



UFG

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
REGIONAL JATAÍ - UNIDADE JATOBÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS APLICADAS À SAÚDE

TATIANA SANTOS ARAÚJO

**AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTIMICROBIANO DE NANOPARTÍCULAS EM
BACTÉRIAS DA PERIODONTITE CRÔNICA**

Jataí – GO
2018

**TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR
VERSÕES ELETRÔNICAS DE TESES E DISSERTAÇÕES
NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG**

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1. Identificação do material bibliográfico: **Dissertação** **Tese**

2. Identificação da Tese ou Dissertação:


Nome completo do autor: Tatiana Santos Araújo

Título do trabalho: **AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTIMICROBIANO DE NANOPARTÍCULAS EM BACTÉRIAS DA PERIODONTITE CRÔNICA**

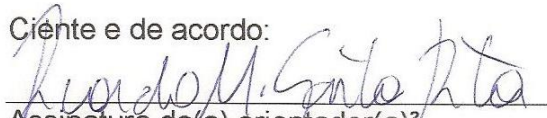
3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento **SIM** **NÃO**¹

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF da tese ou dissertação.


Assinatura do(a) autor(a)²

Ciente e de acordo:


Assinatura do(a) orientador(a)²

Data: 03 / 09 / 18

¹ Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados durante o período de embargo.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente;
- Submissão de artigo em revista científica;
- Publicação como capítulo de livro;
- Publicação da dissertação/tese em livro.

² A assinatura deve ser escaneada.

TATIANA SANTOS ARAÚJO

**AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTIMICROBIANO DE NANOPARTÍCULAS EM
BACTÉRIAS DA PERIODONTITE CRÔNICA**

Dissertação apresentada como requisito para obtenção do título de MESTRE EM CIÊNCIAS APLICADAS À SAÚDE, Área de Concentração: Novos Materiais e Metodologias Aplicadas à Saúde, do Programa de Ciências Aplicadas à Saúde, da Regional Jataí – Universidade Federal de Goiás.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo de Mattos Santa-Rita
Co-orientadora: Profa. Dra. Tatiane Moraes Arantes

Jataí - GO
2018

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

ARAÚJO, TATIANA SANTOS

AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTIMICROBIANO DE NANOPARTÍCULAS EM BACTÉRIAS DA PERIODONTITE CRÔNICA [manuscrito] / TATIANA SANTOS ARAÚJO. 2018.

52 f.

Orientador: Prof. Dr. Prof. Dr. Ricardo de Mattos Santa-Rita; co orientadora Dra. Profa. Dra. Tatiane Moraes Arantes.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Unidade Acadêmica Especial de Ciências da Saúde, Programa de Pós Graduação em Ciências Aplicadas à Saúde, Jataí, 2018.

Bibliografia.

Inclui siglas, abreviaturas, gráfico, tabelas, lista de figuras, lista de tabelas.

1. Biofilme. 2. Periodontite crônica. 3. Antimicrobianos. 4. Nanopartículas. I. Mattos Santa-Rita, Prof. Dr. Ricardo de, orient. II. Título.

CDU 5



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
CAMPUS JATAÍ

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS APLICADAS À SAÚDE

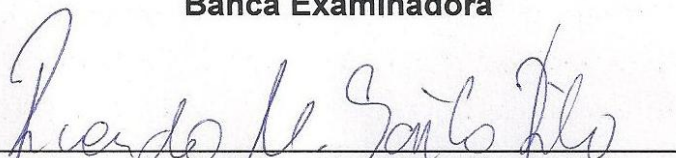
Rod. BR 364, km 192, n. 3800, Setor Industrial
75.801.615 – Jataí/GO- Brasil

ATA DE DEFESA PÚBLICA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

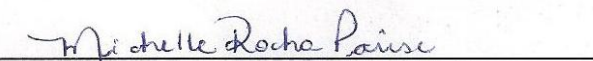
Aos vinte e sete dias do mês de Agosto do ano de dois mil e dezoito às 14:00 horas na sala 06 do Prédio da Pós-Graduação, Unidade Jatobá, Regional Jataí da Universidade Federal de Goiás, realizou-se a sessão pública de defesa de dissertação, intitulada “**AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTIMICROBIANO DE NANOPARTÍCULAS EM BACTÉRIAS DA PERIODONTITE CRÔNICA**”, de autoria da candidata: **TATIANA SANTOS ARAÚJO**, discente do Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Saúde, em nível de Mestrado. A Comissão Examinadora foi constituída pelos professores: Prof. Dr. Ricardo de Mattos Santa-Rita (Presidente), Prof^a. Dr^a. Michelle Rocha Parise (Membro Interno) e Prof. Dr. Luiz Fernando Gorup (Membro Externo). Foi concedido ao mestrando, um prazo máximo de 30 dias a partir da data de defesa para efetuar as correções sugeridas pela Comissão Examinadora e entregar o trabalho em redação definitiva, sob pena de não expedição do Diploma. E, para constar, foi lavrada a presente ata, que vai assinada pelos membros da Comissão.

Concluídos os trabalhos de apresentação e arguição, os membros da banca consideraram a discente: **Aprovada** () **Reprovada**

Banca Examinadora



Prof. Dr. Ricardo de Mattos Santa-Rita
Presidente - UFG



Prof. Dr. Michelle Rocha Parise
Membro Interno - UFG



Prof. Dr. Luiz Fernando Gorup
Membro Externo - UFGD

**“Eu não tenho ídolos. Tenho
admiração por trabalho,
dedicação e competência.”**

Ayrton Senna

AGRADECIMENTOS

A presente dissertação de mestrado não poderia chegar a tal resultado sem o precioso apoio de várias pessoas.

Em primeiro lugar, não posso deixar de agradecer ao meu orientador, Professor Dr. Ricardo Mattos Santa-Rita. Inicialmente, agradeço pelo convite a participar do edital de seleção do programa, agradeço pela confiança em minha capacidade e por toda a paciência, empenho e sentido prático que conduziu a orientação durante esta jornada.

À minha co-orientadora, Professora Dra. Tatiane Moraes Arantes, obrigada pela receptividade ao tema da minha pesquisa, por ter aceito o convite em me co-orientar, pela simplicidade, paciência e por toda contribuição com minha formação e minha pesquisa.

Eternamente grata a vocês, Prof. Dr. Ricardo Mattos Santa-Rita e à Profa. Dra. Tatiane Moraes Arantes, sem palavras.

À minha banca de qualificação e defesa pelas sugestões e imensas contribuições ao trabalho. Ao Programa de Ciências Aplicadas à Saúde, FAPEG, UFSCAR, FIOCRUZ e todos que diretamente ou indiretamente contribuíram com a pesquisa.

Por último, e não menos importante, quero agradecer à minha família e amigos pelo apoio incondicional que me deram, especialmente aos meus pais e ao meu namorado por toda compreensão, pelas ausências e paciência. Eternamente grata.

À Deus, obrigada por me capacitar e me manter trilhando o caminho do crescimento profissional e pessoal.

RESUMO

A Doença Periodontal é uma doença inflamatória localizada e bastante comum, causada por infecção bacteriana associada ao biofilme dental e à diversas condições patológicas, como a inflamação da gengiva, degeneração do ligamento periodontal, cemento radicular e a perda de osso alveolar, caracterizando às periodontites. A Periodontite Crônica é uma das manifestações da Doença Periodontal, destaca-se pela alta prevalência e incidência em todo o mundo, afetando a qualidade de vida dessas pessoas. Pode-se considerar uma doença de elevada complexidade quanto à natureza da sua etiologia, formas de classificação, tratamento e à sua manutenção. As principais bactérias encontradas incluem *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, *P. intermedia*, *C. rectus*, *E. corrodens*, *Fusobacterium nucleatum*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *P. micros* e espécies de *Treponema* e *Eubacterium*. Os antimicrobianos, por inibirem o crescimento de microrganismos patogênicos, são uma alternativa profilática e terapêutica de múltiplas doenças, assim como da Periodontite Crônica. A alta capacidade de desenvolvimento de resistência contra antibióticos tem aumentado continuamente e seu controle é ainda um grande desafio. A nanotecnologia fornece uma nova plataforma de desenvolvimento das propriedades importantes do metal sob a forma de nanopartículas (NPs) com aplicações promissoras como agentes antimicrobianos. Desde a última década, as NPs de prata (Ag-NP) têm demonstrado propriedades antimicrobianas contra as bactérias gram-negativas e bactérias gram-positivas. Neste trabalho, as NPs, de Ag e de óxido de zinco decoradas com prata (ZnO-Ag-NP), foram sintetizadas e analisadas quanto: I a qualidade final das NPs por Difração de Raios X (DRX) e Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET); II através da determinação da concentração inibitória mínima (CIM), o potencial antimicrobiano sobre sobre *Fusobacterium nucleatum* (ATCC 10953) e *Porphyromonas gingivalis* (ATCC 33277), *in vitro* pelo período de 24 à 96h. Comparativamente foi avaliada a atividade antimicrobiana de Amoxicilina (AMX) e Metronidazole (MTZ) sobre as cepas nas mesmas condições experimentais. A DRX confirmou a síntese de Ag-NPs na fase cristalográfica cúbica de face centrada e de ZnO-Ag-NP na fase hexagonal do tipo Wurtzita. As imagens de MET revelaram formato esférico com tamanho médio de cerca de 2 nm (Ag-NP) e 8 nm (ZnO-Ag-NP) apontando a eficiência do método de síntese para a obtenção de suspensões coloidais. A CIM para as Ag-NP (na faixa de 32,4 a 4,05 e >150 a 37,5 µg/mL) e de ZnO-Ag-NP (>150 a 37,5 e 150 µg/mL) sobre *F. nucleatum* e *P. Gingivalis*, respectivamente, apontam para a atividade tipo concentração-tempo dependente; com maior atividade antimicrobiana de Ag-NP para os mesmos tempos de exposição, 24, 48, 72 e 96h. Comparativamente, observa-se com clareza maior sensibilidade de *F. nucleatum* do que *P. gingivalis* às NPs. AMX (0,047 a 0,023 µg/mL) e MTZ (5,0 a 0,625 µg/mL) apresentaram valores de CIM menores do que as NPs, em condições de teste em microdiluição em condições anaeróbicas. O desenvolvimento de novos medicamentos ou nanomateriais é promissor diante a propagação da resistência bacteriana, por estes apresentarem baixa propensão de induzir resistência microbiana quando comparados aos antibióticos convencionais.

Palavras-chaves: Biofilme; Periodontite Crônica; Antimicrobianos; Nanopartículas.

ABSTRACT

Periodontal disease is a common and localized inflammatory disease caused by bacterial infection associated with dental biofilm and several pathological conditions, such as inflammation of the gingiva, degeneration of the periodontal ligament, root cementum and loss of alveolar bone, characterizing periodontitis. Chronic Periodontitis is one of the manifestations of Periodontal Disease, it stands out for the high prevalence and incidence, and still remains, throughout the world, as a public health problem, affecting the quality of life of these people. It can be considered a disease of high complexity as to the nature of its etiology, different forms of classification, treatment and maintenance. The major bacteria found include *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, *P. intermedia*, *C. rectus*, *E. corrodens*, *Fusobacterium nucleatum*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *P. micros*, *Treponema* and *Eubacterium species*. Antimicrobials, by the inhibition of pathogenic microorganisms growth, are a prophylactic and therapeutic alternative for multiple diseases, as well as Chronic Periodontitis. The high capacity of developing resistance to antibiotics has steadily increased and its control is still a major challenge. Nanotechnology provides a new platform for developing important metal properties in the form of nanoparticles (NPs) with promising applications as antimicrobial agents. Since the last decade, silver NPs (Ag-NP) have demonstrated antimicrobial properties against gram-negative bacteria and gram-positive bacteria. In this work, the NPs of Ag and zinc oxide decorated with silver (ZnO-Ag-NP) were synthesized and analyzed for: I the final quality of NPs by X-ray Diffraction (XRD) and Transmission Electron Microscopy (TEM); II by determining the minimum inhibitory concentration (MIC), the antimicrobial potential on *Fusobacterium nucleatum* (ATCC 10953) and *Porphyromonas gingivalis* (ATCC 33277), in vitro for a period of 24 to 96 hours. The antimicrobial activity of Amoxicillin (AMX) and Metronidazole (MTZ) on the strains were evaluated in the same experimental conditions. XRD confirmed the synthesis of Ag-NPs in the face-centered cubic crystallographic phase and ZnO-Ag-NP in the Wurtzite hexagonal phase. TEM images showed a spherical shape with an average size of about 2 nm (Ag-NP) and 8 nm (ZnO-Ag-NP) indicating the efficiency of the synthesis method to obtain colloidal suspensions. The MIC for Ag-NP (in the range of 32.4 to 4.05 and > 150 to 37.5 $\mu\text{g} / \text{mL}$) and ZnO-Ag-NP (> 150 to 37.5 and 150 $\mu\text{g} / \text{mL}$) *F. nucleatum* and *P. gingivalis*, respectively, point to the concentration-time dependent activity; with higher Ag-NP antimicrobial activity for the same exposure times, 24, 48, 72 and 96 hours. Comparatively, greater sensitivity of *F. nucleatum* than *P. gingivalis* to NPs is clearly observed. AMX (0.047 to 0.023 $\mu\text{g} / \text{mL}$) and MTZ (5.0 to 0.625 $\mu\text{g} / \text{mL}$) presented lower MIC values than NPs under microdilution test conditions under anaerobic conditions. The development of new drugs or nanomaterials is promising in the face of the propagation of bacterial resistance, since they have a low propensity to induce microbial resistance when compared to conventional antibiotics.

Keywords: Biofilm; Chronic Periodontitis; Antimicrobials; Nanoparticles,.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 Formação e Maturação do Biofilme Dental.....	10
FIGURA 2 Fluxograma da síntese de Ag-NPs.....	29
FIGURA 3. Microplaca de 96 poços para avaliação do potencial antimicrobiano.	31
FIGURA 4. Reações envolvidas na síntese das Ag-NPs.....	33
FIGURA 5. Difratoogramas de DRX para as Ag-NPs.	34
FIGURA 6. Imagens de MET das Ag-NPs com diferentes ampliações.....	35
FIGURA 7. Difratoogramas de DRX para as ZnO-Ag-NPs.	36
FIGURA 8. Imagens de MET das ZnO-Ag-NPs com diferentes ampliações.....	37

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Reagentes e solventes utilizados para preparar as ZnO-Ag-NPs.....	29
TABELA 2. Valores de CIM para <i>F. nucleatum</i> e <i>P. gingivalis</i>	39

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1. Inibição de crescimento da <i>F. nucleatum</i> sob ação das Ag-NP por 24, 48, 72, 96h	38
GRÁFICO 2. Inibição de crescimento da <i>F. nucleatum</i> sob ação das ZnO-Ag-NP por 24, 48, 72, 96h	38
GRÁFICO 3. Inibição de crescimento da <i>P. gingivalis</i> sob ação das Ag-NP por 24, 48, 72, 96h	40
GRÁFICO 4. Inibição de crescimento da <i>P. gingivalis</i> sob ação das ZnO-Ag-NP por 24, 48, 72, 96h	41

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

Ag-NP.....	Nanopartículas de Prata
Ag.....	Prata
Ag ₂ S	Argentita
AMX	Amoxicilina
ATCC.....	Coleção de Cultivo Americana
AZM.....	Azitromicina
BHI.....	Brain Heart Infusion
CBM.....	Concentração Bactericida Mínima
CDT.....	Cytolethal Distending Toxin
CHX.....	Clorexidina
CIM.....	Concentração inibitória Mínima
Cu	Cobre
CuO.....	Óxido de Cobre
DO.....	Densidade Óptica
DP	Doença Periodontal
DRX.....	Difração de Raios X
IFT.....	Institute of Food Tecnologia
LIEC.....	Laboratório Interdisciplinar de Eletroquímica e Cerâmica
MDR.....	Multidrogaresistentes
MET.....	Microscopia Eletrônica de Transmissão
MTZ.....	Metronidazol
NPs.....	Nanopartículas
PA	Periodontite Agressiva
Pb	Chumbo
PC	Periodontite Crônica
PDMS.....	Polidimetilsiloxano
TCO.....	Óxidos Condutores Transparentes
TiO ₂	Dióxido de Titânio
WO ₃	Óxido de Tungstênio
Zn	Zinco
ZnO-Ag-NP.....	Nanopartículas de Óxido de Zinco decoradas com Prata
ZnO-NP.....	Nanopartículas de Óxido de Zinco
ZnO.....	Óxido de Zinco

SUMÁRIO

RESUMO	1
ABSTRACT	2
LISTA DE FIGURAS	3
LISTA DE TABELAS	4
LISTA DE GRÁFICOS	5
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS	6
SUMÁRIO	7
1 REVISÃO DE LITERATURA	9
1.1 Bactérias e Biofilmes Oraís	9
1.1.1 Formação do Biofilme.....	9
1.1.2 Biofilme Supragengival e Subgengival.....	11
1.2 Cálculo Dentário	12
1.3 Terapêutica Periodontal	13
1.4 Periodontite Crônica	13
1.4.1 <i>Porphyromonas gingivalis</i>	14
1.4.2 <i>Fusobacterium nucleatum</i>	15
1.5 Epidemiologia	15
1.6 Terapias antimicrobianas	16
1.6.1 Resistência à Antibióticos	17
1.7 Nanociência e Nanotecnologia	19
1.8 Nanopartículas de Prata (Ag)	20
1.9 Nanopartículas de Óxido de Zinco decoradas com Prata	21
1.10 Métodos de Sínteses	23
1.10.1 Método do Citrato	24
1.10.2 Métodos de Síntese de ZnO Nanoestruturado	24
1.10.2.1 Síntese Via co-precipitação.....	25
1.10.2.2 Síntese via deposição química e física	25
1.10.2.3 Síntese Solvotérmica.....	25
1.10.2.4 Síntese via Sol-Gel.....	25
2 OBJETIVOS	27
2.1 Objetivo Geral	27
2.2 Objetivos Específicos	27
3 MÉTODOS	28
3.1 Tipo e Local do Estudo	28
3.2 Cultivo das Bactérias	28
3.3 Síntese das Nanopartículas de Prata e de Óxido de Zinco decoradas com Prata	28
3.4 Caracterização	30
3.5 Avaliação da Atividade Antimicrobiana por Método de Microdiluição	30
3.6 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)	31

3.7	Antibióticos	32
3.8	Análise Estatística	32
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
4.1	Obtenção das NPs	33
4.2	Concentração Inibitória Mínima (CIM) das nanopartículas (NPs), Amoxicilina (AMX) e Metronidazol (MTZ)	37
5	CONCLUSÕES	44
6	REFERÊNCIAS	45

1.1 Bactérias e Biofilmes Orais

Os biofilmes são estruturas complexas que se formam pela adesão das bactérias, permitindo sua multiplicação, segregação de uma matriz polimérica extracelular e organização de uma comunidade tridimensional (HERMAN e ULVI, 2016). Um biofilme típico consiste em células mono ou polimicrobianas, polissacarídeos, proteínas, ácidos nucleicos e lipídios (FLEMMING e WINGENDER, 2010). Estão associados com quase dois terços de todas as infecções microbianas nos seres humanos, e por apresentarem estruturas complexas não devem ser vistos simplesmente como "acumulações de bactérias em superfícies" (POTERA, 1999).

Biofilmes orais apresentam semelhanças com biofilmes ambientais, mas ao mesmo tempo são significativamente divergentes. Na cavidade oral, biofilmes são compostos multiespecíficos de bactérias, compreendendo cerca de 700 espécies microbianas diferentes, sendo que, de 100 a 200 destas espécies podem ser encontradas em qualquer cavidade oral saudável (KOLENBRANDER et al., 2010). Na composição dos biofilmes orais predominam bactérias e matriz extracelular. A matriz extracelular é composta por ácido desoxirribonucleico, proteínas, polissacarídeos e lipídios. Além disso, os biofilmes orais contêm glicoproteínas salivares, albumina de fluido crevicular gengival e componentes de células hospedeiras (HERMAN e ULVI, 2016).

1.1.1 Formação do Biofilme

O processo de formação de biofilmes é muito ordenado e coordenado, envolvendo formação sequencial de película adquirida, colonização por colonizadores primários e colonizadores secundários (Figura 1). Na ausência de comunicação, essas mudanças ordenadas seriam aleatórias (MARSH, 2005; KOLENBRANDER, et al., 2006).

Naturalmente minutos após a profilaxia da cavidade oral, há a formação espontânea de uma película sobre a estrutura dentária. A película adquirida, que é composta de uma variedade de moléculas derivadas do hospedeiro, reveste a superfície do esmalte sendo fonte de receptores para colonizadores primários do Biofilme – *Streptococcus spp.*, *Actinomyces spp.*, *Capnocytophaga spp.*, *Eikenella spp.*, *Haemophilus spp.* e *Veillonella spp.* Assim que as bactérias pioneiras se fixam na película, começam a excretar material extracelular composto

por substância polimérica, que ajuda as bactérias unirem e anexarem-se à película (HUANG, et al., 2011 *apud* MAHAJAN et al., 2013).

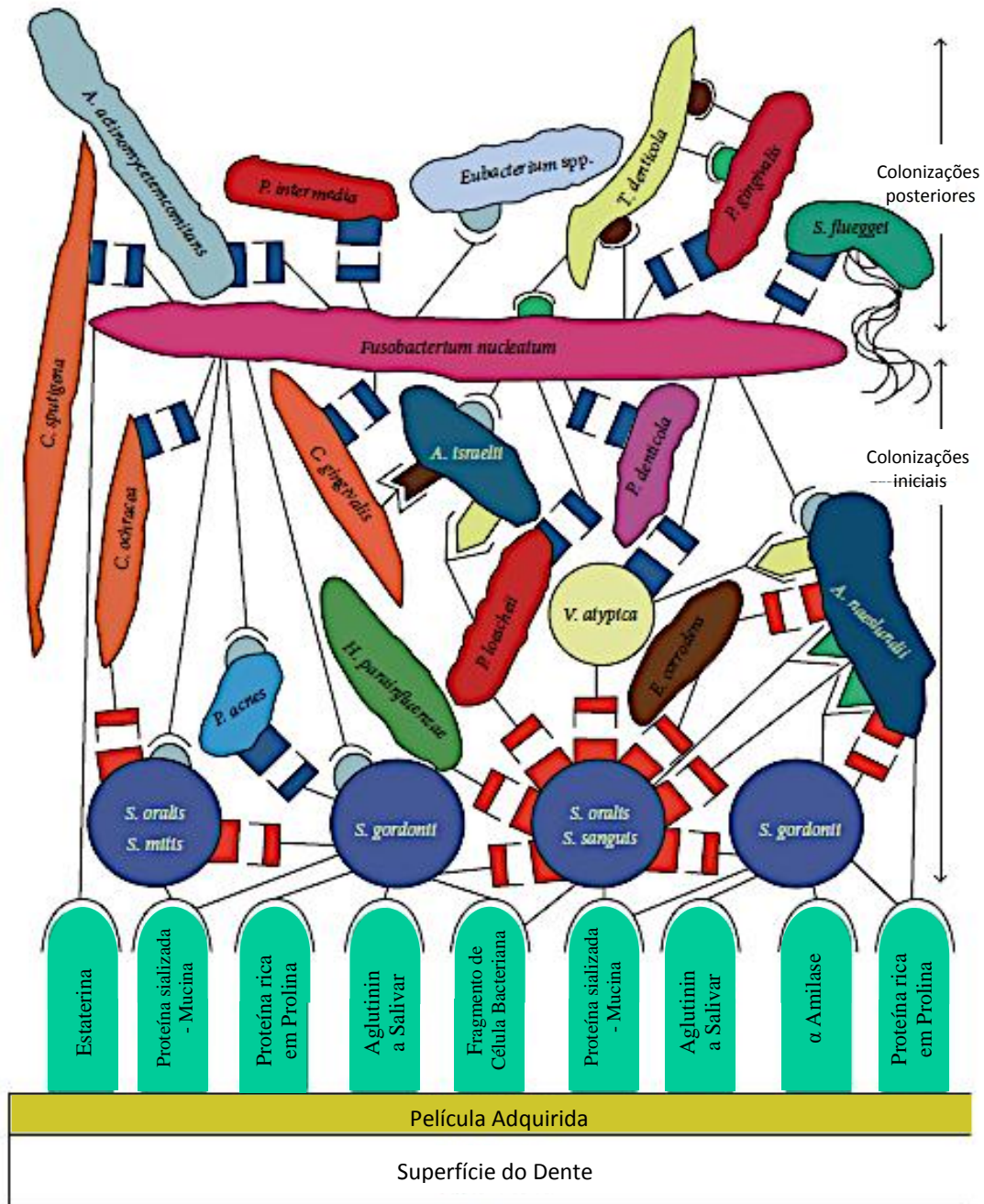


FIGURA 1 Formação e Maturação do Biofilme Dental, adaptado de MAHAJAN et al., 2013

As bactérias pioneiras fornecem locais de ligação específicos para as colonizações bacterianas posteriores. As bactérias coagregam-se, formando estruturas que assemelham-se a uma espiga de milho ou escova de cerdas ou outras formas. A coagregação é definida pelo reconhecimento celular que ocorre entre células geneticamente distintas. Cada tipo de célula carrega em sua superfície um ou mais tipos de mediadores de coagregação, que são chamados

de adesinas e receptores. As coagregações que ocorrem nas colonizações primárias possuem população de baixa diversidade bacteriana e se localizam na região supragengival. Entretanto, alterações no efeito de coagregação ocorrem, e a região subgengival é colonizada por populações bacterianas de alta diversidade; incluindo *Fusobacterium nucleatum*, *Treponema spp.*, *Porphyromonas gingivalis spp.* e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. Como o biofilme amadurece, há deslocamento proporcional nos componentes microbianos (KOLENBRANDER, et al., 2006 *apud* MAHAJAN et al., 2013).

A relativa quantidade de estreptococos e *Neisseria* diminui, enquanto a quantidade de *Actinomyces*, *Corynebacterium*, *Fusobacterium*, e *Veillonella* aumenta. Acredita-se que a *Fusobacterium nucleatum* tenha uma papel fundamental na maturação para quase todas as bactérias, incluindo colonizadores precoces e colonizadores posteriores. Assim, *Fusobacterium nucleatum* forma uma ponte de coagregação entre as bactérias que não se coagregam naturalmente entre si (RITZ, 1967 *apud* MAHAJAN et al., 2013).

Dessa forma, a cavidade oral é um ambiente rico em nutrientes, úmido e quente, o que é excelente para a sobrevivência bacteriana. No entanto, também existem desafios para tal sobrevivência, pois a bactéria precisa, para fugir do fluxo de saliva, hospedar-se. No entanto, há variações na disponibilidades de nutrientes, mudanças de pH, além de antimicrobianos, anti-sépticos e antibióticos que dificultam sua sobrevivência (ABIKO e SAITOH, 2007). Por serem uma parte do biofilme, as bactérias tornam-se resistentes ao estresse ambiental, encontram os nutrientes necessários para o crescimento e se replicam muito facilmente (JAKUBOVICS e KOLENBRANDER, 2010).

1.1.2 Biofilme Supragengival e Subgengival

Na cavidade oral, as bactérias aderem a tecidos duros e moles. Tecidos moles e células epiteliais, que cobrem a mucosa oral, têm taxas altas de ligações temporárias. Assim, bactérias aderidas não podem ficar nesta superfície, e são removidas juntamente com as células epiteliais mortas. Os dentes, por outro lado, têm uma superfície excelente para adesão das bactérias, produção e manutenção dos biofilmes. Os biofilmes supragengivais são encontrados acima da margem gengival, tipicamente caracterizada por comunidades de aeróbios Gram-positivos. Biofilmes subgengivais, por outro lado, são formados principalmente de anaeróbios gram-negativos, e são localizadas sob a margem gengival, entre a superfície da gengiva e o dente (HERMAN E ULVI, 2016).

1.2 Cálculo Dentário

O biofilme bacteriano, juntamente com outros fatores predisponentes, é a causa primária da inflamação gengival. Estes fatores incluem cálculo, má oclusão, restaurações defeituosas, complicações associadas à terapia ortodôntica, lesões autoinduzidas, tabagismo e radioterapia (CLEREHUG et. al., 1996).

A mineralização do biofilme bacteriano sobre a superfície dos dentes e de próteses dentárias formam o cálculo, e que pode ser classificado de acordo com sua relação com a margem gengival, em supragengival ou subgengival. O cálculo supragengival é visível na cavidade oral e localiza-se coronalmente à margem da gengiva. Geralmente tem coloração branca ou amarelo-esbranquiçada, de consistência rígida e pode ser removido por processos mecânicos. Já o cálculo subgengival está localizado abaixo gengiva marginal e, portanto, não é visível clinicamente. É geralmente rígido e denso, e normalmente tem uma aparência marrom ou preto-esverdeada enquanto está firmemente aderido à superfície dentária (CARRANZA, 2007).

A mineralização do biofilme dentário origina o cálculo, iniciando, geralmente a partir do primeiro ao décimo quarto dia da formação do biofilme, por meio da precipitação de sais minerais presente neste biofilme mole, que torna-se enrijecido. O processo de mineralização e formação do cálculo supragengival ocorre por meio da saliva, e o transudato sérico ou fluido gengival fornece os minerais para o cálculo subgengival (CLEREHUG et. al., 1996).

Materiais orgânicos e inorgânicos constituem a composição do cálculo, sendo que o cálculo supragengival é composto de 70% a 90% de materiais inorgânicos, sendo 75,9% de fosfato de cálcio, 3,1% de carbonato de cálcio e traços de fosfato de magnésio e outros metais. Já os materiais orgânicos são formados por uma mistura de complexos de proteínas-polissacarídeos, células epiteliais descamadas, leucócitos, e vários tipos de microrganismos. Os carboidratos constituem entre 1,9% e 9,1% do componente orgânico, dentre eles encontra-se a galactose, glicose, ramanose, manose, ácido glicorônico, galactosamina; as vezes, são encontradas arabinose, ácido galacturônico e glicosamina. Com exceção da arabinose e da ramanose todos esses componentes estão presentes na glicoproteína salivar (CARRANZA, 2007).

1.3 Terapêutica Periodontal

A terapêutica periodontal preconiza, dentre outras possibilidades, os atos de raspagem e alisamento radicular, os quais provocam, quase sempre, um desgarramento e injúria do epitélio sulcular, mais precisamente nos 2/3 apicais da bolsa e, também, um descolamento parcial ou total do epitélio juncional, atingindo, muitas vezes, o tecido conjuntivo subjacente.

Após a remoção da placa e do cálculo subgengival, a ferida, provocada pela raspagem e alisamento na parede mole da bolsa, geralmente cura e cicatriza sem problemas (ARMITAGE, 1999), podendo ser observada uma redução da inflamação gengival, profundidades de sondagem, e, conseqüentemente, redução da bolsa periodontal, havendo um ganho de inserção clínica (CLEREHUG et. al., 1996), ocorrendo de forma concomitantemente, a reparação dos tecidos conjuntivo e epitelial. Células epiteliais provenientes da gengiva inserida migram em direção ao sulco a fim de promover sua epitelização, formando uma nova lâmina própria.

As fibras periodontais não voltarão a ter a mesma disposição e inserção que tinham antes do processo patológico, passando a se inserir em um nível mais apical. O epitélio juncional passa a ser mais longo do que aquele observado num sulco gengival normal. Entretanto, não se pode afirmar que haja uma cicatrização, porque toda reparação por cicatrização implica numa cicatriz, o que não é observado no periodonto. A cicatrização em outros tecidos/órgãos pode levá-los à uma perda de sua função, o que não ocorre no periodonto. Pois, após a terapêutica periodontal o periodonto volta a desempenhar suas funções normais num estado de saúde compatível (ARMITAGE, 1999).

1.4 Periodontite Crônica

A Doença Periodontal (DP) é causada por infecção bacteriana associada ao biofilme dental e é considerada uma doença inflamatória e localizada. Está associada à diversas condições patológicas, como a inflamação da gengiva (Gengivite), degeneração do ligamento periodontal, cemento dental e a perda de osso alveolar, caracterizando as periodontites (TARIQ et al., 2012).

A Periodontite Crônica (PC) é a forma mais comum de Periodontite (FLEMMING, 1999), sendo mais relevante em adultos, mas pode ser observada em crianças, estando associada ao acúmulo de biofilme bacteriano e cálculo e, geralmente, tem um curso de progressão de lento a moderado; porém períodos de destruição mais rápida podem ser observados (BLIEDEN, 1999; HALLMON, 1999; PINI PRATO, 1999). Aumentos na velocidade da progressão da

doença podem ser causados pelo impacto de fatores locais, sistêmicos ou ambientais que influenciam e alteram a interação normal do hospedeiro-bactéria.

O cultivo dos microrganismos do biofilme oriundos de locais acometidos pela PC revela altas porcentagens de espécies bacterianas anaeróbicas (90%) e gram-negativas (75%) (SLOTS, 1979). Na PC, as bactérias cultivadas com maior frequência e em altos níveis incluem *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, *Prevotella intermedia*, *Campylobacter rectus*, *Eikenella corrodens*, *Fusobacterium nucleatum*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *P. micros* e espécies de *Treponema* e *Eubacterium* (DZINK et al, 1988).

1.4.1 *Porphyromonas gingivalis*

P. gingivalis é uma bactéria anaeróbia, Gram-negativa, anaeróbia estrita, assacarolítica, não motilizada; associada com o início e a progressão de quadros inflamatórios no periodonto (VAN WINKELHOFF et al., 1988) e presente em diversas formas de DP. Fatores como a presença de adesinas, fímbrias, cápsula, lipopolissacarídeos, ácidos lipoteicóicos, gingipainas, hemaglutininas, proteínas da membrana externa e vesículas da membrana externa; além de grande capacidade de invasão de células eucarióticas, são reconhecidos como fatores de virulência que favorecem a iniciação, progressão e instalação das DPs por esta espécie (SHIBATA et al., 1993; JANSEN et al., 1995; DORN et al., 1998; SOCRANSKY et al., 1998; CHEN et al., 1999; BOSTANCI e BELIBASAKIS 2012; SAKANAKA et al., 2016).

A colonização por este organismo resulta além de lesão tecidual, na desregulação dos sistema imune e inflamatório do hospedeiro (CARVALHO e CABRAL, 2007). As bactérias do gênero *Porphyromonas* possuem fímbrias que atuam na fixação dos microrganismos nas células do hospedeiro, e proteases que degradam as imunoglobulinas IgA, IgG e IgM, causando destruição tecidual devido à liberação enzimática. Além das proteases, produzem collagenases, fibrino-lisinas, neuraminidasas, heparinases, glicuronidasas e hemolisinas (MURRAY et al., 2000).

P. gingivalis se adaptam a alterações do ambiente através da ativação ou inativação de uma variedade de genes associados ao metabolismo e à virulência (MIMS, 1999). No biofilme subgingival, atuam como colonizadora tardia, um processo facilitado por microrganismos como *F. nucleatum* e outros colonizadores antecessores. Mesmo quando presente em baixas concentrações no biofilme, possui a capacidade de alterar a estrutura deste, de elevar a virulência do biofilme periodontal, modular a resposta do hospedeiro, e aumentar a carga bacteriana total (SAKANAKA et al., 2016).

1.4.2 *Fusobacterium nucleatum*

F. nucleatum é uma espécie bacteriana Gram-negativa, anaeróbia estrita, imóvel e não esporulante, que é normalmente isolada da cavidade oral. É a espécie mais comum nas infecções humanas dentre as sete espécies conhecidas de fusobactérias, predominante na microbiota de canais radiculares é uma das mais prevalentes; demonstrando alta capacidade de co-agregação *in vitro* com muitas das bactérias orais (GOMES et al., 2004; JACINTO et al., 2008; JUNG et al., 2000; SUNDQVIST, 1994).

Alvo de pesquisas na Periodontia, a *F. nucleatum* está associada diretamente à DP, lesões periapicais e à formação de biofilme, por ter uma capacidade de co-agregação com outras espécies. O gênero *Fusobacterium* foi associado com sinais e sintomas específicos de origem endodôntica tais como dor, sensibilidade à percussão, canais úmidos, e a presença de exsudato purulento, além da relação com a lesão persistente (SIQUEIRA, 2013).

Em estudos utilizando-se dezessete dentes extraídos com as lesões periapicais anexas, a amplificação do DNA revelou 28 espécies, sendo a *F. nucleatum* a mais prevalente no terço médio apical, sendo sugerida correlação direta com a Periodontite Apical (ROCAS et al., 2010).

Esta espécie apresenta genes relacionados à capacidade de adesão e aderência em microrganismos Gram-positivos (AMANO, 2010). Possui fatores relacionados à resistência à antibióticos, como a eritromicina, devido à presença de uma proteína de efluxo de macrolídeos (GOLDSTEIN et al.1999); e resistência às penicilinas, relacionada à presença de beta-Lactamase (VOHA et al., 2006). Siqueira et al. (2007), identificaram bactérias cultiváveis de canais com infecção primária crônica, pelo sequenciamento do gene 16s rRNA; sendo a espécie mais frequentemente presente a *F. nucleatum*. Kapatral et al. (2002), apresentaram também a sequência genômica e análise metabólica do *F. nucleatum* e seus respectivos relatos de fatores de adesão e resistência.

1.5 Epidemiologia

Recentemente, tem-se aumentando a ênfase na importância dos fatores econômicos, sociais e ambientais na compreensão das doenças orais e da pesquisa em saúde pública, centrando-se sobre os determinantes sociais de saúde e doença. Em particular, o interesse nos determinantes sociais tem aumentado com o reconhecimento das limitações da abordagem preventiva tradicional em melhorar a saúde e reduzir as desigualdades sociais (WATT, 2002).

A relação entre a idade e periodontite não é simples. Evidências demonstram que tanto a prevalência e severidade da periodontite aumentam com a idade, sugerindo que esta pode ser um marcador periodontal, sinalizando perda de sustentação dos tecidos (VAN DER VELDEN, 1984; JOHNSON, 1989; JOHNSON et al. 1989; BURT, 1994). No entanto, a crença de que a periodontite é uma doença de idosos tem sido questionada. Em vez de indicar um aumento na susceptibilidade à periodontite nas pessoas idosas, este "efeito de idade" pode concebivelmente representar o efeito cumulativo da exposição prolongada a fatores de risco verdadeiros (PAPAPANOU et al., 1991).

Relacionando-se ao sexo, homens têm exibido pior saúde periodontal do que as mulheres, evidenciando que há diferença comprovada entre homens e mulheres na susceptibilidade à periodontite (BURT e EKLUND 1999; ALBANDAR 2002).

Apesar das diferenças demonstradas na prevalência da periodontite entre os países e continentes, estas estão ligadas à fatores sociais e a grupos raciais / étnicos (BAELUM et al., 1996; BURT & EKLUND, 1999). Pesquisas realizadas nos Estados Unidos apontam consistentemente para diferenças étnicas no padrão de prevalência da periodontite. Os afroamericanos apresentam a maior prevalência à periodontite enquanto os mexicanos-americanos apresentam uma prevalência semelhante à não-hispânicos brancos. No entanto, a raça/etnia é geralmente uma construção social que determina uma série de oportunidades na sociedade, tais como o acesso, status e recursos (WILLIAMS 1997, 1999).

Indicadores socioeconômicos são marcadores robustos de periodontite. Seu papel na DP pode ser atribuído ao diferencial acesso a recursos e oportunidades que podem influenciar comportamentos preventivos. Evidências também sugerem que a educação tem uma influência maior do que renda em afetar positivamente o nível da periodontite na população (BORRELL et al. 2004).

1.6 Terapias antimicrobianas

A prevenção e tratamento da DP baseiam-se fundamentalmente na redução dos agentes patogênicos e fortalecimento da barreira epitelial, permitindo a diminuição da susceptibilidade à infecção (SOHI et al., 2011; STAMATOVA e MEURMAN, 2009; LIU et al., 2010). Uma das formas de tratamento baseia-se na utilização de antimicrobianos (BONIFAIT et al., 2009; DEVINE et al., 2009; MOHANTY et al., 2012; MUÑOZ et al., 2010; LAWANDE, 2012; KODUGANTI et al., 2011). Os antimicrobianos podem ser substâncias naturais (antibióticos)

ou sintéticas (quimioterápicos) que agem sobre microrganismos, inibindo o seu crescimento ou causando a sua destruição (SÁEZ-LLORENS et al., 2000).

Antibióticos são compostos naturais ou sintéticos responsáveis pela morte de bactérias ou, simplesmente, capazes de inibirem o crescimento desses microrganismos. São classificados em bactericidas, quando causam a morte da bactéria, ou bacteriostáticos, quando promovem a inibição do crescimento microbiano (WALSH, 2003).

O uso de antibióticos no tratamento periodontal não-cirúrgico é indicado nos casos em que raspagem e alisamento radicular apresentam limitações importantes. No entanto, seu uso é controverso devido aos efeitos secundários a eles associados e as divergências em relação à sua prescrição (MORENO et al., 2012).

No estudo de Moreno et al. (2012), determinou-se a eficácia de antibióticos sistêmicos no tratamento de Periodontite Agressiva (PA) e Crônica. A suplementação da terapia periodontal não-cirúrgica com tratamento utilizando-se antibióticos sistêmicos, como amoxicilina, ácido clavulânico, metronidazol e doxicilina em dose subantimicrobial forneceu resultados estatisticamente significativos no tratamento periodontal de pacientes com PA ou Crônica, aumentando simultaneamente, a nível clínico, a inserção da gengiva e reduzindo a profundidade de sondagem periodontal.

Clinicamente, para o tratamento da Periodontite Crônica, o Cirurgião Dentista utiliza-se de terapias que envolvem procedimentos mecânicos, como a raspagem, alisamento radicular e profilaxia, e tratamento periodontal não cirúrgico com uso de antimicrobianos. Dentre eles destacamos a amoxicilina e o metronidazol prescritos de forma conjugada, podendo obter assim, um efeito sinérgico. Há uma eficácia no uso destes antimicrobianos na Periodontite Agressiva e na Crônica, sendo capazes de promover um ganho de inserção gengival e uma redução na profundidade de sondagem.

1.6.1 Resistência à Antibióticos

O fenômeno ecológico que ocorre como resposta da bactéria frente ao amplo uso de antibióticos e sua presença no meio ambiente pode ser chamado de resistência. As bactérias podem trocar material genético entre linhagens de mesma espécie ou de espécies diferentes, multiplicando-se rapidamente, podem sofrer mutação e são promíscuas. São microrganismos com alta capacidade de adaptação a diversos fatores, como a exposição a agentes químicos potentes (FERNANDES, 2006; LEVY, 2005).

As bactérias têm alta capacidade de desenvolvimento de resistência contra antibióticos. No entanto, em cenário recente, o perfil de resistência bacteriana é continuamente aumentado e seu controle é o grande desafio para cientistas e pesquisadores (RAI et al., 2009).

O Instituto de Tecnologia em Alimentos (IFT - *Institute of Food Technology*), na Inglaterra, definiu a resistência à drogas como a “Capacidade temporária ou permanente de um microrganismo e sua descendência em permanecer viável e /ou multiplicar sob condições que destroem ou inibem outros membros da espécie/cepa” (RAI et al., 2009).

A resistência nem sempre ocorre com o patógeno que está sendo focado no tratamento, sendo, portanto difícil prever qual microrganismo vai ser influenciado por um determinado antibiótico (FERNANDES, 2006). É necessário conhecer os mecanismos bioquímicos e genéticos envolvidos na resistência bacteriana para se entender como a bactéria pode desenvolver a resistência. Essa resistência é causada por alguns fatores básicos: inativação do antibiótico diretamente na molécula bioativa por alterações químicas, geralmente promovidas por enzimas bacterianas (WRIGHT, 2005), modificação do alvo que leva à perda de sensibilidade ao antibiótico (LAMBERT, 2005), mudanças na bomba de efluxo e permeabilidade externa da membrana que promovem a redução da concentração do antibiótico sem sua modificação química (ALLINGTON, 2001), e transmissão do alvo; algumas bactérias se tornam insensíveis a alguns antibióticos pela capacidade de transmitir a inativação de uma determinada enzima, ou seja, os antibióticos com mecanismos de ação que envolvem inibição enzimática tornam-se inativos por não terem o alvo para atuar. Lembrando que esses mecanismos podem variar de patógeno para patógeno (HAPPI, et al., 2002).

Os mecanismos de resistência são complexos sistemas de inativação das drogas. Genes naturais de algumas bactérias, ou conseguidos através de outras, codificam enzimas inativadoras ou degradadoras de antibióticos. Alguns antibióticos ativam esses genes, desreprimindo-os e causando resistência, podendo ser estendido à antibióticos de maior espectro e tornando a bactéria mais resistente. Esses genes podem também ser transmitidos, de forma horizontal (para diferencial do vertical – mãe para filha) ou HGT (*horizontal gene transfer*), de bactéria para bactéria da mesma espécie ou até de outras espécies. Outras formas de troca de material pelas bactérias é trocarem entre si (conjugação), pela captação de material genético espalhado por uma co-irmã morta em combate (transformação); e por fim, podem contrair – tal como uma “doença” material genético de outra bactéria, da mesma espécie ou não, através de um vírus chamado fago (transdução) (FERNANDES, 2006).

Dessa forma, os mecanismos de bombeamento de antibióticos para fora do citoplasma bacteriano são conhecidos como bombas de efluxo. Perfurações na membrana bacteriana são

causados por muitos antibióticos provocando uma morte por choque osmótico na bactéria. O efluxo ativo realizado pelo bombeamento ativo de antimicrobianos do meio intracelular para o extracelular, produz resistência bacteriana a determinados antimicrobianos (FERNANDES, 2006).

O desenvolvimento de resistência bacteriana pode tentar ser evitado por algumas estratégias: uso indiscriminado de antibióticos, prevenção da disseminação de microrganismos resistentes e utilização de vacinas para prevenir infecções bacterianas e desenvolvimento de novos antibióticos e compostos que não sejam antibióticos visando evitar a proliferação de bactérias multidrogaresistentes (MDR). Além disso, a diversidade, localização e caracterização dos genes responsáveis pela resistência são fatores responsáveis para o entendimento do processo de resistência bacteriana (MOELLERING, 2008).

1.7 Nanociência e Nanotecnologia

A nanotecnologia, é uma tecnologia multidisciplinar, que está compreendida dentro da nanociência. A nanociência estuda os fenômenos e a manipulação dos materiais em escala macromolecular, molecular e atômica, sendo que as propriedades diferem, de forma significativa, das propriedades macroscópicas.

O emprego da nanotecnologia surge em várias áreas do conhecimento científico como na mecânica, óptica, eletrônica, medicina, odontologia, energia, têxtil, etc. O prefixo nano indica a ordem de grandeza de 10^9 ou bilionésimo. Essa nova tecnologia objetiva a criação de novos materiais ou desenvolvimento dos já existentes, de forma a alcançar diferentes propriedades, por meio da manipulação de átomos, moléculas e demais partículas de ordem de grandeza nanométrica (GOGOTSI, 2006).

Fundamenta-se no fato de que a redução das substâncias em escalas muito pequenas mudam substancialmente suas propriedades (GARCIA, 2011). Metais tornam-se muito mais duros e tenazes, cerca de sete vezes mais, com tamanhos de grão de aproximadamente 10 nm do que os comumente encontrados com tamanho de algumas centenas de nm (GARCIA, 2011).

As dimensões das partículas, para nanotecnologia, devem estar no intervalo de 1 – 100 nm, e suas superfícies envolvidas são muito maiores em comparação aos volumes, propiciando maiores áreas de contato. Dessa forma, deduz-se que as nanopartículas possuem maior superfície por unidade de massa comparada a partículas maiores, tornando-se também, extremamente reativas, pois as reações químicas ocorrem nas superfícies, comparadas à massa

de material constituído de partículas maiores (EDELSTEIN, 1996; GOGOTSI, 2006; GUOZHONG, 2004).

Assim, a classe de materiais cujas propriedades diferem dos materiais ortodoxos em virtude de seu grau estrutural em escala manométrica é definida como nanomaterial (GOGOTSI, 2006).

1.8 Nanopartículas de Prata (Ag)

O desenvolvimento ou modificação de compostos antimicrobianos para melhorar o potencial bactericida é uma área prioritária de investigação nesta era moderna (HUMBERTO et al., 2010). A Nanotecnologia fornece uma boa plataforma para modificar e desenvolver as propriedades importantes do metal sob a forma de nanopartículas (NPs) com aplicações promissoras em diagnósticos, biomarcadores, marcação celular, agentes de contraste para imagiologia biológica, agentes antimicrobianos, os sistemas de administração de medicamentos e drogas nano para o tratamento de várias doenças (MARCATO e DURAN, 2008; SINGH e SINGH, 2011). Por isso, os pesquisadores, em geral, estão mudando o foco de pesquisa para nanopartículas, e em particular, as nanopartículas de prata, para resolver o problema da emergência de bactérias MDR (GEMMELL et al., 2006).

A prata é um metal de transição que em temperatura ambiente encontra-se no estado sólido, possui cor prateada, brilhante, maleável, dúctil e apresenta ótima condutividade elétrica, sendo pouco reativa e bastante resistente à corrosão. Embora não seja muito abundante, pode ser encontrada no estado nativo e na forma combinada, como no mineral argentita (Ag_2S). Pode ser extraída na forma de ciano complexos solúveis à partir de seus minérios. No entanto, a maior parte é obtida como subproduto do refino eletrolítico de metais comuns (Cu, Pb e Zn). Recentemente, uma quantidade considerável do metal tem sido obtida através da reciclagem (GUSTAVO, et al., 2013).

As propriedades antimicrobianas da prata são conhecidas há séculos, o seu uso para fins medicinais tem se expandido com o tempo, sendo utilizada em uma variedade de materiais na área de saúde e bem-estar humano, como por exemplo o seu uso em catéteres com a finalidade de evitar infecções (KEY e MASS, 2001). Com o aparecimento e crescimento de organismos microbianos resistentes a múltiplos antibióticos, diferentes formas de Nanomateriais têm sido sintetizados, sendo que os de prata estão entre os mais promissores agentes antimicrobianos que vêm sendo desenvolvidos a partir da nanotecnologia (SANPUI et al., 2008). As nanopartículas metálicas, tais como cobre, titânio, magnésio, zinco, ouro e

alginate têm um forte potencial bactericida devido à sua elevada razão entre área de superfície e volume (GU et al., 2003; AHMAD et al., 2005). Entre todos materiais, as nanopartículas de prata têm provado serem os mais eficazes agentes antimicrobianos contra bactérias, vírus e outros microrganismos eucarióticos (GONG et al., 2007).

A prata, tanto em sua forma metálica como iônica, possui uma ação antimicrobiana. Na forma de nanopartículas de prata (Ag-NP), no entanto, tem uma superfície de contato infinitamente maior e suas propriedades são enormemente aumentadas (GUSTAVO, et al., 2013). Devido a alteração das suas propriedades físico-químicas, as nanopartículas de prata têm emergido como agentes antimicrobianos, devido à sua elevada relação de área de superfície para volume e às propriedades físico-químicas diferenciadas (KIM et al., 2007). A mudança na reatividade e propriedades das nanopartículas é atribuível ao seu tamanho pequeno, em comparação com a matéria *bulk*. Quanto menor for o tamanho, quanto maior for a razão da área de superfície para determinado volume, maior será, obviamente, a atividade bactericida das nanopartículas de prata, portanto, a atividade bactericida é afetada pelo tamanho das nanopartículas. Ag-NP, com um tamanho na ordem de 10- 100 nm, apresentaram um forte potencial bactericida contra Gram-positivas e Gram-negativas (MORONES et al., 2005), apresentando também potencial bactericida contra as MDR. Além disso, as nanopartículas de prata também são responsáveis para modulação de citocinas na cicatrização de feridas (TIAN et al., 2007) e a inibição da formação de biofilme.

1.9 Nanopartículas de Óxido de Zinco decoradas com Prata

Óxido de zinco (ZnO) é um composto inorgânico, com características semicondutoras, é muito estável à altas temperaturas, apresentando estabilidade química e propriedades fotoelétrica e piezoelétrica, absorve a radiação ultravioleta (UV) e é insolúvel em água e na maioria dos alcoóis. Recentemente, com o desenvolvimento de técnicas para produção deste óxido com características nanoestruturais, novas aplicações vêm sendo vislumbradas com o intuito de aproveitar as propriedades acentuadas (GUIMARÃES, 2013).

As nanopartículas de óxido de zinco (ZnO-NP) possuem propriedades vantajosas quando comparadas aos compostos orgânicos, principalmente pelo fato de serem resistentes ao calor (SALIANI et al., 2015), permitindo sua aplicação em processos como o de transformação de plásticos. Entre os diversos materiais metálicos nanoestruturados utilizados como agentes antimicrobianos, o ZnO vem recebendo cada vez mais atenção não só devido a sua excelente eficiência bactericida e fungicida, mas também por não ser classificado como um metal pesado

e ser um material que apresenta baixíssima toxicidade aos seres humanos, sendo seguro e biocompatível (LIU et al., 2009), o que contribui para que o mesmo seja utilizado como agente ativo em medicamentos devido a sua atividade antimicrobiana (TALEBIAN e ZAVVARE, 2013).

A incorporação de NPs, em materiais odontológicos, vem sendo estudada nos últimos anos devido ao seu potencial antibacteriano, podendo sintetizar materiais que previnam a cárie recorrente, aumentando a longevidade do tratamento executado (BELL, 2014).

Diversos cimentos usados na Odontologia são constituídos de ZnO (pó). Dentro deste contexto, a aplicação da nanotecnologia, por meio do uso de NPs e materiais nanoestruturados, têm atraído o interesse para síntese da forma nanoparticulada do ZnO. Acredita-se que as ZnO-NP sejam efetivas no controle de vários microrganismos, por apresentarem a capacidade de mudar os componentes da membrana celular da bactéria e distorcê-la, levando à perda do componente intracelular e conseqüentemente à morte. Entre as vantagens desse material soma-se o fato do mesmo ser atóxico, seguro e biocompatível (BELL, 2014).

No estudo de Chen et al. (2015), a matriz híbrida de nanopartículas de óxido de zinco decoradas com prata (ZnO-Ag-NP) foi tratada em bactérias gram-negativas e gram-positivas para avaliar a eficiência antimicrobiana destas nanoestruturas híbridas.

As atividades antimicrobianas de ZnO-NP e de ZnO-Ag-NP no polidimetilsiloxano (PDMS) foram avaliadas mostrando que ZnO-Ag-NP exibiram uma heteroestrutura de maior eficiência antimicrobiana (mais de 20%) em relação à bactérias gram-positivas e bactérias gram-negativas, em comparação às nanopartículas de óxido de zinco incubadas na primeira hora. NPs de Ag demonstraram efeito antimicrobiano dependendo da forma de contato superficial, onde a prata pode inibir o sistema enzimático da cadeia respiratória, influenciando assim a síntese de DNA (LU et al., 2008).

Os resultados indicam que não são significativos os efeitos nocivos aplicados às células. As ZnO-Ag-NP mostraram reforçada eficiência antimicrobiana para bactérias gram-negativas, *E. coli*, e para as bactérias gram-positivas, *Staphylococcus aureus*, em comparação às nanopartículas de ZnO. As ZnO-Ag-NP mostraram propriedades luminescentes, elevada eficiência antimicrobiana e boa biocompatibilidade (CHEN et al., 2015).

1.10 Métodos de Sínteses

As propriedades das nanopartículas (ópticas, elétricas, magnéticas e antimicrobianas) dependem diretamente de sua concentração, tamanho e forma. Para a síntese de nanopartículas podem ser utilizadas duas rotas: Top Down e Bottom Up (GORUP, 2010).

A rota de síntese Top Down é aquela em que há manipulação do material em escala macro e através de processos físicos, quebram-se as partículas até que estejam na escala nanométrica (LIDE, 2007). Em contrapartida, tem-se a rota Bottom Up, que é a preferida por ser mais simples e possibilitar maior controle sobre o processo (controle de tamanho, forma, material monocristalino e a possibilidade de obtenção de partículas em escala de tamanho muito inferior que as produzidas pela rota Top Down) (CAO, 2004). De acordo com Zanchet et al. (1999), para obtenção das nanopartículas por tais métodos utilizam-se precursores moleculares ou atômicos e reações químicas.

A rota Bottom Up "de baixo para cima", consiste em tentar sintetizar um material a partir de seus componentes básicos (ou seja, seus átomos e moléculas), ou seja, sintetizar um nano-objeto pela deposição lenta e controlada de átomos sobre uma superfície bastante polida e regular. Muitas vezes, os átomos depositados se organizam espontaneamente, formando estruturas bem definidas de tamanho nanométrico. É também possível construir objetos nanométricos a partir de reações químicas controladas. Nanopartículas de materiais metálicos, como por exemplo a prata, são obtidas em reações químicas em meios aquosos, nas quais os átomos de prata dissolvidos na solução se juntam para formar agregados de tamanho nanométrico (GOGOTSI, 2006; GOGOTSI, 2006).

Diversos estudos mostram que a síntese coloidal é um métodos mais versáteis, baratos e com possibilidade de se gerar partículas cilíndricas, cúbicas, triangulares, prismáticas, bastões, placas, entre outras. Do ponto de vista experimental e teórico, a redução no tamanho das partículas dificulta a sua caracterização por técnicas convencionais e é fundamental que se obtenha amostras com estreita distribuição de tamanho (PILLAI et al., 2004; RONGCHAO et al., 2003; BRUST et al., 2002; ZANCHET et al., 2000).

Nos últimos anos, tem-se a descrição de várias rotas de obtenção de nanopartículas por meio de precursores em solução. Estas nanopartículas sintetizadas desta forma permanecem dispersas na solução original, comportando-se de maneira similar ao de uma solução homogênea. Nanopartículas dispersas em um solvente representam, na realidade, uma forma de dispersão coloidal, onde a fase dispersa é formada por nanopartículas em escala nanométrica (YIN et al., 2005; MURRAY et al., 2001).

1.10.1 Método do Citrato

Um dos métodos de síntese de NPs metálicas mais usados é o Método do Citrato ou Método de Turkevich está entre os métodos da rota Bottom Up mais utilizados na obtenção de nanopartículas metálicas. Este método foi proposto inicialmente por Turkevich em 1951 e utilizado na obtenção de coloides de ouro e, posteriormente, utilizado para síntese de outros metais (TURKEVICH et al., 1951). Baseia-se em uma reação de óxi-redução em meio aquoso entre o citrato e o sal metálico. Para sais de prata e zinco é necessário incremento na temperatura, enquanto que para sais de ouro pode ser realizada em temperatura ambiente. Os processos de nucleação e crescimento das nanopartículas de prata ocorrem em tempos e temperaturas maiores comparadas com as de ouro, devido a menor reatividade do sal de prata (GORUP, 2010).

Este método, quando comparado às demais rotas, apresenta algumas vantagens como baixo custo, procedimento simples, fácil, rápido, reproduzível, seguro, pois os reagentes não são tóxicos e a reação pode ser realizada em sistema aquoso, gerando partículas com boa homogeneidade e com tamanhos de cerca de 20 nm (HENGLEIN, 1999).

A razão citrato/sal metálico determinará diretamente o tamanho final das nanopartículas, de tal forma que quanto maior a razão, menor o tamanho médio das nanopartículas. As reações com relação estequiométrica acima de 3:1 de citrato/sal metálico apresentam uma pequena variação no tamanho das partículas, sendo obtidas nanopartículas com tamanho médio em torno de 20nm com estreita distribuição de tamanho de partículas. Para razões menores que 3:1, as nanopartículas assumirão tamanhos maiores que 20 nm com variadas distribuições de tamanho e formas (DONG et al, 2009).

1.10.2 Métodos de Síntese de ZnO Nanoestruturado

O óxido de zinco é um semicondutor intrínseco, encontrado naturalmente no mineral chamado zincita e está na classe dos óxidos condutores transparentes (TCO), sendo altamente transparente à luz visível e eletricamente condutor. É um pó fino, amorfo, de coloração branca e é uma molécula covalente (MAYRINCK et al., 2014).

Existem alguns métodos de síntese de óxido de zinco nanoestruturado:

1.10.2.1 Síntese Via co-precipitação

A forma mais comum para a obtenção de nanopartículas é através de reações químicas (redução química, fotorredução, oxidação e hidrólise). Alguns parâmetros relacionados com a solubilidade, condições de tempo de reação, agitação e velocidade de adição dos reagentes, concentração e temperatura da síntese podem induzir a precipitação (MANZOOR et al., 2009).

1.10.2.2 Síntese via deposição química e física

Esta síntese envolve os métodos de deposição física e química de vapor. O processo de deposição física de vapor, de um modo geral, consiste em colocar o material de partida no centro de um tubo inserido em um forno elétrico e aquecê-lo sob uma taxa de aquecimento específica. Um gás inerte (argônio ou nitrogênio) é utilizado como gás de arraste durante o processo. A temperatura e a pressão são mantidas por um período de tempo consideravelmente suficiente para vaporizar o material de partida e conseguir uma quantidade razoável de deposição. O vapor gerado tornar-se-á supersaturado e condensará. Ao atingir um substrato ocorrerão nucleação e crescimento das nanoestruturas (MAYRINCK et al., 2014).

1.10.2.3 Síntese Solvotérmica

A síntese solvotérmica consiste em um método simples e eficaz na preparação de materiais cristalinos, tendo sido bastante utilizada na fabricação de nanoestruturas de ZnO, (JOON-YUB et al., 2011), demonstrando várias vantagens em relação a outros processos de crescimento, tais como o uso de um equipamento simples, crescimento sem catalisador, baixo custo, produção de materiais com grande área uniforme e não agressivo ao meio ambiente. O conceito de síntese hidrotérmica abrange temperatura e pressão acima da ambiente. (CHUNLEI et al., 2007).

1.10.2.4 Síntese via Sol-Gel

Esta síntese, usa meios químicos para produzir compostos intimamente misturados que são hidrolisados dentro de géis. Ocorre uma transição do sistema sol para um sistema gel

formando agregados esféricos. É bastante indicada para revestir grandes áreas de superfícies que apresentam compostos em escala nanométrica muito bem definida (LEE et al., 2009).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Sintetizar Ag-NP e ZnO-Ag-NP, e avaliar o potencial antimicrobiano sobre cepas de bactérias envolvidas na patogenia da Periodontite Crônica.

2.2 Objetivos Específicos

- Analisar a qualidade da síntese das NPs por Difração de Raios X (DRX) e Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET);

- Avaliar a atividade antimicrobiana e determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) das Ag-NP, ZnO-Ag-NP sobre *Fusobacterium nucleatum* e *Porphyromonas gingivalis*, *in vitro*, utilizando os tempos de exposição de 24, 48, 72 e 96h e, compará-las à atividade antimicrobiana da AMX e MTZ, nas mesmas condições experimentais.

3.1 Tipo e Local do Estudo

Trata-se de um estudo quantitativo, utilizando-se 2 cepas bacterianas da Coleção de Cultivo Americana (ATCC - *American Type Culture Collection*) predominantes em pacientes portadores de PC e sua interação com as NPs metálicas. Os experimentos foram realizados nos Laboratórios de Microbiologia e Morfofisiologia da Unidade Acadêmica Especial da Saúde, Universidade Federal de Goiás, Regional Jataí, Unidade Jatobá.

3.2 Cultivo das Bactérias

Foram semeadas duas cepas bacterianas ATCC - *Fusobacterium nucleatum* (ATCC 10953) e *Porphyromonas gingivalis* (ATCC 33277) – em placa de Petri, com ágar sangue, em forma de estria sinuosa, em zigue-zague, partindo da base para a extremidade do bisel (superfície inclinada do meio).

Após o cultivo e crescimento das colônias, amostras destas foram adicionadas ao caldo BHI (*Brain Heart Infusion* – Infusão de Cérebro e Coração), onde cresceram por 48h. Para garantir que apenas o microorganismo desejado fosse semeado, foram utilizadas as técnicas assépticas.

3.3 Síntese das Nanopartículas de Prata e de Óxido de Zinco decoradas com Prata

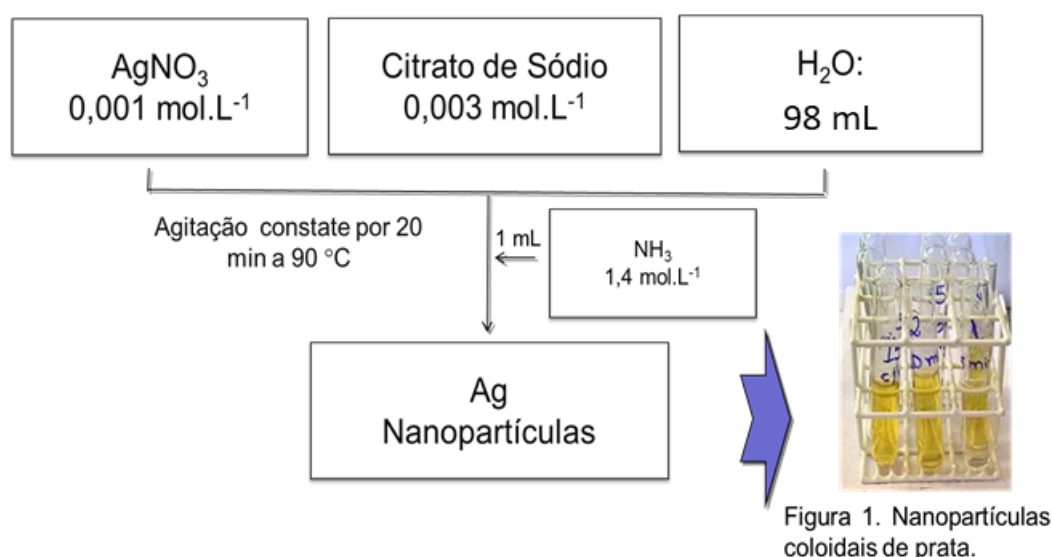
As nanopartículas utilizadas neste projeto foram sintetizadas em parceria com a Profa. Dra. Tatiane Moraes Arantes do curso de Química da Universidade Federal de Goiás da Regional Jataí.

As Ag-NP foram sintetizadas pelo método de Turkevich (TURKEVICH, 1951), também conhecido como Método do Citrato, que consiste na redução da prata na solução de nitrato de prata com a adição de citrato de sódio com relações estequiométricas de 1:3, respectivamente. O sal de citrato foi utilizado como agente redutor e a água utilizada foi a deionizada, utilizando-se um equipamento um sistema de deionização por osmose reversa. Os reagentes e solventes utilizados estão descritos na Tabela 1.

TABELA 1. Reagentes e solventes utilizados para preparar as ZnO-Ag-NPs

Substância	Pureza (%)	Fabricante/País
Nitrato de Prata $\text{AgNO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$	98,8	Synth, Brasil
Citrato de Sódio, $\text{Na}_3\text{C}_3\text{H}_5\text{O}(\text{COO})_3$	99,0	Synth, Brasil
Hidróxido de Amônio, 30% solução aquosa	28-30	Dinâmica, Brasil
Acetato de Zinco dihidratado, $\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_4\text{Zn} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	98,0	Sigma Aldrich, Alemanha
Álcool Benzílico, $\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_2$	99,0	Dinâmica, Brasil
THF - Tetrahidrofurano – Éter, $\text{C}_4\text{H}_8\text{O}$	99,9	Sigma Aldrich, Alemanha
Hidróxido de Potássio, KOH	99,5	Synth, Brasil

Em um béquer foram adicionados 98,0 mL de água deionizada e aquecida sob agitação magnética até atingir a temperatura de 90°C. Em seguida, foram adicionados 1,0 mL da solução de AgNO_3 (0, 1 mol.L⁻¹) e 1,0 mL de solução de citrato de sódio (0,3 mol.L⁻¹). A solução foi mantida sob agitação a 90°C por cerca de 10 minutos até o aparecimento da coloração amarela. Após este período, foram adicionados 2,0 mL de solução de hidróxido de amônio (1,4 mol.L⁻¹). Após tal adição, a solução permaneceu a 90°C por mais 10 minutos, sob agitação, conforme o esquematizado na Figura 2. Após este período, a síntese das Ag-NP foi finalizada, apresentando-se em dispersão coloidal, resultando em uma solução de concentração de 108µg/ml.

**FIGURA 2** Fluxograma da síntese de Ag-NPs.

As nanopartículas de ZnO foram sintetizadas por meio da síntese solvotérmica. Para tanto, dissolveu-se acetato de zinco em álcool benzílico, cuja concentração foi de 30mmol.L⁻¹.

Após a completa dissolução, transferiu-se a solução para um frasco de autoclave de alumínio contendo um copo interno de teflon, o frasco foi mantido em estufa à 120°C por 24h. Após este intervalo de tempo, a suspensão coloidal obtida foi separada por centrifugação. Lavou-se então o pó obtido com THF – tetrahidrofurano (éter, C₄H₈O), duas vezes e centrifugada durante 9 min, sendo realizada em 3 momentos de 3 min cada um e, por fim, secou-se em placa aquecida à 60°C, por 3h. Após a secagem na estufa foi pesada a massa de ZnO, obtendo-se 0,089g.

Para a formação da dispersão coloidal das ZnO-Ag-NP, misturou-se 0,05g de ZnO em 98 ml de água aquecida à 90°C e posteriormente seguiu-se com a síntese das Ag-NP pelo método de Turkevich como o esquematizado na Figura 1. Após 10 min, obtivemos a dispersão coloidal de ZnO-Ag-NP em uma concentração de 500 µg/ml.

As dispersões coloidais, nanopartículas de Ag-NP e ZnO-Ag-NP, obtidas foram caracterizadas por MET e DRX.

3.4 Caracterização

As nanopartículas foram caracterizadas por DRX no Laboratório de Física da Universidade Federal de Goiás – Regional Jataí, em um equipamento Rigaku, e os difratogramas foram realizados em 2θ na faixa de 10 a 70° com passo de 0,03°.

As imagens de MET no modo de baixa resolução foram obtidas usando um microscópio eletrônico de transmissão Philips CM 120. As amostras foram preparadas adicionando-se uma gota de colóide sobre grades de cobre recobertas com filme de carbono. As microscopias foram realizadas no Laboratório Interdisciplinar de Eletroquímica e Cerâmica (LIEC) do Departamento de Química na Universidade Federal de São Carlos.

3.5 Avaliação da Atividade Antimicrobiana por Método de Microdiluição

Foram realizados no mínimo três testes independentes em triplicata, utilizando-se a metodologia de microdiluição seriada em placas de 96 poços fundo plano (Figura 3) onde os compostos foram diluídos em 200µL na concentração inicial de 150 e 32,4 µg/mL para ZnO-Ag-NP e Ag-NP, AMX e MTZ, respectivamente. Em sequência, executou-se a adição de 100µL de meio de cultivo puro para todos os poços, exceto o primeiro poço de cada linha, e fez-se a diluição seriada de 1:2, descartando-se 100µL no final da última coluna da placa.

Após essa microdiluição seriada adicionou-se 100µL de meio de cultivo + microorganismo na turbidez correspondente ao tubo 0,5 na escala de McFarland para bactérias na proporção 1:1 de meio específico contendo as NPs ou antibióticos; perfazendo uma série de microdiluições em 12 concentrações. Os controles executados foram, positivo (meio de cultivo + microorganismo) e negativos (meio puro e meio + compostos). A incubação foi realizada à 35°C em condição de anaerobiose.

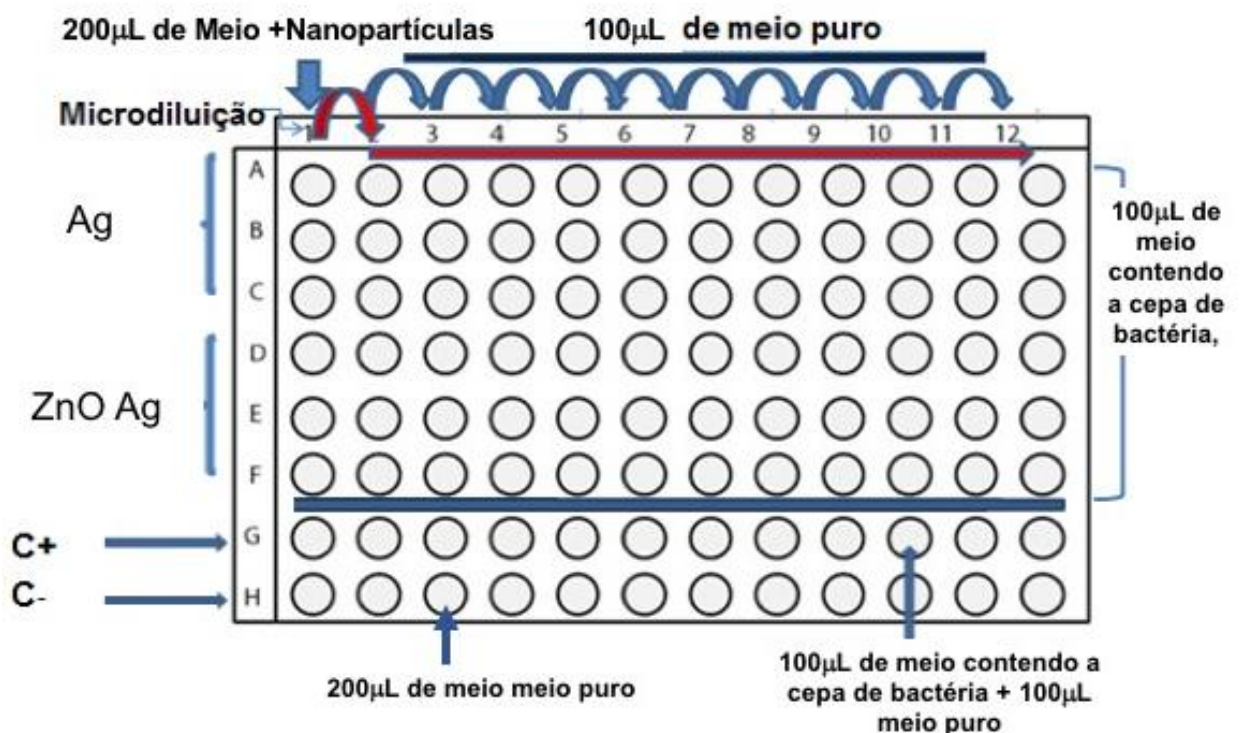


FIGURA 3. Microplaca de 96 poços de fundo chato com exemplificação do procedimento experimental da atividade biológica dos compostos sintetizados.

3.6 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

O valor da CIM (do Inglês – *Minimal Inhibitory Concentration - MIC*), é a menor concentração de um produto químico ou biológico que impede totalmente o crescimento visível de uma bactéria (atividade bacteriostática). Diferentemente, a concentração bactericida mínima (CBM), é a concentração que resulta na morte microbiana (atividade bactericida). A CIM é determinada pela preparação de soluções do composto ou agente pesquisado *in vitro* em concentrações decrescentes, incubando-as com bactérias cultivadas (TRIPATHI, 2013; ANDREWS, 2001).

As leituras para a determinação das CIMs das NPs e antibióticos foram realizadas visualmente e utilizando-se leitor de Elisa (Densidade Ótica - DO) a 630 nm; nos períodos de 24 h à 96h. Os valores finais das CIMs foram determinados com as médias dos percentuais de inibição (100%) dos experimentos realizados isoladamente.

3.7 Antibióticos

Para fins de comparação da ação das NPs testadas com fármacos já empregados comercialmente no tratamento da PC, Amoxicilina e Metronidazol, foram obtidos da Sigma-Aldrich/ MERCK (St Louis, MO)

3.8 Análise Estatística

Todas as variáveis foram analisadas por meio do software (Start Soft INC) versão 7.0. O teste estatístico utilizado foi o *Friedman Test*, adotado de acordo com a distribuição dos dados. O nível de significância foi de $p < 0,05$.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Obtenção das NPs

As Ag-NP foram obtidas a partir do método Turkevich modificado (GORUP, 2011), o qual se baseia na reação de óxido-redução em meio aquoso entre o citrato e o sal metálico. Como o potencial de redução da prata é menor que o do ouro faz-se necessário para a formação das nanopartículas de prata faz-se necessário que a síntese seja realizada em presença de temperaturas mais elevadas, como representado na Figura 4. Neste trabalho utilizou-se a temperatura de 90° C. Além disso, a presença do citrato como agente redutor apresenta vantagens, pois gera nanopartículas com boa homogeneidade e tamanhos controlados, pois o citrato pode atuar também como agente estabilizador das nanopartículas (HENGLEIN, 1999; KIMLING et al., 2006).

O hidróxido de amônio foi adicionado à reação após a fase de nucleação das nanopartículas com a finalidade de estabilizar o colóide de prata e obter dispersões coloidais com tamanho médio inferior ao método do citrato tradicional. O íon prata é o responsável pelo crescimento da partícula tanto sob aquecimento quanto à temperatura ambiente e a amônia impede a redução do íon prata, permitindo que os colóides possam ser armazenados por um período de tempo maior sem ocorrer a coalescência e formação de corpo de fundo (GORUP, 2010).

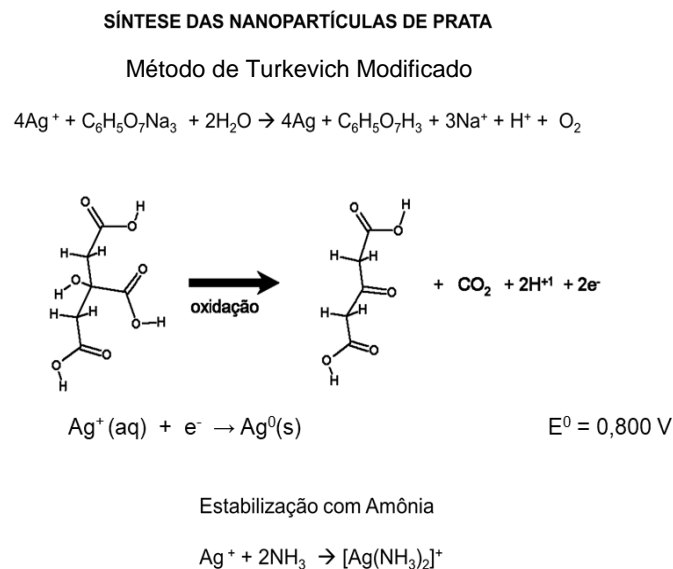


FIGURA 4. Reações de óxido-redução e de complexação envolvidas na síntese das Ag-NPs
Fonte: GORUP, 2010

As medidas de Difração de Raios X (Figura 5) mostraram que foram formadas Ag-NP na fase cristalográfica cúbica de face centrada de acordo com a ficha JCPDS 04-0783.

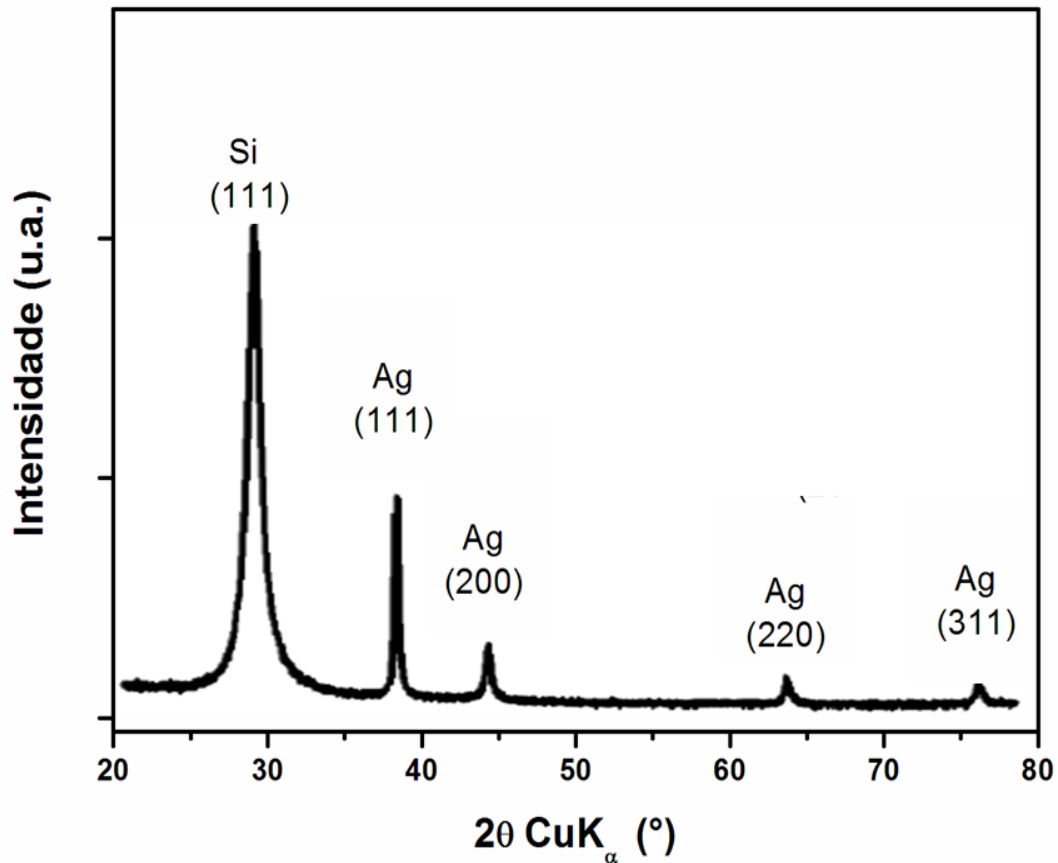


FIGURA 5. Difratogramas de DRX para as Ag-NPs após o tempo de síntese de 20 min.

As imagens de Microscopia Eletrônica de Transmissão (Figura 6) mostraram que as NPs apresentaram formato esférico com tamanho médio de cerca de 2 nm de diâmetro. Os resultados demonstraram a eficiência do método de síntese para a obtenção de suspensões coloidais de NPs de prata com tamanho e forma controlados (GORUP, 2011).

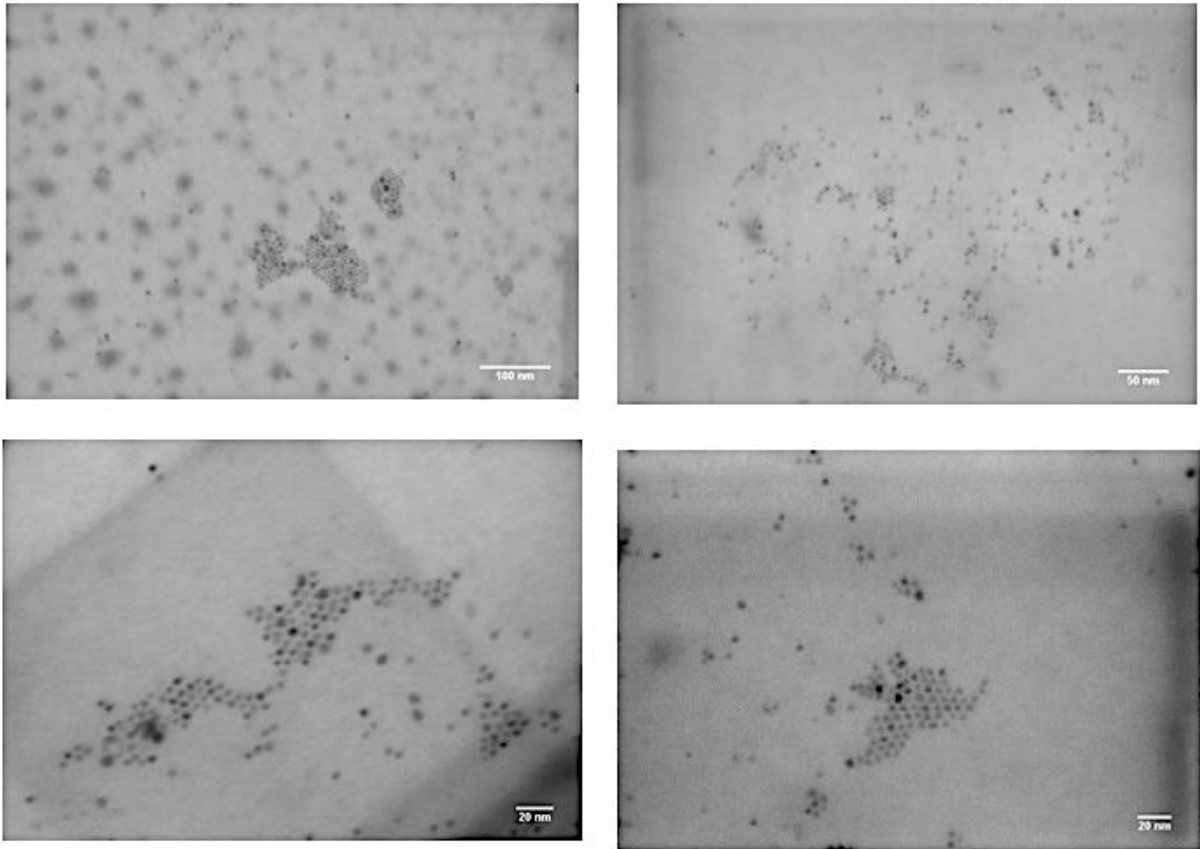


FIGURA 6. Imagens de MET das Ag-NPs com diferentes ampliações.

Pode-se observar, a partir dos difratogramas de Raios X (Figura 7), que foram obtidas NPs cristalinas de óxido de zinco, observa-se a presença da fase hexagonal de óxido de zinco do tipo Wurtzita, de acordo com a ficha JCPDS 36-1451. Para as NPs decoradas com Ag não se pode verificar a presença do pico de difração relativos a presença de Ag na fase cúbica devido à baixa concentração da mesma na amostra.

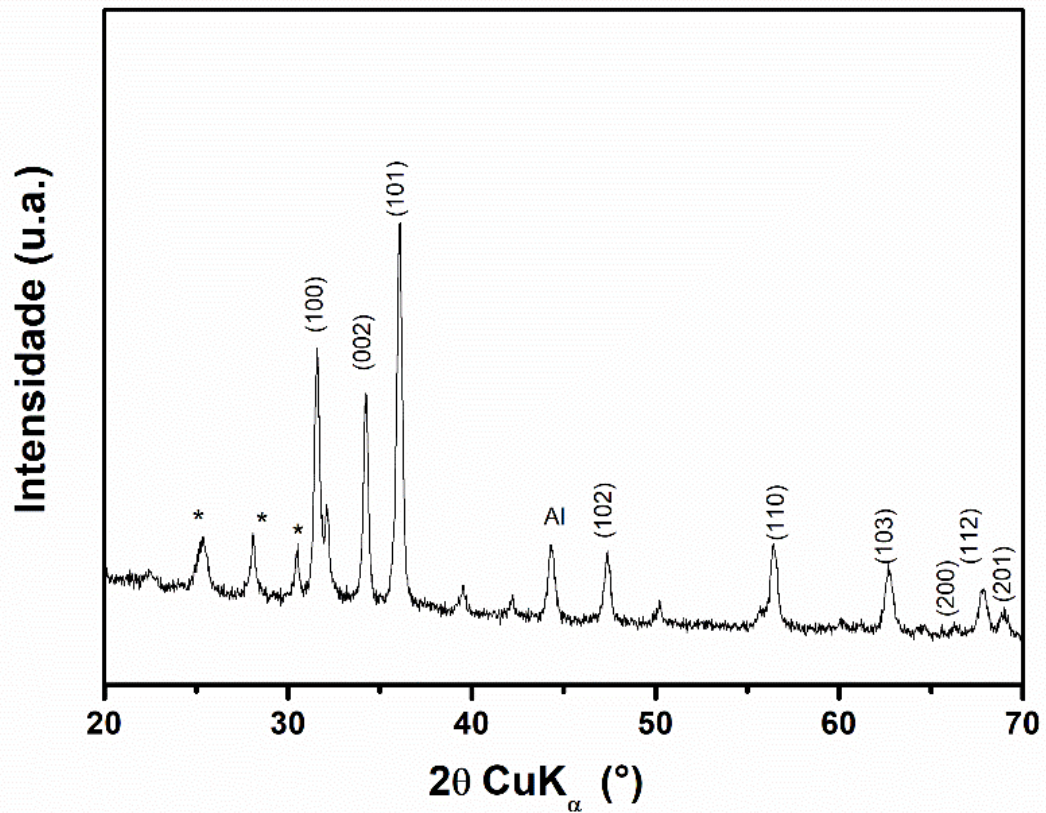


FIGURA 7. Difratoogramas de DRX para as ZnO-Ag-NPs após o tempo de síntese de 20 min.

Na Figura 8 pode-se observar as imagens de MET para as ZnO-Ag-NP. Pode-se observar que foram obtidas NPs de formato esférico com tamanho médio de cerca de 8 nm de diâmetro e estreita variação de tamanho.

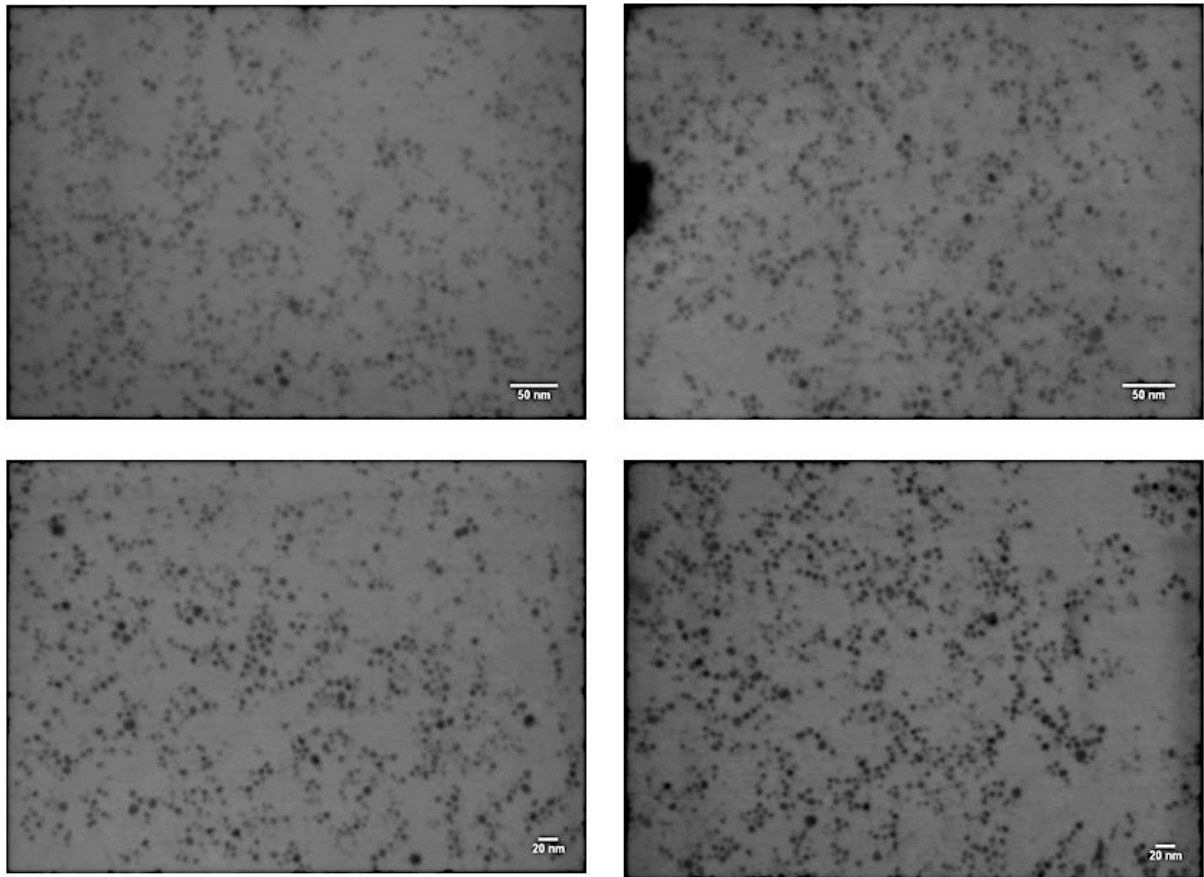


FIGURA 8. Imagens de MET das ZnO-Ag-NPs com diferentes ampliações.

4.2 Concentração Inibitória Mínima (CIM) das nanopartículas (NPs), Amoxicilina (AMX) e Metronidazol (MTZ)

Os dados obtidos apontam uma atividade antimicrobiana das Ag-NP e ZnO-Ag-NP sobre *F. nucleatum*, do tipo concentração-tempo dependente (Gráficos 1 e 2). Analisando separadamente as NPs, as Ag-NP apresentaram valores de CIM, com 32,4; 16,2; 8,1 e 4,05 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente para os tempos de 24, 48, 72 e 96h; quando comparadas com as ZnO-Ag-NP, os valores foram significativamente diferentes. Os valores de CIM para ZnO-Ag-NP, para os mesmos tempos de exposição, foram: >150, 150, 75 e 37,5 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente.

GRÁFICO 1. Inibição de crescimento microbiano pelo tratamento com Ag-NP por 24, 48, 72, 96h para *F. nucleatum*

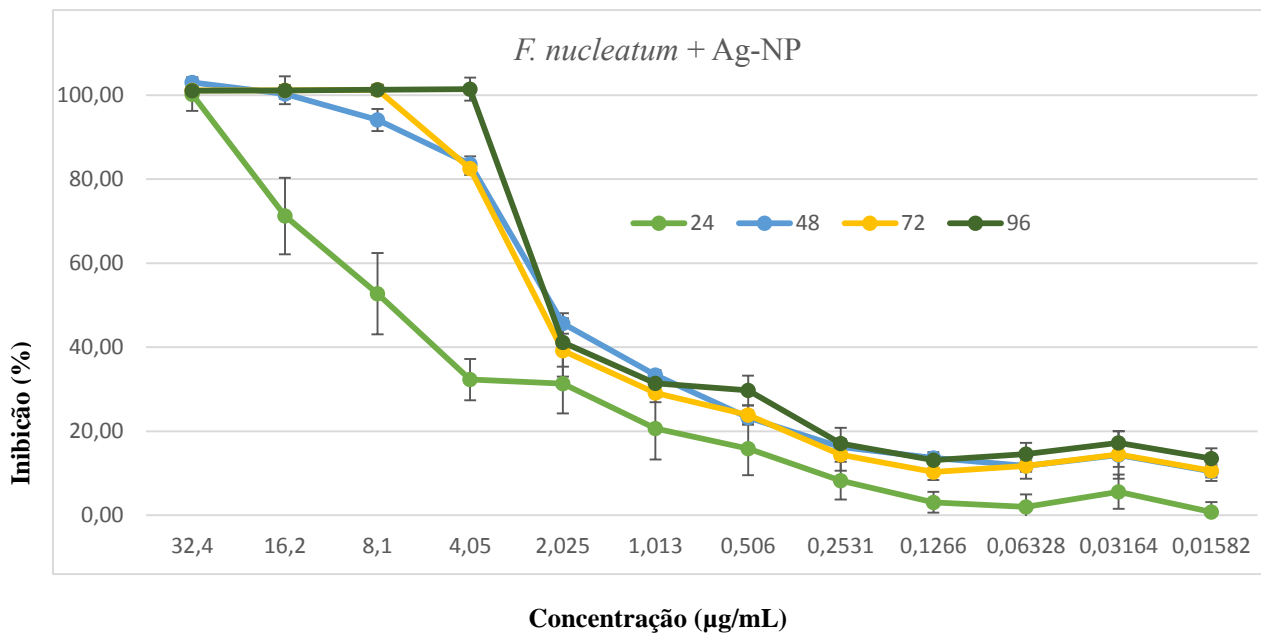
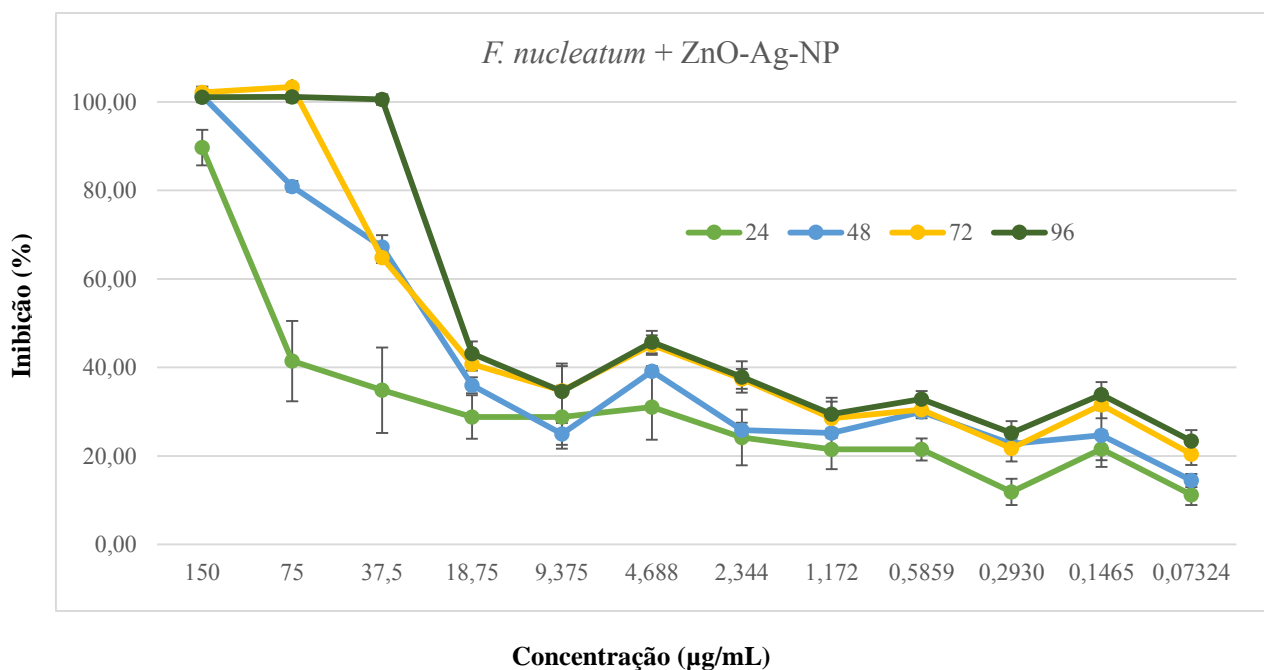


GRÁFICO 2. Inibição de crescimento microbiano pelo tratamento com ZnO-Ag-NP por 24, 48, 72, 96h *F. nucleatum*



Os valores de CIM para AMX e MTZ sobre *F. nucleatum* foram menores do que as NPs sob as mesmas condições experimentais (Tabela 2). Os valores para AMX corroboram aos achados de Daeschlein et al., (2006) em 48h (*F. nucleatum* - faixa de 0,016 a 0,047) e Azizan

et al., (2017) (*F. nucleatum* ATCC 25586). O referencial teórico a cerca da ação de MTZ sobre *F. nucleatum* é escasso tanto nos testes de microdiluição em caldo assim como em ágar. Aldridge et al., (2001) apontam para CIM na faixa de 0,12 a 8 µg/mL para 20 isolados de pacientes. Appelbaum, et al., (1990) também utilizando isolados de pacientes, apresentou CIM de 4 µg/mL, entretando o experimento foi realizado em difusão em ágar.

No estudo de Soares et al. (2015), biofilmes foram cultivados e foram expostos à amoxicilina (AMX), metronidazol (MTZ), azitromicina (AZM), e amoxicilina associada com metronidazol (AMX-MTZ) em quatro concentrações diferentes por 12, 24, ou 36 h. A clorexidina (CHX) (0,12%) foi utilizada como controle positivo. Trinta e cinco das 40 espécies usadas foram consistentemente recuperadas a partir dos biofilmes resultantes *in vitro*. Após 36 h de exposição na diluição de 1:27, CHX teve atividade metabólica reduzida em 11% menos do que a AMX-MTZ ($q = 0,0207$), mas 54% a mais que a AMX ($q = 0,0031$), 72% a mais que o MTZ ($q = 0,0031$), e 67% a mais do que AZM ($q = 0,0008$). Também foi observada evidência preliminar de uma interação sinérgica entre AMX e MTZ. Em resumo, foi desenvolvido biofilmes reprodutíveis com 35 espécies bacterianas subgingivais, e os resultados sugerem que a combinação de AMX e MTZ tiveram maiores efeitos antimicrobianos sobre estas multispécies de biofilmes *in vitro* do que o esperado com base nos efeitos independentes dos fármacos.

Uma possível explicação para os efeitos sinérgicos de MTZ e AMX pode ocorrer pelo aumento da absorção do MTZ na presença de amoxicilina, tal como foi descrito para o *A. Actinobacillus* (PAVIČIĆ et al., 1994). Essas descobertas proporcionam suporte adicional para o uso de tais drogas no tratamento de Doenças Periodontais (SOARES et al., 2015).

TABELA 2. Valores de CIM para *F. nucleatum* e *P. gingivalis*

Valores de CIM para <i>F. nucleatum</i> 24 - 96h				
Horas de tratamento	Ag-NP	ZnO-Ag-NP	AMX	MTZ
24	32,4* a,b	>150*	0,047	1,25 a,b
48	16,2 a,b	150 a,b	0,047 a,b	1,25 a,b
72	8,1 a,b	75 a,b	0,023 a,b	0,625 a,b
96	4,05 a,b	37,5 a,b	0,023	0,625 a,b
Valores de CIM para <i>P. gingivalis</i> 24 - 96h				
Horas de tratamento	Ag-NP	ZnO-Ag-NP	AMX	MTZ
24	>150 ^a	>150* ^a	0,047 a,b	5,0 a,b
48	150 ^{a,b}	>150 ^a	0,047 a,b	2,5 a,b
72	75 a,b	>150 ^a	0,023 a,b	0,625 a,b
96	37,5 a,b	150 ^a	0,023 a,b	0,625 ^a

*valores expressos em µg/mL, ^a diferença estatística quando comparada ao controle; ^b diferença estatística entre si

Na análise dos dados da exposição de *P. gingivalis* às NPs, como observado para *F. nucleatum*, houve na faixa de concentração de 150 a 37,5 $\mu\text{g/mL}$ atividade concentração-tempo dependente para Ag-NP. Pela exposição à ZnO-Ag-NP, a *P. gingivalis* observa-se a atividade concentração dependente mais claramente no período de 96h de exposição (Gráficos 3 e 4).

GRÁFICO 3. Inibição de crescimento microbiano pelo tratamento com Ag-NP por 24, 48, 72, 96h para *P. gingivalis*

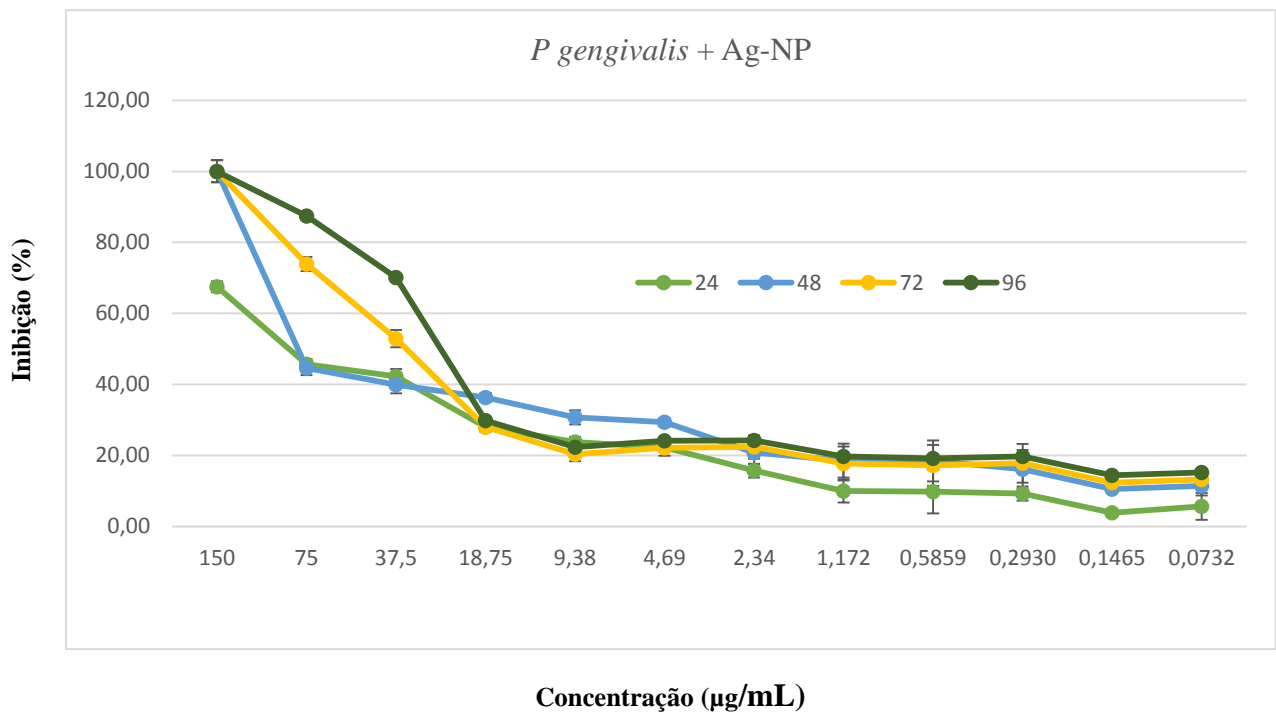
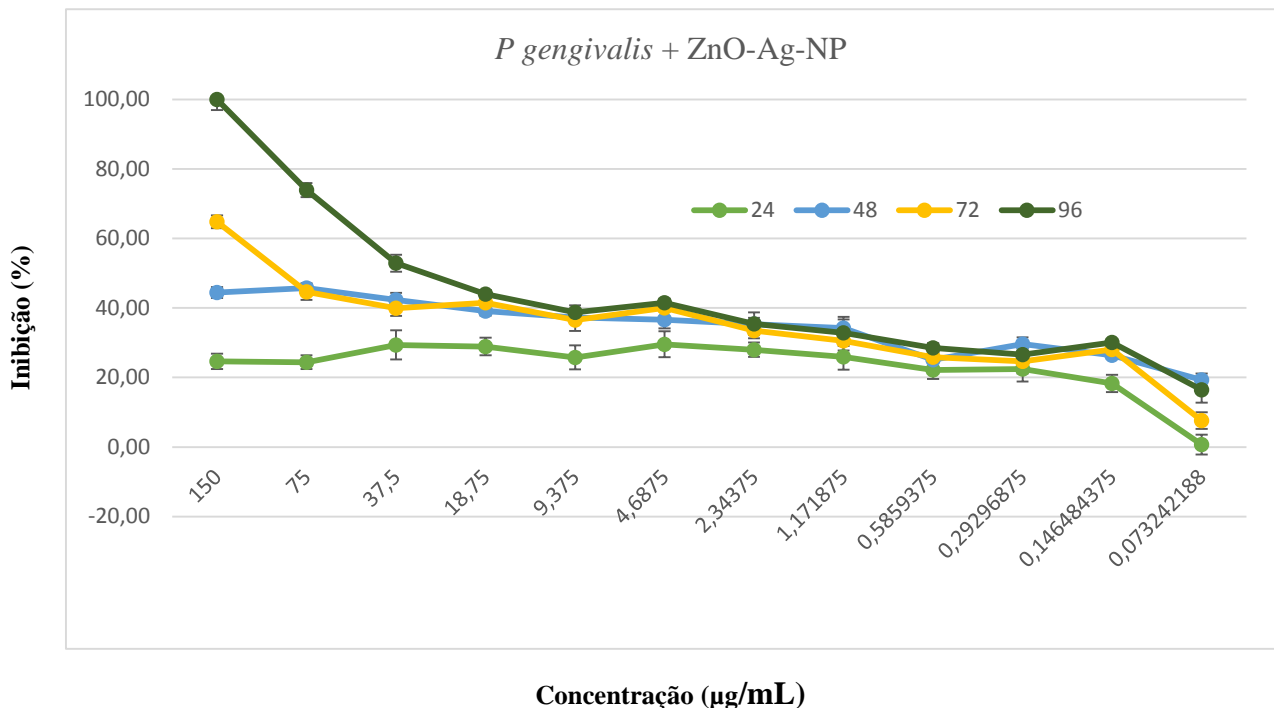


GRÁFICO 4. Inibição de crescimento microbiano pelo tratamento com ZnO-Ag-NP por 24, 48, 72, 96h para *P. gingivalis*



Comparativamente, observa-se maior sensibilidade de *F. nucleatum* às NPs do que *P. gingivalis*, tendo as Ag-NP com maior atividade antimicrobiana, nas condições testadas. Diferenças estatísticas foram observadas na ação das NPs (Tabela 2)($p < 0,05$).

A CIM para AMX e MTZ sobre *P. gingivalis* (Tabela 2), assim como para *F. nucleatum* (Tabela 2), foram menores do que as NPs sob as mesmas condições experimentais, demonstrando uma maior atividade antimicrobiana quando comparados às NPs. Os valores para AMX são próximos aos achados por Azizan, N. et al., (2017) (0,05 µg/mL - *P. gingivalis* ATCC 33277) e menores do que Larsen, T. (2002), com 0,25 µg/mL em frações plactonicas em 48h. A atividade MTZ observada sobre *P. gingivalis* assemelha-se ao relato de Fournier-Larente et al., (2016) (6,25 µg/mL *P. gingivales* ATCC 33277), e maior do que os resultados em meio TBK-HK por Azelmat, et al., (2015) (2,5 µg/mL 24h) e em isolados de *Porphyromonas ssp.* por Aldridge, K.E. et al., (2001) (2,0 µg/mL 48h).

A eficiência de íons de Ag já foi demonstrada contra espécies bacterianas Gram-negativas como *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *P. intermedia* e *E. corrodens* (KAWAHARA et al., 2000; SPACCIAPOLI et al., 2001). Supõe-se que o comportamento contra cepas Gram-negativas está relacionado à falta da espessa camada de peptidoglicano protetora que pode ser encontrada em espécies bacterianas Gram-positivas (SILVESTRY-

RODRIGUEZ et al., 2008). A eficácia antibacteriana da prata contra espécies patogênicas periodontais também foi mostrada em estudos como o de Kawahara et al., (2000), que apontaram o efeito antibacteriano do zeólito de prata contra espécies patogênicas orais sob condições anaeróbicas.

Outros arranjos contendo prata apresentaram efeitos sobre bactérias orais. Complexos de carboidratos com prata apresentaram atividade com CIMs entre 0,625 e 5,0 mmol/L para *F. nucleatum* e *P. gingivalis*, respectivamente (REISE et al., 2016). O CIM de Ag-NP neste trabalho para *F. nucleatum* é de 0,25 mmol/L, cerca de 2,5 vezes mais ativo que os complexos de carboidratos com a Ag. Os resultados corroboram com a literatura porque a CIM para *F. nucleatum* é menor que para *P. gingivalis*. Estudos sobre o efeito de membrana nanocomposta de Ag-nHA-nTiO₂/poliamida 66 em bactérias orais, demonstraram a inibição do crescimento de 91,84% de *P. gingivalis*; 90,64% de *F. nucleatum* e 90,49% de *S. mutans* (BAI et al., 2008).

Vargas-Reus et al. (2012), demonstraram atividade antimicrobiana de ZnO-NP, Ag-NP, óxido de cobre (CuO), dióxido de titânio (TiO₂) e óxido de tungstênio (WO₃), no tratamento de *P. intermedia*, *P. gingivalis*, *F. nucleatum* e *A. actinomycetemcomitans* em até 4h. Os valores de CIM para Ag-NP e ZnO-NP foram de 250 µg/mL para *P. gingivalis*, e de 100 e 250µg/mL, respectivamente para *F. nucleatum*. A faixa de tamanho das partículas obtidas pelo autor variou entre 10 e 50 nm. Estes resultados assemelham-se com os achados do presente estudo, diferindo apenas quanto às dimensões das partículas.

A atividade observada da Ag-NP, do tipo concentração-tempo dependente para ambas espécies tratadas (Gráfico 1, 2, 3 e 4; Tabela 2) esteve na faixa de de atuação de 32,2 a 4,05 µg/mL para *F. nucleatum* e de 150 a 37,4 µg/mL *P. gingivalis*. Os valores menores de CIM sugerem relação com as dimensões das partículas. Da mesma forma o CIM para ZnO-Ag-NP apresentou valor menor para *F. nucleatum* (150 a 37,5 µg/mL) do que o referencial para ZnO-Ag-NP sobre cepas de *P. gingivalis* (>150 a 150 µg/mL).

Comparativamente a *F. nucleatum* revelou-se mais sensível às NP do que a *P. gingivalis*. Entretanto, analisando-se as espécies separadamente, a Ag-NP foi mais ativa tanto contra *F. nucleatum* quanto sobre *P. gingivalis* tendo em vista os resultados na literatura.

VEČEŘOVÁ et al., (2017), verificaram que a atividade antibacteriana, de NPs de 28nm, sobre bactérias anaeróbicas (*Bacteroides fragilis*, *Btazoides thetaiotaomicron*, *Eggerthella lenta*, *Propionibacterium acnes*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium difficile* e *Fusobacterium varium*) variaram nas concentrações de 130 a 340 µg/mL. Segundo MORONES e colaboradores (2005), quanto menor for o tamanho das NPs, maior a razão da área de

superfície, maior a atividade bactericida das Ag-NP. Portanto, a atividade bactericida está diretamente associada ao tamanho das NPs.

Lu et al., (2008), relacionaram o efeito antibacteriano de Ag-NP de diferentes tamanhos contra bactérias anaeróbicas. As menores NPs testadas (5 nm) apresentaram efeitos antimicrobianos mais elevados em comparação às partículas maiores (15 a 55 nm). Ag-NP, com dimensões entre 10- 100 nm, são apresentadas com forte potencial bactericida contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (MORONES et al., 2005).

Estes achados sugerem relação entre as dimensões das Ag-NP (2 nm) e de ZnO-Ag-NP (8 nm) e as propriedades antibacterianas observadas neste estudo.

A atividade antibacteriana reduzida de ZnO-Ag-NP em relação à Ag-NP pode estar relacionada, como já referenciado, à baixa concentração de Ag nas NPs decoradas, como demonstrado na DRX, e por características intra-específicas das espécies e cepas utilizadas.

Diante do exposto, apesar de evidenciarmos o menor potencial bacteriostático das NPs de Ag e ZnO-Ag comparado aos principais antibióticos, AMX e MTZ, utilizados no tratamento contra as bactérias da PC, a síntese de novos medicamentos ou nanomateriais podem ser uma possibilidade promissora diante da propagação da resistência bacteriana, visto serem agentes antimicrobianos em potencial. Além de apresentarem propriedades bactericidas e baixa propensão de induzir resistência microbiana quando comparados aos antibióticos convencionais (LI et al., 2010; CARO et al., 2008), ainda que, em baixas concentrações, apresentam baixa toxicidade para as células humanas (FUNG et al., 1992; PAIM et al., 1998; JOKERST et al., 2012).

5 CONCLUSÕES

Os resultados demonstraram a eficiência do método de síntese para a obtenção de suspensões coloidais de NPs de prata com tamanho e forma controlados.

A DRX confirmou a síntese de Ag-NPs na fase cristalográfica cúbica de face centrada e de ZnO-Ag-NPs cristalina, na fase hexagonal do tipo Wurtzita.

A MET revelou NPs de Ag com formato esférico e tamanho médio de cerca de 2 nm e NPs de ZnO decoradas com Ag com 8nm, apontando a eficiência do método de síntese para a obtenção de suspensões coloidais.

Os valores de CIM para as Ag-NP e de ZnO-Ag-NP sobre *F. nucleatum* e *P. gingivalis* apontam para a atividade tipo concentração-tempo dependente. Análises das NPs, as Ag-NP apresentaram valores menores de CIM quando comparadas as ZnO-Ag-NP, para os mesmos tempos de exposição, 24, 48, 72 e 96h.

Comparativamente, observa-se com clareza maior sensibilidade de *F. nucleatum* do que *P. gingivalis* às NPs, tendo as Ag-NP com maior atividade antimicrobiana, nas condições testadas.

Os valores de CIM para AMX e MTZ sobre *F. nucleatum* (ATCC 10953) e *P. gingivalis* (ATCC 33277) foram menores do que as NPs sob as mesmas condições experimentais. Os dados sobre a sensibilidade aos antibióticos através do CIM para estas cepas, em condições de teste em microdiluição em condições anaeróbicas; colaborarão com os referenciais teóricos atualmente escassos.

6 REFERÊNCIAS

ABIKO, Y.; SAITOH, M. Salivary defensins and their importance in oral health and disease. *Curr Pharm Des* 13, 3065–3072, 2007.

AHMAD, Z.; PANDEY, R.; SHARMA, S.; KHULLER, G..K. Alginate nanoparticles as antituberculosis drug carriers: formulation development, pharmacokinetics and therapeutic potential. *Indian J Chest Dis Allied Sci* 48, 171–176, 2005.

ALBANDAR, J. M. Global risk factors and risk indicators for periodontal diseases. *Periodontology* 2000 29, 177–206, 2002a.

ALDRIDGE, K. E.; ASHCRAFT, D.; CAMBRE, K. et al. Multicenter survey of the changing in vitro antimicrobial susceptibilities of clinical isolates of *Bacteroides fragilis* group, *Prevotella*, *Fusobacterium*, *Porphyromonas*, and *Peptostreptococcus* species, *Antimicrob Agents Chemother*, vol. 45 (pg. 1238-43), 2001.

ALLINGTON, D. R.; RIVEY, M. P. *Clin. Ther.* 2001, 23, 24.

AMANO, A. Bacterial adhesins to host components in periodontitis. *Periodontol* 2000. 2010;52(1):12-37.

ANDREWS, J.M. Determination of minimum inhibitory concentrations. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 48 (suppl 1), 1 July 2001.

APPELBAUM, P. C.; SPANGLER, S. K.; & JACOBS, M. R. Beta-lactamase production and susceptibilities to amoxicillin, amoxicillin-clavulanate, ticarcillin, ticarcillin-clavulanate, cefoxitin, imipenem, and metronidazole of 320 non-*Bacteroides fragilis* *Bacteroides* isolates and 129 fusobacteria from 28 U.S. centers. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 34(8), 1546–1550, 1990.

ARMITAGE, G. C. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Ann Periodontol*, n.1, v.4, p.1-6, 1999.

AZELMAT, J.; LARENTE, J. F.; GRENIER, D. The anthraquinone rhein exhibits synergistic antibacterial activity in association with metronidazole or natural compounds and attenuates virulence gene expression in *Porphyromonas gingivalis*. *Arch Oral Biol*. Feb; 60(2):342-6, 2015.

AZIZAN, N.; MOHD SAID, S.; ZAINAL ABIDIN, Z.; JANTAN, I. Composition and Antibacterial Activity of the Essential Oils of *Orthosiphon stamineus* Benth and *Ficus deltoidea* Jack against Pathogenic Oral Bacteria. *Molecules* 22, 2135, 2017.

BAELUM, V.; CHEN, X.; MANJI, F.; LUAN, W. M.; FEJERSKOV, O. Profiles of destructive periodontal disease in different populations. *Journal of Periodontal Research* 31, 17–26, 1996.

BAI, S.; MO, A.C.; XIAN, S.Q.; ZUO, Y.; LI, Y.B.; XU, W. Characterization and antibacterial effect of Ag-nHA-nTiO₂/polyamide 66 nanocomposite membrane on oral bacteria *Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi*. 2008 Aug;26(4):358-61.

BELL, M. F. Atividade antibacteriana de cimentos de ionômero de vidro modificados por nanopartículas de óxido de zinco. Dissertação apresentada para obtenção de título de mestre em Ciências odontológicas. Universidade Estadual Paulista, Araraquara - SP, 2014.

BLIEDEN, T.M; Tooth-related issues, *Ann Periodontol* 4:91, 1999.

BORRELL, L. N.; BURT, B. A.; NEIGHBORS, H. W.; TAYLOR, G. W. Social factors and periodontitis in an older population. *American Journal of Public Health* 94, 748–754, 2004.

BOSTANCI, N.; BELIBASAKIS, G.N. *Porphyromonas gingivalis*: an invasive and evasive opportunistic oral pathogen. *FEMS Microbiol Lett*. 2012 Aug;333(1):1-9.

BRUST, M.; KIELY, C. J. “Some recent advances in nanostructure preparation from gold and silver particles: a short topical review”, *Colloids and Surface A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 2002, 202, 2, 175.

BURT, B. A. Periodontitis and aging: reviewing recent evidence. *Journal of the American Dental Association* 125, 273–279, 1994.

BURT, B. A.; EKLUND, S. A. *Dentistry, Dental Practice, and the Community*. Philadelphia, PA: W.B. Saunders Company, 1999.

CAO, G. “Nanostructures and Nanomaterials: Synthesis, Properties, and Applications”, Copyright 2004 by Imperial College Press.

CARO, C.; LOPEZ-CARTES, C.; ZADERENKO; P. MEJÍAS, J.Á. *J Raman Spectrosc* 39:1162–1169, 2008.

CARRANZA, N. T. K. *Periodontia Clínica*. 10ª edição. Elsevier Editora Ltda, 2007.

CARVALHO e CABRAL. Papel da *Porphyromonas gingivalis* na doença periodontal. *Revista Portuguesa de Estomatologia, Medicina Dentária e Cirurgia Maxilofacial*, v. 48, n. 3, 2007.

CHEN, X.; ANSAI, T.; AWANO, S.; IIDA, T.; BARIK, S.; TAKEHARA, T. Isolation, cloning, and expression of an acid phosphatase containing phosphotyrosyl phosphatase activity from *Prevotella intermedia*. *J Bacteriol*. 1999;181(22):7107-14.

CHEN, Y; TSE, W.H.; CHEN, L.; ZHANG, J. Ag nanoparticles-decorated ZnO nanorod array on a mechanical flexible substrate with enhanced optical and antimicrobial properties. *Nanoscale Res Lett*. 2015 Mar 1;10:106.

CHUNLEI, W.; BAODONG, M.; ENBO, W.; ZHENHUI, K.; CHUNGUI, T. Solution synthesis of ZnO nanotubes via a template-free hydrothermal route. *Solid State Communications* 2007, 141, 620.

CLEREHUG, V.; ABDEIA, R.; HULL, P. The effect of subgingival calculus on the validity of clinical probing measurements. *J Dent* 24:329, 1996.

DAESCHLEIN, G.; HOEHNE, C.; ASSADIAN, O.; DAXBOECK, F.; MEINL, C.; KRAMER, A.; KEKULE', A. S. In vitro activity of linezolid against clinical isolates of *Fusobacterium* spp. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 58, 789–793, 2006.

DONG, X.; JL, X.; WU, H.; ZHAO, L.; LI, J.; YANG, W. “Shape Control of Silver Nanoparticles by Stepwise Citrate Reduction”, *J. Phys. Chem. C*, 2009, 113, 6573-6576.

DORN, B.R.; LEUNG, K.L.; PROGULSKE-FOX, A. Invasion of human oral epithelial cells by *Prevotella intermedia*. *Infect Immun*. 1998 Dec;66(12):6054-7.

DZINK, J.L.; SOCRANSKY, S.S.; HAFFAJEE, A.D. The predominant cultivable microbiota of active and inactive lesions of destructive periodontal diseases, *J Clin Periodontol* 15:316, 1988.

FERNANDES, P. *Nat. Biotechnol.* 2006, 24, 1497.

FLEMMING, H.C.; WINGENDER, J. The biofilm matrix. *Nat Rev Microbiol* 8, 623–633, 2010.

FLEMMING, T.F. Periodontitis, *Ann Periodontol* 4:32, 1999.

FOURNIER-LARENTE, J.; MORIN, M. P.; GRENIER, D. Green tea catechins potentiate the effect of antibiotics and modulate adherence and gene expression in *Porphyromonas gingivalis*. *Arch Oral Biol*. May; 65:35-43, 2016.

FUNG, Y.; MO, S. *Anal Chim Acta* 261:375-380, 1992.

GARCIA, M. V. D. Síntese, caracterização e estabilização de nanopartículas de prata para aplicações bactericidas em têxteis. Dissertação apresentada para obtenção de título de mestre em Engenharia Química. Universidade Estadual de Campinas, SP, 2011.

GEMMELL, C.G.; EDWARDS, D.I.; FRAINSE, A.P. Guidelines for the prophylaxis and treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) infections in the UK. *J Antimicrob Chemother* 57, 589–608, 2006.

GOGOTSI, Y. Introduction to Nanotechnology - What is nanotechnology? EUA:http://www.nanowerk.com/nanotechnology/introduction/introduction_to_nanotechnology_1.html – 2006.

GOGOTSI, Y. *Nanomaterials handbook* . EUA : ISBN 0-8493-2308-8. p. 12-236 – 2006.

GOLDSTEIN, E.J.; CITRON, D.M.; MERRIAM, C.V.; WARREN, Y.; TYRRELL, K. Activities of telithromycin (HMR 3647, RU 66647) compared to those of erythromycin, azithromycin, clarithromycin, roxithromycin, and other antimicrobial agents against unusual anaerobes. *Antimicrob Agents Chemother*. 1999;43(11):2801-5.

GONG, P.; LI, H.; HE, X.; WANG, K.; HU, J.; TAN, W.; TAN, S.; ZHANG, X.Y. Preparation and antibacterial activity of Fe₃O₄@Ag nanoparticles. *Nanotechnology* 18, 604–611, 2007.

GORUP, L.F. Nanopartículas coloidais de ouro e prata e sua funcionalização com dibutil-dicalcogenetos. Dissertação apresentada para obtenção de título de mestre em Química, área de concentração: Físico-Química. Universidade Federal de São Carlos, SP, 2010.

GORUP, L.F.E.; LONGO LEITE, E.R.; CAMARGO, E.R.; “Moderating effect of ammonia on particle growth and stability of quasi-monodisperse silver nanoparticles synthesized by the Turkevich method”, *J. Coll. Interface Sci.* 2011, 360, 355–358.

GU, H.; HO, P.L.; TONG, E.; WANG, L.; XU, B. Presenting vancomycin on nanoparticles to enhance antimicrobial activities. *Nano Lett* 3, 1261–1263, 2003.

GUIMARÃES, g. r. Preparo e caracterização de óxido de zinco dopado com alumínio e hidrogênio para aplicações em células solares fotovoltaicas. 70f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Materiais) – Universidade Federal de Ouro Preto – MG, 2013.

GUOZHONG, C. Nanostructures and nanomaterials . EUA : ISBN 1-86094-4159 Imperial college press , 2004, pg 36 – 42 – 2004.

GUSTAVO, D. de S.; MÔNICA, A. R.; PRISCILA, P. S.; WENDELL, G. Prata: Breve histórico, propriedades e aplicações. *Educ. quím.*, 24(1), 14-16, 2013.

HALLMON, W.W. Occlusal Trauma: effect and impact on the Periodontium, *Ann Periodontol* 4:102, 1999.

HAPPI, C. T.; GBOTOSHO, G. O.; FOLARIN, O. A.; AKINBOVE, D. O.; YUSUF, B. O.; EBONG, O. O.; SOWUNMI, A.; KYLE, D. E.; MILHOUS, W.; WIRTH, D. T.; ODUOLA, A. M. J. *Acta Trop.* 2005, 95, 183; Mobashery, S.; Azucena, E. F. Em *Encyclopedia of Life Sciences*, Nature Publishing Group: London, 2002, <http://www.mrw.interscience.wiley.com/emrw/9780470015902/els/article/a0001993/current/pdf>, acessada em Novembro 2008.

HENGLEIN, A. “Radiolytic preparation of ultrafine colloidal gold particles in aqueous solution: Optical spectrum, controlled growth, and some chemical reactions”, *Langmuir*, 1999, 15, 6738-6744.

HERMAN, O.S.; ULVI, K.G. Biofilms as “Connectors” for Oral and Systems Medicine: A New Opportunity for Biomarkers, Molecular Targets, and Bacterial Eradication. *OMICS A Journal of Integrative Biology* Volume 20, Number 1, 2016 Mary Ann Liebert, Inc.

HUANG, R.; LI, M.; GREGORY, R.L. “Bacterial interactions in dental biofilm,” *Virulence*, vol. 2, no. 5, pp. 435–444, 2011.

HUMBERTO, H.; LARA, V.; AYALA-NUNEZ, N.V.; CARMEN, L.D.; IXTEPAN, T.; CRISTINA, R.P. Bactericidal effect of silver nanoparticles against multidrug-resistant bacteria. *World J Microbiol Biotechnol* 26, 615–621, 2010.

- JACINTO, R.C.; MONTAGNER, F.; SIGNORETTI, F.G.; ALMEIDA, G.C.; GOMES, B.P. FREQUENCY, microbial interactions, and antimicrobial susceptibility of *Fusobacterium nucleatum* and *Fusobacterium necrophorum* isolated from primary endodontic infections. *J Endod.* 2008 Dec;34(12):1451-6.
- JAKUBOVICS, N.S; KOLENBRANDER, P.E. The road to ruin: The formation of disease-associated oral biofilms. *Oral Dis* 16, 729–739, 2010.
- JANSEN, H.J.; GRENIER, D.; VAN DER HOEVEN, J.S. Characterization of immunoglobulin G-degrading proteases of *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens*. *Oral Microbiol Immunol.* 1995;10(3):138–145.
- JOHNSON, B. D.; MULLIGAN, K.; KIYAK, H. A.; MARDER, M. Aging or disease? Periodontal changes and treatment considerations, 1989.
- JOHNSON, N. W. Detection of high-risk groups and individuals for periodontal diseases. *International Dental Journal* 39, 33–47, 1989.
- JOKERST, J. C.; ADKINS, J. A.; BISHA, B.; MENTELE, M. M.; GOODRIDGE, L. D.; HENRY, C. S. *Anal Chem* 84:2900-2097, 2012.
- JOON-YUB, K.; JIN, W.C.; SUNG, H.K. The characteristic of the ZnO nanowire morphology grown by the hydrothermal method on various surface-treated seed layers. *Materials Letters* 2011, 65, 1161.
- JUNG, I.Y.; CHOI, B.K.; KUM, K.Y.; ROH, B.D.; LEE, S.J.; LEE, C.Y. et al. Molecular epidemiology and association of putative pathogens in root canal infection. *J Endod.* 2000;26(10):599-604.
- KAPATRAL, V.; ANDERSON, I.; IVANOVA, N.; REZNIK, G.; LOS, T.; LYKIDIS, A. et al. Genome sequence and analysis of the oral bacterium *Fusobacterium nucleatum* strain ATCC 25586. *J Bacteriol.* 2002;184(7):2005-18.
- KAWAHARA, K.; TSURUDA, K.; MORISHITA, M.; UCHIDA, M. Antibacterial effect of silver- zeolite on oral bacteria under anaerobic conditions. *Dent Mater.* 2000;16:6.
- KEY, F. S.; MASS, G. Ions, Atoms and Charged Particles. 2001. Disponível em< <http://www.silvercolloids.com/Papers/IonsAtoms&ChargedParticles.PDF>>. Acesso em: 13 jul. 2016.
- KIM, Y.H.; LEE, D.K.; CHA, H.G.; KIM, C.W.; KANG, Y.S.; Synthesis and characterization of antibacterial Ag-SiO₂ nanocomposite. *J Phys Chem C.* 2007;111:3629–35.
- KIMLING, J.; MAIER, M.; B. OKENVE, K.V.; BALLOT, H.; PECH, A.; “Turkevich Method for Gold Nanoparticle Synthesis Revisited”, *J. Phys. Chem. B.*, 2006, 110, 15700-15707.
- KODUGANTI, R. et al. Probiotics and prebiotics in periodontal therapy. *Indian J Dent Res*, 22(2), pp. 324-330, 2011.

KOLENBRANDER, P.E.; PALMER JR, R.J.; RICKARD, A.H.; JAKUBOVICS, N.S.; CHALMERS, N. I.; DIAZ, P.I. "Bacterial interactions and successions during plaque development," *Periodontology* 2000, vol. 42, no. 1, pp. 47–79, 2006.

KOLENBRANDER, P.E.; PALMER, R.J. JR.; PERIASAMY, S.; JAKUBOVICS, N.S. Oral multispecies biofilm development and the key role of cell-cell distance. *Nat Rev Microbiol* 8, 471–480, 2010.

LAMBERT, P. A.; *Adv. Drug Delivery Rev.* 2005, 57, 1471.

LARSEN, T. Susceptibility of *Porphyromonas gingivalis* in biofilms to amoxicillin, doxycycline and metronidazole. *Oral Microbiology and Immunology*, 17: 267-271, 2002.

LAWANDE, S. Probiotics for Management of Periodontal Disease: A Novel Therapeutic Strategy? *Int J Pharm Pharm Sci*, 2(4), pp. 41-46, 2012.

LEE, J.; EASTEAL, A.J.; PAL, U.; BHATTACHARYYA, D. Evolution of ZnO nanostructures in sol–gel synthesis. *Current Applied Physics* 2009, 9, 792.

LEVY, S. B. *Clin. Infect. Dis.* 2001, 33, S124; Demain, A. L.; *Nat. Biotechnol.* 2002, 20, 331 ; Woodford, N.; *Clin. Microbiol. Infec.* 2005, 11, 2.

LI, L.; LI, B.; CHENG, D.; MAO, L. *Food Chem* 122:895–900, 2010.

LIDE, Z.X.F.C.Y. "Controlled growth of nanomaterials Copyright 2007 by World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd".

LIU, Y.; HE, L.; MUSTAPHA, A.; LI, H.; HU, Z.Q.; LIN, M. Antibacterial Activities of Zinc Oxide Nanoparticles Against *Escherichia coli* O157:H7. *J. Appl. Microbiol.*, v. 107, p. 1193-1201, 2009.

LU, W.; LIU, G.; GAO, S.; XING, S.; WANG, J. Tyrosine-assisted preparation of Ag/ZnO nanocomposites with enhanced photocatalytic performance and synergistic antibacterial activities. *Nanotechnology*. 2008;19:445711.

MAHAJAN, A.; SINGH, B.; KASHYAP, D.; KUMAR, A.; MAHAJAN, P. Interspecies communication and periodontal disease. *The Scientific World Journal*. 2013: 765434.

MANZOOR, U.; ISLAM, M.; TABASSAM, L.; RAHMAN, S.U. Quantum confinement effect in ZnO nanoparticles synthesized by co-precipitate method. *Physica E: Low-dimensional Systems and Nanostructures* 2009, 41, 1669.

MARCATO, P.D.; DURAN, N. New aspects of nanopharmaceutical delivery systems. *J Nanosci Nanotechnol* 8, 2216–2229, 2008.

MARSH, P.D., "Dental plaque: biological significance of a biofilm and community life-style," *Journal of Clinical Periodontology*, vol. 32, pp. 7–15, 2005.

MAYRINCK, C.; RAPHAEL, E.; FERRARI, J.L.; SCHIAVON, M. A. Synthesis, Properties and Applications of Nanostructured Zinc Oxide. *Rev. Virtual Quim.*, 2014,6(5), 1185-1204.

- MIMS, C. *Microbiologia médica*. 2.ed. São Paulo: Manole;1999.
- MOELLERING, R. C. JR. *Clin. Infect. Dis.*1998, 27, S135; Dzidic, S.; Suskovic, J.; Kos, B.; *Food Technol. Biotech.* 2008, 46, 11.
- MOHANTY, R.; NAZARETH, B.; SHRIVASTAVA, N. The potencial role of probiotics in periodontal health. *RSBO*, 9(1), pp. 85-88, 2012.
- MORENO, V.A.P.; GÓMEZ, C.J.F. Antimicrobial or subantimicrobial antibiotic therapy as an adjunct to the nonsurgical periodontal treatment: a meta-analysis. *ISRN Dent.* 2012;2012:581207.
- MORONES, J.R.; ELECHIGUERRA, J.L.; CAMACHO, A.; RAMIREZ, J.T. The bactericidal effect of silver nanoparticles. *Nanotechnology* 16, 2346–2353, 2005.
- MUÑOZ, S.; ALARCÓN, P. M. Efecto de los Probióticos en las Condiciones Periodontales. *Rev Clin Periodoncia Implantol Rehabil Oral*, 3(3), pp. 136-139, 2010.
- MURRAY et al. *Microbiologia médica*. 3.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2000.
- MURRAY, C.B.; SUN, S.; GASCHLER, W.; DOYLE, H.; BETLEY, T. A.; KAGAN, C. R. “Colloidal synthesis oh nanocrystals and nanocrystal superlattices”, *IBM J. RES. & DEV.*, 2001, 45, 1, 47.
- PAIM, A. P. S.; KRONKA, E. A. M.; REIS, B. F.; KORN, M. *Quím Nova* 21:47-50, 1998.
- PAPAPANOU, P. N.; LINDHE, J.; STERRETT, J. D.; ENEROTH, L. Considerations on the contribution of ageing to loss of periodontal tissue support. *Journal of Clinical Periodontology* 18, 611–615, 1991.
- PAVIČIĆ, M.J.; VAN WINKELHOFF, A.J.; PAVIČIĆ-TEMMING, Y.A.; DE GRAAFF, J. A amoxicilina causa uma absorção melhorada do metronidazol no *Actinobacillus actinomycetemcomitans*: um mecanismo de sinergia . *J Antimicrob Chemother* 34 : 1047-1050, 1994.
- PILLAI, Z.S.; KAMAT, P.V. “What Factors Control the Size and Shape of Silver Nanoparticles in the Citrate Ion Reduction Method?”, *J. Phys. Chem. B*, 2004, 108, 945-951.
- PINI PRATO, G.P. Mucogingival deformities, *Ann Periodontol* 4:98, 1999.
- POTERA, C. Forging a link between biofilms and disease. *Science* 283, 1839, 1999.
- RAI, M.; YADAV, A.; GADE, A. Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. *Biotechnol Adv.* 2009; 27:76–83.
- REISE, M.; GOTTSCHALDT, M.; MATZ, C.; VÖLPEL, A.; JANDT, K.D.; SCHUBERT, U.S.; SIGUSCH, B.W. Antibacterial effect of silver (I) carbohydrate complexes on oral pathogenic key species in vitro. *BMC Oral Health*. 2016 Mar 23;16:42. doi: 10.1186/s12903-016-0201-4.

RITZ, H.L. "Microbial population shifts in developing human dental plaque," Archives of Oral Biology, vol. 12, no. 12, pp. 1561–1568, 1967.

ROCAS, I.N.; ALVES, F.R.; SANTOS, A.L.; ROSADO, A.S.; SIQUEIRA, J.F.JR. Apical root canal microbiota as determined by reverse-capture checkerboard analysis of cryogenically ground root samples from teeth with apical periodontitis. J Endod. 2010;36(10):1617-21.

RONGCHAO, J.; CAO, Y. C.; HAO, E.; ME' TRAU, G.S.; SCHATZ, G.C.; MIRKIN, C. A.; "Controlling anisotropic nanoparticle growth plasmon excitation", Nature, 2003, 425, 2, 487.

SÁEZ-LLORENS, X. et al. Impact of an antibiotic restriction policy on hospital expenditures and bacterial susceptibilities: a lesson from a pediatric institution in a developing country. Pediatr Infect Dis J. v. 19, p. 200-206. 2000.

SAKANAKA, A.; TAKEUCHI, H.; KUBONIWA, M.; AMANO, A. Dual lifestyle of *Porphyromonas gingivalis* in biofilm and gingival cells. 94, 42-7, 2016.

SALIANI, M.; JALAL, R.; GOHARSHADI, E.K. Effect of pH and Temperature on Antibacterial Activity of Zinc Oxide Nanofluid Against Escherichia coli O157:H7 and Staphylococcus aureus. Jundishapur J. Micobiol, v.8(2):e17115, 2015.

SANPUI, P.; MURUGADOSS, A.; DURGA PRASAD, P. V.; GHOSH, S. Chattopadhyay, A. The antibacterial properties of a novel chitosanAg-nanoparticle composite. International Journal of Food Microbiology, Amsterdam, v. 124, p. 142-146, 2008.

SHIBATA, Y.; FUJIMURA, S.; NAKAMURA, T. Purification and partial characterization of an elastolytic serine protease of *Prevotella intermedia*. Appl Environ Microbiol. 1993;59(7):2107–2111.

SILVESTRY-RODRIGUEZ, N.; BRIGHT, K.R.; SLACK, D.C.; UHLMANN, D.R.; GERBA, C.P. Silver as a residual disinfectant to prevent biofilm formation in water distribution systems. Appl Environ Microbiol. 2008;74:5.

SINGH, R.; SINGH, N.H. Medical applications of nanoparticles in biological imaging, cell labeling, antimicrobial agents, and anticancer nanodrugs. J Biomed Nanotechnol 7, 489–503, 2011.

SIQUEIRA, J.F.JR.; ROCAS, I.N. Microbiology and treatment of acute apical abscesses. Clin Microbiol Rev. 2013;26(2):255-73.

SIQUEIRA, J.F.JR.; ROCAS, I.N.; PAIVA, S.S.; MAGALHAES, K.M.; GUIMARAES-PINTO, T. Cultivable bacteria in infected root canals as identified by 16S rRNA gene sequencing. Oral Microbiol Immunol. 2007;22(4):266-71.

SLOTS, J. Subgingival microflora and periodontal disease, J Clin Periodontol 6:351, 1979.

SOARES, G.M.; TELES, F.; STARR, J.R.; FERES, M.; PATEL, M.; MARTIN, L.; TELES, R. Effects of azithromycin, metronidazole, amoxicillin, and metronidazole plus amoxicillin on an in vitro polymicrobial subgingival biofilm model. Antimicrob Agents Chemother. 2015 May;59(5):2791-8.

- SOCRANSKY, S.S.; HAFFAJEE, A.D.; CUGINI, M.A.; SMITH, C.; KENT JR, R.L. Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol* 1998; 25: 134-144.
- SOHI, R. K.; BANSAL, V.; VEERESHA, K. L. Probiotics and oral health. *SRM J Res Dent Sci*, 2(1), pp. 46-49, 2011.
- SPACCIAPOLI, P.; BUXTON, D.; ROTHSTEIN, D.; FRIDEN, P. Antimicrobial activity of silver nitrate against periodontal pathogens. *J Periodontal Res*. 2001;36:2.
- STAMATOVA, I.; MEURMAN, J.H. Probiotics: health benefits in the mouth. *Am J Dent*, 22, pp. 329-338, 2009.
- SUNDQVIST, G. Taxonomy, ecology, and pathogenicity of the root canal flora. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1994;78(4):522-30.
- TALEBIAN, N.; ZAVVARE, H.S.H. Enhanced Bactericidal Action of SnO₂ Nanostructures Having Different Morphologies Under Visible Light: Influence of Surfactant. *J. Photoch. Photobio. B*, v. 120, p. 66-73, 2013.
- TARIQ, M. et al., Treatment modalities and evaluation models for periodontitis, *Int J Pharm Investig.*, 2012; 2(3): 106–122.
- TIAN, J.; WONG, K.K.; HO, C.M.; LOK, C.N.; YU, W.Y.; CHE, C.M.; CHIU, J.F.; TAM, P.K. Topical delivery of silver nanoparticles promotes wound healing. *Chem Med Chem* 2, 129–136, 2007.
- TRIPATHI, K.D. *Essentials of Medical Pharmacology* (7th ed.). New Delhi, India: Jaypee Brothers Medical Publishers. pp. 696,697, 2013.
- TURKEVICH, J.; STEVENSON, P.C.; HILLIER, J. A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold. *Faraday Discussions*, London, v. 11, p.55, 1951.
- VAN DER VELDEN, U. (1984) Effect of age on the periodontium. *Journal of Clinical Periodontology* 11, 281–294, 1984.
- VAN WINKELHOFF, A.J.; VAN DER VELDEN, U.; DE GRAAFF, J. Microbial succession in recolonizing deep periodontal pockets after a single course of supra- and subgingival debridement. *J Clin Periodontol*. 1988 Feb;15(2):116-22.
- VARGAS-REUS, M.A.; MEMARZADEH, K.; HUANG, J.; REN, G.G.; ALLAKER, R.P. Antimicrobial activity of nanoparticulate metal oxides against peri-implantitis pathogens. *Int J Antimicrob Agents*. 2012 Aug;40(2):135-9.
- VEČEŘOVÁ, R.; PANÁČEK, A.; KOLÁŘ, M. Effect of silver nanoparticles on anaerobic bacteria *Klin Mikrobiol Infekc Lek*. 2017 Mar;23(1):17-20.
- VOHA, C.; DOCQUIER, J.D.; ROSSOLINI, G.M.; FOSSE, T. Genetic and biochemical characterization of FUS-1 (OXA-85), a narrow-spectrum class D beta-lactamase from *Fusobacterium nucleatum* subsp. polymorphum. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006;50(8):2673-9.

WALSH, C. *Antibiotics: Actions, Origins, Resistance*, ASM Press: Washington, 2003.

WATT, R.G. Emerging theories into the social determinants of health: implications for oral health promotion. *Community Dent Oral Epidemiol* 2002, 30:241–247.

WILLIAMS, D. R. Race and health: basic questions, emerging directions. *Annals of Epidemiology* 7, 322–333, 1997.

WILLIAMS, D. R. Race, socioeconomic status, and health. The added effects of racism and discrimination. *Annals of the New York Academy of Sciences* 896, 173–188, 1999.

WRIGHT, G. D. *Adv. Drug Delivery Rev.* 2005, 57, 1451.

YIN, Y.; ALIVISATOS, A.P. “Colloidal nanocrystal synthesis and the organic-inorganic interface”, *Nature*, 2005, 437, 664.

ZANCHET, D.; HALL, B.D.; UGARTE, D.; “Structure population in thiol-passivated gold nanoparticles”, *Journal of Physics Chemistry B*, 2000, 104, 47, 11013.

ZANCHET, D.; MORENO, M.S.; UGARTE, D. “Anomalous packing in thin nanoparticle supercrystals”, *Physical Review Letters*, 1999, 82, 26, 5277.