



**INSTITUTO UNIVERSITÁRIO EGAS MONIZ**

**MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA**

**NANOTECNOLOGIA EM ENDODONTIA**

Trabalho submetido por  
**Francisco Maria Lopes Galhana**  
para a obtenção do grau de Mestre em Medicina Dentária

**junho de 2019**





**INSTITUTO UNIVERSITÁRIO EGAS MONIZ**

**MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA**

**NANOTECNOLOGIA EM ENDODONTIA**

Trabalho submetido por  
**Francisco Maria Lopes Galhana**  
para a obtenção do grau de **Mestre** em Medicina Dentária

Trabalho orientado por  
**Prof. Doutor João Dias**

**junho de 2019**



## **AGRADECIMENTOS**

Em primeiro lugar, quero agradecer ao meu orientador Prof. Doutor João Dias por todo o auxílio prestado e por confiar e acreditar no meu trabalho.

Aos meus pais e à minha irmã, sem os quais nada teria sido possível, agradeço pela presença constante, por todo o apoio e por nunca me terem deixado desistir.

À Patrícia, a amiga de todas as horas, que me motivou, amparou, equilibrou e ajudou, incondicionalmente. Obrigado por tudo.

À Maria, Sílvia e Ana Rita por continuarem a estar sempre presentes na minha vida, apesar dos muitos planos furados.

À Ana Margarida, Ana Rita, Mafalda, Marta e ao resto da família que construí ao longo destes anos, sem os quais tudo seria muito mais difícil.

À minha colega de box, Ana Rosado, que me aturou diariamente e que esteve sempre presente em todos os momentos.

À Professora Joana Carmo por todo o apoio prestado, pelo conhecimento partilhado e pela amizade que sei que perdurará.

Ao Instituto Universitário Egas Moniz, a segunda casa destes últimos 5 anos que já deixa saudade.



## RESUMO

A nanotecnologia é uma área inovadora, em crescente expansão, que conta com inúmeras possibilidades de aplicação, contribuindo com melhorias nos mais diversos campos. A utilização de nanopartículas e a sua aplicação no setor da saúde encontra forte evidência na literatura, que permite a introdução dos conceitos “nanomedicina” e “nanodentistry”. A “nanodentistry” consiste na correlação entre a nanotecnologia e a Medicina Dentária, nas suas múltiplas especialidades. Esta correlação, mais especificamente o uso de nanopartículas na endodontia (uma vertente da Medicina Dentária), apresenta grande interesse, tendo como tal, sido o objeto de estudo deste trabalho.

Um dos problemas mais recorrentes do tratamento endodôntico é a dificuldade na eliminação de microrganismos resistentes, presentes nos canais radiculares. A sua persistência contribui para o insucesso destes tratamentos, o que resulta em prognósticos menos favoráveis dos dentes submetidos a estas intervenções. Com base na evidência científica disponível, constatou-se que a aplicação de nanopartículas de quitosano, nanopartículas de prata, nanopartículas de óxido de zinco e nanopartículas de vidro bioativo, nas várias fases do tratamento endodôntico, isto é, na irrigação, medicação e obturação, contribuem para a desinfecção do sistema de canais, podendo superar alguns dos inconvenientes dos agentes tradicionalmente utilizados para este propósito. Não obstante, compreendeu-se também que partículas com dimensões nanométricas demonstram utilidade no solucionamento de consequências destes tratamentos, nomeadamente, no aumento da estabilidade da dentina por interação com as fibras de colagénio da matriz orgânica deste tecido. Deste modo, assiste-se a uma melhoria das suas propriedades físicas e mecânicas, que resulta numa redução da probabilidade de fratura radicular em dentes endodonciados.

Conclui-se que a aplicação da nanotecnologia, mais especificamente a utilização de nanopartículas, induz benefícios não só aos procedimentos endodônticos, como também às consequências que advêm destes tratamentos que, desta forma, asseguram *outcomes* mais favoráveis que garantem a melhoria e manutenção da saúde oral.

Palavras-chave: nanotecnologia, endodontia, desinfecção, estabilização dentinária



## ABSTRACT

Nanotechnology is a new and emerging area with multiple possibilities of application, with improvements in the most diverse fields. The use of nanoparticles and their application in the health sector finds strong evidence in the literature, which allows the introduction of two distinct concepts "nanomedicine" and "nanodentistry". "Nanodentistry" consists in the correlation between nanotechnology and dentistry, in its many departments. This correlation, and more specifically, the use of nanoparticles in endodontics, presents great interest and, for that reason, was the object of study of the present work.

One of the most recurrent problems of endodontic treatments is the difficulty in eliminating resistant microorganisms, present in the root canals. Its persistence contributes to the failure of these treatments, which results in less favorable prognoses of the teeth submitted to these interventions. Based on the available scientific evidence, the application of chitosan nanoparticles, silver nanoparticles, zinc oxide nanoparticles and bioactive glass nanoparticles in the various phases of the endodontic treatment, such as irrigation, medication and obturation, contributes to the disinfection of the root canal system, and may overcome some of the drawbacks of traditionally used agents. However, it can also be understood that nanometer-sized particles show utility in solving the consequences of these treatments, contributing to increase dentin stability by interacting with the collagen fibers of the organic matrix of this tissue. This way, there is an improvement in their physical and mechanical properties, which results in a reduction in the probability of root fracture in endodontically treated teeth.

It can be concluded that the application of nanotechnology, more specifically the use of nanoparticles, induces benefits not only to endodontic procedures, but also to the consequences of these treatments, which, in this way, ensures more favorable outcomes that guarantee the improvement and maintenance of oral health.

Key-words: nanotechnology, endodontics, disinfection, dentin stabilization



## ÍNDICE GERAL

<b>ÍNDICE DE FIGURAS .....</b>	<b>6</b>
<b>I. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>7</b>
<b>II. DESENVOLVIMENTO.....</b>	<b>9</b>
<b>1.1. Contextualização Histórica .....</b>	<b>9</b>
<b>1.2. Nanotecnologia e Nanoescala .....</b>	<b>9</b>
<b>1.3. Nanomateriais.....</b>	<b>10</b>
<b>1.4. Nanopartículas .....</b>	<b>11</b>
1.4.1. Síntese de nanopartículas .....	12
<b>1.5. Nanomedicina .....</b>	<b>12</b>
1.5.1. Características que influenciam o comportamento biológico .....	13
1.5.1.1. Tamanho .....	13
1.5.1.2. Carga e Potencial de superfície .....	14
1.5.1.3. Composição de superfície.....	15
<b>1.6. <i>Nanodentistry</i> .....</b>	<b>15</b>
<b>1.7. Endodontia.....</b>	<b>16</b>
1.7.1. Desinfecção do sistema de canais .....	17
1.7.1.1. Microbiologia endodôntica.....	17
1.7.1.2. Complexidade anatômica .....	18
1.7.1.3. Limitação dos protocolos de irrigação .....	19
1.7.1.4. Limitação dos protocolos de medicação intracanal.....	24
1.7.1.5. Limitação dos protocolos de obturação.....	25
1.7.2. Estabilidade dentinária .....	26
<b>1.8. Aplicação da Nanotecnologia à Endodontia .....</b>	<b>30</b>
1.8.1. Nanopartículas na desinfecção dos canais radiculares.....	30
1.8.1.1. Nanopartículas de quitosano.....	31
1.8.1.2. Nanopartículas de prata .....	34
1.8.1.3. Nanopartículas de vidro bioativo.....	38
1.8.1.4. Nanopartículas de óxido de zinco.....	39
1.8.1.5. Terapia Fotodinâmica .....	41
1.8.2. Nanopartículas na estabilização dentinária .....	44
<b>III. CONCLUSÃO.....</b>	<b>47</b>
<b>BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>49</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Escala de dimensões nanométricas .....	10
Figura 2: Reação após extrusão de hipoclorito de sódio .....	20
Figura 3: Precipitado formado após mistura de hipoclorito de sódio e clorhexidina .....	22
Figura 4: Precipitado formado após mistura de EDTA e clorhexidina .....	23
Figura 5: Comparação entre as estruturas moleculares da celulose, quitina e quitosano .....	32

## I. INTRODUÇÃO

O sonho e a imaginação humana são, muitas vezes, o ponto de origem de novas ciências e novas tecnologias. A Nanotecnologia foi fruto desse mesmo sonho (Hulla, Sahu & Hayes, 2015). Este conceito diz respeito à ciência que trata das propriedades físicas e bioquímicas de materiais com dimensões pertencentes à escala nanométrica (Verma, Chevvuri & Sharma, 2018). Constitui-se como uma área inovadora e promissora, que tem vindo a crescer nos últimos anos, e que permite projetar novos materiais com novas funções, e melhorar propriedades de materiais já existentes, através da manipulação de matéria a níveis atômicos e moleculares (Telles, Prado & Simão, 2017). A sua aplicação tem sofrido um crescimento exponencial, tendo vindo a revolucionar a indústria da saúde nos últimos anos, particularmente a Medicina e a Medicina Dentária, com importante utilidade na prevenção, diagnóstico e tratamento de diversas patologias (Sharan, Singh, Lale, Mishra, Koul & Kharbanda, 2017).

A Endodontia corresponde à vertente responsável pelo estudo e tratamento de patologias da polpa dentária humana (American Association of Endodontists, 2016), recorrendo a procedimentos que asseguram a viabilidade do dente e a sua manutenção em boca. Um dos critérios mais importantes para a determinação do prognóstico dos tratamentos endodônticos é a eliminação de microrganismos do sistema de canais radiculares, uma vez que a sua persistência resulta no insucesso destas intervenções. Este facto justifica a pertinência de assegurar uma correta desinfeção destes canais, que se pode mostrar dificultada por diversos fatores, tais como a particular anatomia que apresentam (Bukhari, Kim, Liu, Karabucak & Koo, 2018).

O emprego de diferentes nanopartículas, e das suas propriedades, nas várias fases destes tratamentos contribuem para tal, assistindo-se à sua aplicação tanto na irrigação, como na medicação e obturação, por forma a melhorar a sua taxa de sucesso.

Estas partículas, pertencentes à nanoescala, demonstram também grande utilidade no solucionamento das consequências destes tratamentos, particularmente na estabilização dentinária, através do seu direcionamento à matriz orgânica deste tecido, como será posteriormente abordado.

Neste trabalho é proposta uma revisão da literatura disponível sobre este tema, com recurso a diferentes bases bibliográficas, no sentido de correlacionar a área da

Nanotecnologia com a área da Endodontia e entender a sua aplicabilidade nesta especialidade de Medicina Dentária.

## II. DESENVOLVIMENTO

### 1.1. Contextualização Histórica

Foi no ano 1959 que Richard Feynman, futuro Nobel da Física, deu a conhecer este conceito à comunidade científica. “There’s Plenty of Room at the Bottom”. Foi deste modo que o pai da nanotecnologia moderna apresentou a possibilidade de manipulação de matéria a níveis atômicos à Sociedade Americana de Física, uma utopia, até então, para a comunidade científica. As teses defendidas por Feynman foram posteriormente seguidas por Tanigachi que definiu o termo “nanotecnologia” como o “processamento, separação, consolidação e deformação de materiais por um átomo ou uma molécula” (Hulla et al., 2015). O *boom* científico assistido nos anos 80, considerada a *golden era* da Nanotecnologia, com o desenvolvimento da microscopia eletrónica de varrimento mostrou-se essencial para o impulso desta área, possibilitando a visualização de partículas da ordem do nanómetro e tornando esta realidade mais “palpável” (Subedi, 2013). A descoberta do fulereno, uma molécula composta por 60 átomos de carbono, por Kroto, Smalley e Curl, foi também um contributo para o crescimento exponencial do interesse que esta área recebeu, com pesquisas e avanços significativos no sentido de compreender melhor e refinar a capacidade de a colocar em prática (Subedi, 2013; Hulla et al., 2015).

### 1.2. Nanotecnologia e Nanoescala

Atualmente, a Nanotecnologia pode ser definida como a ciência e engenharia envolvidas no *design*, na síntese, na caracterização e na aplicação de materiais e dispositivos, à escala nanométrica. (Saini, Saini & Sharma, 2010) Esta escala, segundo a norma ISO/TS 80004-1:2015, corresponde a uma faixa de comprimento entre 1 e 100 nanómetros (nm), cerca de um bilionésimo de um metro. (Subedi, 2013) (figura 1)

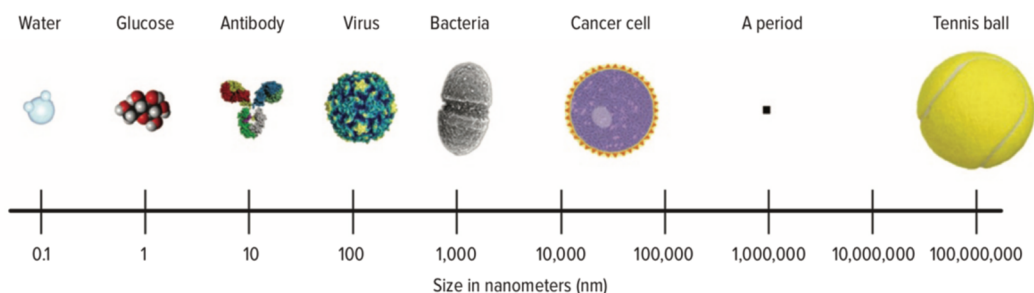


Figura 1

Adaptado de Ventola (2012)

### 1.3. Nanomateriais

Os nanomateriais representam, deste modo, o objeto de estudo desta ciência e podem ser descritos, segundo a Comissão Europeia (2011) como “um material natural, produzido acidentalmente ou fabricado que contém partículas soltas, agregadas ou aglomeradas, no qual 50% ou mais das partículas apresentam, na distribuição granulométrica, uma ou mais dimensões externas no intervalo 1 nm – 100 nm”. Como a definição da Comissão Europeia sugere, estes podem apresentar diferentes origens e ser agrupados com base nesse mesmo parâmetro. Como tal, podemos descrever nanomateriais de origem natural, efeito de fenómenos ambientais, como erupções vulcânicas; e nanomateriais de origem antropogénica, produzidos como consequência da atividade humana como, por exemplo, resultado da combustão automóvel. Dos últimos destacam-se os nanomateriais manufacturados, produzidos intencionalmente para servir um propósito específico (Louro, Borges & Silva, 2013). Estes podem ser considerados o principal foco, alvo de estudo e centro de aplicação da Nanotecnologia atual nas mais diversas áreas.

Desde a sua primeira apresentação à comunidade científica, assistiu-se ao crescimento da Nanotecnologia, apresentando atualmente um verdadeiro impacto no nosso quotidiano. (Alenazy, Mosadomi, Al-Nazhan, Rayyan, 2018). O progresso na área resultou no emprego destes materiais da ordem do nanómetro a um vasto conjunto de mercados, como a indústria eletrónica, química, farmacêutica, aeroespacial, alimentar, cosmética e, em maior detalhe neste trabalho, apresentando uma ampla utilidade no setor da saúde, com aplicações na Medicina e Medicina Dentária (Hulla et al., 2015; Kishen, 2015).

Os nanomateriais comportam-se de maneira diferente dos restantes devido às propriedades físicas e químicas que exibem. Esta diferenciação pode ser, essencialmente, atribuída a duas características principais: a elevada área de superfície que demonstram; e

os efeitos quânticos que apresentam, que dizem respeito a propriedades óticas, magnéticas e elétricas alteradas em função do tamanho reduzido destes materiais (Shashirekha, Jena & Mohapatra, 2017).

Podem ser classificados de acordo com o número de dimensões que apresentam. Deste modo, podemos ter nanoestruturas de dimensão nula (“*zero-dimensional*”), nanoestruturas unidimensionais (“*one-dimensional*”) e nanoestruturas bidimensionais (“*two-dimensional*”) (Kishen, 2015).

#### 1.4. Nanopartículas

As nanopartículas são exemplos de nanoestruturas de dimensão nula com múltiplas aplicações, em inúmeras áreas.

De acordo com Ealias e Saravanakumar (2017), podemos classificá-las de acordo com a sua composição em nanopartículas à base de carbono (*carbon-based*), nanopartículas inorgânicas e nanopartículas orgânicas. As nanopartículas de carbono caracterizam-se por serem totalmente constituídas por carbono, podendo ser classificadas em fulerenos, grafeno, nanotubos de carbono, nanofibras de carbono e *carbon black*. Já as nanopartículas inorgânicas, descrevem-se por não apresentarem carbono na sua constituição, podendo ser classificadas em nanopartículas à base de metais e nanopartículas à base de óxidos metálicos. As primeiras caracterizam-se por serem sintetizadas a partir de metais, através de processos destrutivos ou construtivos. Apesar da maioria dos metais poder ser transformado em nanopartículas, o alumínio, o ouro, a prata, o ferro e o cobalto, são alguns dos mais utilizados; as segundas, as nanopartículas à base de óxidos metálicos, são sintetizadas com o propósito de melhorar as propriedades dos metais que as originaram. Através da oxidação dos metais é possível assistir-se a um aumento da reatividade e eficácia das nanopartículas formadas. Por fim, as nanopartículas orgânicas definem-se como sendo biodegradáveis e não-tóxicas. Deste grupo destacam-se os dendrímeros, as micelas, os lipossomas. Algumas destas nanopartículas caracterizam-se ainda por apresentarem um núcleo vazio ou oco, recebendo a denominação de “nanocapsulas” por este mesmo motivo. Este facto, aliado à sensibilidade à radiação térmica e eletromagnética que demonstram, tornam-nas ideais para o transporte de fármacos.

#### 1.4.1. Síntese de nanopartículas

De um modo geral, os processos de síntese de nanopartículas podem ser classificados em métodos “*top-down*” ou métodos destrutivos e métodos “*bottom-up*” ou métodos construtivos. Os métodos “*top-down*” baseiam-se na decomposição de materiais de maiores dimensões, formando unidades menores, posteriormente convertidas em nanopartículas. Por outro lado, a abordagem “*bottom-up*” representa o oposto, uma vez que a formação de nanopartículas tem origem em substâncias relativamente mais simples, como átomos, que quando agrupados resultam na sua formação (Ealias & Saravanakumar, 2017).

A síntese destas partículas pode ser conseguida através de um vasto conjunto de métodos. Pitkethly (2004) relata a existência de quatro vias distintas para este efeito: a via química húmida, a via mecânica, a via de fase gasosa e a via *form-in-place*. A síntese química húmida, da qual fazem parte os métodos hidrotermais e os *sol-gel*, baseia-se no fenómeno de precipitação. Nesta, são precipitados compostos insolúveis, posteriormente filtrados, formados a partir da mistura de soluções de diferentes iões, sob condições controladas de pressão e temperatura. Os métodos mecânicos consistem em técnicas simples que se baseiam na redução de um pó grosso a um pó mais fino, mediante processos de moagem. Dentro deste grupo, os mais comuns atualmente são o uso do moinho de bolas planetário e o uso do moinho de bolas rotativo. Da via de síntese de fase gasosa destaca-se a ablação a laser, uma vez que esta permite produzir quase qualquer tipo de material à escala nanométrica, por se fazer valer de uma mistura de erosão física e processos evaporativos. Contudo, devido ao facto de apresentar taxas de produção lentas, este método não é extensivamente aplicado. Por fim, os processos *form-in-place*, que incluem a litografia e a deposição física e química de vapor, são mais adequados para a fabrico de revestimentos nanoestruturados, contudo podem ser utilizados para produzir nanopartículas mediante raspagem do depósito do coletor. São considerados pouco eficazes para este propósito, não sendo também utilizados com frequência.

#### 1.5. Nanomedicina

Como já foi mencionado anteriormente, uma das áreas de aplicação da Nanotecnologia é a medicina. Desta aplicação nasceu o conceito “Nanomedicina”. A sua utilização nesta área apresenta o potencial de melhorar a saúde e o bem-estar da sociedade de forma significativa, contribuindo para um diagnóstico precoce e altamente

preciso de patologias, disponibilizando diferentes opções de tratamento, mais específicas, que asseguram melhores *outcomes* e possibilitando intervenções teranósticas, cuja abordagem consiste na aplicação da mesma intervenção para o diagnóstico e tratamento (Satakar, Elger & Shaw, 2015). Constata-se, deste modo, que a convergência das duas áreas conduz a significativos avanços na prevenção, no diagnóstico e no tratamento de diversas doenças.

Ventola (2012) afirma que a Nanotecnologia contribui com melhorias no transporte, *targeting* e biodisponibilidade de fármacos, no diagnóstico imagiológico e na detecção de biomarcadores.

Contudo, as aplicações no setor da saúde não se limitam apenas a estes processos, contando com um vasto conjunto de possíveis utilizações nos sistemas biológicos. A possibilidade de serem administradas de forma intravenosa com rápida distribuição nos vários tecidos, a íntima interação celular e a capacidade de atravessarem membranas biológicas, fazem das nanopartículas estruturas especialmente vantajosas neste campo de aplicação. De um modo geral, as nanopartículas metálicas, nanopartículas poliméricas, os lipossomas e dendrimeros apresentam-se como os sistemas nanoparticulados com melhor potencial para aplicações médicas, sendo geralmente multicomponentes e multifuncionais (Kishen, 2015)

#### 1.5.1. Caraterísticas que influenciam o comportamento biológico

As propriedades das nanopartículas apresentam influência no seu comportamento em sistemas vivos. De facto, a evidência comprova que as caraterísticas físico-químicas destas nanoestruturas, como o tamanho e a composição e carga da superfície, podem influenciar a sua atuação nos sistemas biológicos, afetando a sua biodisponibilidade, distribuição, eficácia e segurança (Hall, Dobrovolskaia, Patri & McNeil, 2007). Neste sentido, o conhecimento e a caraterização das propriedades das nanopartículas torna-se essencial para a sua aplicação nestes sistemas.

##### 1.5.1.1. Tamanho

Este fator apresenta-se crucial para a sua aplicação, especialmente no que diz respeito ao transporte de fármacos. Esta caraterística tem influência não só na sua distribuição, mais especificamente na sua capacidade de atravessar vasos e membranas, mas também na sua eliminação da circulação, isto é, no seu *clearance* (Kishen, 2015).

Idealmente, as nanopartículas deveriam manter-se em circulação até atingirem o seu local de ação, contudo a eliminação do sistema pode reduzir a sua eficácia e, conseqüentemente, comprometer os *outcomes* do tratamento. (Caldorera-Moore, Guimard, Shi & Rov, 2010; Kishen, 2015)

Kishen (2015) descreve que o tamanho ideal para a distribuição *in vivo* se encontra entre os 10 e os 100 nm, uma vez que partículas com dimensões superiores a 200 nm são sequestradas pelo sistema reticuloendotelial, e partículas inferiores a 10 nm resultam numa rápida remoção do organismo por *clearance* renal.

A determinação do tamanho das nanopartículas pode ser realizada recorrendo a vários métodos, apresentando-se as técnicas de microscopia eletrónica, como a microscopia eletrónica de varrimento e a microscopia eletrónica de transmissão, e a dispersão de luz dinâmica (DLS) como as mais comuns (Hall *et al.*, 2007; Kishen, 2015). A conjugação de ambas as técnicas, pode apresentar vantagens na resolução de ambigüidades associadas a cada uma, em separado. (Hall *et al.*, 2007)

#### 1.5.1.2. Carga e Potencial de superfície

Este fator assume relevância uma vez que é também determinante nas interações com o alvo/*target* e com outras partículas em circulação no sistema biológico (Ealias & Saravanakumar, 2017). Este potencial elétrico é também denominado de “potencial zeta”, correspondendo ao potencial de uma partícula associado à sua carga. Um aumento no valor absoluto deste potencial traduz-se numa amplificação da repulsão entre nanopartículas. Deste modo, este parâmetro pode fornecer informação relativamente à tendência para a agregação das nanopartículas, facto que assume elevada importância em sistemas vivos (Jiang, Oberdörster & Biswas, 2009). A carga das nanopartículas apresenta também implicações na taxa de internalização celular, uma vez que nanopartículas positivas apresentam taxas mais elevadas quando comparadas com nanopartículas de carga negativa ou neutra (Alexis, Pridgen, Molnar & Farokhzad, 2008).

Para a determinação do “potencial zeta” recorre-se à técnica de dispersão eletroforética de luz (ELS), também denominada de eletroforese de laser Doppler. (Kishen, 2015)

### 1.5.1.3. Composição de superfície

A composição da superfície de uma nanopartícula é também um fator influenciador do seu comportamento. Um dos aspectos mais relevantes desta característica é a hidrofobicidade. Aquando da sua síntese, e com o propósito de melhorar a sua eficácia, a superfície das nanopartículas pode ser revestida e, deste modo, influenciar a sua solubilidade, com consequentes implicações na sua difusão, distribuição e eliminação (Rees, 2013).

Rees (2013) relata a existência de uma abordagem inovadora de forma a “mascarar” as nanopartículas e impedir a sua eliminação por parte do sistema imunitário. Esta consiste no revestimento de superfície com uma membrana proveniente de leucócitos, possibilitando a evasão ao sistema imunológico. A membrana pode também ser utilizada em interações celulares e, mais especificamente, na entrega de fármacos. Os avanços desta estratégia de mascaramento são evidentes, demonstrando maior tempo de circulação e taxa de acumulação *in loco* mais elevada após administração. À parte disso, o revestimento de superfície pode contribuir para a alteração da carga das nanopartículas e, consequentemente, do seu potencial zeta; assim como para a proteção de certas células, cuja interação com estas partículas poderia induzir efeitos citotóxicos.

Contudo, é importante mencionar que a presença de elementos secundários e indesejáveis na sua composição, pode levar a uma diminuição na eficiência da nanopartícula e resultar em contaminações e reações adversas (Ealias & Saravanakumar, 2017).

## 1.6. *Nanodentistry*

À semelhança do que pode ser constatado nas restantes áreas, e em especial com o avanço da Nanomedicina, assiste-se à aplicação da nanotecnologia e das nanopartículas à Medicina Dentária. Deste modo, no ano 2000, surge o conceito “*nanodentistry*”, que pode ser definido como a ciência e a tecnologia de diagnóstico, prevenção e tratamento de doenças orais, alívio de dor e preservação e melhoria da saúde dentária, mediante a aplicação de materiais à escala nanométrica (Mantri & Mantri, 2013).

Padovani et al. (2015) refere que a nanotecnologia tem possibilitado uma compreensão mais aprofundada acerca do comportamento biomecânico dos tecidos dentários.

Além do mais, a convergência entre estas duas áreas tem permitido a aplicação de nanopartículas com propriedades e características estruturais de elevada qualidade, contribuindo para o desenvolvimento de novos materiais ou induzindo melhorias significativas noutros já existentes. Por estes motivos, considera-se que a sua aplicação à Medicina Dentária apresenta amplas vantagens com contributos relevantes na melhoria da saúde oral dos doentes (Khurshid et al., 2015).

A lista de oportunidades de tratamento que a nanotecnologia e a ação das nanopartículas oferecem é extensa, podendo incluir procedimentos como o diagnóstico de cancro oral, o tratamento de hipersensibilidade dentária, a possibilidade de realização de ajustes ortodônticos apenas numa consulta (Cantín, Vilos & Suazo, 2010) ou a desinfecção de canais radiculares (Mikkilineni, Rao, Tummala & Elkanti, 2013). É possível entender que as suas aplicações são diversas e transversais às múltiplas especialidades da Medicina Dentária, verificando-se a sua ação na Prostodontia, Dentisteria, Periodontologia, Medicina Dentária Preventiva, Implantologia e, mais especificamente, Endodontia.

Abiodun-Solanke, Ajayi e Arigbede (2014) afirmam mesmo que a nanotecnologia se destina a ser a principal tecnologia subjacente a toda a Medicina e Medicina Dentária do século XXI.

### 1.7. Endodontia

O termo Endodontia define-se, segundo o Glossário de Termos Endodônticos da Associação Americana de Endodontia como “o ramo da Medicina Dentária responsável pela morfologia, fisiologia e patologia da polpa dentária humana e dos tecidos perirradiculares.”, estando encarregue da prevenção, diagnóstico e tratamento de lesões associadas ao complexo pulpo-dentinário.

Os estímulos físicos, químicos e bacterianos que agrirem o dente podem ser responsáveis pelo desenvolvimento de pulpites, que surgem em resultado de inflamação

pulpar. Quando não tratadas, podem evoluir para necrose e resultar no aparecimento de lesões apicais, como abscessos, granulomas ou quistos (Kandaswamy, Nagendrababu & Deivanayagam, 2016). O desenvolvimento de lesões apicais devido à agressão por estímulos bacterianos tem origem na exposição da polpa à cavidade oral e na sua consequente colonização bacteriana (Campos-Ibarra, Fuente-Hernández, Tenorio-Rocha & Acosta-Torres, 2013).

A exposição da polpa dentária pode dever-se a um vasto conjunto de causas, podendo os microrganismos atingir e infetar a mesma através de várias vias. A contaminação pulpar pode, deste modo, ocorrer através dos túbulos dentinários, devido a lesões cariosas ou a procedimentos dentários; através de cavidades abertas, com origem em processos traumáticos ou iatrogénicos; através do periodonto, quando microrganismos presentes no sulco gengival atingem a polpa pelo forâmen apical ou canais laterais; através da circulação sanguínea, aquando de bacterémias transitórias, possíveis de ocorrer no dia-a-dia indivíduos saudáveis; devido a restaurações defeituosas, que permitem a contaminação salivar dos sistemas de canais; ou ainda por migração de microrganismos de dentes já infetados, que por este meio, contaminam outros saudáveis (Narayanan & Vaishnavi, 2010). Assiste-se, deste modo, à instalação da infeção.

#### 1.7.1. Desinfeção do sistema de canais

“Um dos objetivos mais importantes no sucesso do tratamento da periodontite apical é a eliminação de bactérias do interior dos canais” (Campos-Ibarra et al., 2013). Porém, este objetivo pode-se encontrar dificultado devido a um diverso conjunto de fatores que resultam na persistência de microrganismos, que não são erradicados do sistema de canais, e que, por este motivo, condicionam o sucesso do tratamento endodôntico (Kandaswamy et al., 2016).

##### 1.7.1.1. Microbiologia endodôntica

A contaminação da cavidade pulpar e, consequentemente, dos canais radiculares fica a cargo de uma microbiota bastante complexa, que envolve bactérias gram-negativas, bactérias gram-positivas e leveduras (Kandaswamy et al., 2016). Todas as bactérias da cavidade oral são passíveis de invadir os canais radiculares,

contudo, apenas um grupo restrito de espécies é identificável em canais infetados (Lattoo, Shah, Ahmad, Qadir, Bhagat & Lone, 2011). Isto deve-se ao microambiente dos sistemas de canais que torna propensa a colonização de microrganismos específicos, devido às condições que apresenta. De facto, assiste-se a um aumento da flora anaeróbica em sentido apical, associado à menor disponibilidade de nutrientes e oxigénio que se verifica (Kishen, 2015). Numa fase inicial, a colonização dos canais radiculares fica a cargo de espécies anaeróbias facultativas, observando-se uma alteração da microflora após cerca de 6 meses, com predominância de espécies anaeróbias obrigatórias (Kandaswamy et al., 2016).

No sistema de canais contaminado, estas espécies bacterianas encontram-se agregadas sob a forma de biofilmes, tornando-se 1 000 vezes mais resistentes do que a sua forma planctónica correspondente (Campos-Ibarra et al., 2013). O conceito “biofilme” pode ser descrito como uma estrutura de elevado grau de organização aderida a uma superfície, constituída por células bacterianas, organizadas em microcolónias, rodeadas por uma matriz extracelular secretada pelas mesmas (Kishen, 2015). Este aumento de resistência bacteriana pode ser atribuído a diversos fenómenos relativos a esta forma de organização, tais como a função protetora da matriz extracelular que atua como uma barreira física e química, devido às suas características aniónicas que dificultam a penetração dos agentes antibacterianos no biofilme e contribuem para a sua neutralização; a existência de bactérias com baixa atividade metabólica nas camadas mais profundas, o que possibilita que entrem num estado de dormência que lhes confere resistência à maior parte dos agentes antibacterianos; e a expressão de genes de stress, proteínas de *shock* e bombas de efluxo na estirpes bacterianas que habitam estes biofilmes, assegurando a sua sobrevivência em resposta a antibacterianos (Kishen, 2015).

#### 1.7.1.2. Complexidade anatómica

A morfologia dos sistemas de canais apresenta elevada complexidade e variabilidade anatómica, associadas à existência de componentes secundários, tais como canais acessórios, deltas apicais, anastomoses ou istmos (Migliau, Pepla, Besharat, Gallottini, 2014). Esta anatomia figura também como uma dificuldade dos tratamentos endodônticos, passível de aumentar a percentagem de insucesso dos mesmos (González-Luna, 2016). Este fenómeno deve-se ao facto de os componentes secundários corresponderem a áreas inacessíveis à ação de irrigantes, impossibilitando uma correta

desinfecção e permitindo a colonização de microrganismos (Ibrahim, Moodley & Patel, 2017).

Este facto é suportado por um estudo conduzido por Nair, Henry, Cano e Vera (2005), que propôs avaliar, através de microscopia eletrónica, a presença de microrganismos em dentes submetidos a tratamento endodôntico. Em 14 dos 16 dentes em estudo, foi demonstrada a existência de microrganismos em áreas de acesso dificultado, com conseqüentes repercussões no prognóstico do tratamento.

#### 1.7.1.3. Limitação dos protocolos de irrigação

A solução irrigante ideal a ser utilizado em tratamentos endodônticos deveria apresentar um amplo espectro antimicrobiano, ser biocompatível com os tecidos periapicais, ter capacidade de eliminar tecido necrótico, de inativar endotoxinas e de eliminar a *smear layer* resultante da instrumentação. Contudo, atualmente, apesar de se encontrarem propostos diversos agentes bactericidas e bacteriostáticos para este propósito, tais como o hipoclorito de sódio (NaOCl), a clorhexidina (CHX) e o ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), ainda não se encontra disponível nenhum capaz de reunir, individualmente, todas estas características, sendo necessário aplicar combinações de irrigantes na tentativa de obter sucesso no tratamento (Zehnder, 2006).

Dos vários agentes disponíveis para a irrigação do sistema de canais, o hipoclorito de sódio é o mais utilizado (Bosch-Aranda, Canalda-Sahli, Figueiredo, Gay-Escoda, 2012). Caracteriza-se por ser um solvente orgânico, assumindo importante relevância por ser capaz de dissolver o tecido pulpar necrótico presente nos canais radiculares, mediante a ação de iões cloreto originados a partir da dissociação desta molécula (Haapasalo, Shen, Wang & Gao, 2014). Em meio ácido, estes iões existem sob a forma de ácido hipocloroso (HClO), demonstrando não só capacidade de degradar proteínas, como também uma forte atividade antibacteriana resultante de interações com a membrana celular, função mitocondrial e síntese de DNA das células destes microrganismos (Abuhaimed & Neel, 2017).

Clinicamente, esta solução é utilizada com concentrações entre 0,5% e 6%, ao longo do processo de instrumentação dos canais (Haapasalo et al., 2014).

Como já foi referido, a sua maior vantagem consiste na capacidade de dissolução de matéria orgânica que contribui para a desinfeção microbiana e eliminação de remanescentes de tecido pulpar. Contudo, o facto desta capacidade não ser seletiva faz com que esta solução exerça também o seu efeito na matriz orgânica da dentina (Borzini, Condò, de Doinicis, Casaglia & Cerroni, 2016). Deste modo, influencia negativamente o comportamento deste tecido, enfraquecendo-o e tornando-o mais suscetível à deformação e fratura, como será abordado adiante (Yadav, Chaudhary, Saxena, Talwar & Yadav, 2017). Além do mais, no caso de extrusão quer através do forâmen apical, quer através de possíveis perfurações radiculares, entra em contacto com os tecidos periapicais, podendo ser responsável por edema, necrose e parestesia (Moghadas, Shahmoradi & Narimani, 2012). (figura 2)



Figura 2

Adaptado de Bosch-Aranda, Canalda-Sahli, Figueiredo e Gay-Escoda (2012)

A citotoxicidade que induz pode também ser uma limitação do seu uso. O aumento da toxicidade da solução apresenta-se diretamente proporcional ao aumento da sua concentração (Borzini et al., 2016). Martin et. al (2014) comprovaram esta relação ao compararem a ação do hipoclorito de sódio sobre células vitais. Os autores concluíram que o maior efeito citotóxico era observado com a aplicação da concentração de 6%, a mais elevada em estudo.

A fim de reduzir a probabilidade de ocorrência de acidentes, o médico dentista deve assegurar que a solução é manuseada com precaução. Para tal, recomenda-se a utilização de agulhas de irrigação de abertura lateral, que se devem encontrar livres e

aquém do comprimento de trabalho, e garantir uma pressão suave aquando da irrigação. Adicionalmente a estas desvantagens, este agente químico não apresenta atividade contra todas as espécies bacterianas e não exerce efeito sobre componentes inorgânicos, sendo incapaz de remover os detritos resultantes da instrumentação dos canais radiculares, a *smear layer* (American Association of Endodontists, 2011)

A clorhexidina consiste num agente antisséptico amplamente utilizado em Medicina Dentária (Haapasalo et al., 2014) devido ao seu largo espetro de atividade antimicrobiana, baixa toxicidade e demonstrada substantividade (Torabinejad, 2011) por ligação aos tecidos dentários (Haapasalo et al., 2014). O seu mecanismo de ação resulta de interações com fosfolípidos e lipopolissacarídeos da membrana celular que contribuem para a morte do microrganismo (Mohammadi, Jafarzadeh & Shalavi, 2014).

O potencial antimicrobiano contra organismos gram-positivos e organismos gram-negativos, aliado a uma toxicidade inferior e menos efeitos adversos, são considerados vantagens sobre o hipoclorito de sódio, podendo também ser utilizado em casos de hipersensibilidade a este agente (Borzini et al., 2016). A sua atividade foi avaliada por Ercan, Ozekinci, Atakul e Gül (2004), num estudo *in vivo* no qual compararam o efeito da clorhexidina a 2% com o efeito do hipoclorito de sódio a 5,25%, por meio de contagem de unidades formadoras de colónias. Os autores concluíram que ambos os agentes químicos eram eficazes na redução de microrganismos presentes em canais radiculares infetados. Este estudo permite comprovar a atividade da clorhexidina e a sua pertinência como irrigante do sistema de canais, aquando do tratamento endodôntico. Contudo, a sua ação antimicrobiana não é tão eficaz como a demonstrada pelo hipoclorito, não apresentando capacidade de eliminar bactérias organizadas em biofilmes (Haapasalo et al., 2014). Apresenta ainda como possível consequência a alteração indesejável da cor da estrutura dentária (Yadav et al., 2017).

Apesar de se considerar uma opção válida para a irrigação dos canais, a clorhexidina carece de capacidade de dissolução de matéria orgânica e matéria inorgânica (Yadav et al., 2017) e como tal, não pode ser utilizada como a única solução irrigante dos canais radiculares.

Um outro aspeto negativo advém da mistura com o hipoclorito na tentativa de obter um efeito sinérgico na desinfeção canalar. Desta combinação resulta a formação de

um precipitado laranja-acastanhado de difícil remoção, que se assume conter paracloroanilina, um composto com potencial mutagénico que inviabiliza a utilização concomitante destes dois agentes de irrigação (Haapasalo, Shen, Qian, Gao, 2010) (figura 3). Contudo, num estudo recentemente publicado por Orhan, Irmak, Hür, Yaman e Karabucak (2016) foi avaliada a presença deste composto no precipitado formado após a mistura das duas soluções irrigantes. Os autores observaram que com recurso a análises cromatográficas e espectroscópicas, não foi detetada a presença de paracloroanilina, sendo possível constatar uma falta de concordância nos resultados de diversos estudos acerca desta temática.



Figura 3

Adaptado de Haapasalo, Shen, Qian e Gao (2010)

O ácido etilenodiaminotetracético, regularmente designado por EDTA, caracteriza-se por ser um agente quelante com a capacidade de estabelecer diversas ligações devido aos quatro grupos carboxilato e aos dois grupos amina que apresenta na sua constituição (Mohammadi, Shalavi & Jafarzadeh, 2013). Por este motivo e por ser capaz de interagir com matéria inorgânica, é o agente químico mais utilizado para a remoção da *smear layer* resultante da instrumentação dos canais radiculares. Devido ao facto desta camada de detritos conter microrganismos e antigénios derivados destes, a sua remoção é essencial para assegurar o sucesso do tratamento endodôntico. Este irrigante não dissolve matéria orgânica e, apesar de certos estudos lhe atribuírem alguma atividade antifúngica, possui uma ação antimicrobiana bastante limitada, contribuindo apenas para o enfraquecimento da membrana celular dos microrganismos com os quais interage (Haapasalo et al., 2014).

Na prática clínica, a concentração mais utilizada é a 17%, com tempo médio de irrigação de 2 a 3 minutos. Devido ao facto de este e o hipoclorito de sódio apresentarem diferentes características, visto um remover a matéria inorgânica e outro dissolver a matéria orgânica, a sua mistura parece vantajosa (Haapasalo et al., 2010). Contudo, a interação destes dois agentes químicos não apresenta bons resultados, com franca diminuição da eficácia do hipoclorito, não devendo, por este motivo, ser misturados (Haapasalo et al., 2014).

A sua interação com a clorhexidina também se encontra comprovada, assistindo-se à formação de um precipitado branco imediatamente após a mistura das duas soluções (Haapasalo et al., 2010). (figura 4)



Figura 4

Adaptado de Haapasalo, Shen, Qian e Gao (2010)

Pode-se concluir que o EDTA apesar de possuir baixa atividade antimicrobiana, é essencial na remoção da *smear layer* e na desmineralização da dentina do sistema de canais radiculares, o que potencia a penetração de outros irrigantes (Iqbal, 2012). Contudo, devido ao facto de não apresentar capacidade de dissolução de matéria orgânica, não é possível utilizá-lo como solução irrigante única nos tratamentos endodônticos (Haapasalo et al., 2014).

Apesar do uso combinado dos vários irrigantes, estes mostram-se incapazes de atingir o objetivo da terapia endodôntica, verificando-se a persistência de microrganismos no sistema de canais mesmo após a conclusão do tratamento, considerada a causa major do seu insucesso (Kishen, 2015). Deste modo, compreende-se a pertinência de desenvolver diferentes estratégias de irrigação dos canais radiculares, de forma a garantir

uma correta e segura desinfecção dos mesmos.

#### 1.7.1.4. Limitação dos protocolos de medicação intracanal

A medicação intracanal entre sessões é recomendada como coadjuvante na desinfecção do sistema de canais, promovendo a eliminação de microrganismos remanescentes, não eliminados nas fases anteriores do tratamento endodôntico, e, garantindo um ambiente que possibilite a regeneração dos tecidos periradiculares (Kandaswamy et al., 2016).

O hidróxido de cálcio corresponde à medicação intracanal mais utilizada (Campos-Ibarra et al., 2013), sendo classificado como uma base forte, com um pH entre 12.5 e 12.8. O seu mecanismo de ação baseia-se na sua capacidade de dissociação, libertando iões hidroxilo ( $\text{OH}^-$ ) que apresentam efeitos letais nas células bacterianas, induzindo danos na membrana citoplasmática, desnaturação proteica ou lesões no DNA (Ba-Hattab, Al-Jamie, Aldreib, Alessa & Alonazi, 2016). Apesar de ser considerado *gold standart* e ser amplamente utilizado com este propósito, o seu papel na eliminação bacteriana é controverso (Abbasy, Ibrahim, Shaker & Ahmed, 2018). Apresenta um largo espectro de atividade antimicrobiana, contudo não possui ação contra todos os agentes patogénicos, demonstrando efeito limitado contra *Candida albicans* e *Enterococcus faecalis* (Ba-Hattab et al., 2016). Este último é considerado o microrganismo predominante em infeções secundárias, mostrando-se a sua adesão e capacidade de formação de biofilmes resistentes à atividade do hidróxido de cálcio (Colaco, 2018).

Para além da sua limitada capacidade antimicrobiana para as espécies anteriormente mencionadas, a dentina, a hidroxiapatite, os remanescentes de tecido pulpar necrótico e o exsudado inflamatório parecem diminuir o seu potencial. (Mohammadi, Shalavi, Yazdizadeh, 2012).

Atendendo às suas limitações já descritas, torna-se necessária a procura por alternativas que possam contribuir para a desinfecção dos canais radiculares, quando aplicadas como medicação intracanal.

## 1.7.1.5. Limitação dos protocolos de obturação

A obturação, no tratamento endodôntico, consiste no selamento dos canais radiculares tratados, apresentando como um dos objetivos primários, a prevenção de possíveis novas contaminações (Kishen, 2015). Para tal, os materiais de obturação devem assegurar uma estreita relação com as paredes dos canais radiculares (Profeta & Prucher, 2017) e possuir propriedades antimicrobianas que permitam não só selar os microrganismos remanescentes, como também prevenir a entrada de fluídos, quer no sentido ortogrado, a partir da coroa do dente, quer no sentido retrogrado, através do seu ápex. (George, Basrani & Kishen, 2010), Estes podem servir como fonte de nutrientes para esses microrganismos e induzir, deste modo, a sua proliferação, que resulta no insucesso do tratamento (Kandaswamy et al., 2016).

George et al., num estudo *in vitro* de 2010, simularam a contaminação, por saliva e por soro, de pontas de *gutta percha*, um dos materiais de obturação mais comuns, tanto com, como sem a aplicação previa de cimento endodôntico, por diferentes períodos de tempo. Para o efeito, foi avaliada a adesão bacteriana de *E. faecalis* e a capacidade de formação de biofilmes nestas pontas. Os autores referem que, após exposição aos fluídos em estudo, verifica-se a formação de uma monocamada, maioritariamente constituída por glicoproteínas e polissacarídeos, nas pontas de *gutta percha*, que se constitui como um ótimo meio para a adesão bacteriana. Foi verificado que, mesmo em condições de privação de nutrientes, após 3 meses de exposição havia adesão bacteriana em pontas revestidas com cimento. Este facto sugere que o efeito inibitório dos cimentos endodônticos é ultrapassado após uma exposição mais longa a estes fluídos. Os autores demonstram que a adesão bacteriana de *E. faecalis* se verifica em pontas de *gutta percha*, revestidas ou não por cimento, podendo concluir-se não só que existe uma elevada afinidade por parte de microrganismos endodônticos para a *gutta percha*, como também que a ação antimicrobiana dos cimentos não inviabiliza a proliferação e adesão destes agentes patogénicos.

Relativamente aos cimentos endodônticos, num estudo de Dalmia, Gaikwad, Samuel, Aher, Gulve e Kolhe, de 2018, na qual foi comparada a atividade antimicrobiana de 4 cimentos diferentes contra *E. faecalis*, foi concluído que essa atividade diminui com o passar do tempo, assistindo-se a uma redução progressiva da sua ação, dados que vão de encontro com o observado no estudo anteriormente referido.

Deste modo, surge a necessidade de promover a otimização do processo de obturação a fim de assegurar um selamento dos canais radiculares que impeça a sua contaminação.

#### 1.7.2. Estabilidade dentinária

Em consequência dos procedimentos endodônticos, surgem fatores que devem ser tomados em consideração uma vez que influenciam o prognóstico destes tratamentos, com implicações no seu sucesso a longo-prazo.

Apesar da evidência científica relatar a possível ocorrência de um risco de fratura superior em dentes submetidos a tratamentos endodônticos, os resultados de diversos estudos mostram-se incongruentes neste aspeto, não sendo possível estabelecer uma verdadeira associação (Cheron, Marshall, Goodis & Peters, 2011). Sabe-se, no entanto, que a degradação do tecido dentinário a que estes dentes são sujeitos contribui para a perda da sua integridade estrutural e para o comprometimento das suas características físicas e mecânicas, fatores que podem contribuir para um risco mais elevado de fratura (Kishen, Shrestha, Shrestha, Cheng & Goh, 2016).

A dentina caracteriza-se como um tecido mineral, organizado em túbulos, que corresponde a grande parte da estrutura das peças dentárias. É maioritariamente constituída por cristais de hidroxiapatite carbonatada, com uma forma de agulha junto da polpa e uma morfologia mais achatada próximo da junção amelodentinária, equivalendo à parcela inorgânica do tecido dentinário. A porção orgânica deste tecido é essencialmente composta por colagénio tipo I, apresentando também proteínas não-colagénicas na sua constituição, tais como proteoglicanos e glicosaminoglicanos. A parcela mais pequena, cerca de 10%, corresponde à água, também presente na composição da dentina, quer na sua forma livre, presente nas porosidades do tecido; quer ligada aos cristais de hidroxiapatite e às fibras de colagénio (Kishen, 2006). Todos estes componentes são responsáveis pelas propriedades mecânicas que o tecido dentinário apresenta, tais como o seu módulo de elasticidade (módulo de Young) e a sua resistência à fratura (Kishen, 2015).

A estabilidade deste tecido é influenciada por uma multiplicidade de fatores e a sua diminuição, em dentes endodonticamente tratados, apresenta diversas causas que podem ser agrupadas em não-iatrogénicas, quando decorrem de alterações fisiológicas e/ou patológicas; e iatrogénicas, como consequência dos procedimentos do tratamento endodôntico. De facto, a ação dos agentes de irrigação e de medicação intracanal, a interação bacteriana com a dentina do sistema de canais e a manifestação dos seus efeitos, demonstram contribuir para a degradação do tecido dentinário que, associado à perda de estrutura decorrente dos processos de instrumentação, favorecem o potencial de fratura demonstrado por estes dentes. Na presença de uma infeção endodôntica, os microrganismos responsáveis pela patologia podem desempenhar um papel importante na deterioração de propriedades mecânicas do tecido dentinário por degradação da sua matriz orgânica, mais especificamente das fibras de colagénio que a constituem. As causas atribuídas a este fenómeno podem estar relacionadas com a atividade colagenolítica de enzimas bacterianas ou com a ação de metaloproteinases de matriz do hospedeiro, uma vez que ambas apresentam atividade na degradação do colagénio que compõe a matriz orgânica da dentina presente nos canais radiculares. Deste modo, assiste-se a um enfraquecimento do tecido com consequências deletérias em propriedades como a sua dureza e a resistência. (Kishen, 2006)

Referente às etapas do tratamento endodôntico e como abordado anteriormente, os agentes de irrigação são aplicados com o intuito de, não só promover a desinfeção do sistema de canais pela eliminação de microrganismos, como também de dissolver remanescentes de tecido pulpar necrótico e remover a camada de detritos resultante da instrumentação, a *smear layer*.

A aplicação do hipoclorito de sódio e do EDTA para este fim já foi descrita, contudo o seu uso prolongado e em concentrações mais elevadas apresenta implicações no comportamento da dentina dos canais radiculares, com efeitos adversos nas suas propriedades físicas (Tang, Wu & Smales, 2010). O hipoclorito de sódio ao promover alterações nos componentes que constituem o tecido dentinário, contribui para estes efeitos prejudiciais que agravam a possibilidade de fratura radicular (Kishen, 2006). Sim, Knowles, Ng, Shelton & Gulabivala (2001) demonstraram este aspeto num estudo no qual observaram que a imersão de barras de dentina em hipoclorito de sódio a 5,25% contribuí

significativamente para a redução do seu módulo de elasticidade e da sua resistência à flexão.

O EDTA sendo um agente quelante é também capaz de enfraquecer e induzir instabilidade na dentina radicular, por dissolução da sua fase inorgânica (Marending, Paqué, Fischer & Zehnder, 2007). O uso sequencial destes dois irrigantes resulta numa superfície dentinária porosa, com reduzida microdureza, devido à remoção quer da porção orgânica, quer da porção inorgânica deste tecido (Kishen, 2006). A remoção da fase mineral por ação do EDTA resulta numa matriz orgânica desprotegida e mais suscetível à ação do hipoclorito de sódio (Marending et al., 2007).

Para além da influência dos irrigantes no comportamento da dentina, existe evidência de que o hidróxido de cálcio, utilizado como medicação intracanal, contribui também com desvantagens no seu comportamento mecânico, com uma taxa de 32% de redução da força deste tecido (White, Lacefield, Chavers & Eleazer, 2002). Este fenómeno pode encontrar resposta na elevada alcalinidade que este composto apresenta, que pode desnaturar a matriz orgânica ou contribuir para desagregação da matriz inorgânica deste tecido (Lee, 2013).

Com base no que foi descrito e à luz da evidência científica, podemos assumir que o uso destes agentes de irrigação e de medicação intracanal em concentrações elevadas por períodos de tempo prolongados, contribui com alterações negativas nas propriedades físicas e mecânicas da dentina que, conseqüentemente, podem resultar num risco superior de fratura radicular.

Apesar da demonstrada influência que os agentes químicos apresentam, a instrumentação do sistema de canais é um fator preponderante neste aspeto, para o qual os métodos e instrumentos utilizados assumem importante relevância. Uma sobreinstrumentação dos canais radiculares corresponde, necessariamente, a uma remoção excessiva de dentina das suas paredes que pode comprometer a estrutura do tecido, algo que encontra forte correlação com um potencial de fratura mais elevado. A presença de canais com uma forma não-circular ou com paredes finas são também considerados fatores de risco que elevam a possibilidade de ocorrência de fratura nos dentes que os apresentem (Tang et al., 2010).

Todos os fatores descritos podem contribuir para o enfraquecimento e a instabilidade da dentina dos canais radiculares e, por consequência, originar fraturas que comprometem o prognóstico de dentes submetidos a tratamento endodôntico. Como tal, devem ser adotadas estratégias que permitam estabilizar o tecido dentinário e deste modo aumentar o seu potencial de sucesso a longo-prazo.

A ligação cruzada das fibras de colagénio da matriz orgânica apresenta-se como uma opção válida para reduzir esta instabilidade, com aumento, por consequência, das propriedades mecânicas deste tecido. Para este propósito existem disponíveis métodos químicos, físicos e fotodinâmicos. Todos estes ao induzirem ligações inter- e intramoleculares no colagénio dentinário, contribuem com melhorias no seu comportamento e na sua resistência à degradação (Kishen *et al.*, 2016). Os métodos químicos de ligação cruzada destas fibras correspondem a uma das abordagens mais comuns para este efeito. O glutaraldeído demonstra grande potencial como agente de ligação, possibilitando o aumento da rigidez, da tração e de outras propriedades físicas e mecânicas dos tecidos. Contudo, a elevada citotoxicidade que apresenta limita o seu uso em sistemas vivos, com reduzida aplicação clínica. O 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) é um outro agente, não-tóxico, regularmente utilizado para estabilizar a dentina. Na presença de N-hidroxisuccinimida (NHS), permite a formação de ligações cruzadas do tipo amida com as fibras de colagénio da matriz orgânica que, deste modo, melhoram o comportamento deste tecido (Kishen *et al.*, 2016). Esta ação foi comprovada por Scheffel *et al.* (2014) num estudo no qual foi observado que o EDC contribui para um aumento significativo da rigidez do colagénio e para a diminuição da sua degradação, por um decréscimo na atividade colagenolítica das metaloproteinases também avaliada no presente estudo. A proantocianidina é também um composto que se apresenta útil para este efeito e que permite contrariar algumas das adversidades da aplicação de outros agentes químicos, tais como a sua toxicidade, a falta de estabilidade e a dificuldade em controlar a taxa de ligação que proporcionam. Através de interações covalentes, iónicas, hidrofóbicas e pontes de hidrogénio, este composto contribui para a estabilização do colagénio e, conseqüentemente, da dentina que constitui os canais radiculares (Han, Jaurequi, Tang & Nimni, 2003). Um estudo de Bedran-Russo, Pereira, Duarte, Drummond e Yamauchi (2006) comprovou que a proantocianidina proporciona uma resistência à tração satisfatória, inclusivamente superior à demonstrada por outros agentes químicos com implicações na formação de ligações cruzadas no tecido

colagénico, também testados pelos autores. Além dos métodos químicos disponíveis, esta estabilização pode ser conseguida com recurso a abordagens físicas, tais como a irradiação ultravioleta e o tratamento desidrotérmico. Numa comparação entre métodos químicos e métodos físicos, foi observado que os primeiros proporcionavam uma estabilidade superior contra a degradação por meio de enzimas, retardando a sua atividade (Suesca, Dias, Braga, de Sousa & Fontanilla, 2017). Além do mais, estas medidas encontram utilização limitada no estabelecimento de ligações no colagénio, uma vez que promovem a sua desnaturação e degradação térmica (Vashi, Werkmeister, Vuocolo, Elvin & Ramshaw, 2012).

A inclusão de fotossensibilizadores possibilita a formação de ligações covalentes entre as moléculas de colagénio com a aplicação da terapia fotodinâmica à dentina radicular, eliminando o risco associado ao uso de radiação neste tecido. Deste modo, assiste-se a um aumento da sua resistência à tração, assim como a uma melhoria das suas restantes propriedades físicas e mecânicas (Vashi *et al.*, 2012).

## 1.8. Aplicação da Nanotecnologia à Endodontia

Como tentativa de superar os desafios e dificuldades inerentes ao tratamento endodôntico, e com o intuito de contribuir para a diminuição da sua taxa de insucesso assiste-se à aplicação da nanotecnologia a esta especialidade da Medicina Dentária.

### 1.8.1. Nanopartículas na desinfeção dos canais radiculares

A aplicação de nanopartículas e das suas propriedades nas várias fases do tratamento endodôntico contribuem, direta e indiretamente, para melhorias na desinfeção dos canais radiculares, resultando numa diminuição da persistência de microrganismos nos mesmos. Deste modo, assiste-se ao uso de nanopartículas tanto na irrigação, como na medicação e obturação do sistema de canais.

Estas partículas apresentam um amplo espectro de atividade e exercem a sua ação por meio de interações electroestáticas entre a carga positiva que apresentam e a carga negativa das células bacterianas, que resulta na alteração do potencial da membrana (Colaco, 2018), com entrada de nanopartículas para o espaço intracelular e perda de

constituintes citoplasmáticos (Kishen, 2015). Contribuem ainda para o aumento da produção de espécies reativas de oxigênio que influenciam também a sobrevivência bacteriana (Colaco, 2018).

A literatura descreve o uso de nanopartículas de quitosano, nanopartículas de prata, nanopartículas de vidro bioativo e nanopartículas de óxidos metálicos, demonstrando a utilidade das suas propriedades antimicrobianas para este efeito.

#### 1.8.1.1. Nanopartículas de quitosano

O quitosano, um derivado da quitina industrialmente obtida a partir do exoesqueleto de crustáceos, corresponde a um biopolímero hidrofílico versátil que pode ser sintetizado sob várias formas, das quais se destacam as nanopartículas (Shrestha & Kishen, 2014). Demonstra uma estrutura química semelhante à celulose, diferenciando apenas nos grupos funcionais que apresenta (Azevedo, Chaves, Bezerra, Fook & Costa, 2007) (figura 5)

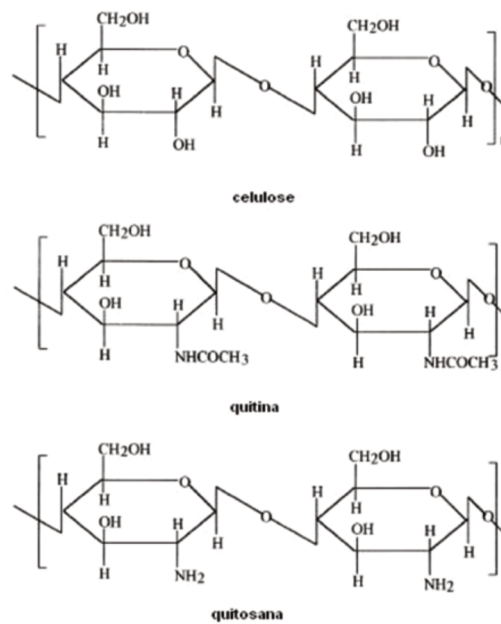


Figura 5

Adaptado de Azevedo, Chaves, Bezerra, Fook e Costa (2007)

Este exibe uma amina primária e dois grupos hidroxilo livres em cada monómero (Kishen, 2015), o que o tornam passível de diversas modificações químicas, como será posteriormente abordado. Apresenta um extenso espectro de atividade antimicrobiana, demonstrando propriedades antifúngicas e propriedades antibacterianas, (Kandaswamy *et al.*, 2016) com uma ação superior em bactérias gram-positivas (Kishen, 2015). Assiste-se ainda a uma biocompatibilidade e biodegradabilidade por parte destas partículas, assim como a uma compatibilidade com a cor da estrutura dentária e um custo de produção reduzido. Estas características aliadas à possibilidade de atuarem nos túbulos dentinários e nas zonas de maior complexidade anatômica, tornam as nanopartículas de quitosano uma opção vantajosa na melhoria da desinfecção do sistema de canais radiculares, aquando do tratamento endodôntico (Kishen, 2015).

A atividade antibacteriana reside nas interações eletrostáticas anteriormente mencionadas, devido à natureza catiónica destas nanopartículas, que contrasta com a polaridade aniónica das células bacterianas (Kishen, 2015). Devido ao facto de possuir uma elevada capacidade quelante de vários iões metálicos, equaciona-se que apresente

atividade junto dos iões que conferem estabilidade à parede celular e exercer também deste modo a sua ação antimicrobiana (Campos-Ibarra et al., 2013).

De acordo com o mencionado no artigo de Shrestha e Kishen (2014), estas nanopartículas demonstraram, com base numa interação tempo-dependente, reduzir a adesão bacteriana da superfície dentinária tratada e eliminar biofilmes monoespécie (Shrestha & Kishen, 2014). Por outro lado, o efeito antifúngico é atribuído à capacidade de supressão da esporulação e da germinação de esporos que o quitosano apresenta (Campos-Ibarra et al., 2013).

A sua utilização enquanto irrigante foi avaliada por Yadav et al. (2017), num estudo *in vitro* no qual foi testado o efeito antibacteriano contra *E. faecalis* e *C. albicans* de 5 grupos diferentes de irrigantes – quitosano a 0,25%, quitosano a 0,5%, clorhexidina a 2%, hipoclorito de sódio a 3% e solução salina – em dentes seccionados. Foi revelado que, apesar da redução bacteriana ser superior quando utilizado hipoclorito de sódio, o quitosano demonstrou remover e desintegrar, com sucesso, o biofilme formado na superfície dos canais radiculares. Os autores concluem que este pode ser uma alternativa válida ao uso de hipoclorito de sódio e de clorhexidina, uma vez que expressa atividade antimicrobiana e não apresenta as desvantagens, anteriormente mencionadas, associadas ao uso destes dois irrigantes.

Também é possível fazer uso das propriedades destas nanopartículas na medicação intracanal. Carpio-Perochena et al. (2017) conduziu um estudo no qual foram testados os efeitos da adição de nanopartículas de quitosano a uma pasta à base de hidróxido de cálcio (30%-35%), tendo sido demonstrado que, apesar de não promover diferenças significativas na variação do pH da pasta, a capacidade antimicrobiana melhora significativamente com a presença destas partículas, garantindo a manutenção da sua atividade por longos períodos de tempo. Foi também provado que a inclusão de quitosano na pasta promove a morte de bactérias organizadas em biofilmes de espécies múltiplas. Os autores propõem que a melhoria na eficácia antimicrobiana exibida no estudo pode ser atribuída à capacidade destas nanopartículas em neutralizar o crescimento das células bacterianas. Conclui-se que esta abordagem apresenta o potencial de aumentar a ação do hidróxido de cálcio enquanto agente de desinfeção de canais radiculares e inibir a sua

recolonização.

A aplicação destas nanopartículas na sessão de obturação também se encontra descrita na literatura, contribuindo a sua adição a cimentos endodônticos para a redução da adesão de bactérias, como o *E. faecalis*, à dentina dos canais (Kishen, 2015).

Como é possível constatar, a utilização de nanopartículas de quitosano na desinfecção de canais radiculares encontra bastante evidência científica, permitindo induzir vastas melhorias nestes tratamentos. Contudo, é importante ressaltar que a sua atividade pode ser influenciada não só por fatores intrínsecos como a sua carga, peso molecular, solubilidade ou potencial quelante; como também por fatores inerentes ao ambiente em que vão atuar, tais como o pH, a temperatura e a concentração iónica desse meio (Kandaswamy et al., 2016). A necessidade de um certo tempo de interação para demonstrar atividade, e o facto da presença de tecido pulpar remanescente e albumina parecerem inibir a eficácia antibacteriana, mostram-se como algumas das adversidades da utilização destas nanopartículas (Wu, Fan, Kishen, Gutmann & Fan, 2014).

#### 1.8.1.2. Nanopartículas de prata

A prata tem sido amplamente utilizada devido às propriedades antimicrobianas que apresenta (Kishen, 2015). De facto, estas nanopartículas apresentam um largo espectro de atividade contra bactérias gram-positivas e gram-negativas, fungos, protozoários e ainda alguns vírus (Campos-Ibarra et al., 2013).

Apesar da sua forma de ação não estar completamente bem definida, existem dois mecanismos de atividade aceites: a indução de morte celular por contacto direto e a indução de morte celular mediada por iões. A primeira baseia-se nas forças eletrostáticas já descritas que possibilitam a adesão destas nanopartículas que deste modo induzem danos membranares e conseqüente perda de constituintes da célula. Podem ainda penetrar a membrana, invadir o espaço celular e, deste modo, interagir com proteínas e lípidos e contribuir para o aumento da produção de espécies reativas de oxigénio, que no seu conjunto contribuem para a perda da função e morte celular. A segunda caracteriza-se pela capacidade de libertação de iões  $Ag^+$  por parte destas nanopartículas, que ao interagirem com os grupos sulfidrilo de proteínas, resultam na sua inativação e comprometimento de funções essenciais à manutenção da vitalidade celular.

À semelhança do que foi descrito anteriormente, estes iões podem também causar aumento do stress oxidativo nos microrganismos nos quais atua (Qing et al., 2018).

Devido à atividade antimicrobiana que demonstram, estas nanopartículas apresentam elevado potencial, assistindo-se à sua aplicação nas várias fases do tratamento endodôntico, com vista à desinfeção dos canais radiculares e com o propósito de melhorar o *outcome* do mesmo. O seu uso na irrigação, medicação intracanal e obturação encontra-se amplamente descrito na literatura disponível.

Associado à sua utilização como irrigante, González-Luna et al. (2016) conduziu um estudo *ex vivo* com canais de dentes monorradiculares previamente instrumentados, no qual propõe avaliar o efeito bactericida de uma dispersão de nanopartículas de prata quando utilizada como irrigante final. Para tal, e após terem sido irrigados com hipoclorito de sódio durante a instrumentação, os canais foram submetidos a um última irrigação durante 5 minutos (5mL) com nanopartículas de prata (grupo A), hipoclorito de sódio a 2,25% (grupo B), nanopartículas de prata em conjunto com EDTA a 17% (grupo C) e uma solução salina (grupo D), avaliando a eficácia bactericida de cada um para *E. faecalis*. Foi concluído que apesar do hipoclorito de sódio ter demonstrado maior eficácia, não se verificaram diferenças significativas entre este grupo e o grupo submetido a irrigação final com a dispersão de nanopartículas de prata. A remoção de *smear layer* foi também avaliada neste estudo, tendo os autores observado uma boa capacidade por parte das nanopartículas de prata para este efeito. Os resultados apresentados por estes autores no que concerne à atividade bactericida contrastam com os resultados obtidos no estudo de Wu et al., do ano 2014, no qual observaram que nanopartículas de prata a 0,1% utilizadas como agentes de irrigação não provocavam disrupção da estrutura do biofilme. Importante referir que este facto pode ser atribuído à interação inadequada entre as nanopartículas e as células bacterianas em estudo, devido ao reduzido tempo de irrigação (apenas 2 minutos). De facto, os dados obtidos a partir do estudo inicialmente referido vão de encontro com o observado noutros, onde foi proposta a avaliação do efeito bactericida destas nanopartículas enquanto irrigantes. Um estudo no qual foi comparado o efeito do hipoclorito de sódio a 5,25% com o efeito de nanopartículas de prata a 0,005% sobre espécies bacterianas de *E. faecalis* demonstra não haver diferenças significativas entre os dois, sugerindo que estes possuem semelhante atividade antibacteriana (Lotfi, Vosoughhosseini, Ranjkesh, Khani, Saghiri & Zand,

2011). Estes resultados permitem concluir que estas nanopartículas apresentam efeito bactericida positivo, podendo apresentar-se como uma alternativa válida ao uso de hipoclorito.

A sua aplicação enquanto medicação intracanal encontra também extensa evidência na literatura, com estudos que comprovam os efeitos benéficos da sua utilização quando em comparação com o hidróxido de cálcio, o composto mais usado para este fim. Afkhami, Pourhashemi, Sadegh, Salehi e Fard (2015), compararam a atividade antibacteriana de diferentes medicações em canais contaminados por *E. faecalis*. Para o feito, foi testada a eficácia de uma pasta hidróxido de cálcio, de uma mistura de hidróxido de cálcio e clorhexidina, de uma mistura de hidróxido de cálcio e uma suspensão de nanopartículas de prata e de uma solução salina, quando aplicadas no interior dos canais durante 1 semana. Os autores concluíram que após este período, a mistura de hidróxido de cálcio e nanopartículas de prata demonstrou ser a mais eficaz contra a espécie bacteriana em estudo, apresentando elevada atividade antibacteriana. A sua aplicação sob a forma de gel a 0,02% durante 7 dias, apresentou efeitos bactericidas superiores quando em comparação com o hidróxido de cálcio, tal como apontado por Wu et al. em 2014. Foi demonstrado que este gel de nanopartículas de prata contribui para uma disrupção da integridade do biofilme e uma consequente redução significativa do número de células bacterianas da espécie em estudo, com proporções menores de *E. faecalis* detetadas nas estruturas residuais destes biofilmes, comparativamente ao observado aquando da aplicação de hidróxido de cálcio como medicação intracanal.

Dentro da temática da medicação intracanal, foi demonstrado que estas partículas apresentam não só influência na atividade antimicrobiana, como também na redução da dor pós-operatória, isto é, na dor após o tratamento endodôntico. Este aspeto foi estudado por Abbasy et al., em 2018, ao compararem o efeito de redução da dor do hidróxido de cálcio e das nanopartículas de prata, utilizados como medicação em 34 doentes. O nível de dor foi avaliado com recurso a uma escala numérica, antes do tratamento e após a aplicação de medicação nos canais. Concluiu-se que, apesar de após 48 horas não se verificarem diferenças relevantes entre os dois, após 4, 12 e 24 horas, os doentes nos quais os canais foram medicados com as nanopartículas, apresentavam taxas de dor inferiores quando comparados com os doentes nos quais foi aplicado hidróxido de cálcio como medicação intracanal. É então possível equacionar que a aplicação de

nanopartículas de prata pode contribuir para uma redução da dor após tratamento e contribuir para um pós-operatório mais favorável para o doente.

Na fase de obturação também se encontra aplicabilidade para estas partículas, em especial na sua adição a cimentos endodônticos, com o propósito de melhorar não só o seu comportamento antimicrobiano, assim como algumas das suas propriedades. A sua mistura com estes cimentos demonstra contribuir para uma melhoria do seu escoamento, devido à diminuição de viscosidade que estas nanopartículas induzem (Campos-Ibarra et al., 2013). Um exemplo de um cimento que apresenta nanopartículas de prata na sua constituição é o *Gutta-Flow*, um cimento à base de silicone ao qual é também adicionado pó de *gutta percha*. Este material tem sido apontado como capaz de melhorar a capacidade de selamento dos canais radiculares nos quais é aplicado e, deste modo, aumentar a resistência à penetração bacteriana nos mesmos (Jadhav, Bhide, Prasad, Kunchiraman, Shimpi & Nandhini, 2016).

O MTA é um material que conta com vastas aplicações na área da endodontia devido à sua biocompatibilidade, bioatividade, hidrofiliçidade, radiopacidade, selamento e baixa solubilidade. Por estas características, é empregue na reparação de perfurações radiculares, na retroobturaçã/obturaçã retrógrada, na apexificaçã em dentes imaturos, entre outras possíveis aplicações (Tawil, Duggan & Galicia, 2015). Este deve também apresentar alguma atividade antimicrobiana, contudo os resultados dos estudos acerca desta capacidade mostram-se controversos. Num estudo *in vitro* desenvolvido com o intuito de compreender se a conjugaçã do MTA com nanopartículas de prata podia contribuir para melhorias da sua capacidade antimicrobiana, foi verificado que esta mistura se mostrou mais eficaz contra *E. faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa* e *C. albicans* (3 das 4 espécies bacterianas em estudo), quando comparado com o efeito do MTA individualmente, isto é, sem a adiçã de nanopartículas (Samiei, Aghazadeh, Lotfi, Shakoei, Aghazadeh & Pakdel, 2013).

Para garantir um correto controlo da infeçã, todos os instrumentos e materiais em contacto com os canais radiculares devem estar estéreis, incluindo a *gutta percha*, que corresponde ao material obturador mais comum dos tratamentos endodônticos. Apesar de serem produzidos sob condições assétiças, estes cones podem sofrer contaminaçã por aerossóis, pela sua manipulaçã ou pelo armazenamento inadequado

(Chandrappa, Mundathodu, Srinivasan, Nasreen, Kavitha & Shetty, 2014). Por este motivo, a sua desinfecção torna-se necessária. O hipoclorito de sódio é um dos agentes utilizado para este propósito, contudo causa irregularidades na superfície dos cones, fator que pode influenciar o prognóstico do tratamento. Um estudo de 2018 concluiu que o uso de nanopartículas de prata para a desinfecção destes cones produzia menos irregularidades, causando 10 vezes menos deterioração do que o hipoclorito de sódio, sendo como tal uma opção válida para este fim (Misha & Tyagi, 2018).

Apesar dos visíveis contributos para a melhoria dos tratamentos endodônticos e, conseqüentemente, da saúde oral, existem desvantagens à utilização destas nanopartículas. De acordo com Kishen (2015), existem dois problemas principais: o potencial escurecimento da dentina pelo qual podem ser responsáveis e a toxicidade que apresentam para células mamíferas. Foi evidenciado que doses elevadas de nanopartículas de prata podem induzir stress oxidativo como mecanismo de citotoxicidade. Este *stress* verifica-se quando a formação de espécies reativas de oxigénio excede a capacidade de defesa antioxidante do organismo (González-Luna et al., 2016). É referido no artigo de Campos-Ibarra et al (2013) que vários investigadores reportam que a citotoxicidade, a apoptose celular e a lesão do DNA que podem ser induzidas por estas nanopartículas, são mediadas não só pelas espécies reativas de oxigénio e *stress* oxidativo, como também pela peroxidação lipídica da membrana celular. Como é possível constatar, apesar dos evidentes benefícios da sua aplicação à desinfecção em endodontia, os aspetos relacionados com a segurança da sua utilização devem ser tidos em conta.

#### 1.8.1.3. Nanopartículas de vidro bioativo

As nanopartículas de vidro bioativo, constituídas por óxido de cálcio ( $\text{CaO}_2$ ), óxido de sílica ( $\text{SiO}_2$ ), óxido de sódio ( $\text{Na}_2\text{O}$ ) e pentóxido de fósforo ( $\text{P}_2\text{O}_5$ ) têm apresentado bastante interesse na desinfecção de canais radiculares devido às suas propriedades antibacterianas (Waltimo, Brunner, Vollenweider, Stark & Zehnder, 2007). A sua atividade reside na libertação de iões em meio aquoso, na capacidade que demonstram em elevar o pH e a pressão osmótica do local no qual são aplicadas e na possibilidade de precipitação de iões cálcio e fosfato na membrana das células bacterianas, contribuindo, deste modo, para o distúrbio do seu correto funcionamento. Não obstante, estas nanopartículas podem também exercer o seu efeito através de conjugação com antibióticos ou outros elementos com atividade antibacteriana, libertados

à medida que o vidro se decompõe (Shrestha & Kishen, 2016). Apesar de Waltimo et al. (2007) terem comprovado que o seu efeito antibacteriano promovia a redução significativa da viabilidade das espécies bacterianas em estudo, a evidência científica atualmente disponível não permite classificar esta abordagem como uma alternativa válida aos atuais agentes de desinfecção dos canais radiculares. De facto, os resultados da sua eficácia enquanto antibacterianos são dispares, tal como demonstrado por Zehnder, Luder, Schatzle, Kerosuo e Waltimo (2006), numa investigação *ex vivo* na qual testaram esta propriedade em comparação com o efeito do hidróxido de cálcio, quando aplicados no interior de canais radiculares, como medicação por um período de 10 dias. Os autores concluíram que o efeito sobre as células bacterianas em estudo era significativamente superior quando aplicado o hidróxido de cálcio, demonstrando melhores resultados na prevenção do crescimento de espécies bacterianas residuais.

Apesar do potencial contra patógenos bacterianos que estas nanopartículas apresentam, a sua aplicação à desinfecção do sistema de canais no tratamento endodôntico carece de evidência científica mais robusta, devido à variação dos resultados dos diversos estudos atualmente publicados referentes à sua eficácia (Subhashini & Raj, 2018).

#### 1.8.1.4. Nanopartículas de óxido de zinco

As nanopartículas de óxidos metálicos são também partículas que apresentam atividade antibacteriana, com ação tanto contra bactérias gram-positivas, como contra bactérias gram-negativas, e atividade antifúngica (Kandaswamy et al., 2016).

As nanopartículas de óxido de zinco fazem parte deste grupo, apresentando altos efeitos antimicrobianos em ambientes com valores de pH elevados. O seu mecanismo de ação é semelhante ao das restantes nanopartículas, baseando-se em interações eletroestáticas com a polaridade aniónica das células bacterianas, que resulta numa maior permeabilidade das suas membranas e consequente perda de componentes citoplasmáticos (Mohammadi et al., 2013). A sua acumulação no interior destas células e a produção de iões zinco ( $Zn^{2+}$ ) contribuem também para o seu efeito bactericida, por distúrbios no sistema enzimático e no metabolismo aminoácido (Ibrahim et al., 2017). A peroxidação dos lípidos da membrana celular devido à ação de espécies reativas de

oxigênio e de iões superóxidos é também uma manifestação do potencial antibacteriano que estas partículas apresentam (Kandaswamy et al., 2016).

Referente a esta temática, parece existir uma correlação entre o tamanho destas nanopartículas e as suas propriedades de eliminação de espécies bacterianas, com partículas de menores dimensões a possuírem maiores efeitos bactericidas (Ibrahim et al., 2017). Subhashini e Raj (2018) referem ainda que esta capacidade também se encontra dependente da concentração, reportando que níveis mais elevados se traduzem em efeitos antibacterianos superiores.

A utilização destas nanopartículas na endodontia apresenta evidência relevante que se expressa pela sua aplicação como agentes de desinfeção nas múltiplas fases do tratamento. Shrestha, Zhilong, Gee e Kishen (2010), testaram a efeito das nanopartículas de óxido de zinco na eliminação de bactérias *E. faecalis*, tanto na sua forma planctónica, como organizadas em biofilmes, avaliando também a sua eficácia a longo-prazo. Os autores observaram uma eliminação total das células bacterianas que se encontravam livres e dispersas (isto é, bactérias planctónicas), constatando, contudo, a sua sobrevivência quando organizadas em biofilmes. Apesar disso, foi demonstrada uma redução significativa da espessura destas estruturas de organização. Estes resultados, aliados à manutenção da atividade antibacteriana após 90 dias também provada no estudo, permitem concluir que estas nanopartículas se podem apresentar úteis na desinfeção dos canais radiculares, aquando de um tratamento endodôntico.

A atividade antimicrobiana foi também testada na adição destas nanopartículas a pastas de hidróxido de cálcio, contra várias espécies bacterianas, tais como *E. faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*, a fim de comprovar a pertinência da sua utilização enquanto medicação intracanal. Demonstrou-se que esta associação contribui para um aumento de pH e para uma conseqüente maior atividade antimicrobiana, concluindo apresentar efeitos benéficos na eliminação de microrganismos, quando aplicada no interior dos canais.

Não obstante, existe também evidência que comprova que a sua aplicação a cimentos endodônticos induz melhorias na irradiação de culturas bacterianas, o que se

traduz em *outcomes* mais favoráveis do ponto de vista da desinfecção do sistema de canais. Este aspeto foi provado por Nair, James, Devadathan, Johnny, Mathew e Jacob, num estudo de 2018, no qual foi demonstrado que a conjugação de um cimento à base de hidróxido de cálcio com óxido de zinco, sob a forma de nanopartículas, apresenta um efeito antibiofilme eficaz, com resultados superiores comparativamente à conjugação com nanopartículas de quitosano, também avaliada no estudo. Estes resultados apresentados pelos autores vão de encontro ao anteriormente observado por Kishen, Shrestha e Neoh, no ano 2008, no qual evidenciaram que apesar do potencial zeta e propriedades antibacterianas superiores apresentados pelas nanopartículas de quitosano quando aplicadas diretamente sobre bactérias na sua forma planctónica, a sua atividade diminuía consideravelmente quando misturadas com cimento (no caso deste estudo, um cimento de óxido de zinco-eugenol).

Deste modo comprovam-se os efeitos benéficos associados à aplicação de nanopartículas de óxido de zinco ao tratamento endodôntico, o que se traduz em *outcomes* mais favoráveis do ponto de vista da desinfecção do sistema de canais.

#### 1.8.1.5. Terapia Fotodinâmica

A terapia fotodinâmica consiste numa estratégia antimicrobiana inovadora com aplicabilidade pertinente na desinfecção do sistema de canais radiculares, aquando do tratamento endodôntico (Singh, Nagpal, Manuja & Tyagi, 2014). O seu mecanismo de ação envolve a administração de fotossensibilizadores, a sua ativação por incidência de luz e a presença de oxigénio (Iqbal, 2012). Os fotossensibilizadores correspondem a moléculas passíveis de ativação por uma fonte de luz com um comprimento de onda específico, destacando-se o azul de metileno, o azul de toluidina, o dióxido de titânio e o rosa-bengala como os mais utilizados para este efeito. A maioria destas moléculas são ativadas por luz vermelha, com comprimentos de onda entre os 630 e os 700 nanómetros com recurso a fontes de luz como lasers díodo e luzes LED (Singh *et al.*, 2014). Esta ativação resulta na excitação destes agentes químicos com consequente transição do seu estado fundamental para um nível de energia superior (Plotino, Grande & Mercade, 2018) que, ao reagirem com o oxigénio presente no ambiente onde se encontram, produzem espécies reativas capazes de induzir a morte de microrganismos (Iqbal, 2012).

Com base na sua atividade, compreende-se que esta terapia se pode apresentar útil na eliminação de microrganismos presentes nos canais radiculares e contribuir, deste modo, com melhorias no *outcome* dos tratamentos endodônticos. Ng *et al.* demonstraram este aspeto num estudo *ex vivo*, publicado no ano 2011, no qual avaliaram o efeito antimicrobiano da terapia fotodinâmica em canais radiculares infetados, através da contagem de unidades formadoras de colónias. Os autores compararam a eficácia do desbridamento tradicional com a sua eficácia quando em complemento com a terapia fotodinâmica, verificando que a conjugação com esta terapia possibilita uma redução significativa do número de espécies bacterianas presentes no sistema de canais radiculares, sendo inclusivamente superior à demonstrada apenas com recurso ao desbridamento. Constata-se que a aplicação desta técnica apresenta eficácia comprovada, mostrando-se eficaz na desinfeção de canais radiculares o que assegura resultados mais favoráveis por parte dos tratamentos endodônticos. Pourhajibagher e Bahador (2018) corroboram esta ideia ao avaliarem, *in vivo*, o efeito desta terapia em infeções endodônticas primárias, utilizando o azul de toluidina como fotossensibilizador e o laser díodo como fonte de luz. Deste modo, verificaram uma redução significativa no número e diversidade dos microrganismos presentes nos canais infetados, após aplicação desta estratégia antimicrobiana.

Contudo, e apesar da atividade antimicrobiana demonstrada, este método apresenta algumas limitações. A reduzida capacidade de penetração dos fotossensibilizadores e da luz, associada à arquitetura complexa do sistema de canais (Pražmo, Kwaśny, Łapiński & Mielczarek, 2016), a resistência bacteriana, a disponibilidade limitada de oxigénio ou o efeito inibitório de constituintes dos canais radiculares, como tecido pulpar e remanescentes bacterianos, obrigam ao desenvolvimento de estratégias que induzam melhorias nesta terapia e que, deste modo, contornem as limitações descritas (Singh *et al.*, 2014). Com este propósito, assiste-se à aplicação de nanopartículas à terapia fotodinâmica, cuja combinação com fotossensibilizadores assegura uma concentração dos mesmos com conseqüente aumento da atividade antimicrobiana desta modalidade de tratamento, (Akbarianrad, Mohammadian, Nazari & Nobar, 2018) assim como uma seletividade superior e uma limitação da capacidade de efluxo por parte da célula-alvo, contribuindo para a diminuição da ação dos seus mecanismos de resistência (Pagonis *et al.*, 2010). Constata-se que esta conjugação, correspondente à funcionalização de nanopartículas,

apresenta múltiplas vantagens sobre fotossensibilizadores que não se encontrem encapsulados nestas.

As nanopartículas de PLGA correspondem a nanopartículas poliméricas passíveis de serem carregadas com fotossensibilizadores e utilizadas para este fim. Pagonis et al. (2010) avaliaram a eficácia da sua conjugação com azul de metileno contra *E. faecalis*, quer na sua forma planctónica, quer no interior de canais radiculares, após fotoativação com luz vermelha com um comprimento de onda de 665nm. Os autores observaram uma redução na contagem bacteriana em ambas as formas testadas, o que permite concluir que o uso destas nanopartículas encapsuladas com fotossensibilizadores apresenta resultados promissores na desinfeção do sistema de canais.

Num estudo de Akbari et al. (2017), foi testado o efeito da incorporação de um fotossensibilizador em nanopartículas de óxido de grafeno, avaliando a sua atividade antimicrobiana contra *E. faecalis*, aquando da aplicação da terapia fotodinâmica. Esta combinação demonstrou uma eficácia elevada na redução significativa do número de células bacterianas que, à semelhança do seu potencial antibiofilme, se apresentou superior quando comparada com a terapia fotodinâmica baseada apenas na atividade do fotossensibilizador, isto é, na ausência das nanopartículas em estudo.

As nanopartículas de quitosano, já anteriormente descritas, apresentam diversos grupos funcionais reativos que as tornam extremamente versáteis e suscetíveis de sofrerem funcionalização, com aplicabilidade neste tratamento por combinação com fotossensibilizadores, à semelhança do verificado com as partículas de PLGA e de óxido de grafeno. A sua atividade no tratamento fotodinâmico foi comprovada por Shrestha, Hamblin e Kishen, em 2014, num estudo no qual observaram que a conjugação destas nanopartículas com o fotossensibilizador rosa bengala resultava numa redução da viabilidade de espécies bacterianas *E. faecalis* organizadas em biofilme. Os autores constataram ainda que após irradiação, se assistia a uma eliminação completa da sua estrutura. Quando comparada com a utilização apenas de rosa bengala, a sua combinação com as nanopartículas de quitosano apresentou maior *uptake* celular e melhor efeito antibacteriano, o que o que permite concluir que a aplicação destas partículas pode se apresentar como um contributo válido na desinfeção do sistema de canais radiculares.

Para além das melhorias que induzem na eficácia antimicrobiana, a conjugação de fotossensibilizadores com nanopartículas potencia também a sua estabilidade, tornando-os mais apropriados para a sua utilização nesta modalidade de tratamento (Akbarianrad et al., 2018). Contudo, é importante referir que a sua eficácia contra a microbiota endodôntica depende de fatores como a intensidade da luz aplicada, o tempo de exposição e a taxa de absorção por parte dos tecidos (Iqbal, 2012).

É possível compreender, com base na evidência científica disponível referente a esta temática que, a modificação das nanopartículas é uma área extensa e com inúmeras aplicações, das quais se destaca a sua conjugação com moléculas fotossensibilizadoras, que demonstram extrema relevância na terapia fotodinâmica, uma modalidade de tratamento inovadora que se apresenta como alternativa válida aos métodos tradicionais de desinfeção dos canais radiculares.

#### 1.8.2. Nanopartículas na estabilização dentinária

O desenvolvimento e aplicação da nanotecnologia à Medicina Dentária, e em específico à endodontia permite, à semelhança do que é verificado na desinfeção dos canais radiculares, encontrar diferentes abordagens para solucionar a instabilidade do tecido dentinário, que se mostra como uma consequência dos procedimentos endodônticos, e que pode resultar na fratura de dentes submetidos a este tratamento. Assim como os métodos anteriormente descritos, que possibilitam o estabelecimento de ligações cruzadas a nível do colagénio tipo I que constitui a fase orgânica da dentina, as nanopartículas podem desempenhar um papel importante na estabilização deste tecido e, deste modo, contribuir com melhorias nas suas propriedades físicas e mecânicas.

As nanopartículas poliméricas têm sido extensamente utilizadas para este propósito, assistindo-se às vantagens da sua incorporação entre as fibras da estrutura do colagénio que, por meio de interações intermoleculares entre unidades aniónicas e unidades catiónicas, possibilitam uma optimização do comportamento da dentina e da resistência à fratura deste tecido (Kishen et al., 2016). Uma das partículas mais empregues para tal é o quitosano. O seu particular interesse nesta área surge devido ao facto de, como já mencionado, possuir um elevado número de grupos reativos que permitem a interação não só com as moléculas de colagénio, como também com enzimas colagenolíticas

(colagenases), demonstrando uma atividade inibitória sobre estas, mediada pelo bloqueio dos seus locais de ligação. O facto destas nanopartículas apresentarem semelhanças com glicosaminoglicanos é também considerada uma vantagem uma vez que estes componentes, por si só, proporcionam estabilidade à matriz orgânica e conseqüentemente ao tecido dentinário.

A aplicação de sistemas nanoparticulados a este fenómeno pode também ser observada pela atividade demonstrada pela tiopronina, quando conjugada com nanopartículas de ouro. Este complexo demonstrou-se eficaz no estabelecimento de ligações cruzadas a nível das fibras de colagénio, comprovado pela redução da porosidade da estrutura (Castaneda, Valle, Yang, Pluskat & Slowinska, 2008).

A terapia fotodinâmica, à semelhança do que foi abordado relativamente à desinfeção dos canais radiculares, assume relevância nesta temática. A conjugação de nanopartículas e fotossensibilizadores, que contribui para a produção de espécies reativas de oxigénio, apresenta o potencial de induzir melhorias no comportamento da dentina e nas suas propriedades. Shrestha et al. (2014) propuseram avaliar o efeito de nanopartículas de quitosano combinadas com rosa bengala na estabilização deste tecido, equacionando que a sua ação sinérgica se apresenta válida para este fim. Os autores observaram que a fotoativação do conjugado quitosano-rosa bengala induz o fenómeno de ligação cruzada a nível do colagénio da matriz dentinária. A incorporação de nanopartículas na sua estrutura, comprovada com recurso a microscopia eletrónica de transmissão, contribui também para este aspeto devido à formação de complexos iónicos que resultam no aumento da estabilidade deste tecido. Deste modo, verifica-se a recuperação da sua integridade, com melhorias nas suas propriedades físicas e mecânicas.

Conclui-se que a aplicação da nanotecnologia, e em particular das nanopartículas, à matriz orgânica da dentina contribui com melhorias no comportamento deste tecido uma vez que asseguram a sua estabilização, reduzindo deste modo a probabilidade de fratura de dentes endodonticamente tratados.



### III. CONCLUSÃO

A Nanotecnologia assume-se como uma área bastante promissora com aplicação em diversas vertentes, das quais se destaca a Medicina e, mais especificamente, a Medicina Dentária.

A correlação entre esta área e a Endodontia, especialidade de Medicina Dentária, encontra forte evidência na literatura científica, sendo perceptível que da sua interseção, particularmente da aplicação de nanopartículas aos procedimentos endodônticos, resultam inúmeros benefícios que contribuem para a melhoria da taxa de sucesso destes tratamentos, conduzindo, conseqüentemente, a prognósticos mais favoráveis. Para o efeito, encontra-se demonstrada a pertinência da utilização de nanopartículas de quitosano, nanopartículas de prata, nanopartículas de óxido de zinco e nanopartículas de vidro bioativo na desinfecção do sistema de canais radiculares, quando aplicadas à fase de irrigação, de medicação intracanal ou de obturação. Como foi possível constatar, estas partículas contribuem para a eliminação de microrganismos persistentes cuja permanência nos canais é, em muitas vezes, responsável pelo fracasso das intervenções endodônticas. Por outro lado, e complementarmente, as nanopartículas podem demonstrar utilidade no solucionamento de conseqüências resultantes destes tratamentos, como é o caso da diminuição de estabilidade da dentina, responsável pela maior fragilidade atribuída aos dentes submetidos a estas terapias. A sua aplicação direcionada à matriz orgânica do tecido dentinário, mais especificamente ao colagénio tipo I que a constitui, assegura uma maior estabilidade deste tecido, resultando em *outcomes* mais positivos e taxas de insucesso mais reduzidas.

Em suma, parece lógico afirmar que a nanotecnologia se apresenta como o caminho para a evolução do desenvolvimento da Medicina Dentária do século XXI, comprovando-se com base na evidência científica disponível, que a sua aplicação à Endodontia contribui com crescentes benefícios nas temáticas abordadas neste trabalho.



**BIBLIOGRAFIA**

Abiodun-Solanke, I. M. F., Ajayi, D. M., & Arigbede, A. O. (2014). Nanotechnology and its application in dentistry. *Annals of medical and health sciences research*, 4(3), 171-177.

Afkhami, F., Pourhashemi, S. J., Sadegh, M., Salehi, Y., & Fard, M. J. K. (2015). Antibiofilm efficacy of silver nanoparticles as a vehicle for calcium hydroxide medicament against *Enterococcus faecalis*. *Journal of dentistry*, 43(12), 1573-1579.

Akbari, T., Pourhajibagher, M., Hosseini, F., Chiniforush, N., Gholibegloo, E., Khoobi, Shahabi, S. & Bahador, A. (2017). The effect of indocyanine green loaded on a novel nano-graphene oxide for high performance of photodynamic therapy against *Enterococcus faecalis*. *Photodiagnosis and photodynamic therapy*, 20, 148-153.

Akbadianrad, N., Mohammadian, F., Alhuyi Nazari, M., & Rahbani Nobar, B. (2018). Applications of nanotechnology in endodontic: A Review. *Nanomedicine Journal*, 5(3), 121–126.

Alexis, F., Pridgen, E., Molnar, L. K., & Farokhzad, O. C. (2008). Factors affecting the clearance and biodistribution of polymeric nanoparticles. *Molecular pharmaceutics*, 5(4), 505-515.

American Association of Endodontists. (2011). Endodontics: Colleagues for Excellence Root Canal Irrigants and Disinfectant. *American Association of Endodontists*, 1–7.

American Association of Endodontists. (2015). Glossary of Endodontic Terms 2016. *Glossary of Endodontic Terms*.

Azevedo, V. V. C., Chaves, S. A., Bezerra, D. C., Fook, M. V., Costa & A. C. F. M. (2010). Quitina e Quitosana: aplicações como biomateriais. *Quimica Nova*, 2.3(3), 27–34.

Ba-Hattab, R., Al-Jamie, M., Aldreib, H., Alessa, L., & Alonazi, M. (2016). Calcium Hydroxide in Endodontics: An Overview. *Open Journal of Stomatology*, *06*(12), 274–289.

Basudan, S. (2019). Sodium hypochlorite use, storage, and delivery methods: A Survey. 27–33.

Bedran-Russo, A. K. B., Pereira, P. N., Duarte, W. R., Drummond, J. L., & Yamauchi, M. (2007). Application of crosslinkers to dentin collagen enhances the ultimate tensile strength. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials*, *80*(1), 268-272.

Borzini, L., Condò, R., De Dominicis, P., Casaglia, A., & Cerroni, L. (2016). Root Canal Irrigation: Chemical Agents and Plant Extracts Against *Enterococcus faecalis*. *The Open Dentistry Journal*, *10*(1), 692–703.

Bosch-Aranda, M. L., Canalda-Sahli, C., Figueiredo, R., & Gay-Escoda, C. (2012). Complications following an accidental sodium hypochlorite extrusion: A report of two cases. *Journal of Clinical and Experimental Dentistry*, *4*(3), 194–198.

Bukhari, S., Kim, D., Liu, Y., Karabucak, B., & Koo, H. (2018). Novel endodontic disinfection approach using catalytic nanoparticles. *Journal of endodontics*, *44*(5), 806-812.

Caldorera-Moore M, Guimard N, Shi L, Roy K. Designer nanoparticles: Incorporating size, shape, and triggered release into nanoscale drug carriers. *Expert Opin. Drug Deliv.* 2010;7(4):479-495.

Campos Ibarra, P., De la Fuente Hernández, J., Tenorio Rocha, F., & Acosta Torres, L. (2018). Irrigantes y selladores-nanopartículas biocompatibles antimicrobianos para uso en Endodoncia. *Entreciencias: Diálogos En La Sociedad Del Conocimiento*, *1*(1), 7.

Cantín L, M., Vilos O, C., & Suazo G, I. (2010). Nanodontología: el Futuro de la Odontología Basada en Sistemas Nanotecnológicos. *International Journal of Odontostomatology*, 4(2), 127–132.

Castaneda, L., Valle, J., Yang, N., Pluskat, S., & Slowinska, K. (2008). Collagen cross-linking with Au nanoparticles. *Biomacromolecules*, 9(12), 3383-3388.

Chandrappa, M. M., Mundathodu, N., Srinivasan, R., Nasreen, F., Kavitha, P., & Shetty, A. (2014). Disinfection of gutta-percha cones using three reagents and their residual effects. *Journal of conservative dentistry: JCD*, 17(6), 571.

Cheron, R. A., Marshall, S. J., Goodis, H. E., & Peters, O. A. (2011). Nanomechanical properties of endodontically treated teeth. *Journal of endodontics*, 37(11), 1562-1565.

Colaco, A. (2018). Extreme resistance of *Enterococcus faecalis* and its role in endodontic treatment failure. *Progress in Medical Sciences*, 2(2), 9.

Comissão Europeia. (2011). Recomendação da Comissão de 18 de Outubro de 2011 sobre a definição de nanomaterial. JOUE. L275:38-40

Dalmia, S., Gaikwad, A., Samuel, R., Aher, G., Gulve, M., & Kolhe, S. (2018). Antimicrobial efficacy of different endodontic sealers against *Enterococcus faecalis*: An In vitro study. *Journal of International Society of Preventive & Community Dentistry*, 8(2), 104.

Del Carpio-Perochena, A., Kishen, A., Felitti, R., Bhagirath, A. Y., Medapati, M. R., Lai, C., & Cunha, R. S. (2017). Antibacterial Properties of Chitosan Nanoparticles and Propolis Associated with Calcium Hydroxide against Single- and Multispecies Biofilms: An In Vitro and In Situ Study. *Journal of Endodontics*, 43(8), 1332–1336.

Ealias, A. M., & Saravanakumar, M. P. (2017). A review on the classification, characterisation, synthesis of nanoparticles and their application. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, 263(3).

- El Abbasy, F. E. Z., Ibrahim, S., Shaker, O., & Ahmed, G. (2018). Intra-canal medication containing silver nanoparticle versus calcium hydroxide in reducing postoperative pain: A randomized clinical trial. *F1000Research*, 7(0), 1949.
- Ercan, E., Özekinci, T., Atakul, F., & Gül, K. (2004). Antibacterial activity of 2% chlorhexidine gluconate and 5.25% sodium hypochlorite in infected root canal: in vivo study. *Journal of endodontics*, 30(2), 84-87.
- George, S., Basrani, B., & Kishen, A. (2010). Possibilities of gutta-percha-centered infection in endodontically treated teeth: An in vitro study. *Journal of Endodontics*, 36(7), 1241–1244.
- González-Luna, P. I., Martínez-Castanon, G. A., Zavala-Alonso, N. V., Patiño-Marin, N., Niño-Martínez, N., Morán-Martínez, J., & Ramírez-González, J. H. (2016). Bactericide Effect of Silver Nanoparticles as a Final Irrigation Agent in Endodontics on *Enterococcus faecalis*: An Ex Vivo Study. *Journal of Nanomaterials*, 2016.
- Haapasalo, M., Shen, Y., Wang, Z., & Gao, Y. (2014). Irrigation in endodontics. *British Dental Journal*, 216(6), 299–303.
- Hall, J. B., & Mcneil, S. E. (2007). *Characterization of Nanoparticles for Therapeutics: Physicochemical Characterization*. 2, 789–803.
- Han, B., Jaurequi, J., Tang, B. W., & Nimni, M. E. (2003). Proanthocyanidin: a natural crosslinking reagent for stabilizing collagen matrices. *Journal of Biomedical Materials Research Part A: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials*, 65(1), 118-124.
- Ibrahim, A. I. O., Moodley, D. S., Petrik, L., & Patel, N. (2017). Use of antibacterial nanoparticles in Endodontics. *South African Dental Journal*, 72(3), 105-112.
- Iqbal, A. (2012). Antimicrobial irrigants in the endodontic therapy. *International journal of health sciences*, 6(2), 186.

Jadhav, R., Bhide, S., Prasad, B. L. V., Kunchiraman, B., Shimpi, J., & Nandhini, U. (2016). Silver nanoparticles: a new perspective in endodontic therapy. *IIOABJ*, 7(6), 77-81.

Jiang J, Oberdorster G, Biswas P. Characterization of size, surface charge, and agglomeration state of nanoparticle dispersions for toxicological studies. *J. Nanoparticle Res.* 2009;11(1):77-89.

Kandaswamy, E., Nagendrababu, V., & Deivanayagam, K. (2016). Antimicrobial effect of nanoparticles in endodontics. In *Nanobiomaterials in Dentistry* (pp. 161-186). William Andrew Publishing.

Khurshid, Z., Zafar, M., Qasim, S., Shahab, S., Naseem, M. & AbuReqaiba, A. 2015. Advances in nanotechnology for restorative dentistry. *Materials*. 8, 717-731.

Kishen, A. (2006). Mechanisms and risk factors for fracture predilection in endodontically treated teeth. *Endodontic Topics*, 13(1), 57–83.

Kishen, A., Shi, Z., Shrestha, A., & Neoh, K. G. (2008). An investigation on the antibacterial and antibiofilm efficacy of cationic nanoparticulates for root canal disinfection. *Journal of endodontics*, 34(12), 1515-1520.

Kishen, A. (2015). *Nanotechnology in Endodontics*. Suiça: Springer.

Kishen, A., Shrestha, S., Shrestha, A., Cheng, C., & Goh, C. (2016). Characterizing the collagen stabilizing effect of crosslinked chitosan nanoparticles against collagenase degradation. *Dental Materials*, 32(8), 968–977.

Lattoo, S., Shah, A. A., Ahmad, I., Qadir, S., Bhagat, R. K., & Lone, K. A. (2011). Endodontic Microbiology: Review of literature. *International Journal of Clinical Cases and Investigations*, 2(6), 24–36.

Lee, Y. (2013). Effect of calcium hydroxide application time on dentin. *Restorative dentistry & endodontics*, 38(3), 186.

- Lotfi, M., Vosoughhosseini, S., Ranjkesh, B., Khani, S., Saghiri, M., & Zand, V. (2011). Antimicrobial efficacy of nanosilver, sodium hypochlorite and chlorhexidine gluconate against *Enterococcus faecalis*. *African Journal of Biotechnology*, *10*(35), 6799–6803.
- Louro, H., Borges, T., & Silva, M. J. (2013). Manufactured nanomaterials: New challenges for public health. *Revista Portuguesa de Saude Publica*, *31*(2), 145–157.
- Mantri, S. S., & Mantri, S. P. (2013). The nano era in dentistry. *Journal of natural science, biology, and medicine*, *4*(1), 39.
- Mareending, M., Paqué, F., Fischer, J., & Zehnder, M. (2007). Impact of Irrigant Sequence on Mechanical Properties of Human Root Dentin. *Journal of Endodontics*, *33*(11), 1325–1328.
- Migliau, G., Pepla, E., Besharat, L. K., & Gallottini, L. (2014). Resolution of endodontic issues linked to complex anatomy. *Annali di stomatologia*, *5*(1), 34.
- Mishra, P., & Tyagi, S. (2018). Surface analysis of gutta percha after disinfecting with sodium hypochlorite and silver nanoparticles by atomic force microscopy: An in vitro study. *Dental research journal*, *15*(4), 242.
- Mohammad, Z., Soltani, M. K., & Shalav, S. (2014). An update on the management of endodontic biofilms using root canal irrigants and medicaments. *Iranian Endodontic Journal*, *9*(2), 89–97.
- Mohammadi, Z., Jafarzadeh, H., & Shalavi, S. (2014). Antimicrobial efficacy of chlorhexidine as a root canal irrigant: a literature review. *Journal of Oral Science*, *56*(2), 99-103.
- Mohammadi, Z., Shalavi, S., & Yazdizadeh, M. (2012). Antimicrobial activity of calcium hydroxide in endodontics: a review. *Chonnam medical journal*, *48*(3), 133-140.
- Nair, N., James, B., Devadathan, A., Johny, M. K., Mathew, J., & Jacob, J. (2018). Comparative evaluation of antibiofilm efficacy of chitosan nanoparticle-and zinc oxide nanoparticle-incorporated calcium hydroxide-based sealer: An In vitro study. *Contemporary clinical dentistry*, *9*(3), 434.

Nair, P. N. R., Henry, S., Cano, V., & Vera, J. (2005). Microbial status of apical root canal system of human mandibular first molars with primary apical periodontitis after “one-visit” endodontic treatment. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology*, 99(2), 231–252.

Narayanan, L. L., & Vaishnavi, C. (2010). Endodontic microbiology. *Journal of conservative dentistry: JCD*, 13(4), 233.

Ng, R., Singh, F., Papamanou, D. A., Song, X., Patel, C., Holewa, C., Patel, N., Klepac-Ceraj, V., Fontana, C. R., Kent, R., Pagonis, T. C., Stashenko, P. P. & Soukos, N. S. (2011). Endodontic photodynamic therapy ex vivo. *Journal of endodontics*, 37(2), 217-222.

Orhan, E. O., Irmak, Ö., Hür, D., Yaman, B. C., & Karabucak, B. (2016). Does para-chloroaniline really form after mixing sodium hypochlorite and chlorhexidine?. *Journal of endodontics*, 42(3), 455-459.

Padovani, G.C., Feitosa, V.P., Sauro, S., Tay, F.R., Durán, G., Paula, A.J. & Durán, N. (2015). Advances in dental materials through nanotechnology: facts, perspectives and toxicological aspects. *Trends in Biotechnology*. 33(11), 621-636. doi:

Pagonis, T. C., Chen, J., Fontana, C. R., Devalapally, H., Ruggiero, K., Song, X., Foschi, F., Dunham, J., Skobe, Z., Yamazaki, H., Kent, R., Tanner, A. C. R., Amiji, M. M. & Soukos, N. S. (2011). Nanoparticle-based Endodontic Antimicrobial Photodynamic Therapy. 36(2), 1–16.

Pitkethly, M. J. (2004). Nanomaterials - The driving force. *Materials Today*, 7(12 SUPPL.), 20–29.

Plotino, G., Grande, N. M. & Mercade, M. (2019). Photodynamic therapy in endodontics. *International Endodontic Journal*, 18(52), 760–775.

Pourhajbagher, M., & Bahador, A. (2018). An in vivo evaluation of microbial diversity before and after the photo-activated disinfection in primary endodontic infections:

Traditional phenotypic and molecular approaches. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 22(February), 19–25.

Prażmo, E., Mielczarek, A., Kwaśny, M., & Łapiński, M. (2016). Photodynamic Therapy As a Promising Method Used in the Treatment of Oral Diseases. *Advances in Clinical and Experimental Medicine*, 25(4), 799–807.

Profeta, A. C., & Prucher, G. M. (2017). Bioactive-glass in endodontic therapy and associated microsurgery. *The open dentistry journal*, 11, 164.

Rao, A., Tummala, M., Elkanti, S., & Mikkilineni, M. (2013). Nanodentistry: New buzz in dentistry. *European Journal of General Dentistry*, 2(2), 109.

Rees, P. (2013). Uptake and toxicology of nanoparticles. In *Frontiers of Nanoscience* (1st ed., Vol. 5).

Samiei, M., Aghazadeh, M., Lotfi, M., Shakoei, S., Aghazadeh, Z., & Vahid Pakdel, S. M. (2013). Antimicrobial efficacy of mineral trioxide aggregate with and without silver nanoparticles. *Iranian Endodontic Journal*, 8(4), 166–170.

Satalkar, P., Elger, B. S., & Shaw, D. M. (2016). Defining Nano, Nanotechnology and Nanomedicine: Why Should It Matter? *Science and Engineering Ethics*, 22(5), 1255–1276.

Scheffel, D. L., Hebling, J., Scheffel, R. H., Agee, K. A., Cadenaro, M., Turco, G., Breschi, L., Mazzoni, A., Costa, C. A. S. & Pashley, D. H. (2014). Stabilization of dentin matrix after cross-linking treatments, in vitro. *Dental Materials*, 30(2), 227-233.

Sharan, J., Singh, S., Lale, S. V., Mishra, M., Koul, V., & Kharbanda, O. P. (2017). Applications of nanomaterials in dental science: A review. *Journal of nanoscience and nanotechnology*, 17(4), 2235-2255.

Shashirekha, G., Jena, A., & Mohapatra, S. (2017). Nanotechnology in Dentistry: Clinical Applications, Benefits, and Hazards. *Compendium of continuing education in dentistry (Jamesburg, NJ: 1995)*, 38(5), e1-e4.

Shrestha, A., & Kishen, A. (2014). Antibiofilm efficacy of photosensitizer-functionalized bioactive nanoparticles on multispecies biofilm. *Journal of Endodontics*, 40(10), 1604–1610.

Shrestha, A., & Kishen, A. (2016). Antibacterial Nanoparticles in Endodontics: A Review. *Journal of Endodontics*, 42(10), 1417–1426.

Shrestha, A., Hamblin, M. R., & Kishen, A. (2014). Photoactivated rose bengal functionalized chitosan nanoparticles produce antibacterial/biofilm activity and stabilize dentin-collagen. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 10(3), 491-501.

Shrestha, A., Zhilong, S., Gee, N. K., & Kishen, A. (2010). Nanoparticulates for antibiofilm treatment and effect of aging on its antibacterial activity. *Journal of Endodontics*, 36(6), 1030–1035.

Sim, T. P. C., Knowles, J. C., Ng, Y. L., Shelton, J., & Gulabivala, K. (2001). Effect of sodium hypochlorite on mechanical properties of dentine and tooth surface strain. *International Endodontic Journal*, 34(2), 120-132.

Subedi, S. K. (2015). An introduction to nanotechnology and its implications. *Himalayan Physics*, 5, 78–81.

Subhashini, M. H. R., & Raj, J. D. (2018). *Nanoparticle disinfection of root canals*. 10(4), 3623–3629.

Suesca, E., Dias, A. M. A., Braga, M. E. M., de Sousa, H. C., & Fontanilla, M. R. (2017). Multifactor analysis on the effect of collagen concentration, cross-linking and fiber/pore orientation on chemical, microstructural, mechanical and biological properties of collagen type I scaffolds. *Materials Science and Engineering C*, 77, 333–341.

Tang, W., Wu, Y., & Smales, R. J. (2010). Identifying and Reducing Risks for Potential Fractures in Endodontically Treated Teeth. *Journal of Endodontics*, 36(4), 609–617.

Tawil, P. Z., Duggan, D. J., & Galicia, J. C. (2015). Mineral trioxide aggregate (MTA): its history, composition, and clinical applications. *Compendium of continuing education in dentistry (Jamesburg, NJ: 1995)*, 36(4), 247-52.

Telles, I. S. F., do Prado, M., & Simão, R. A. (2017). Nanopartículas e aplicações endodônticas: uma revisão da literatura. *Revista Brasileira de Odontologia*, 74(2), 167.

Vashi, A. V., Werkmeister, J. A., Vuocolo, T., Elvin, C. M., & Ramshaw, J. A. (2012). Stabilization of collagen tissues by photocrosslinking. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 100(9), 2239-2243.

Ventola, C. L. (2012). The nanomedicine revolution: part 1: emerging concepts. *P & T: A Peer-Reviewed Journal for Formulary Management*, 37(9), 512–525.

Verma, S., Chevvuri, R., & Sharma, H. (2018). Nanotechnology in dentistry: Unleashing the hidden gems. *Journal of Indian Society of Periodontology*, 22(3), 196.

Waltimo, T., Brunner, T. J., Vollenweider, M., Stark, W. J., & Zehnder, M. (2007). Antimicrobial effect of nanometric bioactive glass 45S5. *Journal of Dental Research*, 86(8), 754–757. <https://doi.org/10.1177/154405910708600813>

White, J. D., Lacefield, W. R., Chavers, L. S., & Eleazer, P. D. (2002). The effect of three commonly used endodontic materials on the strength and hardness of root dentin. *Journal of endodontics*, 28(12), 828-830.

Wu, D., Fan, W., Kishen, A., Gutmann, J. L., & Fan, B. (2014). Evaluation of the antibacterial efficacy of silver nanoparticles against *Enterococcus faecalis* biofilm. *Journal of endodontics*, 40(2), 285-290.

Yadav, P., Chaudhary, S., Saxena, R. K., Talwar, S., & Yadav, S. (2017). Evaluation of Antimicrobial and Antifungal efficacy of Chitosan as endodontic irrigant against *Enterococcus Faecalis* and *Candida Albicans* Biofilm formed on tooth substrate. *Journal of Clinical and Experimental Dentistry*, 9(3), e361–e367.

Qing, Y., Cheng, L., Li, R., Liu, G., Zhang, Y., Tang, X., Wang, J., Liu, H. & Qin, Y. (2018). Potential antibacterial mechanism of silver nanoparticles and the optimization of orthopedic implants by advanced modification technologies. *International Journal of Nanomedicine*, 13, 3311.

Zehnder, M. (2006). Root canal irrigants. *Journal of endodontics*, 32(5), 389-398.

Zehnder, M., Luder, H. U., Schätzle, M., Kerosuo, E., & Waltimo, T. (2006). A comparative study on the disinfection potentials of bioactive glass S53P4 and calcium hydroxide in contra-lateral human premolars ex vivo. *International endodontic journal*, 39(12), 952-958.