

ANA HELENA PEREIRA BARBOSA

Análise microbiológica de uma resina acrílica para base protética contendo nanopartículas de prata antes e após armazenamento em água deionizada

ARAÇATUBA- SP

2012

ANA HELENA PEREIRA BARBOSA

“Análise microbiológica de uma resina acrílica para base protética contendo nanopartículas de prata antes e após armazenamento em água deionizada”

Trabalho de Conclusão de curso
apresentado como parte dos requisitos para
obtenção do título de Bacharel em
Odontologia pela Faculdade de Odontologia
de Araçatuba, Universidade Estadual
Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

Orientadora:

Profa. Dra. Debora Barros Barbosa.

ARAÇATUBA- SP

2012

Dedicatória

Dedico esta monografia a duas pessoas fundamentais em minha vida, Marcia Janduzzo e João Batista, que estiveram a meu lado a todo instante, alimentaram minha alma, e fortaleceram a minha vida com muito amor e dedicação. Tenho muito orgulho de tê-los como pais, tenho muita satisfação de chamá-los de pais, pois tudo devo a vocês, simplesmente devo a minha vida.

Agradecimentos

A Deus que fortalece minha alma, que acalma e transforma meus medos e inseguranças em certezas absolutas.

Aos meus pais e meu noivo que jamais saíram do meu lado, sempre me amando e respeitando minhas decisões.

A querida professora e orientadora Profa. Dra. Debora Barros Barbosa, por ter dividido seus conhecimentos, pela sua atenção, amizade, carinho, conteúdo científico cedido e por toda dedicação e incentivo para o andamento desse trabalho.

A Aline Satie Takamiya por toda ajuda, dedicação, amizade, carinho. Palavras não fazem jus ao que você representou em minha vida em todo esse percurso, não conseguiria escrever em poucas palavras tudo o que você significou para minha evolução científica, serei eternamente grata.

Ao Douglas Roberto Monteiro por me ajudar, sempre amigo e carinhoso. Obrigada por tudo que fez por mim.

“Se enxerguei mais longe, foi porque me apoiei sobre os ombros de gigantes”

Isaac Newton

BARBOSA AHP. **Análise microbiológica de uma resina acrílica para base protética contendo nanopartículas de prata antes e após armazenamento em água deionizada.** 2012 39 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Faculdade de Odontologia, da Universidade Estadual Paulista, Araçatuba 2012.

RESUMO

O objetivo do presente estudo foi verificar a atividade antimicrobiana de nanopartículas de prata em resina acrílica à base de poli metil metacrilato (PMMA) contendo nanopartículas de prata frente a *Candida albicans* logo após a confecção dos corpos de prova (t0) e após 30 dias de armazenamento em água deionizada (t30). 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 nanopartículas na forma esférica com tamanhos médios de 5 e 10 nm. A resina acrílica foi proporcionada de acordo com as instruções do fabricante e as nanopartículas de prata foram adicionadas ao componente líquido da resina acrílica nas concentrações de 0,5% e 5% baseadas na massa do polímero. Após a confecção, os corpos de prova foram esterilizados por radiação de Co-60. Foi analisada a formação de biofilme de *Candida albicans* sobre a superfície do poli (metil metacrilato)/prata (PMMA/Ag) por meio da quantificação de Unidades Formadoras de Colônias (UFC). Os resultados mostraram que no tempo t0 a presença de nanopartículas de prata reduziu a formação de biofilme em todos os grupos em relação ao controle. Após 30 dias de armazenamento em água deionizada foi observada redução somente para os grupos com nanopartículas de tamanho 5 e 10 nm na concentração 0,5%. Ao comparar os grupos antes e após o armazenamento em água deionizada, notou-se que somente o nanocompósito contendo partículas de 10 nm na concentração 0,5% reduziu a formação de biofilme após o armazenamento em água. Concluiu-se que a incorporação de nanopartículas

de prata à resina acrílica previamente ao armazenamento em água deionizada reduziu a adesão fúngica para todos os grupos em relação ao controle. Após o armazenamento em água deionizada, o nanocompósito reduziu a formação de biofilme para os grupos com nanopartículas de tamanho 5 e 10 nm na concentração de 0,5%, sugerindo que ação antimicrobiana do nanocompósito inibe o desenvolvimento de biofilme de *Candida albicans*.

Palavras-chave: Nanotecnologia. Polimetil Metacrilato. *Candida albicans*. Prata. Estomatite protética. Prótese total.

BARBOSA AHP. **Microbiological analysis of a denture base resin containing silver nanoparticles previously and after storage in deionized water** 2012 39 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Faculdade de Odontologia, da Universidade Estadual Paulista, Araçatuba 2012.

ABSTRACT

The aim of this study was to verify the antimicrobial activity of a poly (methyl methacrylate) acrylic resin containing silver nanoparticles against *Candida albicans*. The heat-polymerized acrylic resin Lucitone 550 was used and the silver nanoparticles were synthesized through the reduction of silver ions of silver nitrate by sodium citrate. The shape and size of the particles were confirmed by scanning electron microscopy (SEM) and transmission electron microscopy (TEM), and showed spherical particles with medium size of 5 and 10 nm. The acrylic resin was proportioned according to the manufacturer's instructions and the silver nanoparticles colloid solution was added to the liquid of the acrylic resin at 0.5% and 5% based on the polymer mass. After being processing, the specimens were sterilized by Co-60 radiation. *Candida albicans* biofilm formation on the surface of the polymer was assessed by enumeration of Colony Forming Units (CFUs). Results demonstrated that at t0 the addition of silver nanoparticles reduced the biofilm formation compared to the control group. After 30 days of storage in deionized water, it was observed reduction on biofilm formation for groups containing silver nanoparticles 5 and 10 nm at 0.5% compared to control. Comparing the groups before and after storage in deionized water, it was observed that only the nanocomposite containing silver nanoparticles 10 nm at 0.5% (t1) reduced *Candida albicans* biofilm formation. It was concluded that the addition of silver nanoparticles to denture base resin previously to storage in deionized water reduced biofilm formation compared to control. After storage in deionized water, the incorporation of silver nanoparticles (5 and 10nm) at 0.5% into acrylic resin reduced biofilm formation suggesting potential antimicrobial effect against *Candida albicans*.

Key words: Nanotechnology. Polymethyl methacrylate. *Candida albicans*. Silver. Denture Stomatitis. Complete Denture.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** Gráfico de absorbância 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. 50
- Figura 2** 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. **a)** os pontos claros representam nanopartículas de prata com tamanho médio de 5 nm. Aumento: 90,75 Kx; **b)** os pontos claros representam nanopartículas de prata com tamanho médio de 10 nm. Aumento: 90,75 Kx. 51
- Figura 3** MET das nanopartículas de prata, onde se adicionou uma gota de colóide sobre grades de cobre recobertas com filme fino de carbono. **a)** os pontos escuros representam as partículas de prata com diâmetro médio de 5 nm. Aumento: 64,84Kx; **b)** os pontos escuros representam as partículas de prata com diâmetro médio de 10 nm. Aumento: 64,84Kx. 52
- Figura 4** Difrátograma de raios-X das nanopartículas de prata em substrato de silício com seus planos de reflexão indexados. 53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Número de espécimes de acordo com o tamanho médio e concentração de nanopartículas de prata adicionadas à resina acrílica e tempo de armazenamento em água deionizada.	54
Tabela 2	Média do número de UFC/mL e Desvio Padrão para as diferentes concentrações e tamanhos de nanopartículas de prata adicionadas à resina acrílica.	55

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

PMMA	= Poli (metil metacrilato)
Ag	= Prata
Ag⁺	= Íons prata
Nm	= Nanômetro
mg/L	= Miligrama por litro
AgNO₃	= Nitrato de prata
Na₃C₆H₅O₇	= Citrato de sódio
Mol/L⁻¹	= Mol por litro
°C	= Grau Celsius
mL	= Mililitro
pH	= Potencial hidrogeniônico
UV/Vis	= Ultravioleta visível
CuK_α	= Radiação K _α do cobre
λ	= Comprimento de onda
Å	= Ângstron
MEV	= Microscopia eletrônica de varredura
MET	= Microscopia eletrônica de transmissão
Mm	= Milímetro
G	= Grama
%	= Porcentagem
μL	= Microlitro
v/v	= Volume por volume

Cm	= Centímetro
CO-60	= Cobalto 60
kGy	= KiloGray
ATCC	= American Type Culture Collection
ASD	= Agar Sabouraud Dextrose
CSD	= Caldo Sabouraud Dextrose
NaCl	= Cloreto de sódio
UFC/mL	= Unidades formadoras de colônias por mililitro
DO	= Densidade óptica

SUMÁRIO

SUMÁRIO

1 - INTRODUÇÃO	15
2 - MATERIAIS E MÉTODOS	18
2.1 - Síntese e caracterização do colóide de nanopartículas de prata	18
2.2 - Adição da solução coloidal de nanopartículas de prata ao PMMA e processamento da resina acrílica	19
2.3 - Armazenamento dos espécimes por 30 dias em água deionizada (t30)	21
2.4 - Esterilização dos espécimes	21
2.5 - Microrganismo e condições de crescimento	21
2.6 - Análise da ação antimicrobiana do nanocompósito PMMA/Ag – quantificação de Unidades Formadoras de Colônias	22
3 RESULTADOS	23
3.1. - Síntese e caracterização do colóide de nanopartículas de prata	23
3.2 - Corpos de prova de resina acrílica	25
3.3 - Análise da ação antimicrobiana do nanocompósito PMMA/Ag – quantificação de Unidades Formadoras de Colônias – grupos t0 e t30	26
4. DISCUSSÃO	28
REFERÊNCIAS	32

1 - INTRODUÇÃO

Candida albicans e outras espécies de *Candida* são componentes comuns da microbiota humana intestinal e oral¹⁻⁴. Sobre certas condições predisponentes esses microrganismos podem se converter em patógenos oportunistas que causam desde doenças superficiais a sistêmicas^{1,2,5,6}. Alguns fatores como hipossalivação, higiene oral inadequada, diabetes mellitus, uso contínuo de próteses e de antibióticos e condições de imunossupressão constituem os fatores predisponentes para a infecção por *Candida* spp^{1,5,7-10}.

A candidose oral pode ser classificada em primária ou secundária. A forma primária se divide em aguda, crônica e lesões associadas a *Candida*. Dentro da forma aguda há a candidose pseudomembranosa e a eritematosa; a forma crônica pode ser dividida em hiperplásica e eritematosa; e entre as lesões associadas a *Candida* temos a queilite angular, a glossite rombóide mediana, o eritema gengival linear e a estomatite protética (5); sendo que esta última atinge de 25 a 65% dos pacientes usuários de próteses com base em resina acrílica^{1,7,11}.

Diversos estudos têm mostrado que a quantidade de células fúngicas presente na cavidade oral aumenta quando os pacientes são portadores de aparelhos ortodônticos, próteses totais ou parciais removíveis^{3,12,13}. Também é sabido que a adesão fúngica à superfície de resina acrílica de próteses constitui uma importante etapa para a colonização e início da infecção por *Candida* spp na estomatite protética^{2,3,6,14,15}. Essa adesão é favorecida pela hidrofobicidade relativa da superfície do poli(metil metacrilato) (PMMA) e pelo dimorfismo apresentado pelos fungos^{6,9,16-18}.

De maneira geral, o desenvolvimento de um biofilme envolve quatro etapas: primeiro ocorre a adesão dos microrganismos à superfície, depois, uma discreta formação de colônias e organização de células; em seguida, ocorre a secreção de matriz extracelular (polissacarídeos) e maturação de uma estrutura tridimensional; e por último, a disseminação de células¹⁹⁻²¹. Uma vez estabelecido o biofilme sobre qualquer que seja a superfície, os microrganismos começam a apresentar características únicas, como a tolerância a agentes antimicrobianos^{12,20,22}.

Atualmente, os agentes antimicrobianos mais utilizados no tratamento de infecções fúngicas são aqueles com polieno (anfotericina B), triazol (fluconazol, itraconazol, voriconazol, posaconazol) ou equinocandinas (caspofungina, micafungina, anidulafungina)²³. Entretanto, a administração desses antifúngicos é frequentemente acompanhada de várias complicações como a toxicidade e as interações medicamentosas²³.

E diversos estudos têm mostrado que a prata (Ag) exibe uma forte atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, fungos, protozoários, e certos tipos de vírus²⁴⁻²⁶, incluindo cepas resistentes, podendo ser considerada como um potencial agente antifúngico^{22,24,25,27}. Devido aos mecanismos de ação da Ag que envolvem a interação com componentes citoplasmáticos e ácidos nucleicos, inibição de enzimas da cadeia respiratória e alteração na permeabilidade da membrana plasmática, a probabilidade do desenvolvimento de resistência dos microrganismos é menor^{22,23,25}.

Nanopartículas são partículas menores que 100 nm²⁸ e que exibem uma área de superfície maior que a correspondente na forma convencional. Ainda, o pequeno tamanho frequentemente resulta em uma maior reatividade e alteração de propriedades de superfície que podem ser exploradas em uma variedade de produtos como cosméticos, dispositivos médicos, etc²⁸.

Estudos têm mostrado que nanopartículas de Ag possuem potencial antimicrobiano contra bactérias e fungos^{22,23,25,27,29-34}. Kim KJ et al²² ao avaliar a ação de nanopartículas de Ag com forma esférica e tamanho médio de 3 nm encontraram que as mesmas inibiram células de *Candida albicans* de forma semelhante à anfotericina B, e causaram menos lise de eritrócitos que a anfotericina B na mesma concentração. Segundo os autores, as nanopartículas de Ag agiram rompendo a membrana celular plasmática e inibindo processos normais da célula fúngica²².

Considerando estes achados prévios e pensando no controle de biofilme sobre materiais odontológicos, tem sido uma tendência a incorporação de agentes antimicrobianos como a prata a materiais poliméricos como a resina acrílica.

Vários trabalhos³⁴⁻³⁹ têm avaliado a incorporação e liberação de Ag⁺ a polímeros. No experimento de Yu e col.⁴⁰, nanopartículas de Ag adicionadas ao poli

(metil metacrilato) 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 Ag, Kong et al.⁴¹ observaram que após 6 meses de imersão em água destilada a maioria das nanopartículas de Ag 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.

Pensando-se assim, a incorporação de nanopartículas de Ag ao PMMA poderia ser considerada como uma possível medida de prevenção para estomatite protética em pacientes portadores de próteses com base em resina acrílica, uma vez que as mesmas apresentam baixa toxicidade às células humanas, possuem ação antimicrobiana em baixas concentrações (unidades mg/L) ^{23,29} e o custo para sua produção pode ser considerado baixo ^{25,43}.

Dessa forma, o objetivo da presente pesquisa foi adicionar nanopartículas de Ag a uma resina acrílica à base de poli (metil metacrilato) e verificar a atividade antimicrobiana do nanocompósito PMMA/Ag para *Candida albicans*, em um período inicial (t_0) e após 30 dias armazenamento em água deionizada (t_{30}).

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.⁴⁴. Nanopartículas de Ag coloidal foram sintetizadas pela redução de íons prata (Ag^+) do nitrato de prata (AgNO_3) (Merck KGaA, Darmstadt, Hesse, Alemanha) pelo citrato de sódio ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$) (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 aproximadamente 10 minutos, até o aparecimento da coloração amarelo âmbar, que evidencia qualitativamente a formação de nanopartículas de Ag.

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), para isto 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. As nanopartículas de Ag também foram caracterizadas qualitativamente por difração de raios-X (Difratômetro Rigaku DMax-2000PC, Rigaku Corporation, Tóquio, Japão) com anodo rotatório e radiação CuK_α ($\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$) para que se conhecesse a estrutura cristalina das mesmas. O difratômetro de raios-X 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 à temperatura ambiente.

A forma e a distribuição do tamanho das partículas (5 e 10 nm) foram confirmadas a partir de imagens de MEV e de MET (microscópio eletrônico FEG-VP Supra 35, Carl Zeiss, Jena, Turíngia, Alemanha).

2.2 - Adição da solução coloidal de nanopartículas de prata ao PMMA e processamento da resina acrílica

Para obtenção dos corpos de prova 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 modelo 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 pela condensação manual desse material e aguardou-se a polimerização final do silicone.

Somente para os grupos que ficaram armazenados em água deionizada por um período de 30 dias, após a obtenção dos moldes, os mesmos foram perfurados com uma agulha para a passagem de um fio de silicone previamente à inclusão.

Os moldes foram fixados com adesivo (Cola Tenaz Loctite, Henkel Ltda, São Paulo, São Paulo, Brasil) sobre uma lâmina de vidro retangular (75 mm x 45 mm x 5 mm) e seu interior foi preenchido com cera utilidade (Wilson, Polidental Ind. e Com. Ltda, Cotia, São Paulo, Brasil).

O conjunto lâmina de vidro + moldes em silicone foi incluído em mufla metálica com gesso pedra tipo III. Após o gesso tomar presa, 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. 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).

A resina acrílica Lucitone 550 foi proporcionada de acordo com as instruções do fabricante. Para cada corpo de prova 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 Ag com tamanhos médios de 5 e 10 nm foi adicionada ao componente líquido da resina acrílica nas concentrações de 0% (0 μ L), 0,5% (20 μ L) e 5% (200 μ L) baseadas na

massa do polímero (4g).

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 e, ao atingir a fase plástica, a resina acrílica contendo as nanopartículas de prata foi condensada no interior dos moldes em silicone. Na sequência, 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 (Termopolimerizadora Solab, Solab Equipamentos para Laboratório Ltda, Piracicaba, São Paulo, Brasil). Após a polimerização, a mufla foi resfriada sobre bancada por uma noite e os espécimes desincluídos. Para cada concentração e tamanho foram confeccionados trinta espécimes para os grupos de t_0 e t_{30} de acordo com a tabela 1.

Tabela 1. Número de corpos de prova confeccionados de acordo com o tamanho médio e concentração de nanopartículas de prata adicionadas à resina acrílica e tempo de armazenamento em água deionizada.

Tamanho médio das nanopartículas de prata adicionadas à resina acrílica	Concentrações de nanopartículas de prata adicionadas à resina acrílica	Número de corpos de prova em triplicata (n=30) t_0	Número de corpos de prova em triplicata (n=30) t_{30}
0 nm	0%	30	30
5 nm	0,5%	30	30
	5%	30	30
10 nm	0,5%	30	30
	5%	30	30

t_0 (Tempo 0) a análise microbiológica foi realizada logo após a confecção dos espécimes sem armazenamento em água deionizada; t_{30} (Tempo 30 dias) a análise microbiológica foi realizada após 30 dias de armazenamento em água deionizada à 37°C sob agitação a 100 rpm.

Após a desinclusão, os corpos de prova foram submetidos a acabamento para remoção das irregularidades das bordas, com auxílio de um micromotor e fresa de tungstênio (mini cut). Foram realizadas três medições da altura e do diâmetro dos espécimes com um paquímetro digital (Paquímetro Digital Absolute Digimatic, Mitutoyo Sul Americana Ltda, Santo Amaro, São Paulo, Brasil).

2.3 - Armazenamento dos espécimes por 30 dias em água deionizada (t₃₀)

Os fios de silicone pelos quais os espécimes estavam presos foram fixados com cola quente nas tampas de tubos de polipropileno e cada corpo de prova foi imerso em 10 mL de água deionizada no interior destes tubos. Na sequência, os tubos foram mantidos à 37°C sob agitação em um agitador orbital (Tecnal TE 420, Tecnal Equipamentos para Laboratórios Ltda, Piracicaba, São Paulo, Brasil) por um período de tempo de 30 dias (t₃₀). O agitador operou 6 horas seguidas por dia a uma velocidade de 100 rpm durante 30 dias.

2.4 - Esterilização dos espécimes

Previamente aos ensaios microbiológicos, todos os modelos foram submetidos a esterilização por radiação com uma fonte de Co-60 tipo “Gammacell 220” com dose de 25kGy. Este procedimento foi realizado no Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN).

2.5 - Microrganismo e condições de crescimento

A cepa de *Candida* utilizada neste estudo foi a *Candida albicans* (ATCC 1031) proveniente do Instituto Adolfo Lutz – Divisão de Biologia Médica, São Paulo, SP, Brasil. Previamente a cada ensaio, os microrganismos foram cultivados a 37°C por 24h em Ágar Sabouraud Dextrose (ASD) (Becton Dickinson France SAS, Le Pont de Claix, France), após este período, uma alçada de microrganismos foi adicionada em 10 mL de NaCl 0,9% para a obtenção de um inóculo a uma concentração de 1,1 x

10^7 UFC mL^{-1} ajustada a partir da densidade óptica ($\text{OD}_{0.951}$) a 530 nm com auxílio de um espectrofotômetro (Shimadzu Corporation, Nakagyo-Ku, Kyoto, Japão).

2.6 - Análise da ação antimicrobiana do nanocompósito PMMA/Ag – quantificação de Unidades Formadoras de Colônias

A atividade antimicrobiana do PMMA/Ag contra a formação de biofilme de *Candida albicans* antes e após o armazenamento em água deionizada foi analisada por meio da quantificação de Unidades Formadoras de Colônias. Os corpos de prova foram adicionados a tubos de ensaio contendo 9,9 mL de Sabouraud Dextrose Broth (SDB) (Becton Dickinson France SAS, Le Pont de Claix, France) e 0,1 mL do inoculo a uma concentração de $1,1 \times 10^7$ UFC/mL ajustada a partir da densidade óptica ($\text{OD}_{0.951}$) a 530 nm com auxílio de espectrofotômetro. Após 24 horas de incubação a 37°C em condições de aerobiose, os modelos foram assepticamente removidos dos tubos e lavados por cinco vezes através da imersão em NaCl 0,9% estéril com o objetivo de remover microrganismos fracamente aderidos a superfície do polímero.

Os corpos de prova foram então, transferidos para 10 mL de NaCl 0,9% e agitados em vortex durante 1min para remoção do biofilme formado sobre a superfície da resina. Diluição decimal seriada foi imediatamente preparada e a diluição a 10^{-1} foi semeada em ASD. Após um período de 48 h de incubação, o total de Unidades Formadoras de Colônias foi quantificado. Todos os ensaios foram realizados em triplicata e em três vezes independentes

3 RESULTADOS

3.1. - Síntese e caracterização do colóide de nanopartículas de prata

Um indício da formação de nanopartículas de Ag foi a coloração amarelo âmbar observada na solução instantes após a etapa de adição do agente redutor. O espectro de absorção UV/Vis do colóide mostrou uma banda plasmon característica de nanopartículas de Ag, com máximo em aproximadamente 430 nm (Figura 1).

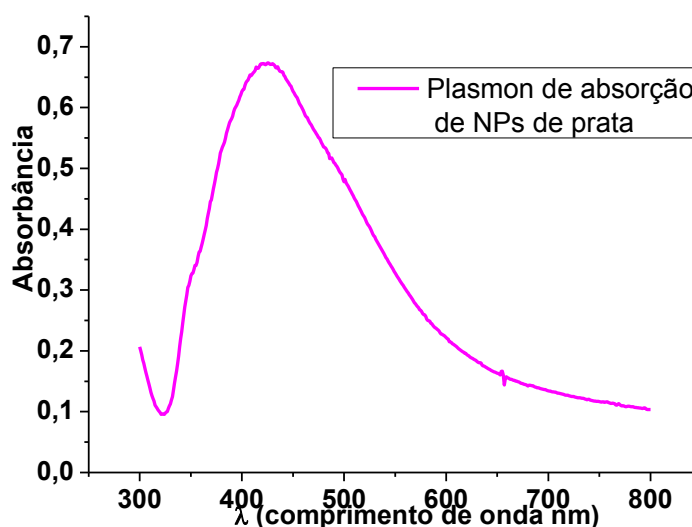


Figura 1. Gráfico de absorbância versus comprimento de onda do colóide obtido a partir da reação de redução da prata pelo citrato de sódio na temperatura de 97°C. O gráfico mostra a banda plasmon de absorção característica de nanopartículas de prata.

As imagens de MEV (Figura 2) e de MET (Figura 3) confirmaram a forma esférica das partículas e evidenciaram nanopartículas de Ag com diâmetros médios de 5 e 10 nm em uma concentração de 539,5µg de Ag/mL na solução coloidal.

A difração de raios-X também confirmou a presença de nanopartículas de Ag com estrutura cristalina cúbica (Joint Committee on Powder Diffraction Standards 04-0783). De acordo com a Figura 4, 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),

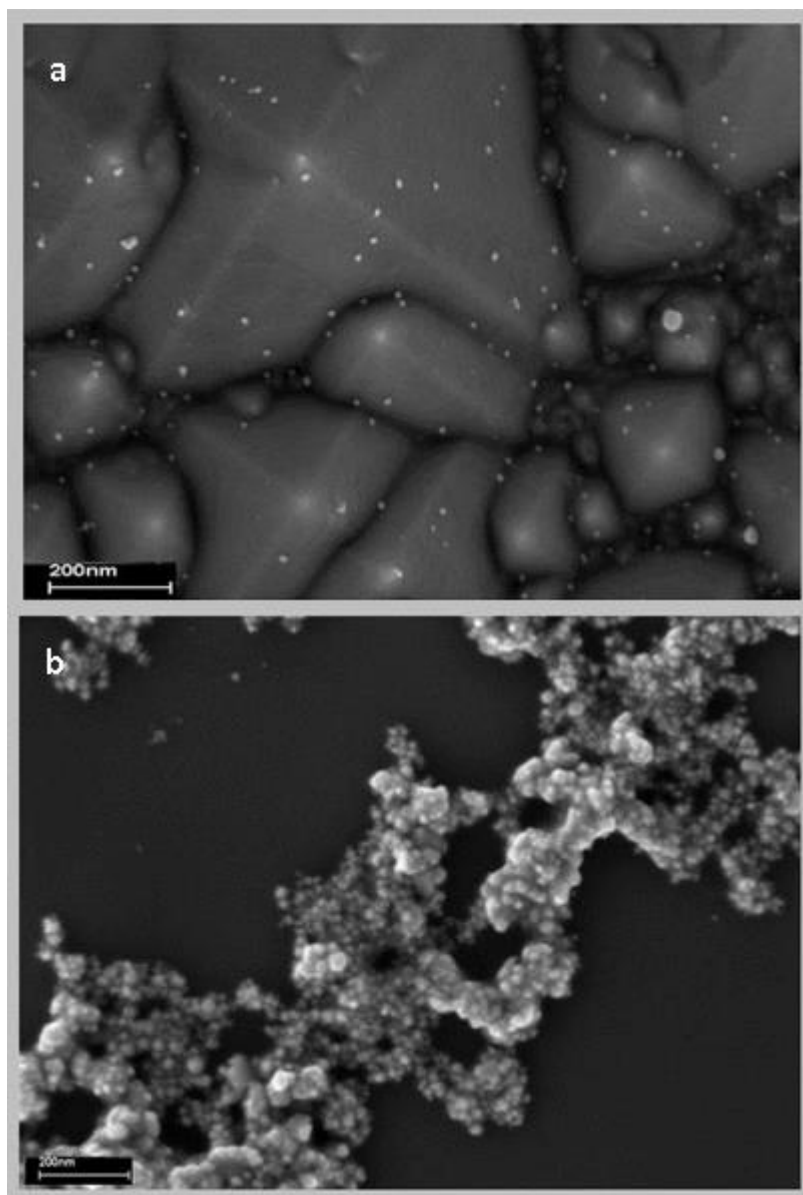


Figura 2. MEV das nanopartículas de prata sintetizadas via redução dos íons prata do nitrato de prata pelo citrato. O substrato de silício foi degradado por KOH por 2 horas e a prata coloidal foi depositada sobre o substrato e secada para se obter a imagem. Essa técnica ilustra claramente a forma e o tamanho das nanopartículas de prata. **a)** os pontos claros representam nanopartículas de prata com tamanho médio de 5 nm. Aumento: 90,75 Kx; **b)** os pontos claros representam nanopartículas de prata com tamanho médio de 10 nm. Aumento: 90,75 Kx.

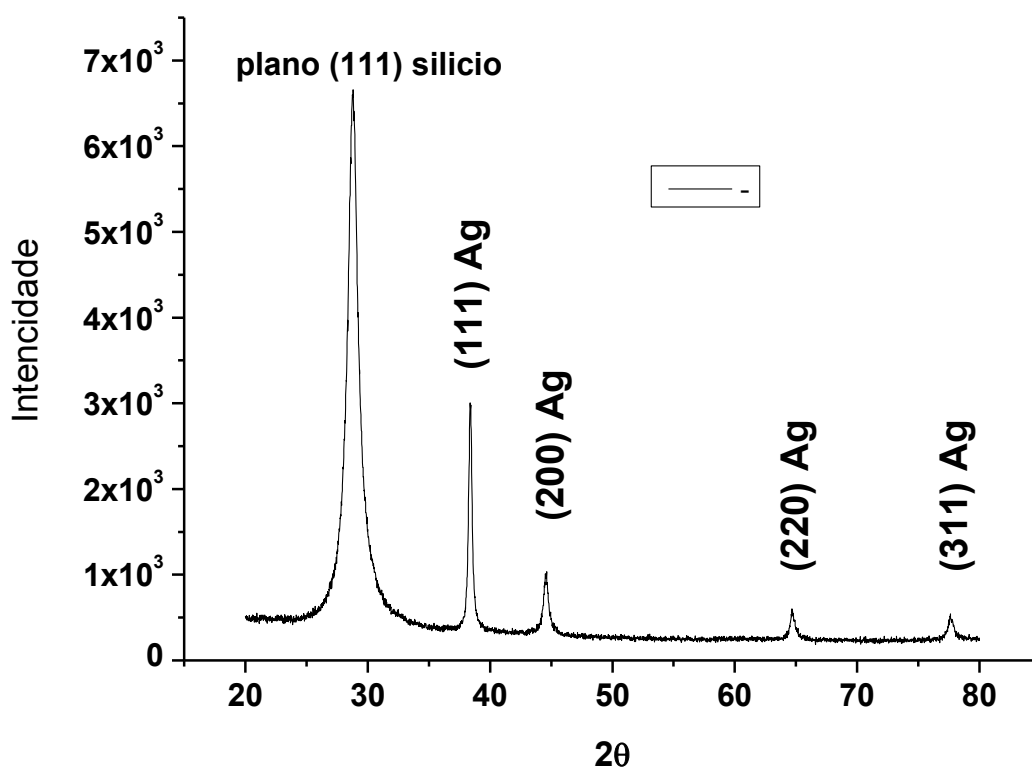


Figura 4.

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

3.2 - Corpos de prova de resina acrílica

Após a obtenção e acabamento dos corpos de prova foram realizadas três mensurações do diâmetro e da altura dos mesmos com auxílio de um paquímetro digital (Paquímetro Digital Absolute Digimatic, Mitutoyo Sul Americana Ltda, Santo Amaro, São Paulo, Brasil). A média da altura dos modelos dos grupos t_0 foi de 3,6 cm, com coeficiente de variação 0,05, e a média do diâmetro foi de 10,4 cm com coeficiente de variação 0,09. Os corpos de prova dos grupos t_{30} apresentaram média de diâmetro 9,65 cm, com coeficiente de variação 0,02 e média de altura de 3,53 cm, com coeficiente de variação 0,05.

3.3 - Análise da ação antimicrobiana do nanocompósito PMMA/Ag – quantificação de Unidades Formadoras de Colônias – grupos t₀ e t₃₀

Os resultados indicaram que a adição das soluções coloidais de nanopartículas de Ag de tamanhos médios 5 e 10 nm à resina acrílica nas concentrações de 0,5% e 5% reduziram a formação de biofilme na superfície do nanocompósito, quando comparado com o grupo controle no tempo t₀ (Tabela 2). A maior redução na formação de biofilme entre os grupos que não ficaram imersos em água deionizada (t₀) foi observada para o nanocompósito em que adicionou-se nanopartículas de tamanho médio de 5 nm na concentração 0,5% ($13,95 \times 10^2$ UFC/mL). Por outro lado, a adição nanopartículas de Ag de tamanho 10 nm na concentração 5% foi a que mostrou menor redução no desenvolvimento de biofilme de *Candida albicans* sobre a superfície do nanocompósito (Tabela 2).

Para os grupos que foram submetidos ao armazenamento em água deionizada (t₃₀) observou-se que a adição de nanopartículas de Ag de tamanhos médios 5 e 10 nm na menor concentração (0,5%) reduziu a formação de biofilme fúngico em comparação com o grupo controle (Tabela 2).

Ao se comparar os grupos nos tempos t₀ e t₃₀ foi possível notar uma redução na formação de biofilme sobre a superfície polimérica após o armazenamento em água para os grupos em que adicionou-se nanopartículas de 10 nm a uma concentração de 0,5%. Ainda, o nanocompósito contendo nanopartículas de tamanho 10 nm em concentração 5% mostrou um valor muito próximo nos tempos t₀ e t₃₀, $26,56 \times 10^2$ UFC/mL e $26,96 \times 10^2$ UFC/mL, respectivamente (Tabela 2).

Tabela 2. Média do número de UFC/mL e Desvio Padrão para as diferentes concentrações e tamanhos de nanopartículas de prata adicionadas à resina acrílica (grupos t_0 e t_{30}), obtidos a partir do ensaio de quantificação de Unidades Formadoras de Colônias.

Tempo de armazenamento em água deionizada	Tamanho das nanopartículas de prata (nm)	Concentração (%) de nanopartículas adicionadas à resina	Média do Número de Colônias (UFC/mL) (Desvio Padrão)
t_0	0 (Controle)	0%	$33,89 \times 10^2$ (2,77)
t_0	5 nm	0,5%	$13,95 \times 10^2$ (1,35)
		5%	$16,44 \times 10^2$ (1,4)
t_0	10 nm	0,5%	$16,22 \times 10^2$ (1,36)
		5%	$26,56 \times 10^2$ (2,19)
t_{30}	0 (Controle)	0%	$23,18 \times 10^2$ (3,28)
t_{30}	5 nm	0,5%	$20,73 \times 10^2$ (0,51)
		5%	$24,80 \times 10^2$ (1,59)
t_{30}	10 nm	0,5%	$11,11 \times 10^2$ (0,5)
		5%	$26,96 \times 10^2$ (1,71)

4. DISCUSSÃO

O presente trabalho analisou a atividade antimicrobiana de uma resina acrílica para base protética contendo nanopartículas de Ag sobre o microrganismo *Candida albicans* antes e após armazenamento em água deionizada por um período de 30 dias.

Os resultados mostraram que a incorporação de nanopartículas de Ag ao PMMA reduziu a formação de biofilme de *Candida albicans* sobre a superfície da resina acrílica no tempo t_0 para todos os grupos em comparação ao controle. No período t_{30} , para os grupos em que foram adicionados nanopartículas de Ag de tamanho 5 e 10 nm, somente a menor concentração (0,5%) apresentou ação antimicrobiana reduzindo a formação de biofilme em relação ao grupo controle no mesmo período.

O processo de adesão de *Candida* spp à superfície de resinas acrílicas para base protética é complexo ³. Fatores como pobre higiene oral e das próteses, baixo pH sob as mesmas, dieta rica em carboidratos, superfície da célula fúngica constituída basicamente de manoproteínas e β glicanos que conferem características aniônicas aos fungos, a hidrofobicidade fúngica, a energia livre de superfície da resina acrílica envolvendo forças eletrostáticas de atração e repulsão, interferem na adesão e colonização por *Candida* spp ^{2,3,6,9,47}.

A hidrofobicidade do substrato tem sido considerada um dos fatores mais significantes no processo de adesão inicial do fungo e, portanto, no desenvolvimento do biofilme sobre superfícies poliméricas ^{3,2,15,17,26}. A presença das nanopartículas de Ag pode ter alterado características físico-químicas da resina acrílica interferindo na hidrofobicidade de superfície do polímero, inibindo a formação de biofilme sobre o mesmo. Bürgers e col ²⁶ ao incorporar micropartículas de Ag a uma resina composta observaram que as mesmas tornaram a resina mais hidrofóbica e o grau de hidrofobicidade foi dependente da concentração de micropartículas adicionadas, aumentando com o aumento da concentração de prata. Contrariamente, Dhir et al. (10) ao adicionar uma carga aniônica (monômero com radicais fosfato) ao PMMA observaram um aumento da hidrofilia do material, apesar de não terem testado a

adesão microbiana a este substrato. Acredita-se que o comportamento de nanopartículas de Ag em tamanhos bem reduzidos seja semelhante ao de íons Ag^+ , o que reforça a possibilidade de ter ocorrido um aumento da hidrofília do nanocompósito, e conseqüentemente uma redução na formação de biofilme sobre o mesmo, uma vez que o microrganismo *Candida albicans* pode ser considerado uma espécie mais hidrofílica com ângulos de contato entre 23 e 51°. Em outras palavras, parte do potencial antimicrobiano do nanocompósito observado neste estudo poderia ser atribuído ao efeito da prata sobre a hidrofobicidade do substrato.

Tanto para os grupos que ficaram armazenados em água deionizada (t_{30}) como para os que não passaram por armazenamento (t_{30}) houve uma menor atividade antimicrobiano quando se adicionou a maior concentração (5%) de nanopartículas de Ag à resina acrílica. Uma das explicações para esse resultado poderia estar relacionada com as características físico-químicas do substrato que interfeririam na quantidade e qualidade da adesão de microrganismos à superfície, sendo a rugosidade uma das características dominantes neste sentido^{3,15}. Altos valores de rugosidade de superfície têm mostrado promover a adesão de microrganismos a materiais odontológicos, entretanto, valores de rugosidade abaixo de 0.2 μm não interferem diretamente sobre a adesão microbiana.

No presente trabalho, a rugosidade de superfície dos espécimes de resina acrílica foi controlada, uma vez que as mesmas apresentaram-se bastante lisas após o processamento entre duas placas de vidro e a sua interferência na adesão microbiana pode ter sido reduzida. Entretanto, a adição de colóide de nanopartículas na maior concentração (5%) em ambos os tamanhos causou uma redução visual no brilho de superfície dos corpos de prova, o que poderia ser um indicativo de alteração da topografia, que conseqüentemente pode ter interferido na adesão microbiana impedindo uma maior atividade antimicrobiano nestes grupos.

Ainda, frente a esses resultados, supomos que pode haver uma concentração limite de nanopartículas de Ag capaz de causar inibição da adesão microbiana e conseqüentemente na formação de biofilme, e que a adição de concentrações superiores pode não promover os efeitos esperados ou mesmo causar um aumento da adesão de microrganismos sobre a superfície do polímero.

A maior adesão fúngica à superfície do nanocompósito com maior concentração de nanopartículas pode ter ocorrido também devido à dificuldade de homogeneização do colóide de nanopartículas de Ag na massa de resina durante o processamento laboratorial, fato que foi observado durante a manipulação da resina com maior concentração de colóide incorporado. Essa homogeneização dificultada pode ter impedido a dispersão das nanopartículas promovendo uma maior agregação o que possivelmente levaria as partículas aglomeradas a se comportarem de maneira única, como uma massa, deixando de assumir a sua característica de ação antimicrobiana com alta reatividade em pequenos tamanhos ^{28,32}.

Ao compararmos os resultados antes e após o armazenamento em água deionizada podemos notar que somente a adição de nanopartículas de Ag de tamanho 10 nm na concentração 0,5% mostrou redução da adesão microbiana após os 30 dias de armazenamento. Durante o período de armazenamento, pode ter ocorrido liberação de nanopartículas de Ag oriundas das camadas mais superficiais do nanocompósito e a dissolução destas nanopartículas no meio aquoso ³⁷, fazendo com que as partículas não estivessem mais disponíveis na superfície quando da realização do teste microbiológico após 30 dias de imersão.

Embora o mecanismo de ação antimicrobiano da Ag, especificamente na forma de nanopartículas, ainda não esteja totalmente claro na literatura, o fato de alguns trabalhos relatarem que tanto íons Ag ^{25,30,33,34} como nanopartículas de Ag ^{23,25,29} agiriam comprometendo a integridade da membrana plasmática de células fúngicas ^{22,23,25} e que a Ag, por apresentar um tamanho nanométrico, penetraria através da membrana celular do microrganismo e alteraria seu metabolismo celular, podendo levar a célula à morte ^{22,25}, reforça os resultados observados no presente estudo em que houve menor ação antimicrobiana nos grupos que ficaram armazenados em água deionizada. As partículas presentes na superfície do nanocompósito podem ter sido liberadas durante o período de armazenamento, mesmo que em quantidades muito reduzidas, e este período pode ter sido insuficiente para permitir a migração das partículas das regiões mais internas do espécime para a superfície.

Assim, somente a adição das menores concentrações de nanopartículas de Ag ao PMMA foram as que mostraram maior potencial antimicrobiano biofilme de

Candida albicans tanto antes como após o armazenamento em água, podendo futuramente se considerada uma opção para prevenção de estomatite protética, trazendo benefícios para pacientes reabilitados com próteses com base em resina acrílica, especialmente para aqueles que não seguem um adequado protocolo de higienização.

Uma vez que este estudo avaliou somente um tipo de resina acrílica, uma única espécie de microrganismo e duas concentrações de nanopartículas de Ag, estudos futuros para analisar o efeito de outras concentrações de nanopartículas de Ag, outros tipos de resina sobre diferentes tipos de biofilmes são fortemente recomendados.

Dentro das limitações, o presente estudo mostrou que a incorporação de nanopartículas de Ag à resina acrílica previamente ao armazenamento em água deionizada reduziu a formação de biofilme para os grupos com partículas de tamanho 5 e 10 nm e concentrações de 0,5% e 5%. Após o armazenamento em água deionizada o nanocompósito reduziu a formação de biofilme fúngico para os grupos com nanopartículas de tamanho 5 e 10 nm na concentração de 0,5%, sugerindo uma ação antimicrobiana do nanocompósito no que diz respeito ao controle no desenvolvimento de biofilme de *Candida albicans*.

REFERÊNCIAS

- 1 ELGUEZABAL N, MAZA JL, DORRONSORO S, PONTÓN J. Whole Saliva has a Dual Role on the Adherence of *Candida albicans* to Polymethylmetacrylate. *Open Dent J* 2008;2:1-4.
- 2 PARK SE, PERIATHAMBY AR, LOZA JC. Effect of surface-charged poly(methyl methacrylate) on the adhesion of *Candida albicans*. *J Prosthodont* 2003; 12:249-54.
- 3 HE XY, MEURMAN JH, KARI K, RAUTEMAA R, SAMARANAYAKE LP. In vitro adhesion of *Candida* species to denture base materials. *Mycoses* 2006;49:80-4.
- 4 THEIN ZM, SAMARANAYAKE YH, SAMARANAYAKE LP. Characteristics of dual species *Candida* biofilms on denture acrylic surfaces. *Arch Oral Biol* 2007;52:1200-8.
- 5 SAMARANAYAKE LP, KEUNG LEUNG W, JIN L. Oral mucosal fungal infections. *Periodontol 2000* 2009;49:39-59.
- 6 PANAGODA GJ, ELLEPOLA AN, SAMARANAYAKE LP. Adhesion of *Candida parapsilosis* to epithelial and acrylic surfaces correlates with cell surface hydrophobicity. *Mycoses* 2001;44:29-35.

- 7 FIGUEIRAL MH, AZUL A, PINTO E, FONSECA PA, BRANCO FM, Scully C. Denture-related stomatitis: identification of aetiological and predisposing factors - a large cohort. *J Oral Rehabil*. 2007;34:448-55.
- 8 REDDING S, BHATT B, RAWLS HR, SIEGEL G, SCOTT K, LOPEZ-RIBOT J. Inhibition of *Candida albicans* biofilm formation on denture material. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2009;107:669-72.
- 9 DE SOUZA RD, MORES AU, CAVALCA L, ROSA RT, SAMARANAYAKE LP, ROSA EA. Cell surface hydrophobicity of *Candida albicans* isolated from elder patients undergoing denture-related candidosis. *Gerodontology* 2009;26:157-61.
- 10 DHIR G, BERZINS DW, DHURU VB, PERIATHAMBY AR, DENTINO A. Physical properties of denture base resins potentially resistant to *Candida* adhesion. *J Prosthodont* 2007;16:465-72.
- 11 BUDTZ-JÖRGENSEN E. Etiology, pathogenesis, therapy, and prophylaxis of oral yeast infections. *Acta Odontol Scand* 1990;48:37-43.
- 12 SAMARANAYAKE YH, YE J, YAU JY, CHEUNG BP, SAMARANAYAKE LP. In vitro method to study antifungal perfusion in *Candida* biofilms. *J Clin Microbiol* 2005;43:818-25.

13 ADDY M, SHAW WC, HANSFORD P, HOPKINS M. The effect of orthodontic appliances on the distribution of *Candida* and plaque in adolescents. *Br J Orthod* 1982;9:158-63.

14 SAMARANAYAKE LP, MACFARLANE TW. An in-vitro study of the adherence of *Candida albicans* to acrylic surfaces. *Arch Oral Biol* 1980;25:603-9.

15 RADFORD DR, SWEET SP, CHALLACOMBE SJ, WALTER JD. Adherence of *Candida albicans* to denture-base materials with different surface finishes. *J Dent* 1998;26:577-83.

16 NIKAWA H, NISHIMURA H, HAMADA T, MAKIHIRA S, SAMARANAYAKE LP. Relationship between thigmotropism and *Candida* biofilm formation in vitro. *Mycopathologia* 1998-1999;144:125-9.

17 ARAI T, UEDA T, SUGIYAMA T, SAKURAI K. Inhibiting microbial adhesion to denture base acrylic resin by titanium dioxide coating. *J Oral Rehabil* 2009;36:902-8.

18 KULAK-OZKAN Y, KAZAZOGLU E, ARIKAN A. Oral hygiene habits, denture cleanliness, presence of yeasts and stomatitis in elderly people. *J Oral Rehabil* 2002;29:300-4.

19 SENEVIRATNE CJ, JIN L, SAMARANAYAKE LP. Biofilm lifestyle of *Candida*: a mini review. *Oral Dis* 2008;14:582-90.

20 CHANDRA J, KUHN DM, MUKHERJEE PK, HOYER LL, MCCORMICK T, GHANNOUM MA. Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: development, architecture, and drug resistance. *J Bacteriol* 2001;183:5385-94.

21 SENEVIRATNE CJ, SILVA WJ, JIN LJ, SAMARANAYAKE YH, SAMARANAYAKE LP. Architectural analysis, viability assessment and growth kinetics of *Candida albicans* and *Candida glabrata* biofilms. *Arch Oral Biol* 2009;54(11):1052-60.

22. KIM KJ, SUNG WS, SUH BK, MOON SK, CHOI JS, KIM JG, LEE DG. Antifungal activity and mode of action of silver nano-particles on *Candida albicans*. *Biometals* 2009;22:235-42.

23 PANÁČEK A, KOLÁR M, VECEROVÁ R, PRUCEK R, SOUKUPOVÁ J, KRYSTOF V, HAMAL P, ZBORIL R, KVÍTEK L. Antifungal activity of silver nanoparticles against *Candida* spp. *Biomaterials* 2009;30:6333-40.

24 BALAZS DJ, TRIANDAFILLU K, WOOD P, CHEVOLOT Y, VAN DELDEN C, HARMS H, HOLLENSTEIN C, MATHIEU HJ. Inhibition of bacterial adhesion on PVC endotracheal tubes by RF-oxygen glow discharge, sodium hydroxide and silver nitrate treatments. *Biomaterials*. 2004 May;25(11):2139-51.

25 MONTEIRO DR, GORUP LF, TAKAMIYA AS, RUVOLLO-FILHO AC, DE CAMARGO ER, BARBOSA DB. The growing importance of materials that prevent

microbial adhesion: antimicrobial effect of medical devices containing silver. *Int J Antimicrob Agents* 2009;34:103-10.

26 BÜRGERS R, EIDT A, FRANKENBERGER R, ROSENTRITT M, SCHWEIKL H, HANDEL G, HAHNEL S. The anti-adherence activity and bactericidal effect of microparticulate silver additives in composite resin materials. *Arch Oral Biol* 2009;54:595-601.

27 KIM KJ, SUNG WS, MOON SK, CHOI JS, KIM JG, LEE DG. Antifungal effect of silver nanoparticles on dermatophytes. *J Microbiol Biotechnol* 2008;18:1482-4.

28 STONE V, NOWACK B, BAUN A, VAN DEN BRINK N, VON DER KAMMER F, DUSINSKA M, HANDY R, HANKIN S, HASSELLÖV M, JONER E, FERNANDES TF. Nanomaterials for environmental studies: Classification, reference material issues, and strategies for physico-chemical characterisation. *Sci Total Environ*. 2009 Nov 9. [Epub ahead of print]

29 PANACEK A, KVÍTEK L, PRUCEK R, KOLAR M, VECEROVA R, PIZÚROVA N, SHARMA VK, NEVECNA T, ZBORIL R. Silver colloid nanoparticles: synthesis, characterization, and their antibacterial activity. *J Phys Chem B* 2006;110:16248-53.

30 LOK CN, HO CM, CHEN R, HE QY, YU WY, SUN H, TAM PK, CHIU JF, CHE CM. Silver nanoparticles: partial oxidation and antibacterial activities. *J Biol Inorg Chem* 2007;12:527-34.

- 31 ALT V, BECHERT T, STEINRÜCKE P, WAGENER M, SEIDEL P, DINGELDEIN E, DOMANN E, SCHNETTLER R. An in vitro assessment of the antibacterial properties and cytotoxicity of nanoparticulate silver bone cement. *Biomaterials* 2004;25:4383-91.
- 32 MONTEIRO DR. Análise da incorporação de nanopartículas de Ag a uma resina acrílica para base protética [dissertação]. Araçatuba: Faculdade de Odontologia de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista; 2009.
- 33 SONDI I, SALOPEK-SONDI B. Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on *E. coli* as a model for Gram-negative bacteria. *J Colloid Interface Sci* 2004;275:177-82.
- 34 DAMM C, MÜNSTEDT H, RÖSCH A. The antimicrobial efficacy of polyamide 6/silver-nano- and microcomposites. *Mater Chem Phys* 2008;108:61-66.
- 35 KUMAR R, MÜNSTEDT H. Silver ion release from antimicrobial polyamide/silver composites. *Biomaterials* 2005;26:2081-2088.
- 36 DAMM C, MÜNSTEDT H, RÖSCH A. Long-term antimicrobial polyamide 6/silver-nanocomposites. *J Mater Sci* 2007;42:6067-6073.

- 37 DAMM C, MÜNSTEDT H. Kinetic aspects of the silver ion release from antimicrobial polyamide/silver nanocomposites. *Appl Phys A* 2008;91:479-486.
- 38 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.
- 39 KUMAR R, MÜNSTEDT H. Polyamide/silver antimicrobials: effect of crystallinity on the silver ion release. *Polym Int* 2005;54:1180-1186.
- 40 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.
- 41 KONG H, JANG J. Antibacterial properties of novel poly(methyl methacrylate) nanofiber containing silver nanoparticles. *Langmuir* 2008;24:2051-2056.
- 42 IRZH A, PERKAS N, GEDANKEN A. Microwave-assisted coating of PMMA beads by silver nanoparticles. *Langmuir* 2007;23:9891-9897.
- 43 RUPP ME, FITZGERALD T, MARION N, HELGET V, PUUMALA S, ANDERSON JR, FEY PD. Effect of silver-coated urinary catheters: efficacy, cost-effectiveness, and antimicrobial resistance. *Am J Infect Control* 2004;32:445-50.

44 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.

45 MINSKY A, SHIMONI E, FRENKIEL-KRISPIN D. Stress, order and survival. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002;3:50-60.

46 THATI B, NOBLE A, ROWAN R, CREAVEN BS, WALSH M, MCCANN M, EGAN D, KAVANAGH K. Mechanism of action of coumarin and silver(I)-coumarin complexes against the pathogenic yeast *Candida albicans*. *Toxicol In Vitro* 2007;21:801-8.

47 MINAGI S, MIYAKE Y, INAGAKI K, TSURU H, SUGINAKA H. Hydrophobic interaction in *Candida albicans* and *Candida tropicalis* adherence to various denture base resin materials. *Infect Immun* 1985;47:11-4.