

DOUGLAS ROBERTO MONTEIRO

**Análise da incorporação de nanopartículas de
prata a uma resina acrílica para base
protética**

Araçatuba – SP

2009

DOUGLAS ROBERTO MONTEIRO

**Análise da incorporação de nanopartículas de
prata a uma resina acrílica para base
protética**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia do
Campus de Araçatuba – Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”- UNESP, para obtenção do
Título de MESTRE EM ODONTOLOGIA (Área de
concentração em Prótese Dentária).

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

Araçatuba – SP

2009

Catálogo-na-Publicação

Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

Monteiro, Douglas Roberto

M775a Análise da incorporação de nanopartículas de prata a uma resina
acrílica para base protética / Douglas Roberto Monteiro. - Araçatuba :
[s.n.], 2009
98 f. : il. ; tab.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Odontologia, Araçatuba, 2009
Orientador: Prof^a. Dr^a.Débora Barros Barbosa

1. Nanotecnologia 2. Prata 3. Polimetil metacrilato 4. Bases de
Dentadura

Black D3
CDD 617.69

DADOS CURRICULARES

DOUGLAS ROBERTO MONTEIRO

NASCIMENTO	25/06/1981 - ARAÇATUBA – SP
FILIAÇÃO	Paulo Roberto Monteiro Lourdes Eufrásia Machado Monteiro
2002/2005	Curso de Graduação em Odontologia Faculdade de Odontologia de Araçatuba - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.
2006/2006	Curso de Aperfeiçoamento em Prótese Parcial Fixa Faculdade de Odontologia de Araçatuba - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.
2007/2009	Curso de Pós-Graduação em Odontologia, área de concentração em Prótese Dentária, nível de Mestrado Faculdade de Odontologia de Araçatuba - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

DEDICATÓRIA

Aos meus queridos pais, Lourdes e Paulo

Que me deram a vida e me ensinaram a vivê-la com dignidade. A vocês que se doaram por inteiro e renunciaram aos seus sonhos para que eu, muitas vezes, pudesse realizar os meus, a minha eterna gratidão. Obrigado pela educação valiosa, presença constante, apoio, compreensão e amor que sempre me concederam. Saibam que sempre procurarei retribuir tudo o que fizeram por mim. Vocês são os maiores responsáveis para que eu pudesse realizar esse sonho e sempre seguirei me espelhando em vocês, meus ídolos. Exemplos de caráter, honestidade e amor incondicional, representam a fonte de alegria que ilumina a minha vida. A emoção e o amor infinito que sinto por vocês jamais serão traduzidos por palavras.

À minha querida irmã Michele

Pessoa amantíssima que, para mim, sempre significou muito mais do que uma irmã: minha melhor amiga, conselheira, a pessoa que sempre se preocupou para que eu tivesse uma ótima formação moral e intelectual. Obrigado por ser esta pessoa tão especial, doce e carismática que encanta a todos ao seu redor, por compartilharmos incríveis momentos, desde a nossa infância até o nosso amadurecimento como pessoas, pelo seu companheirismo, serenidade e bondade. É um orgulho ser seu irmão e meu amor por você é gigantesco. Parabéns por ser

uma mãe exemplar para a Beatriz. Seu carinho, apoio, incentivo e atenção estarão guardados para sempre em meu coração.

Ao meu cunhado George

Por acreditar em mim e pelo incentivo para que eu seguisse em frente na vida profissional. Muito obrigado pela força, apoio, compreensão e respeito destinados a mim. Parabéns pelo pai que você é e por ser tão amoroso e carinhoso com a minha irmã e minha sobrinha.

À minha sobrinha Beatriz

Você é uma bênção de Deus e tem transformado nossas vidas. Sua chegada nos encheu de alegria e empolgação. Obrigado Senhor por colocar esse ser tão especial em nossas vidas. A cada dia que passa você está mais linda. Bia, que Jesus abençoe muito sua caminhada e que Maria a acolha sempre sob seu Manto Sagrado. Meu amor por você é tão forte que não tem explicação.

Aos meus avós Gabriel (in memoriam), Hélia (in memoriam), José

Rafael e Natalina.

Por terem constituído lindas famílias, das quais me sinto honrado e orgulhoso de fazer parte. Obrigado pelo amor, carinho, incentivo e dedicação demonstrados por mim em toda a minha vida. Amo-os muito. Vô Gabriel e Vó Hélia, sei que aí do céu estão orando e velando por mim em todos os dias de minha vida. Vô José

Rafael e Vó Natalina desculpem-me por às vezes estar ausente, mas tenham certeza de que sou muito orgulhoso por tê-los como avós.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

A Deus

Pai de todos nós, que em sua bondade me abençoou para alcançar e vencer mais esta etapa em minha vida. Obrigado Senhor por guiar todos os meus passos segundo seus ensinamentos; por estar sempre me dando forças para ultrapassar todas as barreiras da minha vida e por ter inserido em meu convívio a amizade de tantas pessoas queridas, durante um período tão especial de minha vida.

Aos meus pais, minha irmã, meu cunhado e minha sobrinha

Obrigado por tudo o que fazem por mim, por acreditarem no meu potencial, pelo amor e carinho que me dedicam e pelo que representam. Vocês me enchem de orgulho e alegria. Esta conquista também é de vocês.

À minha orientadora, Prof^a. Ass. Dr^a. Débora Barros Barbosa

Querida Professora Débora. Minha admiração pela sua fé, integridade, generosidade e companheirismo só me faz sentir orgulho de ser seu orientado. Essa admiração começou bem antes do mestrado quando, na época da graduação, no final do ano de 2003, comecei a trabalhar com você em minha primeira etapa desta caminhada. A partir daí, a convivência nos laboratórios, clínicas e aulas me despertou o interesse pelo ensino e pesquisa. Sua forma de conduzir a orientação

com tranquilidade, competência, amizade, sinceridade e honestidade torna o nosso ambiente de trabalho muito prazeroso. Obrigado por me passar sua experiência, conhecimento e compartilhar de momentos tão maravilhosos. Agradeço também pela compreensão e por abdicar parte de seu tempo a mim. Parabéns pela idéia brilhante do tema deste trabalho. Espero ter correspondido à sua confiança. Foi através do amor de Deus que nos conhecemos e é por esse amor que a nossa amizade se tornou tão bonita. Um grande abraço de carinho e eterna gratidão, em meu nome e em nome de toda a minha família.

AGRADECIMENTOS

À *Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP*, na pessoa de seu diretor ***Prof. Dr. Pedro Felício Estrada Bernabé***, pela acolhida durante o curso de graduação e pós-graduação e pela oportunidade de crescimento pessoal e profissional.

Ao *Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese* da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP, representado por todos os seus professores e funcionários, pela oportunidade de cursar o mestrado e pelo convívio com tantas pessoas maravilhosas.

Ao *Departamento de Odontopediatria* da Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP, especialmente à pessoa do ***Prof. Adj. Alberto Carlos Botazzo Delbem***, por permitir a utilização de equipamentos imprescindíveis na execução deste trabalho.

Ao atual *coordenador do Programa de Pós-Graduação em Odontologia*, da Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP, ***Prof. Dr. Idelmo Rangel Garcia Júnior***, pela sabedoria e competência.

À *Universidade Federal de São Carlos – UFSCar*, pela receptividade e oportunidade de aprendizado.

Ao *Departamento de Química* da Universidade Federal de São Carlos – UFSCar e ao *LIEC (Laboratório Interdisciplinar de Eletroquímica e Cerâmica)*, por permitirem o uso dos seus equipamentos em suas instalações.

Ao *Prof. Adj. Wirley Gonçalves Assunção*, homem de caráter irretocável e mestre por excelência. Sua competência e capacidade profissional são notáveis. Muito de minha formação profissional e pessoal devo à sua generosa colaboração. É um prazer e um orgulho tê-lo como mestre.

Ao *Prof. Adj. Wilson Roberto Poi*, pela amizade, carinho e apoio e a todos os *docentes do Programa de Pós-Graduação em Odontologia* pelo convívio e ensinamentos transmitidos.

Ao *Prof. Adj. Emerson Rodrigues de Camargo* do Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos - UFSCar, por ter sido sempre atencioso, paciente, prestativo e cordial. Sua capacidade e inteligência são admiráveis. Muito obrigado por toda a sua contribuição no desenvolvimento deste projeto e pela amizade.

Ao *Prof. Dr. Adhemar Collà Ruvolo Filho* do Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos - UFSCar que, com seu conhecimento incontestável, promoveu essenciais discussões sobre o tema deste trabalho. Sempre solícito, não me negou atenção nem mediu esforços para contribuir com

esta pesquisa. Muito obrigado pelo seu generoso gesto de compartilhar conhecimentos.

Ao **Prof. Adj. Edenír Rodrigues Pereira Filho** do Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos – UFSCar, pela contribuição nas análises de Espectroscopia de Absorção Atômica.

Ao **Prof. Titular Marco Antonio Compagnoni**, à **Prof^a Dr^a Ana Carolina Pero** e aos alunos de pós-graduação **Juliê Marra e André Paleari** do Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP, por toda a contribuição e apoio no início deste trabalho.

À funcionária **Maria dos Santos Ferreira Fernandes** do Departamento de Odontopediatria, pessoa tão amável e atenciosa, sempre solícita, nunca me negou ajuda. Muito obrigado pela convivência, disponibilidade e prestatividade durante a realização deste trabalho.

Aos excelentes **funcionários da seção de Pós-graduação** da Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP: **Diogo, Marina e Valéria**, que sempre muito simpáticos e atenciosos me ajudaram quando precisei.

Aos **funcionários da Biblioteca** da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP, obrigado por todo o apoio, suporte e atenção dispensados a mim.

À minha grande amiga *Aline Satie Takamiya*, pela agradável convivência, pelo companheirismo, pelos momentos de descontração e por se dispor integralmente a me ajudar na execução deste trabalho, abdicando muitas vezes de seus afazeres. Obrigado pela amizade sincera e espero poder desfrutar de sua companhia por anos a vir.

Ao meu amigo químico *Luiz Fernando Gorup*, exemplo de bondade, dedicação e simplicidade. Muito obrigado pela ajuda fundamental no desenvolvimento deste projeto e pela paciência em me atender com prestatividade em todos os momentos que precisei. Sem a sua ajuda e paciência a realização deste trabalho não seria possível. Agradeço também ao acadêmico *Daniel* por toda a sua colaboração nas análises das amostras.

Ao meu grande amigo *Aldiéris Alves Pesqueira*, por ter compartilhado comigo todos os momentos deste mestrado, de alegria e de tristeza, de trabalho e de diversão. Agradeço por sua amizade e por não medir esforços para me ajudar. Você é uma das pessoas mais divertidas e competentes que já conheci e espero estar ao seu lado em muitas conquistas ainda por vir.

Ao meu grande amigo *Valentim Adelino Ricardo Barão*, exemplo de competência e inteligência. Obrigado por toda a ajuda, pelo carinho, preocupação e pela confiança depositada em mim. Agradeço também por todos os momentos bons e ruins que compartilhamos durante estes anos; momentos estes que consolidaram em nós uma amizade que nunca acabará.

Aos meus amigos **Jônatas Caldeira Esteves, Marcelo Alexandre, Maria Elídia e Maristela Bonato**, amigos amáveis, carinhosos e atenciosos. Muito obrigado pela amizade que perdura até os dias de hoje e também por sempre estarem ao meu lado, fortalecendo e alegrando a minha vida. Amo muito vocês.

Às minhas amigas **Marcela Haddad, Luciana (Ladir) e Daniele Micheline dos Santos**, pessoas de enorme bondade. Ter vocês como amigas é um enorme privilégio para mim. Obrigado por toda força e pelos momentos incríveis que temos passado juntos.

Aos meus amigos de turma de mestrado: **Aldiéris, Bianca, Cristina, Juliana, Paula (Docinho) e Renato**, pela amizade, vivências e experiências compartilhadas. Desejo a todos vocês muito sucesso.

Ao meu amigo **Reginaldo Rodrigues**, pessoa extremamente alegre e receptiva. Obrigado pelos momentos de diversão e por sempre me acolher em sua casa.

À minha amiga **Aline Úrsula**, pessoa que transborda alegria. Obrigado por fazer parte da minha vida e por todos os momentos maravilhosos que a sua companhia tem me proporcionado.

Às minhas amigas da Odontopediatria **Fernanda, Eliana Takeshita, Luciene e Marcele**. Conviver com pessoas como vocês é uma dádiva de Deus. Obrigado por terem sempre me ajudado quando precisei.

Ao meu amigo *Carlos Galbe*. Tenho um grande respeito pelo excelente profissional que é e pelo grande caráter. Apesar da distância, sinto de você a vibração positiva que certamente muito me fortalece. Obrigado pela sua amizade.

Às grandes amigas *Juliana Martinho e Jaqueline Mendes*, pessoas amáveis e divertidíssimas. Obrigado por todos os momentos agradáveis que vocês me proporcionaram nesses anos de intensa amizade. Adoro vocês.

Aos amigos *Adailton Borges e Gleuber Pereira*, pelos anos agradáveis de convivência. Tenho certeza que a nossa amizade irá transpor as barreiras da distância que o destino providenciou e que ainda compartilharemos muitos momentos de alegria.

À *Maria Cristina Cecolin*, exemplo de superação e competência. Parabéns pela linda família. Agradeço por sua amizade e por ser um braço direito para mim.

A todos os meus *colegas e amigos de Pós-Graduação* que, de alguma maneira, contribuíram para esta conquista.

A todos os *meus amigos e familiares*, pelo amor, carinho, apoio, compreensão e respeito destinados a mim. Vocês estão em meu coração.

“Superação é ter a humildade de aprender com o passado, não se conformar com o presente e desafiar o futuro”.

Hugo Bethlem

Monteiro DR. **Análise da incorporação de nanopartículas de prata a uma resina acrílica para base protética** [dissertação]. Araçatuba: Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual Paulista; 2008.

RESUMO

O objetivo do presente estudo foi avaliar a incorporação de nanopartículas de prata a uma resina acrílica para base protética por meio de testes de liberação em água deionizada por diferentes períodos e através de análises da distribuição e dispersão destas partículas na massa polimérica. Utilizou-se a resina acrílica termopolimerizável Lucitone 550 e as nanopartículas de prata foram sintetizadas por meio da redução dos íons prata do nitrato de prata pelo citrato de sódio. A forma e o tamanho das partículas foram confirmados por microscopia eletrônica de varredura (MEV) e de transmissão (MET), tendo-se obtido partículas na forma esférica e com tamanho médio de 60 nm. A resina acrílica foi proporcionada de acordo com as instruções do fabricante e a solução coloidal de nanopartículas de prata foi adicionada ao componente líquido da resina acrílica nas concentrações de 0,05%, 0,5% e 5% baseadas na massa do polímero. Após o processamento laboratorial, os espécimes foram armazenados em água deionizada à 37°C por 7, 15, 30, 60 e 120 dias. As amostras de cada solução foram analisadas por espectroscopia de absorção atômica. Espécimes antes e após 120 dias de imersão em água foram analisados por MEV para caracterização morfológica do nanocompósito. Não houve liberação de prata detectável pelo aparelho, independentemente da concentração de colóide adicionada ao polímero e do

tempo de imersão em água deionizada. As microscopias mostraram que, de uma forma geral, quanto menor a concentração de colóide de prata adicionada, menor a distribuição e maior a dispersão das partículas no polímero. Também ocorreu uma tendência das nanopartículas localizarem-se, principalmente, na superfície externa dos espécimes após 120 dias de armazenamento. Concluiu-se que houve incorporação das nanopartículas de prata ao polímero da resina acrílica e estas não foram liberadas em água por até 120 dias, e a sua distribuição e dispersão na matriz polimérica variaram em função da concentração adicionada e do período de armazenamento.

Palavras-chave: Nanotecnologia, Prata, Polimetil Metacrilato, Bases de Dentadura.

Monteiro DR. **Evaluation of an acrylic denture base resin with added silver nanoparticles** [dissertation]. Araçatuba: UNESP - São Paulo State University; 2008.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the incorporation of silver nanoparticles to an acrylic denture base resin by testing the silver release in deionized water at different times, and through morphological analysis to check the distribution and dispersion of these particles in the polymer. The heat-polymerised acrylic resin Lucitone 550 was used and the silver nanoparticles were synthesized by reduction of silver nitrate with sodium citrate. The form and size of the particles were confirmed by scanning and transmission electron microscopy. Most of the particles showed a diameter of about 60 nm and spherical form. The acrylic resin was prepared in accordance with the manufacturers' instructions and silver nanoparticles solution was added to the monomer of the acrylic resin in the concentrations of 0.05wt%, 0.5wt% and 5wt%. The specimens were stored in deionized water at 37°C for 7, 15, 30, 60 and 120 days, and each solution was analyzed by atomic absorption spectroscopic. The specimens were characterized by scanning electron microscopy before and after their immersion in water. Silver was not detected in deionized water regardless of the silver nanoparticles added to the polymer and of the storage period. The micrographs usually showed that when lower concentrations of silver nanoparticles were added, the particles distribution was reduced whereas their dispersion was improved into the polymer. Moreover,

nanoparticles were mainly located at the surface of the specimens after 120 days of storage. The results showed that the silver nanoparticles were incorporated in the denture base resin polymer, and these nanoparticles were not detected in deionized water for up to 120 days. Moreover, the distribution and dispersion of the particles in the polymer changed with the silver concentration added and the period of storage.

Key-words: Nanotechnology, Silver, Polymethyl Methacrylate, Denture Bases.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** Ilustração esquemática da síntese de nanopartículas de prata na forma coloidal por meio da redução dos íons prata do nitrato de prata pelo citrato de sódio 57
- Figura 2** Gráfico de absorvância versus comprimento de onda do colóide obtido a partir da reação de redução da prata pelo citrato de sódio na temperatura de 97°C. O gráfico mostra a banda plasmon de absorção característica de nanopartículas de prata. 58
- Figura 3** MEV das nanopartículas de prata sintetizadas via redução dos íons prata do nitrato de prata pelo citrato. O substrato de silício foi degradado por KOH por 2 horas e a prata coloidal foi depositada sobre o substrato e secada para se obter a imagem. Essa técnica ilustra claramente a forma e o tamanho das nanopartículas de prata (os pontos claros representam nanopartículas de prata com tamanho médio de 60 nm). Aumento: 90,75 Kx 59
- Figura 4** MET das nanopartículas de prata, onde se adicionou uma gota de colóide sobre grades de cobre recobertas com filme fino de carbono. Os pontos claros representam as partículas de prata com diâmetro médio de 60 nm. Aumento: 64,84 Kx 60
- Figura 5** Difractograma de raios-X das nanopartículas de prata em substrato de silício com seus planos de reflexão indexados 61
- Figura 6** Espectros de absorvância para prata em função do tempo encontrados para: **(a)** solução padrão contendo 0,5 mg de AgNO_3/L ; **(b)** exemplo de uma das amostras

analisadas e que se assemelhou às demais avaliadas para as diferentes concentrações e períodos de tempo (7, 15, 30, 60 e 120 dias). O espectro claro indica a absorvância da água deionizada

62

Figura 7

Ação da rodanina por 24 horas em: **(a)** solução de nitrato de prata e **(b)** líquido retirado da amostra onde o nanocompósito com maior concentração de prata ficou imerso por 120 dias. O teste do reagente orgânico indicou presença de Ag^+ na solução de nitrato de prata **(a)** e ausência de Ag^+ na solução em que o nanocompósito ficou imerso por 120 dias **(b)**.

63

Figura 8

MEV evidenciando sucessivos aumentos da superfície externa do nanocompósito PMMA/Ag contendo 0,05% de solução coloidal de nanopartículas de prata. **(a)**, **(b)**, **(c)** e **(d)** antes da imersão em água deionizada. **(e)**, **(f)**, **(g)** e **(h)** após 120 dias de imersão. Aumento: **(a)** 1,69 Kx; **(b)** 6,34 Kx; **(c)** 50,93 Kx; **(d)** 61,20 Kx; **(e)** 14,29 Kx; **(f)** 31,81 Kx; **(g)** 61,89 Kx; **(h)** 79,98 Kx

64

Figura 9

MEV com sucessivos aumentos da superfície de fratura (interna) do nanocompósito PMMA/Ag contendo 0,05% de solução coloidal de nanopartículas de prata. **(a)**, **(b)**, **(c)** e **(d)** antes da imersão em água deionizada. **(e)**, **(f)**, **(g)** e **(h)** após 120 dias de imersão. Aumento: **(a)** 1,61 Kx; **(b)** 5,31 Kx; **(c)** 10,01 Kx; **(d)** 42,49 Kx; **(e)** 2,00 Kx; **(f)** 7,24 Kx; **(g)** 20,00 Kx; **(h)** 76,74 Kx

65

Figura 10

MEV da superfície externa do nanocompósito PMMA/Ag contendo 0,5% de solução coloidal de nanopartículas de prata. **(a)** e **(b)** antes da imersão em água deionizada. **(c)**, **(d)**, **(e)** e **(f)** após 120 dias de imersão. Em **(a)** e **(b)** as áreas mais claras podem ser um indicativo de artefato de técnica. As setas vermelhas em **(b)** sugerem algumas partículas de prata na superfície do

	espécime. Aumento: (a) 5,47 Kx; (b) 24,11 Kx; (c) 8,03 Kx; (d) 82,17 Kx; (e) 61,05 Kx; (f) 71,53 Kx	66
Figura 11	MEV da superfície de fratura do nanocompósito PMMA/Ag contendo 0,5% de solução coloidal de nanopartículas de prata. (a), (b), (c) e (d) antes da imersão em água deionizada. (e) e (f) após 120 dias de imersão. Aumento: (a) 499 x; (b) 1,40 Kx; (c) 22,61 Kx; (d) 29,53 Kx; (e) 10,01 Kx; (f) 73,67 Kx	67
Figura 12	MEV da superfície externa do nanocompósito PMMA/Ag contendo 5% de solução coloidal de nanopartículas de prata. (a), (b), (c) e (d) antes da imersão em água deionizada. (e), (f), (g) e (h) após 120 dias de imersão. Aumento: (a) 2,32 Kx; (b) 5,58 Kx; (c) 13,00 Kx; (d) 63,14 Kx; (e) 5,00 Kx; (f) 15,00 Kx; (g) 35,00 Kx; (h) 60,00 Kx	68
Figura 13	MEV da superfície de fratura do nanocompósito PMMA/Ag contendo 5% de solução coloidal de nanopartículas de prata. (a), (b), (c) e (d) antes da imersão em água deionizada. (e), (f), (g) e (h) após 120 dias de imersão. As figuras (f), (g) e (h) representam sucessivos aumentos da área indicada com a seta na figura (e). Aumento: (a) 1,28 Kx; (b) 13,55 Kx; (c) 64,00 Kx; (d) 69,79 Kx; (e) 1,00 Kx; (f) 10,00 Kx; (g) 25,00 Kx; (h) 150,00 Kx	69
Figura 14	MEV da resina acrílica sem nanopartículas de prata. (a) e (b) superfície externa, (c) e (d) superfície de fratura. Área central em (b) indicando um poro ou defeito na superfície do polímero. Aumento: (a) 25,00 Kx; (b) 50,00 Kx; (c) 5,00 Kx; (d) 15,00 Kx	70
ANEXOS	Materiais e Métodos, Resultados e Normas para publicação	71
Figura 1	a) Soluções de nitrato de prata e citrato de sódio	

	utilizadas na síntese das nanopartículas de prata; b) balão de fundo redondo conectado a um condensador e ao espectrofotômetro de UV/Vis, contendo no seu interior as soluções que foram mantidas sob agitação magnética e aquecimento a 97°C por cerca de 10 minutos	72
Figura 2	Solução coloidal de nanopartículas de prata com tonalidade amarelo âmbar, que é um dos indicativos da formação destas nanopartículas	72
Figura 3	Espectrofotômetro UV-Vis Shimadzu Multspec 1501 utilizado durante a síntese para acompanhar a formação das nanopartículas de prata	73
Figura 4	Difratômetro de raios-X, Rigaku DMax-2000PC, com anodo rotatório e radiação CuK_α ($\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$), utilizado para confirmar a presença de prata na solução coloidal	74
Figura 5	a) Matriz metálica com réplica maciça do espécime de resina acrílica localizada centralmente em sua base; b) condensação manual do silicone no interior da matriz metálica; c) silicone no interior da matriz após condensação deste material; d) molde em silicone vazado já pronto	75
Figura 6	a) Perfuração do molde com agulha para passagem do fio de silicone; b) aspecto do molde em silicone após a passagem do fio; c) moldes em silicone fixados sobre uma lâmina de vidro; d) interior dos moldes preenchidos com cera utilidade	76
Figura 7	a) Moldes em silicone preenchidos com cera utilidade e incluídos em gesso no interior da mufla; b) lâmina de vidro posicionada sobre os moldes incluídos e fixada com cera utilidade; c) encaixe da contra-mufla e preenchimento da mesma com gesso pedra tipo III; d)	

	prensagem da mufla metálica e eliminação dos excessos de gesso	76
Figura 8	a) Remoção da cera utilidade do interior dos moldes em silicone com auxílio de um holleback; b) eliminação dos resíduos de cera com algodão e acetona pura; c) interior dos moldes limpos e prontos para receberem a resina acrílica; d) lâmina de vidro posicionada na superfície do gesso pedra da contra-mufla	77
Figura 9	a) Resina acrílica e b) solução coloidal de nanopartículas de prata para ser adicionada ao PMMA	78
Figura 10	a) Espátula, pote de vidro e tampa utilizados para a mistura do polímero, monômero e colóide de prata; b) mistura da solução coloidal de nanopartículas de prata com o monômero; c) acréscimo do polímero à solução de monômero contendo o colóide de prata	79
Figura 11	Aspecto do espécime após desinclusão e preso ao fio de silicone	79
Figura 12	a) Fio de silicone fixo à tampa do tubo de polipropileno; b) espécimes imersos em água deionizada no interior dos tubos de polipropileno	80
Figura 13	Agitador orbital Tecnal TE 420. Suporte metálico para contenção dos tubos de polipropileno encaixado sobre a plataforma agitadora	81
Figura 14	Espectrofotômetro de absorção atômica Varian AA240FS utilizado para avaliar a presença de prata nas amostras	82
Figura 15	Curva de calibração linear (absorbância x concentração de Ag) calculada pelo espectrofotômetro e obtida a partir das medidas de absorbância das soluções padrões de nitrato de prata	82
Figura 16	Preparação dos espécimes para análise por meio de MEV. Deposição de ouro sobre as superfícies dos	

	espécimes: a) superfície externa e b) superfície interna do espécime após fratura criogênica	84
Figura 17	Microscópio eletrônico FEG-VP Zeiss Supra 35 utilizado na obtenção das micrografias para análise morfológica dos espécimes	84
Figura 18	Espectros de absorção atômica das soluções coletadas em t_1 a partir do nanocompósito PMMA/Ag contendo 0,5% (a) e 5% (b) de colóide de prata	85
Figura 19	Espectros de absorção atômica das soluções coletadas em t_2 a partir do nanocompósito PMMA/Ag contendo 0,5% (a) e 5% (b) de colóide de prata	86
Figura 20	Espectros de absorção atômica das soluções coletadas em t_3 a partir do nanocompósito PMMA/Ag contendo 0,5% (a) e 5% (b) de colóide de prata	86
Figura 21	Espectros de absorção atômica das soluções coletadas em t_4 a partir do nanocompósito PMMA/Ag contendo 0,5% (a) e 5% (b) de colóide de prata	87
Figura 22	Espectros de absorção atômica das soluções coletadas em t_5 a partir do nanocompósito PMMA/Ag contendo 0,5% (a) e 5% (b) de colóide de prata	87

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%	= Porcentagem
Ag	= Prata
Ag⁺	= Íons prata
-SH	= Grupo tiol
ADN	= Ácido desoxirribonucléico
µg/mL	= Micrograma por mililitro
ppm	= Parte por milhão
<	= Menor
PA	= Polímero poliamida
MET	= Microscopia eletrônica de transmissão
MEV	= Microscopia eletrônica de varredura
PMMA	= Poli (metil metacrilato)
AgNO₃	= Nitrato de prata
Na₃C₆H₅O₇	= Citrato de sódio
mL	= Mililitro
mol.L⁻¹	= Mol por litro
°C	= Grau Celsius
pH	= Potencial hidrogeniônico
UV/Vis	= Ultravioleta visível
nm	= Nanômetro

K_{α}	= Tipo de radiação
CuK_{α}	= Radiação K_{α} do cobre
λ	= Comprimento de onda
Å	= Ângstrom
mm	= Milímetro
g	= Grama
μL	= Microlitro
t	= Tempo
mM	= Mili molar
mg/L	= Miligrama por litro
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$	= Nitrato de cálcio
KCl	= Cloreto de potássio
NaH_2PO_4	= Fosfato de sódio monobásico
Na	= Sódio
t_g	= Temperatura de transição vítrea
$\mu\text{g}/(\text{mL}\cdot\text{h})$	= Micrograma por mililitro por hora
NPs	= Nanopartículas
KOH	= Hidróxido de potássio
Kx	= Mil vezes
Unid. Arb.	= Unidade arbitrária
2θ	= Ângulo de difração
Absorb.	= Absorbância
s	= Segundo

min	= Minuto
h	= Hora
rpm	= Rotação por minuto
KV	= Quilovolt
mA	= Miliampere

SUMÁRIO

1. Introdução	31
2. Materiais e Métodos	35
3. Resultados	39
4. Discussão	43
5. Conclusão	51
Referências	52
Anexos	71
Anexo A – Materiais e Métodos	72
Anexo B – Resultados	85
Anexo C – Normas para publicação	88

1. Introdução*

Estudos tem mostrado que aproximadamente 50 a 70% dos usuários de próteses totais apresentam uma patologia conhecida como estomatite protética (1,2). Ela caracteriza-se por eritemas homogêneos ou áreas focais avermelhadas especialmente no palato e está associada ao fungo Candida albicans (3,4). Seu tratamento ainda é motivo de preocupação, pois recidivas são freqüentes após sua interrupção e várias espécies de Candida têm adquirido resistência ao limitado número de antifúngicos disponíveis no mercado (5). Esse fato representa um desafio na prática odontológica e tem estimulado o desenvolvimento de métodos de prevenção da estomatite, tais como a incorporação de agentes antimicrobianos em polímeros utilizados como base protética e como condicionadores de tecidos (6-11).

A prata (Ag) tem sido amplamente utilizada em dispositivos poliméricos na área médica (12-29) por apresentar propriedades antimicrobianas para um largo espectro de microorganismos, incluindo bactérias gram positivas e negativas (30-34) e fungos (7,8,35,36). Acredita-se que íons prata (Ag^+) interagem com grupos sulfúricos ou grupos tiol (-SH) nas membranas dos microorganismos, causando desregulação de sua permeabilidade e, com isso, a morte da célula microbiana (atividade bactericida) (24). Os Ag^+ também podem interagir com o ácido desoxirribonucléico (DNA) impedindo sua reprodução celular (atividade bacteriostática) (24). Entretanto, o seu uso deve ser feito com cautela já que tem sido demonstrada uma toxicidade dependente da concentração de prata (37).

* O artigo segue as normas do periódico *International Journal of Antimicrobial Agents*, disponível no anexo C.

Essa concentração variou de 5 – 10 μg de Ag/mL para induzir necrose ou apoptose de células espermatozóides de ratos (37).

O uso de nanopartículas de prata como agente antimicrobiano merece atenção, uma vez que partículas nanométricas apresentam menor tamanho e maior razão da área de superfície por volume e maior área disponível para oxidação (38). Além disso, a sua incorporação em polímeros resulta em inúmeras aplicações, como medicamentos (18), cicatrizadores de feridas (18), catéteres venosos (27) e urinários (15), fios de sutura (24), tendões artificiais (24), adesivos ortodônticos (23), máscaras cirúrgicas (20) e tubos endotraqueais (39).

Furno et al. (17) incorporaram nanopartículas de prata a um silicone utilizado para implantes médicos e verificaram as taxas de liberação de Ag^+ em água deionizada e em proteína plasmática. Em plasma ela foi cerca de 10 vezes superior (4 ppm) à liberação em água deionizada (<0,5 ppm) durante os 5 primeiros dias. Esses resultados indicam a afinidade de Ag^+ por proteínas, comprometendo clinicamente a eficácia de implantes médicos impregnados com Ag , uma vez que estes dispositivos logo após a sua instalação são cobertos por glicoproteínas (28). Pensando nisso, os autores destacaram a necessidade de se ter uma quantidade suficiente de Ag^+ por determinado período de tempo para suprir aqueles perdidos pela ligação com as proteínas.

Diversos trabalhos (12,19,22,24-26) têm avaliado a liberação de Ag^+ a partir de polímeros poliamida (PA) e caracterizado morfologicamente estes materiais por meio de microscopia eletrônica de transmissão (MET) e de varredura (MEV). A distribuição e a dispersão das partículas de prata dependeram da área de superfície específica das partículas, ou seja, quanto menor o diâmetro das

partículas melhor a sua distribuição e dispersão na massa polimérica (12). A liberação foi superior em polímeros mais hidrofílicos (19) e com menor grau de cristalinidade (26). Ela aumentou com a concentração de Ag adicionada ao polímero e com o tempo de imersão em água (12). Finalmente, Damm et al. (24) encontraram que nanocompósitos liberaram mais prata que microcompósitos.

No experimento de Yu et al. (11) nanopartículas de prata adicionadas ao poli (metil metacrilato) (PMMA) para base protética, liberaram lentamente Ag^+ em saliva artificial até o 27º dia de imersão. Depois disso, a velocidade de liberação aumentou rapidamente e em seguida permaneceu lenta até o final do experimento (54 dias).

Em nanofibras de PMMA cobertas com nanopartículas de prata, Kong et al. (21) observaram que após 6 meses de imersão em água destilada a maioria das nanopartículas de prata foi liberada. As análises por MET comprovaram essa liberação, evidenciando a superfície da nanofibra totalmente coberta pelas partículas de prata antes da imersão e, após o armazenamento em água, somente poucas partículas permaneceram aderidas à superfície deste material.

Outro fator que pode interferir na taxa de liberação é a área de superfície específica das partículas de prata adicionadas ao polímero (12). Irzh et al. (29) observaram por MEV uma melhor cobertura e dispersão de nanopartículas de prata na superfície de um polímero PMMA, utilizando-se nanopartículas de menor tamanho e polietilenoglicol como solvente e agente redutor na reação para formação do nanocompósito. O acetato de prata utilizado na reação também mostrou melhores resultados como precursor de prata quando comparado ao nitrato de prata, já que os íons acetato agiram como surfactantes, prevenindo a

agregação das nanopartículas de prata.

Assim, apesar de se observar diversos trabalhos na literatura relacionados à nanocompósitos de prata com aplicação antimicrobiana na área de saúde (15,17-22,24,27,39), poucos estudos sobre a incorporação e caracterização morfológica de partículas de prata adicionadas ao PMMA de resinas acrílicas odontológicas têm sido publicados (8,11).

Dessa forma, o objetivo do presente estudo foi adicionar nanopartículas de prata a uma resina acrílica para base protética, determinar a característica morfológica deste nanocompósito antes e após 120 dias de armazenamento em água deionizada e examinar suas propriedades de liberação de prata em água deionizada por diferentes períodos. Os dados na literatura sugerem que nanopartículas de prata incorporadas em polímeros podem ser liberadas em diferentes soluções de armazenamento. O propósito da incorporação de nanopartículas de prata ao PMMA é a obtenção de um material com propriedade antimicrobiana e que seja efetivo no controle de patologias bucais comuns em usuários de próteses removíveis.

2. Materiais e Métodos

2.1. Síntese e caracterização do colóide de nanopartículas de prata

O método de síntese empregado foi baseado no proposto por Turkevich et al. (40). Nanopartículas de prata coloidal foram sintetizadas através da redução de íons prata do AgNO_3 (nitrato de prata) (Merck KGaA, Darmstadt, Hesse, Alemanha) pelo $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ (citrato de sódio) (Merck KGaA, Darmstadt, Hesse, Alemanha) com relações estequiométricas de 1:3, respectivamente. Em um balão de fundo redondo, 100 mL de solução de AgNO_3 ($1,0 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$) foram aquecidos até a temperatura de 97°C e em seguida adicionou-se 20 mL de solução de citrato de sódio ($1,5 \times 10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$) com pH entre 8,0 e 8,5. A mistura foi mantida sob agitação magnética e aquecimento a 97°C por cerca de 10 minutos, até o aparecimento da coloração amarelo âmbar, que evidencia qualitativamente a formação de nanopartículas de prata (Figura 1). Durante o processo de síntese, a formação das nanopartículas foi acompanhada por espectroscopia de absorção na região do Ultravioleta/Visível (UV/Vis) (Espectrofotômetro Shimadzu MultSpec-1501, Shimadzu Corporation, Tóquio, Japão) no intervalo de 190 a 800 nm e, posteriormente, por difração de raios-X (Difratômetro Rigaku DMax-2000PC, Rigaku Corporation, Tóquio, Japão) com anodo rotatório e radiação CuK_α ($\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$). A forma e a distribuição do tamanho das partículas foram confirmadas a partir de imagens de MEV e de MET (microscópio eletrônico FEG-VP Supra 35, Carl Zeiss, Jena, Turíngia, Alemanha).

2.2. Preparação do nanocompósito poli (metil metacrilato)/prata

Para a padronização dos espécimes em resina acrílica, moldes em silicone (Zetalabor, Zhermack SpA, Badia Polesine, Rovigo, Itália) foram obtidos a partir de uma matriz metálica com medidas compatíveis ao do futuro espécime (diâmetro de 10 mm e altura de 3,0 mm).

A resina acrílica para base protética Lucitone 550 (Dentsply Ind. e Com. Ltda, Petrópolis, Rio de Janeiro, Brasil) foi proporcionada de acordo com as instruções do fabricante. Para cada espécime utilizou-se a proporção de 4 g de pó / 1,9 mL de líquido. A solução contendo as nanopartículas de prata foi adicionada ao componente líquido da resina acrílica nas concentrações de 0% (0 μ L), 0,05% (2 μ L), 0,5% (20 μ L) e 5% (200 μ L) baseadas na massa do polímero (4 g). Para cada concentração foram confeccionados 5 espécimes.

Ao atingir a fase plástica, a resina acrílica foi condensada no interior dos moldes em silicone incluídos em gesso pedra tipo III (Herodent, Vigodent S/A Ind. e Com., Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil) no interior de mufla metálica (DCL nº 6, Dentária Campineira Ltda, Campinas, São Paulo, Brasil). Em seguida, a resina foi prensada em uma prensa hidráulica (Delta, Vipi-Delta Máquinas Especiais, Pirassununga, São Paulo, Brasil) com carga de 1 tonelada por 30 minutos. Os espécimes foram, então, polimerizados em banho de água quente por 1,5 horas a 73°C seguidos de 30 minutos a 100°C em uma termopolimerizadora automática (Termopolimerizadora Solab, Solab Equipamentos para Laboratório Ltda, Piracicaba, São Paulo, Brasil). Após a polimerização, a mufla foi resfriada sobre bancada e os espécimes desincluídos. Os espécimes foram armazenados em água deionizada à 37°C no interior de tubos de polipropileno (Injeplast, São

Paulo, São Paulo, Brasil) e mantidos sob agitação por diferentes períodos de tempo.

2.3. Avaliação da liberação de nanopartículas de prata

Cada espécime foi imerso em 10 mL de água deionizada no interior de tubos de polipropileno e mantido à 37°C sob agitação em um agitador orbital (Tecnal TE 420, Tecnal Equipamentos para Laboratórios Ltda, Piracicaba, São Paulo, Brasil) por diferentes períodos de tempo: $t_1 = 7$, $t_2 = 15$, $t_3 = 30$, $t_4 = 60$ e $t_5 = 120$ dias, num total de 6 horas de agitação por dia. A cada 10 dias, a água perdida por evaporação foi repostada para que a concentração de prata na solução se mantivesse constante. Durante cada período de tempo, amostras de 1 mL de solução de cada tubo foram recolhidas e a dosagem da prata foi analisada via espectroscopia de absorção atômica (Varian AA240FS, Varian Inc., Palo Alto, Califórnia, USA).

Soluções de AgNO_3 em diferentes concentrações foram preparadas como padrão para se obter uma curva de calibração linear no equipamento e permitir a determinação da concentração de prata nas amostras coletadas.

2.4. Teste do reagente orgânico

Utilizou-se como reagente orgânico a rodanina (Sigma–Aldrich Brasil Ltda, São Paulo, São Paulo, Brasil) (20 mM), que é um reagente seletivo e sensível para a detecção de Ag^+ . O seu teste foi baseado no proposto por Kong et al. (21), onde utilizou-se 1 mL de solução em que o espécime com a maior concentração de prata (5% de colóide de prata) ficou imerso por 120 dias. Uma solução de nitrato de prata (1 mg/L) serviu como controle para se comparar a

reação de Ag^+ com a rodanina (21). Um volume de 0,5 mL de solução de rodanina foi adicionado à solução onde o nanocompósito ficou imerso e a de nitrato de prata (21). A variação de cor foi monitorada por meio do tempo e registrada com uma câmera digital (Sony Cyber-shot DSC-W130 8.1Mp, Nova York, Nova York, USA).

2.5. Investigação morfológica do nanocompósito PMMA/Ag

A morfologia do nanocompósito PMMA/Ag foi analisada por meio da MEV após a confecção dos espécimes e depois de 120 dias de armazenamento dos mesmos em água deionizada. Duas regiões do espécime foram avaliadas, a superfície externa e o seu interior após a fratura criogênica. Para isso, utilizou-se um microscópio eletrônico FEG-VP Zeiss Supra 35.

3. Resultados

3.1. Síntese e caracterização do colóide de nanopartículas de prata

Um indício da formação de nanopartículas de prata foi a coloração amarelo âmbar observada na solução instantes após a etapa de adição do agente redutor (Figura 1). O espectro de absorção UV/Vis do colóide mostrou uma banda plasmon característica de nanopartículas de prata, com máximo em aproximadamente 430 nm (Figura 2). As imagens de MEV (Figura 3) e de MET (Figura 4) confirmaram a forma esférica das partículas e evidenciaram nanopartículas de prata com diâmetro médio de 60 nm em uma concentração de 107,9 µg de Ag/mL na solução coloidal.

A difração de raios-X também confirmou a presença de nanopartículas de prata com estrutura cristalina cúbica (Joint Committee on Powder Diffraction Standards 04-0783). De acordo com a Figura 5, os picos de difração de raios-X de aproximadamente 38,5°, 44,5°, 64,8° e 78° podem ser atribuídos aos planos cristalográficos (111), (200), (220) e (311) da prata, respectivamente.

3.2. Liberação de nanopartículas de prata

As análises foram realizadas com espécimes contendo duas concentrações de solução coloidal: 0,5% e 5%. O limite de detecção de prata no espectrofotômetro de absorção atômica utilizado para as análises foi de 0,003 mg/L. Independentemente do período de tempo e da concentração de colóide adicionada ao PMMA, todos os nanocompósitos investigados não liberaram quantias detectáveis de Ag em água deionizada. A Figura 6b ilustra o espectro de

absorbância para prata em função do tempo encontrado para uma das amostras analisadas e que se assemelhou às demais avaliadas para as diferentes concentrações e períodos de tempo (7, 15, 30, 60 e 120 dias). Percebeu-se que não ocorreram níveis de absorbância para prata detectáveis pelo aparelho.

3.3. Teste do reagente orgânico

A Figura 7a mostra as imagens da solução aquosa de AgNO_3 em função do tempo após a adição de rodanina. Após a adição de rodanina, precipitados amarelo amarronzados foram formados gradualmente e em 24 horas mudaram para preto amarronzados devido à formação de complexos Ag^+ -rodanina. Contudo, nenhum precipitado foi observado na solução em que o espécime de maior concentração de prata (5% de solução coloidal) ficou imerso por 120 dias, permanecendo a cor inalterada nas 24 horas (Figura 7b).

3.4. Investigação morfológica do nanocompósito PMMA/Ag

As nanopartículas de prata são evidenciadas por pontos ou áreas mais claras nas imagens de MEV. As micrografias sugerem que o modo de dispersão das nanopartículas de prata no polímero foi dependente da concentração de solução coloidal adicionada ao PMMA. Quanto maior o volume de colóide adicionado, maior a quantidade de partículas distribuídas, porém menor a sua dispersão na massa polimérica (Figuras 8, 9, 10, 11, 12 e 13). De forma geral, as nanopartículas de prata localizaram-se em maior número na superfície externa do que no interior dos espécimes, principalmente após a imersão em água deionizada.

Entre os grupos analisados, o nanocompósito contendo 0,05% de colóide de prata foi o que mostrou menor aglomeração das nanopartículas, principalmente na superfície externa do espécime após 120 dias de imersão (Figura 8e-h). A morfologia da superfície externa do nanocompósito antes da imersão revelou partículas menos distribuídas e dispersas do que após a imersão por 120 dias (Figura 8a-d), enquanto na superfície de fratura (interior do nanocompósito) as partículas mostraram-se na sua maioria aglomeradas e pouco distribuídas (Figura 9a-d). Após 120 dias de imersão, observou-se tanto uma melhor distribuição quanto uma melhor dispersão das partículas na superfície externa do polímero (Figura 8e-h). Já no interior do espécime, poucas partículas foram visualizadas (Figura 9e-h).

Em relação ao espécime contendo 0,5% de colóide de prata antes da imersão em água, verificou-se maior número de partículas no seu interior do que na sua superfície externa (Figuras 10a-b e 11a-d). O interior do nanocompósito revelou partículas melhores distribuídas e dispersas no polímero do que para o interior do nanocompósito contendo 0,05% de solução coloidal antes da imersão (Figura 11a-b). Entretanto, após a imersão em água deionizada, notou-se maior quantidade de partículas na superfície externa, com alguns aglomerados situados ao redor e no interior de possíveis poros do polímero (Figuras 10c-f). Quando comparado à superfície externa, o interior do nanocompósito apresentou uma quantidade muito pequena de partículas supostamente não dispersas (Figura 11e-f).

Para o nanocompósito contendo 5% de colóide de prata antes da imersão, tanto na superfície externa como no interior, as partículas mostraram-se bem

distribuídas, porém aglomeradas, especialmente na superfície externa (Figuras 12a-d e 13a-d). Na figura 12d observa-se o formato irregular das partículas coalescidas que apresentaram tamanhos na escala micrométrica. Após a imersão em água deionizada, ocorreu uma maior tendência das partículas localizarem-se na superfície externa do que no interior do nanocompósito. Ainda, as partículas apresentaram-se pouco dispersas e localizadas em irregularidades ou poros presentes na superfície externa e no interior do espécime (Figuras 12e-h e 13e-h). O tamanho das partículas variou de 50 a 300 nm.

A título comparativo, a Figura 14 vem ilustrar algumas micrografias da resina acrílica Lucitone 550 sem a adição de nanopartículas de prata.

4. Discussão

O presente trabalho avaliou a incorporação de nanopartículas de prata a uma resina acrílica para base protética por meio de espectroscopia de absorção atômica e de MEV. As análises para detecção de prata liberada em água deionizada foram realizadas em um espectrofotômetro com limite de detecção para prata de 0,003 mg/L. Em função disso, os espécimes com a concentração de 0,05% de solução coloidal de prata, ou seja, 0,00162 mg de Ag/L por espécime, não foram analisados por esse equipamento.

As amostras das soluções foram coletadas após 7, 15, 30, 60 e 120 dias de armazenamento dos espécimes em água deionizada. Buscou-se nesses diferentes períodos verificar a influência do tempo no processo de liberação das partículas de prata. A liberação de partículas oriundas da camada superficial do nanocompósito ocorreria durante o período inicial por meio de sua dissolução no meio aquoso (22). A partir daí a velocidade de liberação reduziria em função da necessidade de difusão de água para o interior da massa polimérica, que sofreria plastificação e facilitaria a migração das partículas ou Ag^+ em direção à superfície e então seriam liberadas na água (12).

No entanto, os resultados da espectroscopia de absorção atômica não indicaram essa cinética de liberação de partículas ou Ag^+ em meios líquidos a partir de materiais poliméricos (12,22). Mesmo após o período mais longo de armazenamento do nanocompósito PMMA/Ag não foram observados níveis detectáveis de Ag na água deionizada.

Testes adicionais foram feitos na tentativa de se quantificar prata liberada

especialmente da camada superficial do polímero e que fosse detectável pelo aparelho. Para isso, 10 espécimes com a concentração máxima de colóide de prata foram armazenados em um mesmo tubo de polipropileno contendo água deionizada e mantidos a 37°C sob agitação por 7 dias. Entretanto, o resultado se manteve, ou seja, não ocorreu liberação de quantias detectáveis de prata nessa solução.

Ainda, para se verificar uma provável liberação de prata do nanocompósito, outro estudo foi realizado paralelamente utilizando-se como solução de armazenamento a saliva artificial. Como a composição da saliva artificial apresenta substâncias com cargas iônicas em potencial ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$; KCl ; NaH_2PO_4 ; metil para hidróxido benzoato de Na), seria provável uma atração entre partículas inorgânicas presentes neste líquido e Ag^+ presentes no PMMA. Contudo, mais uma vez não foi detectado prata por meio da análise de espectroscopia de absorção atômica. Contrariamente, Furno et al. (17) ao estudarem silicones impregnados com nanopartículas de prata constataram em 5 dias maior liberação de Ag^+ em solução protéica de plasma humano do que em água deionizada. O fato da solução de saliva artificial não apresentar em sua composição substâncias de caráter protéico, e aliado ao fato do nanocompósito poder conter apenas pequenas quantidades de Ag^+ poderiam explicar essa diferença de resultados.

Pensando dessa forma, testes com o reagente orgânico rodanina foram feitos para se verificar nas amostras de água deionizada a presença de Ag^+ pela oxidação das nanopartículas. O Ag^+ em contato com a rodanina formaria precipitados e alteraria a cor da solução devido à troca do grupo ácido amino-

hidrogênio da rodanina por Ag^+ (21). No entanto, o resultado desse teste não comprovou uma quantidade de Ag^+ detectável visualmente na amostra de água do nanocompósito de maior concentração que permaneceu imerso por 120 dias (Figura 7b). A rodanina também foi adicionada à solução coloidal pura de nanopartículas de prata e somente após um período de aproximadamente 2 semanas que ocorreu a alteração de cor ou detecção de Ag^+ neste colóide. Isso pode ser um indicativo da pouca presença desses íons no interior da massa polimérica mesmo diante de uma possível oxidação da prata após a imersão do nanocompósito em meio aquoso ou da resistência das nanopartículas de prata em oxidar, formando Ag^+ .

Estudos demonstraram que fatores como tempo de imersão em solução aquosa (12,22), gradiente de concentração entre a prata contida no polímero e no líquido de imersão (24), concentração e área de superfície específica das partículas de prata adicionadas ao polímero (24), bem como propriedades do polímero (19,26), podem interferir na liberação de Ag a partir de nano e microcompósitos.

Na presente pesquisa, não houve liberação de prata independentemente da concentração de colóide adicionada ao polímero e do tempo de imersão em água deionizada. A Figura 6 ilustra os espectros de absorção atômica de uma das soluções padrões de AgNO_3 e de uma das amostras de água onde o espécime ficou imerso e que se repetiu para os demais espécimes nas diferentes concentrações de nanopartículas de prata adicionadas e diversos períodos de imersão. A não detecção de prata na amostra é evidenciada pelo espectro em preto da Figura 6b, ao contrário da Figura 6a onde esse espectro atinge níveis de absorbância de prata

detectáveis pelo aparelho. Apesar do espectrofotômetro utilizado não detectar concentrações de prata abaixo de 0,003 mg/L, uma das explicações para esse resultado seria o período de tempo insuficiente de armazenamento dos espécimes em água para permitir uma melhor difusão de água para o interior do polímero, relaxamento das cadeias poliméricas e liberação da prata para o meio líquido. Diferentemente desses resultados, polímeros poliamida com 100 dias de armazenamento em água deionizada liberaram Ag^+ proporcionalmente ao tempo de imersão (19,22). Uma das explicações para isso seria a característica morfológica e as propriedades do PA quando comparadas ao PMMA. O PA é um polímero bastante hidrofílico e que permite a fácil ação da água como plastificante (19). Já o PMMA é um material mais hidrofóbico que o poliamida, o que pode ter proporcionado uma maior barreira para a difusão de água e conseqüente liberação de partículas ou Ag^+ (19). Ainda, o agente de ligação cruzada etilenoglicoldimetacrilato presente na resina acrílica Lucitone 550 pode ter restringido as rotações das cadeias poliméricas, reduzindo a velocidade de difusão das moléculas de água para o interior do polímero (41).

A temperatura de transição vítrea (t_g) é outra propriedade física a se considerar no processo de difusão de substâncias líquidas em materiais poliméricos. A t_g pode ser influenciada pela espessura do polímero e para o PMMA ela varia de 97 a 125°C (21,42). No estudo de Kong et al. (21) uma nanofibra de PMMA contendo nanopartículas de prata envoltas por polivinilalcool permitiu uma taxa de liberação de 0,43 μg de $\text{Ag}/(\text{mL h})$. Por outro lado, a espessura de 3 mm do espécime analisado no presente estudo pode ter colaborado para retardar o processo de liberação das partículas de prata uma vez que quanto

maior a espessura do polímero maior a t_g , menor a plastificação em função do tempo e menor seria a velocidade de sorção de água e migração das partículas do interior para a superfície polimérica. Os estudos relacionados à liberação de prata a partir de polímeros poliamida utilizaram espécimes com espessura de apenas 1 mm (12,19,22,24-26), o que poderia também estar associado a maior liberação de prata a partir destes materiais.

Do ponto de vista clínico, uma gradual plastificação do PMMA com lenta e prolongada liberação de Ag^+ com ação antimicrobiana seria bastante desejável considerando-se o tempo de uso recomendável de cerca de 5 anos para próteses com base em resina acrílica. Nesse sentido, estudos in vitro com períodos de armazenamento superiores a 120 dias e diferentes meios de imersão contribuiriam para elucidar essa provável hipótese relacionada ao grau de liberação em função do tempo e do meio, e estimulariam o desenvolvimento de nanocompósitos PMMA/Ag funcionalizados para prevenção da estomatite protética dentro dessa realidade clínica.

As análises morfológicas dos nanocompósitos PMMA/Ag por meio da MEV mostraram de uma maneira geral que, antes da imersão, quanto maior o volume de colóide adicionado, maior a distribuição das nanopartículas e menor a sua dispersão na massa polimérica (Figuras 8a-d, 9a-d, 11a-b, 12a-d e 13a-d). A maior quantidade de partículas de prata nos espécimes contendo 0,5% e 5% de colóide de prata, aliada à temperatura de 100°C durante a polimerização, podem ter favorecido a coalescência das partículas (18), aumentando a sua área de superfície específica e dificultando a sua liberação para o meio líquido. As Figuras 12d e 13d ilustram alguns aglomerados de nanopartículas de prata na

superfície e no interior do polímero, respectivamente.

Após 120 dias de imersão em água deionizada, independentemente da concentração de colóide adicionada ao PMMA, observou-se uma tendência das partículas de se localizarem mais na superfície que no interior dos nanocompósitos. Isso poderia indicar uma migração das partículas do interior para a superfície do polímero. Com o progresso da difusão de água, os grupos polares nas cadeias poliméricas são separados e os dipolos da água são capazes de interagir com aqueles do polímero (12). A estrutura polimérica é então reestabelecida com a incorporação de água (12). Este efeito origina um volume livre no polímero que poderia permitir a migração de íons e partículas (12).

Contudo, os resultados indicaram que nesse processo de difusão as partículas de prata não foram liberadas. A Figura 12e ilustra a presença de possíveis poros ou defeitos na superfície do nanocompósito. A maior área de superfície interna desses poros juntamente com suas irregularidades podem ter dificultado essa liberação por reterem as partículas em suas paredes (Figuras 12f e 13f). Esses poros ou irregularidades podem ter sido causados pela solução coloidal que não foi adequadamente dispersa na massa polimérica. Uma das explicações para essa dificuldade de dispersão do colóide seria a diferença de polaridade entre as duas substâncias, ou seja, massa polimérica e solução coloidal. Observou-se durante o processamento laboratorial de preparação dos nanocompósitos que quanto maior o volume de solução coloidal adicionado, maior foi a dificuldade de homogeneização desta solução na massa de resina acrílica.

Já na Figura 10d, as partículas de prata encontram-se externamente a esses

defeitos, o que pode ter ocorrido pelos mesmos encontrarem-se mais próximos da superfície e permitirem fácil penetração da água, o que facilitou o desprendimento das partículas para a superfície externa do polímero. Esse fato pode ser uma evidência de futura liberação ou mesmo da já existência de partículas de prata, ainda que em quantidades bem pequenas, na água deionizada. Mais uma vez, testes complementares com maior tempo de imersão do nanocompósito em meio líquido e utilizando-se outros métodos como voltametria de redissolução anódica (12,19,22,24-26), espectroscopia de emissão atômica (21) e espectroscopia de massa (11,17), seriam indicados para se comprovar essa hipótese. Deve-se considerar também que, clinicamente, esse desprendimento ou liberação das partículas de prata poderia ser favorecido pelo atrito constante da musculatura da língua e bochecha do paciente com a superfície externa da base protética ou mesmo durante a própria escovação. Pensando assim, além de estudos *in vitro*, estudos clínicos e *in situ* poderiam auxiliar na compreensão dos fenômenos de liberação e da ação antimicrobiana das partículas de prata do nanocompósito PMMA/Ag.

Finalmente, a adição de surfactantes na solução coloidal de prata poderia permitir melhor homogeneização da solução coloidal com a massa de resina, prevenindo a formação de agregados e possibilitando uma melhor dispersão das partículas no polímero (29). Esse colóide contendo surfactante poderia auxiliar indiretamente na liberação de partículas de Ag para o meio líquido ao reduzir a área de superfície formada pela coalescência de várias partículas. Nesse sentido, o desenvolvimento de soluções coloidais ou de nanopartículas de prata que promovam uma melhor distribuição/dispersão na massa polimérica, assim como

uma liberação controlada de prata deveria ser estimulado para a obtenção futura de nanocompósitos poliméricos visando ações antimicrobianas. Ainda, pesquisas adicionais sobre o comportamento de nanocompósitos PMMA/Ag frente a diferentes meios e períodos de imersão, além de estudos microbiológicos e citotóxicos são indicados para se avaliar a possibilidade de uso deste novo material com provável ação antimicrobiana como base protética de próteses removíveis.

5. Conclusão

As nanopartículas de prata foram adicionadas à resina acrílica para base protética e quanto menor o volume da solução de nanopartículas adicionado, menor a distribuição e maior a dispersão destas partículas na massa polimérica. Também ocorreu uma tendência das nanopartículas de prata localizarem-se, principalmente, na superfície externa dos espécimes após o armazenamento em água por 120 dias. Não houve liberação de prata mesmo com 120 dias de armazenamento dos nanocompósitos em água deionizada.

Referências

- (1) Budtz-Jorgensen E, Mojon P, Banon-Clément JM, Baehni P. Oral Candidosis in long-term hospital care: comparison of edentulous and dentate subjects. *Oral Dis* 1996;2:285-290.
- (2) Al-Dwairi ZN. Prevalence and risk factors associated with denture-related stomatitis in healthy subjects attending a dental teaching hospital in North Jordan. *J Ir Dent Assoc* 2008;54:80-83.
- (3) Budtz-Jorgensen E, Mojon P, Rentsch A, Deslauriers N. Effects of an oral health program on the occurrence of oral candidosis in a long-term care facility. *Community Dent Oral Epidemiol* 2000;28:141-149.
- (4) Jeganathan S, Lin CC. Denture stomatitis – a review of the aetiology, diagnosis and management. *Aust Dent J* 1992;37:107-114.
- (5) Batista JM, Birman EG, Cury AE. Suscetibilidade a antifúngicos de cepas de *Cândida albicans* isoladas em pacientes com estomatite protética. *Rev Odontol Univ São Paulo* 1999;13:343-348.
- (6) Dhir G, Berzins DW, Dhuru VB, Periathamby AR, Dentino A. Physical properties of denture base resins potentially resistant to candida adhesion. *J Prosthodont* 2007;16:465-472.
- (7) Matsuura T, Abe Y, Sato Y, Okamoto K, Ueshige M, Akagawa Y. Prolonged antimicrobial effect of tissue conditioners containing silver-zeolite. *J Dent* 1997;25:373-377.
- (8) Casemiro LA, Gomes Martins CH, Pires-de-Souza Fde C, Panzeri H. Antimicrobial and mechanical properties of acrylic resins with incorporated

silver-zinc zeolite – part 1. Gerodontology 2008;25:187-194.

(9) Abe Y, Ishii M, Takeuchi M, Ueshige M, Tanaka S, Akagawa Y. Effect of saliva on an antimicrobial tissue conditioner containing silver-zeolite. J Oral Rehabil 2004;31:568-573.

(10) Ueshige M, Abe Y, Sato Y, Tsuga K, Akagawa Y, Ishii M. Dynamic viscoelastic properties of antimicrobial tissue conditioners containing silver-zeolite. J Dent 1999;27:517-522.

(11) Yu RY, Zhou YS, Feng HL, Liu XY. Silver-ion release and particle distribution of denture base resin containing nanometer-sized silver-supported antimicrobial agent. Zhonghua Kou Qiang Yi Xue Za Zhi 2008;43:54-56.

(12) Kumar R, Münstedt H. Silver ion release from antimicrobial polyamide/silver composites. Biomaterials 2005;26:2081-2088.

(13) Balazs DJ, Triandafillu K, Wood P, Chevolut Y, van Delben C, Harms H, et al. Inhibition of bacterial adhesion on PVC endotracheal tubes by RF-oxygen glow discharge, sodium hydroxide and silver nitrate treatments. Biomaterials 2004;25:2139-2151.

(14) Rupp ME, Fitzgerald T, Marion N, Helget V, Puumala S, Anderson JR, et al. Effect of silver-coated urinary catheters: efficacy, cost-effectiveness, and antimicrobial resistance. Am J Infect Control 2004;32:445-450.

(15) Samuel U, Guggenbichler JP. Prevention of catheter-related infections: the potential of a new nano-silver impregnated catheter. Int J Antimicrob Agents 2004;23(suppl 1):S75-78.

(16) Bosetti M, Massè A, Tobin E, Cannas M. Silver coated materials for external fixation devices: in vitro biocompatibility and genotoxicity. Biomaterials

2002;23:887-892.

(17) Furno F, Morley KS, Wong B, Sharp BL, Arnold PL, Howdle SM, et al. Silver nanoparticles and polymeric medical devices: a new approach to prevention of infection? *J Antimicrob Chemother* 2004;54:1019-1024.

(18) Balan L, Schneider R, Loughnot DJ. A new and convenient route to polyacrylate/silver nanocomposites by light-induced cross-linking polymerization. *Prog Org Coat* 2008, doi:10.1016/j.porgcoat.2008.01.017.

(19) Damm C, Münstedt H, Rösch A. Long-term antimicrobial polyamide 6/silver-nanocomposites. *J Mater Sci* 2007;42:6067-6073.

(20) Li Y, Leung P, Yao L, Song QW, Newton E. Antimicrobial effect of surgical masks coated with nanoparticles. *J Hosp Infect* 2006;62:58-63.

(21) Kong H, Jang J. Antibacterial properties of novel poly(methyl methacrylate) nanofiber containing silver nanoparticles. *Langmuir* 2008;24:2051-2056.

(22) Damm C, Münstedt H. Kinetic aspects of the silver ion release from antimicrobial polyamide/silver nanocomposites. *Appl Phys A* 2008;91:479-486.

(23) Ahn SJ, Lee SJ, Kook JK, Lim BS. Experimental antimicrobial orthodontic adhesives using nanofillers and silver nanoparticles. *Dent Mater* 2008, doi:10.1016/j.dental.2008.06.002.

(24) Damm C, Münstedt H, Rösch A. The antimicrobial efficacy of polyamide 6/silver-nano- and microcomposites. *Mater Chem Phys* 2008;108:61-66.

(25) Kumar R, Howdle S, Münstedt H. Polyamide/silver antimicrobials: effect of filler types on the silver ion release. *J Biomed Mater Res B* 2005;75:311-319.

(26) Kumar R, Münstedt H. Polyamide/silver antimicrobials: effect of crystallinity on the silver ion release. *Polym Int* 2005;54:1180-1186.

- (27) Roe D, Karandikar B, Bonn-Savage N, Gibbins B, Rouillet JB. Antimicrobial surface functionalization of plastic catheters by silver nanoparticles. *J Antimicrob Chemother* 2008;61:869-876.
- (28) Schierholz JM, Lucas LJ, Rump A, Pulverer G. Efficacy of silver-coated medical devices. *J Hosp Infect* 1998;40:257-262.
- (29) Irzh A, Perkas N, Gedanken A. Microwave-assisted coating of PMMA beads by silver nanoparticles. *Langmuir* 2007;23:9891-9897.
- (30) Pal S, Tak YK, Song JM. Does the antibacterial activity of silver nanoparticles depend on the shape of the nanoparticle? A study of the Gram-negative bacterium *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* 2007;73:1712-1720.
- (31) Sondi I, Sondi BS. Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on *E. coli* as a model for Gram-negative bacteria. *J Colloid Interface Sci* 2004;275:177-182.
- (32) Lok CN, Ho CM, Chen R, He QY, Yu WY, Sun H, et al. Silver nanoparticles: partial oxidation and antibacterial activities. *J Biol Inorg Chem* 2007;12:527-534.
- (33) Baker C, Pradhan A, Pakstis L, Pochan DJ, Shah SI. Synthesis and antibacterial properties of silver nanoparticles. *J Nanosci Nanotech* 2005;5:244-249.
- (34) Panáček A, Kvítek L, Pucek 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.
- (35) Kim KJ, Sung WS, Moon SK, Choi JS, Kim JG, Lee DG. Antifungal effect of silver nanoparticles on dermatophytes. *J Microbial Biotechnol* 2008;18:1482-

1484.

(36) Kim KJ, Sung WS, Suh BK, Moon SK, Choi JS, Kim JG, et al. Antifungal activity and mode of action of silver nano-particles on *Candida albicans*. *Biomaterials* 2008, doi: 10.1007/s10534-008-9159-2.

(37) Braydich-Stolle L, Hussain S, Schlager JJ, Hofmann MC. In vitro cytotoxicity of nanoparticles in mammalian germline stem cells. *Toxicol Sci* 2005;88:412-419.

(38) Gibbins B, Warner L. The role of antimicrobial silver nanotechnology [online information]. Portland: AcryMed Inc; 2005. Available from internet: <http://www.devicelink.com/mddi/archive/05/08/005.html>.

(39) Stickler DJ. Biomaterials to prevent nosocomial infections: is silver the gold standard? *Curr Opin Infect Dis* 2000;13:389-393.

(40) Turkevich J, Stevenson PC, Hillier J. A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold. *Discuss Faraday Soc* 1951;11:55-75.

(41) Söderholm KJ. Water sorption in a bis(GMA)/TEGDMA resin. *J Biomed Mater Res* 1984;18:271-279.

(42) Vallittu PK, Ruyter IE, Buykuilmaz S. Effect of polymerization temperature and time on the residual monomer content of denture base polymers. *Eur J Oral Sci* 1998;106:588-593.

Figuras

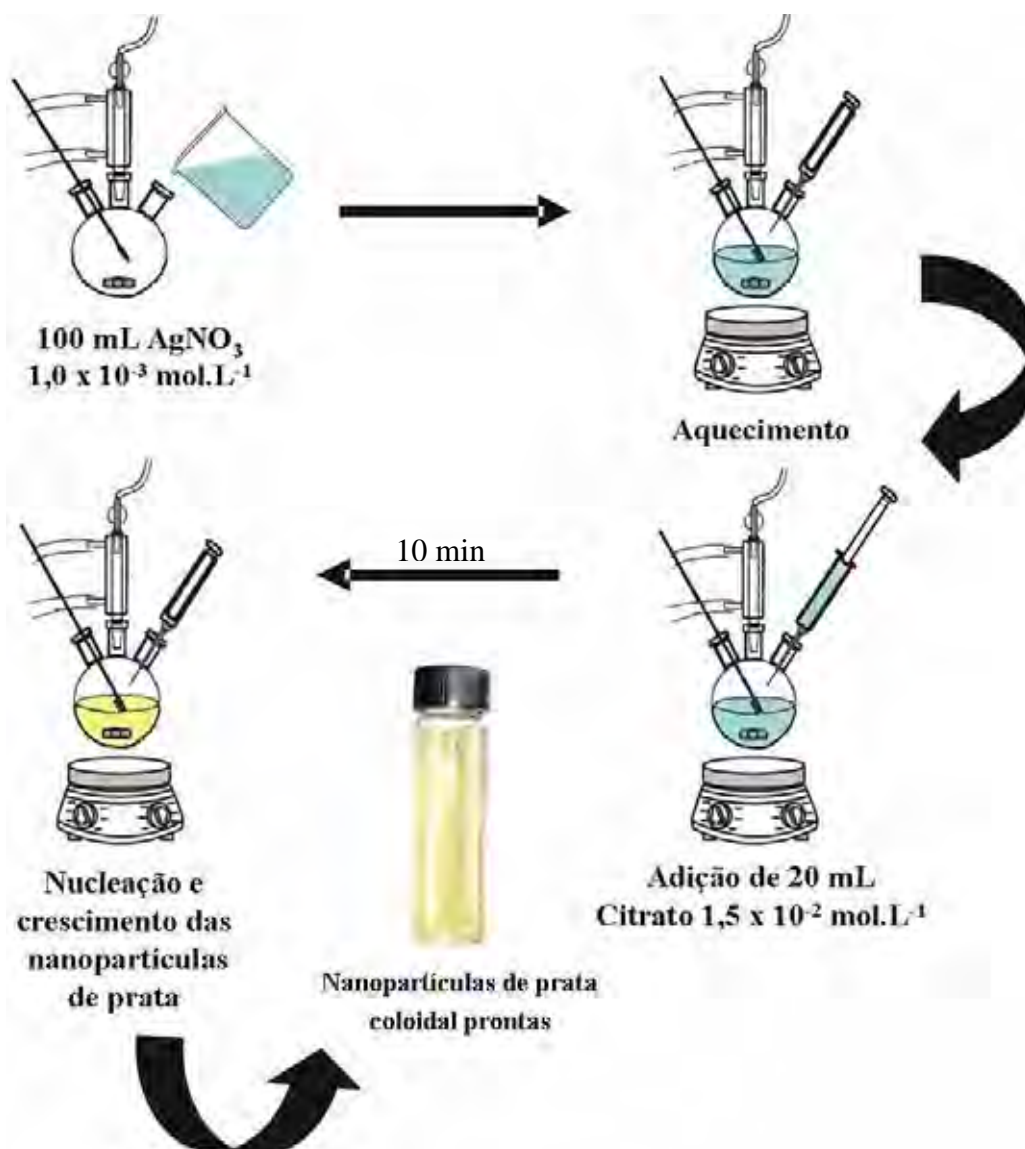


Figura 1. Ilustração esquemática da síntese de nanopartículas de prata na forma coloidal por meio da redução dos íons prata do nitrato de prata pelo citrato de sódio.

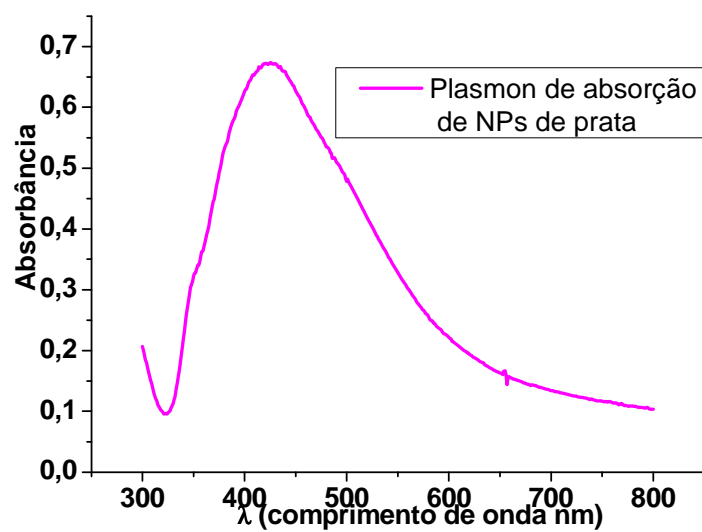


Figura 2. Gráfico de absorvância versus comprimento de onda do colóide obtido a partir da reação de redução da prata pelo citrato de sódio na temperatura de 97°C. O gráfico mostra a banda plasmon de absorção característica de nanopartículas de prata.

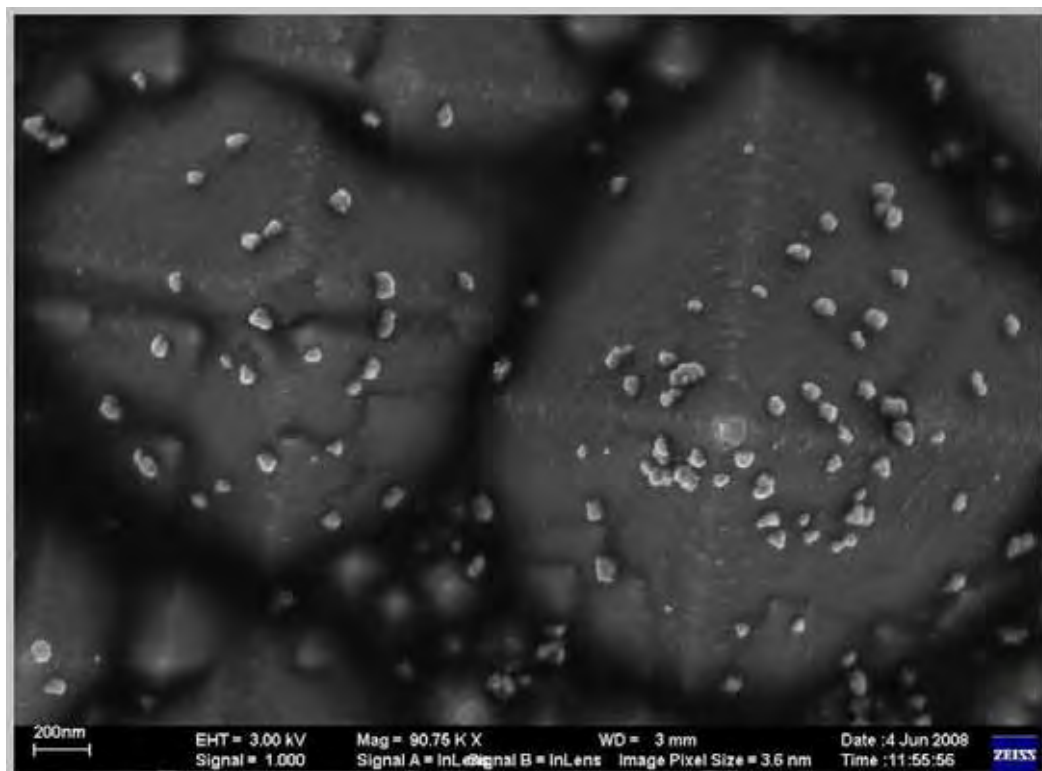


Figura 3. MEV das nanopartículas de prata sintetizadas via redução dos íons prata do nitrato de prata pelo citrato. O substrato de silício foi degradado por KOH por 2 horas e a prata coloidal foi depositada sobre o substrato e secada para se obter a imagem. Essa técnica ilustra claramente a forma e o tamanho das nanopartículas de prata (os pontos claros representam nanopartículas de prata com tamanho médio de 60 nm). Aumento: 90,75 Kx.

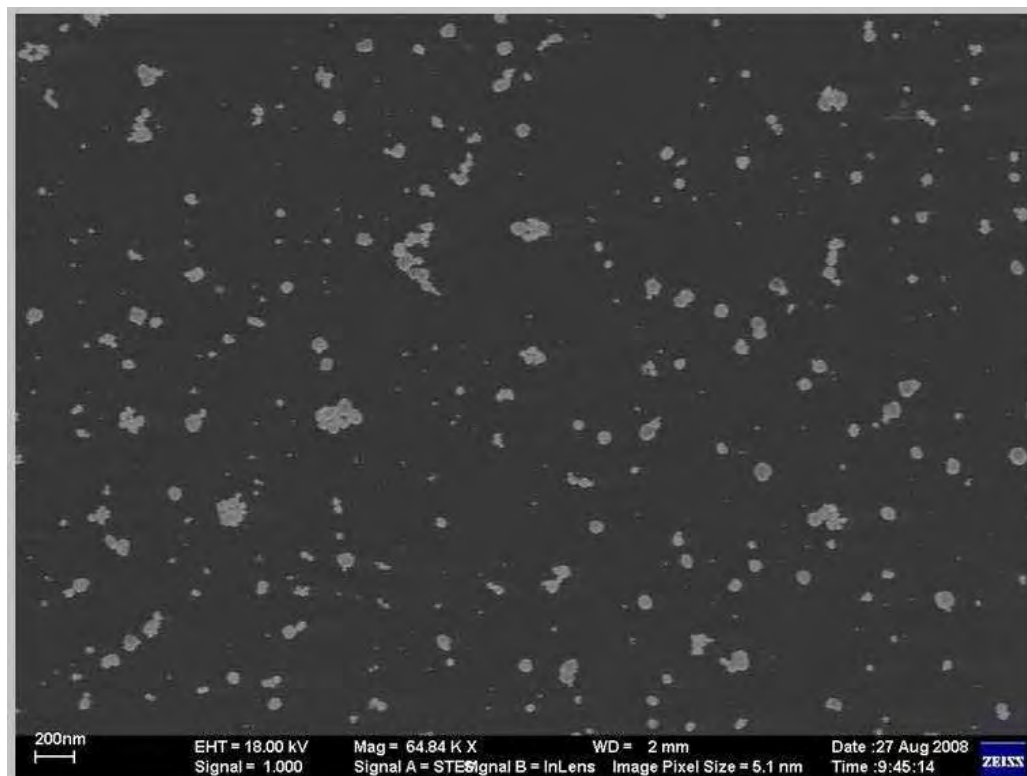


Figura 4. MET das nanopartículas de prata, onde se adicionou uma gota de colóide sobre grades de cobre recobertas com filme fino de carbono. Os pontos claros representam as partículas de prata com diâmetro médio de 60 nm. Aumento: 64,84 Kx.

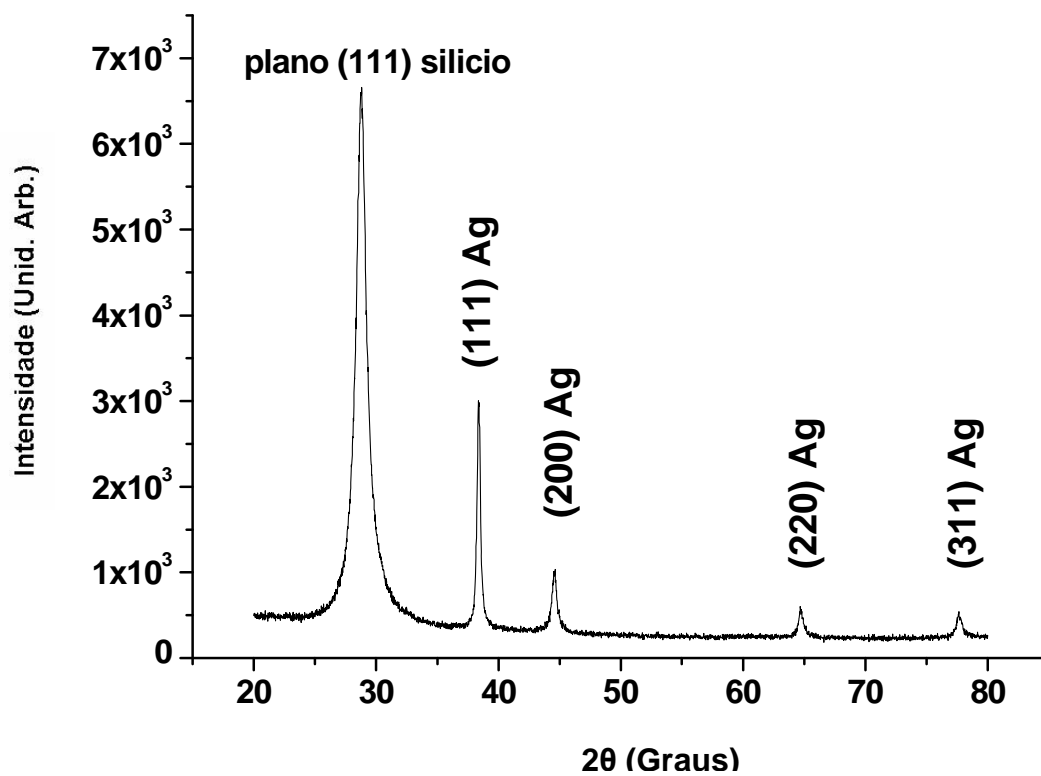


Figura 5. Difratoograma de raios-X das nanopartículas de prata em substrato de silício com seus planos de reflexão indexados.

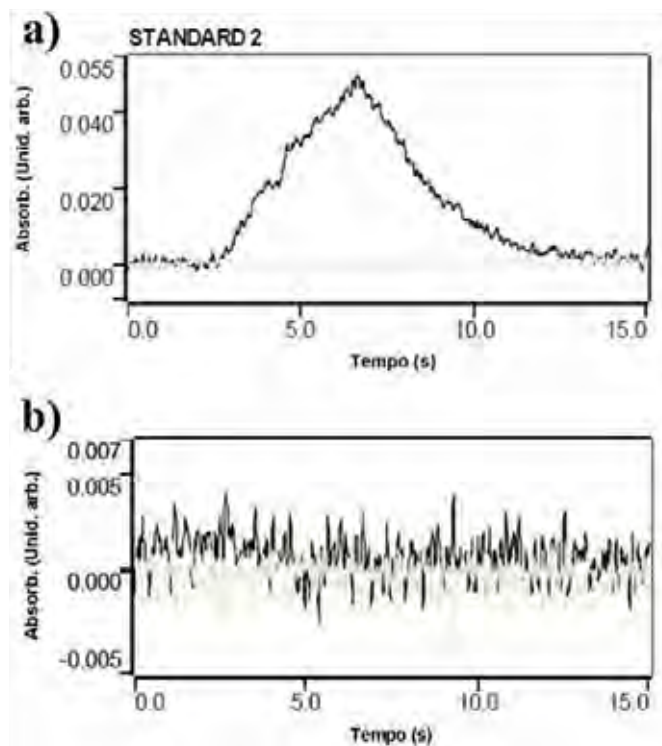


Figura 6. Espectros de absorvância para prata em função do tempo encontrados para: **(a)** solução padrão contendo 0,5 mg de AgNO_3/L ; **(b)** exemplo de uma das amostras analisadas e que se assemelhou às demais avaliadas para as diferentes concentrações e períodos de tempo (7, 15, 30, 60 e 120 dias). O espectro claro indica a absorvância da água deionizada.

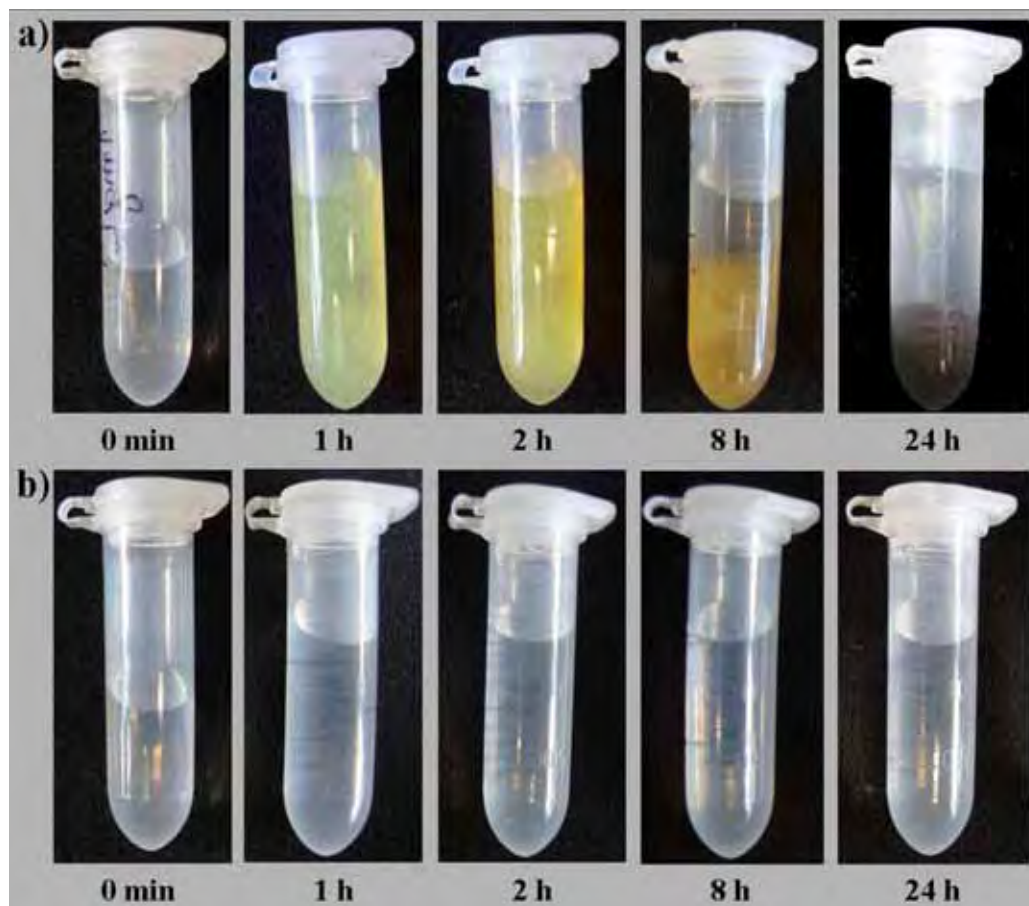


Figura 7. Ação da rodanina por 24 horas em: (a) solução de nitrato de prata e (b) líquido retirado da amostra onde o nanocompósito com maior concentração de prata ficou imerso por 120 dias. O teste do reagente orgânico indicou presença de Ag^+ na solução de nitrato de prata (a) e ausência de Ag^+ na solução em que o nanocompósito ficou imerso por 120 dias (b).

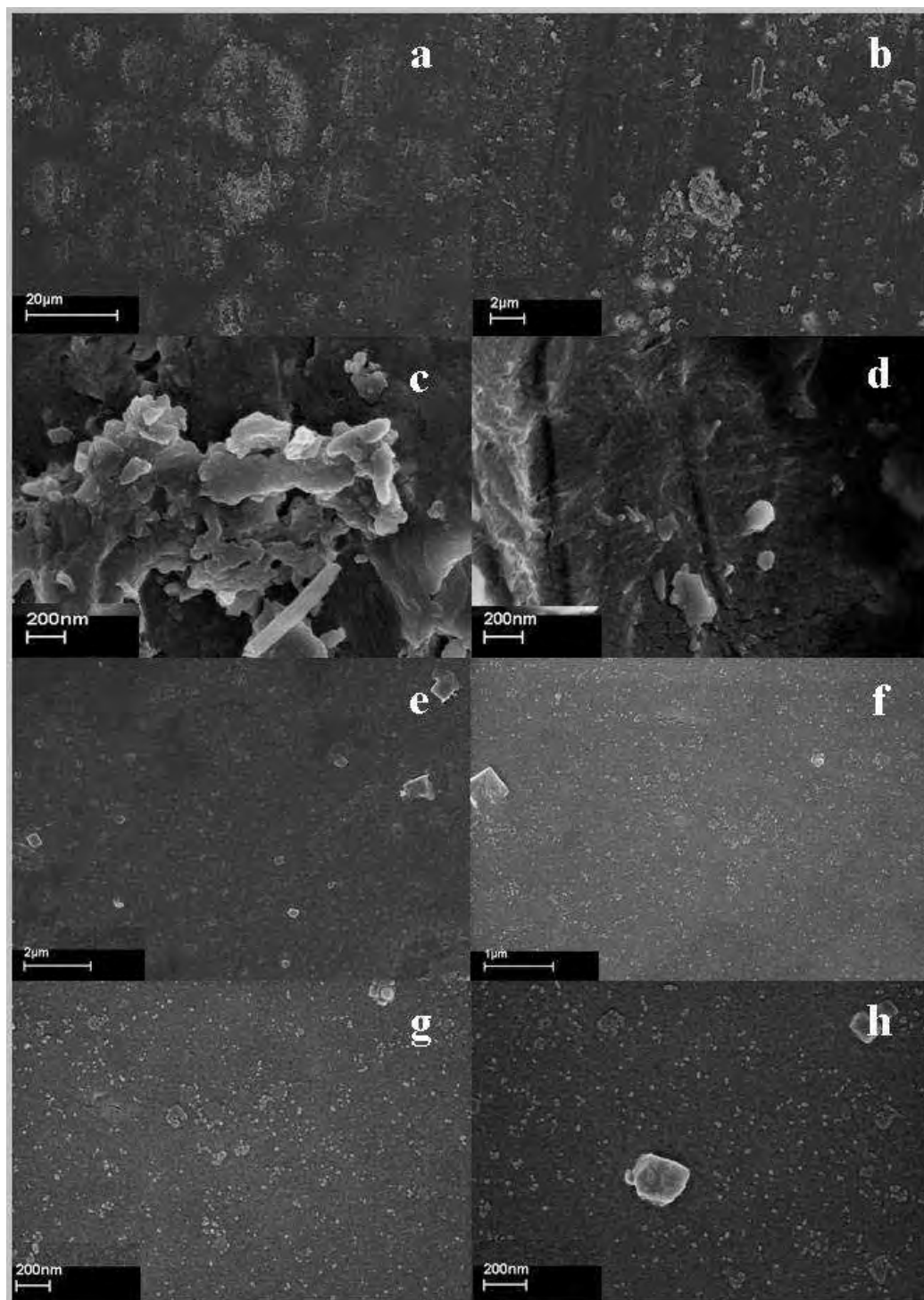


Figura 8. MEV evidenciando sucessivos aumentos da superfície externa do nanocompósito PMMA/Ag contendo 0,05% de solução coloidal de nanopartículas de prata. (a), (b), (c) e (d) antes da imersão em água deionizada. (e), (f), (g) e (h) após 120 dias de imersão. Aumento: (a) 1,69 Kx; (b) 6,34 Kx; (c) 50,93 Kx; (d) 61,20 Kx; (e) 14,29 Kx; (f) 31,81 Kx; (g) 61,89 Kx; (h) 79,98 Kx.

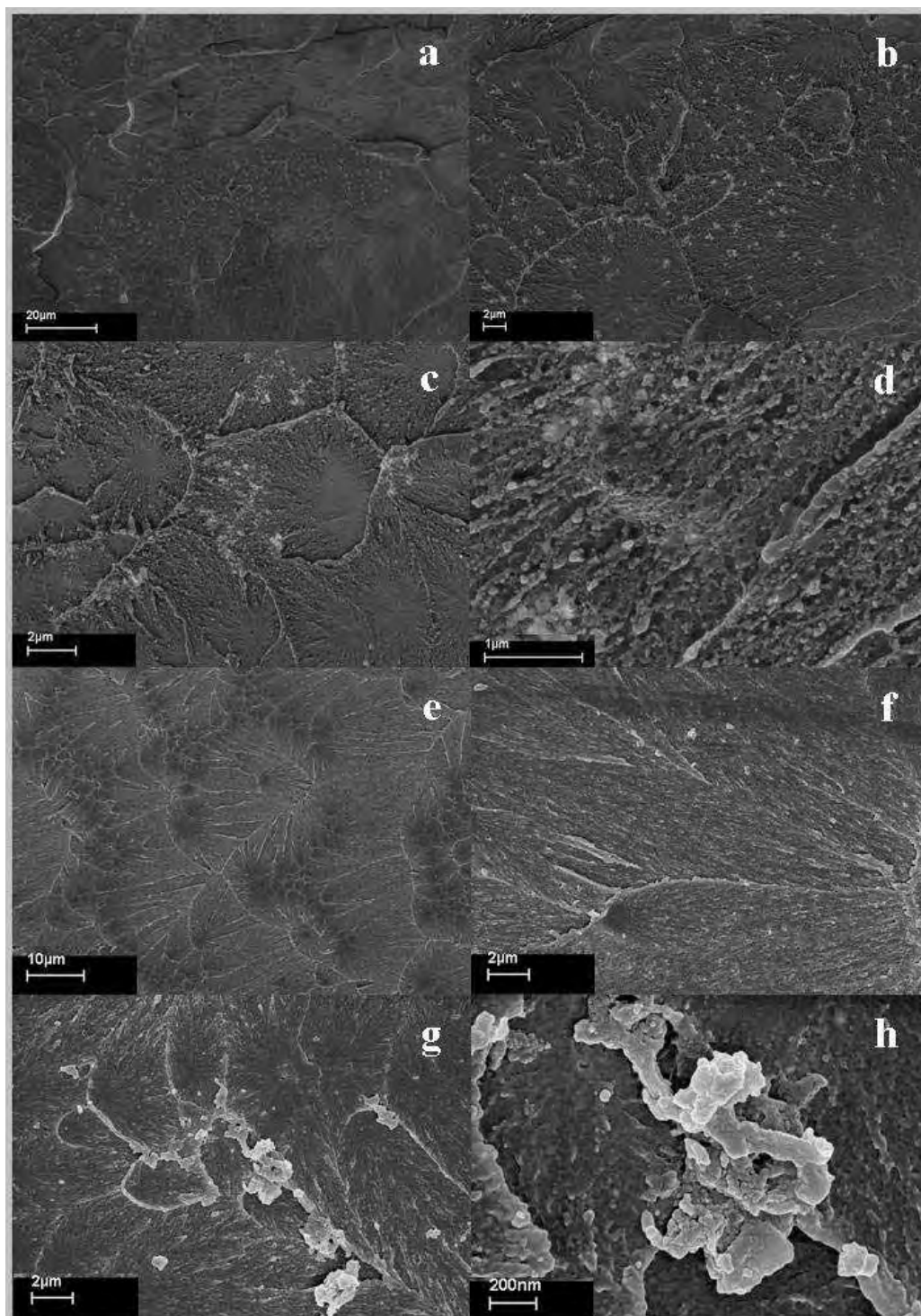


Figura 9. MEV com sucessivos aumentos da superfície de fratura (interna) do nanocompósito PMMA/Ag contendo 0,05% de solução coloidal de nanopartículas de prata. (a), (b), (c) e (d) antes da imersão em água deionizada. (e), (f), (g) e (h) após 120 dias de imersão. Aumento: (a) 1,61 Kx; (b) 5,31 Kx; (c) 10,01 Kx; (d) 42,49 Kx; (e) 2,00 Kx; (f) 7,24 Kx; (g) 20,00 Kx; (h) 76,74 Kx.

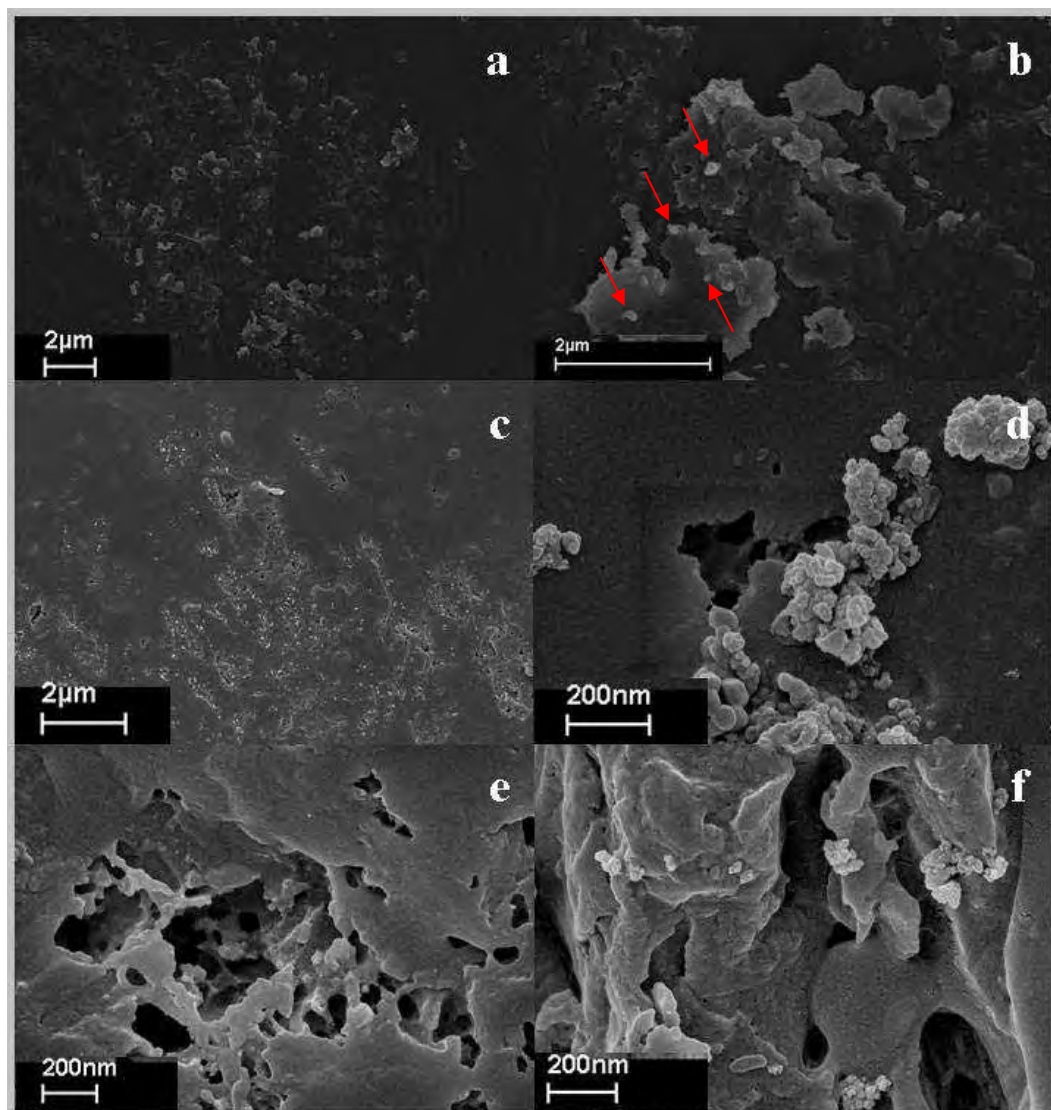


Figura 10. MEV da superfície externa do nanocompósito PMMA/Ag contendo 0,5% de solução coloidal de nanopartículas de prata. (a) e (b) antes da imersão em água deionizada. (c), (d), (e) e (f) após 120 dias de imersão. Em (a) e (b) as áreas mais claras podem ser um indicativo de artefato de técnica. As setas vermelhas em (b) sugerem algumas partículas de prata na superfície do espécime. Aumento: (a) 5,47 Kx; (b) 24,11 Kx; (c) 8,03 Kx; (d) 82,17 Kx; (e) 61,05 Kx; (f) 71,53 Kx.

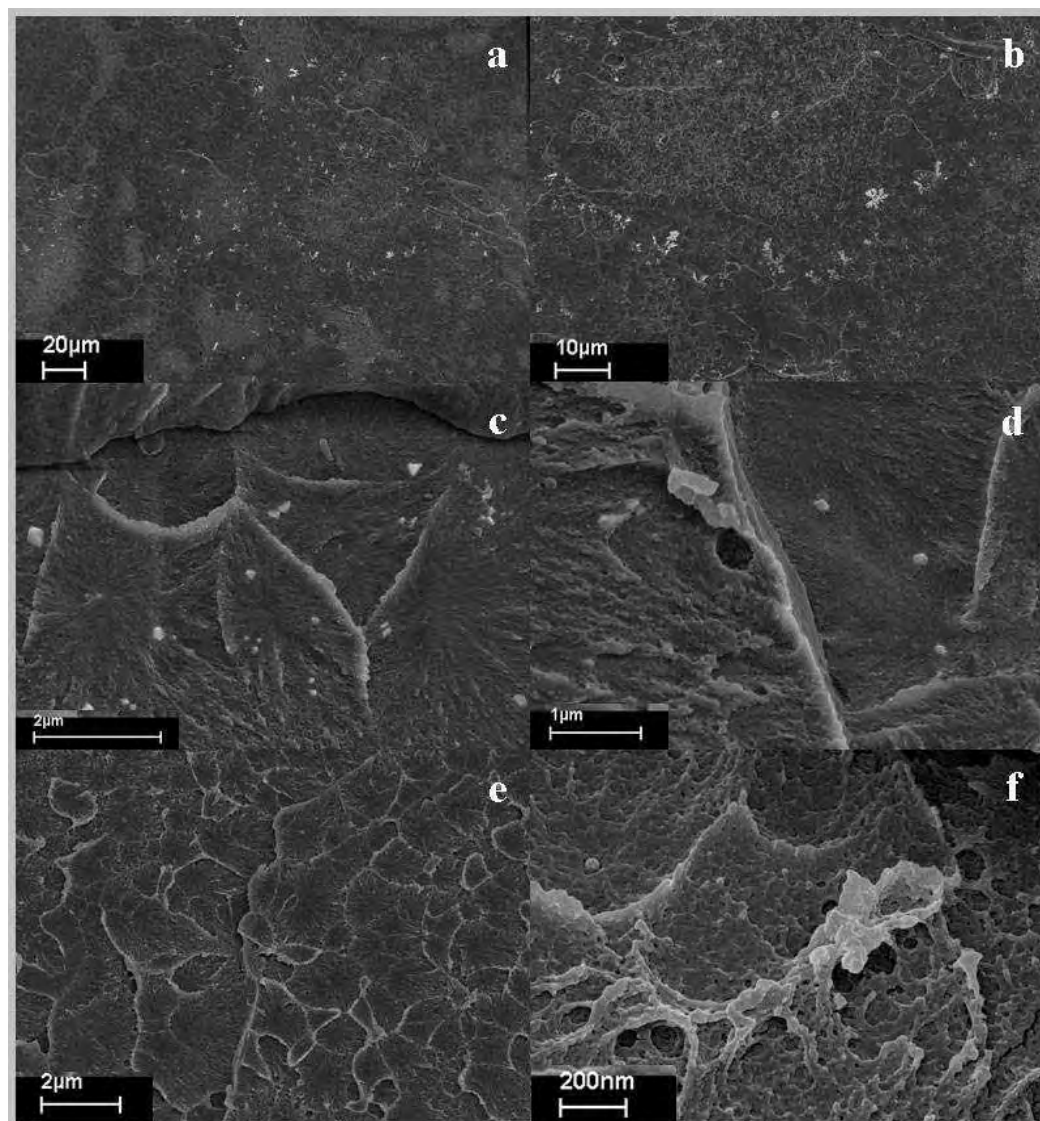


Figura 11. MEV da superfície de fratura do nanocompósito PMMA/Ag contendo 0,5% de solução coloidal de nanopartículas de prata. (a), (b), (c) e (d) antes da imersão em água deionizada. (e) e (f) após 120 dias de imersão. Aumento: (a) 499 x; (b) 1,40 Kx; (c) 22,61 Kx; (d) 29,53 Kx; (e) 10,01 Kx; (f) 73,67 Kx.

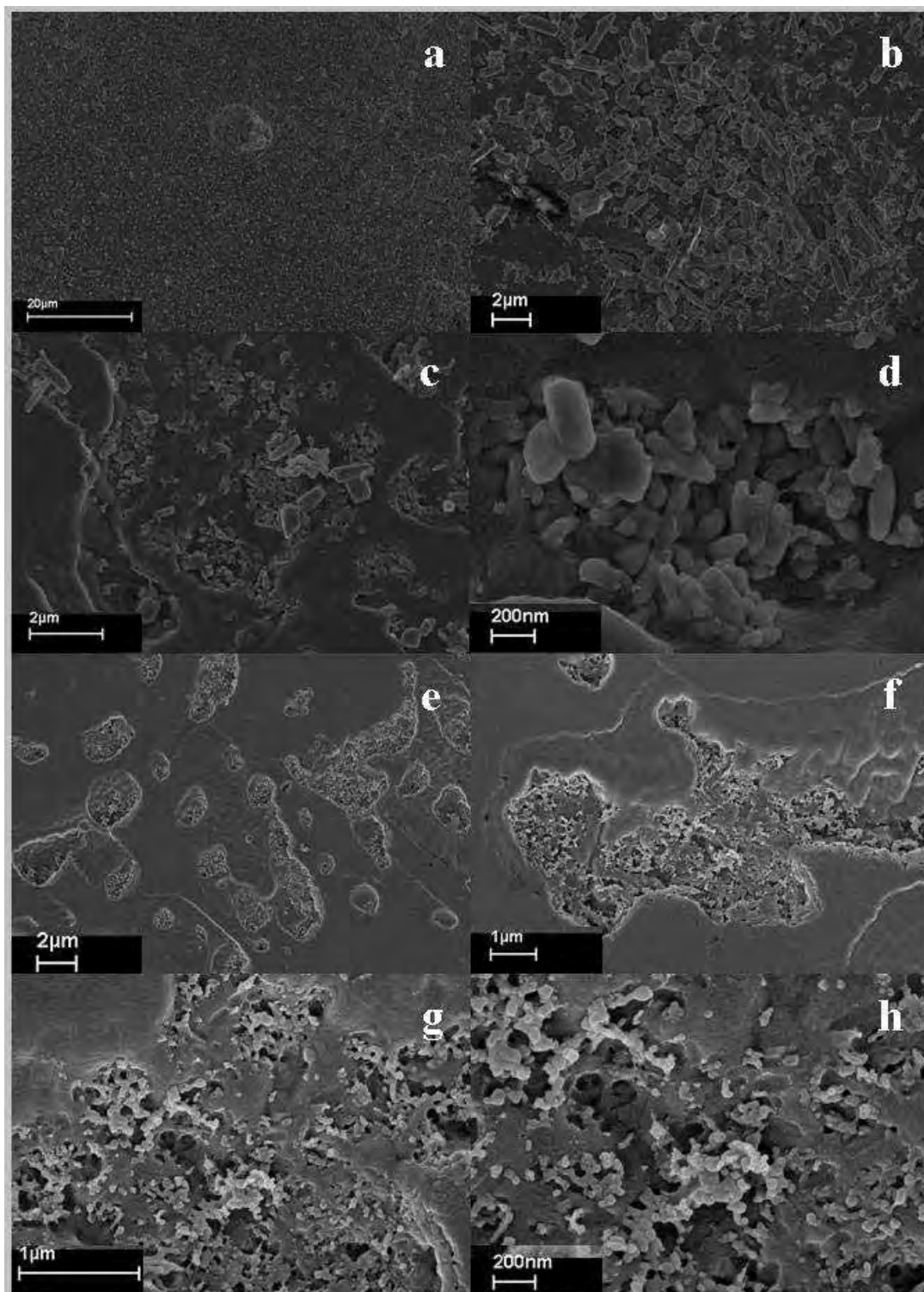


Figura 12. MEV da superfície externa do nanocompósito PMMA/Ag contendo 5% de solução coloidal de nanopartículas de prata. (a), (b), (c) e (d) antes da imersão em água deionizada. (e), (f), (g) e (h) após 120 dias de imersão. Aumento: (a) 2,32 Kx; (b) 5,58 Kx; (c) 13,00 Kx; (d) 63,14 Kx; (e) 5,00 Kx; (f) 15,00 Kx; (g) 35,00 Kx; (h) 60,00 Kx.

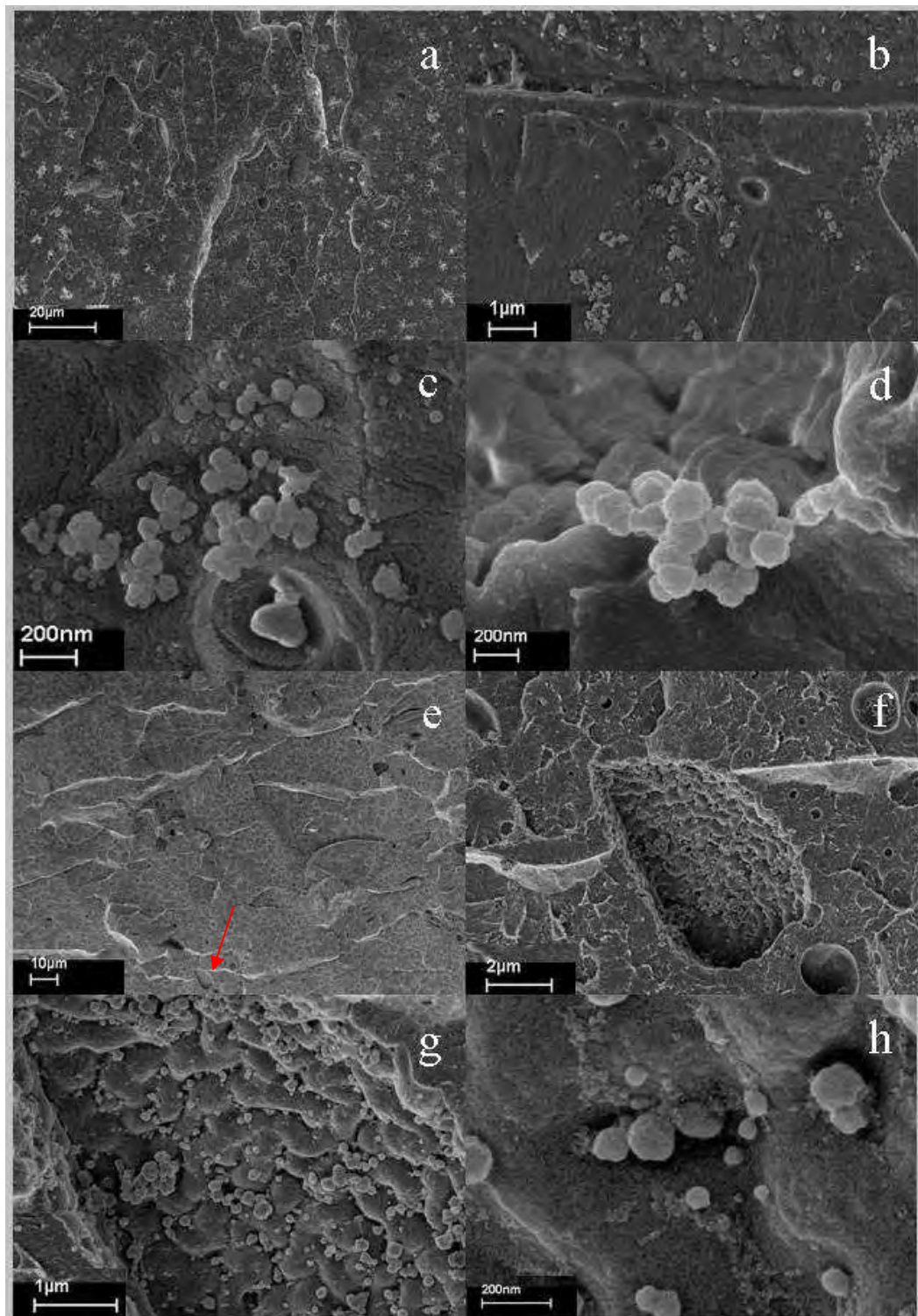


Figura 13. MEV da superfície de fratura do nanocompósito PMMA/Ag contendo 5% de solução coloidal de nanopartículas de prata. (a), (b), (c) e (d) antes da imersão em água deionizada. (e), (f), (g) e (h) após 120 dias de imersão. As figuras (f), (g) e (h) representam sucessivos aumentos da área indicada com a seta na figura (e). Aumento: (a) 1,28 Kx; (b) 13,55 Kx; (c) 64,00 Kx; (d) 69,79 Kx; (e) 1,00 Kx; (f) 10,00 Kx; (g) 25,00 Kx; (h) 150,00 Kx.

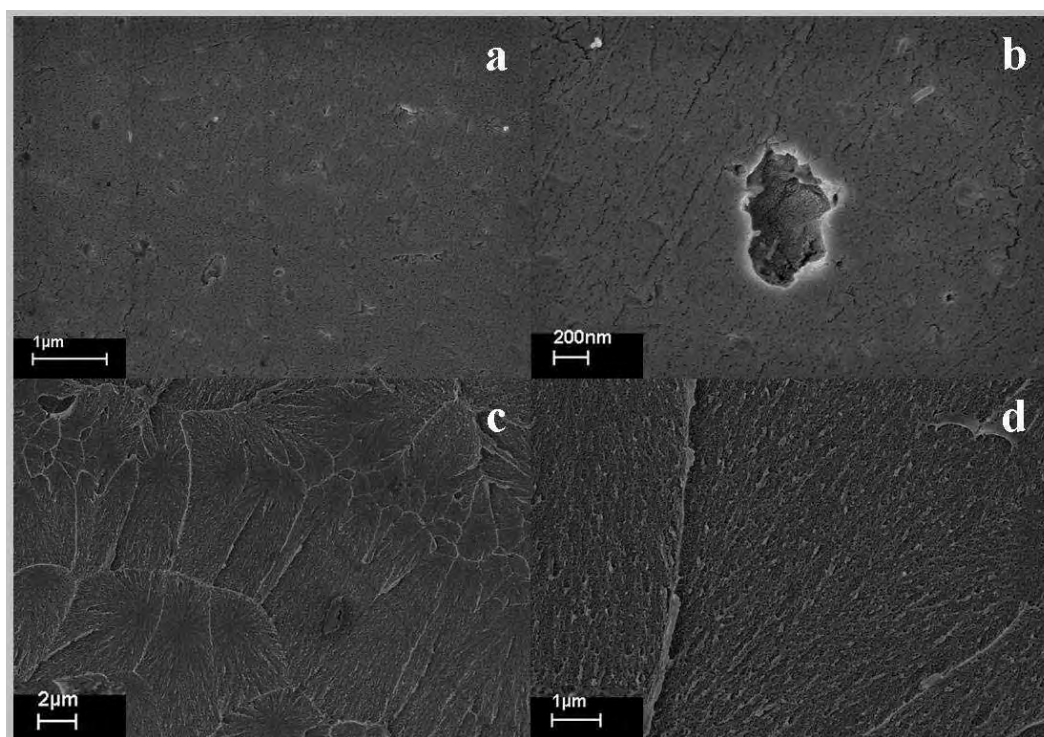


Figura 14. MEV da resina acrílica sem nanopartículas de prata. **(a)** e **(b)** superfície externa, **(c)** e **(d)** superfície de fratura. Área central em **(b)** indicando um poro ou defeito na superfície do polímero. Aumento: **(a)** 25,00 Kx; **(b)** 50,00 Kx; **(c)** 5,00 Kx; **(d)** 15,00 Kx.

ANEXOS

Anexo A - Materiais e Métodos

1. Síntese de nanopartículas de prata



Figura 1. a) Soluções de nitrato de prata e citrato de sódio utilizadas na síntese das nanopartículas de prata; b) balão de fundo redondo conectado a um condensador e ao espectrofotômetro de UV/Vis, contendo no seu interior as soluções que foram mantidas sob agitação magnética e aquecimento a 97°C por cerca de 10 minutos.



Figura 2. Solução coloidal de nanopartículas de prata com tonalidade amarelo âmbar, que é um dos indicativos da formação destas nanopartículas.

Para análise da solução coloidal por espectroscopia de absorção no UV-Vis foi montado um sistema composto por uma bomba peristáltica e uma cubeta de análise adaptada de forma a proporcionar a análise on-line da reação de formação das nanopartículas pela banda plasmon, na região de 190 a 800nm (Figura 3). As nanopartículas de prata também foram caracterizadas qualitativamente por difração de raios-X para que se conhecesse a estrutura cristalina das mesmas. O difratômetro de raios-X (Figura 4) operou na faixa 2θ de 20 a 110 graus, voltagem de 40 KV, corrente de 40 mA, fenda divergente de 1,0 mm, fenda de coleta de 0,2 mm e acumulação para leitura a cada 0,02 segundo. A amostra foi preparada gotejando o colóide sobre um substrato de silício e aguardando-se a secagem do mesmo na temperatura ambiente.



Figura 3. Espectrofotômetro UV-Vis Shimadzu Multspec 1501 utilizado durante a síntese para acompanhar a formação das nanopartículas de prata.



Figura 4. Difratorômetro de raios-X, Rigaku DMax-2000PC, com anodo rotatório e radiação CuK_α ($\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$), utilizado para confirmar a presença de prata na solução coloidal.

2. Adição da solução coloidal de nanopartículas de prata ao PMMA e processamento da resina acrílica

Para obtenção dos espécimes foram confeccionados moldes em silicone para inclusão por meio de uma matriz metálica com diâmetro interno de 21 mm e altura de 6 mm, apresentando no seu interior uma réplica maciça em metal do espécime de resina acrílica. Essa réplica de metal foi localizada centralmente no interior da matriz e apresentou diâmetro de 10 mm e altura de 3,0 mm. Os moldes em silicone foram obtidos através da condensação manual desse material no interior da matriz e aguardou-se a polimerização final do silicone (Figura 5).

Após a obtenção dos moldes, os mesmos foram perfurados com uma agulha para a passagem de um fio de silicone. Os moldes contendo os fios de silicone foram fixados com adesivo (Cola Tenaz Loctite, Henkel Ltda, São Paulo,

São Paulo, Brasil) sobre uma lâmina de vidro retangular (60 mm x 40 mm x 3 mm) e seu interior foi preenchido com cera utilidade (Wilson, Polidental Ind. e Com. Ltda, Cotia, São Paulo, Brasil) (Figura 6).

O conjunto lâmina de vidro + moldes em silicone foi incluído em mufla metálica com gesso pedra tipo III. Após o gesso tomar presa, uma outra lâmina de vidro com as mesmas dimensões citadas anteriormente foi posicionada sobre os moldes já incluídos em gesso e fixada com cera utilidade. A contra-mufla foi então preenchida com gesso pedra tipo III e o conjunto foi levado para uma prensa hidráulica para eliminação dos excessos de gesso (Figura 7). Após a presa do gesso a mufla foi aberta, a cera removida do interior dos moldes e a superfície do vidro foi limpa com acetona pura (Labsynth Produtos para Laboratórios Ltda, Diadema, São Paulo, Brasil) (Figura 8).

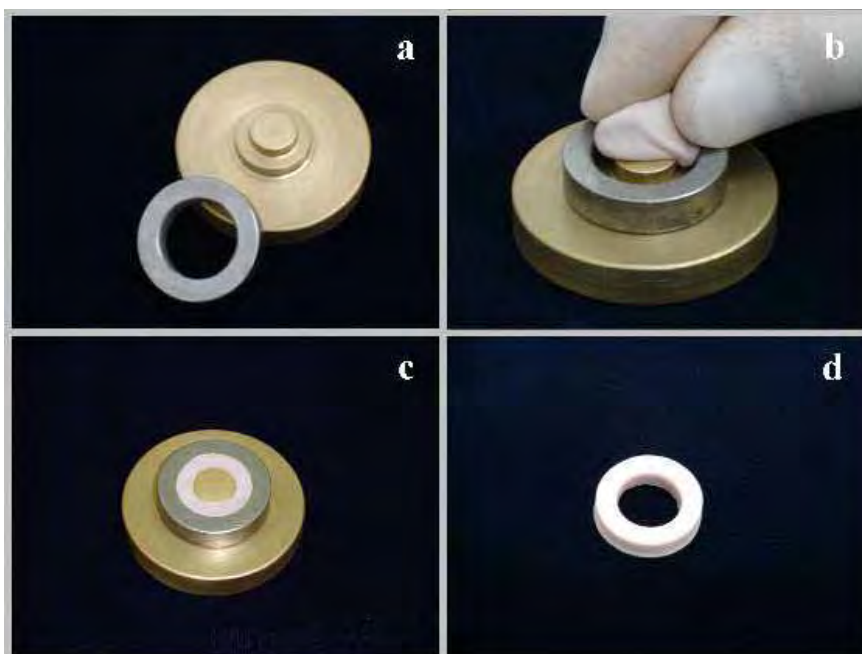


Figura 5. a) Matriz metálica com réplica maciça do espécime de resina acrílica localizada centralmente em sua base, e anel metálico removível; b) condensação manual do silicone no interior da matriz metálica; c) silicone no interior da matriz após condensação deste material; d) molde em silicone vazado já pronto.

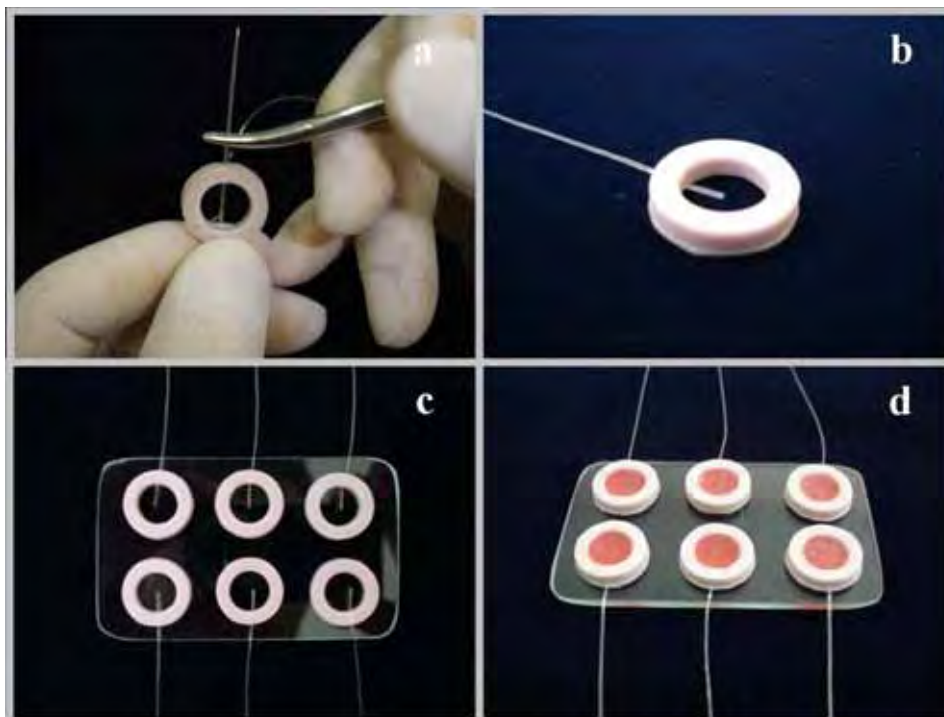


Figura 6. a) Perfuração do molde com agulha para passagem do fio de silicone; b) aspecto do molde em silicone após a passagem do fio; c) moldes em silicone fixados sobre uma lâmina de vidro; d) interior dos moldes preenchidos com cera utilidade.

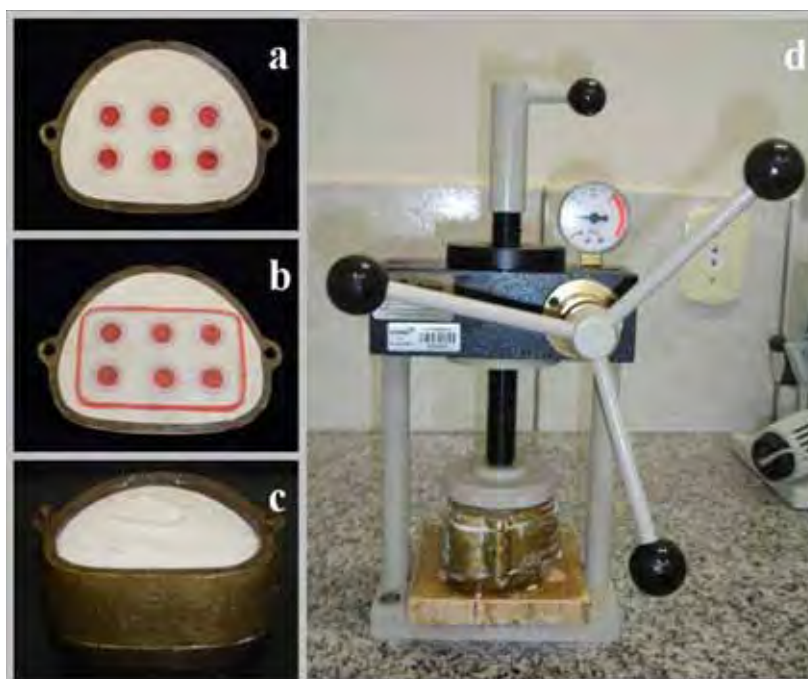


Figura 7. a) Moldes em silicone preenchidos com cera utilidade e incluídos em gesso no interior da mufla; b) lâmina de vidro posicionada sobre os moldes incluídos e fixada com cera utilidade; c) encaixe da contra-mufla e preenchimento da mesma com gesso pedra tipo III; d) prensagem da mufla metálica e eliminação dos excessos de gesso.

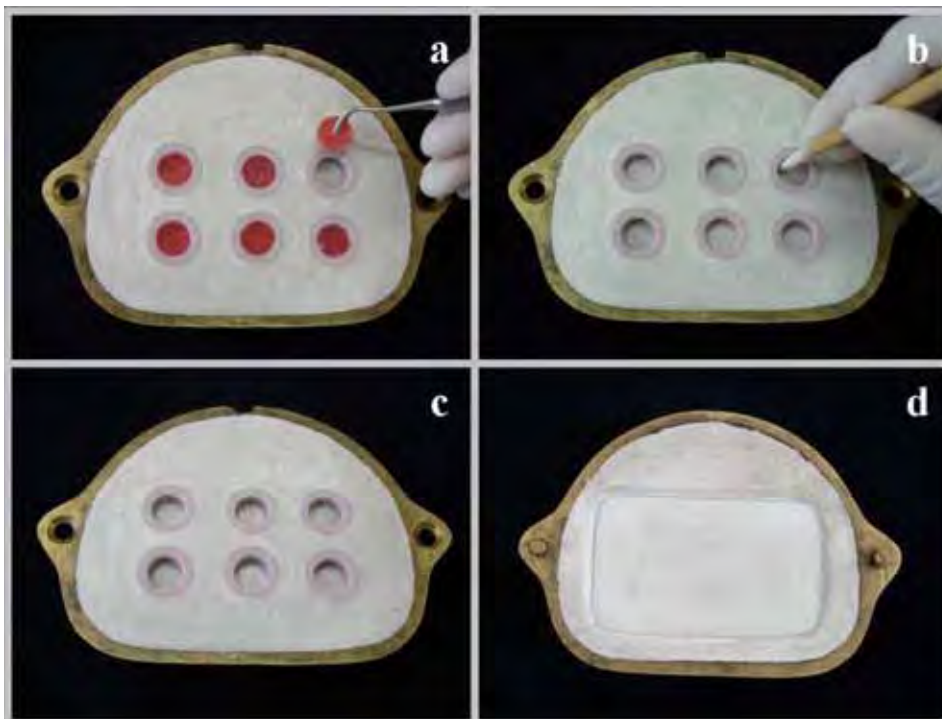


Figura 8. a) Remoção da cera utilidade do interior dos moldes em silicone com auxílio de um hollemback; b) eliminação dos resíduos de cera com algodão e acetona pura; c) interior dos moldes limpos e prontos para receberem a resina acrílica; d) lâmina de vidro posicionada na superfície do gesso pedra da contra-mufla.

A resina acrílica Lucitone 550 (Figura 9) foi proporcionada de acordo com as instruções do fabricante. Para cada espécime utilizou-se a proporção de 4 g de pó / 1,9 mL de líquido. Com auxílio de uma pipeta automática (Acura electro 925, Socorex Isba S/A, Ecublens, Lausanne, Suíça), a solução contendo as nanopartículas de prata (Figura 9) foi adicionada ao componente líquido da resina acrílica nas concentrações de 0% (0 μ L), 0,05% (2 μ L), 0,5% (20 μ L) e 5% (200 μ L) baseadas na massa do polímero (4g). Para cada concentração foram confeccionados cinco espécimes.



Figura 9. a) Resina acrílica e b) solução coloidal de nanopartículas de prata para ser adicionada ao PMMA.

Esses materiais foram misturados com espátula 36 (Millenium, Golgran Ind. e Com. de Instrumental Odontológico Ltda, São Paulo, São Paulo, Brasil) no interior de potes de vidro (Figura 10) e, ao atingir a fase plástica, a resina acrílica contendo as nanopartículas de prata foi condensada no interior dos moldes em silicone. Na seqüência, a mufla foi fechada e levada sob a prensa hidráulica. Realizou-se uma prensagem inicial para eliminação dos excessos de resina acrílica e uma prensagem final. A carga utilizada durante a prensagem inicial foi de 0,5 tonelada e na prensagem final cargas graduais de 0,5, 0,8 e 1 tonelada. Ao atingir-se 1 tonelada de pressão, a mufla foi mantida sob a prensa por 30 minutos. Posteriormente, a mufla foi retirada da prensa hidráulica, colocada em uma prensa de mão (Dentária Campineira Ltda, Campinas, São Paulo, Brasil) e levada para a polimerização em banho de água quente por 1,5 horas a 73°C seguidos de 30 minutos a 100°C em uma termopolimerizadora automática. Após a polimerização, a mufla foi resfriada sobre bancada por uma noite e os espécimes desincluídos (Figura 11).

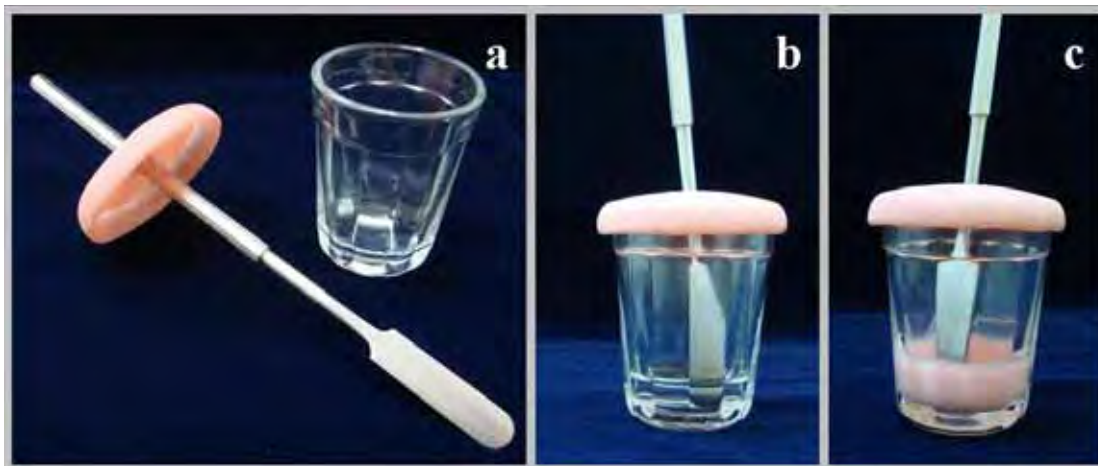


Figura 10. a) Espátula, pote de vidro e tampa utilizados para a mistura do polímero, monômero e colóide de prata; b) mistura da solução coloidal de nanopartículas de prata com o monômero; c) acréscimo do polímero à solução de monômero contendo o colóide de prata.

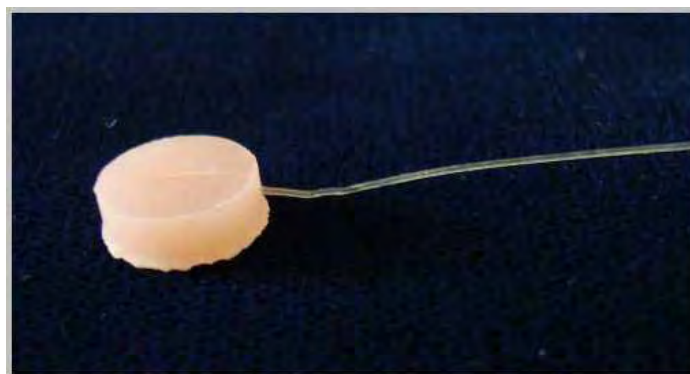


Figura 11. Aspecto do espécime após desinclusão e preso ao fio de silicone.

3. Avaliação da liberação de nanopartículas de prata

Os fios de silicone pelos quais os espécimes estavam presos foram fixados com cola quente nas tampas de tubos de polipropileno e cada espécime foi imerso em 10 mL de água deionizada no interior destes tubos (Figura 12). Realizou-se, então, no tempo zero (t_0) a pesagem dos tubos contendo os espécimes imersos em água em uma balança eletrônica de precisão (BEL engineering, MPL Materiais

para Laboratório, Piracicaba, São Paulo, Brasil). Na seqüência, os tubos foram mantidos à 37°C sob agitação em um agitador orbital por diferentes períodos de tempo: $t_1 = 7$, $t_2 = 15$, $t_3 = 30$, $t_4 = 60$ e $t_5 = 120$ dias (Figura 13). O agitador operou 6 horas por dia a uma velocidade de 100rpm. A cada 10 dias, para que a concentração de prata se mantivesse constante, os tubos contendo os espécimes foram pesados novamente e a água perdida por evaporação era repostada até que cada tubo apresentasse o mesmo peso que em t_0 .

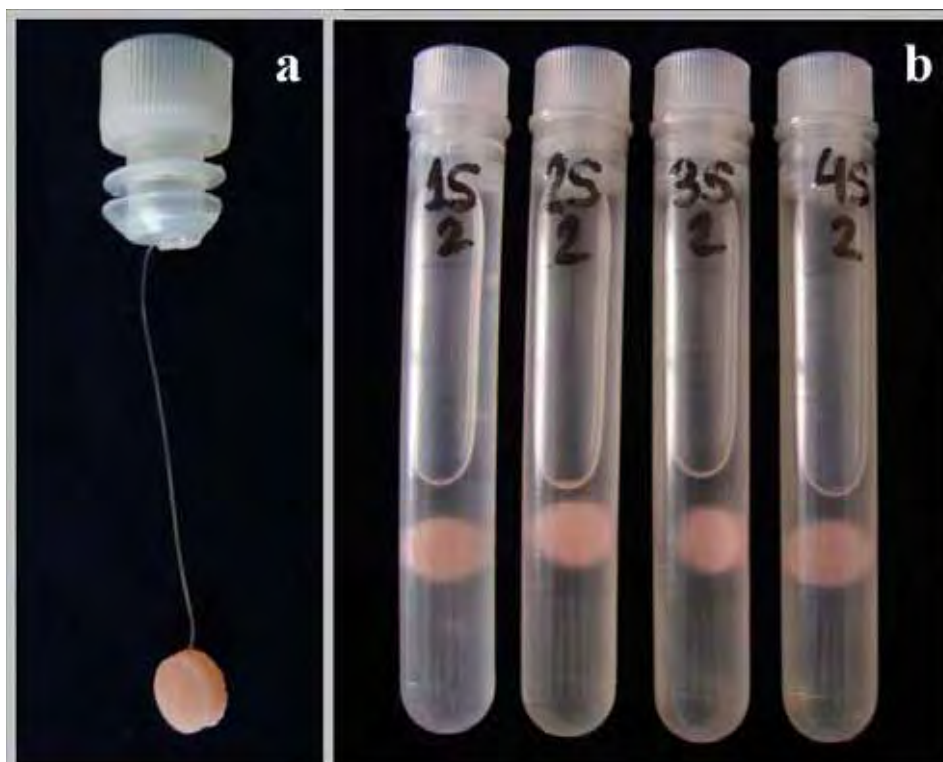


Figura 12. a) Fio de silicone fixo à tampa do tubo de polipropileno; b) espécimes imersos em água deionizada no interior dos tubos de polipropileno.



Figura 13. Agitador orbital Tecnal TE 420. Suporte metálico para contenção dos tubos de polipropileno encaixado sobre a plataforma agitadora.

Durante cada período de tempo (7, 15, 30, 60 e 120 dias), 1 mL de solução de cada tubo foi coletado e posteriormente 1 mL de água deionizada foi adicionada aos mesmos para manutenção constante do volume. Das soluções coletadas, foram realizadas as dosagens da prata via espectroscopia de absorção atômica (Figura 14). Um volume de 0,5 mL de cada amostra foi injetado na câmara de atomização do espectrofotômetro de absorção atômica e uma chama de gás acetileno ($\sim 3000^{\circ}\text{C}$) vaporizou a solução e atomizou as partículas ou íons prata que pudessem estar presentes na amostra. Uma lâmpada de catodo-odo de prata, que emite um comprimento de onda de 328,1 nm, e um detector foram posicionados de modo que a nuvem de prata atomizada passasse pelo caminho óptico entre a lâmpada e o detector. A prata atomizada absorve parte da luz gerada na lâmpada e essa absorção é proporcional à concentração de prata na solução.

Ainda, preparou-se 8 soluções padrões dissolvendo-se 10 mg/L de AgNO_3 em água deionizada: padrão 1 = 1,0 mg/L, padrão 2 = 0,50 mg/L, padrão 3 = 0,10 mg/L, padrão 4 = 0,075 mg/L, padrão 5 = 0,05 mg/L, padrão 6 = 0,01 mg/L, padrão 7 = 0,0075 mg/L e padrão 8 = 0,005 mg/L. As medidas de absorvância das soluções padrões foram realizadas em ordem crescente de concentração. A partir daí obteve-se uma curva de calibração linear que permitiu a análise quantitativa da concentração de prata nas amostras (Figura 15).



Figura 14. Espectrofotômetro de absorção atômica Varian AA240FS utilizado para avaliar a presença de prata nas amostras.

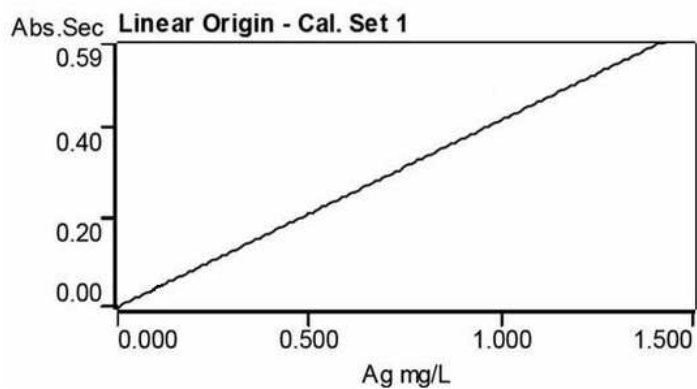


Figura 15. Curva de calibração linear (absorvância x concentração de Ag) calculada pelo espectrofotômetro e obtida a partir das medidas de absorvância das soluções padrões de nitrato de prata.

4. Investigação morfológica do nanocompósito PMMA/Ag

Para esta investigação, os espécimes foram imersos por 3 minutos em nitrogênio líquido (-196°C) e fraturados (fratura criogênica) com auxílio de uma chave de fenda e um martelo. Após a fratura, os espécimes foram fixados em staves com fita adesiva de carbono e aplicou-se tinta prata em algumas regiões de suas superfícies com o intuito de se melhorar a condução dos elétrons pelas mesmas. Na seqüência realizou-se o recobrimento das superfícies dos espécimes com ouro (Figura 16) em uma câmara a vácuo e tanto a superfície externa quanto o interior (ou superfície de fratura) foram analisados por meio da microscopia eletrônica de varredura (Figura 17), antes e após 120 dias de armazenamento em água deionizada.

O princípio de funcionamento do microscópio eletrônico de varredura consiste na emissão de feixes de elétrons por um filamento capilar de tungstênio (eletrodo negativo), mediante a aplicação de uma diferença de potencial que pode variar de 0,5 a 30 KV. Essa variação de voltagem permite a variação da aceleração dos elétrons. A parte positiva em relação ao filamento do microscópio (eletrodo positivo) atrai fortemente os elétrons gerados, resultando numa aceleração em direção ao eletrodo positivo. A correção do percurso dos feixes é realizada pelas lentes condensadoras que alinham os feixes em direção à abertura da objetiva. A objetiva ajusta o foco dos feixes de elétrons antes dos elétrons atingirem a amostra analisada.

Dentro da coluna de alto vácuo, os elétrons gerados passam por lentes condensadoras, que reduzem o seu diâmetro, e por uma lente objetiva que os focalizam sobre a amostra. Logo acima da lente objetiva existem dois estágios de

bobinas eletromagnéticas responsáveis pela varredura do feixe sobre a amostra. O feixe interage com a região de incidência da amostra até uma profundidade que pode variar de $\sim 1 \mu\text{m}$ a $\sim 6 \mu\text{m}$, dependendo da natureza da amostra. Esta região é conhecida por volume de interação. O feixe de elétrons, extremamente estreito, é usado para varrer o espécime, isto é, ele é movido em um eixo x e y na superfície do espécime. Assim, o feixe faz com que o próprio espécime emita elétrons, os quais geram sinais que serão detectados e utilizados para a formação das imagens



Figura 16. Preparação dos espécimes para análise por meio de MEV. Deposição de ouro sobre as superfícies dos espécimes: **a)** superfície externa e **b)** superfície interna do espécime após fratura criogênica.



Figura 17. Microscópio eletrônico FEG-VP Zeiss Supra 35 utilizado na obtenção das micrografias para análise morfológica dos espécimes.

Anexo B – Resultados

Liberação de prata

Os gráficos a seguir mostram os espectros de absorção atômica para detectar prata a partir das amostras onde o nanocompósito PMMA/Ag com diferentes concentrações de nanopartículas de prata ficou imerso em água deionizada por 7 (t_1), 15 (t_2), 30 (t_3), 60 (t_4) e 120 (t_5) dias. Os gráficos não indicaram a presença de prata nas soluções, independentemente da concentração e do período de imersão.

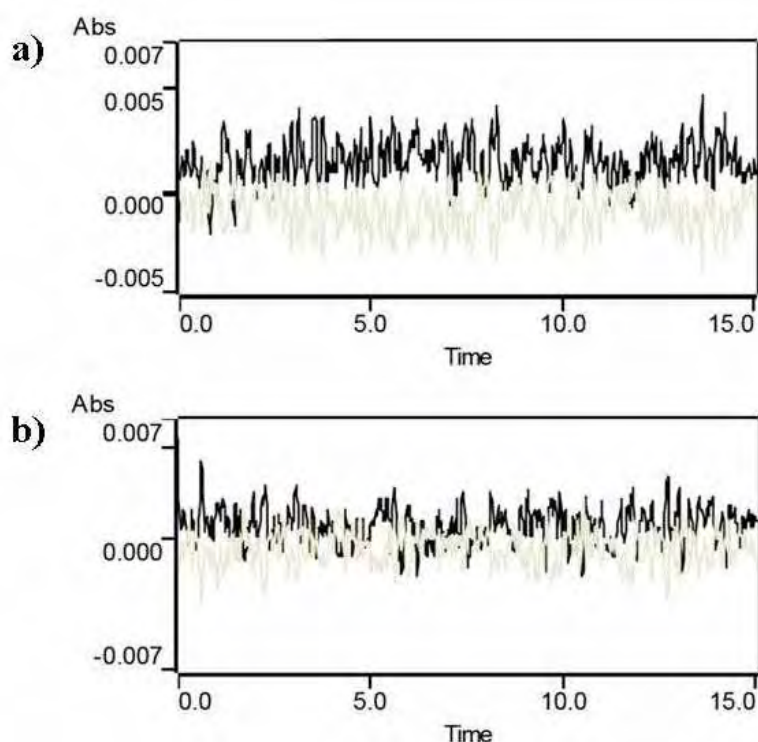


Figura 18. Espectros de absorção atômica das soluções coletadas em t_1 a partir do nanocompósito PMMA/Ag contendo 0,5% (a) e 5% (b) de colóide de prata.

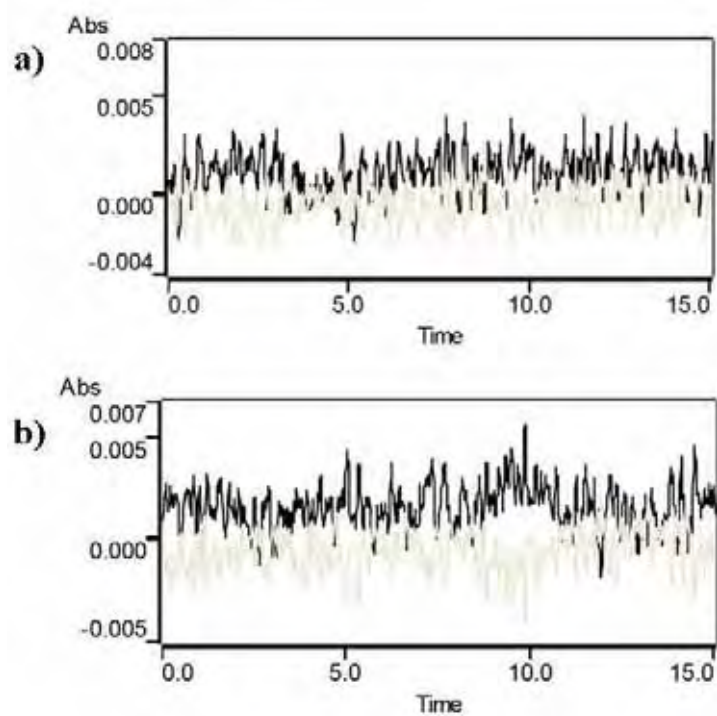


Figura 19. Espectros de absorção atômica das soluções coletadas em t_2 a partir do nanocompósito PMMA/Ag contendo 0,5% (a) e 5% (b) de colóide de prata.

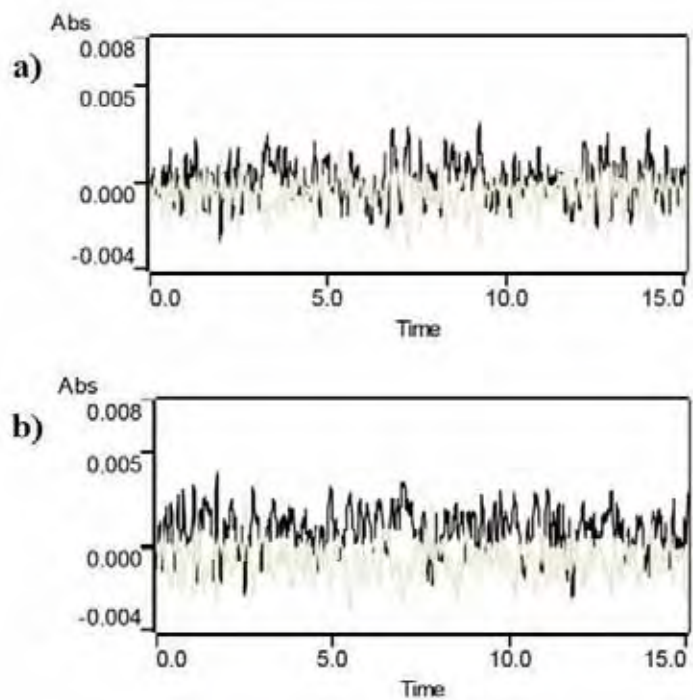


Figura 20. Espectros de absorção atômica das soluções coletadas em t_3 a partir do nanocompósito PMMA/Ag contendo 0,5% (a) e 5% (b) de colóide de prata.

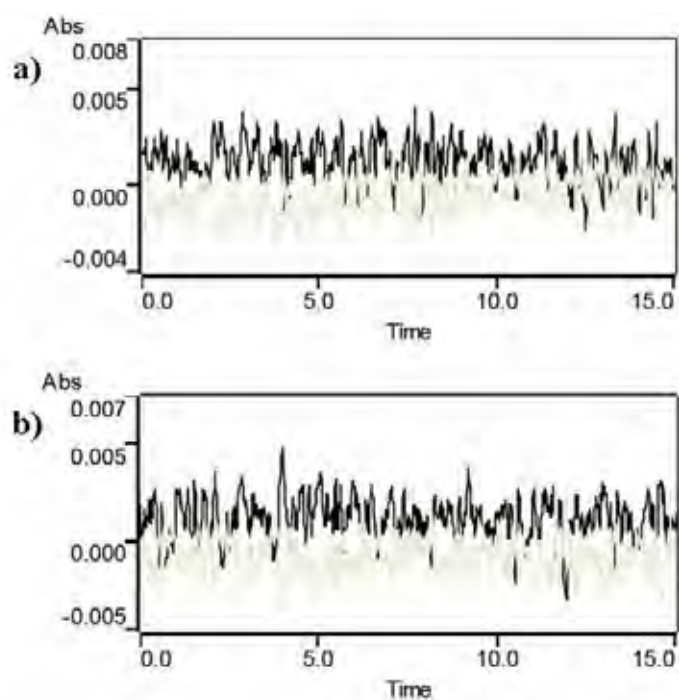


Figura 21. Espectros de absorção atômica das soluções coletadas em t_4 a partir do nanocompósito PMMA/Ag contendo 0,5% (a) e 5% (b) de colóide de prata.

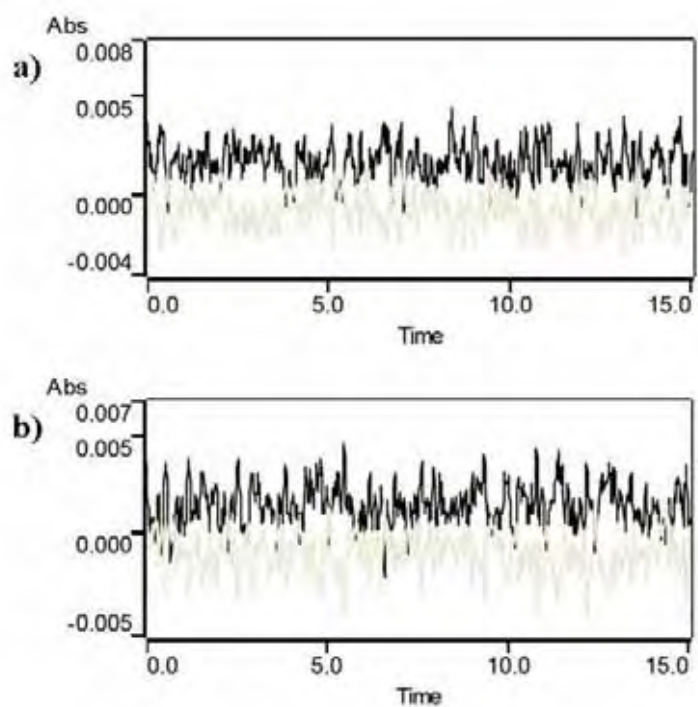


Figura 22. Espectros de absorção atômica das soluções coletadas em t_5 a partir do nanocompósito PMMA/Ag contendo 0,5% (a) e 5% (b) de colóide de prata.

Anexo C - Normas para publicação

International Journal of Antimicrobial Agents

Guide for Authors

Official Journal of the International Society of Chemotherapy

These guidelines generally follow the "Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals". The complete document appears at <http://www.icmje.org>.

Submission

The Journal now accepts online submissions only. Manuscripts can be submitted at <http://ees.elsevier.com/ijaa/>. Once the manuscript has been uploaded, our system automatically generates an electronic pdf proof, which is then used for reviewing. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revisions, will be managed via this system. Authors may also track the progress of their paper using this system to final decision.

If you have any problems submitting your paper through this system, please contact the Editorial Office on: e-mail: ijaa@elsevier.com; tel: +44 (0)1865 843270; fax: +44 (0)1865 843992.

Journal Publishing Agreement

Upon acceptance of an article, authors will be asked to sign a "Journal Publishing Agreement" (for more information on this and copyright see <http://www.elsevier.com/authors>). Acceptance of the agreement will ensure the widest possible dissemination of information. An e-mail (or letter) will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form.

If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases: contact Elsevier's Rights Department, Philadelphia, PA, USA: phone (+1) 215 239 3804, fax (+1) 215 239 3805, e-mail healthpermissions@elsevier.com. Requests may also be completed online via the Elsevier homepage (<http://www.elsevier.com/locate/permissions>).

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, without the written consent of the Publisher.

Authorship

All authors should have made substantial contributions to all of the following: (1) the conception and design of the study, or acquisition of data, or analysis and interpretation of data, (2) drafting the article or revising it critically for important intellectual content, (3) final approval of the version to be submitted.

Article types

The following types of manuscripts are routinely accepted (please note that word count is from abstract to references but excluding references):

Original Articles: The form of these articles is discussed fully below; an abstract is required. They should be no longer than 4000 words (as above, please note that word count also excludes tables, figures and legends). IJAA will be happy to consider papers of veterinary origin as long as there is some linkage of the scientific work back to human antibiotic use.

Letters: Headings should not be used in a letter; no abstract or keywords are required. The text should be no more than 800 words; there should be a maximum of 7 references and one table or figure may be included.

Reviews: An abstract and keywords are required. The text should be divided into sections by suitable headings. Tables and figures may be used as appropriate for the text. They should be no longer than 5000 words.

Opinions and Commentaries: These take the same form as a review.

Short Communications: These should be no more than 2,500 words, with up to 15 references and a maximum of 3 figures or tables.

Leaders: These tend to be invited papers but unsolicited Leaders are welcome. There are no abstract, keywords or section headings.

Submission Checklist

Please ensure that the following are including in your submission:

- One author designated as corresponding author:
- Their E-mail address
- Full postal address
- Telephone and fax numbers
- Keywords
- Cover letter addressed to the Editor, introducing the manuscript and confirming that it is not being submitted concurrently elsewhere
- All figure captions
- All tables (including title, description, footnotes)
- All necessary files have been uploaded as attachments to the e-mail
- Manuscript has been spell checked
- All text pages have been numbered
- References are in the correct format for this journal
- All references mentioned in the Reference list are cited in the text and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Web)
- Colour figures are clearly marked as being intended for colour reproduction or to be reproduced in black-and-white.

Manuscripts

Please type all pages with double spacing and wide margins on one side of the paper. Words to be printed in italics are to be underlined. Title page, abstract, tables, legends to figures and reference list should each be provided on separate pages of the manuscript.

Use a true type font such as Times New Roman or Arial. The text should be in single-column format. Number the pages. In order to help our reviewers please number each line of the manuscript. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. In particular, do not use the options to justify text or to hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts, superscripts etc. Do not embed 'graphically designed' equations or tables, but prepare these using the facility in Word or as a separate file in Excel. When preparing tables, if you are using a table grid, use only one grid for each individual table and not a grid for each row. Do not prepare tables in Powerpoint. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also: <http://www.elsevier.com/authors>). Do not import the figures into the text file but, instead, indicate their approximate locations directly in the electronic text and on the manuscript. See also the section on *illustrations*.

To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the spellchecker.

The title page should include: the title, the name(s) and affiliation(s) of the author(s), an address for correspondence, and telephone/fax numbers for editorial queries. All articles should include an Abstract (a single paragraph) of no more than 120 words and 3-6 key words for abstracting and indexing purposes.

Please **do not split** the article into separate files (title page as one file, text as another, etc.). Ensure that the letter 'l' and digit '1' (also letter 'O' and digit '0') have been used properly, and structure your article (tabs, indents, etc.) consistently. Characters not available on your computer (Greek letters, mathematical symbols, etc.) should not be left open but indicated by a unique code (e.g., α , @, #, etc., for the Greek letter). Such codes should be used consistently throughout the entire text. Please make a list of such codes and provide a key. Do not allow your computer to introduce word splits and do not use a 'justified' layout. Please adhere strictly to the general instructions on style/arrangement and, in particular, the reference style of the journal. It is very important that you save your file in the standard format for the program you are using. If your computer features the option to save files 'in flat ASCII', please do not use it.

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Italics are not to be used for expressions of Latin origin, for example, *in vivo*, *et al.*, *per se*. Use decimal points (not commas); use a space for thousands (10 000 and above).

Provide the following data in your submission (in the order given). This is required for all types of paper submitted.

Title. Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.

Author names and affiliations. Where the family name may be ambiguous (e.g., a double name), please indicate this clearly. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name.

Corresponding author. Clearly indicate who is willing to handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. **Ensure that telephone and fax numbers (with country and area code) are provided in addition to the e-mail address and the complete postal address.**

Present/permanent address. If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Abstract. A concise and factual abstract is required (maximum length 200 words). The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. Do not cite references in the abstract. Non-standard or uncommon abbreviations should be avoided in the abstract, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

Keywords. Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using British spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Abbreviations. Define abbreviations that are not standard in this field at their first occurrence in the article: in the abstract but also in the main text after it. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

Subdivision of the article. Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ?), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to 'the text.' Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

Introduction. State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

Experimental/Materials and methods. Provide sufficient detail to allow the work

to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described.

Include in figure legends and table texts technical details of methods used, while describing the methods themselves in the main text.

Results/Discussion. This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate in a Short Communication but not in an Original Article. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

Acknowledgement. Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. When the work included in a paper has been supported by a grant from any source, this must be indicated. A connection of any author with companies producing any substances or apparatus used in the work should be declared. Authors will be asked to respond to a form e-mailed to them when their paper is accepted (see the 'conflict of interest' section below). All contributors who do not meet the criteria for authorship as defined above should be listed in an acknowledgements section. Examples of those who might be acknowledged include a person who provided purely technical help, writing assistance, or a department chair who provided only general support. Authors should disclose whether they had any writing assistance and identify the entity that paid for this assistance.

References. References should be numbered consecutively (with parentheses) as they appear in the text. Type the reference list with double spacing on a separate sheet. References should accord with the system used in *Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals* (N Engl J Med 1991;324:424-428).

Examples:

1 Taylor DN, Sanchez JL, Candler W et al. Treatment of traveller's diarrhea: ciprofloxacin plus loperamide compared with ciprofloxacin alone. *Ann Intern Med* 1991;114:731-734.

2 Mackowiak PA, ed. *Fever. Basic Mechanisms and Management*. New York: Raven Press, 1991.

3 Rubin M, Pizzo PA, Monotherapy in neutropenic cancer patients. In: Peterson PK, Verhoef J, eds. *Antimicrobial Agents Annual 3*. Amsterdam: Elsevier, 1988.

Please note that all authors should be listed when six or less; when seven or more, list only the first six and add 'et al.'. Do not include references to personal communications, unpublished data or manuscripts either 'in preparation' or 'submitted for publication'. If essential, such material may be incorporated into the appropriate place in the text. *Recheck references in the text against reference list after your manuscript has been revised.*

Illustrations. Photographs should be presented as high quality jpg (jpeg) or tiff

files with high contrast. Magnification should be indicated by a line representing the actual scale of reproduction (0.1 mm, 1mm or 10 mm); the use of magnification factors is to be avoided where possible. Illustrations will not be redrawn by the Publisher: line figures should be suitable for direct reproduction. They should be prepared with black on white background, or be black-and-white images; *they should be completely and consistently lettered, the size of the lettering being appropriate to that of the illustration, taking into account the necessary reduction in size.*

Illustrations should be designed to fit either a single column (84 mm wide) or the full text width (175mm). However, if specifically requested by the author(s), plates may be reproduced larger than the typeset area; all originals for these should have the same proportions to achieve uniformity in their presentation. *N.B. When plates are required to fill the entire page, the originals should have the dimensions 215 x 285 mm and contain no essential information or labelling near the edges.* Further information about artwork can be found on the World Wide Web: access under <http://www.elsevier.com/locate/authorartwork>

Colour figures. Colour figures will be included subject to the authors' agreement to defray the cost.

Specific remarks Mathematical formulae. Present simple formulae in the line of normal text where possible. In principle, variables are to be presented in italics. Use the solidus (/) instead of a horizontal line,

e.g., X_p/Y_m

Powers of e are often more conveniently denoted by exp. Number consecutively any equations that have to be displayed separate from the text (if referred to explicitly in the text).

Tables. Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text. Place footnotes to tables below the table body and indicate them with superscript lowercase letters. Avoid vertical rules. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in tables do not duplicate results described elsewhere in the article.

Nomenclature and units. Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other quantities are mentioned, give their equivalent in SI.

DNA sequences and GenBank Accession numbers. Many Elsevier journals cite 'gene accession numbers' in their running text and footnotes. Gene accession numbers refer to genes or DNA sequences about which further information can be found in the databases at the National Center for Biotechnical Information (NCBI) at the National Library of Medicine. Elsevier authors wishing to enable other scientists to use the accession numbers cited in their papers via links to these sources, should type this information in the following manner:

For each and every accession number cited in an article, authors should type the accession number in **bold, underlined text**. Letters in the accession number should always be capitalised. (See example below.) This combination of letters and format will enable Elsevier's typesetters to recognise the relevant texts as accession numbers and add the required link to GenBank's sequences.

Example:

GenBank accession nos. **AI631510** , **AI631511** , **AI632198** , and **BF223228**), a B-cell tumour from a chronic lymphatic leukaemia (GenBank accession no. **BE675048**), and a T-cell lymphoma (GenBank accession no. **AA361117**).

Authors are encouraged to check accession numbers used very carefully. **An error in a letter or number can result in a dead link.** In the final version of the *printed article*, the accession number text will not appear bold or underlined. In the final version of the *electronic copy*, the accession number text will be linked to the appropriate source in the NCBI databases enabling readers to go directly to that source from the article.

Editorial Review

All manuscripts are subject to peer review. If changes are requested, revisions received later than 3 months after this request will be treated as new submissions.

Proofs

One set of page proofs in PDF format will be sent by e-mail to the corresponding author (if we do not have an e-mail address then paper proofs will be sent by post). Elsevier now sends PDF proofs which can be annotated; for this you will need to download Adobe Reader version 7 available free from <http://www.adobe.com/products/acrobat/readstep2.html>. Instructions on how to annotate PDF files will accompany the proofs. The exact system requirements are given at the Adobe site: <http://www.adobe.com/products/acrobat/acrrsystemreqs.html#70win>. If you do not wish to use the PDF annotations function, you may list the corrections (including replies to the Query Form) and return to Elsevier in an e-mail. Please list your corrections quoting line number. If, for any reason, this is not possible, then mark the corrections and any other comments (including replies to the Query Form) on a printout of your proof and return by fax, or scan the pages and e-mail, or by post.

Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Therefore, it is important to ensure that all of your corrections are sent back to us in one communication: please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility. Note that Elsevier may proceed with the publication of your article if no response is received.

Language Editing

If you are based in Japan, upon request, Elsevier Japan will provide a list of people who can check and improve the English of an article before submission. Contact our Tokyo office: Elsevier K.K., Editorial Service, 1-9-15 Higashi Azabu, Minato-ku, Tokyo 106-0044, Japan; tel.: +81-3-5561-5032; fax: +81-3-5561-5045; E-mail: info@elsevier.co.jp. For authors elsewhere who wish to have their work professionally edited prior to submission, please consult <http://www.elsevier.com/wps/find/authorsview.authors/languageediting/> for a list of approved language editors. Please note Elsevier neither endorses nor takes responsibility for any products, goods or services offered by outside vendors through our services or in any advertising. For more information please refer to our terms and conditions (External link <http://www.elsevier.com/authors> https://webmailuk.elsevier.com/exchweb/bin/redirect.asp?URL=http://www.elsevier.com/frameworkimages/externalLink_3.gif).

Page charges

The Journal does not charge a submission fee.

Offprints

The corresponding author, at no cost, will be provided with a PDF file of the article via e-mail or, alternatively, 25 free paper offprints. The PDF file is a watermarked version of the published article and includes a cover sheet with the journal cover image and a disclaimer outlining the terms and conditions of use. Paper offprints can be ordered by the authors. An order form with prices will be sent to the corresponding author.

Queries

All questions arising after acceptance of a manuscript by the editor, especially those relating to proofs, publication and reprints should be directed to the publishers, Elsevier Ireland Ltd., Elsevier House, Brookvale Plaza, East Park, Shannon, Co. Clare, Ireland. Tel: +353 61 709600, Fax: +353 61 709100, E-mail: support@elsevier.com. In the USA and Canada: For further information, contact Elsevier Inc., Attn: Journal Information Center, 360 Park Avenue South, New York, NY 10010, USA. Tel: +1 212 6333750; Fax: +1 212 6333990; Telex: 420-643 AEP Ui; E-mail: usinfo-f@elsevier.com.

Policy and Ethics

Declarations

Upon submission you will be required to complete and upload this form ([pdf version](#) or [word version](#)) to declare funding, conflict of interest and to indicate whether ethical approval was sought. This information must also be inserted into your manuscript under the acknowledgements section with the headings below. If you have no declaration to make please insert the following statements into your manuscript:

Funding: None

Competing interests: None declared

Ethical approval: Not required

Ethics

Work on human beings that is submitted to IJAA should comply with the principles laid down in the Declaration of Helsinki; Recommendations guiding physicians in biomedical research involving human subjects. Adopted by the 18th World Medical Assembly, Helsinki, Finland, June 1964, amended by the 29th World Medical Assembly, Tokyo, Japan, October 1975, the 35th World Medical Assembly, Venice, Italy, October 1983, and the 41st World Medical Assembly, Hong Kong, September 1989. The manuscript should contain a statement that the work has been approved by the appropriate ethical committees related to the institution(s) in which it was performed and that subjects gave informed consent to the work (see declarations section above). Studies involving experiments with animals must state that their care was in accordance with institution guidelines. Patients' and volunteers' names, initials, and hospital numbers should not be used.

Competing interests

See the declarations section above. All authors must disclose any financial and personal relationships with other people or organisations that could inappropriately influence (bias) their work. Examples of potential conflicts of interest include employment, consultancies, stock ownership, honoraria, paid expert testimony, patent applications/registrations, and grants or other funding.

Role of the funding source

See the declarations section. All sources of funding should be declared. Authors should declare the role of study sponsors, if any, in the study design, in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the manuscript; and in the decision to submit the manuscript for publication. If the study sponsors had no such involvement, the authors should so state.

Randomised controlled trials

All randomised controlled trials submitted for publication in IJAA should include a completed Consolidated Standards of Reporting Trials (CONSORT) flow chart. Please refer to the CONSORT statement website at <http://www.consort-statement.org> for more information. IJAA has adopted the proposal from the International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE) which require, as a condition of consideration for publication of clinical trials, registration in a public trials registry. Trials must register at or before the onset of patient enrolment. The clinical trial registration number should be included at the end of the abstract of the article. For this purpose, a clinical trial is defined as any research project that prospectively assigns human subjects to intervention or comparison groups to study the cause-and-effect relationship between a medical intervention and a health outcome. Studies designed for other purposes, such as to study pharmacokinetics or major toxicity (e.g. phase I trials) would be exempt. Further information can be found at www.icmje.org. Revisions received later than 3 months after this request will be treated as new submissions.

Authors in Japan please note: If you would like information about how to have the English of your paper checked, corrected and improved (*before submission*), please contact our Tokyo office who will inform you of the services provided by language correctors: Elsevier Japan, 9-15 Higashi-Azabu 1-chome,

Minato-ku, Tokyo, 106 Japan, Tokyo; Tel: +81-3-5561-5032; Fax: +81-3-5561-5032.

Proofs will be sent to the authors to be carefully checked for printer's errors. *Changes or additions to the edited manuscript cannot be allowed at this stage.* Corrected proofs should be returned to the publisher by email within two days of receipt.

Page charges will not be made.

Twenty-five free reprints will be supplied. The publisher will send authors a form enabling further reprints to be ordered at prices listed on the form.

Illustrations Photographs should be presented as high quality jpg (jpeg) or tiff files with high contrast. Magnification should be indicated by a line representing the actual scale of reproduction (0.1 mm, 1mm or 10 mm); the use of magnification factors is to be avoided where possible. Illustrations will not be redrawn by the Publisher: line figures should be suitable for direct reproduction. They should be prepared with black on white background, or be black-and-white images; *they should be completely and consistently lettered, the size of the lettering being appropriate to that of the illustration, taking into account the necessary reduction in size.*

Illustrations should be designed to fit either a single column (84 mm wide) or the full text width (175mm). However, if specifically requested by the author(s), plates may be reproduced larger than the typeset area; all originals for these should have the same proportions to achieve uniformity in their presentation. *N.B. When plates are required to fill the entire page, the originals should have the dimensions 215 x 285 mm and contain no essential information or labelling near the edges.* Further information about artwork can be found on the World Wide Web: access under <http://www.elsevier.com/locate/authorartwork>

Colour figures will be included subject to the authors' agreement to defray the cost.

Tables All tables must be cited in the text and have titles. Number them consecutively with Arabic numerals. Table titles should be complete but brief. Information other than that defining the data should be presented as footnotes. Only horizontal rules should be included, and kept to a minimum.

All questions arising after acceptance of a manuscript by the editor, especially those relating to proofs, publication and reprints should be directed to the publishers, Elsevier Ireland Ltd., Elsevier House, Brookvale Plaza, East Park, Shannon, Co. Clare, Ireland. Tel: +353 61 709600, Fax: +353 61 709100, E-mail: Editors@elsevier.ie. **In the USA and Canada:** For further information, contact Elsevier Inc., Attn: Journal Information Center, 360 Park Avenue South, New York, NY 10010, USA. Tel: +1 212 6333750; Telefax: +1 212 6333990; Telex: 420-643 AEP Ui; E-mail: usinfo-f@elsevier.com.

Funding body agreements and policies

Elsevier has established agreements and developed policies to allow authors whose articles appear in journals published by Elsevier, to comply with potential manuscript archiving requirements as specified as conditions of their grant awards. To learn more about the existing agreements and policies please visit <http://www.elsevier.com/fundingbodies>