

NATÁLIA SOARES DA ENCARNAÇÃO

**Estudo preliminar sobre o efeito de uma resina acrílica para base protética
contendo nanopartículas de prata sobre a formação de biofilme – análise *in*
situ e *in vitro***

ARAÇATUBA- SP

2012

NATÁLIA SOARES DA ENCARNAÇÃO

**Estudo preliminar sobre o efeito de uma resina acrílica para base protética
contendo nanopartículas de prata sobre a formação de biofilme – análise *in
situ* e *in vitro***

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado como parte dos requisitos para
a obtenção do título de Bacharelado em
Odontologia da Faculdade de Odontologia
de Araçatuba, Universidade Estadual
Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

Orientadora:

Profa. Dra. Debora Barros Barbosa

ARAÇATUBA- SP

2012

Dedicatória

A Deus, que me permitiu tudo isso, ao longo de toda a minha vida, mais do que me criar, deu propósito à minha vida. Agradeço por mais uma conquista, por ter me ajudado a enfrentar todas as dificuldades, agradeço por me ouvir todos os dias me cobrir de fé e me amparar com seu amor e por sempre acreditar em mim.

Aos meus pais por me revestir de amor, carinho e dedicação. Cultivaram em mim todos os valores necessários da vida para que eu me tornasse uma pessoa responsável, honesta e solidária. Trabalharam, sacrificaram seus sonhos em favor dos meus, não foram apenas pais, mas amigos e companheiros, mesmo nas horas mais difíceis.

A minha irmã, pelo incentivo, amizade e companheirismo.

Agradecimentos

Aos professores que me acompanharam durante toda a faculdade que contribuíram, diretamente, para a formação do meu caráter e profissionalismo. À Profa. Dra. Debora Barros Barbosa, agradeço pela sua orientação, suas atitudes, ensinamentos, exemplos e incentivos que colaboraram para que eu fosse além dos meus limites e medos.

Aos amigos pelas palavras de conforto, momentos de atenção, por dividir comigo momentos de angústias, medos, vitórias e derrotas, por confiarem em mim, ouvir e amar. Aos meus amigos Aline e Douglas, agradeço por partilhar comigo cada descoberta, desafio e conquista. Somamos entusiasmo, forças e alegrias...

À Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP, por proporcionar os meus conhecimentos, possibilitando a realização de um grande sonho e me tornar uma profissional capacitada.

“Cada pessoa que passa em nossa vida, passa sozinha, é porque cada pessoa é única e nenhuma substitui a outra. Cada pessoa que passa em nossa vida passa sozinha e não nos deixa só porque deixa um pouco de si e leva um pouquinho de nós. Essa é a mais bela responsabilidade da vida e a prova de que as pessoas não se encontram por acaso.”

Charles Chaplin

ENCARNAÇÃO NS. **Estudo preliminar sobre o efeito de uma resina acrílica para base protética contendo nanopartículas de prata sobre a formação de biofilme – análise in situ e in vitro.** 2012. 30 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2012.

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar in situ e in vitro o potencial antimicrobiano de uma resina acrílica comercial para base protética contendo nanopartículas de prata (NP). A resina acrílica termopolimerizável Lucitone 550 foi utilizada e as NP foram sintetizadas através da redução do nitrato de prata pelo citrato de sódio. A forma e tamanho das partículas foram confirmadas por microscopia eletrônica de transmissão. A maioria das partículas mostraram um diâmetro de 15-20 nm e forma esférica. A resina acrílica foi preparada de acordo com as instruções do fabricante e a solução de nanopartículas foi adicionada ao monômero da resina acrílica em concentrações de 0% e 5%. Para análise in situ do biofilme, 5 voluntários adultos usaram dispositivos palatinos contendo 4 blocos de resina acrílica (2 blocos contendo 5% de NP e os outros 0%). Os voluntários removiam os dispositivos da cavidade oral e pingavam duas gotas de solução de sacarose 30% sobre cada bloco de resina, 4 vezes por dia, durante 4 dias. Após este período, amostras de biofilme de cada bloco de resina acrílica foram utilizadas para a preparação dos esfregaços. Os esfregaços foram corados pelo método de Gram e examinados em microscópio de luz polarizada. O efeito antimicrobiano contra *Candida albicans* foi avaliado através da contagem de células viáveis de *Candida albicans* plaqueadas sobre Agar sabouraud dextrose e incubadas a 37°C por 48 horas. Estas células foram removidas de discos de resina acrílica, sobre os quais haviam crescido em caldo sabouraud dextrose a 37°C por 24 horas. Os resultados mostraram que entre os voluntários foi observada diferença na quantidade e tipos celulares presentes no biofilme. Ainda, o nanocompósito reduziu o número de colônias in vitro, mas não teve efeito sobre a inibição da formação de biofilme in situ.

Palavras chave: Biofilme. Prata. Nanopartículas. Resina acrílica.

ENCARNAÇÃO NS. **Preliminary study on the effect of a denture base resin containing silver nanoparticles on biofilm formation – in situ and in vitro analysis.** 2012. 30 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2012.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the in situ and in vitro antimicrobial potential of a commercial denture base resin containing silver colloid nanoparticles. 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 transmission electron microscopy. Most of the particles showed a diameter of about 15-20 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 0wt% and 5wt%. For the analysis of in situ biofilm, five adult volunteers wore palatal devices containing 4 denture base resin blocks (two blocks contained 5% of silver nanoparticles and the others 0%). The volunteers removed the appliances from the oral cavity and drip two drop of the 30% sucrose solution onto each acrylic resin block, 4 times a day, during 4 days. After this period, samples of biofilm of each denture base resin block were used for the preparation of smears. The smears were stained by the Gram method and examined under a polarized light microscope. The antimicrobial efficacy test against *Candida albicans* was assessed by viable cell counts of *Candida albicans* plated on Saborroud Dextrose agar and incubated at 37°C for 48 hours. These cells were disrupted from each disc of denture base resin, which had grown into Sabouraud Dextrose broth at 37°C for 24 hours. The results showed that among the volunteers was observed differences in the amount and cellular types of microorganisms in the biofilm. In addition, nanocomposite reduced the number of *C. albicans* colonies in vitro, but it has no effect on the biofilm formation inhibition in situ.

Keywords: Biofilm. Silver. Nanoparticles. Acrylic resin.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Ilustração do dispositivo palatino acrílico utilizado pelos voluntários.	15
Figura 2	Imagem de microscopia eletrônica de transmissão de nanopartículas de prata sintetizadas através da redução do nitrato de prata pelo citrato. Esta micrografia ilustra a forma e o tamanho das nanopartículas de prata (partículas brancas ca. 15-20nm). Aumento: 3000x.	17
Figura 3	Esfregaço coletado a partir do biofilme formado sobre a resina acrílica do grupo controle (a e b) e sobre a superfície do nanocompósito (c e d), para o voluntário 1. Biofilme pobre em substâncias poliméricas extracelulares e microrganismos. A seta azul em (b) mostra leveduras em brotamento, enquanto que a seta preta indica bacilos Gram-negativos. A seta em (c) mostra fusobactéria, e em (d) estreptococos. Aumento: 100x.	18
Figura 4	Esfregaço coletado a partir do biofilme formado sobre a resina acrílica do grupo controle (a e b) e sobre a superfície do nanocompósito (c e d), para o voluntário 2. As setas em (a) e (c) mostram leveduras, em (b) estreptococos Gram-positivos e, em (d) células epiteliais. Aumento: 100x.	19

Figura 5	Esfregaço coletados a partir do biofilme formado sobre a resina acrílica do grupo controle (a e b) e sobre a superfície do nanocompósito (c e d), para o voluntário 3. A figura (a) mostra bacilos e estreptococos. A seta em (b) indica leveduras em bromento, enquanto que em (c) indica células bacilos. A Figura (d) ilustra cocos, diplococos, estreptococos e células epiteliais. Aumento: 100x.	20
Figura 6	Esfregaço coletado a partir do biofilme formado sobre a resina acrílica do grupo controle (a e b) e sobre a superfície do nanocompósito (c e d), para o voluntário 4. A seta em (a) mostra células de estreptococos. A seta azul em (b) indica diplococos, enquanto que a seta preta indica fusobactérias. As Figuras (c) e (d) ilustram cocos, diplococos, estreptococos e leveduras isoladas e bacilos Gram-positivos e Gram-negativos. Aumento: 100x.	21
Figura 7	Esfregaço coletado a partir do biofilme formado sobre a resina acrílica do grupo controle (a e b) e sobre a superfície do nanocompósito (c e d), para o voluntário 5. Biofilme rico em substâncias poliméricas extracelulares e microrganismos. Figuras (a) e (b) mostram grande quantidade de estreptococos e bacilos Gram-positivos. Setas em (c) e (d) indicam alguns estreptobacilos. Aumento: 100x.	22
Figura 8	Número de células viáveis de <i>Candida. albicans</i> plaqueadas em ágar Sabouraud Dextrose e incubadas a 37 ° C durante 48 horas.	24

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%	= Porcentagem
µL/ml	= Microlitro por mililitro
Ag	= Prata
AgNO₃	= Nitrato de Prata
CFU	= Unidades formadoras de colônia
MET	= Microscopia eletrônica de transmissão
mg/L	= Miligrama por litro
ml	= Mililitro
Mm	= Milímetros
Na₃C₆H₅O₇	= Citrato de sódio
NaCl	= Cloreto de sódio
Nm	= Nanômetro
°C	= Grau Celsius
PMMA	= Poli (metil metacrilato)
PMMA/Ag	=Poli (metil metacrilato)
UFC/mL	= Unidades formadoras de colônia por mililitro
µL	= Microlitro

SUMÁRIO

1 - INTRODUÇÃO	12
2 - MATERIAIS E MÉTODOS	14
2.1. Síntese do colóide de nanopartículas de prata (SCN)	14
2.2. Preparação do nanocomposito PMMA/Ag	14
2.3. Análise do biofilme in situ	14
2.4. Teste da eficiência antimicrobiana	16
3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO	17
3.1. Síntese de SCN	17
3.2. Análise do biofilme in situ	17
3.3. Teste da atividade antimicrobiana	23
4 - CONCLUSÃO	25
REFERÊNCIAS	26

1 - INTRODUÇÃO

Aproximadamente 10% das espécies de *Candida* são patógenos oportunistas¹, e são membros comuns das microbiotas humanas oral, dérmica e intestinal, capazes de causar uma ampla quantidade de infecções². Uma das infecções relacionadas à *Candida* é a candidose orofaríngea, uma infecção comum entre os pacientes imunocomprometidos e idosos³, com diversas formas de apresentações clínicas, incluindo formas pseudomembranosas e eritematosas tais como a estomatite protética associada à *Candida*^{3,4}, uma condição inflamatória crônica associada à mucosa oral de suporte particularmente da prótese superior[5]. A estomatite protética é atualmente reconhecida como um processo complexo que envolve formação de biofilme sobre próteses⁵, sendo *Candida albicans* o fungo predominantemente isolado da cavidade oral inflamada^{3,6,7,8}.

Embora o fluconazol e outros antifúngicos azóis sejam efetivos para o tratamento de infecções mucosas e sistêmicas por *Candida*, a falta de atividade fungicida e falhas no tratamento são comuns em pacientes severamente comprometidos e pacientes idosos^{6,9,10}.

Diversas espécies de metais inorgânicos têm atraído atenção como antibacterianos por exercerem uma ação de toxicidade tempo dependente que eliminam biofilmes in vitro^{11,1,13}. Entre os agentes antimicrobianos inorgânicos, a terapia com a prata (Ag) tem sido amplamente empregada na luta contra infecções^{14,15}. Entretanto, o mecanismo de ação bactericida de NP ainda não é bem compreendido. Pal et al.¹⁵ especularam que a ação de NP é similar a de íons prata. Proteínas contendo grupos sulfúricos na membrana ou no interior das células bem como elemento fósforo, tais como DNA, são provavelmente o sítio de ligação preferencial para NP¹⁵.

Tem sido mostrado que NP podem ser preparadas com baixo custo e utilizadas como novo efetivo material bactericida¹⁶. Um dos métodos de preparação de nanopartículas de prata é baseado no método de Turkevich¹⁷ em que o nitrato de prata é reduzido pelo citrato de sódio¹⁸.

Publicações têm destacado a necessidade de se desenvolver uma estratégia para reduzir a adesão microbiana a materiais odontológicos^{19,20}. Alguns tentativas

tem sido realizadas para reduzir o acúmulo de biofilme na superfície de resina para a base protética através da incorporação de agentes antimicrobianos como a nistatina e anfotericina B⁵, prata – zinco zeolite²⁰, amônia quaternária ^{21,22}, fluconazol ²³, própolis ²⁴, e substâncias fotocatalísticas ²⁵.

Neste sentido, NP poderiam ser adicionadas ao poli (metil metacrilato) (PMMA), resina acrílica utilizada na confecção de próteses removíveis ^{26,27}, na tentativa de prevenir a estomatite em portadores de próteses.

O presente estudo foi conduzido para avaliar in situ e in vitro o potencial antimicrobiano de uma resina acrílica comercial para a base protética contendo NP na forma coloidal. O estudo in situ foi realizado com blocos de nanocompósito fixados em dispositivos palatinos intra-orais, e o estudo in vitro foi realizado através da quantificação de células de *C albicans* presente no biofilme formado na superfície de espécimes de nanocompósito PMMA / Ag.

2 - MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Síntese do colóide de nanopartículas de prata (SCN)

A síntese de NP foi baseada no método de Turkevich et al.¹⁷. SCN foi preparado através da redução do nitrato de prata (AgNO_3) (Merck) pelo citrato de sódio ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$) (Merck)^{18,27}. Ao final da reação, a solução foi mantida sob aquecimento por alguns minutos até o aparecimento da coloração amarelo âmbar, que indicou a presença de NP. Microscopia eletrônica de transmissão (MET) (Electron Microscope FEG-VP Supra 35, Carl Zeiss) foi utilizada para registrar imagens das NP sintetizadas.

2.2 Preparação do nanocomposito PMMA/Ag

Para padronização dos espécimes de resina acrílica, moldes de silicone foram obtidos a partir de uma matriz metálica com formato circular padrão (diâmetro: 10 mm; altura: 3 mm). A resina acrílica para base protética (Lucitone 550, Dentsply Ind. e Com. Ltda, Brazil) foi preparada de acordo com as instruções do fabricante. Para cada espécime foi utilizada uma proporção de 4 g/1,9 mL (pó/líquido). A solução contendo NP foi adicionada ao componente líquido da resina acrílica a 0 vol.% (controle) and 5%, com base na massa do polímero²⁷.

Os nanocompósitos foram prensados diretamente no interior dos moldes de silicone incluídos em gesso pedra. Os espécimes foram polimerizados em uma polimerizadora automática em banho de água quente por 1,5 horas a 73°C + 30 minutos a 100°C. Os espécimes foram então, desincluídos após o resfriamento das muflas.

2.3. Análise do biofilme in situ

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP (Protocolo 2009-02113) e todos os

participantes leram e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido. Cinco voluntários saudáveis, com idade entre 23 e 28 anos, apresentando fluxo salivar normal, usaram um dispositivo palatino acrílico contendo 4 blocos de resina acrílica. Dois blocos continham 5% de solução coloidal de NP e os outros 0% (controle).

Os blocos de resina acrílica (medindo 3 x 3 x 2 mm) foram obtidos a partir de espécimes de resina acrílica para a base protética que foram seccionados utilizando um disco diamantado dupla face. A superfície dos blocos foram limpas e polidas.

Dispositivos palatinos contendo 4 cavidades nos lados esquerdo e direito foram confeccionados e um bloco foi inserido em cada uma das cavidades (Figura 1). Para permitir o acúmulo de placa e para proteger os blocos de interferências mecânicas, uma malha plástica foi fixada à superfície acrílica do dispositivo palatino sobre as cavidades.

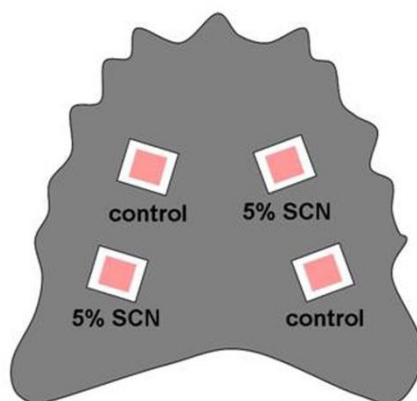


Figura 1. Ilustração do dispositivo palatino acrílico utilizado pelos voluntários.

Os voluntários foram instruídos a remover os dispositivos da cavidade oral e pingar 2 gotas de solução de sacarose 30% em cada bloco de resina acrílica, 4 vezes ao dia (9:30, 14:00, 17:00 e 21:00 horas). Depois de 5 minutos, o dispositivo era reinserido na boca. Os voluntários também foram instruídos a usar o dispositivo todo o tempo, removendo apenas durante as refeições.

Durante um período de 7 dias pré experimental e 4 dias de período experimental, os voluntários escovaram seus dentes com pasta de dente sem flúor e

depois de 4 dias de acumulo e exposição a sacarose 30%, o dispositivo oral de cada voluntário foi removido e o biofilme formado foi examinado.

Para a avaliação da condição e aspecto morfológico dos microrganismos isolados do biofilme, amostras de biofilme de cada bloco de resina acrílica foi utilizada para a preparação de esfregaço. O esfregaço foi corado através da coloração de gram e examinados em microscópio de luz polarizada (Carl Zeiss, Stemi SV 11) com aumento de 100x e fotografados com câmera digital (Canon Power Shot A640 – 10 mega pixels).

2.4. Teste da eficiência antimicrobiana

Para obtenção do inóculo foi utilizado o microorganismo *Candida albicans* (ATCC 10231). A suspensão fúngica utilizada para o teste continha 10^5 unidades formadoras de colônias (CFU), ajustada em espectrofotômetro (Shimadzu UV-1800). Os espécimes de resina acrílica foram esterilizados por óxido de etileno e posicionados em tubos contendo 9,9 mL de meio de cultura Sabouraud dextrose caldo (Difco) e 0,1 mL do inóculo. Após a incubação por 24 horas a 37°C, os espécimes foram removidos e colocados em um segundo tubo contendo 10 mL de NaCl 0,9%. Os tubos foram agitados por 1 minuto e depois de 9 minutos uma nova agitação foi realizada.

Consecutivamente, a solução foi diluída seriadamente, 20mL de Agar sabouraud dextrose foi depositado em placas de petri estéreis e após a solidificação do meio, 10 µL de cada diluição foram plaqueados em triplicata. As placas foram mantidas a 37°C por 48 horas, e o número de células foi contado. Os números de células mencionados neste estudo são médias de três determinações.

3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Síntese de SCN

Análises de microscopia eletrônica de transmissão foram realizadas para confirmar a forma e o tamanho das NP (Figura 2), e mostraram partículas de forma esférica com média de diâmetro de 15 – 20 nm em uma concentração de 107.9µg de prata / mL na solução coloidal.

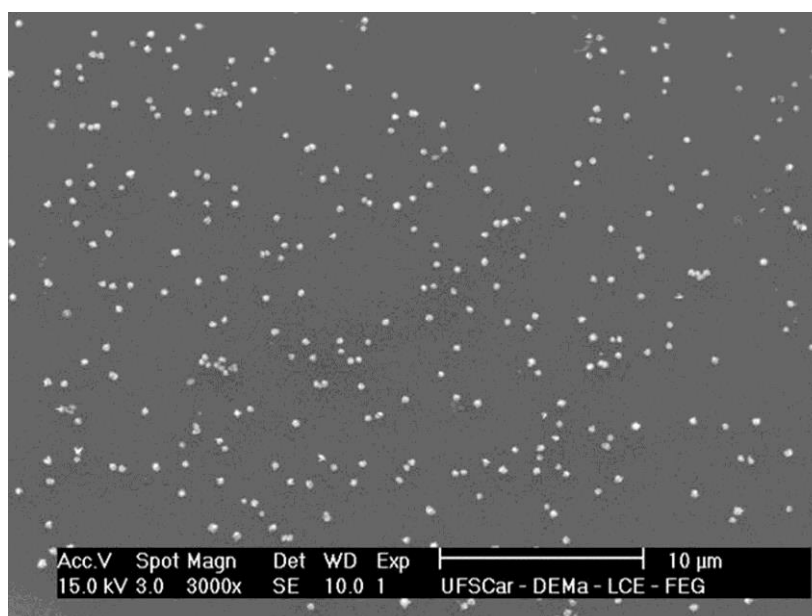


Figura 2. Imagem de microscopia eletrônica de transmissão de nanopartículas de prata sintetizadas através da redução do nitrato de prata pelo citrato. Esta micrografia ilustra a forma e o tamanho das nanopartículas de prata (partículas brancas ca. 15-20nm). Aumento: 3000x.

3.2. Análise do biofilme in situ

A formação de biofilme ocorre como resultado de uma sequência de eventos: adesão microbiana à superfície, proliferação celular, produção de matriz e disseminação de células. Em ambientes que suportam uma microflora planctônica

mista, a composição final do biofilme irá refletir o resultado de uma sucessão bacteriana, resultante da competição entre as bactérias aderidas.

A análise *in situ* não avalia a contagem de células total e a massa de biofilme sobre os blocos de resina acrílica. E o biofilme foi apenas observado a olho nu, e não foi notada nenhuma diferença entre o biofilme formado sobre os grupos controle e experimentais. Entre os voluntários foi observada diferença na quantidade e nos tipos celulares de microrganismos presentes no biofilme. As mulheres (1,2 e 3) (Figuras 3, 4 e 5) formaram biofilmes com menos substância polimérica extracelular em comparação com os homens voluntários 4 e 5 (Figura 6 e 7).

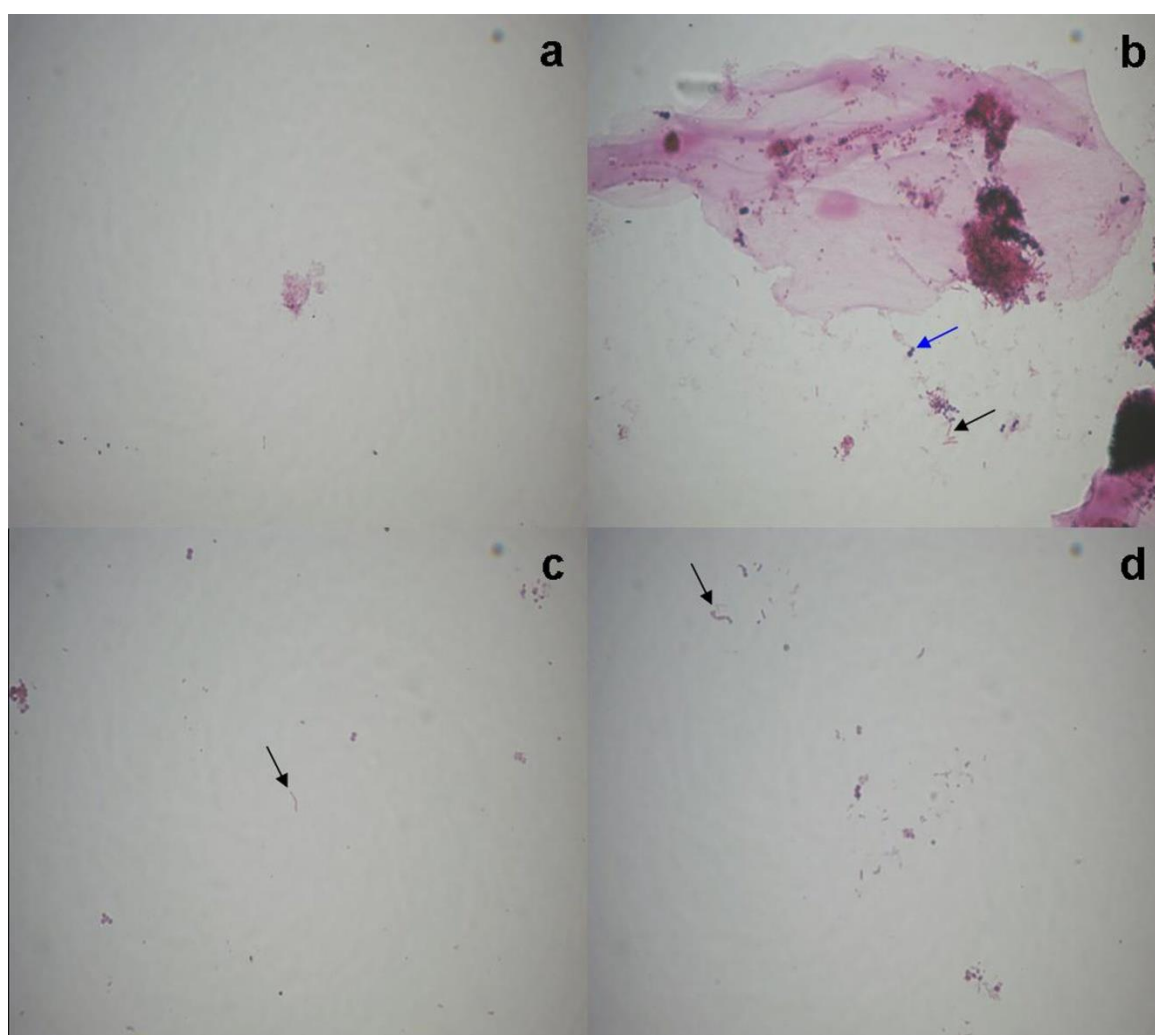


Figura 3. Esfregaço coletado a partir do biofilme formado sobre a resina acrílica do grupo controle (a e b) e sobre a superfície do nanocompósito (c e d), para o voluntário 1. Biofilme pobre em substâncias poliméricas extracelulares e microrganismos. A seta azul em (b) mostra leveduras em brotamento, enquanto que a seta preta indica bacilos Gram-negativos. A seta em (c) mostra fusobactéria, e em (d) estreptococos. Aumento: 100x.

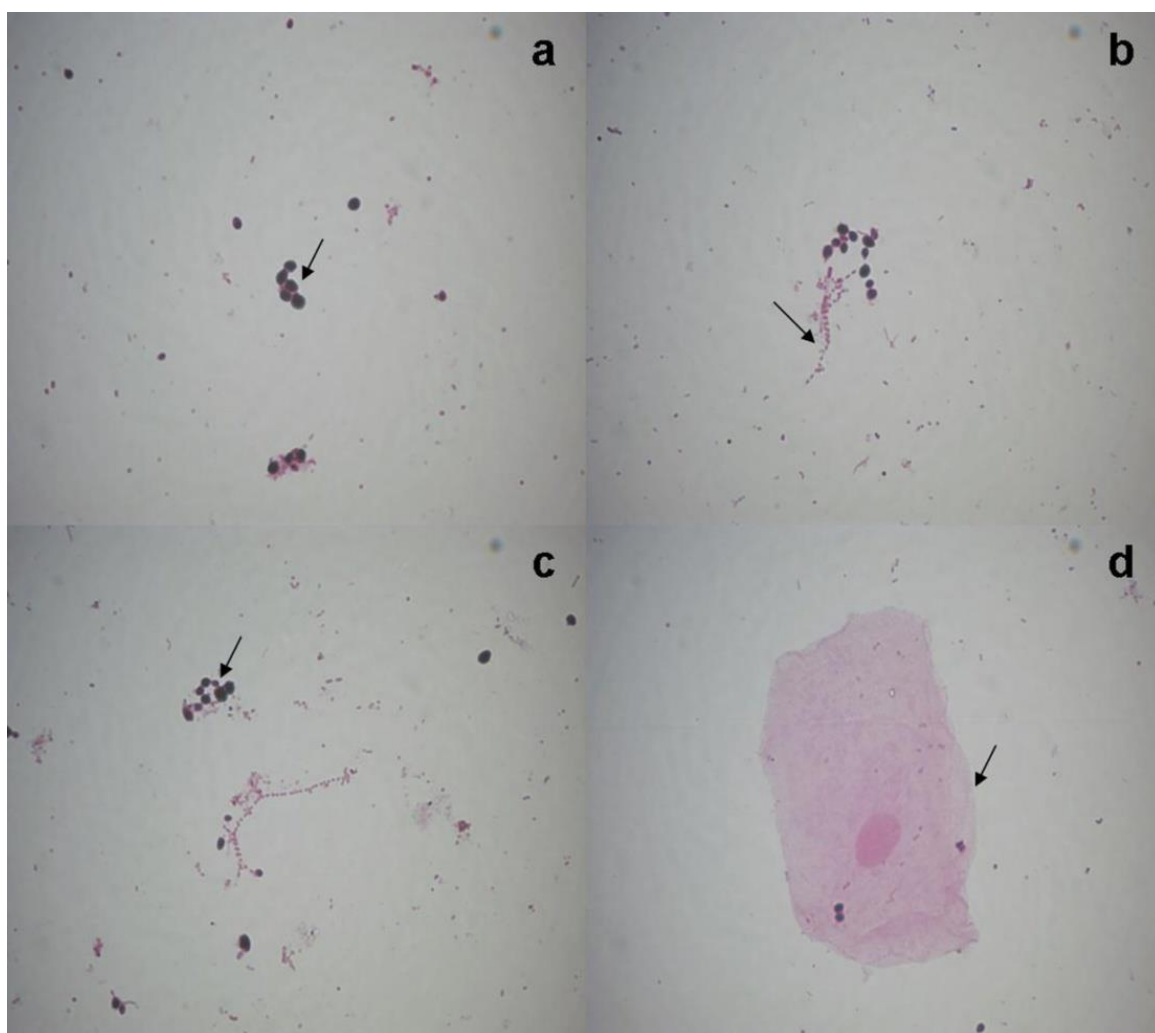


Figura 4. Esfregaço coletado a partir do biofilme formado sobre a resina acrílica do grupo controle (a e b) e sobre a superfície do nanocompósito (c e d), para o voluntário 2. As setas em (a) e (c) mostram leveduras, em (b) estreptococos Gram-positivos e, em (d) células epiteliais. Aumento: 100x

Para as populações de estreptococos, uma maior quantidade de microrganismos foi encontrada nos voluntários 4 e 5 (Figuras 6 e 7), entretanto, nenhuma diferença foi observada entre os grupos controle e experimentais. Ainda, nos biofilmes destes voluntários foram encontrados bacilos, diplococos, estreptobacilos e fusobactérias. Para o voluntário 5, o biofilme formado sobre a superfície do nanocompósito apresentou menor quantidade de bacilos que no grupo controle. Por outro lado, o voluntário 1 (Figura 3) apresentou a menor formação de

biofilme sobre os os blocos de resina e este biofilme era composto basicamente, por estreptococos, cocos isolados, bacilos e cocos aderidos a células epiteliais.

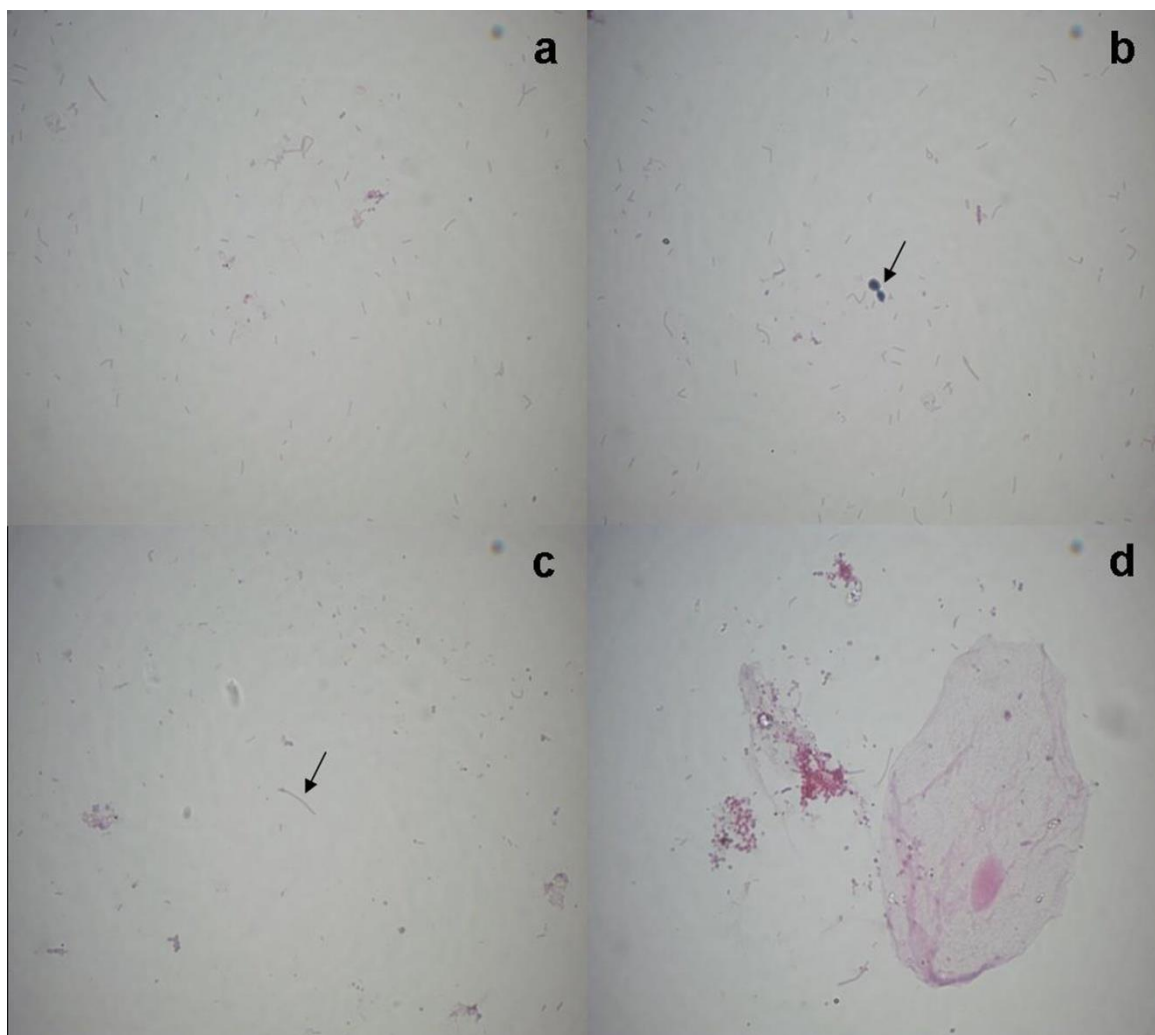


Figura 5. Esfregaço coletados a partir do biofilme formado sobre a resina acrílica do grupo controle (a e b) e sobre a superfície do nanocompósito (c e d), para o voluntário 3. A figura (a) mostra bacilos e estreptococos. A seta em (b) indica leveduras em bromento, enquanto que em (c) indica células bacilos. A Figura (d) ilustra cocos, diplococos, estreptococos e células epiteliais. Aumento:100x

Com relação ao voluntário 2, a figura 4 mostra que o tipo celular predominante no biofilme da resina acrílica do grupo controle foi cocos. Entretanto, considerável presença de leveduras foi notada. Comparando os grupos experimentais e controle, menor quantidade de leveduras, estreptococos, cocos isolados e alguns bacilos foram encontrados no biofilme dos blocos de resina

experimental. Em relação ao voluntário 3 (Figura 5), o esfregaço coletado do grupo controle mostrou maior quantidade de bacilos que no biofilme do nanocompósito, que foi composto basicamente por cocos.

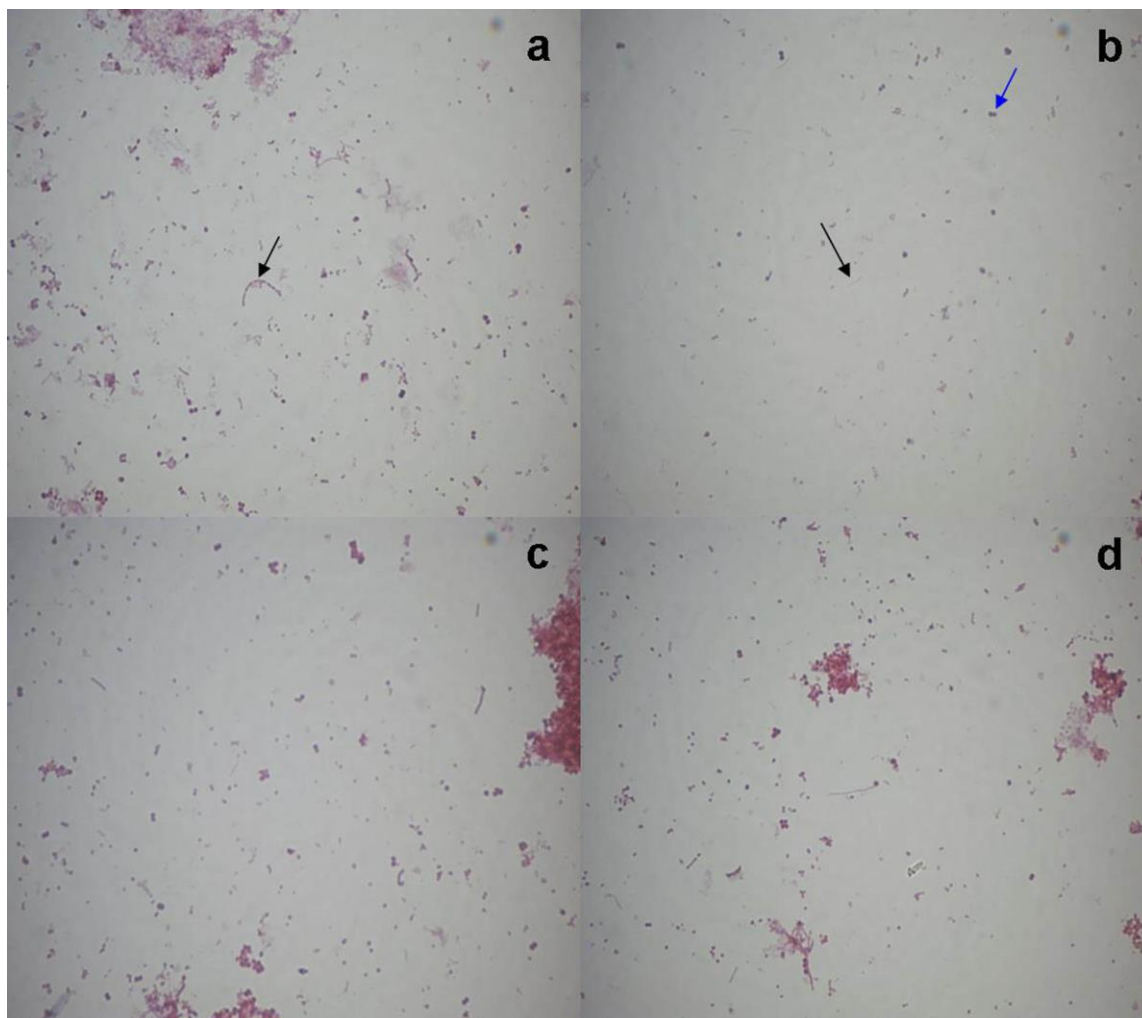


Figura 6. Esfregaço coletado a partir do biofilme formado sobre a resina acrílica do grupo controle (a e b) e sobre a superfície do nanocompósito (c e d) para o voluntário 4. A seta em (a) mostra células de estreptococos. A seta azul em (b) indica diplococos, enquanto que a seta preta indica fusobactérias. As Figuras (c) e (d) ilustram cocos, diplococos, estreptococos e leveduras isoladas e bacilos Gram-positivos e Gram-negativos. Aumento:100x.

Acordo com Beighton and Hayday, as interações entre os microrganismos, a habilidade de competir pela assimilação de nutrientes, a manutenção da energia requerida, e o sistema antibacteriano específico e não específico da saliva limitam a flora natural.

Além disso, o biofilme é conhecido por “iludir”, desafiar antimicrobianos envolvendo antibióticos ou defesas imunológicas do hospedeiro através de múltiplos mecanismos, e tem sido mostrado que agentes antimicrobianos falham em não serem capazes de penetrar completamente nos microrganismos.

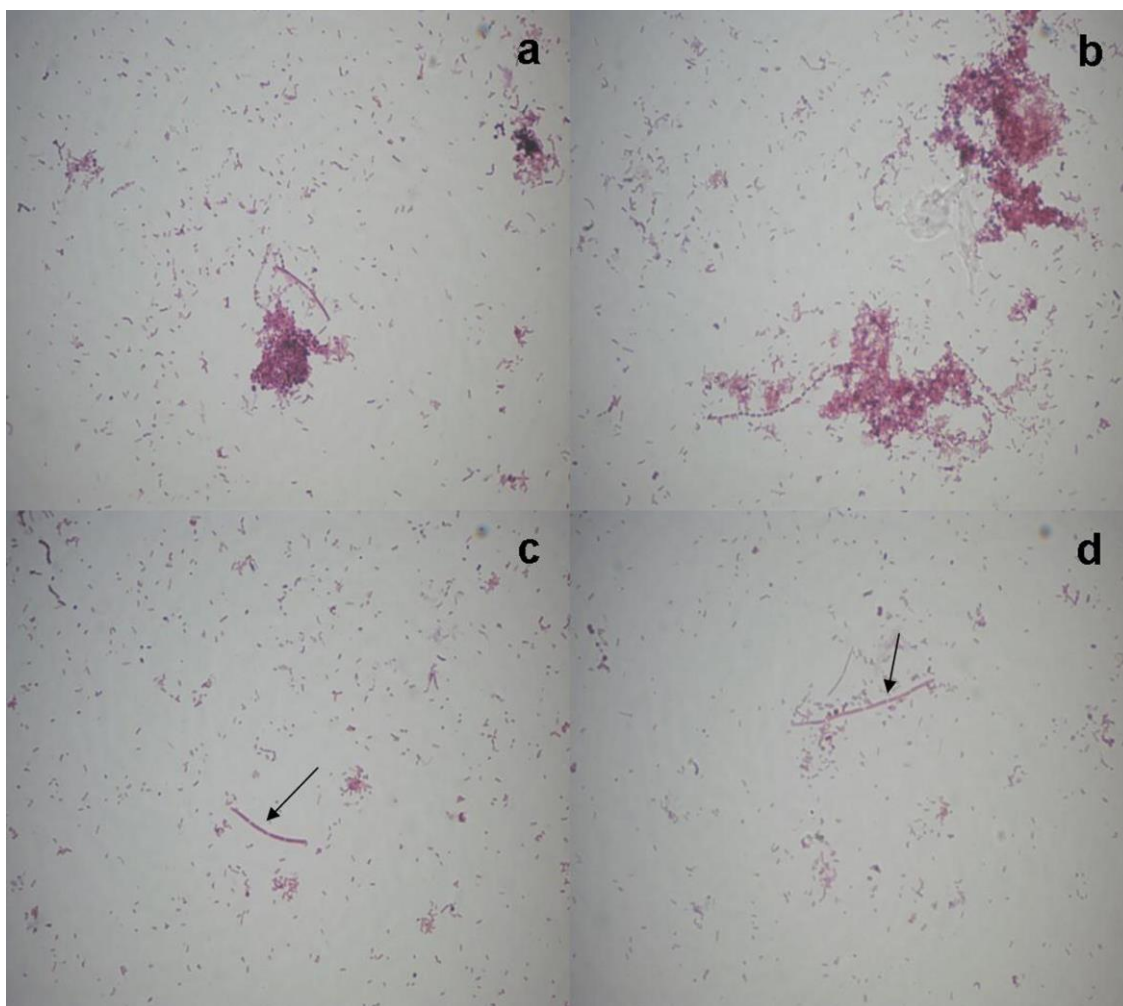


Figura 7. Esfregaço coletado a partir do biofilme formado sobre a resina acrílica do grupo controle (a e b) e sobre a superfície do nanocompósito (c e d), para o voluntário5. Biofilme rico em substâncias poliméricas extracelulares e microrganismos. Figuras (a) e (b) mostram grande quantidade de estreptococos e bacilos Gram-positivos. Setas em (c) e (d) indicam alguns estreptobacilos. Aumento:100x.

No presente trabalho, a resina acrílica contendo nanopartículas de prata coloidal não inibiu a formação de biofilme quando comparado com o grupo controle, para todos os voluntários. Uma possível explicação para isso, seria a ausência de

liberação das nanopartículas do nanocompósito. Monteiro em sua tese, encontrou que nanopartículas de prata não foram detectadas em água deionizada para todos os períodos de armazenamento (7, 15, 30, 60 e 120 dias). O PMMA pode ter gerado uma barreira para a difusão de água e consequentemente para a liberação de prata com ação antimicrobiana. O agente cross-linking etileno glicol dimetacrilato presente na resina Lucitone 550 pode ter restringido a rotação das cadeias poliméricas, diminuindo a velocidade de difusão de água no polímero.

Entretanto, a ausência de dispersão de NP na massa polimérica foi observada durante a preparação do nanocompósito PMMA / Ag. Uma razão para isto poderia ser a diferença de polaridade entre o polímero e a solução coloidal. A dificuldade de dispersão das nanopartículas na forma coloidal, associada à alta temperatura atingida durante a polimerização da resina acrílica pode ter contribuído para a coalescência. Este fato pode ter aumentado a área de superfície específica das nanopartículas e consequentemente reduzido a liberação para a cavidade.

3.3. Teste da atividade antimicrobiana

A eficácia antimicrobiana do nanocompósito PMMA / Ag contra *C albicans* foi avaliada pela contagem do número de colônias em Agar. Os resultados apresentados na figura 8 mostram que o nanocompósito contendo 5% de Sol. Coloidal de NP reduziu o número de colônias de *C albicans*.

Dois processos podem ser considerados para explicar estes achados: a) as células fúngicas foram eliminadas pela liberação de NP dos espécimes de polímero (efeito fungicida); b) as células fúngicas sobreviveram, mas forças eletrostáticas produzidas pela nanopartículas do nanocompósito podem ter interferido na processo de adesão inicial para a formação do biofilme sobre a superfície do nanocompósito (Efeito fungistático).

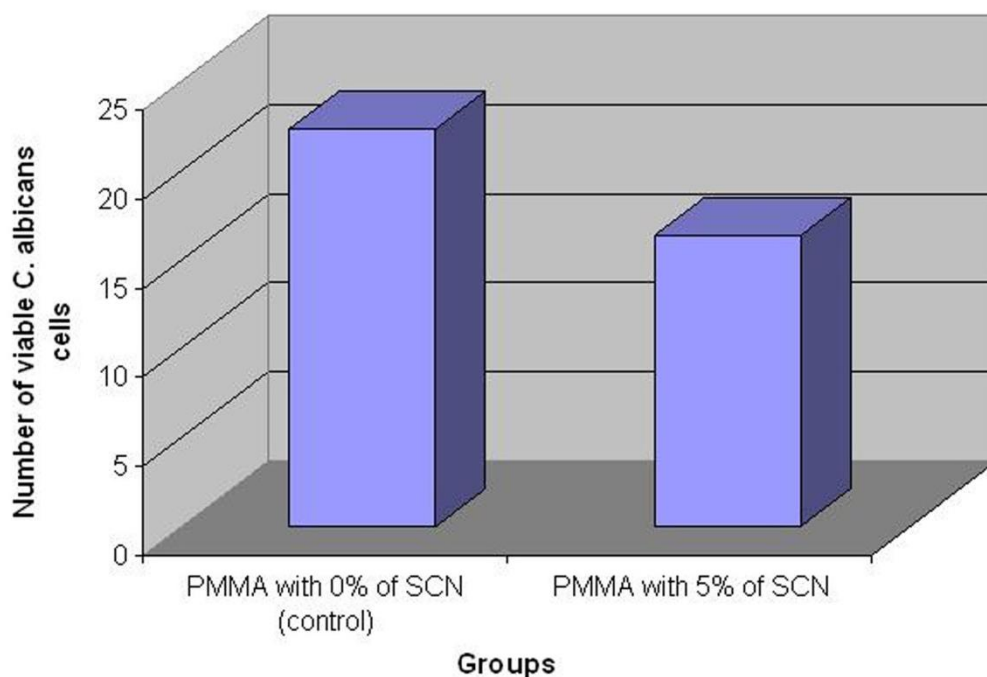


Figura 8. Número de células viáveis de *Candida albicans* plaqueadas em ágar Sabouraud Dextrose e incubadas a 37 ° C durante 48 horas.

Houve uma diferença no nº de células de *C. albicans* entre o grupo controle e o grupo experimental, entretanto, nenhuma análise estatística foi realizada neste teste inicial. Assim, estudos futuros são necessários para esclarecer as propriedades do nanocompósito PMMA /Ag no sentido de avaliar a possibilidade de utilização do nanocompósito como um novo material odontológico com propriedades antimicrobianas, especialmente para a confecção de próteses removíveis.

4 - CONCLUSÃO

Dentro das limitações deste estudo preliminar, pode-se concluir que o PMMA /Ag reduziu o nº de colônias de *C albicans* in vitro, mas não houve efeito sobre a inibição da formação de biofilme in situ. Além disso, este trabalho integra nanotecnologia e microbiologia, levando a possibilidade de avanços na formulação de um novo tipo de material odontológico com propriedades antimicrobianas.

REFERÊNCIAS

- 1 HARRISON, JJ; RABIEI, M; TURNER, RJ; BADRY, EA; SPROULE, KM; CERI, H. Metal resistance in Candida biofilms. *FEMS Microbiology Ecology*, 2006;55(3):479-91.

- 2 WARGO, MJ; HOGAN, DA. Fungal--bacterial interactions: a mixed bag of mingling microbes. *Current Opinion in Microbiology*, 2006;9(4):359-64. Epub 2006 Jun 13.

- 3 COCO, BJ; BAGG, J; CROSS, LJ; JOSE, A; CROSS, J; RAMAGE, G. Mixed Candida albicans and Candida glabrata populations associated with the pathogenesis of denture stomatitis. *Oral Microbiology and Immunology*, 2008;23(5):377-83.

- 4 CANNON, RD; HOLMES, AR; MASON, AB; MONK, BC. Oral Candida: clearance, colonization, or candidiasis? *Journal of Dental Research*, 1995 May;74(5):1152-61.

- 5 REDDING, S; BHATT, B; RAWLS, HR; SIEGEL, G; SCOTT, K; LOPEZ-RIBOT, J. Inhibition of Candida albicans biofilm formation on denture material. *Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology and Endodontics*, 2009;107(5):669-72.

- 6 HE, XY; MEURMAN, JH; KARI, K; RAUTEMAA, R; SAMARANAYAKE, LP. In vitro adhesion of Candida species to denture base materials. *Mycoses*, 2006;49(2):80-4.

- 7 PEREIRA-CENCI, T; DEL BELCURY, AA; CRIELAARD, W; TEN CATE, JM. Development of Candida-associated denture stomatitis: new insights. *Journal of Applied Oral Science*, 2008;16(2):86-94.

- 8 MCINTYRE, GT. Oral candidosis. *Dental Update*, 2001;28(3):132-9.

- 9 BRAGA-SILVA, LA; MESQUITA, DG; RIBEIRO, MD; CARVALHO, SM; FRACALANZZA, SE; SANTOS, AL. Trailing end-point phenotype antibiotic-sensitive strains of *Candida albicans* produce different amounts of aspartylpeptidases. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 2009;42(8):765-70.

- 10 WATAMOTO, T; SAMARANAYAKE, LP; JAYATILAKE, JA; EGUSA, H; YATANI, H; SENEVIRATNE, CJ. Effect of filamentation and mode of growth on antifungal susceptibility of *Candida albicans*. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 2009;34(4):333-9. Epub 2009 Apr 18.

- 11 HARRISON, JJ; CERI, H; STREMICK, CA; TURNER, RJ. Biofilm susceptibility to metal toxicity. *Environmental Microbiology*, 2004;6(12):1220-7.

- 12 DAMM, C; MÜNSTEDT, H; RÖSCH, A. The antimicrobial efficacy of polyamide 6/silver-nano- and microcomposites. *Materials Chemistry and Physics*, 2008;108:61-6.

- 13 HARRISON, JJ; TURNER, RJ; JOO, DA; STAN, MA; CHAN, CS; ALLAN, ND; Vrionis, HA; Olson, ME; Ceri, H. Copper and quaternary ammonium cations exert synergistic bactericidal and antibiofilm activity against *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2008;52:2870-81.

- 14 GAJBHIYE, MB; KESHARWANI, JG; INGLE, AP; GADE, AK; RAI, MK. Fungus-mediated synthesis of silver nanoparticles and their activity against pathogenic fungi in combination with fluconazole. *Nanomedicine*, 2009 Jul 16. [Epub ahead of print].

- 15 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*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007;73:1712–20.

- 16 SONDI, I; GOIA, DV; MATIJEVIC, E. Preparation of highly concentrated stable dispersions of uniform silver nanoparticles. *Journal of Colloid Interface Science*, 2003;260:75-81.
- 17 TURKEVICH, J; STEVENSON, PC; HILLIER, J. A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold. *Discussion of the Faraday Society*, 1951;11:55-75.
- 18 MONTEIRO, DR; GORUP, LF; TAKAMIYA, AS; RUVOLLO-FILHO, AC; DE CAMARGO, ER; BARBOSA DB. The growing importance of materials that prevent microbial adhesion: antimicrobial effect of medical devices containing silver. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 2009;34(2):103-10.
- 19 AHN, SJ; LEE, SJ; KOOK, JK; LIM, BS. Experimental antimicrobial orthodontic adhesives using nanofillers and silver nanoparticles. *Dental Materials*, 2009;25:206–13.
- 20 CASEMIRO, LA; MARTINS, CHG; PIRES-DE-SOUZA, FCP; PANZERI, H. Antimicrobial and mechanical properties of acrylic resins with incorporated silver–zinc zeolite–Part 1. *Gerodontology*, 2008;25:187–94.
- 21 PESCI-BARDON, C; FOSSE, T; MADINIER, I; SERRE, D. In vitro new dialysis protocol to assay the antiseptic properties of a quaternary ammonium compound polymerized with denture acrylic resin. *Letters in Applied Microbiology*, 2004;39(3):226-31.
- 22 PESCI-BARDON, C; FOSSE, T; SERRE, D; MADINIER, I. In vitro antiseptic properties of an ammonium compound combined with denture base acrylic resin. *Gerodontology*, 2006;23(2):111-6.
- 23 DARWISH, RM; AMIN, WM; AL-ALI, MH; SALEM, NA. Study of the elution of fluconazole from a self-polymerizing acrylic resin and its activity against resistant

Candida albicans. *Journal of Materials Science Materials in Medicine*, 2009 Oct 21. [Epub ahead of print].

24 DA SILVA, WJ; RACHED, RN; ROSALEN, PL; DEL BELCURY, AA. Effects of nystatin, fluconazole and propolis on poly(methyl methacrylate) resin surface. *Brazilian Dental Journal*, 2008;19(3):190-6.

25 CHENG, Y; SAKAI, T; MOROI, R; NAKAGAWA, M; SAKAI, H; OGATA, T; et al. Self-cleaning ability of a photocatalyst-containing denture base material. *Dental Materials Journals*, 2008;27(2):179-86.

26 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(1):54-6. [Chinese].

27 MONTEIRO, DR. Evaluation of an acrylic denture base resin with added silver nanoparticles[dissertation]. Araçatuba: UNESP - São Paulo State University; 94 p. 2008.

28 VALE, GC; TABCHOURY, CPM; ARTHUR, RA; DEL BELCURY, AA; PAESLEME, AF; CURY, JA. Temporal relationship between sucrose-associated changes in dental biofilm composition and enamel demineralization. *Caries Research*, 2007;41(5):406-412.

29 DELBEM, ACB; CARVALHO, LPR; MORIHISA, RKU; CURY, JA. Effect of rinsing with water immediately after APF gel application on enamel demineralization in situ. *Caries Research*, 2005;39(3):258-260.

30 MOYES, RB; REYNOLDS, J; BREAKWELL, DP. Differential staining of bacteria: gram stain. *Current Protocols in Microbiology*, 2009; Appendix3:Appendix 3C.

- 31 VALAPPIL, SP; PICKUP, DM; CARROLL, DL; HOPE, CK; PRATTEN, J; NEWPORT, RJ; et al. Effect of silver content on the structure and antibacterial activity of silver-doped phosphate-based glasses. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2007;51(12):4453-4461.
- 32 BOWDEN, GH; LI, YH. Nutritional influences on biofilm development. *Advances in Dental Research*, 1997;11(1):81-99.
- 33 BEIGHTON, D; HAYDAY, H. The influence of diet on the growth of streptococcal bacteria on the molar teeth of monkeys (*Macaca fascicularis*). *Archives of Oral Biology*, 1986;31:449–54.
- 34 COSTERTON, JW; STEWART, PS; GREEBERG, EP: Bacterial biofilms: A common cause of persistent infections. *Science*, 1999;284:1318–1322.
- 35 DAMM, C; MÜNSTEDT, H; RÖSCH, A. Long-term antimicrobial polyamide 6/silver-nanocomposites. *Journal of Materials Science*, 2007;42:6067-73.
- 36 SÖDERHOLM, KJ. Water sorption in a bis(GMA)/TEGDMA resin. *Journal of Biomedical Materials Research*, 1984;18:271-9.
- 37 BALAN, L; SCHNEIDER, R; LOUGNOT, DJ. A new and convenient route to polyacrylate/silver nanocomposites by light-induced cross-linking polymerization. *Progression in Organic Coatings*, 2008;62:351-7.