



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “Julio de Mesquita Filho”
Campus de Araçatuba – Faculdade de Odontologia
Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese

ANA BEATRIZ REPIZO RENESTO

**Nanopartículas de prata associada ao trimetafosfato de
sódio e fluoreto: síntese e avaliação do efeito
antimicrobiano**

**Araçatuba – SP
2017**

ANA BEATRIZ REPIZO RENESTO

**Nanopartículas de prata associada ao trimetafosfato de
sódio e fluoreto: síntese e avaliação do efeito
antimicrobiano**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Bacharel em Odontologia.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Débora de Barros Barbosa

**Araçatuba – SP
2017**

Dedicatória

Trabalho de conclusão de curso

Ana Beatriz Repizo Renesto

Dedicação

Dedico esse trabalho aos meus pais, Silmar Renesto e Sueli Repizo Renesto, e ao meu irmão, Gustavo Repizo Renesto. Agradeço por todo apoio que me deram durante esta fase, para que eu chegasse até aqui. Meus maiores exemplos de amor e união, que sempre apoiaram os meus sonhos. Minha eterna gratidão por tudo que fazem por mim.

Agradecimentos

Agradecimentos

À Deus,

Pela proteção, por me guiar e fortalecer todos os dias, me capacitando para realizar os meus sonhos. Agradeço a permissão de estar concluindo uma etapa muito importante em minha vida.

Aos meus pais Silmar Renesto e Sueli Repizo,

Eu agradeço à educação que me deram, e por todos os ensinamentos. Sou grata por estarem presentes em todo momentos da minha vida, me apoiando. Pelo amor, pela dedicação e pela confiança. Obrigada por terem acreditado em mim, e pelo esforço diário que fizeram para que eu estivesse aqui. Tudo que sou hoje devo a vocês.

Ao meu irmão Gustavo Repizo Renesto,

Muito obrigada por ser meu amigo e companheiro desde a infância, por estar presente em todos os momentos da minha vida. Meu amor e gratidão por ter em você, alguém em que posso confiar e me apoiar sempre que preciso. Amo você.

À professora Débora de Barros Barbosa,

Minha admiração por ser uma pessoa de bom coração. Obrigada pela orientação neste trabalho.

À Jackeline Gallo do Amaral,

Pela ajuda, dedicação e orientação durante o trabalho. Obrigada pelas vezes que me ajudou mesmo a distancia, pela preocupação e organização para com o projeto. Admiro muito a profissional que você é e agradeço a oportunidade que me deu, que com certeza acrescentou muito na minha formação.

Ao professor Aldiéris Alves Pesqueira,

Obrigada por ter aceitado o convite como banca avaliadora deste trabalho. Durante a graduação pude conhecer um pouco da pessoa maravilhosa que você é, de muita competência e bom humor. Agradeço os ensinamentos profissionais e pessoais que tive. Vou sempre me lembrar de você.

À minha família,

Só tenho a agradecer por serem o meu maior exemplo de união, amizade, fraternidade e amor. Tios, tias, primos e primas, ter vocês na minha vida me torna mais forte e feliz, com a certeza que tenho sempre em quem me apoiar.

A minha amiga Gabriela Lopes Fernandes,

Eu não tenho palavras que agradeçam tudo que você fez por mim. Obrigada, primeiramente, pela ajuda e dedicação para que esse trabalho fosse realizado e concluído. Além disso, ter você em casa, fez com que os dias aqui fossem mais fáceis. Sem dúvidas, você é uma irmã que ganhei e vou levar para o resto da vida. Obrigada por tudo.

Aos Pós-graduandos,
Renan, Carla, Ana Paula, Laís, e aos demais amigos que estavam presente no laboratório, obrigada pelo convívio, colaboração, ajuda e amizade que tornou tudo mais fácil.

Aos amigos,
Agradeço de coração, todos os amigos que fiz durante esses anos. Cada um de vocês teve importância particular em tudo que aprendi e vivi aqui. Jamais me esquecerei de vocês. Meu amor e gratidão por tudo.

A Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista "Julio Mesquita Filho"

Ao Departamento de Odontopediatria da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP.

A todos os professores da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP, obrigada pelo aprendizado e ensinamentos.

A todos os funcionários da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP, pela ajuda e dedicação de todos os dias.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Processo FAPESP 2016/08302-4) pelo apoio no desenvolvimento deste projeto.

MUITO OBRIGADA!

“Quando pensamos e agimos de acordo com as imutáveis Leis Naturais, que regem toda a criação e todas as ações, os resultados são benéficos.”

Meishu Sama

RENESTO, A.B.R. **Nanopartículas de prata associada ao trimetafosfato de sódio e fluoreto: síntese e avaliação do efeito antimicrobiano**. 2017. (Trabalho de Conclusão de Curso) - Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2017.

RESUMO

A fim de se desenvolver novos agentes antimicrobianos, muitas pesquisas vêm sendo conduzidas, e dentre estes agentes podemos citar as nanopartículas de prata (NP-Ag), devido a sua atividade antimicrobiana e antifúngica contra um amplo espectro de microorganismos. Além disso, o trimetafosfato de sódio (TMP) preserva a integridade e estabilidade do esmalte e sua associação nas proporções adequadas com o fluoreto (F) pode proporcionar um efeito protetor maior em relação aos produtos fluoretados convencionais. Assim, objetivo do presente estudo foi sintetizar um composto contendo nanopartículas de prata (NP-Ag), trimetafosfato de sódio (TMP) e fluoreto (F), caracterizá-lo e avaliar a ação antimicrobiana contra células planctônicas de *Candida albicans* e *Streptococcus mutans*. Para isso, NP-Ag foram sintetizadas através da redução do nitrato de prata contendo 1 (T1) e 10% (T10) em relação ao TMP por meio de uma via química na presença de F e TMP. O composto foi caracterizado utilizando a microscopia eletrônica de varredura (MEV) e difração de raios-X (DRX). Foi avaliada também a quantidade de íons prata no composto através de eletrodo íon-específico. A ação antimicrobiana em células planctônicas foi avaliada através da concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida ou fungicida mínima (CBM/CFM). As análises de MEV apresentaram NP-Ag decorando a superfície das partículas de TMP para os compostos sintetizados e a efetividade das reações foi demonstrada pela redução de íons prata maior que 90%. Ambos os compostos apresentaram atividade antimicrobiana contra os microrganismos avaliados, sendo a *Candida albicans* mais susceptível. Para o *Streptococcus mutans* o valor de CIM e CBM foram 5850 µg/ml e 11700 µg/ml respectivamente para o composto T1, e 1463 µg/ml e 5850 µg/ml para o composto T10. Para a *Candida albicans* o valor de CIM e CFM foram 182,8 µg/ml e 2925 µg/ml respectivamente para o composto T1, e 45,7 µg/ml e 731,2 µg/ml para o composto T10. Assim, os compostos formados por NP-Ag associadas ao TMP e F

apresentaram potencial para o desenvolvimento de novos produtos de higiene oral.

Palavras-chave: Polifosfatos, Nanopartículas, Fluoretos, Microbiologia.

RENESTO, A.B.R. **Silver nanoparticles associated with sodium trimetaphosphate and fluoride: synthesis and evaluation of the antimicrobial effect**. 2017. (Trabalho de Conclusão de Curso) - Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2017.

ABSTRACT

Several researches have been conducted in order to develop new antimicrobial agents. Among these agents, silver nanoparticles (Ag-NP) demonstrated antimicrobial and antifungal activity against a broad spectrum of microorganisms. In addition, sodium trimetaphosphate (TMP) preserves the integrity and stability of the enamel and its association in appropriate proportions with fluoride (F) may provide a greater protective effect over conventional fluoride products. Thus, this study aimed to synthesize a compound containing silver nanoparticles (Ag-NP), sodium trimetaphosphate (TMP) and fluoride (F), characterize it and evaluate the antimicrobial action against planktonic cells of *Candida albicans* and *Streptococcus mutans*. For this, Ag-NP were synthesized by reducing silver nitrate at 1 (T1) or 10% (T10) in relation to TMP by a chemical route in the presence of F and TMP. The compound was characterized using scanning electron microscopy (SEM) and X-ray diffraction (XRD). It was also evaluated the silver ions concentration in the compound through an ion-specific electrode. The antimicrobial action in planktonic cells was evaluated by minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal or fungicidal concentration (MBC / MFC). SEM analyzes showed Ag-NP decorating the surface of the TMP particles and the effectiveness of the reaction was demonstrated by the reduction of silver ions greater than 90%. Both compounds presented antimicrobial activity against the evaluated microorganisms, however, *Candida albicans* was more susceptible. For *Streptococcus mutans* the MIC and MBC values were 5850 µg / ml and 11700 µg / ml respectively for compound T1, and 1463 µg / ml and 5850 µg / ml for compound T10. For *Candida albicans* the MIC and MFC values were 182.8 µg / ml and 2925 µg / ml respectively for compound T1, and 45.7 µg / ml and 731.2 µg / ml for compound T10. Thus, compounds synthesized by Ag-NP in the presence of TMP and F presented potential for the development of new oral hygiene products.

Key words: Polyphosphates, Nanoparticles, Fluorides, Microbiology.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Padrões de DRX do trimetafosfato de sódio comercial e dos compostos sintetizados.....	32
Figura 2 - Padrões de DRX das nanopartículas de prata.....	33
Figura 3 - Imagens de MEV a: composto T1 b: composto T10.....	34
Figura 4 - Análise da distribuição de nanopartículas de prata através do mapeamento 2D da emissão de elementos O K α , P K α , Ag L α dos compostos T1 e T10.....	35
Figura 5 - Concentrações de TMP, F e Ag presentes na mínima concentração inibitória (a) e mínima concentração fungicida (b) apresentada pelos compostos contra cepas de <i>Candida albicans</i>	36
Figura 6 - Concentrações de TMP, F e Ag presentes na mínima concentração inibitória (a) e mínima concentração bactericida (b) apresentada pelos compostos contra cepas de <i>Streptococcus mutans</i>	37
Figura 7 - Análise da concentração de prata iônica (Ag ⁺) nos compostos T1 e T10 ao longo dos dias.....	38

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Concentração inibitória mínima (CIM) e bactericida/fungicida (CBM/CFM) obtida de acordo com os compostos avaliados.....	39
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

NP-Ag - nanopartículas de prata.

TMP - trimetafosfato de sódio.

F- fluoreto.

MEV - microscopia eletrônica de varredura.

DRX - difração de raios-X.

T1 - composto contendo 1% de Prata em relação ao TMP.

T10- composto contendo 10% de Prata em relação ao TMP.

CIM - concentração inibitória mínima.

CBM - concentração bactericida mínima.

CFM - concentração fungicida mínima.

Ag⁺ - íons prata.

UFSCar – Universidade Federal de São Carlos.

Ag - Prata.

AgNO₃ . nitrato de prata.

NaF - fluoreto de sódio.

NaBH₄. borohidreto de sódio.

ppm – parte por milhão.

ATCC - American Type Culture Collection.

ASD - Agar Sabouraud Dextrose.

BHI - Brain Heart Infusion.

Rpm- rotação por minuto.

PBS - solução salina tamponada com fosfato

CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute.

> - maior.

SUMÁRIO

1. Introdução.....	17
2. Proposição	18
3. Materiais e Métodos.....	18
4. Resultados	22
5. Discussão	24
6. Conclusão	27
Referências	28

1. Introdução

O desenvolvimento de materiais utilizando a nanotecnologia tem mostrado novas alternativas para diversas áreas tanto em projetos de pesquisa quanto em aplicações clínicas (Monteiro et. al., 2009; Corrêa et. al., 2015; Duran et. al., 2016). Nanopartículas metálicas, particularmente as nanopartículas de prata (NP-Ag), tem mostrado resultados promissores em diversas áreas da odontologia, como endodontia (Samiei et al., 2013), prótese (Nam et al. 2011), dentística restauradora (Cheng et al., 2012; das Neves et al., 2014) e ortodontia (Moreira et al., 2015), a fim de reduzir a colonização microbiana sobre a superfície dentária ou em materiais, melhorando a qualidade da saúde bucal.

Entre as bactérias, o *Streptococcus mutans*, é um dos principais microrganismos relacionados com a cárie dentária, apresenta alta prevalência nos biofilmes dentais, propriedades acidogênica e acidúrica, juntamente com a capacidade para sintetizar polissacarídeos extracelulares, sendo importantes fatores de virulência que contribuem para a colonização da superfície do esmalte dentário e desenvolvimento de biofilmes patogênicos (Loesche, 1986; Marsh 1999; Gregoire et al. 2011). Além disso, apesar do desenvolvimento da cárie dentária estar inicialmente relacionado à formação de biofilme cariogênico por *Streptococcus mutans*, na progressão de lesões estabelecidas pode estar presente *Candida albicans* (de Carvalho et al, 2006).

Dentre as maneiras de se prevenir a formação da lesão cariosa tem-se o controle da formação de biofilme sobre a superfície dentária. Neste contexto, NP-Ag possuem atividade antimicrobiana e antifúngica contra um amplo espectro de microrganismos, sendo considerado atualmente um potencial agente para propostas terapêuticas (Monteiro et al., 2009; Corrêa et al., 2015). Na forma nanoparticulada, a prata possui uma maior área de superfície por volume, o que a torna potencialmente mais reativa (Panáček et al., 2006), podendo ser uma alternativa para novos tratamentos antimicrobianos.

O fluoreto (F) é o principal agente utilizado no controle da cárie dentária (Pessan et al., 2011). Porém, a associação deste agente a compostos contendo cálcio e fosfato tem mostrado resultados promissores na prevenção

da cárie dentária (do Amaral et al., 2013; Takeshita et al., 2015; da Camara et al., 2016). Dentre os sais de fosfato, o trimetafosfato de sódio (TMP) tem se mostrado eficaz como agente cariostático, ao serem adicionados a vernizes, dentifrícios e enxaguatórios bucais levando a uma redução significativa da perda mineral do esmalte (Takeshita et al., 2009, 2015; Danelon et al., 2013, 2014; Manarelli et al., 2015). O TMP é um polifosfato cíclico condensado e, de acordo com a literatura, preserva a estabilidade e integridade da superfície do mineral do esmalte (Gonzalez, 1971). Estudos recentes mostram que produtos com uma proporção adequada de TMP e F podem proporcionar um efeito protetor maior que em produtos fluoretados convencionais (Danelon et al., 2013, 2014; Manarelli et al., 2015; Takeshita et al., 2015).

Diante do exposto e da necessidade de se prevenir a cárie, faz-se necessário o desenvolvimento de novos compostos. A utilização de um material contendo um agente antimicrobiano e um composto agindo como uma fonte de fosfato e fluoreto pode ter um grande impacto sobre a prevenção e controle da cárie dentária. Neste sentido é interessante a avaliação do efeito antimicrobiano de um composto contendo TMP e F associados à prata na forma nanoparticulada.

2. Proposição

1) Sintetizar um composto contendo NP-Ag, F e TMP e caracterizá-lo através da microscopia eletrônica de varredura (MEV) e difração de raios-X (DRX); avaliar a concentração de íons prata (Ag^+) no composto através de eletrodo íon-específico.

2) Avaliar a atividade antimicrobiana através da concentração inibitória mínima (CIM) e das concentrações bactericidas e fungicidas mínimas (MBC/MFC) contra cepas de *Streptococcus mutans* ATCC 25175 e *Candida albicans* ATCC 10231.

3. Materiais e Métodos

3.1 Síntese do composto e caracterização

a. Síntese do composto contendo NP-Ag, F e TMP

O composto contendo NP-Ag associadas ao TMP e F foi sintetizado no Laboratório Interdisciplinar de Eletroquímica e Cerâmica do Departamento de Química da UFSCar, sob a supervisão do Prof. Dr. Emerson Rodrigues de Camargo. A síntese foi baseada na metodologia proposta por Miranda et al., (2012) com modificações. Foram sintetizados dois compostos, em que a concentração de Ag utilizada foi 1% e 10% em relação ao peso de TMP, obtendo-se assim os compostos T1 e T10, respectivamente. Para isso, foram preparadas suspensões contendo 10g TMP (Sigma-Aldrich, CAS 7785-84-4, UK), com 1 ou 10% de prata em relação ao TMP, na forma de nitrato de prata (AgNO_3 , Merck KGaA, Darmstadt, Hessen, Germany), 0,553g fluoreto de sódio (NaF, Merck, CAS 7681-49-4, Germany) e 1ml do surfactante (sal de amônia de ácido polimetacrílico, Dolapix®, Polysciences, Inc., Warrington, PA, USA) em 100 ml de isopropanol. Em seguida borohidreto de sódio (NaBH_4 , Sigma-Aldrich) foi adicionado a essa suspensão a fim de promover a redução de íons prata. Assim, a mistura permaneceu sob agitação por 10 minutos, ocorrendo alteração de cor, o que evidencia qualitativamente a formação de nanopartículas de prata. A relação molar estequiométrica entre o NaBH_4 e a Ag^+ foi de 1: 1,26 respectivamente e a relação entre TMP e fluoreto foi de 2% para 500 ppm, respectivamente. Os compostos foram secos em estufa a 70°C e triturados utilizando almofariz e pistilo de ágata. Foi sintetizado também um composto contendo apenas nanopartículas de prata como controle (sem TMP e F) da mesma maneira descrito acima.

b. Caracterização

A morfologia e distribuição das partículas foram caracterizadas através da microscopia eletrônica de varredura (MEV) em um microscópio Zeiss Supra 35VP com canhão de emissão de elétrons por efeito de campo (FEG-MEV), trabalhando a 10 kV. Também foi realizado, análises de espectroscopia de raios X por dispersão em energia (EDX) com mapeamento em 2D. Este acessório é essencial no estudo de caracterização microscópica do composto.

Quando o feixe de elétrons incide sobre o material, os elétrons mais externos dos átomos constituintes são excitados, mudando de níveis energéticos. Ao retornarem para sua posição inicial, liberam a energia adquirida, que é emitida em comprimento de onda no espectro de raios-X. Um detector instalado na câmara de vácuo do MEV mede a energia associada a esses elétrons. Como os elétrons de um determinado átomo possuem energias distintas, é possível, no ponto de incidência do feixe, determinar qual elemento químico está presente naquele local e identificar a composição química na área observada. As imagens em 2D foram construídas pela análise da energia liberada da emissão $P K\alpha$, $Ag L\alpha$ e $Ca K\alpha$.

O composto também foi caracterizado qualitativamente por difração de raios-X (DRX) (Difratômetro Rigaku DMax-2000PC, Rigaku Corporation, Tóquio, Japão) com anodo rotatório e radiação $CuK\alpha$ ($\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$) para que se conheça a estrutura cristalina das mesmas. O difratômetro de raios-X foi operado na faixa 2θ de 20 a 110 graus, voltagem de 40 KV, corrente de 40mA, fenda divergente de 1,0mm, fenda de coleta de 0,2mm e acumulação para leitura a cada 0,02 segundo.

3.2 Avaliação da concentração de Ag^+ no composto

A fim de verificar a quantidade de íons prata e estabilidade dos compostos foi realizada a dosagem de Ag iônica (Ag^+) logo após o processo de síntese e em dias pré-determinados: 1, 3, 5, 9, 20, 40, 80 e 160 dias. Para isto, a concentração de íons prata da amostra foi mensurada utilizando um eletrodo específico para o íon combinado 9616 BNWP (Thermo Scientific, Beverly, MA, USA) acoplado a um analisador de íons (Orion 720 A^+ , Thermo Scientific, Beverly, MA, USA) previamente calibrado com cinco padrões contendo 6,25; 12,5; 25; 50 e 100 $\mu g Ag^+/mL$. Os dados obtidos em mV foram convertidos em $\mu g Ag^+/mL$.

Para o preparo do padrão de prata, $AgNO_3$ (Merck KGaA, Darmstadt, Hessen, Germany) foi seco em estufa à $70^\circ C$ overnight e foi preparado um padrão contendo 1000 ppm de prata (1,57g de nitrato de Ag/L água deionizada), o qual foi armazenado em frasco opaco e estocado em local escuro. As amostras foram pesadas (0,0234 do composto/mL de água

deionizada – proporção inicial utilizada no MIC) e homogeneizadas. Essas amostras foram armazenadas em frascos opacos e local escuro e a determinação da concentração de Ag^+ realizada nos períodos pré-determinados.

3.3 Teste de susceptibilidade de células planctônicas de *Streptococcus mutans* e *Candida albicans*

a. Cepas de microrganismos e condições de crescimento

Para este estudo foram utilizadas as cepas de referência da American Type Culture Collection (ATCC) *Candida albicans* (ATCC 10231) e *Streptococcus mutans* (ATCC 25175). Culturas destes microrganismos mantidas a $-70^{\circ}C$ em glicerina foram semeadas em Agar Sabouraud Dextrose (ASD; Difco, LePont de Claix, França), para a cepa de *Candida albicans*, e cultivadas por 24 horas a $37^{\circ}C$. Culturas de *Streptococcus mutans* foram semeadas em Agar Infusão de Cérebro e Coração (BHI Agar; Difco) e incubadas em 5% de CO_2 a $37^{\circ}C$ por 24 horas. Colônias de *Streptococcus mutans* foram inoculadas em 10 mL de BHI caldo (Difco, LePont de Claix, França) e incubadas estaticamente durante a noite em 5% de CO_2 a $37^{\circ}C$. Após o período de incubação, as células bacterianas foram recuperadas por centrifugação a 8000 rpm por 5 minutos e os “pellets” de células foram lavados duas vezes com 10 mL de solução salina tamponada com fosfato (PBS; pH 7).

b. Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

A CIM para cada cepa foi determinada usando o método da microdiluição, de acordo com as normas do Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI). Os compostos foram primeiramente diluídos em água deionizada em progressão geométrica, de 2 a 1024 vezes. Cada concentração dos compostos obtida previamente foi diluída (1:2,5) nos meios de cultura RPMI 1640 (Sigma-Aldrich, St Louis, Missouri, USA) e Brain Heart Infusion (BHI) caldo, respectivamente para *Candida albicans* (ATCC 10231) e *Streptococcus mutans* (ATCC 25175). Inóculos a partir de culturas de 24 horas dos microrganismos semeados em Ágar Sabouraud Dextrose (ASD) para *Candida*

albicans e BHI ágar para o *Streptococcus mutans* foram ajustados para uma turbidez equivalente ao padrão 0,5 da escala Mc Farland em solução salina (0,85% NaCl). As suspensões de cada cepa foram diluídas (1:5) em solução salina e, posteriormente, diluídas (1:20) em RPMI 1640 para *Candida albicans* ou BHI caldo para *Streptococcus mutans*. Cada suspensão de microrganismos (100 µL) foi adicionada aos poços de placas de microtitulação de 96 poços (Costar, Tewksbury, EUA) contendo 100 µL de cada concentração específica dos compostos. Soluções sem a Ag e sem o TMP e F foram avaliadas como controles, e digluconato de clorexidina foi utilizado como controle positivo. Também foi avaliada uma solução contendo nanopartículas de prata sem TMP e F. Na sequência, as placas de microtitulação foram incubadas à 37°C e as CIM foram determinadas visualmente como sendo as menores concentrações capazes de inibirem o crescimento dos microrganismos após 48 horas de incubação para a *Candida albicans* e 24 horas para o *Streptococcus mutans* (microaerofilia). O conteúdo dos poços também foram plaqueados a fim de obter as mínimas concentrações bactericida (CBM) e fungicida (CFM) após 24h horas de incubação para a *Candida albicans* e *Streptococcus mutans* (microaerofilia). Todos os ensaios foram realizados em triplicata em três ocasiões diferentes.

3.4 Análise dos dados

No presente projeto, os dados da DRX foram descritos em função da presença de picos específicos que representam os elementos presentes no composto de acordo com uma base de dados. Os dados do MEV e EDX foram analisados em função da presença, forma e tamanho dos elementos do composto. Para os testes microbiológicos os resultados foram expressos como a menor concentração capaz de inibir o crescimento dos microrganismos e bactericidas e fungicidas. Foram realizados pelo menos três ensaios independentes, cada um em triplicata.

4. Resultados

Os compostos obtidos neste estudo foram caracterizados por DRX e MEV. O padrão de DRX dos compostos sintetizados pode ser observado na

Figura 1. Os dados mostram os picos de difração a $2\theta = 14,4^\circ$, $17,3^\circ$, $23,4^\circ$, $26,1^\circ$ e $29,2^\circ$ e a correspondente forma cristalográfica (PDF Nº 72-1628) do sal de trimetafosfato de sódio. O padrão DRX das nanopartículas de prata é mostrado na Figura 2. Os dados mostram picos de difração a $2\theta = 38,2^\circ$, $44,4^\circ$ e $64,6^\circ$, que podem ser indexados em (111), (200), (220) e planos de prata pura com sistema cúbico centrado na face (PDF Nº 04-0783).

As análises de MEV apresentaram NP-Ag esféricas com tamanho médio de 30 nm decorando a superfície das micropartículas de TMP para os compostos sintetizados (Figura 3). Para a amostra contendo 10% de prata nas imagens de MEV foi possível observar com mais detalhes a formação de nanopartículas de prata ancoradas na superfície de TMP em relação às amostras contendo 1% de prata. A distribuição de nanopartículas de prata compostos foi analisada por MEV com análise por dispersão de energia (MEV-EDX).

A Figura 4 apresenta o mapeamento em 2D em que observa-se as nanopartículas de prata representada por tons de vermelho dispersas no material com tamanho micrométrico (tons de cinza). As imagens 2D são construídas analisando a energia liberada da emissão O K α , P K α e Ag K α , indicando a distribuição desses elementos na área demarcada na micrografia. Foi possível observar que as amostras mostram distribuição uniforme de nanopartículas de prata no composto. Podem ser observados também os elementos oxigênio e fósforo, os quais são constituintes do TMP.

Na tabela 1 observa-se a CIM e CBM/CFM para as cepas de *Streptococcus mutans* e *Candida albicans* para os compostos avaliados neste estudo. Ambos os microrganismos foram susceptíveis aos compostos T1 e T10, entretanto a cepa de *Candida albicans* apresentou maior susceptibilidade para ambos os compostos testados (T1 e T10) e também para as NP-Ag. Apenas o *Streptococcus mutans* apresentou-se susceptível ao F, no entanto as concentrações avaliadas no presente estudo não foram bactericidas. O TMP e os demais reagentes utilizados na reação não apresentaram efeito antimicrobiano nas concentrações testadas.

Nas figuras 5 e 6 podemos observar as concentrações de TMP, F e Ag presentes nos compostos sintetizados na CIM e CFM/CBM obtida para as

cepas de *Candida albicans* e *Streptococcus mutans* (não foram consideradas as concentrações do agente redutor e estabilizante no gráfico).

Na figura 5 observa-se que a *Candida albicans* foi susceptível tanto ao composto T1 quanto ao T10 e que uma menor concentração de prata foi necessária para promover efeito antimicrobiano comparado ao composto contendo apenas NP-Ag, especialmente quando se observa a CFM. Para o *Streptococcus mutans* resultados semelhantes foram observados (Figura 6).

Na figura 7 observa-se a concentração de Ag^+ nos compostos T1 e T10 após a síntese e ao longo dos dias. Ocorreu redução dos íons prata durante o processo de síntese de 92,4% para o T1 e 97,3% para o T10 (dia 1) e não houve alterações na concentração iônica de prata ao longo do tempo nos compostos, os quais apresentaram mais de 90% da prata reduzida ao longo dos dias.

5. Discussão

Os inúmeros benefícios e aplicabilidades da nanotecnologia atualmente faz com que essa área desperte o interesse dos pesquisadores para melhorar a utilização de diversos materiais. Estudos avaliando as propriedades das NP-Ag como antimicrobianos e sua incorporação em novos compósitos tem aumentado ao longo dos últimos anos (Monteiro et al., 2009; Ge et al., 2014; Corrêa et al., 2015). As NP-Ag vem sendo cada vez mais exploradas principalmente devido a sua capacidade antimicrobiana sobre um amplo espectro de microrganismos (Monteiro et al., 2009, Rizzello e Pompa, 2014). Assim, possíveis associações com outros materiais pode proporcionar um efeito benéfico e sinérgico. A associação com polifosfatos, por exemplo, poderia proporcionar efeito antimicrobiano e atuar na mineralização com aplicabilidades médico-odontológicas importantes.

Neste estudo a síntese de NP-Ag ocorreu na presença de TMP e F, compostos que associados em uma proporção adequada proporcionam um efeito protetor maior comparado a produtos fluoretados convencionais nos processos de desmineralização e remineralização do esmalte dental (Danelon et al., 2013, 2014; Manarelli et al., 2015; Takeshita et al., 2015). Há várias vias químicas para obtenção de NP-Ag, que incluem processos químicos,

eletroquímicos, radiativos, fotoquímicos e biológicos (Yin et al., 2003; Zhu et al., 2001; Soliman et al., 2014; Zaarour et al., 2014; Prasad et al., 2014). De modo geral, estes processos envolvem a redução de íons prata através de um agente redutor na presença de um estabilizante coloidal e, dependendo do processo de síntese, o mecanismo de nucleação pode ter vias completamente diferentes, resultando em nanopartículas com forma e tamanho específicos.

Os nanocompostos sintetizados neste estudo foram preparados usando NaBH_4 como agente redutor de íons prata, sal de amônia de ácido polimetacrílico como agente estabilizante, nitrato de prata na concentração 1 e 10% em relação ao TMP e isopropanol como solvente. Assim, as NP-Ag foram geradas em uma dispersão de partículas de TMP e F obtendo-se um composto contendo o fosfato com a superfície decorada pelas NP-Ag. Foi possível observar com maior facilidade as NP-Ag decorando a superfície do TMP quando 10% de prata foram utilizados (Figura 3b) quando comparadas com a concentração de 1% de prata (Figura 3a) em relação ao TMP. Quando foi realizado o mapeamento em 2D através do EDX, observamos a presença de prata (vermelho) em ambos os compostos com 1 e 10% decorando a superfície do TMP (Figura 4).

Ambas as cepas avaliadas neste estudo foram susceptíveis aos compostos sintetizados, no entanto a *Candida albicans* foi mais susceptível. Os valores CIM e CFM para a *Candida albicans* foram de 182,8 $\mu\text{g/ml}$ e 2925 $\mu\text{g/ml}$ respectivamente para o composto T1, e 45,7 $\mu\text{g/ml}$ e 731,2 $\mu\text{g/ml}$ para o composto T10, já para o *Streptococcus mutans* os valores de CIM e CBM foram 5850 $\mu\text{g/ml}$ e 11700 $\mu\text{g/ml}$ respectivamente para o composto T1, e 1463 $\mu\text{g/ml}$ e 5850 $\mu\text{g/ml}$ para o composto T10.

O mecanismo antimicrobiano das NP-Ag ainda é discutido, no entanto as propriedades físico-químicas das nanopartículas como, por exemplo, a sua maior reatividade superficial pode influenciar positivamente no seu efeito contra microrganismos (Rizello e Pompa, 2014). Também, é relatado na literatura que as NP-Ag podem ancorar-se na membrana celular e penetrar na parede celular bacteriana, promovendo alterações estruturais e aumentando a permeabilidade, levando à morte celular (Morones et al., 2005; Rizzello e Pompa, 2014); possíveis interações com grupamentos tiol de enzimas vitais e

bases contendo fósforo, inibindo, assim, funções celulares, como a replicação de DNA e divisão celular (Ge et al., 2014). Além disso, é discutido na literatura sobre o efeito dos íons Ag^+ no mecanismo de ação antimicrobiano das NP-Ag. Lok et al. 2014 descreveram as NP-Ag como um sistema físico-químico de transporte de íons, ou seja, as NP-Ag funcionariam como um reservatório de íons facilitando a sua ação na célula microbiana. Os dados obtidos a partir da dosagem de íons prata mostraram que além de uma redução de mais de 90% dos íons, houve uma estabilidade das NP-Ag ao longo do tempo.

Assim, pode-se dizer que o efeito antimicrobiano contra *Candida albicans* e *Streptococcus mutans* está relacionado às NP-Ag. A maior susceptibilidade de células planctônicas de *Candida albicans* em comparação às de *Streptococcus mutans* pode estar relacionada à diferença estrutural nas respectivas membranas celulares (Malanovic et al., 2016). Os fungos são microrganismos eucariotas e a membrana é estruturalmente diferente das células bacterianas, embora ambos apresentem como principais componentes os fosfolipídios, que podem ser atacados pela nanopartículas de prata (Lara et al., 2015). De acordo com Lara et al., 2015, o efeito das NP-Ag nas células fúngicas está associado a uma mudança no potencial da membrana, formação de poros e perda de componentes intracelulares, produzindo apoptose celular. Outro fator que pode contribuir para explicar os resultados observados se refere à carga externa das membranas celulares destes microrganismos e das NP-Ag sintetizadas.

Estudos na literatura mostram que as NP-Ag reduzidas através do NaBH_4 apresentam uma carga negativa (Solomon et al., 2007; Tolaymat et al., 2010) e a membrana celular das bactérias também são carregadas negativamente em vista de fosfolipídios aniônicos, o que poderia causar uma repulsão e conseqüentemente dificultar o efeito microbiano sobre as células de *Streptococcus mutans*, enquanto que a carga em membranas de fungos é neutra, o que poderia facilitar a ação das NP-Ag (Malanovic et al., 2016). Os compostos T1 e T10 apresentaram efeito antimicrobiano, demonstrando que a associação de NP-Ag, TMP e F não prejudicou o efeito das NP-Ag. Além disso, o efeito antimicrobiano foi atingindo com uma concentração menor de NP-Ag para os dois compostos avaliados comparados à solução contendo apenas NP-

Ag (Figuras 5 e 6), o que permite o uso de uma menor quantidade de NP-Ag reduzindo a possibilidade de citotoxicidade.

Este resultado pode estar relacionado com as propriedades dos polifosfatos, como a adsorção em proteínas através de sítios de ligação amino e hidroxila (Li e Chang, 2008; Leone et al., 2008), o que poderia aumentar a disponibilidade de prata e melhorar o efeito antimicrobiano desses compostos.

O fluoreto apresentou efeito inibitório apenas sobre o crescimento do *Streptococcus mutans* quando uma concentração de 125 µg F/ml estava presente, mas não bactericida mesmo na maior concentração avaliada (1000 µg F/ml), sendo desta forma o efeito bactericida e fungicida dos compostos atribuídos à ação das NP-Ag, já que o TMP e nenhum outro reagente utilizado na reação apresentou efeito antimicrobiano nas concentrações avaliadas. Xu et al., 2015 e Dong et al., 2012 avaliaram o efeito antimicrobiano do F contra cepas de *Streptococcus mutans* e observaram efeito bactericida apenas quando concentrações de 4690 µg F/ml e 2500 µg F/ml, respectivamente, foram testadas.

6. Conclusão

Assim, neste estudo verificou-se um potencial para o desenvolvimento de novos nanocompostos formados por NP-Ag associadas à polifosfatos como o TMP e ao fluoreto. Foi observada eficácia antimicrobiana dos compostos sintetizados para ambos os microrganismos avaliados na forma planctônica, sendo que a *Candida albicans* apresentou maior susceptibilidade. Além disso, os resultados sugerem que o fosfato facilita a ação da NP-Ag, permitindo o uso de uma menor quantidade de NP-Ag. Mais estudos avaliando estes compostos em biofilmes, testes de citotoxicidade, além de estudos avaliando os processos de desmineralização e remineralização do esmalte são necessários para o desenvolvimento de novos produtos de higiene oral.

REFERÊNCIAS

1. Cheng L, Weir MD, Xu HH, Antonucci JM, Kraigsley AM, Lin NJ, Lin-Gibson S, Zhou X. Antibacterial amorphous calcium phosphate nanocomposites with a quaternary ammonium dimethacrylate and silver nanoparticles. *Dent Mater* 2012; 28:561–572.
2. Corrêa JM, Mori M, Sanches HL, Cruz AD, Poiate E, Poiate IAVP. Silver Nanoparticles in Dental Biomaterials. *Int J Biomater* 2015; ID:485275.
3. da Camara DM, Pessan JP, Francati TM, Souza JA, Danelon M, Delbem AC. Fluoride toothpaste supplemented with sodium hexametaphosphate reduces enamel demineralization in vitro. *Clin Oral Investig* 2016; 20:1981-1985.
4. Danelon M, Takeshita EM, Sasaki KT, Delbem AC. In situ evaluation of a low fluoride concentration gel with sodium trimetaphosphate in enamel remineralization. *Am J Dent* 2013; 26:15-20.
5. Danelon M, Takeshita EM, Peixoto LC, Sasaki KT, Delbem AC. Effect of fluoride gels supplemented with sodium trimetaphosphate in reducing demineralization. *Clin Oral Investig* 2014; 18:1119-1127.
6. das Neves PBA, Agnelli JAM, Kurachi C, de Souza CWO. Addition of Silver Nanoparticles to Composite Resin: Effect on Physical and Bactericidal Properties In Vitro. *Braz Dent J* 2014; 25:141-145.
7. de Carvalho FG, Silva DS, Hebling J, Spolidorio LC, Spolidorio DM. Presence of mutans streptococci and *Candida* spp. in dental plaque/dentine of carious teeth and early childhood caries. *Arch Oral Biol* 2006; 51:1024-1028.
8. do Amaral JG, Sasaki KT, Martinhon CC, Delbem AC. Effect of low-fluoride dentifrices supplemented with calcium glycerophosphate on enamel demineralization in situ. *Am J Dent* 2013; 26:75-80.
9. Dong L, Tong Z, Linghu D, Lin Y, Tao R, Liu J, Tian Y, Ni L. Effects of sub-minimum inhibitory concentrations of antimicrobial agents on *Streptococcus mutans* biofilm formation. *Int J Antimicrob Agents* 2012; 39:390-395.
10. Durán N, Durán M, de Jesus MB, Seabra AB, Fávaro WJ, Nakazato. Silver nanoparticles: A new view on mechanistic aspects on antimicrobial activity. *Nanomedicine* 2016; 12:789-799.
11. Ge, L., Li, Q., Wang, M., Ouyang, J., Li, X., and Xing, M.M. Nanosilver particles in medical applications: synthesis, performance, and toxicity. *Int J Nanomedicine* 2014; 9: 2399-2407.

12. Gonzalez M. Effect of trimetaphosphate ions on the process of mineralization. *J Dent Res* 1971; 50: 1056-1064.
13. Gregoire S, Xiao J, Silva BB, Gonzalez I, Agidi PS, Klein MI, Ambatipudi KS, Rosalen PL, Bauserman R, Waugh RE, Koo H. Role of glucosyltransferase B in interactions of *Candida albicans* with *Streptococcus mutans* and with an experimental pellicle on hydroxyapatite surfaces. *Appl Environ Microbiol* 2011; 77:6357-6367.
14. Lara, H.H., Romero-Urbina, D.G., Pierce, C., Lopez-Ribot, J.L., Arellano-Liménez, M.J., and Jose-Yacaman, M. Effect of silver nanoparticles on *Candida albicans* biofilms: an ultrastructural study. *J Nanobiotechnology* 2015; 13:91.
15. Leone G TP, Giardino R, Barbucci R. New phosphorylated derivatives of carboxymethylcellulose with osteogenic activity. *Polym Adv Technol* 2008; 19:824-830.
16. Li X, Chang J. Preparation of bone-like apatite-collagen nanocomposites by a biomimetic process with phosphorylated collagen. *J Biomed Mater Res Part A*. 2008; 85:293-300.
17. Loesche WJ. Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. *Microbiol Rev* 1986; 50:353-380.
18. Lok CN, Zou T, Zhang JJ, Lin IW, Che CM. Controlled-release systems for metal-based nanomedicine: encapsulated/self-assembled nanoparticles of anticancer gold(III)/platinum(II) complexes and antimicrobial silver nanoparticles. *Adv Mater* 2014; 20:5550-5557.
19. Malanovic N, Lohner K. Gram-positive bacterial cell envelopes: The impact on the activity of antimicrobial peptides. *Biochim Biophys Acta* 2016; 1858:936-946.
20. Manarelli MM, Delbem AC, Binhardi TD, Pessan JP. In situ remineralizing effect of fluoride varnishes containing sodium trimetaphosphate. *Clin Oral Investig* 2015; 19: 2141-2146.
21. Marsh PD. Microbiologic aspects of dental plaque and dental caries. *Dent Clin North Am* 1999; 43:599-614.
22. Miranda M, Fernández A, Lopez-Esteban S, Malpartida F, Moya JS, Torrecillas R. Ceramic/metal biocidal nanocomposites for bone-related applications. *J Mater Sci Mater Med* 2012; 23:1655-1662.
23. Monteiro DR, Gorup LF, Takamiya AS, Ruvollo-Filho AC, de Camargo ER, Barbosa DB. The growing importance of materials that prevent microbial adhesion: antimicrobial effect of medical devices containing silver. *Int J Antimicrob Agents* 2009; 34:103-110.

24. Moreira DM, Oei J, Rawls HR, Wagner J, Chu L, Li Y, Zhang W, Whang K. A novel antimicrobial orthodontic band cement with in situ-generated silver nanoparticles. *Angle Orthod* 2015; 85:175-183.
25. Morones JR, Elechiguerra JL, Camacho A, Holt K, Kouri JB, Ramírez JT, Yacaman MJ. The bactericidal effect of silver nanoparticles. *Nanotechnology* 2005; 16:2346–2353.
26. Nam KY. In vitro antimicrobial effect of the tissue conditioner containing silver nanoparticles. *J Adv Prosthodont* 2011; 3:20–24.
27. Panáček A, Kvítek L, Prucek R, Kolár M, Vecerová R, Pizúrová N, et al. Silver colloid nanoparticles: synthesis, characterization, and their antibacterial activity. *J Phys Chem B* 2006; 110:16248–16253.
28. Pessan JP, Toumba KJ, Buzalaf MA. Topical use of fluorides for caries control. *Monogr Oral Sci* 2011; 22:115-132.
29. Prasad R. Synthesis of Silver Nanoparticles in Photosynthetic Plants. *Journal of Nanoparticles* 2014; ID:963961.
30. Rizzello L, Pompa PP. Nanosilver-based antibacterial drugs and devices: mechanisms, methodological drawbacks, and guidelines. *Chem Soc Rev* 2014; 43:1501-1518.
31. Samiei M, Aghazadeh M, Lotfi M, Shakoei S, Aghazadeh Z, Pakdel SMV. Antimicrobial efficacy of mineral trioxide aggregate with and without silver nanoparticles. *Iran Endod Journal* 2013; 8:166–170.
32. Soliman YS. Gamma-radiation induced synthesis of silver nanoparticles in gelatin and its application for radiotherapy dose measurements. *Radiat Phys Chem* 2014; 102:60-67.
33. Solomon SD, Bahadory M, Jeyarajasingam AV, Rutkowsky SA, Boritz C. Synthesis and Study of Silver Nanoparticles. *J Chem Educ* 2007; 84:322-325.
34. Takeshita EM, Castro LP, Sasaki KT, Delbem AC. In vitro evaluation of dentifrice with low fluoride content supplemented with trimetaphosphate. *Caries Res* 2009; 43:50-56.
35. Takeshita EM, Danelon M, Castro LP, Sasaki KT, Delbem AC. Effectiveness of a Toothpaste with Low Fluoride Content Combined with Trimetaphosphate on Dental Biofilm and Enamel Demineralization in situ. *Caries Res* 2015; 49:394-400.
36. Tolaymat TM, El Badawy AM, Genaidy A, Scheckel KG, Luxton TP, Suidan M. An evidence-based environmental perspective of manufactured silver nanoparticle in syntheses and applications: a systematic review and critical appraisal of peer-reviewed scientific papers. *Sci Total Environ* 2010; 408:999-1006.

37. Xu YT, Wu Q, Chen YM, Smales RJ, Shi SY, Wang MT. Antimicrobial effects of a bioactive glass combined with fluoride or triclosan on *Streptococcus mutans* biofilm. *Arch Oral Biol* 2015; 60:1059-1065.
38. Yin B, Ma H, Wang S, Chen S. Electrochemical Synthesis of Silver Nanoparticles under Protection of Poly(N-vinylpyrrolidone). *J Phys Chem B* 2003; 107:8898-8904.
39. Zaarour M, El Roz M, Dong B, Retoux R, Aad R, Cardin J, Dufour C, Gourbilleau F, Gilson JP, Mintova S. Photochemical Preparation of Silver Nanoparticles Supported on Zeolite Crystals. *Langmuir* 2014; 30:6250-6256.
40. Zhu J, Liao X, Chen HY. Electrochemical preparation of silver dendrites in the presence of DNA. *Mater Res Bull* 2001; 36:1687-1692.

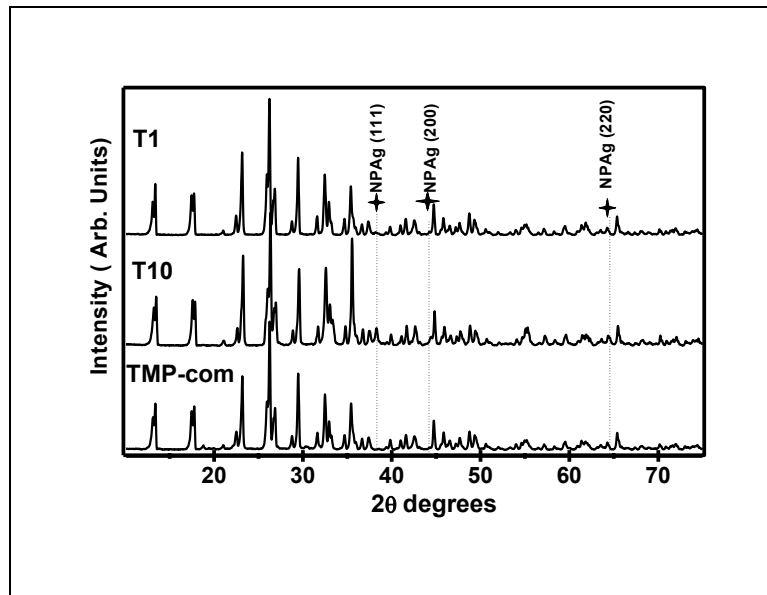


Figura 1. Padrões de DRX do trimetafosfato de sódio comercial e dos compostos sintetizados.

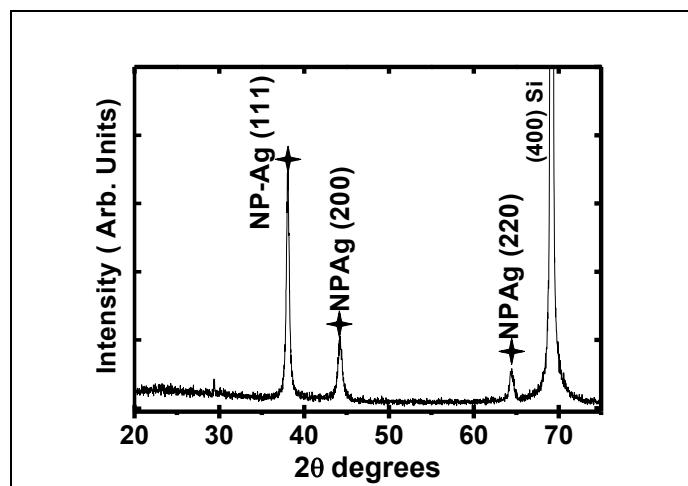


Figura 2. Padrões de DRX das nanopartículas de prata

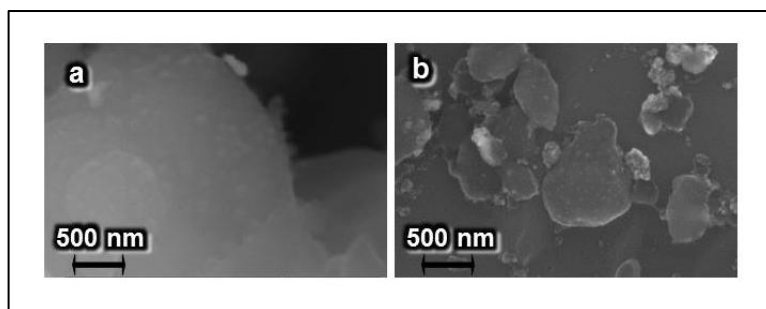


Figura 3. Imagens de MEV a: composto T1 b: composto T10

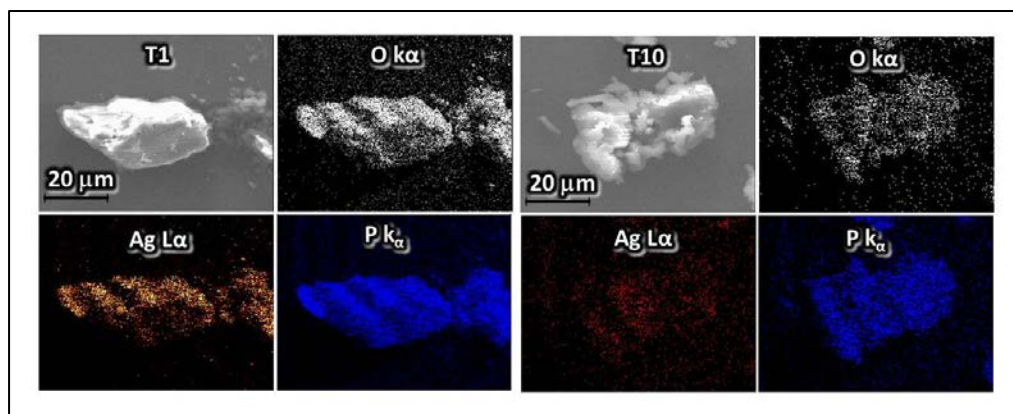


Figura 4. Análise da distribuição de nanopartículas de prata através do mapeamento 2D da emissão de elementos O K α , P K α , Ag L α dos compostos T1 e T10

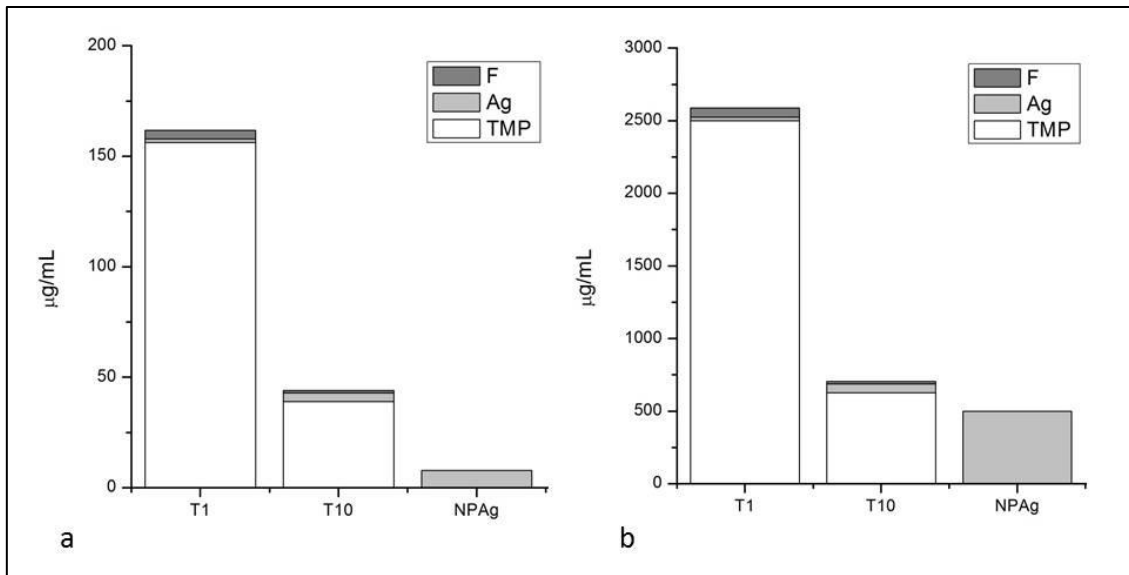


Figura 5. Concentrações de TMP, F e Ag presentes na mínima concentração inibitória (a) e mínima concentração fungicida (b) apresentada pelos compostos contra cepas de *Candida albicans*

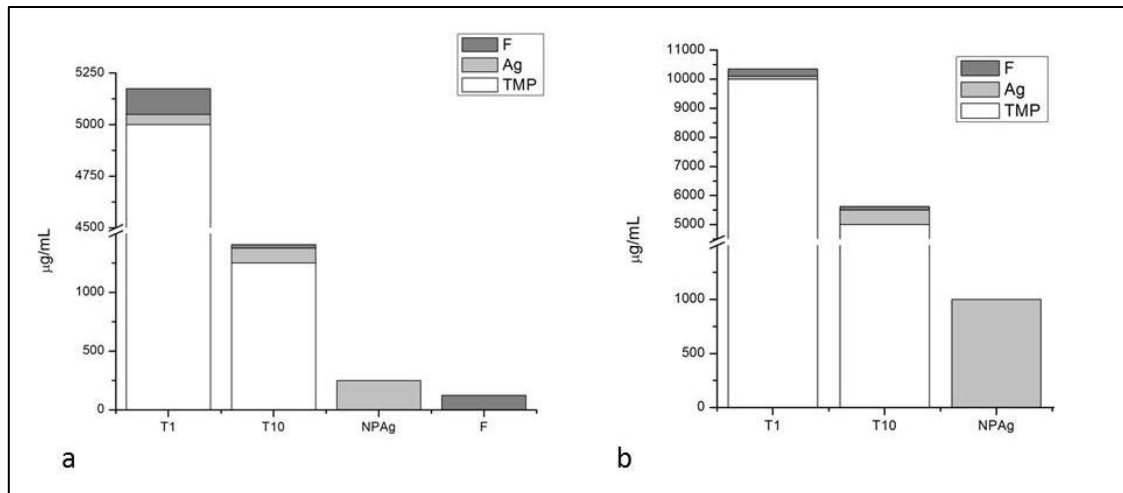


Figura 6. Concentrações de TMP, F e Ag presentes na mínima concentração inibitória (a) e mínima concentração bactericida (b) apresentada pelos compostos contra cepas de *Streptococcus mutans*.

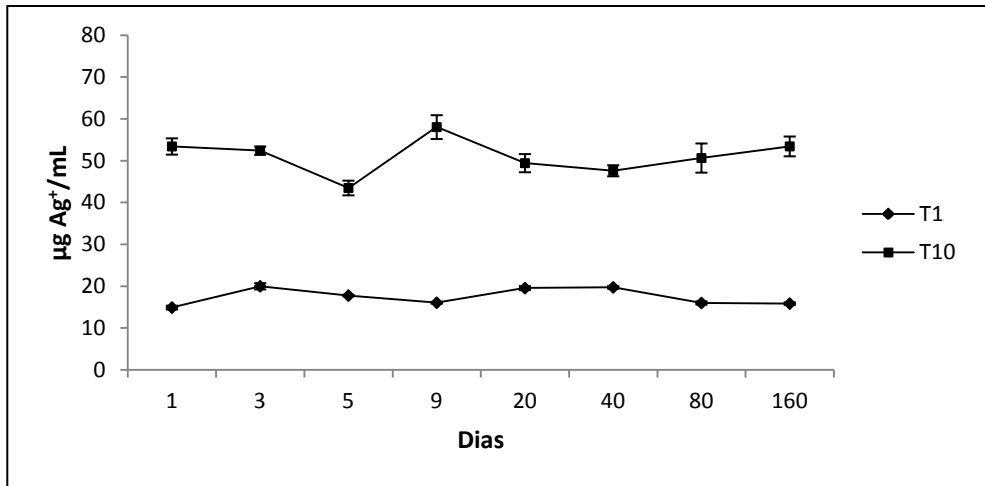


Figura 7. Análise da concentração de prata iônica (Ag^+) nos compostos T1 e T10 ao longo dos dias.

Tabela 1. Concentração inibitória mínima (CIM) e bactericida/fungicida (CBM/CFM) obtida de acordo com os compostos avaliados

Grupos	<i>S. mutans</i>		<i>C. albicans</i>	
	CIM ($\mu\text{g/mL}$)	CBM ($\mu\text{g/mL}$)	CIM ($\mu\text{g/mL}$)	CFM ($\mu\text{g/mL}$)
<i>T1</i>	5850	11700	182,81	2925
<i>T10</i>	1463	5850	45,70	731,25
<i>NP-Ag</i>	250	1000	7,81	500
<i>F</i>	125	>1000	>1000	>1000
<i>TMP</i>	>100000	>100000	>100000	>100000
<i>CLO</i>	0,93	3,82	3,75	15,00