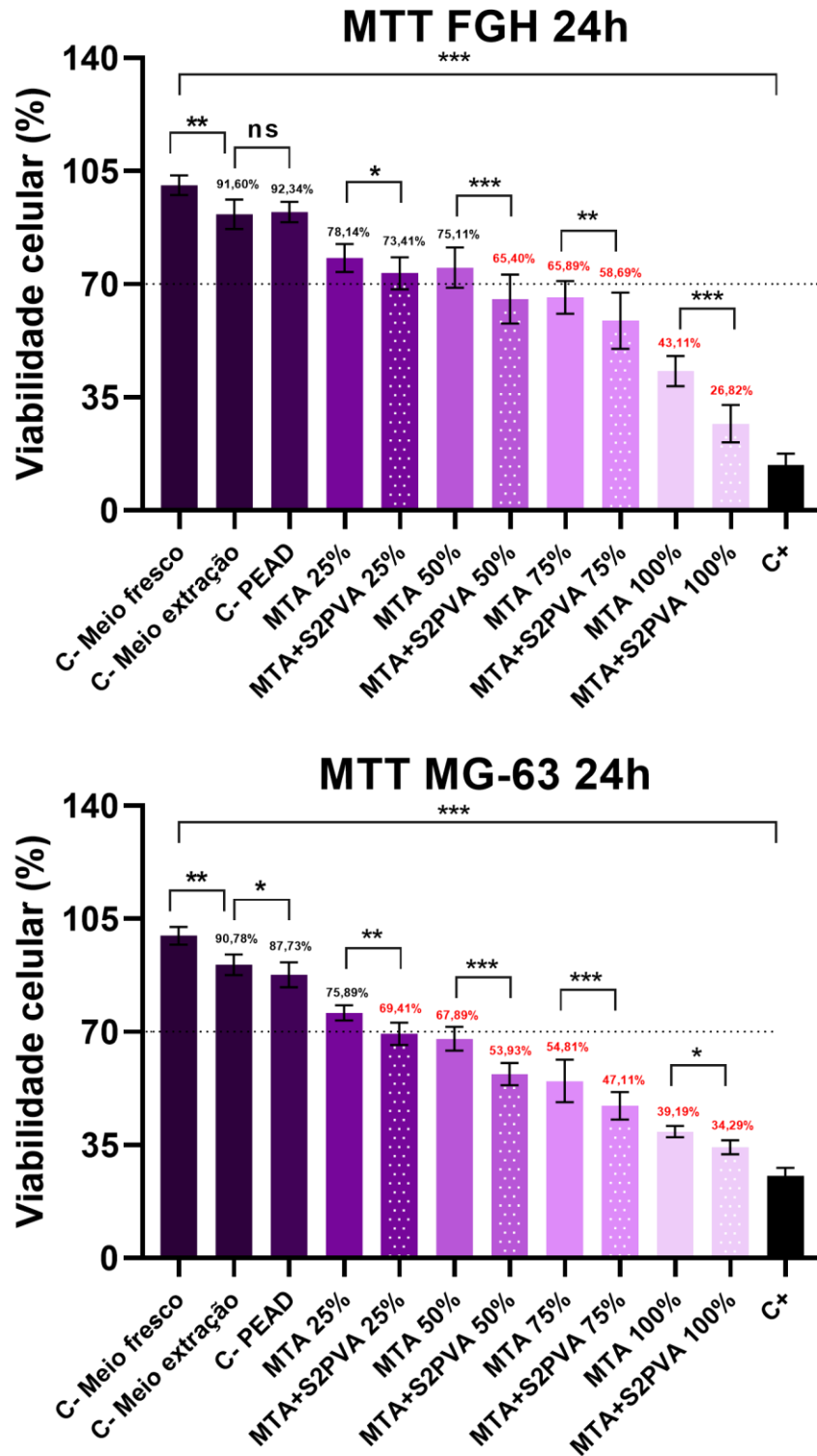


Figura 18. Viabilidade celular. Ensaio de redução de MTT realizado por contato indireto nas linhagens FGH e MG-63 aos extratos do cimento MTA puro (comparação) e MTA S2PVA, nas concentrações 25, 50, 75 e 100% dos extratos, em 24h. O controle positivo foram células não expostas. O controle de morte foi Triton™ X-100 a 0,1%. Os controles de experimento foram PEAD e extração. Foram realizados três experimentos independentes. A análise estatística foi realizada através do teste one-way ANOVA com múltiplas comparações de Dunnett comparado ao respectivo grupo controle (células viáveis) (*p <0,05; **p <0,01; ***p <0,001, ns: não significativo).

Primeiramente, os resultados demonstraram que há redução de aproximadamente de 10% (FGH: $91,60\% \pm 4,56$ e MG-63: $90,78\% \pm 3,21$) da viabilidade celular apenas pelo contato das células com o meio de extração (meio de cultura sob a mesma condição em que os extratos são produzidos), quando comparados ao controle negativo (meio de cultura fresco) ($**p < 0,01$). O PEAD (polietileno de alta densidade) é um material conhecidamente não citotóxico, mas foi possível observar uma pequena diminuição da atividade mitocondrial das células FGH ($92,34\% \pm 3,10$, $**p < 0,001$) e MG-63 ($87,73\% \pm 3,09$, $***p < 0,001$), quando comparados ao controle negativo.

Em relação ao material teste, os resultados demonstraram que houve uma redução estaticamente significativa da viabilidade celular tempo-dose-material dependente, em ambas as células. Os extratos contendo o MTA modificado com AgNPs S2 PVA Sobrenadante reduziram mais a viabilidade celular do que os extratos contendo o MTA puro, sendo possível observar esse comportamento nas duas células e em todas as concentrações testadas. De maneira geral, as células MG-63 foram bem mais sensíveis aos extratos do que as células FGH.

Os resultados também demonstraram citotoxicidade ($***p < 0,001$) para as células FGH a partir do contato com os extratos a 50% do cimento MTA modificado com AgNPS, da seguinte forma: 50% MTA + S2PVA: viabilidade $65,40\% \pm 5,70$; 75% MTA + S2PVA: viabilidade $58,69\% \pm 8,60$; 100% MTA + S2PVA: viabilidade $26,82\% \pm 5,80$). Nas células MG-63, foi possível observar citotoxicidade ($***p < 0,001$) a partir do contato com os extratos a 25% do cimento MTA modificado com AgNPS, da seguinte forma: 25% MTA + S2PVA: viabilidade $69,41 \pm 3,47$; 50% MTA + S2PVA: viabilidade $53,93 \pm 3,39$; 75% MTA + S2PVA: viabilidade $47,11 \pm 4,26$ 100% MTA + S2PVA: viabilidade $34,29 \pm 2,15$).

Para complementar os resultados de citotoxicidade celular avaliados pelo ensaio de MTT, também foi dosada a quantidade da enzima lactato-desidrogenase (LDH) presente no sobrenadante celular. Os resultados de citotoxicidade expressos pela liberação de LDH, que podem ser observados na Figura 19, logo abaixo, e demonstram a liberação de LDH de maneira tempo-dose-dependente. Esses dados confirmam que há rompimento de membrana das células não viáveis e presença de necrose e que as células MG-63 apresentaram maior rompimento da membrana plasmática em comparação às células FGH.

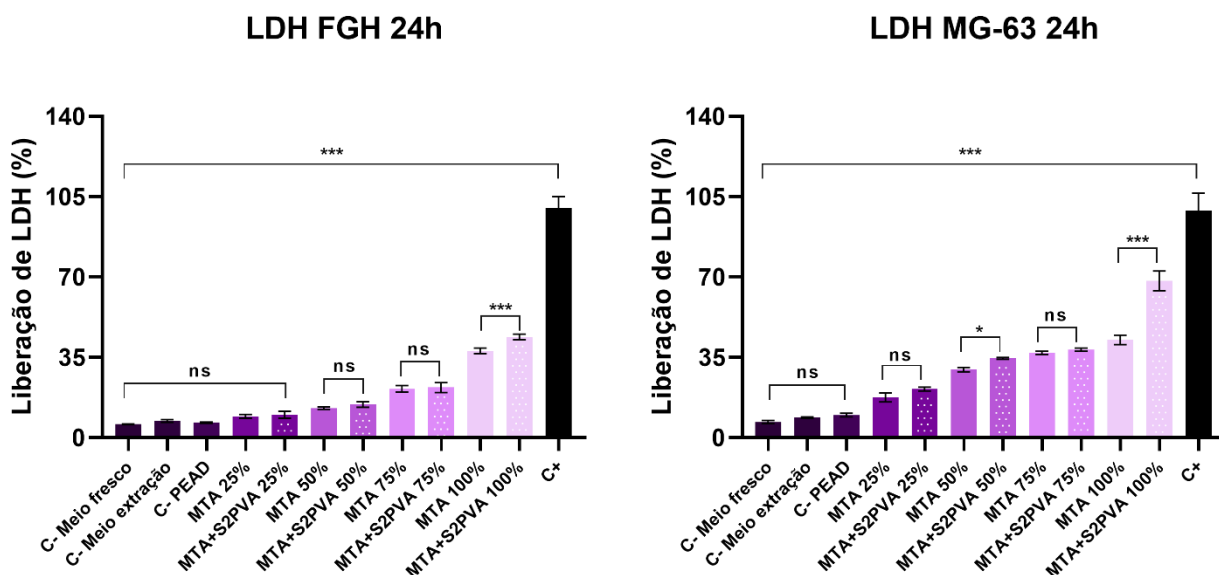


Figura 19. Citotoxicidade celular. Ensaio de liberação de LDH realizado por contato indireto nas linhagens FGH e MG-63 aos extratos do cimento MTA puro (comparação) e MTA S2PVA, nas concentrações 25, 50, 75 e 100% dos extratos, em 24h. O controle positivo foram células não expostas. O controle de morte foi Triton™ X-100 a 0,1%. Os controles de experimento foram PEAD e extração. Foram realizados três experimentos independentes. A análise estatística foi realizada através do teste one-way ANOVA com múltiplas comparações de Dunnett comparado ao respectivo grupo controle (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$, ns: não significativo).

Considerando que AgNPs geram estresse oxidativo par as células e que a superprodução de ROS pode desnaturar diferentes proteínas, levando a morte celular, também foi dosada a quantidade de espécies reativas de oxigênio (ROS) intracelulares. Os resultados expressos pela quantificação de ROS, que podem ser observados na Figura 20, logo abaixo, demonstram houve pequena produção de ROS pelas células expostas. E ainda, foi possível observar maior produção de ROS pelas células MG-63 em comparação às células FGH.

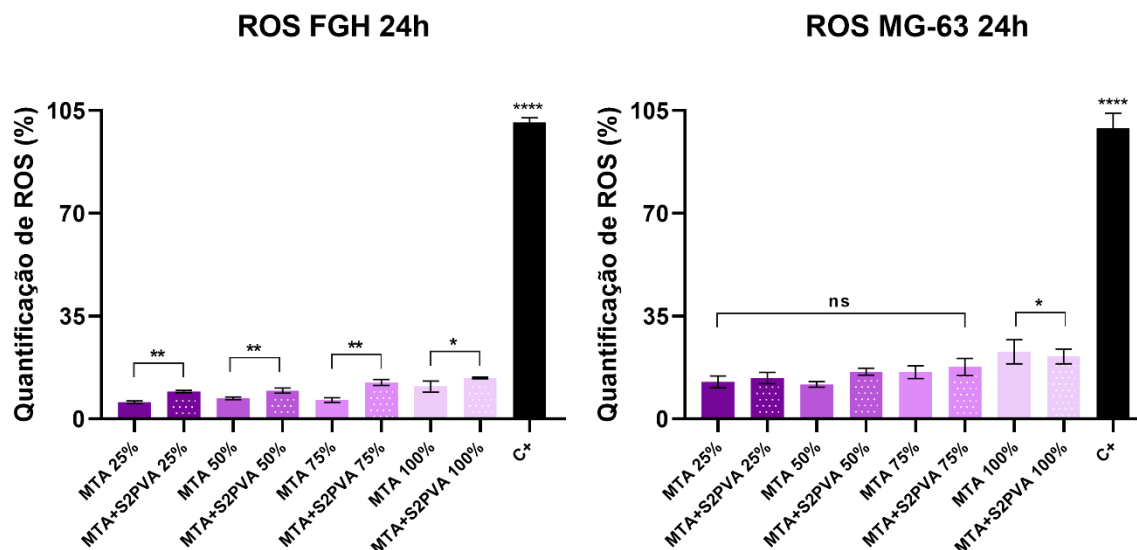


Figura 20. Ensaio quantificação de ROS intracelulares realizado por contato indireto nas linhagens FGH e MG-63 aos extratos do cimento MTA puro (comparação) e MTA S2PVA, nas concentrações 25, 50, 75 e 100% dos extratos, em 24h. O controle positivo foram células não expostas. O controle de morte foi H_2O_2 a 5M. A análise estatística foi realizada através do teste one-way ANOVA com múltiplas comparações de Dunnett comparado ao respectivo grupo controle (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$, ns: não significativo).

Muitos estudos relatam que o cimento MTA é biocompatível, e a fabricante Angelus também afirma essa característica, principalmente se comparado a outros cimentos (Parirokh e Torabinejad, 2010). Um estudo que avaliou a viabilidade celular, por MTT, utilizando diferentes concentrações de extrato do MTA (50%, $\approx 33,33\%$, 20% e $\approx 11,11\%$), durante 48h e 7 dias, em fibroblastos do ligamento periodontal humano e demonstraram aumento na atividade mitocondrial, sugerindo uma tentativa de recuperação tecidual (Coaguila-Llerena *et al.*, 2016). Esses dados corroboram com outro estudo que também avaliou a viabilidade celular, por MTT, expondo extratos do MTA em células MC3T3 (pré-osteoblásticas de camundongo), durante 24h, 72h e 7 dias e demonstraram aumento na atividade mitocondrial (Abrão *et al.*, 2023).

DSouza e colaboradores (2023) desenvolveram um cimento experimental a base de silicato de cálcio incorporado com AgNPs 0,5% e, após avaliarem seu efeito citotóxico, por MTT, através do contato direto dos pallets produzidos sobre a monocamada de FGH, durante 24 h, 48 h e 72 h, concluíram que o cimento experimental não apresentou citotoxicidade.

Em contrapartida, outro estudo também avaliou a viabilidade celular, por MTT, em células Saos-2 (osteoblastos) cultivadas com as mesmas concentrações de

extrato (50%, $\approx 33,33\%$, 20% e $\approx 11,11\%$) do Pro Root MTA, durante 24, 48 e 72 h, apresentou citotoxicidade. Em 24h, reduziu mais de 50% da viabilidade celular em todas as concentrações e, em 48 e 72h, somente nas concentrações de $\approx 11,11\%$ não houve citotoxicidade (Bossú *et al.*, 2021). Em nosso estudo, encontramos redução de aproximadamente 50% da viabilidade de MG-63 e de aproximadamente 40% da viabilidade de FGH em extratos de 50%. E ainda, maior redução da viabilidade em concentrações de 75 e 100% do extrato.

Uma revisão avalia aspectos de citotoxicidade do MTA relacionados com a composição em diferentes tecidos (incluindo fibroblastos, osteoblastos e células da polpa dental) e também conclui que a citotoxicidade é mais evidente em amostras frescas do MTA e diminui com o tempo (Camilleri e Pitt Ford, 2006). O MTA também pode induzir resposta inflamatória temporária, necrose e posterior reparo tecidual (Nair, 2008).

Sarkar e colaboradores (2005) investigaram as propriedades físico-químicas do MTA, incluindo a liberação de íons e o efeito na biocompatibilidade e concluíram que a formação de hidroxiapatita na superfície do cimento é um ponto positivo no quesito biocompatibilidade, entretanto, a alcalinidade extrema do cimento causa irritação nos tecidos. O pH elevado dos extratos seria uma possível explicação para a diminuição da viabilidade celular que nós encontramos. Ainda, uma outra explicação seria pela elevada quantidade íons de cálcio presentes do extrato, levando ao desequilíbrio homeostático, sobrecarga de Ca^{2+} intracelular e, consequente disfunção mitocondrial, levando a apoptose ou necrose.

Ademais, considerando que a superfície de contato do material aos tecidos adjacentes no ambiente *in vivo* é pequena, a concentração de extrato que mais se aproxima da quantidade usual do cimento endodôntico na prática clínica é 25%. Esta concentração não foi citotóxica para as células FGH, apresentando citotoxicidade, com redução da viabilidade celular e baixa liberação de LDH para as células MG-63.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Apesar da síntese química ser um método que permite controle de parâmetros para garantir soluções de AgNPs homogêneas, nossas amostras apresentaram heterogeneidade. O ajuste da condição de síntese, adicionando o volume de AgNO_3 em 10 minutos foi determinante para garantir mais homogeneidade da suspensão coloidal, observada na amostra S2 PVA. Além disso, diante da heterogeneidade das amostras, centrifugá-las foi eficaz para selecionar uma população de AgNPs com diâmetro hidrodinâmico médio e PDI desejados.

A síntese por rota química em resfriamento (recoberta com PVA) gerou suspensões coloidais mais estáveis e com maior potencial antimicrobiano contra as quatro cepas bacterianas desafiadas, apresentando resultados de MIC e IC_{50} similares das AgNPs NANoREG.

A amostra de AgNP escolhida, S2 PVA Sobrenadante, que possui diâmetro médio igual a 30 nm e PDI 0,377, apresentou citotoxicidade para as células MG-63 na concentração de 750 $\mu\text{g/mL}$, por isso, a concentração de escolha para adição ao cimento MTA foi 500 $\mu\text{g/mL}$.

A avaliação da citotoxicidade do cimento MTA modificado com AgNPs demonstrou diminuição da viabilidade celular e estresse oxidativo em todas as concentrações de extrato, apresentando morte com necrose a partir de 50% para células FGH e 25% para células MG-63. No entanto, vale ressaltar que aproximadamente 10% da redução da viabilidade celular tem relação com o método de avaliação em extrato.

Considerando que a superfície de contato do material aos tecidos adjacentes no ambiente *in vivo* é pequena, a concentração de extrato que mais se aproxima da quantidade usual do cimento endodôntico na prática clínica seria 25%. Portanto, desconsiderando o efeito do meio de extração, o cimento incorporado apresentou citotoxicidade para células ósseas e não apresentou para fibroblastos gengivais.

Finalmente, a avaliação da liberação de íons de prata pelo MTA modificado está sendo avaliada. Espera-se que haja liberação gradual, garantindo efeito antimicrobiano prolongado. Futuramente, a avaliação do efeito antimicrobiano do cimento modificado com AgNPS ao biofilme e ensaios físico-químicos, como tempo de presa, escoamento, radiopacidade, resistência a compressão, precisam ser realizados para melhor determinação da sua eficácia e segurança clínica.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGNIHOTRI, S.; MUKHERJI, S.; MUKHERJI, S. Size-controlled silver nanoparticles synthesized over the range 5–100 nm using the same protocol and their antibacterial efficacy. **RSC Adv.**, v. 4, n. 8, p. 3974–3983, 2014.

AKTER, M. et al. A systematic review on silver nanoparticles-induced cytotoxicity: Physicochemical properties and perspectives. **Journal of Advanced Research**, v. 9, p. 1–16, jan. 2018.

BLANCO, J. et al. Polyvinyl pyrrolidone-coated silver nanoparticles in a human lung cancer cells: time- and dose-dependent influence over p53 and caspase-3 protein expression and epigenetic effects. **Archives of Toxicology**, v. 91, n. 2, p. 651–666, 8 fev. 2017.

BORTOLUZZI, E. A. et al. The Influence of Calcium Chloride on the Setting Time, Solubility, Disintegration, and pH of Mineral Trioxide Aggregate and White Portland Cement with a Radiopacifier. **Journal of Endodontics**, v. 35, n. 4, p. 550–554, abr. 2009.

CÂMARA, N. L. A. DA S.; VIANA, D. DOS S. F.; VIANA, V. G. F. Síntese e caracterização de nanopartículas de prata estabilizada em extrato de *Struthanthus Flexicaulis* Mart. (Erva-de-Passarinho). **Research, Society and Development**, v. 10, n. 14, p. e146101421983, 29 out. 2021.

CAMILLERI, J.; PITT FORD, T. R. Mineral trioxide aggregate: a review of the constituents and biological properties of the material. **International Endodontic Journal**, v. 39, n. 10, p. 747–754, 3 out. 2006.

DANAEI, M. et al. Impact of Particle Size and Polydispersity Index on the Clinical Applications of Lipidic Nanocarrier Systems. **Pharmaceutics**, v. 10, n. 2, p. 57, 18 maio 2018.

DURÁN, N. et al. NANOTOXICOLOGIA DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA: TOXICIDADE EM ANIMAIS E HUMANOS. **Química Nova**, 2018.

GHANWATE, N. et al. Colorimetric method for rapid detection of Oxacillin resistance in *Staphylococcus aureus* and its comparison with PCR for mec A gene. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 23013, 10 mar. 2016.

HERNÁNDEZ-SIERRA, J. F. et al. In vitro Cytotoxicity of Silver Nanoparticles on Human Periodontal Fibroblasts. **Journal of Clinical Pediatric Dentistry**, v. 36, n. 1, p. 37–42, 1 set. 2011.

JONES, I. A.; JOSHI, L. T. Biocide Use in the Antimicrobial Era: A Review. **Molecules**, v. 26, n. 8, p. 2276, 14 abr. 2021.

MATYSIAK-KUCHAREK, M.; SAWICKI, K.; KAPKA-SKRZYPCZAK, L. Effect of silver nanoparticles on cytotoxicity, oxidative stress and pro-inflammatory proteins profile in lung adenocarcinoma A549 cells. **Annals of Agricultural and Environmental Medicine**, v. 30, n. 3, p. 566–569, 28 set. 2023.

MISIRLI, G.; PATRICIO, B.; ABRANTES, S. Silver Nanoparticles for Antibacterial Use: Extrinsic and Intrinsic Factors to Increase Stability. **Revista Virtual de Química**, v. 14, n. 5, p. 902–915, 2022.

PADMINI, R. et al. Cytotoxic effect of silver nanoparticles synthesized from ethanolic extract of *Allium sativum* on A549 lung cancer cell line. **Journal of King Saud University - Science**, v. 34, n. 4, p. 102001, jun. 2022.

PANKEY, G. A.; SABATH, L. D. Clinical Relevance of Bacteriostatic versus Bactericidal Mechanisms of Action in the Treatment of Gram-Positive Bacterial Infections. **Clinical Infectious Diseases**, v. 38, n. 6, p. 864–870, 15 mar. 2004.

PARIROKH, M.; TORABINEJAD, M. Mineral Trioxide Aggregate: A Comprehensive Literature Review—Part I: Chemical, Physical, and Antibacterial Properties. **Journal of Endodontics**, v. 36, n. 1, p. 16–27, jan. 2010.

PARVEKAR, P. et al. The minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) of silver nanoparticles against *Staphylococcus aureus*. **Biomaterial Investigations in Dentistry**, v. 7, n. 1, p. 105–109, 1 jan. 2020.

RUSSELL, A. D.; MCDONNELL, G. Concentration: a major factor in studying biocidal action. **Journal of Hospital Infection**, v. 44, n. 1, p. 1–3, jan. 2000.

SARKAR, N. et al. Physicochemical Basis of the Biologic Properties of Mineral Trioxide Aggregate. **Journal of Endodontics**, v. 31, n. 2, p. 97–100, fev. 2005.

SCHILDER, H. Cleaning and shaping the root canal. **Dental clinics of North America**, v. 18, n. 2, p. 269–96, abr. 1974.

SOBERÓN, J. R. et al. Antibacterial activity of plant extracts from northwestern Argentina. **Journal of Applied Microbiology**, v. 102, n. 6, p. 1450–1461, jun. 2007.

WANG, H. et al. Preparation of silver nanoparticles by chemical reduction method. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 256, n. 2–3, p. 111–115, abr. 2005.

da Silva S.Y. et al. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO MTA E CIMENTO PORTLAND EM CEPAS DE ENTEROCOCCUS FAECALIS E PSEUDOMONAS AERUGINOSA. REVISTA FLUMINENSE DE ODONTOLOGIA - ISSN 1413-2966 ANO XVII - Nº 36 - JUL/DEZ - 2011

ABBASI, E. et al. Silver nanoparticles: Synthesis methods, bio-applications and properties. **Critical Reviews in Microbiology**, p. 1–8, 17 jun. 2014.

ABINADER DA SILVA, S. Y. A. Avaliação da atividade antimicrobiana do MTA e cimento portland em cepas de enterococcus faecalis e pseudomonas aeruginosa. **Revista Fluminense de Odontologia**, 12 nov. 2012.

ALMATROUDI, A. Silver nanoparticles: synthesis, characterisation and biomedical applications. **Open Life Sciences**, v. 15, n. 1, p. 819–839, 19 nov. 2020.

ALMEIDA-FILHO, J. et al. **Cirurgia parendodôntica: Relato de caso**. Oral Sciences. v.3, n.1, p. 21-25 jan. 2011

ANGELUS. PERFIL TÉCNICO CIENTÍFICO - MTA ANGELUS® – Cimento reparador. Paraná, Brasil, jun. 2022, 28 f.

BARBOSA, I. B.; PAIXÃO, F. DE M.; ADEODATO, C. S. R. Evolução do cimento MTA - uma revisão de literatura. **Journal of Multidisciplinary Dentistry**, v. 11, n. 3, p. 72–7, 4 mar. 2024.

BERMAN, L. H; HARGREAVES, COHEN, K. M., **Caminhos da polpa**. Ed. 12. Rio de Janeiro: GEN Guanabara Koogan, 2021.

BERNI NETO, E. A. **Desenvolvimento de nanobiocompósitos contendo nanopartículas de prata para aplicações bactericidas**. São Carlos: Universidade de São Paulo, 2 jun. 2010.

BRAUSE, R.; MÖLTGEN, H.; KLEINERMANN, K. Characterization of laser-ablated and chemically reduced silver colloids in aqueous solution by UV/VIS spectroscopy and STM/SEM microscopy. **Applied Physics B: Lasers and Optics**, v. 75, n. 6–7, p. 711–716, 1 nov. 2002.

CARLESSO, F.; SANTOS, V. S. **dos Cirurgia parendodôntica: Uma alternativa ao tratamento endodôntico convencional**. 40 f. Trabalho de conclusão de curso (Formação em Odontologia) – Universidade Federal do Rio grande do Sul, Porto Alegre, RS, 2019.

CECI, M. et al. Biological and chemical-physical properties of root-end filling materials: A comparative study. **Journal of Conservative Dentistry**, v. 18, n. 2, p. 94, 2015.

CLAUDER, T.; SHIN, S. Repair of perforations with MTA: clinical applications and mechanisms of action. **Endodontic Topics**, v. 15, n. 1, p. 32–55, 19 nov. 2006.

COHENCA, N.; PARANJPE, A.; BERG, J. Vital Pulp Therapy. **Dental Clinics of North America**, v. 57, n. 1, p. 59–73, jan. 2013.

DO NASCIMENTO, S. L.; MAGALHÃES, M. C. C.; LESSA, S. V. Microbiologia das infecções endodônticas: uma breve revisão. **Brazilian Journal of Health Review**, v. 6, n. 3, p. 13484–13492, 26 jun. 2023.

GARCIA, M. V. D. **Síntese, caracterização e estabilização de nanopartículas de prata para aplicações bactericidas em têxteis**. Campinas, SP: Universidade Estadual de Campinas, 2 jun. 2011.

GONÇALVES, J. F. DE J. **Sucesso da pulpotomia coronária em dentes permanentes com pulpite irreversível sintomática: Revisão sistemática**. Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra. 2022

GUIMARÃES, C. et al. **Proteção do Complexo Dentino-Pulpar: Capeamento Pulpar Indireto com Ionômero de Vidro (Relato De Caso)**. Revista Saúde Multidisciplinar -FAMA Mineiros/GO, v. IV, p. 217–226, 2017.

GUERREIRO-TANOMARU, J. M. et al. Effect of Zirconium Oxide and Zinc Oxide Nanoparticles on Physicochemical Properties and Antibiofilm Activity of a Calcium Silicate-Based Material. **The Scientific World Journal**, v. 2014, p. 1–6, 2014.

HOLT, D. et al. 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. **Journal of Endodontics**, v. 33, n. 7, p. 844–847, jul. 2007.

HOPPE, A.; GÜLDAL, N. S.; BOCCACCINI, A. R. A review of the biological response to ionic dissolution products from bioactive glasses and glass-ceramics. **Biomaterials**, v. 32, n. 11, p. 2757–2774, abr. 2011.

ISLAM, I.; KHENG CHNG, H.; JIN YAP, A. U. Comparison of the Physical and Mechanical Properties of MTA and Portland Cement. **Journal of Endodontics**, v. 32, n. 3, p. 193–197, mar. 2006.

KATCHBURIAN, Eliezer; ARANA, Vera. **Histologia e Embriologia Oral: texto, atlas correlações clínicas**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2017

LACERDA MFLS, et al. **Infecção secundária e persistente e sua relação com o fracasso do tratamento endodôntico**. Revista brasileira de odontologia, 73: 212., 2016.

LAVÔR, M.L.T. et al. **Uso de hidróxido de cálcio e MTA na odontolgia: conceitos, fundamentos e aplicação clínica**. SALUSVITA, Bauru, v. 36, n. 1, p. 99-121, 2017.

LEE, S. H.; JUN, B.-H. Silver Nanoparticles: Synthesis and Application for Nanomedicine. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 4, p. 865, 17 fev. 2019.

LEE, S.-J.; MONSEF, M.; TORABINEJAD, M. Sealing ability of a mineral trioxide aggregate for repair of lateral root perforations. **Journal of Endodontics**, v. 19, n. 11, p. 541–544, nov. 1993.

LOPES, H. P.; SIQUEIRA JR, J. F. **Endodontia: Biologia e técnica**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2020.

MELO JR., M. A. et al. Preparação de nanopartículas de prata e ouro: um método simples para a introdução da nanociência em laboratório de ensino. **Química Nova**, v. 35, n. 9, p. 1872–1878, 2012.

MISIRLI, G.; PATRICIO, B.; ABRANTES, S. Silver Nanoparticles for Antibacterial Use: Extrinsic and Intrinsic Factors to Increase Stability. **Revista Virtual de Química**, v. 14, n. 5, p. 902–915, 2022.

NAZAM, N. **The effect of antimicrobials on the properties of a root-end filling cement**. [Dissertação Mestrado]. University of Birmingham - School of Dentistry; 2013.

PANÁČEK, A. et al. Silver Colloid Nanoparticles: Synthesis, Characterization, and Their Antibacterial Activity. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 110, n. 33, p. 16248–16253, 1 ago. 2006.

PITTS, N. B. et al. Dental caries. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 3, n. 1, p. 17030, 25 maio 2017.

RANGEL, L.S. et al. **Tratamentos conservadores da polpa e sua aplicabilidade: revisão de literatura**. Brazilian Journal of Health Review, Curitiba, v. 6, n. 6, p.28021-28031, nov. /dec., 2023

RÔÇAS, I. N.; SIQUEIRA, J. F. Characterization of Microbiota of Root Canal-Treated Teeth with Posttreatment Disease. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 50, n. 5, p. 1721–1724, maio 2012.

RODRIGUES, J. DA S. et al. Aplicabilidade, biocompatibilidade e eficácia do Agregado de Trióxido Mineral na Endodontia. **Research, Society and Development**, v. 12, n. 4, p. e9912440917, 31 mar. 2023.

ROMÁN, C. C. A. **Desenvolvimento de um cimento reparador injetável para uso odontológico**. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo, 2 ago. 2019.

SAATCHI, M. et al. The effect of various concentrations of iodine potassium iodide on the antimicrobial properties of mineral trioxide aggregate – a pilot study. **Dental Traumatology**, v. 28, n. 6, p. 474–477, 2 dez. 2012.

SAMIEI, M. et al. Antimicrobial Efficacy of Mineral Trioxide Aggregate with and without Silver Nanoparticles. **Iranian endodontic journal**, v. 8, n. 4, p. 166–70, 2013.

SIQUEIRA, J. F. et al. Bacterial leakage in coronally unsealed root canals obturated with 3 different techniques. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology**, v. 90, n. 5, p. 647–650, nov. 2000.

SIQUEIRA, J. F. Endodontic infections: Concepts, paradigms, and perspectives. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology**, v. 94, n. 3, p. 281–293, set. 2002.

SIQUEIRA, J. F.; RÔÇAS, I. N. Clinical Implications and Microbiology of Bacterial Persistence after Treatment Procedures. **Journal of Endodontics**, v. 34, n. 11, p. 1291- 1301.e3, nov. 2008.

SONDI, I.; SALOPEK-SONDI, B. Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on E. coli as a model for Gram-negative bacteria. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 275, n. 1, p. 177–182, jul. 2004.

SONG, J.-S. et al. Chemical analysis of powder and set forms of Portland cement, gray ProRoot MTA, white ProRoot MTA, and gray MTA-Angelus. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology**, v. 102, n. 6, p. 809–815, dez. 2006.

SOSA, I. O.; NOGUEZ, C.; BARRERA, R. G. Optical Properties of Metal Nanoparticles with Arbitrary Shapes. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 107, n. 26, p. 6269–6275, 1 jul. 2003.

SOUSA, A.; LIMA, H.; SALOMÃO, M. **Cimentos MTA e biocerâmicos: revisão de literatura**. Revista Cathedral, v. 2, n. 3, p. 64-74, 30 ago. 2020.

STOWE, T. et al. The Effects of Chlorhexidine Gluconate (0.12%) on the Antimicrobial Properties of Tooth-Colored ProRoot Mineral Trioxide Aggregate. **Journal of Endodontics**, v. 30, n. 6, p. 429–431, jun. 2004.

SUMER, M. et al. Reactions of Connective Tissue to Amalgam, Intermediate Restorative Material, Mineral Trioxide Aggregate, and Mineral Trioxide Aggregate Mixed With Chlorhexidine. **Journal of Endodontics**, v. 32, n. 11, p. 1094–1096, nov. 2006.

TAHA, N. A.; KHAZALI, M. A. Partial Pulpotomy in Mature Permanent Teeth with Clinical Signs Indicative of Irreversible Pulpitis: A Randomized Clinical Trial. **Journal of Endodontics**, v. 43, n. 9, p. 1417–1421, set. 2017.

TAVARES, F. A.; SILVA, D. V. **Microbiologia endodôntica: uma revisão do processo**. (Monografia). 38f. Especialização em Endodontia. Instituto de Educação em Saúde – IES. Belo Horizonte, 2011.

TORABINEJAD, M.; CHIVIAN, N. Clinical applications of mineral trioxide aggregate. **Journal of Endodontics**, v. 25, n. 3, p. 197–205, mar. 1999.

TORABINEJAD, M.; PARIROKH, M.; DUMMER, P. M. H. Mineral trioxide aggregate and other bioactive endodontic cements: an updated overview – part II: other clinical applications and complications. **International Endodontic Journal**, v. 51, n. 3, p. 284–317, 11 mar. 2018.

TORABINEJAD, M.; WATSON, T. F.; PITT FORD, T. R. Sealing ability of a mineral trioxide aggregate when used as a root end filling material. **Journal of Endodontics**, v. 19, n. 12, p. 591–595, dez. 1993.

TOURÉ, B., et al. **Análise das razões para extração de dentes tratados endodonticamente: um estudo prospectivo**. Revista de Endodontia. v.37, n.11, 2011.

VEGA-BAUDRIT, J. et al. Synthesis and characterization of silver nanoparticles and their application as an antibacterial agent. **International Journal of Biosensors & Bioelectronics**, v. 5, n. 5, 2019.

ABRÃO, S. M. S. et al. Cytotoxicity and genotoxicity of Bio-C Repair, Endosequence BC Root Repair, MTA Angelus and MTA Repair HP. **Brazilian Dental Journal**, v. 34, n. 2, p. 14–20, mar.-abr. 2023.

AKTER, M. et al. A systematic review on silver nanoparticles-induced cytotoxicity: Physicochemical properties and perspectives. **Journal of Advanced Research**, v. 9, p. 1–16, 2 nov. 2017.

ALGHAMDI, F.; SHAKIR, M. The influence of Enterococcus faecalis as a dental root canal pathogen on endodontic treatment: a systematic review. **Cureus**, v. 12, n. 3, 2020.

AMIRULHUSNI, A. N. et al. Antibacterial effect of silver nanoparticles on multi-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa*. **International Journal of Medical Sciences and Public Health**, v. 6, n. 7, p. 291–294, 2012.

AYALA-NÚÑEZ, V. et al. Silver nanoparticles toxicity and bactericidal effect against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: Nanoscale does matter. **Nanobiotechnology**, v. 5, n. 1–4, p. 2–9, 2009.

BOSSÙ, M. et al. Biocompatibility and antibiofilm properties of calcium silicate-based cements: an in vitro evaluation and report of two clinical cases. **Biology (Basel)**, v. 10, n. 6, p. 470, 26 maio 2021.

BROWN, A. N. et al. Nanoparticles functionalized with ampicillin destroy multiple-antibiotic-resistant isolates of *Pseudomonas aeruginosa* and *Enterobacter aerogenes* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, p. 2768–2774, 2012.

CERVINO, G. et al. Mineral Trioxide Aggregate Applications in Endodontics: A Review. **European Journal of Dentistry**, v. 14, n. 4, p. 683–691, out. 2020.

COAGUILA-LLERENA, H., VAISBERG, A., VEÁSQUEZ-HUAMÁN, Z. In Vitro Cytotoxicity Evaluation of Three Root-End Filling Materials in Human Periodontal Ligament Fibroblasts. **Brazilian Dental Journal**, v. 27, n. 2, p. 187–191, mar.-abr. 2016.

DSOUZA, T. et al. Biocompatibility of calcium silicate based cement incorporated with silver or gold nanoparticles—an in vitro study. **Annals of Dental Specialty**, v. 8, n. 2, p. 62–66, 2020.

DURÁN, N., NAKAZATO, G., SEABRA, A. Antimicrobial activity of biogenic silver nanoparticles, and silver chloride nanoparticles: an overview and comments. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, n. 15, p. 6555–6570, 2016.

HALKAI, K. R. et al. Cytotoxicity evaluation of fungal-derived silver nanoparticles on human gingival fibroblast cell line: An in vitro study. **Journal of Conservative Dentistry**, v. 22, n. 2, p. 160–163, mar.-abr. 2019.

HERNANDEZ-DELGADILLO, R. et al. Antimicrobial and Antibiofilm Activities of MTA Supplemented with Bismuth Lipophilic Nanoparticles. **Dental Materials Journal**, v. 36, p. 503–510, 2017.

HERNÁNDEZ-SIERRA, J. F. et al. In vitro cytotoxicity of silver nanoparticles on human periodontal fibroblasts. **Journal of Clinical Pediatric Dentistry**, v. 36, n. 1, p. 37–41, out. 2011.

KAUKAB, A. et al. Silver Nanoparticles as an Intracanal Medicament: A Scoping Review. **Scientific World Journal**, 11 set. 2023. doi: 10.1155/2023/9451685.

LOGESWARI, P., SILAMBARASAN, S., ABRAHAM, J. Synthesis of silver nanoparticles using plants extract and analysis of their antimicrobial property. **Journal of Saudi Chemical Society**, v. 19, n. 3, p. 311–317, 2015.

LOK, C. N. et al. Silver nanoparticles: partial oxidation and antibacterial activities. **Journal of Biological Inorganic Chemistry**, v. 12, n. 4, p. 527–534, maio 2007. doi: 10.1007/s00775-007-0208-z.

MARÍN-CORREA, B. M. et al. Nanosilver gel as an endodontic alternative against *Enterococcus faecalis* in an in vitro root canal system in Mexican dental specimens. **New Microbiologica**, v. 43, n. 4, p. 166–170, 2020.

MEIKLE, T. et al. Preparation, characterization, and antimicrobial activity of cubosome encapsulated metal nanocrystals. **ACS Applied Materials & Interfaces**, v. 12, n. 6, p. 6944–6954, 2020.

NISKA, K. et al. Capping Agent-Dependent Toxicity and Antimicrobial Activity of Silver Nanoparticles: An In Vitro Study. Concerns about Potential Application in Dental Practice. **International Journal of Medical Sciences**, v. 13, n. 10, p. 772–782, 27 set. 2016.

PARVEKAR, P. et al. The minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) of silver nanoparticles against *Staphylococcus aureus*. **Biomaterials Investigations in Dentistry**, v. 7, n. 1, p. 105–109, 23 jul. 2020.

SHIN, J.-H., RYU, J. J., LEE, S.-H. Antimicrobial Activity and Biocompatibility of the Mixture of Mineral Trioxide Aggregate and Nitric Oxide-Releasing Compound. **Journal of Dental Sciences**, v. 16, n. 1, p. 29–36, 2021.

VIORICA, R. P. et al. *Lactococcus lactis* as a safe and inexpensive source of bioactive silver composites. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 101, p. 7141–7153, 2017.

YIN, I. X. et al. The Antibacterial Mechanism of Silver Nanoparticles and Its Application in Dentistry. **International Journal of Nanomedicine**, v. 15, p. 2555–2562,