

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo deste trabalho será disponibilizado somente a partir de 12/05/2019.



UNESP - Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Odontologia de Araraquara



NATALI LISETTE HARO CHÁVEZ

**Efeito citotóxico de microcristais de Tungstato de prata e de
Molibdato de prata em fibroblastos gengivais humanos cultivados
em monocamada e em equivalente dermal**

Araraquara

2017



UNESP - Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Odontologia de Araraquara



NATALI LISETTE HARO CHÁVEZ

**Efeito citotóxico de microcristais de Tungstato de prata e de
Molibdato de prata em fibroblastos gengivais humanos cultivados
em monocamada e em equivalente dermal**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Reabilitação Oral - Área de Materiais Odontológicos e Prótese, da Faculdade de Odontologia de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista - Unesp, para obtenção do título de Mestre em Reabilitação Oral.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Eduardo Vergani
Co-orientadora: Dra. Erica Dorigatti de Avila

Araraquara

2017

Haro Chávez, Natali Lisette

Efeito citotóxico de microcristais de Tungstato de prata e de Molibdato de prata em fibroblastos gengivais humanos cultivados em monocamada e em equivalente dermal / Natali Lisette Haro Chávez.-- Araraquara: [s.n.], 2017.

71 f.; 30 cm.

Dissertação (Mestrado em Prótese) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia

Orientador: Prof. Dr. Carlos Eduardo Vergani

Co-orientadora: Profa. Dra. Erica Dorigatti De Avila

1. Nanopartículas 2. Fibroblastos. 3. Toxicidade I. Título

Ficha catalográfica elaborada pela Bibliotecária Marley C. Chiusoli Montagnoli, CRB-8/5646

Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação da Faculdade de Odontologia de Araraquara / UNESP

NATALI LISETTE HARO CHÁVEZ

Efeito citotóxico de microcristais de Tungstato de prata e de Molibdato de prata em fibroblastos gengivais humanos cultivados em monocamada e em equivalente dermal

Dissertação para obtenção do grau de Mestre.

Comissão julgadora

Presidente e orientador: Prof. Dr. CARLOS EDUARDO VERGANI

Pesquisador III, do Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese, Faculdade de Odontologia de Araraquara, UNESP.

2º Examinador: Prof. Dr. CÁSSIO DO NASCIMENTO

Pesquisador III, do Departamento de Materiais Dentários e Prótese, Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, USP.

3º Examinador: Profa. Dra. ANA CLAUDIA PAVARINA

Pesquisador III, do Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese, Faculdade de Odontologia de Araraquara, UNESP.

Araraquara, 12 de maio de 2017.

DADOS CURRICULARES

NATALI LISETTE HARO CHÁVEZ

NASCIMENTO: 27/06/1990 – Lima – Perú

FILIAÇÃO: Nilda Isabel Chávez Medina (Mãe)

Armando Rigoberto Haro Chávez (Pai)

2015/2017 Curso de Pós-Graduação em Reabilitação Oral, nível Mestrado
Universidade Estadual Paulista, Araraquara- Brasil

2007/2012 Curso de Graduação em Odontologia
Universidad de San Martín de Porres, Lima- Perú

AGRADECIMENTOS

Diante da conquista alcançada, agradeço infinitamente a Deus que esteve comigo não somente nestes anos de preparação acadêmica, mas também durante toda minha vida. Pela força e vontade que produz em mim para continuar cada dia e por me ajudar a concluir mais uma etapa importante da minha carreira. Não é por acaso que eu cheguei até aqui, mas sim por benção por parte dele.

Aos meus queridos pais, Armando e Nilda, pelo amor e confiança depositado em mim, por todos os cuidados e conselhos, pela educação, apoio e incentivo ao longo de todos esses anos na minha vida. Pelos momentos de alegria e também de tristeza, eu não senti vocês longe, pois vocês sempre estiveram me acompanhando. Dedico meus sucessos a vocês. Vocês fizeram de mim a pessoa capaz de tomar decisões e prosseguir seus sonhos no meio das circunstâncias e eu só tenho gratidão no meu coração.

Ao meu namorado Adrian R., pelo amor e compreensão, seu apoio, carinho, paciência, e preocupação que teve comigo foi sempre muito importante e gratificante.

A toda minha família Haro - Chávez, e aos que mais perto de mim estão (tios Emilio e Flor, Papá Emilio e família), por acreditar em mim, meu sucesso é de todos vocês.

Ao meu prezado orientador, Prof. Dr. Carlos Eduardo Vergani, por esta grande oportunidade e confiança depositada em mim, pelas orientações, sugestões e ajuda ao longo deste trabalho.

A minha co-orientadora, Dra. Erica Dorigatti de Avila, pela oportunidade de trabalhar juntas, estou muito grata por toda a paciência que teve comigo e certamente aprendi muito na sua companhia. É gratificante ter a doutora na minha vida acadêmica.

Aos meus prezados amigos no Brasil (Midian, Cristiane, Uxua, Danny, Julia L e Juventina L) vocês me brindaram sua amizade e carinho, tornando minha estadia em Araraquara muito agradável e especial. Agradeço de coração pela sua companhia e carinho.

Ao programa de Pós-Graduação em Reabilitação Oral, FOAr-UNESP, em especial à Profa. Dra. Ana Claudia Pavarina.

À equipe do laboratório de cultura celular, FOAr-UNESP: Profa. Dra. Janaina Habib Jorge, que gentilmente abriu as portas do seu laboratório para que eu pudesse realizar parte deste trabalho. À Dra. Paula Barbugli pelas orientações e sugestões ao longo da minha pesquisa, assim também a Kássia, Camila, Andressa e Bruna pela gentileza e ajuda compartilhada oportunamente.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo auxílio financeiro na modalidade bolsa de estudo (CNPq Processo 163196/2015-0) e ao Centro de Desenvolvimento de Materiais Funcionais (CDMF) no auxílio à pesquisa (FAPESP CEPID Processo 13/07296-2).

Haro Chávez NL. Efeito citotóxico de microcristais de Tungstato de prata e de Molibdato de prata em fibroblastos gengivais humanos cultivados em monocamada e em equivalente dermal [Dissertação de Mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2017.

RESUMO

A associação da prata a outros compostos vem sendo estudada em uma tentativa de acentuar as propriedades antimicrobianas e reduzir a citotoxicidade deste metal quando em altas concentrações. O presente estudo investigou o efeito dos microcristais: tungstato de prata ($\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$) e molibdato de prata ($\beta\text{-Ag}_2\text{MoO}_4$), no comportamento das células gengivais em monocamada e em modelo de matriz de colágeno, simulando a reparação tecidual. Para isto, fibroblastos gengivais (FGH) foram cultivados e utilizados somente entre as passagens 3 e 8 para formação de monocamada e para a confecção do equivalente dermal em matriz de colágeno em três dimensões (3D). Ambos microcristais foram utilizados na concentração fungicida mínima (CFM) capaz de matar o fungo *Candida albicans* (*C. albicans*) e foram definidas como C2: 7,81 $\mu\text{g/mL}$ para tungstato de prata e 15,62 $\mu\text{g/mL}$ para molibdato de prata. A partir destes valores, concentrações 10 vezes concentradas (C3) e 10 vezes diluídas (C1) foram preparadas para melhor compreender a margem de efeito dos componentes sobre as células estudadas. Células incubadas com meio de cultura na ausência de microcristais foram utilizadas como controle negativo (C-) e células incubadas com tampão de lise (TL) como controle positivo, representando 100% de morte celular. O efeito dos microcristais na morfologia, viabilidade e proliferação das células foram inicialmente avaliados e direcionaram os experimentos sequenciais. A geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) e a análise da integridade do DNA foram experimentos mandatórios para se conhecer o real impacto dos microcristais quando em células humanas. Os resultados quantitativos e qualitativos mostraram que $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$ não afetou a atividade enzimática mitocondrial das células FGH cultivadas em monocamada e em matriz de colágeno, em contraste com $\beta\text{-Ag}_2\text{MoO}_4$. Embora, o $\beta\text{-Ag}_2\text{MoO}_4$ não tenha interferido na proliferação celular, este composto afetou diretamente a viabilidade dos fibroblastos durante a confecção do gel em 3D. Experimentos posteriores realizados com $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$ provaram que estes microcristais na concentração de C2 não danificaram o DNA. O desenvolvimento de novos materiais tem sido sempre atraente para os pesquisadores, principalmente pela possibilidade de ser utilizado para tratamento de doenças, bem como evitar a prescrição indiscriminada de antibióticos. Nossos resultados fornecem informações relevantes no que diz respeito as propriedades não citotóxicas do $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$ para células gengivais humanas, durante um período de tempo adequado para estimar-se o potencial de perigo.

Palavras-chave: Nanopartículas. Fibroblastos. Toxicidade.

Haro Chávez NL. Cytotoxic effect of silver Tungstate and silver Molybdate microcrystals on human gingival fibroblasts in monolayer and equivalent dermal. [Dissertação de Mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2017.

ABSTRACT

Growing interest has been reported in combining silver with other metals to improve the antimicrobial properties, reduce silver concentration and consequently its toxicity. Herein, this study investigated the effect of microcrystals silver tungstate (α - Ag_2WO_4) and silver molybdate (β - Ag_2MoO_4) on the gingival cells and three-dimensional (3D) collagen matrices behavior. For all experiments, human gingival fibroblasts cells (HGF) were used between the 3rd and 8th passage. To carry out the experiments, lowest concentrations of α - Ag_2WO_4 and β - Ag_2MoO_4 that prevents visible growth of *Candida albicans* (*C. albicans*) planktonic cells were defined as our test concentration (C2): 7,81 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for silver tungstate and 15,62 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for silver molybdate. Solutions prepared from initial MFC concentration, ten-folds diluted (C1) and ten-folds concentrated (C3), improved the knowledge about the concentration ranging effect against human cells. Complete medium (C-) was used as a negative control and lysis buffer (LB) served as positive control (C+), equating to 100% cell death. The effect of the microcrystals concentration on cell morphology, viability and proliferation of HGF cells led following experiments. Reactive oxygen species (ROS) generation and DNA integrity analyzes were mandatories to know the real impact of the microcrystals on human cells. The quantitative and qualitative results showed that α - Ag_2WO_4 did not affect mitochondrial enzymatic activity of HGF cells cultured in monolayer and within collagen matrices, in contrast to β - Ag_2MoO_4 . Although, β - Ag_2MoO_4 did not affect cells proliferation, this compound interfered directly in cell viability during 3D gel confection. Hence, subsequent analyzes performed with α - Ag_2WO_4 proved that this microcrystals in C2 concentration did not injury the genomic DNA. The new materials development has always been attractive to researchers, mainly by the possibility of treating diseases as well as avoiding the indiscriminate antibiotic prescription. Our findings afford strong information about the effect of α - Ag_2WO_4 on cells behavior, disclosing non-cytotoxic properties against human gingival cells, during a time period adequate to measure the hazard potential.

Keywords: Nanoparticles. Fibroblasts. Toxicity.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Fluxograma da sequência experimental e metodológica utilizada durante a pesquisa. Sumariza de forma didática os tipos de experimentos desenvolvidos ao longo da pesquisa. Fonte: Elaboração própria.

Figura 2 - Difração de raios X dos microcristais (a) α -Ag₂WO₄ e (b) β -Ag₂MoO₄*. (*) As linhas vermelhas indicam a intensidade relativa das estruturas cristalinas inorgânicas correspondente ao ICSD de cada material. Fonte: Fabbro et al.³⁹, 2016.

Figura 3 - Morfologia obtidas por meio de imagens FE-MEV dos microcristais (a) α -Ag₂WO₄ e (b) β -Ag₂MoO₄. Fonte: Fabbro et al.³⁹, 2016.

Figura 4 - Espectros identificando as substâncias encontradas nos microcristais (a) α -Ag₂WO₄ e (b) β -Ag₂MoO₄. Fonte: Fabbro et al.³⁹, 2016.

Figura 5 - Dados de proliferação celular em monocamada para os microcristais (a) α -Ag₂WO₄ e (b) β -Ag₂MoO₄. A análise de variância (ANOVA) foi empregada com o teste post hoc Tukey utilizando Graph-Pad Prism versão 5.0 c. Os dados são apresentados como a média \pm DP (n = 15), *p <0,05 foi considerado estatisticamente significativo. DP: Desvio padrão. (*) Houve diferença significativa entre os grupos Controle negativo (DMEM), C1, C2 com os grupos C3 e controle positivo (TL) nas primeiras 24h. Fonte: Elaboração própria.

Figura 6A - Registro microscópico em campo claro de células em monocamada para α -Ag₂WO₄. Comparação da morfologia das células fibroblastos em monocamadas, após 24 h em contato com o α -Ag₂WO₄, nas concentrações C1 e C2 com os grupos controle negativo (DMEM). As imagens foram adquiridas em aumentos de 10x e 20x vezes. Fonte: Elaboração própria.

Figura 6B - Registro microscópico em campo claro de células em monocamada para α -Ag₂WO₄. Comparação da morfologia das células fibroblastos em monocamadas, após 24 h em contato com o α -Ag₂WO₄, na concentração C3 com o

grupo controle positivo (TL). As imagens foram adquiridas em aumentos de 10x e 20x. Fonte: Elaboração própria.

Figura 7A - Registro microscópico em campo claro de células em monocamada para $\beta\text{-Ag}_2\text{MoO}_4$. Comparação da morfologia das células fibroblastos em monocamadas, após 24 h em contato com o $\beta\text{-Ag}_2\text{MoO}_4$, na concentração C3 com o grupo controle positivo (TL). As imagens apresentam aumentos de 10x e 20x. Fonte: Elaboração própria.

Figura 7B - Registro microscópico em campo claro de células em monocamada para $\beta\text{-Ag}_2\text{MoO}_4$. Comparação da morfologia das células fibroblastos em monocamadas, após 24 h em contato com o $\beta\text{-Ag}_2\text{MoO}_4$, na concentração C3 com o grupo controle positivo (TL). As imagens foram adquiridas em aumentos de 10x e 20x. Fonte: Elaboração própria.

Figura 8 - Dados de diâmetro de contração do equivalente dermal (a) e viabilidade celular após 96 h mediante o ensaio MTT (b) para $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$. As análises estatísticas foram realizadas por meio do GraphPad Prism versão 5.0 c. Os dados estão apresentados como média \pm DP (n=6). **(a)** Teste de Kruskal-Wallis para dados não paramétricos foi utilizado com teste Dunn de comparações múltiplas. (*) Nota-se uma ausência de contração nos grupos C3 e TL quando comparado com os grupos controle negativo DMEM, C1 e C2. **(b)** análise de variância (ANOVA), complementada com o teste de Tukey. * $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo. Fonte: Elaboração própria.

Figura 9A - Análise microscópica em equivalente dermal para $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$. As imagens em campo claro mostram não haver alterações morfológicas nas concentrações C1 e C2 em comparação com o controle negativo (DMEM). Por outro lado, a concentração C3 demonstra lise da membrana plasmática com focos de células mortas. As imagens foram adquiridas em aumento de 10x. Fonte: Elaboração própria.

Figura 9B - Análise microscópica em equivalente dermal para $\beta\text{-Ag}_2\text{MoO}_4$. As imagens em campo claro mostram não haver alterações morfológicas na concentração C1 em comparação com o controle negativo (DMEM). Por outro lado, as concentrações C2 e C3 demonstram lise da membrana plasmática com focos de células mortas. As imagens foram adquiridas em aumento de 10x. Fonte: Elaboração própria.

Figura 10 - Efeito do $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$ nas células FGH no interior do equivalente dermal após 24 h e 96 h de incubação. Fonte: Elaboração própria.

Figura 11 - Análise morfológica das células FGH em monocamada após 24 horas de incubação com $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$. (A) Imagem mostra a morfologia celular conservada para o grupo C1 em comparação com o controle negativo (DMEM). (B) Imagem mostra a morfologia celular conservada para o grupo C2 ao contrário do grupo C3, o qual apresenta restos celulares com pequenas partículas presumivelmente dos microcristais. As imagens foram adquiridas em 70x e 100x. (C) Imagens em maior aumento, 250x e 700x, foram registradas para os grupos controle e C3 a fim de destacar as alterações morfológicas encontradas. Fonte: Elaboração própria.

Figura 12 - Produção de espécies reativas do tipo inespecífico, em diferentes tempos. A diferença estatística na liberação de radicais livres pelas células expostas ao microcristal $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$ na concentração C3 em relação aos demais grupos foi mensurada de acordo com a análise de variância “one way” (ANOVA), complementada pelo teste post hoc de Tukey, utilizando GraphPad Prism versão 5.0c. Os dados estão apresentados como a média \pm DP (n = 8). *p <0,05 foi considerado estatisticamente significativo. Fonte: Elaboração própria.

Figura 13 - Análise microscópica de fluorescência para células em monocamada. A intensidade da fluorescência indica similaridade na produção de espécies reativas entre o grupo controle negativo, C1 e C2. As imagens foram registradas nos primeiros 10 min após contato com os microcristais. Fonte: Elaboração própria.

Figura 14 - Eletroforese em gel de agarose para separação dos fragmentos do DNA. Os grupos controle negativo (C-) e os grupos concentração C2 apresentaram apenas uma banda, confirmando que o α -Ag₂WO₄ na concentração C2 não comprometeu a integridade do DNA. Os grupos controle positivo que foi a concentração C3, demonstra a presença de diferentes bandas, indicando a fragmentação da molécula analisada. As imagens são representativas de experimentos realizados em duplicata e em duas ocasiões distintas. Fonte: Elaboração própria.

QUADROS

Quadro 1 Grupos experimentais e concentrações de microcristais. Foram estabelecidos seis grupos experimentais de acordo com a CFM de ambos microcristais obtida para a *C. albicans*. A concentração de interesse, referente a CFM foi denominada de C2, e a partir desta, concentrações 10 vezes diluídas (C1) e 10 vezes concentrada (C3) foram preparadas para melhor compreensão do efeito dos microcristais sobre as células estudadas. Fonte: Elaboração própria. Fabbro et al.³⁹, 2016 (CFM para *C. albicans*).

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

***p** - Valor de probabilidade

µg/mL – Microgramas por Mililitro

µL – Microlitros

AgNPs – Nanopartículas de prata

C. albicans – *Candida albicans*

CFM - Concentração Fungicida Mínima

DMEM – Dulbecco´s Modified Eagle´s Médium Low

DP - Desvio padrão.

FGH – Fibroblastos gengivais humanos

h – horas

ICSD - Inorganic Crystal Structure Database

IU/mL – Unidade Internacional por Mililitro

KPO₄ – fosfato de potássio

kV – *kilovol* (Quilovolt ou Quilovóltio)

MEV – Microscopia Eletrônica de Varredura

mg/L - Miligramas por Litro

mg/mL- Miligramas por Mililitro

mL – Mililitros

mm – Milímetros

mM - Milimolar

mmol - Milimol

MRSA - *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* (*Staphylococcus aureus* resistente à metilina)

MTT - *Methyl thiazolyl tetrazolium* (metil tiazol tetrazolio)

NaCl – Cloreto de Sódio

NaOH – Hidróxido de sódio

ng - Nanograma

nm – Nanômetro

PBS - *Phosphate buffered saline* (tampão fosfato salino)

ROS – *Reactive oxygen species* (Espécies reativas de oxigênio)

SFB – Soro Fetal Bovino

TL - Tampão de lise.

V - volt ou vóltio

α -Ag₂WO₄ – Tungstato de prata

β -Ag₂MoO₄ – Molibdato de prata

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 REVISÃO DE LITERATURA	20
2.1 Estomatite Protética e <i>Candida albicans</i>	20
2.2 Nanopartículas de Prata	21
2.3 Análise Celular e o Modelo Equivalente Dermal	22
3 PROPOSIÇÃO	24
4 MATERIAIS E MÉTODOS	25
4.1 Preparo e Caracterização dos Microcristais	25
4.2 Células e Condições de Crescimento	26
4.3 Grupos Amostrais	27
4.4 Concentração de Prata nos Microcristais	27
4.5 Métodos de Análises	28
4.6 Análise Estatística	33
5 RESULTADOS	34
5.1 Caracterização dos Microcristais e Concentração de Prata	34
5.2 Efeito dos Microcristais na Proliferação e Morfologia Celular	36
5.3 Efeito dos Microcristais no Reparo Tecidual	42
5.4 Efeito do α-Ag₂WO₄ na Morfologia Celular	48
5.5 Efeito do α-Ag₂WO₄ na Produção de Espécies Reativas de Oxigênio	51
5.6 Efeito do α-Ag₂WO₄ na Integridade do DNA	53
6 DISCUSSÃO	55
7 CONCLUSÃO	60
REFERÊNCIAS	61

1 INTRODUÇÃO

A cavidade bucal é considerada um ambiente único, apresentando diferentes habitats e condições ecológicas para a colonização e crescimento de bactérias, fungos e vírus (Avila et al.⁸, 2009; Wright et al.¹³², 2013; Krom et al.⁶⁷, 2014). As infecções orais são ocasionadas por um desequilíbrio na microflora, influenciada por fatores locais (fluxo salivar, pH, temperatura e higiene oral) (Filoche et al.⁴⁰, 2010), sistêmicos e/ou ambientais como a diminuição do mecanismo de defesa no indivíduo, deficiência nutricional, hábitos nocivos e uso de medicamentos (Holmstrup et al.⁵², 2003; Muzyka, Epifanio⁸⁵, 2013). Este desequilíbrio na cavidade oral permite a formação de biofilmes, o que torna a comunidade microbiana ainda mais resistente a agentes externos (Tuson, Weibel¹²³, 2013). O biofilme é definido como uma estrutura composta por uma diversidade de micro-organismos, embebidas em matriz polimérica extracelular (Hall-Stoodley et al.⁴⁶, 2009; Kolenbrander et al.⁶⁵, 2010). A complexidade desta estrutura dificulta a penetração de agentes antimicrobianos e facilita a progressão de doenças (Hojo et al.⁵¹, 2009; Huang et al.⁵⁵, 2011). Desta forma, somente o controle dos fatores de risco para infecções não se mostra suficiente, sendo necessária a realização de procedimentos para remoção mecânica de tais estruturas associadas a terapias antimicrobianas de acordo com a patologia. Dentre as possibilidades de controle e/ou tratamento de doenças orais, a prescrição de antibióticos e antifúngicos vem sendo conduzida de forma indiscriminada, na odontologia para situações tais quais: tratamento de pacientes portadores de doença periodontal em estágio avançado, pacientes portadores de doença peri-implantar (Rams et al.⁹⁸, 2014) e para tratamento de estomatite protética (Chandra et al.²⁷, 2001). Em relação a esta última, *Candida albicans* se destaca como o agente etiológico responsável pelo início e progressão da doença.

A estomatite protética afeta principalmente pacientes portadores de próteses removíveis, mostrando uma prevalência na faixa de 15% a mais de 70%, e apresentando-se com maior incidência em pacientes idosos e mulheres (Gendreau, Loewy⁴², 2011). O tratamento de rotina para este tipo de patologia envolve a utilização de antimicrobianos associada a manutenção da higiene bucal e adaptação/desinfecção das próteses (Webb et al.¹²⁷, 1998). A interrupção da terapia

ou falha na ação dos agentes químicos utilizados podem favorecer o surgimento de resistência à antifúngicos, como o desenvolvimento de tolerância a droga (Mukherjee, Chandra⁸³, 2004). Situações as quais são consideradas de extrema gravidade tendo em vista o envolvimento do fungo do gênero *Candida* com infecções sistêmicas (Tsui et al.¹²², 2016) e a possibilidade de emergência de Cepas resistentes (Blankenship et al.¹⁷, 2006; Chandra, Mukherjee²⁸, 2015). Não obstante, o uso indiscriminado de agentes antimicrobianos de amplo espectro em geral, pode levar não somente ao desenvolvimento de micro-organismos resistentes (Soares et al.¹¹³, 2012; Howard et al.⁵⁴, 2013) mas também, ao desenvolvimento de infecções difíceis de erradicar (Overbye, Barrett⁹⁰, 2005; Nathan et al.⁸⁶, 2011; Nett⁸⁷, 2014). A seriedade deste problema tem sido discutida pela Organização Mundial de Saúde (OMS) que, recentemente, manifestou grandes preocupações sobre o estado atual da saúde humana. Esta organização estimou que aproximadamente um bilhão de pessoas serão infectadas com o *Mycobacterium tuberculosis* entre os anos de 2000 e 2020, e cerca de 35 milhões de seres humanos morrerão como resultado do ressurgimento da tuberculose em uma forma mais virulenta e resistente aos antibióticos (Shingadia, Novelli¹⁰⁶, 2003; Rossolini et al.¹⁰⁰, 2014; Ventola¹²⁷, 2015). Tendo em vista este problema, novas abordagens têm sido investigadas e desenvolvidas em uma tentativa de combater doenças sem alterar o equilíbrio biológico, como estratégia ideal para inibir ou prevenir seu crescimento.

Nas últimas décadas, o campo emergente da nanotecnologia tem desenvolvido novos materiais em nível de nanoescala (Murray et al.⁸⁴, 2000), com inúmeras aplicações na área de saúde e tecnológicas. Dentre os materiais descritos na literatura, a prata tem se destacado devido as propriedades físico-químicas e antimicrobianas inerentes a este metal. A prata é um metal não corrosivo e muito utilizado em diversas áreas por apresentar baixa toxicidade quando comparada a outros metais, além de possuir propriedades bactericidas e bacteriostáticas de amplo espectro (Azam et al.⁹, 2012; Qin et al.⁹⁶, 2014). Interessantemente, a literatura relata que este metal foi muito utilizado como um dos principais agentes terapêuticos para queimaduras, feridas e infeções bacterianas (Mahendra et al.⁷⁴, 2009), até o descobrimento dos antibióticos. Considerando que a prata é eficaz contra as bactérias do gênero *Streptococcus* da cavidade oral e outros micro-organismos

patogênicos, da mesma forma em que impede a adesão de bactérias às superfícies e formação de biofilmes, este elemento químico pode ser utilizado como um aditivo antibacteriano para materiais dentários (Spacciapoli et al.¹¹⁴, 2001; Burgers et al.²¹, 2009; Wong et al.¹³¹, 2010; de Castro et al.³⁴⁻³⁵, 2016). Em nível de nanoescala, nanopartículas de prata (AgNPs) vêm admitindo ampla aplicabilidade na área da saúde por agir efetivamente contra um amplo espectro de bactérias e fungos (Cao et al.²², 2011; Anandhakumar, Raichur³, 2013), e não promover resistência (Hardes et al.⁴⁷, 2007; Zhao et al.¹³⁴, 2009). Embora o mecanismo de ação das AgNPs ainda não esteja totalmente estabelecido, acredita-se que os íons prata reajam com as cargas negativas da superfície dos micro-organismos, provocando desnaturação das proteínas e morte celular (Vazquez-Munoz et al.¹²⁶, 2014).

De acordo com outros pesquisadores, estas AgNPs penetrariam no interior das bactérias interrompendo a replicação do DNA (Panacek et al.⁹¹, 2006; Sintubin et al.¹¹², 2011). Em ambas as situações, para que este nanomaterial desempenhe a sua função, é necessário o rompimento da parede celular das bactérias (Liu et al.⁷³, 2014). Em relação a atividade antimicrobiana, alguns estudos reportaram que algumas espécies de bactérias Gram-positivas, tais como *Staphylococcus aureus* resistentes a metilina (MRSA), foram menos susceptíveis às AgNPs quando em comparação com espécies Gram-negativas, como por exemplo, a *Escherichia coli* (Kim et al.⁶¹, 2007). Além disso, o potencial de citotoxicidade destes nanomateriais às células eucarióticas ainda é uma preocupação e um desafio no meio científico (Ahamed et al.¹, 2012). A literatura tem reportado as consequências da intoxicação por AgNPs como possíveis alterações nas funções cognitivas, sensoriais, motoras, além de danos cerebrais e hepáticos (Kim et al.⁶⁴, 2009; Liu et al.⁷², 2010; Sharma et al.¹⁰⁴, 2012; Hwang et al.⁵⁶, 2012). Além destas injúrias, a exposição a estes nanomateriais também pode comprometer o processo natural de proliferação celular, induzindo o desenvolvimento de câncer, mesmo em concentrações de AgNPs menores de 0,5 mg/L (Carlson et al.²³, 2008; Choi, Hu³¹, 2008; Kawata et al.⁶⁰, 2009; Beer et al.¹³, 2012; Horie et al.⁵³, 2012).

Em uma tentativa de reduzir a citotoxicidade por meio da redução da concentração de íons disponíveis, a prata vem sendo sintetizada na presença de

outros metais com função carregadora, e a literatura tem reportado resultados promissores (Cao et al.²², 2011; Foggi et al.⁴¹, 2017). Neste contexto, nosso grupo de pesquisa tem desenvolvido microcristais de tungstênio e molibdato contendo nanopartículas de prata, como proposta para futuras aplicações na área da saúde. Estes microcristais exibem uma estrutura em forma de rede complexa composta por radicais, os quais interagem entre si e formam uma nuvem de elétrons, cujos espectros de vibração interna geram atividade antimicrobiana (Cavalcante et al.²⁵, 2012; Gouveia et al.⁴⁴, 2014). No caso do tungstato de prata (Ag_2WO_4), a variedade de polimorfismo, decorrente da estrutura ortorrômbica e do método de síntese utilizado, interage formando aglomerados ($[\text{AgO}_7]$, $[\text{AgO}_6]$, $[\text{AgO}_4]$, e $[\text{AgO}_2]$) por meio de diferentes ângulos de ligação com O-Ag-O na rede cristalina (Cavalcante et al.²⁵, 2012). O mesmo ocorre com o molibdato de prata. Este último óxido é capaz de exibir estruturas tetragonal (fase α) ou cúbica (fase β), dependendo da pressão utilizada na síntese. (Arora et al.⁴, 2012).

Considerando os resultados microbiológicos satisfatórios destes microcristais (Longo et al.⁷⁴, 2014; Fabbro et al.³⁹, 2016), no que se refere à propriedade antimicrobiana, propusemos, neste estudo, a avaliar o efeito do $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$ e $\beta\text{-Ag}_2\text{MoO}_4$ em solução, sobre culturas celulares em monocamada de mucosa oral humana e em matriz de colágeno simulando a reparação tecidual.

7 CONCLUSÃO

Baseados nos resultados obtidos e considerando a metodologia utilizada neste estudo, observou-se que o tungstato de prata na concentração C2 (7,81 µg/mL) ou CFM para *C. albicans*, não apresentou propriedades tóxicas para as células fibroblastos em monocamada e em matriz de colágeno. Por outro lado, embora o molibdato de prata na concentração C2 não tenha interferido na proliferação das células quando em monocamadas, afetou diretamente a viabilidade dos fibroblastos durante a confecção da matriz de colágeno.

REFERÊNCIAS*

1. Ahamed M, Karns M, Goodson M, Rowe J, Hussain SM, Schlaager JJ, et al. DNA damage response to different surface chemistry of silver nanoparticles in mammalian cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 2008; 233(3): 404–10.
2. Altarawneh S, Bencharit S, Mendoza L, Curran A, Barrow D, Barros S. Clinical and histological findings of denture stomatitis as related to intraoral colonization patterns of *Candida albicans*, Salivary flow, and dry mouth. *J Prosthodont*. 2013; 22(1): 13-22.
3. Anandhakumar S, Raichur AM. Polyelectrolyte/silver nanocomposite multilayer films as multifunctional thin film platforms for remote activated protein and drug delivery. *Acta Biomater*. 2013; 9(11): 8864–74.
4. Arora AK, Nithya R, Misra S, Yagi T. Behavior of silver molybdate at high-pressure. *J Solid State Chem*. 2012; 196: 391-7.
5. Arora PD, Narani N, McCulloch CA. The compliance of collagen gels regulates transforming growth factor-beta induction of alpha-smooth muscle actin in fibroblasts. *Am J Pathol*. 1999; 154(3): 871–82.
6. Artym VV, Matsumoto K. Imaging cells in three-dimensional collagen matrix. *Curr Protoc Cell Biol*. 2010 Sep; Chapter: Unit 10.18. 1-20. doi: 10.1002/0471143030.cb1018s48.
7. AshaRani PV, Low Kah Mun G, Hande MP, Valiyaveetil S. Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in human cells. *ACS Nano*. 2009; 3(2): 279-90.
8. Avila M, Ojcius DM, Yilmaz O. The oral microbiota: living with a permanent guest. *DNA Cell Biol*. 2009; 28(8): 405–11.
9. Azam A, Ahmed AS, Oves M, Khan MS, Habib SS, Memic A. Antimicrobial activity of metal oxide nanoparticles against Gram-positive and Gram-negative bacteria: a comparative study. *Int J Nanomedicine*. 2012; 7: 6003-9. doi: 10.2147 / IJN.S35347.
10. Baillie GS, Douglas LJ. *Candida* biofilms and their susceptibility to antifungal agents. *Methods Enzymol*. 1999; 310:644–56.
11. Baillie GS, Douglas LJ. Iron-limited biofilms of *Candida albicans* and their susceptibility to amphotericin B. *Antimicrob Agents Chemother*. 1998; 42(8): 2146-9.

* De acordo com o Guia de Trabalhos Acadêmicos da FOAr, adaptado das Normas Vancouver. Disponível no site da Biblioteca: <http://www.foar.unesp.br/#biblioteca/manual>.

12. Barbeau J, Seguin J, Goulet JP, de Koninck L, Avon SL, Lalonde B, et al. Reassessing the presence of *Candida albicans* in denture-related stomatitis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2003;95(1):51-9.
13. Beer C, Foldbjerg R, Hayashi Y, Sutherland DS, Autrup H. Toxicity of silver nanoparticles - nanoparticle or silver ion? *Toxicol Lett.* 2012;208(3):286-92.
14. Bell E, Ivarsson B, Merrill C. Production of a tissue-like structure by contraction of collagen lattices by human fibroblasts of different proliferative potential in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1979; 76(3): 1274–8.
15. Bello YM, Falabella AF, Eaglstein WH. Tissue-engineered skin. Current status in wound healing. *Am J Clin Dermatol.* 2001; 2(5):305-13.
16. Beltrán A, Gracia L, Longo E, Andrés J. First-principles study of pressure-induced phase transitions and electronic properties of Ag_2MoO_4 . *J. Phys Chem C.* 2014; 118(7): 3724-32.
17. Blankenship JR, Mitchell AP. How to build a biofilm: a fungal perspective. *Curr Opin Microbiol.* 2006; 9(6): 588-94.
18. Boyce ST, Ham RG. Cultivation, frozen storage, and clonal growth of normal human epidermal keratinocytes in serum-free media. *J Tissue Cult Methods.* 1985; 9(2): 83 - 93.
19. Budtz-Jorgensen E, Lombardi T. Antifungal therapy in the oral cavity. *Periodontol 2000.* 1996; 10: 89–106.
20. Budtz-Jorgensen E. Ecology of *Candida*-associated denture stomatitis. *Microb Ecol Health Dis.* 2000; 12(3):170–85.
21. Burgers R, Eidt A, Frankenberger R, Rosentritt M, Schweikl H, Handel G, et al. The anti-adherence activity and bactericidal effect of microparticulate silver additives in composite resin materials. *Arch Oral Biol.* 2009; 54(6):595-601.
22. Cao H, Liu X, Meng F, Chu PK. Biological actions of silver nanoparticles embedded in titanium controlled by micro-galvanic effects. *Biomaterials.* 2011; 32(3): 693-705.
23. Carlson C, Hussain SM, Schrand AM, Braydich-Stolle LK, Hess KL, Jones RL, et al. Unique cellular interaction of silver nanoparticles: size-dependent generation of reactive oxygen species. *Phys Chem B.* 2008; 112(43):13608-19.
24. Carlson MA, Longaker MT. The fibroblast-populated collagen matrix as a model of wound healing: a review of the evidence. *Wound Repair Regen.* 2004; 12(2): 134-47.

25. Cavalcante LS, Almeida MA, Avansi W, Tranquilin RL, Longo E, Batista NC, et al. Cluster coordination and photoluminescence properties of alpha-Ag₂WO₄ microcrystals. *Inorg Chem* 2012; 51(20):10675-87.
26. Chan FK, Moriwaki K, De Rosa MJ. Detection of necrosis by release of Lactate Dehydrogenase (LDH) activity. *Methods Mol Biol.* 2013; 979: 65–70. doi: 10.1007/978-1-62703-290-2_7.
27. Chandra J, Kuhn DM, Mukherjee PK, Hoyer LL, McCormick T, Ghannoum MA. Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: development, architecture, and drug resistance. *J Bacteriol*, 2001; 183(18): 5385–94.
28. Chandra J, Mukherjee PK. *Candida* biofilms: development, architecture, and resistance. *Microbiol Spectr.* 2015; 3(4) doi: 10.1128/microbiolspec MB-0020-2015.
29. Chandra J, Zhou G, Ghannoum MA. Fungal biofilms and antimycotics. *Curr Drug Targets.* 2005; 6(8): 887-94.
30. Chandra J, Mukherjee PK, Leidich SD, Faddoul FF, Hoyer LL, Douglas LJ, et al. Antifungal resistance of candidal biofilms formed on denture acrylic in vitro. *J Dent Res.* 2001; 80(3): 903–8.
31. Choi O, Hu Z. Size dependent and reactive oxygen species related nanosilver toxicity to nitrifying bacteria. *Environ Sci Technol.* 2008; 42(12):4583-8.
32. Cooper ML, Boyce ST, Hansbrough JF, Foreman TJ, Frank DH. Cytotoxicity to cultured human keratinocytes of topical antimicrobial agents. *J Surg Res.* 1990; 48(3): 190-5.
33. Dallon JC, Ehrlich HP. A review of fibroblast-populated collagen lattices. *Wound Repair Regen.* 2008; 16(4): 472-9.
34. De Castro DT, Valente ML, Agnelli JA, Lovato da Silva CH, Watanabe E, Siqueira RL, et al. In vitro study of the antibacterial properties and impact strength of dental acrylic resins modified with a nanomaterial. *J Prosthet Dent.* 2016; 115(2): 238-46.
35. De Castro DT, Valente ML, da Silva CH, Watanabe E, Siqueira RL, Schiavon MA, et al. Evaluation of antibiofilm and mechanical properties of new nanocomposites based on acrylic resins and silver vanadate nanoparticles. *Arch Oral Biol.* 2016; 67:46-53.
36. De Lima R, Seabra AB, Duran N. Silver nanoparticles: a brief review of cytotoxicity and genotoxicity of chemically and biogenically synthesized nanoparticles. *J Appl Toxicol.* 2012; 32(11): 867-79.

37. Echt A, Hirst DVL, Kovein R, The National Institute for Occupational Safety and Health (NIOSH). Control technology for dowell drilling in concrete. Springfield, MO; 2011. [EPHB Report nº 347-14a] [acesso em 2017 01 17]. Disponível em: <https://www.cdc.gov/niosh/surveyreports/pdfs/347-15a.pdf>.
38. Ehrlich HP, Moyer KE. Cell-populated collagen lattice contraction model for the investigation of fibroblast collagen interactions. *Methods Mol Biol.* 2013; 1037: 45-58.
39. Fabbro MT, Foggi CC, Santos LP, Gracia L, Perrin A, Perrin C, et al. Synthesis, antifungal evaluation and optical properties of silver molybdate microcrystals in different solvents: a combined experimental and theoretical study. *Dalton Trans.* 2016; 45(26):10736-43.
40. Filoche S, Wong L, Sissons CH. Oral biofilms: emerging concepts in microbial ecology. *J Dent Res.* 2010; 89(1):8-18.
41. Foggi CC, Fabbro MT, Santos LP, de Santana YV, Vergani CE, Machado AL, et al. Synthesis and evaluation of α -Ag₂WO₄ as novel antifungal agent. *Chem Phys Let.* 2017; 674: 125–9.
42. Gendreau L, Loewy ZG. Epidemiology and etiology of denture stomatitis. *J Prosthodont.* 2011; 20(4): 251-60.
43. Germain L, Jean A, Auger FA, Garrel DR. Human wound healing fibroblasts have greater contractile properties than dermal fibroblasts. *J Surg Res.* 1994; 57(2): 268-73.
44. Gouveia AF, Sczancoski JC, Ferrer MM, Lima AS, Santos MR. Li MS et al. Experimental and theoretical investigations of electronic structure and photoluminescence properties of beta-Ag₂MoO₄ microcrystals. *Inorg Chem.* 2014; 53(11): 5589-99.
45. Gudlaugsson O, Gillespie S, Lee K, Vande Berg J, Hu J, Messer S, et al. Attributable mortality of nosocomial candidemia, revisited. *Clin Infect Dis.* 2003; 37(9): 1172-7.
46. Hall-Stoodley L, Stoodley P. Evolving concepts in biofilm infection. *Cell Microbiol.* 2009; 11(7): 1034-43.
47. Harges J, Ahrens H, Gebert C, Streitbuerger A, Buerger H, Erren M, et al. Lack of toxicological side-effects in silver-coated megaprotheses in humans. *Biomaterials.* 2007; 28(18): 2869-75.
48. He D, Bligh MW, Waite TD. Effects of aggregate structure on the dissolution kinetics of citrate-stabilized silver nanoparticles. *Environ Sci Technol.* 2013; 47(16): 9148–56.

49. Helary C, Ovtracht L, Coulomb B, Godeau G, Giraud-Guille MM. Dense fibrillar collagen matrices: a model to study myofibroblast behaviour during wound healing. *Biomaterials*. 2006; 27(25):4443-52.
50. Herzog F, Clift MJ, Piccapietra F, Behra R, Schmid O, Petri-Fink A, et al. Exposure of silver-nanoparticles and silver-ions to lung cells in vitro at the air-liquid interface. *Part Fibre Toxicol*. 2013;10:11.
51. Hojo K, Nagaoka S, Oshima T, Maeda N, Bacterial interactions in dental biofilm development. *J Dent Res*.2009; 88 (11): 982-90.
52. Holmstrup P, Poulsen AH, Andersen L, Skuldbol T, Fiehn NE. Oral infections and systemic diseases. *Dent Clin North Am*. 2003; 47(3): 575-98.
53. Horie M, Kato H, Fujita K, Endoh S, Iwahashi H. In vitro evaluation of cellular response induced by manufactured nanoparticles. *Chem Res Toxicol*. 2012; 25(3):605-19.
54. Howard SJ, Catchpole M, Watson J, Davies SC. Antibiotic resistance: global response needed. *Lancet Infect Dis*. 2013; 13(12):1001-3.
55. Huang R, Li M, Gregory RL. Bacterial interactions in dental biofilm. *Virulence*. 2011; 2(5): 435–44.
56. Hwang IS, Lee J, Hwang JH, Kim KJ, Lee DG. Silver nanoparticles induce apoptotic cell death in *Candida albicans* through the increase of hydroxyl radicals. *FEBS J*. 2012; 279(7): 1327-38.
57. Iñigo M, Pemán J, Del Pozo JL. Antifungal activity against *Candida* biofilms. *Int J Artif Organs*. 2012; 35(10): 780-91.
58. Jiang W, Kim BYS, Rutka JT, Chan WCW. Nanoparticle-mediated cellular response is size-dependent. *Nat Nanotech*. 2008; 3: 145 –50.
59. Kaba S, Egorova E. In vitro studies of the toxic effects of silver nanoparticles on HeLa and U937 cells. *Nanotechnol Sci Appl*. 2015; 5(8):19-29.
60. Kawata K, Osawa M, Okabe S. In vitro toxicity of silver nanoparticles at noncytotoxic doses to HepG2 human hepatoma cells. *Environ Sci Technol*. 2009; 43(15): 6046-51.
61. Kim JS, Kuk E, Yu KN, Kim JH, Parque SJ, Lee HJ, et al. Antimicrobial effects of silver nanoparticles. *Nanomedicine*. 2007; 3(1):95-101.
62. Kim YS, Kim JS, Cho HS, Rha DS, Kim JM, Park JD, et al. Twenty-eight-day oral toxicity, genotoxicity, and gender-related tissue distribution of silver nanoparticles in Sprague-Dawley rats. *Inhal Toxicol*. 2008; 20(6): 575–83.

63. Kim YS, Song MY, Park JD, Song KS, Ryu HR, Chung YH, et al. Subchronic oral toxicity of silver nanoparticles. *Part Fibre Toxicol.* 2010; 7(20):1-11.
64. Kim S, Choi JE, Choi J, Chung K, Park K, Yi J, et al. Oxidative stress dependent toxicity of silver nanoparticles in human hepatoma cells. *Toxicol in Vitro.* 2009; 23(6): 1076-84.
65. Kolenbrander PE, Palmer RJ, Jr., Periasamy S, Jakubovics NS. Oral multispecies biofilm development and the key role of cell-cell distance. *Nat Rev Microbiol.* 2010; 8(7): 471-80.
66. Krajewski S, Pucek R, Panacek A, Avci-Adali M, Nolte A, Straub A, et al. Hemocompatibility evaluation of different silver nanoparticle concentrations employing a modified Chandler-loop in vitro assay on human blood. *Acta Biomater.* 2013; 9(7): 7460-8.
67. Krom BP, Kidwai S, Ten Cate JM. *Candida* and other fungal species: forgotten players of healthy oral microbiota. *J Dent Res.* 2014; 93(5):445–51.
68. Kruk T, Szczepanowicz K, Kregiel D, Szyk-Warszynska L, Warszynski P. Nanostructured multilayer polyelectrolyte films with silver nanoparticles as antibacterial coatings. *Coll Surf B: Biointer.* 2016, 137: 158–66.
69. Larson EM, Doughman DJ, Gregerson DS, Obritsch WF. A new, simple, nonradioactive, nontoxic in vitro assay to monitor corneal endothelial cell viability. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1997; 38(10): 1929-33.
70. Lemire JA, Harrison JJ, Turner RJ. Antimicrobial activity of metals: mechanisms, molecular targets and applications. *Nat Rev Microbiol.* 2013; 11(6): 371–84.
71. Li L, Sun J, Li X, Zhang Y, Wang Z, Wang C, et al. Controllable synthesis of monodispersed silver nanoparticles as standards for quantitative assessment of their cytotoxicity. *Biomaterials.* 2012; 33(6): 1714-21.
72. Liu J, Sonshine DA, Shervani S, Hurt RH. Controlled release of biologically active silver from nanosilver surfaces. *ACS Nano.* 2010; 4(11):6903-13.
73. Liu Z, Wang Y, Zu Y, Fu Y, Li N, Guo N, et al. Synthesis of polyethylenimine (PEI) functionalized silver nanoparticles by a hydrothermal method and their antibacterial activity study. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2014; 42:31-7.
74. Longo VM, De Foggi CC, Ferrer MM, Gouveia AF, Andre RS, Avansi W, et al. Potentiated electron transference in alpha-Ag₂WO₄ microcrystals with Ag nanofilaments as microbial agent. *J Phys Chem A.* 2014; 118(31):5769-78.
75. Lyons AB, Parish CR. Determination of lymphocyte division by flow cytometry. *J Immunol Methods.* 1994; 171(1) 131-7.

76. Maillard JY, Hartemann P. Silver as an antimicrobial: facts and gaps in knowledge. *Crit Rev Microbiol*. 2012; 39(4): 373–83.
77. Mateasik A, Trnka M, Kajo K, Vallova M, Cunderlikova B, et al. Cell-type dependent response to photodynamic treatment in 3D collagen cell cultures. *J Photochem Photobiol B: Biol*. 2017; 166: 94-103.
78. Mendy A, Gasana J, Vieira ER. Urinary heavy metals and associated US adult population. *Int J Environ Health Res*. 2012; 22(2): 105-18.
79. Monteiro DR, Gorup LF, Takamiya AS, de Camargo ER, Filho AC, Barbosa DB. Silver distribution and release from an antimicrobial denture base resin containing silver colloidal nanoparticles. *J Prosthodont*. 2012; 21(1): 7–15.
80. Monteiro DR, Silva S, Negri M, Gorup LF, de Camargo ER, Oliveira R, et al. Silver colloidal nanoparticles: effect on matrix composition and structure of *Candida albicans* and *Candida glabrata* biofilms. *J Appl Microbiol*. 2013; 114(4): 1175–83.
81. Moulin V, Castilloux G, Jean A, Garrel DR, Auger FA, Germain L. In vitro models to study wound healing fibroblasts. *Burns*. 1996; 22(5): 359-62.
82. Muadcheingka T, Tantivitayakul P. Distribution of *Candida albicans* and non-albicans *Candida* species in oral candidiasis patients: Correlation between cell surface hydrophobicity and biofilm forming activities. *Arch Oral Biol*. 2015; 60(6): 894 – 901.
83. Mukherjee PK, Chandra J. *Candida* biofilm resistance. *Drug Resist Updat*. 2004; 7 (4-5): 301-9.
84. Murray CB, Kagan CR, Bawendi MG. Synthesis and characterization of monodisperse nanocrystals and close-packed nanocrystal assemblies. *Annu Rev Mater Sci*. 2000; 30: 545-610.
85. Muzyka, BC, Epifanio RN. Update on oral fungal infections. *Dent Clin North Am*. 2013; 57(4): 561-81.
86. Nathan K. Archer, Mark J. Mazaitis, J. William Costerton, Jeff G. Leid, et al. *Staphylococcus aureus* biofilms: properties, regulation, and roles in human diseases. *Virulence*. 2011; 2(5): 445-59.
87. Nett J. Future directions for anti-biofilm therapeutics targeting *Candida*. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2014; 12(3): 375-82.
88. Nolte SV, Xu W, Rennekampff HO, Rodemann HP. Diversity of fibroblasts--a review on implications for skin tissue engineering. *Cells Tissues Organs*. 2008; 187(3): 165-76.

89. Nygaard UH, Niehues H, Rikken G, Rodijk-Olthuis D, Schalkwijk J, van den Bogaard EH. Antibiotics in cell culture: friend or foe? Suppression of keratinocyte growth and differentiation in monolayer cultures and 3D skin models. *Exp Dermatol*. 2015; 24(12): 964–5.
90. Overbye KM, Barrett F. Antibiotics: where did we go wrong? *Drug Discov. Today*. 2005; 10(1):45-52.
91. Panacek A, Kvittek L, Pucek R, Kolar M, Vecerova R, Pizurova N, et al. Silver colloid nanoparticles: synthesis, characterization, and their antibacterial activity. *J phys Chem B*. 2006; 110(33): 16248-53.
92. Parekh A, Sandulache VC, Singh T, Cetin S, Sacks MS, Dohar JE, et al. Prostaglandin E2 differentially regulates contraction and structural reorganization of anchored collagen gels by human adult and fetal dermal fibroblasts. *Wound Repair Regen*. 2009; 17(1): 88-98.
93. Parks AC, Sung K, Wu B. A three-dimensional in vitro model to quantify inflammatory response to biomaterials. *Acta Biomaterialia*. 2014; 10(11): 4742–9.
94. Paul EH, Sun B, Kainth KS, Kromah F. Elucidating the mechanism of wound contraction: rapid versus sustained myosin ATPase activity in attached-delayed-released compared with free-floating fibroblast-populated collagen lattices. *Wound Repair Regen*. 2006; 14(5): 625-32.
95. Pires FR, Santos EB, Bonan PR, De Almeida OP, Lopes MA. Denture stomatitis and salivary *Candida* in Brazilian edentulous patients. *J Oral Rehabil*. 2002; 29(11): 1115-9.
96. Qin H, Cao H, Zhao Y, Zhu C, Cheng T, Wang Q, et al. In vitro and in vivo anti-biofilm effects of silver nanoparticles immobilized on titanium. *Biomaterials*. 2014; 35(33): 9114-25.
97. Ramage G, Tomsett K, Wickes BL, López-Ribot JL, Redding SW. Denture stomatitis: a role for *Candida* biofilms. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2004; 98(1): 53-9.
98. Rams TE, Degener JE, van Winkelhoff AJ. Antibiotic resistance in human chronic periodontitis microbiota. *J Periodontol*. 2014; 85(1): 160-9.
99. Roca RA, Sczancoski JC, Nogueira IC, Fabbro MT, Alves HC, Gracia L, et al. Facet dependent photocatalytic and antibacterial properties of α -Ag₂WO₄ crystals: combining experimental data and theoretical insights. *Catal Sci Technol*. 2015; 5(8): 4091–107.
100. Rossolini GM, Arena F, Pecile P, Pollini S. Update on the antibiotic resistance crisis. *Curr Opin Pharmacol*. 2014; 18: 56–60.

101. Salvatori O, Puri S, Tati S, Edgerton M. Innate immunity and saliva in *Candida albicans*-mediated oral diseases. *J Dent Res*. 2016; 95(4): 365-71.
102. Schmitt-Graff A, Desmouliere A, Gabbiani G. Heterogeneity of myofibroblast phenotypic features: an example of fibroblastic cell plasticity. *Virchows Arch*. 1994; 425(1):3-24.
103. Sephra NR. Multiple applications of Alamar Blue as an indicator of metabolic function and cellular health in cell viability bioassays. *Sensors (Basel)*. 2012; 12(9): 12347–60.
104. Sharma HS, Sharma A. Neurotoxicity of engineered nanoparticles from metals. *CNS Neurol Disord Drug Targets*. 2012; 11(1): 65-80.
105. Shi B, Wu T, McLean J, Edlund A, Young Y, He X, et al. The denture-associated oral microbiome in health and stomatitis. *mSphere*. 2016; 1(6): e00215-16.
106. Shingadia D, Novelli V. Diagnosis and treatment of tuberculosis in children. *Lancet Infect Dis*. 2003; 3(10): 624-32. Erratum in *Lancet Infect Dis*. 2004; 4(4):251. Dosage error in article text.
107. Shulman JD, Rivera-Hidalgo F, Beach MM. Risk factors associated with denture stomatitis in the United States. *J Oral Pathol Med*. 2005; 34(6):340-6.
108. Siddiqui MA, Saquib Q, Ahamed M, Farshori NN, Ahmad J, Wahab R, et al. Molybdenum nanoparticles induced cytotoxicity, oxidative stress, G2/M arrest and DNA damage in mouse skin fibroblast cells (L929). *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2015; 125:73-81.
109. Sies H. Damage to plasmid DNA by singlet oxygen and its protection. *Mutat Res*. 1993; 299(3-4): 183-91.
110. Silva S, Pires P, Monteiro DR, Negri M, Gorup LF, Camargo ER, et al. The effect of silver nanoparticles and nystatin on mixed biofilms of *Candida glabrata* and *Candida albicans* on acrylic. *Med Mycol*. 2013; 51(2): 178–84.
111. Singh R, Shedbalkar UU, Wadhwani SA, Balu, Chopade BA. Bacteriogenic silver nanoparticles: synthesis, mechanism, and applications. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2015; 99(11): 4579–93.
112. Sintubin L, De Gusseme B, Van der Meeren P, Pycke BF, Verstraete W, Boon N. The antibacterial activity of biogenic silver and its mode of action. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2011; 91(1): 153-62.

113. Soares GM, Figueiredo LC, Faveri M, Cortelli SC, Duarte PM, Feres M. Mechanisms of action of systemic antibiotics used in periodontal treatment and mechanisms of bacterial resistance to these drugs. *J Appl Oral Sci.* 2012; 20(3): 295–304.
114. Spacciapoli P, Buxton D, Rothstein D, Friden P. Antimicrobial activity of silver nitrate against periodontal pathogens. *J Periodontal Res* 2001; 36(2): 108-13.
115. Stensberg MC, Wei Q, Mclamore ES, Porterfield DM, Wei A, Sepulveda MS. Toxicological studies on silver nanoparticles: challenges and opportunities in assessment, monitoring and imaging. *Nanomedicine (Lond).* 2011; 6(5): 879–98.
116. Stone V, Johnston H, Clift MJ. Air pollution, ultrafine and nanoparticle toxicology: cellular and molecular interactions. *IEEE Trans NanoBioscience.* 2007; 6(4): 331–40.
117. Sutherland RM. Cell and environment interactions in tumor microregions: the multicell spheroid model. *Science.* 1988; 240(4849): 177-84.
118. Suzuki T, Fujikura K, Higashiyama T, Takata K. DNA staining for fluorescence and laser confocal microscopy. *J Histochem Cytochem.* 1997; 45(1):49-53.
119. Tamariz E, Grinnell F. Modulation of fibroblast morphology and adhesion during collagen matrix remodeling. *Mol Biol Cell.* 2002; 13: 3915–29.
120. Tobudic S, Kratzer C, Lassnigg A, Presterl E. Antifungal susceptibility of *Candida albicans* in biofilms. *Mycoses.* 2012; 55(3):199-204.
121. Torres SR, Peixoto CB, Caldas DM, Silva EB, Magalhães FAC, Uzeda M, et al. Clinical aspects of *Candida* species carriage in saliva of xerostomic subjects. *Med Mycol.* 2003; 41:411-5.
122. Tsui C, Kong EF, Jabra-Rizk MA. Pathogenesis of *Candida albicans* biofilm. *Pathog Dis.* 2016; 74(4): ftw018.
123. Tuson HH, Weibel DB. Bacteria–surface interactions. *Soft Matter.* 2013; 9(18): 4368–80.
124. Vande Berg JS, Rudolph R, Poolman WL, Disharoon DR. Comparative growth dynamics and actin concentration between cultured human myofibroblasts from granulating wounds and dermal fibroblasts from normal skin. *Lab Invest.* 1989; 61(5): 532-8

125. Vanden AA, de Meel H, Ahariz M, Perraudin JP, Beyer I, Courtois P. Denture contamination by yeasts in the elderly. *Gerodontology*. 2008; 25:222–8.
126. Vazquez-Munoz R, Avalos-Borja M, Castro-Longoria E. Ultrastructural analysis of *Candida albicans* when exposed to silver nanoparticles. *PloS One*. 2014; 9(10): e108876.
127. Ventola CL. The antibiotic resistance crisis part 1: causes and threats. *PT*. 2015; 40(4): 277–83.
128. Vyskocil A, Viau C. Assessment of molybdenum toxicity in humans. *J Appl Toxicol*. 1999; 19(3): 185-92.
129. Webb BC, Thomas CJ, Willcox MD, Harty DW, Knox KW. *Candida*-associated denture stomatitis. Aetiology and management: a review. Part 3. Treatment of oral candidosis. *Aust Dent J*. 1998; 43:244–9.
130. Wei L, Lu J, Xu H, Patel A, Chen Z, Chen G. Silver nanoparticles: synthesis, properties, and therapeutic applications. *Drug Dis Tod*. 2015; 20(5):595-601.
131. Wong SY, Moskowitz JS, Veselinovic J, Rosario AR, Timachova K, Blaisse MR, et al. Dual functional Polyelectrolyte multilayer coatings for implants: permanent microbicidal base with controlled release of therapeutic agents. *J Am Chem Soc*. 2010; 132(50): 17840–8.
132. Wright CJ, Burns LH, Jack AA, Back CR, Dutton LC, Nobbs AH, et al. Microbial interactions in building of communities. *Mol Oral Microbiol*. 2013; 28(2):83-101.
133. Zhang T, Wang L, Chen Q, Chen C. Cytotoxic potential of silver nanoparticles. *Yonsei Med J*. 2014; 55(2): 283-91.
134. Zhao L, Chu PK, Zhang Y, Wu Z. Antibacterial coatings on titanium implants. *J Biomed Mater Res B, Appl Biomater*. 2009; 91(1): 470-80.
135. Zissis A, Yannikakis S, Harrison A. Comparison of denture stomatitis prevalence in 2 population groups. *Int J Prosthodont*. 2006; 19(6):621–5.