

ALINE SATIE TAKAMIYA

**Adição de nanopartículas de prata ao Poli
(metil metacrilato) – Análise microbiológica**

Araçatuba – SP

2010

ALINE SATIE TAKAMIYA

**Adição de nanopartículas de prata ao Poli
(metil metacrilato) – Análise microbiológica**

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

2010

Catálogo-na-Publicação

Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

Takamiya, Aline Satie
T136a Adição de nanopartículas de prata ao poli (metil metacrilato) :
análise microbiológica / Aline Satie Takamiya. - Araçatuba : [s.n.],
2010
114 f. : il. ; tab. + 1 CD-ROM
Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Odontologia, Araçatuba, 2010
Orientadora: Profa. Débora de Barros Barbosa
1. Nanotecnologia 2. Polimetil metacrilato 3. Candida albicans
4. Prata 5. Bases de dentadura
Black D3
CDD 617.69

DADOS CURRICULARES

ALINE SATIE TAKAMIYA

NASCIMENTO	11/01/1983 – MOGI MIRIM – SP
FILIAÇÃO	Yoshihiro Takamiya Rosangela de Fatima Crochi Takamiya
2002/2007	Curso de Graduação em Odontologia Faculdade de Odontologia de Araçatuba - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.
2008/2010	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 Rosângela e Yoshihiro

Meus primeiros e eternos mestres, de quem recebi o dom mais valioso do Universo – a vida. 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. Obrigada por revestir a minha existência com amor carinho e dedicação, por serem não apenas pais, mas amigos e companheiros, mesmo nas horas em que os ideais pareciam distantes e inatingíveis. Vocês são motivos de muito orgulho para mim e os maiores responsáveis pela realização deste sonho. Amo muito vocês.

Aos meus queridos irmãos Alan, André e Alex

Pessoas encantadoras e especiais que tornam a minha caminhada mais leve, iluminada e feliz. Vocês são mais que irmãos, são amigos, companheiros e exemplos para mim. Obrigada por estarem sempre presente em minha vida, por compartilharem comigo os melhores momentos da minha existência. Obrigada pela bondade, pelo incentivo e por todo amor. É um orgulho para mim tê-los como irmãos, vocês com certeza contribuíram muito para a concretização deste sonho. Amo vocês incondicionalmente.

Aos meus avós Etsuo (in memoriam), Tyono, Antônio e Maria

Cecília

Pela maravilhosa família que me deram. Obrigada pelo amor, cuidado e carinho que sempre dedicaram a mim. Vocês são exemplos de luta, honestidade e integridade. Sinto-me honrada e orgulhosa de tê-los como avós. Amo muito vocês. Vô José, sei que aí do céu está orando e velando por mim em todos os dias de minha vida. Vó Olga, Vô Crochi e Vó Cecília desculpem-me por às vezes estar ausente, mas tenham certeza de que vocês estão sempre comigo em meus pensamentos. À vocês que também me incentivaram muito nesta conquista, toda a minha gratidão.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

“Há pessoas que transformam o sol numa simples mancha amarela, mas há também aquelas que fazem de uma simples mancha amarela o próprio sol.”

Pablo Picasso

A Deus

Que me deu a vida, sempre me acompanhou e colocou em meu caminho pessoas tão especiais como as que posso conviver. Pai, obrigada por iluminar minha vida, por ter me dado forças principalmente nos momentos mais difíceis.

Aos meus pais, e aos meus irmãos

Obrigada por tudo, vocês são os alicerces que sustentam a minha vida. Obrigada por acreditarem no meu potencial, por todo amor, carinho, amizade, generosidade e por tudo que representam na minha vida. Vocês com certeza são meu orgulho e minha felicidade. Obrigada, não só pelo que vocês são, mas pelo que fazem de mim quando estou com vocês. Minha eterna gratidão.

À minha orientadora e amiga Prof^a. Ass. Dr^a. Débora Barros

Barbosa

Obrigada por toda dedicação, atenção e paciência que você dedica a mim desde a minha iniciação científica. Conhecer você com certeza foi um presente de Deus. Obrigada pela orientação, por confiar em mim e pela oportunidade de aprendizado que me proporcionou. Sua competência, seu jeito simples, descontraído e calmo de orientar com certeza tornaram a realização deste trabalho uma grande oportunidade de crescimento profissional e pessoal para mim. Você é um exemplo de fé, integridade, generosidade e profissionalismo que fez despertar em mim o interesse pela pesquisa e ensino. Professora, obrigada acima de tudo pela sua amizade, você é um anjo que Deus colocou em minha vida. Muito obrigada.

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, pelo convívio e pela amizade.

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 do laboratório e de equipamentos indispensáveis na execução deste trabalho. Muito obrigada pela acolhida e pelo apoio, sem sua ajuda não seria possível.

Ao *Departamento de Patologia e Propedêutica Clínica* da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP, por permitir a realização de diversos estudos pilotos imprescindíveis para a realização 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.

À *Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)* pelo apoio financeiro na forma de Bolsa Mestrado (Processo nº2007/06302-8).

Ao *Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)* pelo apoio financeiro na forma de auxílio à pesquisa Processo nº 577163/2008-6.

À *Profa. Ass. Dra. Ana Cláudia Okamoto*, por todo conhecimento a mim transmitido. Obrigada pela sua disposição em ensinar e pela ajuda inestimável na realização dos primeiros testes microbiológicos. Obrigada pela amizade e por todo apoio.

Ao *Prof. Adj. Wirley Gonçalves Assunção*, que com competência, caráter e integridade influenciou minha formação. Obrigada pela saudável convivência nas clínicas e nas aulas, você com certeza é um exemplo de mestre para mim.

Ao *Prof. Ass. Dr. Paulo Henrique dos Santos*, pela realização da análise estatística desse trabalho. Pela sua paciência, e sua ajuda sempre que precisei.

Ao **Prof. Adj. Wilson Roberto Poi**, pela amizade, carinho e apoio. Obrigada pelos ensinamentos e pelo convívio.

A todos os **docentes do Programa de Pós-Graduação em Odontologia**, pela oportunidade de crescimento, por todo conhecimento científico compartilhado.

À **Profa. Dra. Cristiane Yumi Koga Ito**, por sua disposição em transmitir conhecimento para a realização deste trabalho.

Ao **Prof. Dr. Émerson Rodrigues de Camargo** do Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos - UFSCar, por toda dedicação e contribuição no desenvolvimento deste trabalho. Obrigada pela amizade e disponibilidade em ajudar sempre.

À funcionária **Maria dos Santos Ferreira Fernandes** do Departamento de Odontopediatria, pessoa amável e atenciosa, sempre solícita, nunca me negou ajuda. Muito obrigada 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 e Valéria**, que sempre muito atenciosos, prestativos e eficientes 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.

Ao meu grande amigo *Douglas Roberto Monteiro*, fiel escudeiro de todas as horas. Que muitas vezes deixou seus compromissos de lado para se dedicar aos meus. Obrigada pela amizade, pelo companheirismo, por noites e finais de semana no laboratório a me ajudar. Obrigada pela convivência agradável, pelas risadas e pelo apoio de sempre.

Ao meu grande amigo *Aldiéris Alves Pesqueira*, meu “irmão”. Obrigada pela amizade, pela convivência, por compartilhar comigo momentos de alegria, tristeza, trabalho e diversão. Agradeço toda a sua disponibilidade em me ajudar. Você é uma pessoa muito especial que Deus colocou em meu caminho.

Ao meu amigo químico *Luiz Fernando Gorup*, exemplo de dedicação, educação e bondade. Obrigada pela ajuda no desenvolvimento deste trabalho, sem você não seria possível. Obrigada também pela disponibilidade e prestatividade em todos os momentos que precisei.

À química *Tatiane Moraes Arantes*, pela valiosa contribuição nas análises de Microscopia Eletrônica de Varredura.

À minhas amigas *Érica Alves Gomes* e *Josiene Firmino de Souza* amigas amáveis, carinhosas e atenciosas. A convivência com vocês me ensinou muito. Muito obrigada 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.

Ao meu amigo *Valentim Adelino Ricardo Barão*, por sua amizade e companheirismo, por todos os momentos de alegria e de trabalho compartilhados.

À minha amiga *Marcela Filie Haddad* pessoa de enorme bondade. Ter você como amiga é um privilégio para mim. Obrigada por toda convivência, pela alegria e disposição em trabalhar em dupla. Agradeço por todos os momentos que passamos nas clínicas e aulas, serão inesquecíveis.

À minha amiga *Daniela Micheline dos Santos*, pela amizade, pela sua solicitude sempre que precisei, por todo o apoio e pela divertida convivência. Você é uma amiga especial.

À minha amiga *Fernanda Brighenti*, por toda atenção, disposição e paciência em ajudar. Obrigada pelo apoio e pelos esclarecimentos em alguns procedimentos laboratoriais.

Às amigas *Ligia Kerche Vasconcelos, Natália e Ana Helena Pereira Barbosa*, pelo auxílio no laboratório, pela prestatividade e ajuda. Foi um prazer conviver com vocês.

Aos meus amigos de turma de mestrado: *Marcela, Luciana, Rodolfo, Murilo, Márcio e Adriana*, pela amizade, vivências e experiências compartilhadas. Desejo a todos vocês muito sucesso.

À minha amiga *Aline Úrsula*, pessoa que transborda alegria. Obrigada por fazer parte da minha vida.

Às minhas amigas da Odontopediatria *Eliana Takeshita, Marcele, Michele e Jackeline*. Obrigada pela agradável convivência no laboratório e pela disponibilidade em ajudar sempre. Conviver com pessoas como vocês é uma dádiva de Deus.

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.

“Só existem dois dias no ano que nada pode ser feito. Um se chama ontem e o outro se chama amanhã, portanto hoje é o dia certo para amar, acreditar, fazer e principalmente viver.”

Dalai Lama

Takamiya AS. **Adição de nanopartículas de prata ao Poli (metil metacrilato) – Análise microbiológica** [dissertação]. Araçatuba: Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual Paulista; 2010.

RESUMO

O objetivo do presente estudo foi verificar a atividade antimicrobiana de uma resina acrílica à base de poli (metil metacrilato) (PMMA) contendo nanopartículas de prata frente ao microorganismo Candida albicans. 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 tamanhos médios de 5 e 10 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, os espécimes foram esterilizados por radiação de Co-60. Foram analisados a adesão de microorganismos à superfície do poli (metil metacrilato)/prata (PMMA/Ag) e a formação de biofilme por Candida albicans sobre a superfície polimérica através de microscopia de luz e de MEV. Os resultados mostraram redução estatisticamente significativa ($P < 0,05$) da adesão de microorganismos à superfície do nanocompósito para os grupos com 0,05 e 0,5% de nanopartículas de prata com tamanho de 5nm quando comparados ao grupo controle. A

microscopia de luz não mostrou diferença na formação de biofilme entre os grupos dos nanocompósitos e o grupo controle. A MEV sugeriu uma redução na quantidade de células na superfície dos grupos contendo nanopartículas de prata, especialmente até 12 horas de crescimento fúngico. Os resultados sugerem ação inibitória sobre a adesão e formação de biofilme por Candida albicans quando da adição de nanopartículas de prata de tamanho 5 nm à resina acrílica nas concentrações de 0,05% e 0,5%.

Palavras-chave: Nanotecnologia. Polimetil Metacrilato. Candida albicans. Prata.

Takamiya AS. **Addition of silver nanoparticles to the poly (methyl methacrylate) – microbiological analysis** [dissertation]. Araçatuba: UNESP - São Paulo State University; 2010.

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 microorganism. 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 in 0.05%, 0.5% and 5% of concentration based on the polymer mass. After being processing, the specimens were sterilized by Co-60 radiation. The adhesion of cells of Candida albicans and the biofilm formation on the surface of the polymer were evaluated by light microscopy and SEM. The results demonstrated significantly reduction ($P < .05$) of the microorganisms adhesion on the surface of the nanocomposites for the groups containing 0.05 and 0.5% of silver nanoparticles with size of 5nm when compared to the control group. The light microscopy did not show difference in the biofilm formation among the groups evaluated. The SEM images suggested reduction of growth of Candida

albicans cells for the nanocomposite groups, mainly up to the period of 12 hours. It was concluded that the addition of silver nanoparticles with size of 5 nm to the PMMA in 0.05% and 0.5% concentrations showed antimicrobial effect against Candida albicans.

Key words: Nanotechnology. Polymethyl methacrylate. Candida albicans. Silver.

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 62
- 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 63
- 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, 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: 230Kx; **b)** os aglomerados em tonalidade esbranquiçada representam nanopartículas de prata com tamanho médio de 10 nm. Aumento: 120 Kx 64
- Figura 4** MET das nanopartículas de prata em campo claro (**a**) e escuro (**b**), em aumentos de 500Kx e 150Kx, respectivamente. Uma gota da solução coloidal de nanopartículas de prata nos tamanhos médios de 5 nm (**a**) e 10 nm (**b**) foi depositada sobre grades de cobre recobertas com filme fino de carbono para as tomadas micrográficas. Os pontos escuros indicam as nanopartículas de prata 65

Figura 5	Difratograma de raios-X das nanopartículas de prata em substrato de silício com seus planos de reflexão indexados	66
Figura 6	Gráfico dos postos médios referentes ao número de colônias para os grupos avaliados	67
Figura 7	Desenvolvimento de biofilme de <u>C. albicans</u> sobre as superfícies poliméricas imediatamente (t_0) e cerca de 15 segundos (t_1) após a remoção dos espécimes do meio de cultura ASD dos grupos: Controle; A) nanocompósitos com concentração de 0,05% de nanopartículas de prata; B) nanocompósitos com 0,5% e C) nanocompósitos com 5% de nanopartículas de prata	68
Figura 8	Imagens de MEV evidenciando desenvolvimento de biofilme de <u>C. albicans</u> sobre as superfícies poliméricas com 5 horas (t_1), 12 horas (t_2) e 24 horas (t_3) dos grupos: Controle; A) nanocompósitos com concentração de 0,05% de nanopartículas de prata; B) nanocompósitos com concentração de 0,5% de nanopartículas de prata; C) nanocompósitos com concentração de 5% de nanopartículas de prata	69
Figura 9	Imagens de MEV evidenciando desenvolvimento de <u>C. albicans</u> sobre as superfícies poliméricas com 5 horas (t_1), 12 horas (t_2) e 24 horas (t_3) dos grupos: Controle; A) nanocompósitos com concentração de 0,05% de nanopartículas de prata; B) nanocompósitos com concentração de 0,5% de nanopartículas de prata; C) nanocompósitos com concentração de 5% de nanopartículas de prata	70

ANEXOS	Materiais e Métodos, Resultados e Normas para publicação	
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, 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	75
Figura 6	a) Moldes em silicone fixados sobre uma lâmina de vidro; b) 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 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	77
Figura 9	a) Resina acrílica; 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	Termopolimerizadora Solab, utilizada para a polimerização dos espécimes de resina acrílica	80
Figura 12	Aspecto dos espécimes após desinclusão e acabamento, onde pode se verificar a superfície lisa dos mesmos. a) Espécimes com maior concentração de nanopartículas de prata (5%); b) espécimes do grupo controle	80
Figura 13	Espécimes embalados separadamente por grupo em papel grau cirúrgico. Aspecto após sua esterelização	81
Figura 14	<u>Candida albicans</u> cepa padrão ATCC 10231 liofilizada	81

Figura 15	a) Meio de cultura Agar Sabouraud Dextrose (ASD), Difco; b) meio de cultura Caldo Sabouraud com Dextrose (CSD), Difco	82
Figura 16	Espectrofotômetro UV/VIS 1800, utilizado para ajustar e padronizar a concentração de microorganismos nas suspensões para inoculação de meio de cultura.	83
Figura 17	Contador eletrônico de colônias CP 600 Plus, Phoenix, utilizado para a contagem de colônias	84
Figura 18	a) remoção dos espécimes estéreis do papel grau cirúrgico; b) colocação dos espécimes nos tubos de ensaio contendo CSD inoculado com <u>C. albicans</u> ; c) espécimes no interior de tubos de ensaio previamente à sua incubação em aerobiose por 24 horas	85
Figura 19	Espécime sendo lavado de forma breve em NaCl 0,9% uma vez em cada poço da placa de microtitulação, totalizando 5 poços, para remoção das células fúngicas fracamente aderidas	86
Figura 20	Espécime em tubo de ensaio com 10 mL de NaCl 0,9% estéril sendo agitado em vortex para desprendimento das células fúngicas aderidas à superfície polimérica	87
Figura 21	a) Meio ASD sendo inoculado com 3 alíquotas de 10 µL cada. O inóculo correspondeu a diluição 10 ⁻¹ da solução de NaCl 0,9% na qual o espécime foi agitado em vórtex para remoção das células aderidas em sua superfície; b) placa de Petri sendo inclinada para que as alíquotas escorressem e percorressem todo o diâmetro da placa	87
Figura 22	a) Meio ASD sendo vertido em placa de Petri; b) inserção do inóculo; c) inóculo sendo espalhado com alça de Drigalsky; d) posicionamento dos espécimes imediatamente após a inoculação do meio de cultura	88

Figura 23	Espécimes sobre o meio ASD inoculado após 48 horas de incubação a 37°C, previamente a análise por microscopia de luz. a) nanocompósitos com maior concentração de nanopartículas de prata (5%); b) espécimes do grupo controle	89
Figura 24	Microscópio de luz, Axiostar Plus, utilizado para análise do crescimento fúngico sobre a superfície dos espécimes de resina	89
Figura 25	a) Meio de cultura CSD em placa de microtitulação sendo inoculado para posterior adição dos espécimes; b) espécimes imersos em CSD inoculado previamente à incubação	90
Figura 26	a) Metalizador Balzers SCD-004 utilizado para o recobrimento áurico dos espécimes; b) espécimes sendo submetidos ao recobrimento com ouro para análise por MEV	91
Figura 27	Espécimes logo após o recobrimento com filme de ouro de 10 nm de espessura	92
Figura 28	Microscópio Eletrônico de Varredura XL30 TMP, Philips utilizado para análise do crescimento de microorganismos na superfície polimérica em diferentes tempos	92

- Figura 29** Imagens obtidas através da MEV com modos de análises *Scanning electrons* (SE) e *Backscattering electrons* (BSE). No modo BSE a imagem é gerada pela emissão de elétrons retroespalhados e demonstra diferenças composicionais na região selecionada da amostra. As imagens evidenciam a superfície do nanocompósito com pouco crescimento fúngico e grande quantidade de regiões com aglomerados de pontos mais claros, sendo um indicativo da presença de cálcio nessas regiões. **A)** nanocompósito com nanopartículas de tamanho 5 nm e concentração 0,05% (12 horas); **B)** nanocompósito com nanopartículas de tamanho 10 nm e concentração 0,05% (12 horas) 101
- Figura 30** Imagens de MEV evidenciando presença de poros e/ou defeitos na superfície do nanocompósito com concentração de 5% de nanopartículas, e a localização de células de C. albicans no interior e adjacentes a essas áreas. **A)** nanocompósito com nanopartículas de tamanho 10 nm; **B)** nanocompósito com nanopartículas de tamanho 5 nm 102
- Figura 31** Presença de células de C. albicans na forma de hifas e pseudohifas na superfície do nanocompósito. **A)** nanocompósito com concentração de 5% de nanopartículas de prata com tamanho 10 nm; **B)** nanocompósito com concentração de 0,5% de nanopartículas de prata com tamanho 10nm 103

LISTA DE TABELAS

Anexo	Resultados	
Tabela 1	Média do número de colônias e UFC/mL de cada espécime analisado do grupo controle	93
Tabela 2	Média do número de colônias e UFC/mL de cada espécime analisado do grupo de nanocompósito com concentração de 0,05% de nanopartículas com tamanho médio de 5 nm	94
Tabela 3	Média do número de colônias e UFC/mL de cada espécime analisado do grupo de nanocompósito com concentração de 0,05% de nanopartículas com tamanho médio de 10 nm	95
Tabela 4	Média do número de colônias e UFC/mL de cada espécime analisado do grupo de nanocompósito com concentração de 0,5% de nanopartículas com tamanho médio de 5 nm	96
Tabela 5	Média do número de colônias e UFC/mL de cada espécime analisado do grupo de nanocompósito com concentração de 0,5% de nanopartículas com tamanho médio de 10 nm	97
Tabela 6	Média do número de colônias e UFC/mL de cada espécime analisado do grupo de nanocompósito com concentração de 5% de nanopartículas com tamanho médio de 5 nm	98

Tabela 7	Média do número de colônias e UFC/mL de cada espécime analisado do grupo de nanocompósito com concentração de 5% de nanopartículas com tamanho médio de 10 nm	99
Tabela 8	Análise estatística com teste de Teste de Kruskal – Wallis	100

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	= Ângstrom
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
OD	= Densidade óptica
BSE	= Backscattering electrons
SE	= Scanning electrons

SUMÁRIO

1. Introdução	35
2. Materiais e Métodos	38
3. Resultados	46
4. Discussão	49
5. Conclusão	56
Referências	57
Anexos	71
Anexo A – Materiais e Métodos	72
Anexo B – Resultados	93
Anexo C – Normas para publicação	104

1. Introdução*

Candida albicans e outras espécies de Candida são componentes comuns da microflora humana intestinal e oral (1-4). Sobre certas condições predisponentes esses microorganismos podem se converter em patógenos oportunistas que causam doenças superficiais e 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 candidíase oral pode ser classificada em primária e secundária. A forma primária se divide em aguda, crônica e lesões associadas à Candida. Dentro da forma aguda há a candidíase pseudomembranosa e a eritematosa, a forma crônica pode ser dividida em hiperplásica e eritematosa, e entre as lesões associadas à 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 o nível 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).

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

De maneira geral, o desenvolvimento de um biofilme envolve quatro etapas: primeiro ocorre a adesão dos microorganismos à superfície; depois, uma formação discreta 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 células (19-21). Uma vez estabelecido o biofilme sobre próteses, implantes ou cateteres, os microorganismos começam a apresentar características únicas, como a resistência a agentes antimicrobianos (12,20,22).

Atualmente, os agentes antimicrobianos mais utilizados nos tratamentos de infecções fúngicas são aqueles baseados em polieno (anfotericina B), triazol (fluconazol, itraconazol, voriconazol, posaconazol) ou equinocandinas (caspofungina, micafungina, anidulafungina) (23) e nistatina (5). Entretanto, a administração desses antifúngicos é frequentemente acompanhada de várias complicações como a toxicidade e as interações medicamentosas (23).

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 vírus (24-26), 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 microorganismos é menor (22,23,25).

Nanopartículas são partículas menores que 100 nm (28) 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, etc (28).

Estudos têm mostrado que nanopartículas de Ag possuem potencial antimicrobiano contra bactérias e fungos (22,23,25,27,29-34). Kim KJ et al. (22) 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 fúngica (22).

As nanopartículas de Ag 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 (25,35). 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. Dessa forma, o objetivo do presente estudo foi verificar a atividade antimicrobiana de uma resina acrílica à base de PMMA contendo nanopartículas de Ag frente ao microorganismo Candida albicans.

A hipótese nula testada foi de que não haveria diferença estatisticamente significativa entre a adesão fúngica na superfície da resina acrílica contendo nanopartículas de Ag e a adesão sobre a superfície da resina acrílica sem a adição destas nanopartículas, independentemente da concentração e do tamanho das nanopartículas adicionadas a este polímero.

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. (36) Nanopartículas de Ag coloidal foram sintetizadas através da redução de íons (Ag^+) 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 Ag (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 (5 e 10 nm) foram confirmadas a partir de imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) e de transmissão (MET) (microscópio eletrônico FEG-VP Supra 35, Carl Zeiss, Jena, Turíngia, Alemanha).

2.2. Preparação do nanocompósito PMMA/Ag

Para obtenção dos espécimes foram confeccionados moldes de silicone para inclusão (Zetalabor, Zhermack SpA, Badia Polesine, Rovigo, Itália) com auxílio de uma matriz metálica com medidas compatíveis com a do futuro espécime (10 mm de diâmetro e 3 mm de espessura).

A resina acrílica utilizada foi a Lucitone 550 (Dentsply Ind. e Com. Ltda, Petrópolis, Rio de Janeiro, Brasil) proporcionada de acordo com as instruções do fabricante (4g de pó e 1,9 mL de líquido). As soluções coloidais de nanopartículas de Ag foram adicionadas ao componente líquido da resina acrílica nas proporções de 0% (0 μ L), 0,05 (2 μ L); 0,5 (20 μ L); e 5% (200 μ L) v/v, com auxílio de uma pipeta automática (Socorex Isba S/A, Ecublens, Lausanne, Suíça), com base na massa do componente sólido da resina acrílica (4g).

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 n^o 6, Dentária Campineira Ltda, Campinas, São Paulo, Brasil) entre duas placas de vidro que garantiu uma superfície lisa na parte superior e inferior dos espécimes. 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 grupos estudados foram formados de acordo com a concentração e o tamanho de nanopartículas de Ag adicionadas à resina. Os ensaios microbiológicos de adesão foram realizados em triplicata e em três vezes independentes (n = 10). Para cada grupo foram confeccionados 30 espécimes para o ensaio de adesão, 1 espécime para a análise do crescimento fúngico sobre a superfície polimérica através MEV e 1 espécime para análise por microscopia de luz.

Posteriormente à desinclusão, os espécimes foram submetidos a acabamento para remoção de irregularidades ao redor do seu diâmetro com fresa de tungstênio (mini cut). Após o acabamento foram realizadas três mensurações do diâmetro e da altura dos espécimes que foram submetidos ao ensaio de adesão, com auxílio de um paquímetro digital (Paquímetro Digital Absolute Digimatic, Mitutoyo Sul Americana Ltda, Santo Amaro, São Paulo, Brasil). A média da altura dos espécimes foi de 3,6 cm com coeficiente de variação = 20,2, e a média do diâmetro foi de 9,7 cm com coeficiente de variação = 39,3.

Previamente aos ensaios microbiológicos os espécimes foram esterilizados através de um ciclo de radiação com uma fonte de Co-60 tipo “Gammacell 220” com dose de 25kGy.

2.3. Candida albicans e condições de crescimento

A cepa de Candida albicans utilizada neste estudo foi proveniente da American Type Culture Collection (ATCC 10231) e obtida do Instituto Adolfo Lutz – Divisão de Biologia Médica, São Paulo, SP, Brasil. Ela foi ativada em meio Ágar Sabouraud Dextrose (ASD) (Agar Sabouraud Dextrose, Becton Dickinson France SAS, Le Pont de Claix, France) por incubação a 37°C por 48

horas após ser suspensa em solução de NaCl 0,9% (Merck KGaA, Darmstadt, Hesse, Alemanha).

Para todos os ensaios, o microorganismo foi utilizado com 24 horas de crescimento após sua reativação em ASD a 37°C. As células fúngicas eram, então, suspensas em solução de NaCl 0,9% e ajustadas a uma concentração $1,1 \times 10^5$ UFC/mL (densidade óptica (OD) de 0,024) para os ensaios de adesão e a $1,1 \times 10^7$ UFC/mL (OD 0,951) para os ensaios de desenvolvimento de biofilme sobre a resina acrílica, em comprimento de onda de 530 nm com auxílio de um espectrofotômetro UV/Vis (Espectrofotômetro UV – 1800, Shimadzu Corporation, Nakagyo-Ku, Kyoto, Japão).

2.4. Ensaio de adesão do microorganismo Candida albicans à superfície polimérica

Os espécimes de resina acrílica estéreis foram adicionados a tubos de ensaio contendo 9,9 mL de meio de cultura Caldo Sabouraud com Dextrose (CSD) (Sabouraud Caldo Dextrose, Becton Dickinson France SAS, Le Pont de Claix, France) inoculado com 0,1 mL de suspensão de Candida albicans em solução de NaCl 0,9%, com concentração de $1,1 \times 10^7$ UFC/mL com OD_{0,951} em comprimento de onda de 530 nm. A concentração de microorganismos no meio de cultura foi ajustada assim, a $1,1 \times 10^5$ UFC/mL previamente à adição dos espécimes. O conjunto meio de cultura inoculado e espécime foi então incubado a 37°C por 24 horas em condições de aerobiose.

Após esse período, os espécimes foram removidos do meio caldo e lavados de forma breve por cinco períodos através da imersão em solução de NaCl 0,9% estéril contida em placas de microtitulação com 12 poços

(TPP) Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Suíça). Esse procedimento de lavagem foi realizado para remoção de microorganismos fracamente aderidos à superfície da resina.

A seguir, os espécimes foram introduzidos em tubos de ensaio contendo 10 mL de solução NaCl 0,9%, e foram agitados em vortex (Agitador de tubos Vortex AP 56, Phoenix Indústria e Comercio de Equipamentos Científicos Ltda, Araraquara, São Paulo, Brasil) durante 1 minuto, deixados em repouso por 9 minutos e em seguida foram novamente agitados por 1 minuto, a fim de desprender os microorganismos aderidos à superfície da resina. A partir desse inóculo obtido com os microorganismos que estavam aderidos à superfície do espécime de resina, obteve-se diluições de 10^{-1} que foram utilizadas para a determinação da adesão microbiana ao PMMA/Ag por meio da contagem de colônias.

Os testes foram realizados em triplicata para cada espécime e seguiu-se a técnica utilizada pelo Grupo de Pesquisa em Biofilme do Departamento de Engenharia Biológica da Universidade do Minho, Braga, Portugal. Para isto, em cada placa de Petri contendo meio de cultura ASD foram adicionadas em uma extremidade e equidistantes entre si três alíquotas 10 μ L do inóculo diluído a 10^{-1} . A placa de Petri foi em seguida inclinada para que os 10 μ L da solução do inóculo escorressem linearmente e percorressem toda extensão do diâmetro da placa. O número de células foi contado nessas três fileiras, de forma que cada fileira foi considerada como uma placa inoculada individualmente.

A triplicata em três placas separadas foi realizada com 100 μ L do inóculo na diluição 10^{-1} de alguns grupos selecionados aleatoriamente para a comparação das duas técnicas e comprovação da concordância entre elas.

Após a inoculação das placas, as mesmas foram incubadas à 37° C por 48 horas em condições de aerobiose, e posteriormente a este período foi realizada a contagem do número de colônias, com auxílio de um contador de colônias eletrônico (Contador de colônias eletrônico CP 600 Plus, Phoenix Indústria e Comércio de Equipamentos Científicos Ltda, Araraquara, São Paulo, Brasil).

2.5. Avaliação do desenvolvimento de biofilme por Candida albicans sobre a superfície polimérica

As células de Candida albicans suspensas em solução de NaCl 0,9% foram ajustadas a concentração de $1,1 \times 10^5$ UFC/mL em espectrofotômetro UV/Vis ($OD_{0,024}$) com comprimento de onda 530 nm. Cem microlitros dessa suspensão foram semeados com auxílio de uma alça de Drigalsky em ASD. Imediatamente após a inoculação, os espécimes foram posicionados sobre a superfície do meio de cultura exercendo-se sobre eles uma pequena pressão. Em seguida, os espécimes sobre o meio de cultura foram então incubados a 37°C por 48 horas em condições de aerobiose.

Após esse período de incubação, os espécimes foram removidos do meio ASD e analisados por um único examinador em microscópio de luz (Microscópio Axiostar Plus, Carl Zeiss de México S. A. de C. V., Santa Catarina, Coyoacan, México) para observação do padrão de desenvolvimento de biofilme sobre a superfície polimérica.

2.6. Análise do desenvolvimento de biofilme por Candida albicans sobre a superfície do polímero através de microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Um espécime de cada grupo foi analisado por MEV (Microscópio eletrônico XL30 TMP, Philips, Eindhoven, Netherlands). Para isso, os espécimes foram incubados de maneira semelhante ao ensaio de adesão. Após os períodos de 5, 12 e 24 horas de incubação a 37°C, os espécimes foram lavados em PBS para remoção de microorganismos fracamente aderidos e imersos em glutaraldeído 2,5% (Merck KGaA, Darmstadt, Hesse, Alemanha) à temperatura de 4°C por 2 horas. Em seguida, foram novamente lavados em PBS por 3 períodos de 5 minutos cada um. A desidratação dos espécimes foi realizada com imersão dos mesmos em concentrações seriadas de álcool 70%, 95% por 10 minutos e três imersões em álcool 100% por 10 minutos cada. Os espécimes foram então imersos em hexametildesilazane 98% (Merck KGaA, Darmstadt, Hesse, Alemanha) por dois períodos de 20 segundos e secos à temperatura ambiente.

Em seguida, os espécimes foram fixados em *stubs*, submetidos a metalização (Metalizador, Balzers SCD-004, Liechtenstein, Germany) áurica para obtenção de uma cobertura com um filme de Au de 10 nm de espessura e analisados em MEV. As imagens de cada espécime foram capturadas em diferentes aumentos e regiões para a caracterização das células de Candida albicans nos grupos e períodos de tempo avaliados.

2.7. Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando o software StatView Version 5.0.1 (SAS Institute Inc. Cary, NC, USA) e o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis foi aplicado para comparar o número de UFC/mL dos grupos em que foram incorporadas nanopartículas de Ag com o grupo controle. O valor de $P < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

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 (Figura 1). O espectro de absorção UV/Vis do colóide mostrou uma banda plasmon característica de nanopartículas de Ag, 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 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 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 Ag, respectivamente.

3.2. Ensaio de adesão do microorganismo Candida albicans à superfície polimérica

Os resultados indicaram que a adição da solução coloidal contendo nanopartículas de Ag à resina acrílica nas concentrações de 0,05% e 0,5% com tamanho 5 nm diminuiu a adesão de microorganismos à superfície da resina ($P < 0,05$), entretanto a adição de 5% de colóide com partículas de 5 nm à resina não reduziu a adesão microbiana quando comparado com o grupo controle. Para as nanopartículas de Ag com tamanho médio de 10 nm a adição das três

concentrações diferentes (0,05%, 0,5% e 5%) à resina não alterou a adesão de microorganismos (Figura 6).

3.3. Avaliação do desenvolvimento de biofilme por Candida albicans sobre a superfície polimérica

As imagens de microscopia de luz sugeriram que não houve diferença entre o crescimento fúngico na superfície da resina acrílica (controle – sem adição de nanopartículas) e na superfície dos espécimes de nanocompósito, independentemente da concentração e do tamanho das nanopartículas adicionadas à resina (Figura 7).

3.4. Análise do desenvolvimento de biofilme por Candida albicans sobre a superfície do polímero através de microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Foram avaliados através de MEV um espécime de cada grupo nos diferentes tempos de crescimento do microorganismo Candida albicans (5, 12 e 24 horas). Em todos os tempos avaliados, as imagens mostraram que independentemente do tamanho e da concentração de nanopartículas houve uma redução no crescimento de microorganismos na superfície do nanocompósito quando comparados com o grupo controle (resina acrílica sem adição de nanopartículas) (Figuras 8 e 9). Embora nos grupos dos nanocompósitos tenha sido observado um crescimento maior de microorganismos com 24 horas, esse crescimento foi localizado somente em algumas regiões, diferentemente do controle onde se notou um grande número de microorganismos cobrindo praticamente toda a superfície do espécime e com um biofilme mais espesso.

Ainda, com relação ao tempo de formação do biofilme de Candida albicans, as fotomicrografias mostraram que não houve grande diferença na quantidade de células recobrindo os espécimes dos grupos contendo nanopartículas de Ag entre os tempos de 5 e 12 horas, o que contrariamente ocorreu no grupo controle onde houve maior concentração de microorganismos para o tempo de 12 horas.

Com relação à concentração de nanopartículas, foi possível observar que os grupos com concentração 5% apresentaram um menor crescimento de microorganismos na superfície independentemente do tamanho das partículas, especialmente nos tempos 5 e 12 horas(Figuras 8 e 9).

4. Discussão

O presente trabalho analisou o efeito antimicrobiano de uma resina acrílica para base protética contendo nanopartículas de Ag sobre o microorganismo Candida albicans. Foram avaliados a adesão de células de Candida albicans à superfície do nanocompósito PMMA/Ag, e o padrão de desenvolvimento de biofilme desse microorganismo sobre a superfície polimérica, tanto através de microscopia de luz como através de MEV. A hipótese nula inicial de que a adição de nanopartículas de Ag à resina acrílica não alteraria a adesão de Candida albicans na superfície polimérica, independentemente do tamanho e concentração de nanopartículas adicionadas, foi rejeitada.

Os resultados obtidos com o ensaio de adesão mostraram que a incorporação de nanopartículas de Ag ao PMMA reduziu a adesão de Candida albicans à superfície da resina acrílica de maneira estatisticamente significativa para os grupos com partículas de tamanho 5 nm e concentrações de 0,05% e 0,5%, em relação ao grupo controle. 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 microorganismos à superfície, sendo a rugosidade e a hidrofobicidade características dominantes neste sentido (3,15). No presente trabalho, a rugosidade de superfície dos espécimes de resina acrílica foi controlada, uma vez que as superfícies 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 da superfície dos espécimes, o que poderia ser um indicativo de alteração da topografia de superfície, que conseqüentemente pode ter interferido na adesão microbiana impedindo uma redução significativa da adesão nos grupos em que foi adicionado 5% de colóide de nanopartículas, especialmente para grupo com partículas de tamanho 5 nm.

Ainda, frente a esses resultados, supomos que pode haver uma concentração limite de nanopartículas de Ag capaz de causar inibição da adesão microbiana, e que a adição de concentrações superiores pode não promover os efeitos esperados ou mesmo causar um aumento da adesão de microorganismos ao polímero.

O processo de adesão in vivo de Candida spp à resina acrílica 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 celular fúngica, a energia livre de superfície da resina acrílica envolvendo forças eletrostáticas de atração e repulsão, interferem na adesão e colonização por Candida spp (2,3,6,9,37).

Também, a hidrofobicidade do substrato é considerada significativa no processo de adesão inicial do fungo e até mesmo no desenvolvimento do biofilme sobre superfícies poliméricas (3,2,15,17,26). A presença das nanopartículas de Ag pode ter alterado as características físico-químicas da superfície do nanocompósito PMMA/Ag interferindo na hidrofobicidade da resina. Bürgers et al. (26) ao incorporar micropartículas de Ag a uma resina composta observou que essas micropartículas tornaram a resina mais hidrofóbica e esta hidrofobicidade foi ainda superior com o aumento da concentração de partículas de Ag.

Contrariamente, Dhir et al. (10) ao adicionar uma carga aniônica (monômero com radicais fosfato) ao PMMA observaram um aumento da hidrofília do material, apesar de não testarem 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 hidrofobicidade do nanocomposto, principalmente nos grupos com maior concentração de nanopartículas.

A maior adesão fúngica à superfície do nanocomposto 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).

Buscando-se evitar este comportamento de aglomeração das partículas no interior do polímero, a solução coloidal foi desidratada para permitir uma melhor distribuição e dispersão na massa polimérica. Entretanto, com esse procedimento obtivemos um pó com coloração cinza escuro, o que impossibilitou a sua utilização por comprometer a estética da resina acrílica utilizada como base protética.

O mecanismo de ação antimicrobiana da Ag, especificamente na forma de nanopartículas, ainda não é bem claro na literatura. Alguns trabalhos relatam 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). Ainda, outros estudos sugerem que a Ag por apresentar um tamanho nanométrico, penetraria através da membrana celular do microorganismo e alteraria seu metabolismo celular, podendo levar a célula a morte (22,25). Entretanto, em um estudo de incorporação de nanopartículas de Ag à resina acrílica, Monteiro DR. (32) observou ausência de liberação de Ag, seja ela na forma iônica ou em nanopartícula, mesmo após 120 dias de imersão do nanocompósito em água deionizada e saliva artificial. Esse fato poderia corroborar com a ação antimicrobiana não tão efetiva como era esperada de um polímero contendo nanopartículas de Ag, uma vez que seria necessário sua liberação do interior do polímero para posterior ação, seja diretamente na membrana, agindo de forma fungicida, ou no interior da célula, atuando com ação fungicida ou fungistática (22,25).

Trabalhos na literatura também relatam que o tamanho das nanopartículas de Ag interfere em sua ação antimicrobiana (22,38). Em nosso estudo, não foi observado diferença entre o grupo controle e todos os grupos experimentais com nanopartículas com tamanho de 10 nm. Apesar do tamanho médio das nanopartículas de 10 nm não ser muito superior ao de 5 nm, seria oportuno considerar a possibilidade de ter ocorrido uma maior dificuldade de penetração das nanopartículas com 10 nm nas células fúngicas, o que poderia explicar a redução de sua efetividade. Esse fato foi comprovado em estudos não publicados por nosso grupo de pesquisa, onde se testou as soluções coloidais puras por meio

da formação de halos de inibição. Naquela oportunidade, também foi testada uma solução coloidal de nanopartículas de Ag com tamanho médio de 60 nm e a mesma foi menos efetiva em relação a formação de halo de inibição quando comparada com as soluções de 10 e 5nm. Dessa forma, embora a taxa de liberação tenha sido provavelmente semelhante e mínima para ambos os tamanhos das nanopartículas, a maior efetividade antimicrobiana do nanocompósito contendo nanopartículas de menor tamanho poderia estar relacionada com sua maior facilidade de penetração na célula de Candida albicans.

Embora as células fúngicas eucarióticas apresentem paredes celulares que promovem proteção química e mecânica contra drogas antifúngicas (2) e as mesmas serem mais complexas que as células procarióticas bacterianas (23) o estudo de Morone et al. (38) pode reforçar nosso pensamento citado anteriormente. Em seu estudo observaram que nanopartículas de Ag com tamanhos inferiores a 10 nm apresentaram uma ação mais direta na penetração da membrana das bactérias (38).

Outra provável explicação para a redução da adesão de Candida albicans, especialmente para os grupos de concentrações 0,05 e 0,5% com tamanho de 5nm, seria a alteração metabólica da célula fúngica promovida pelo estresse causado somente pela presença das nanopartículas de Ag (39) na superfície do nanocompósito. Como a vida celular é incompatível com circunstâncias que perturbem o balanço de energia por períodos extensos, sob condições estressantes espera-se que os sistemas biológicos decaiam a um estado de entropia máxima, que geralmente é definido como morte termodinâmica, em que se observa um estado de equilíbrio onde nenhuma energia é liberada (39).

Sabe-se que alterações da proporção [ATP] / [ADP] celular, que podem ser causadas por mudanças nas condições ambientais afetam o metabolismo de bactérias (39). Ainda, a respiração fúngica sofre interferências quando as células são expostas a drogas baseadas em metais (40). Assim, a presença da Ag na forma de nanopartículas na superfície do espécime pode ter alterado a proporção [ATP] / [ADP] da célula fúngica por um período considerado longo e levado às células de Candida albicans a um estado de entropia máxima, o que explicaria a redução da adesão fúngica ao nanocompósito PMMA/Ag naqueles grupos.

As imagens de microscopia de luz obtidas no presente estudo, não mostraram diferenças no crescimento fúngico sobre os espécimes independentemente do tamanho das nanopartículas e da concentração de colóide adicionada à resina. Contudo, as imagens de MEV evidenciaram que os grupos experimentais contendo nanopartículas de Ag apresentaram menor número e volume de células formadas sobre sua superfície, especialmente nos nanocompósitos com maior concentração de Ag. Esse fato poderia ser explicado pelo tipo de meio de cultura utilizado para o crescimento das células de Candida albicans e o maior tempo para a maturação do biofilme no caso dos espécimes onde foi realizada a análise da microscopia de luz (48 horas).

Apesar do presente trabalho ter avaliado a ação antimicrobiana de uma única resina acrílica para base protética contendo nanopartículas de Ag frente apenas uma espécie de microorganismo, foi possível observar a efetividade deste nanocompósito na redução do número de células de Candida albicans aderidas. Esse estudo apresentou limitações especialmente quanto a maneira e mesmo quanto a concentração mais adequada de nanopartículas de Ag a serem acrescentadas ao polímero. Ainda, a forma que essas nanopartículas se

encontravam, ou seja, dispersas em solução aquosa, também pode ter limitado a ação antimicrobiana dos nanocompósitos PMMA/Ag devido a sua homogeneização inadequada na massa polimérica. Assim, acreditamos que o mérito do presente trabalho esteja especialmente relacionado com o direcionamento de pesquisas futuras para se buscar uma forma mais adequada de apresentação e inserção dessas nanopartículas a polímeros a base de PMMA. O desenvolvimento de nanopartículas na forma de pó e até mesmo um processamento do nanocompósito para favorecer a localização destas partículas próximas a superfície polimérica seriam sugestões para outros trabalhos para que essas principais limitações fossem superadas.

Outras pesquisas avaliando-se a efetividade antimicrobiana somente das nanopartículas de Ag sobre biofilmes simples e/ou compostos e em estágios iniciais e de maturação dos mesmos também seriam oportunas para obtenção de um material polimérico com melhores propriedades antimicrobianas.

5. Conclusão

O presente estudo mostrou que a incorporação de nanopartículas de Ag à resina acrílica reduziu a adesão fúngica para os grupos com partículas de tamanho 5 nm e concentrações de 0,05% e 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-Jørgensen 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, Pucek 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, Chevolut 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, Pucek 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 prata 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) 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.
- (36). 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.
- (37). 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.
- (38) Morones JR, Elechiguerra JL, Camacho A, Holt K, Kouri J, Ramirez JT. The bactericidal effect of silver nanoparticles. *Nanotechnology* 2005;16:2346-53.
- (39) Minsky A, Shimoni E, Frenkiel-Krispin D. Stress, order and survival. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002;3:50-60.
- (40) 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.

Figuras

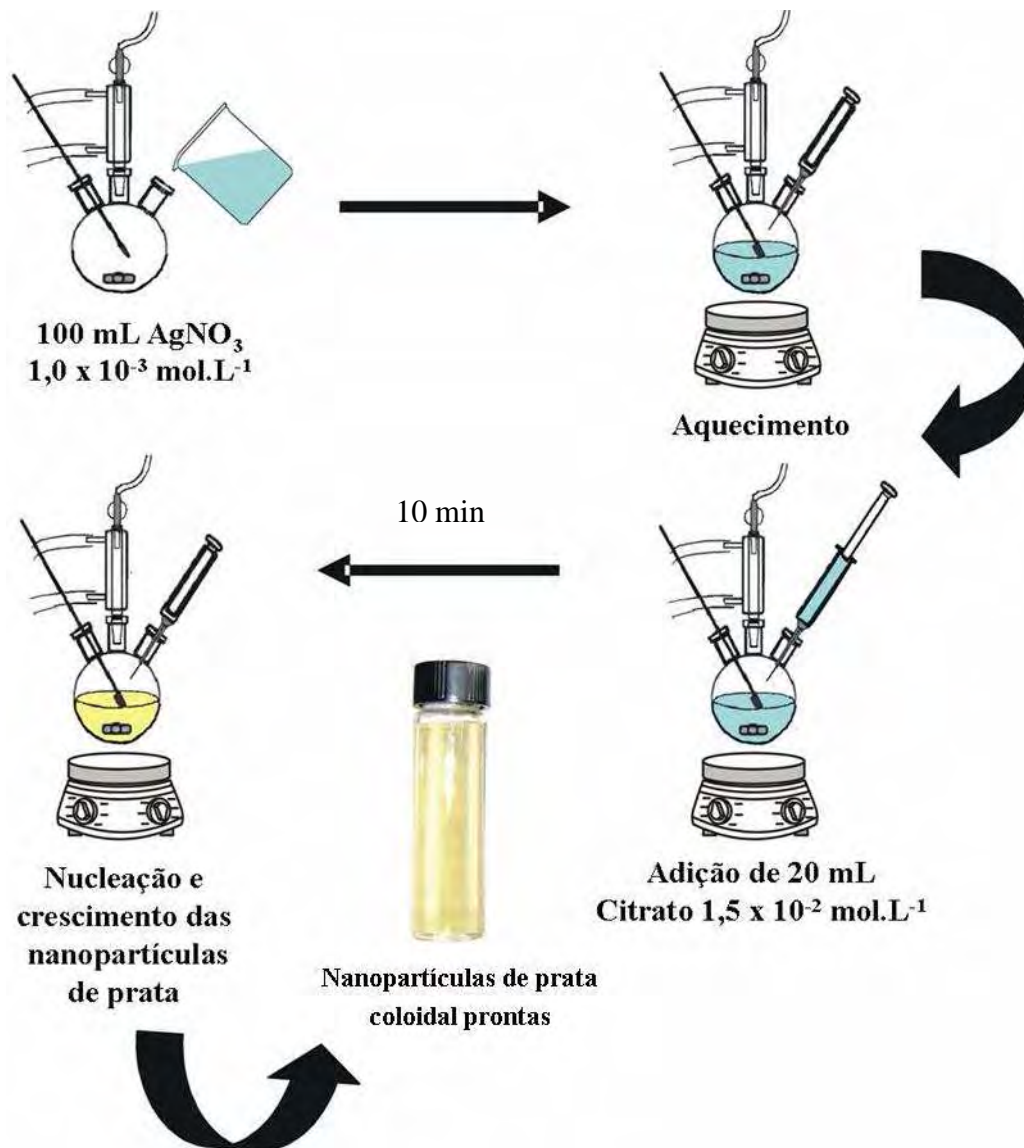


Figura 1. Ilustração esquemática da síntese de nanopartículas de prata na forma coloidal por meio da redução dos íons prata do nitrato de prata pelo citrato de sódio.

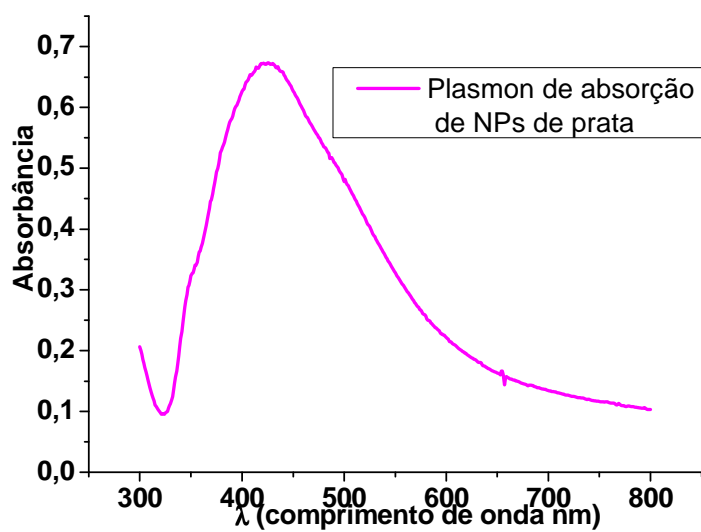


Figura 2. Gráfico de absorbância versus comprimento de onda do colóide obtido a partir da reação de redução da prata pelo citrato de sódio na temperatura de 97°C. O gráfico mostra a banda plasmon de absorção característica de nanopartículas de prata.

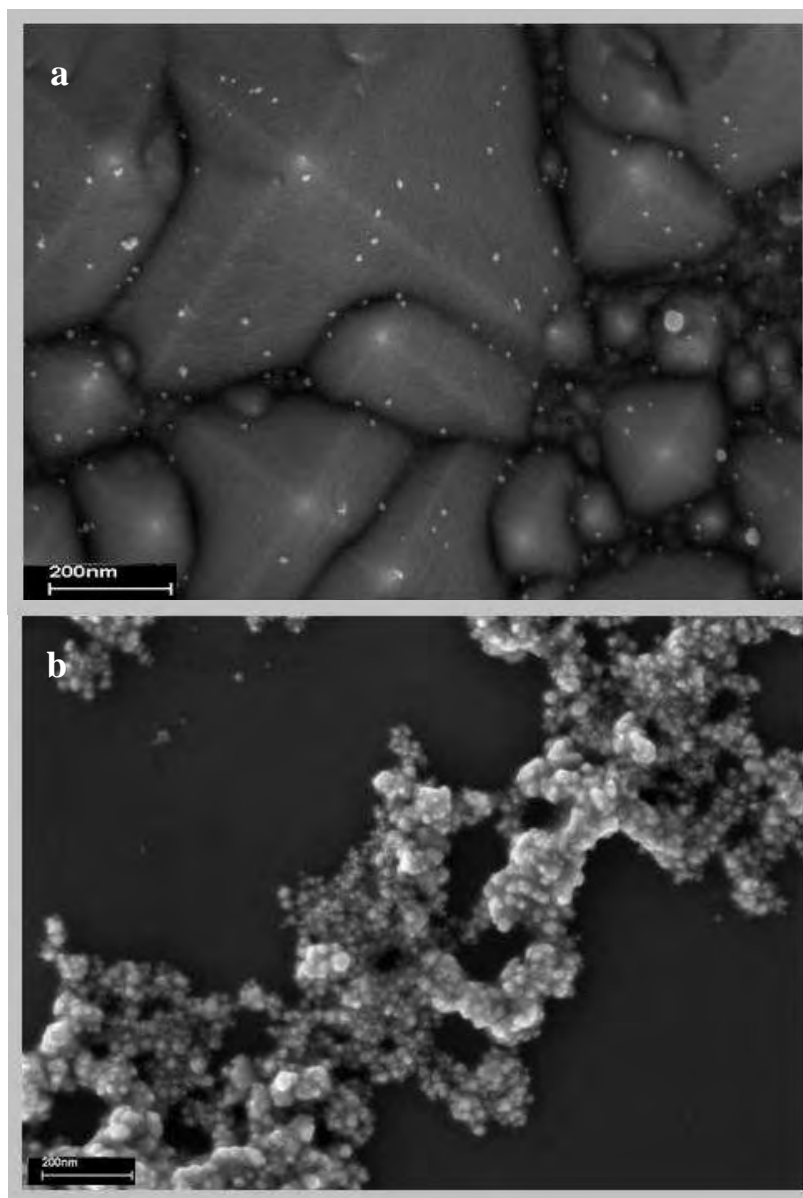


Figura 3. MEV das nanopartículas de prata sintetizadas via redução dos íons prata do nitrato de prata pelo citrato. O substrato de silício foi degradado por KOH por 2 horas, a prata coloidal foi depositada sobre o substrato e secada para se obter a imagem. Essa técnica ilustra claramente a forma e o tamanho das nanopartículas de prata. **a)** os pontos claros representam nanopartículas de prata com tamanho médio de 5 nm. Aumento: 230Kx; **b)** os aglomerados em tonalidade esbranquiçada representam nanopartículas de prata com tamanho médio de 10 nm. Aumento: 120 Kx.

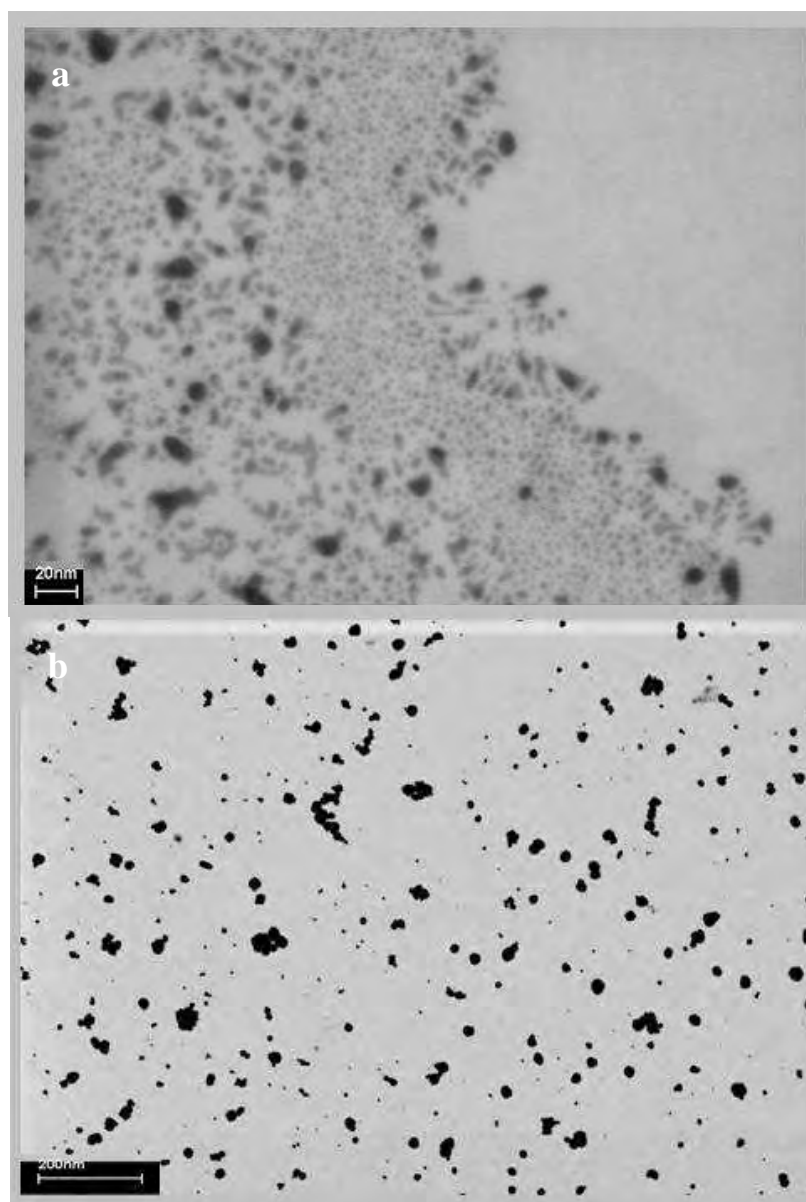


Figura 4. MET das nanopartículas de prata em campo claro (a) e escuro (b), em aumentos de 500Kx e 150Kx, respectivamente. Uma gota da solução coloidal de nanopartículas de prata nos tamanhos médios de 5 nm (a) e 10 nm (b) foi depositada sobre grades de cobre recobertas com filme fino de carbono para as tomadas micrográficas. Os pontos escuros indicam as nanopartículas de prata.

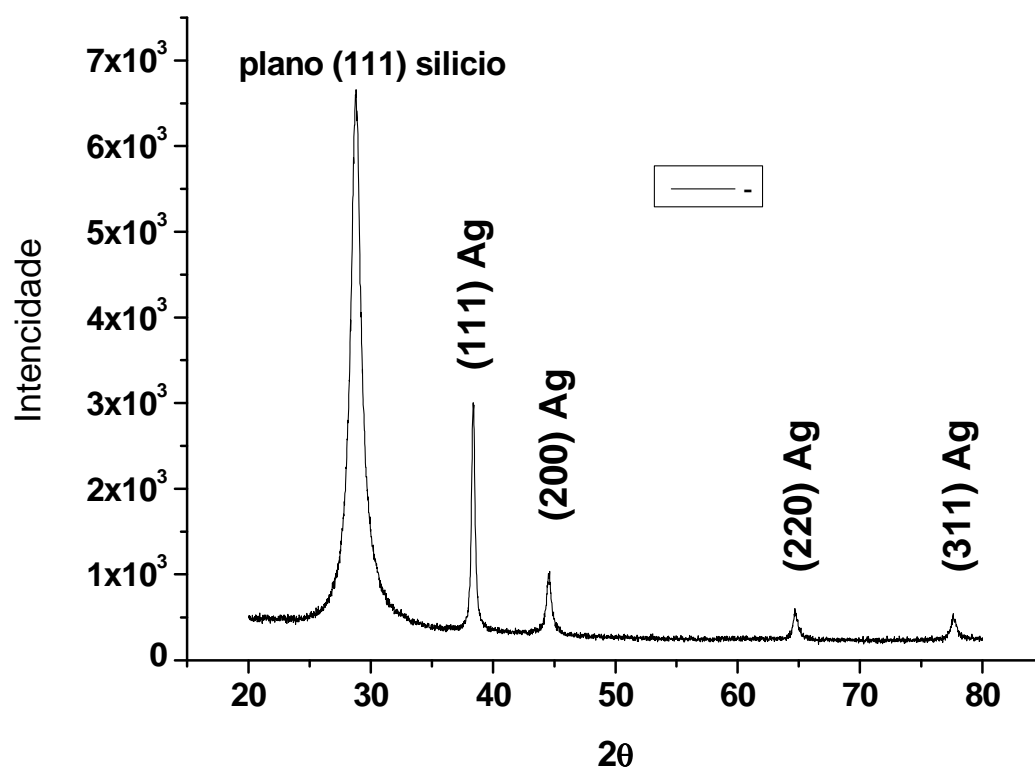


Figura 5. Difratoograma de raios-X das nanopartículas de prata em substrato de silício com seus planos de reflexão indexados.

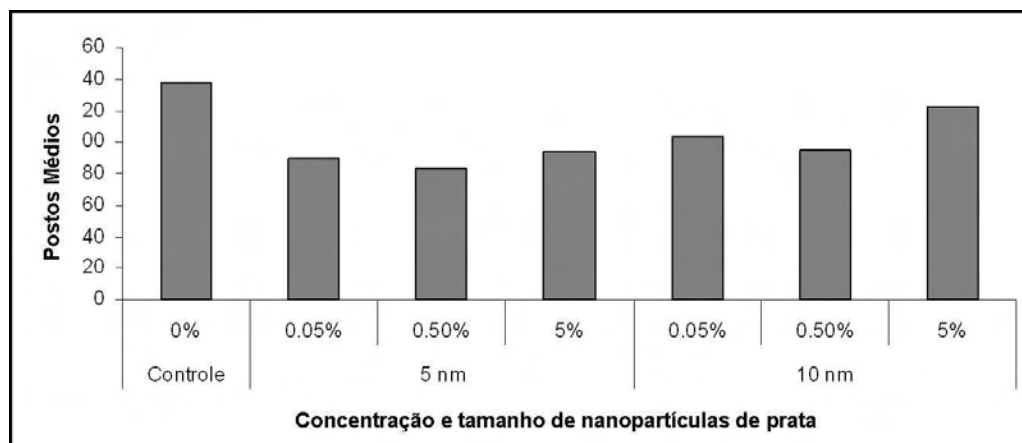


Figura 6. Gráfico dos postos médios de UFC/mL referentes ao número de colônias para os grupos avaliados.

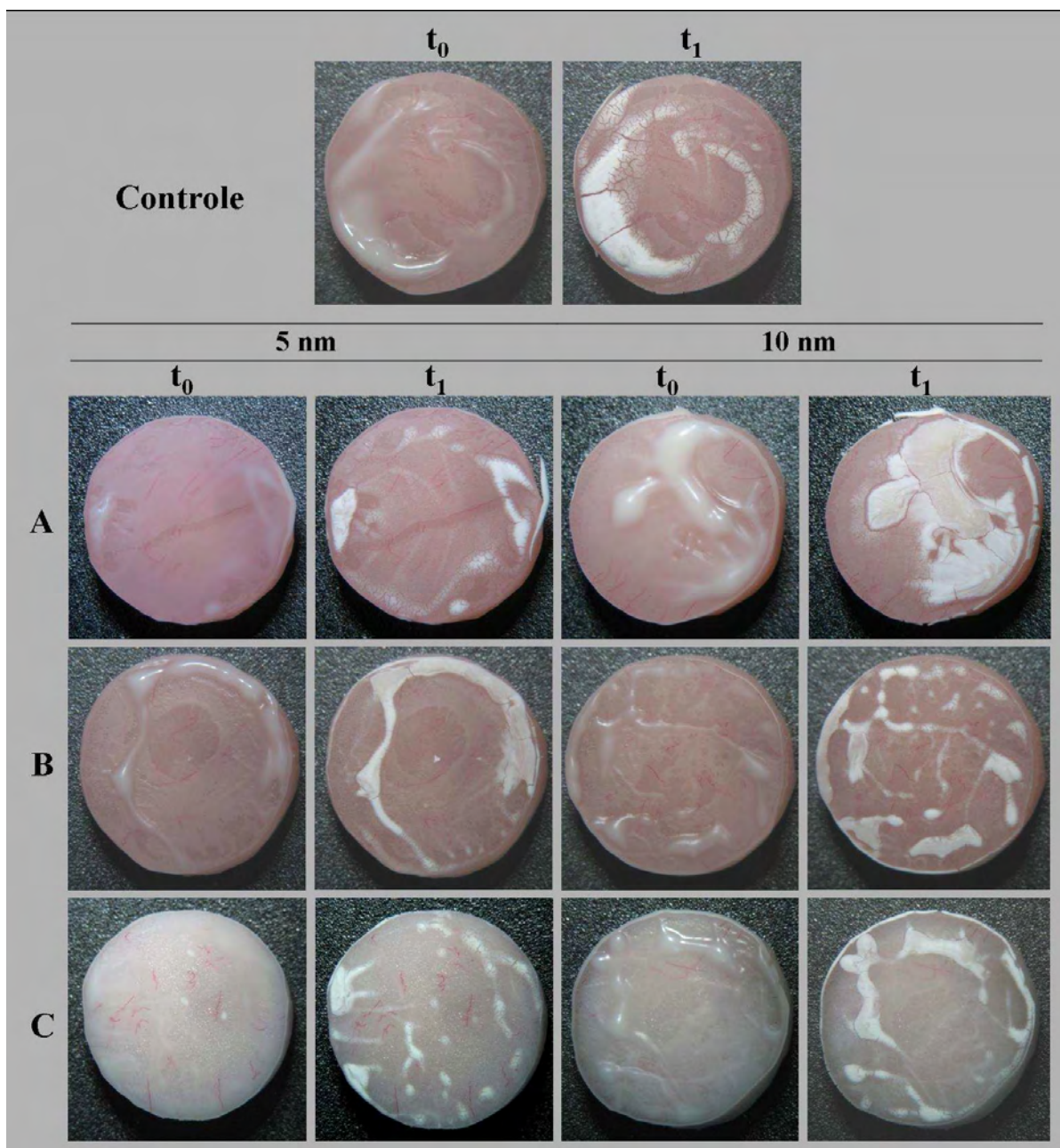


Figura 7. Desenvolvimento de biofilme por *C. albicans* sobre as superfícies poliméricas imediatamente (t_0) e cerca de 15 segundos (t_1) após a remoção dos espécimes do meio de cultura ASD dos grupos: Controle; **A)** nanocompósitos com concentração de 0,05% de nanopartículas de prata; **B)** nanocompósitos com 0,5% e **C)** nanocompósitos com 5% de nanopartículas de prata.

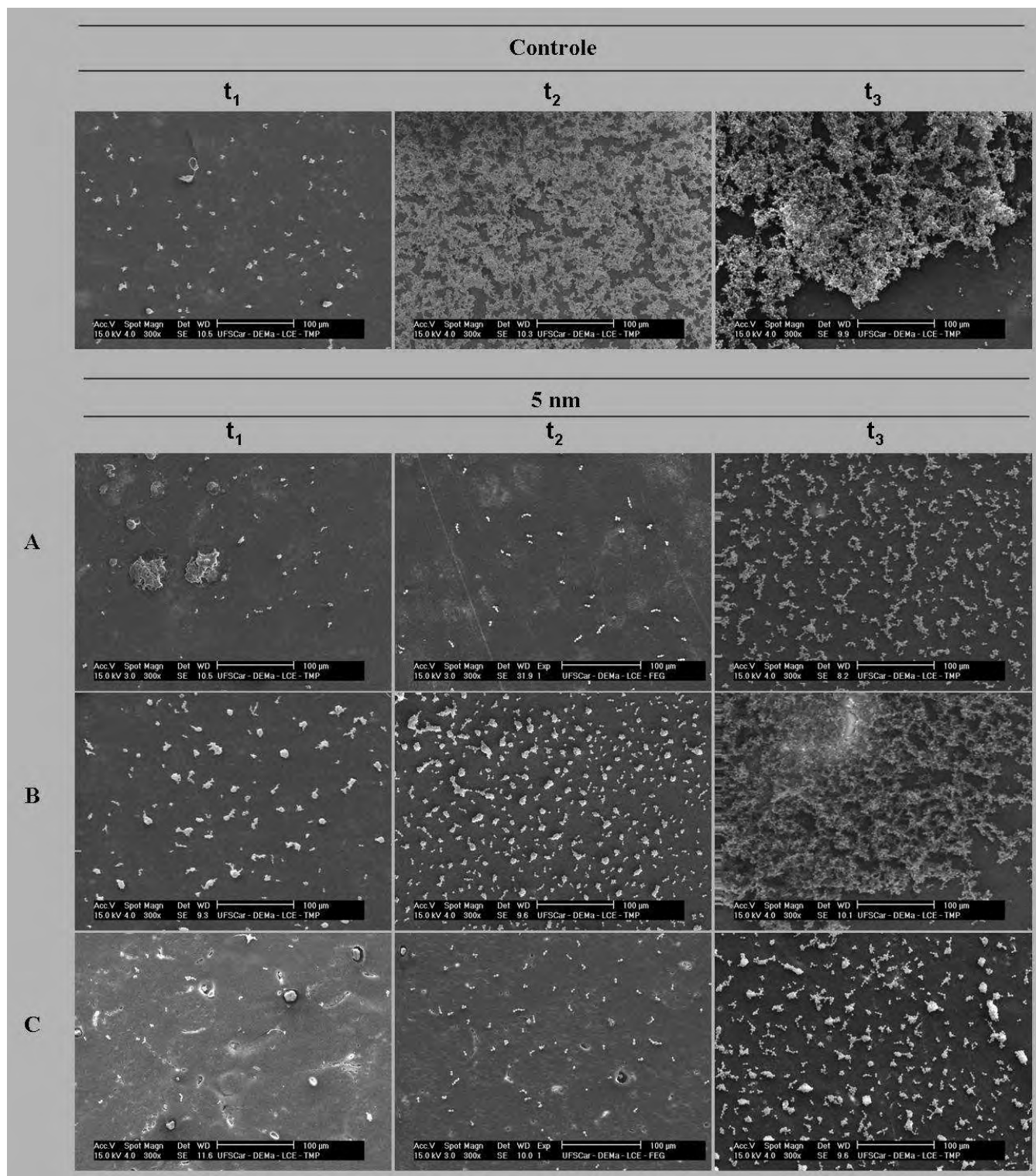


Figura 8. Imagens de MEV evidenciando desenvolvimento de biofilme por *C. albicans* sobre as superfícies poliméricas com 5 horas (t_1), 12 horas (t_2) e 24 horas (t_3) dos grupos: Controle; **A)** nanocompósitos com concentração de 0,05% de nanopartículas de prata; **B)** nanocompósitos com concentração de 0,5% de nanopartículas de prata; **C)** nanocompósitos com concentração de 5% de nanopartículas de prata.

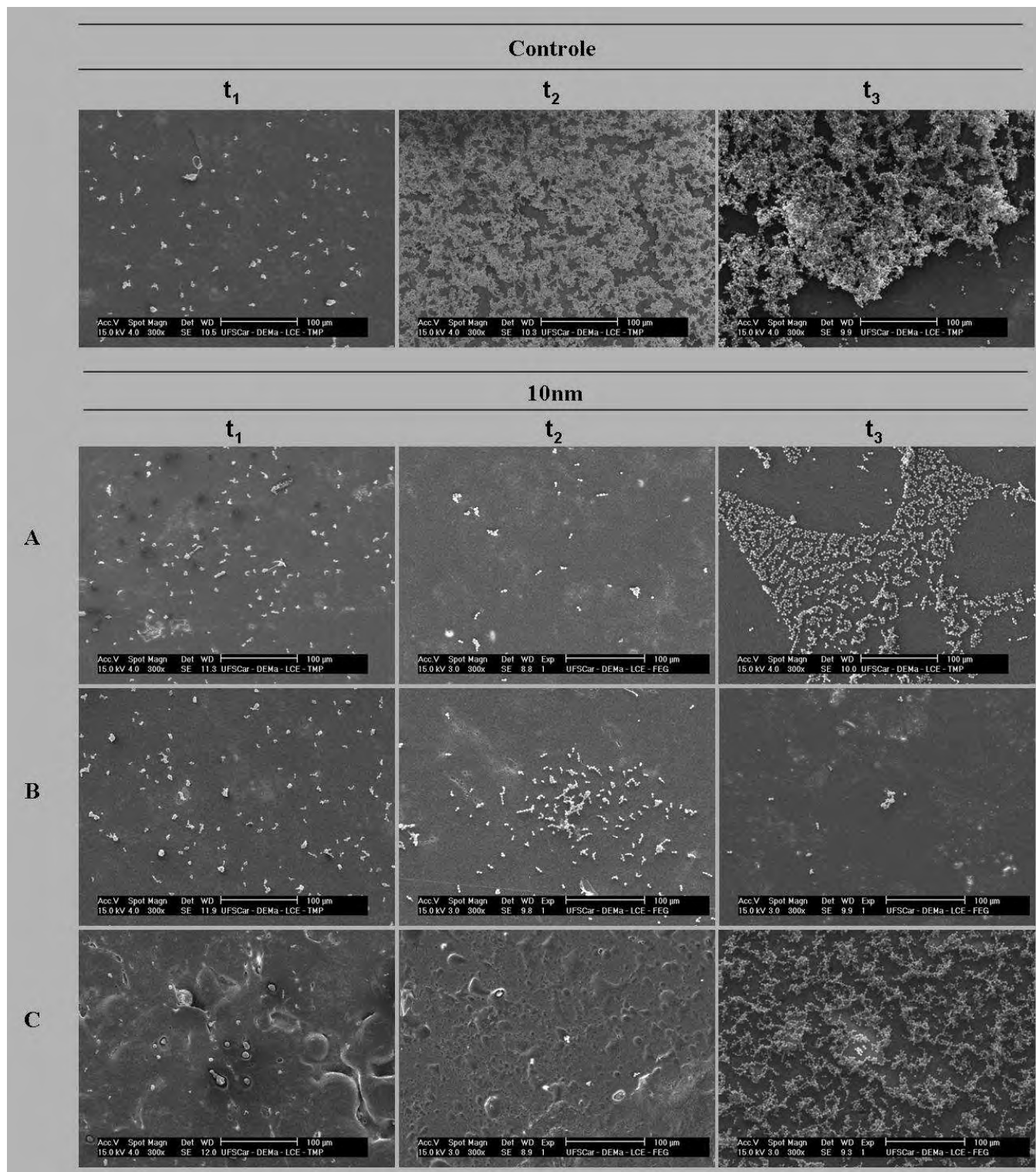


Figura 9. Imagens de MEV evidenciando desenvolvimento de biofilme por *C. albicans* sobre as superfícies poliméricas com 5 horas (t_1), 12 horas (t_2) e 24 horas (t_3) dos grupos: Controle; **A)** nanocompósitos com concentração de 0,05% de nanopartículas de prata; **B)** nanocompósitos com concentração de 0,5% de nanopartículas de prata; **C)** nanocompósitos com concentração de 5% de nanopartículas de prata.

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.

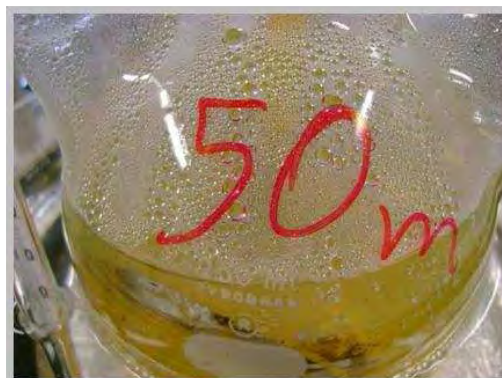


Figura 2. Solução coloidal de nanopartículas de prata com tonalidade amarelo âmbar, que é um dos indicativos da formação destas nanopartículas.

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 à temperatura ambiente.



Figura 3. Espectrofotômetro UV-Vis Shimadzu Multispec 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).

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) (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).

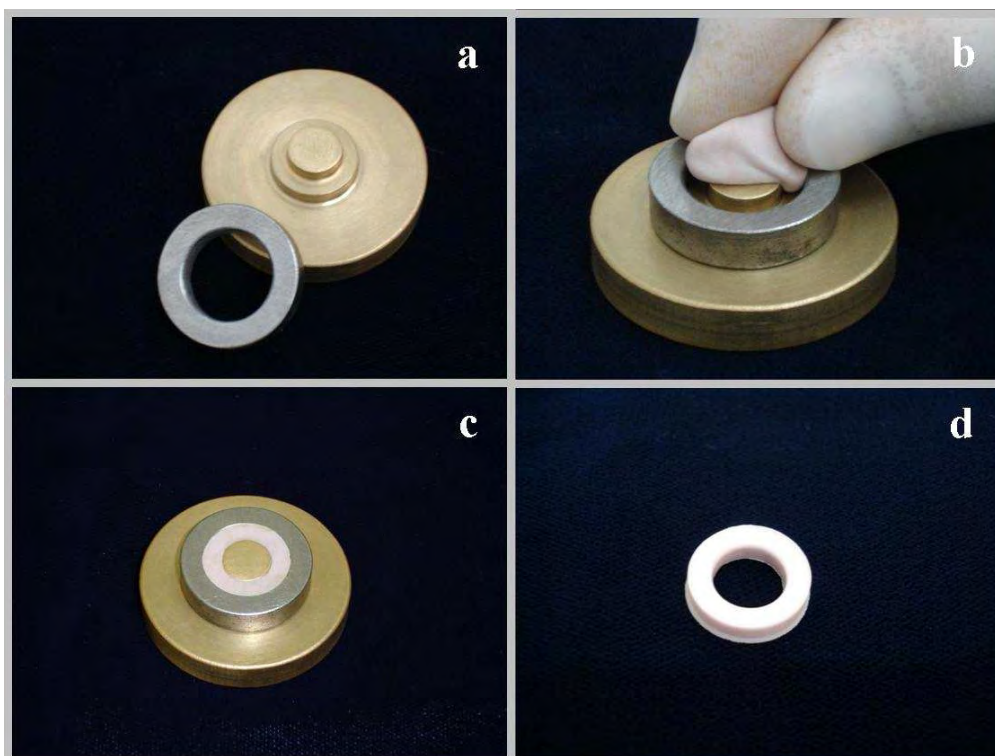


Figura 5. a) Matriz metálica com réplica maciça do espécime de resina acrílica localizada centralmente em sua base, e anel metálico removível; b) condensação manual do silicone no interior da matriz metálica; c) silicone no interior da matriz após condensação deste material; d) molde em silicone vazado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

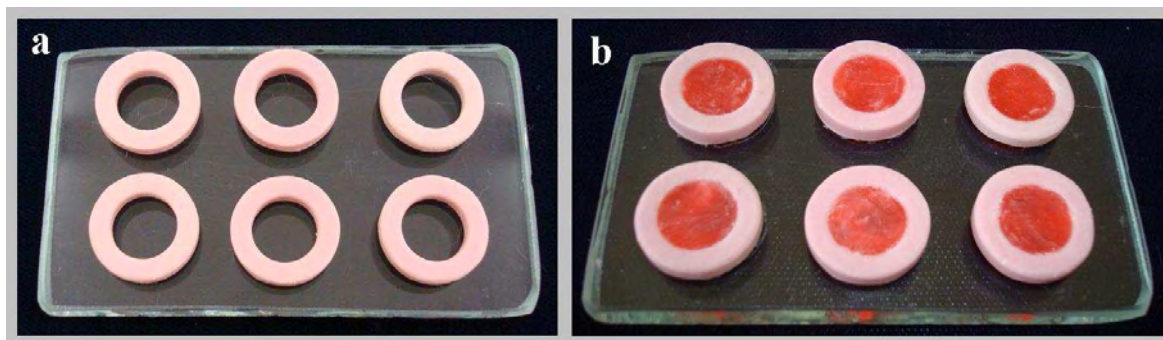


Figura 6. a) Moldes em silicone fixados sobre uma lâmina de vidro; b) interior dos moldes preenchidos com cera utilidade.

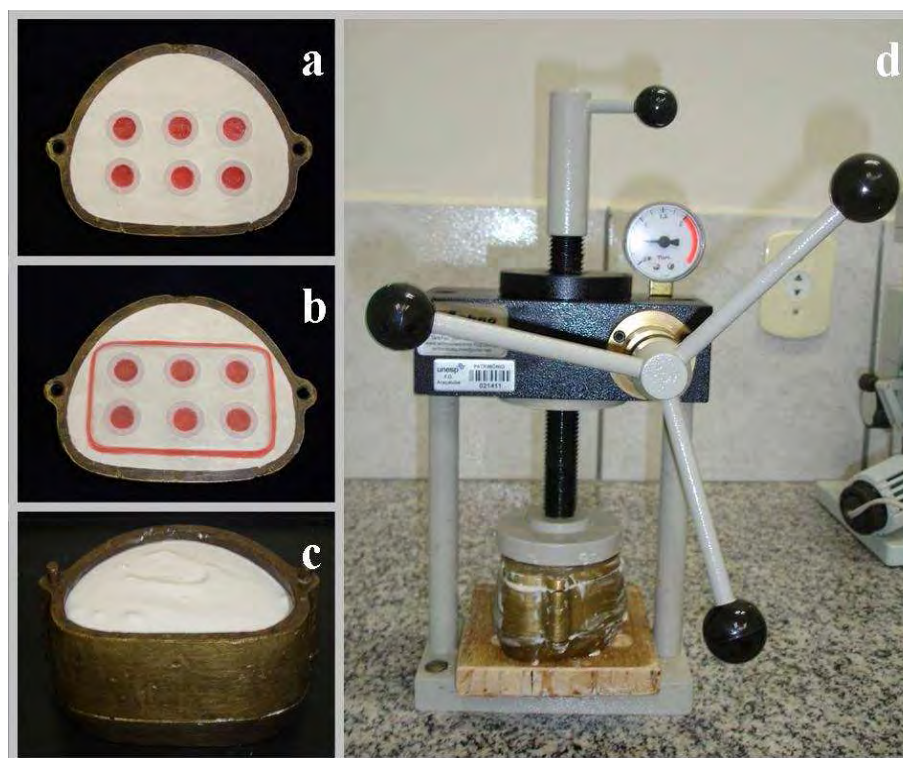


Figura 7. a) Moldes em silicone preenchidos com cera utilidade e incluídos em gesso no interior da mufla; b) lâmina de vidro posicionada sobre os moldes incluídos e fixada com cera utilidade; c) encaixe da contra-mufla e preenchimento da mesma com gesso pedra tipo III; d) prensagem da mufla metálica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

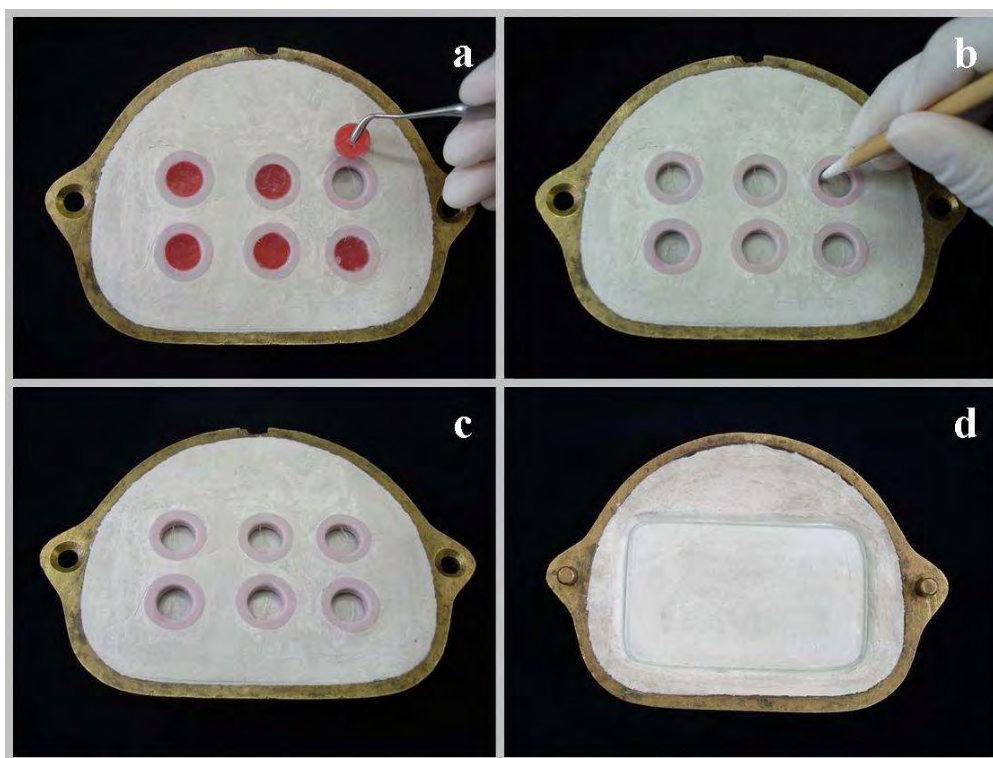


Figura 8. a) Remoção da cera utilidade do interior dos moldes em silicone com auxílio de um hollemback; b) eliminação dos resíduos de cera com algodão e acetona pura; c) interior dos moldes limpos e prontos para receberem a resina acrílica; d) lâmina de vidro posicionada na superfície do gesso pedra 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 com tamanhos médios de 5 e 10 nm 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).



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

A solução coloidal de nanopartículas de prata adicionada o componente líquido da resina acrílica foi agitada com auxílio de uma espátula 36 (Millenium, Golgran Ind. e Com. de Instrumental Odontológico Ltda, São Paulo, São Paulo, Brasil) no interior de potes de vidro para homogeneização. Em seguida, o pó foi adicionado ao líquido e homogeneizado (Figura 10), então 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) (Figura 11). Após a polimerização, a mufla foi resfriada sobre bancada por uma noite e os espécimes foram desincluídos.

Após a desinclusão os espécimes foram submetidos a acabamento para remoção das irregularidades das bordas (Figura 12), com auxílio de um micromotor e broca minicut. Então foram realizadas três mensurações da altura e do diâmetro dos espécimes com um paquímetro digital (Paquímetro Digital Digimatic, Mitutoyo Sul Americana Ltda, Santo Amaro, SP, Brasil).

Para cada concentração e tamanho de nanopartículas de prata foram confeccionados 30 espécimes para o ensaio de adesão, 1 para a microscopia de luz e 1 para a microscopia eletrônica de varredura.

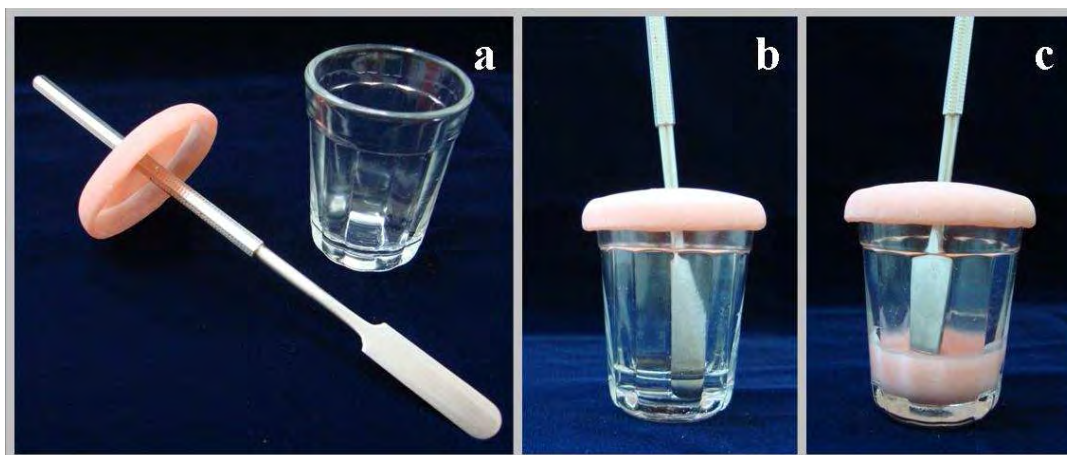


Figura 10. a) Espátula, pote de vidro e tampa utilizados para a mistura do polímero, monômero e colóide de prata; b) mistura da solução coloidal de nanopartículas de prata com o monômero; c) acréscimo do polímero à solução de monômero contendo o colóide de prata.



Figura 11. Termopolimerizadora Solab, utilizada para a polimerização dos espécimes de resina acrílica.

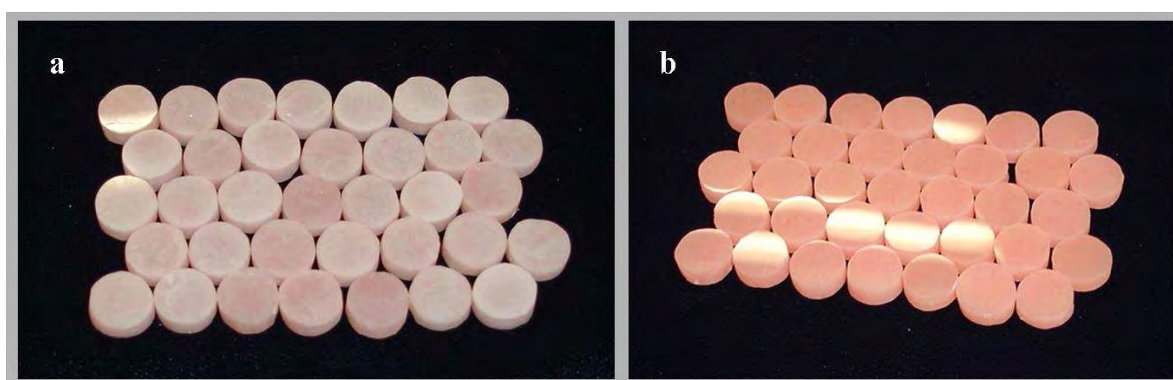


Figura 12. Aspecto dos espécimes após desinclusão e acabamento, onde pode se verificar a superfície lisa dos mesmos. **a)** Espécimes com maior concentração de nanopartículas de prata (5%); **b)** espécimes do grupo controle.

3. Esterilização dos espécimes

Os espécimes foram embalados em papel grau cirúrgico e submetidos a um ciclo de esterilização por radiação realizada com uma fonte de Co-60 tipo “Gammacell 220” com dose de 25kGy. Este processo foi realizado com a

colaboração do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN) (Figura 13).



Figura 13. Espécimes embalados separadamente por grupo em papel grau cirúrgico. Aspecto após sua esterilização.

5. Candida albicans e condições de crescimento

O microorganismo Candida albicans liofilizado (cepa padrão ATCC 10231 – Instituto Adolfo Lutz – Divisão de Biologia Médica, São Paulo, SP, Brasil) (Figura 14) foi ativado através da sua diluição em solução de NaCl 0,9% com posterior semeadura em placas de Petri contendo meio de cultura ágar Sabouraud (ASD) (Agar Sabouraud Dextrose, Becton Dickinson France SAS, Le Pont de Claix, France) (Figura 15) e incubação a 37°C por 48 horas em aerobiose.



Figura 14. Candida albicans cepa padrão ATCC10231 liofilizada

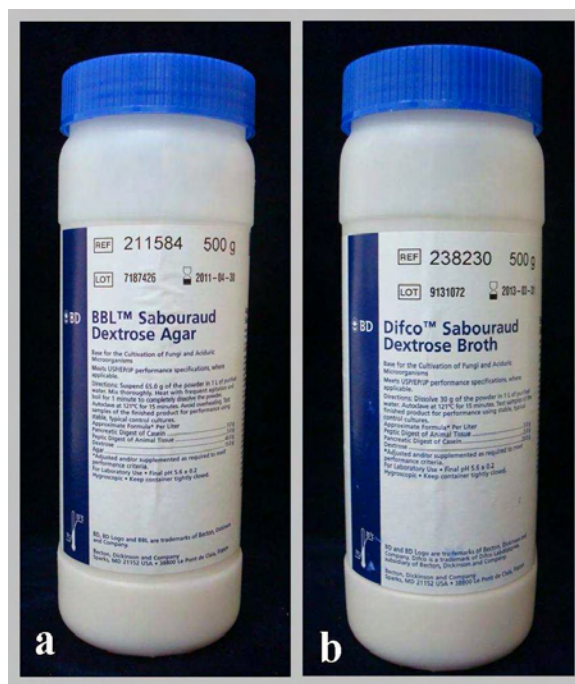


Figura 14. a) Meio de cultura Agar Sabouraud Dextrose (ASD), Difco; **b)** meio de cultura Caldo Sabouraud com Dextrose (CSD), Difco.

4. Confeção da Curva Padrão do número de UFC/mL de acordo com a densidade óptica em espectrofotômetro UV/Vis

Para a padronização da concentração de células (UFC / mL) na suspensão de Candida albicans utilizada no presente estudo, foi confeccionada uma curva padrão em espectrofotômetro UV/Vis (Espectrofotômetro UV/Vis – 1800, Shimadzu Corporation, Nakagyo-Ku, Kyoto, Japão) (Figura 16).

Para isso foram obtidas suspensões de Candida albicans em solução de NaCl 0,9% com concentrações variadas e aleatórias que tiveram suas absorbâncias medidas com auxílio de espectrofotômetro com comprimento de onda visível de 530 nm. Os microorganismos utilizados para a obtenção das suspensões

apresentavam crescimento em ASD por 24 horas a 37°C em condições de aerobiose.



Figura 15 Espectrofotômetro UV/VIS 1800, utilizado para ajustar e padronizar a concentração de microorganismos nas suspensões para inoculação de meio de cultura.

Após a leitura das absorbâncias, foram obtidas diluições seriadas de cada suspensão até a diluição 10^{-4} . Cem microlitros de cada diluição foi plaqueado em triplicata em ASD e após 48 horas de incubação a 37°C em aerobiose, o número de colônias formadas para a diluição 10^{-4} foi contado (Contador de colônias eletrônico CP 600 Plus, Phoenix Indústria e Comércio de Equipamentos Científicos Ltda, Araraquara, São Paulo, Brasil) (Figura 17) para cada concentração de células acrescentadas aleatoriamente em NaCl 0,9%. Assim, pôde-se relacionar cada valor de absorbância com o número de células plaqueadas em ASD.



Figura 16. Contador eletrônico de colônias CP 600 Plus, Phoenix, utilizado para a contagem de colônias.

Para obtenção dos valores em UFC/mL em cada valor de absorbância, utilizou-se a seguinte equação matemática:

$$\text{UFC/mL} = \text{média aritmética do n}^\circ \text{ de colônias da triplica} \times \text{fator de diluição } (10^4) \\ \times \text{volume de suspensão plaqueado } (10).$$

Com isso conseguimos determinar a concentração de células/mL da suspensão de microorganismos de acordo com o valor de absorbância obtido com densidade óptica (OD) de 530 nm e utilizar uma suspensão com concentração de células padronizada.

5. Ensaio de adesão do microorganismo Candida albicans à superfície polimérica

Para o teste de adesão fúngica, suspensões de Candida albicans em NaCl 0,9% foram ajustadas a concentração de $1,1 \times 10^7$ UFC/mL com OD_{530nm} . Um volume de 0,1 mL dessa suspensão foi utilizado para inocular 9,9 mL de meio de cultura CSD previamente preparados e autoclavados. A partir daí, o meio de cultura já com o inóculo foi ajustado para a concentração de $1,1 \times 10^5$ UFC/mL.

Em seguida, os espécimes estéreis foram adicionados ao meio inoculado e foram incubados a 37°C por 24 horas em condições de aerobiose (Figura 18).

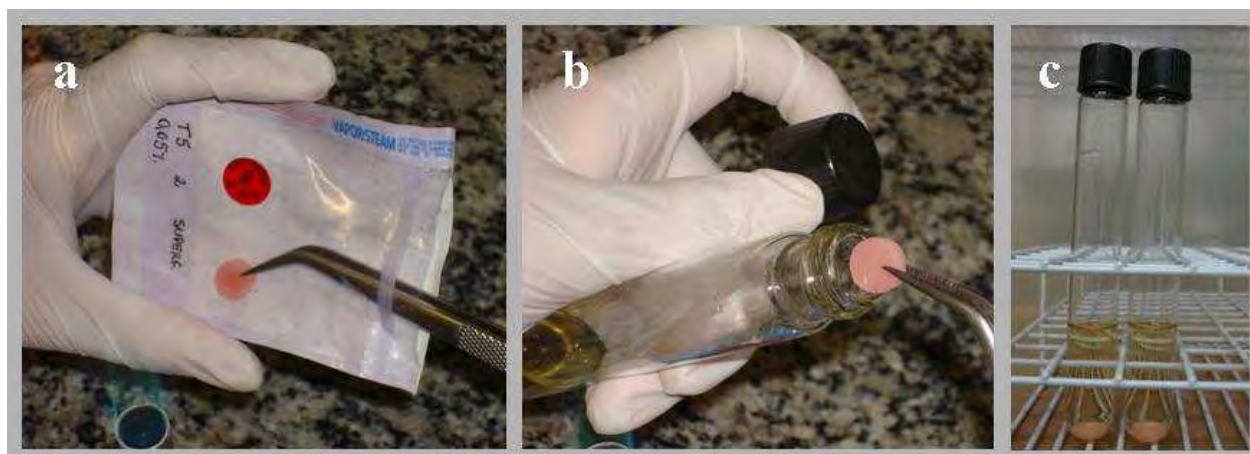


Figura 17. a) remoção dos espécimes estéreis do papel grau cirúrgico; b) colocação dos espécimes nos tubos de ensaio contendo CSD inoculado com C. albicans; c) espécimes no interior de tubos de ensaio previamente à sua incubação em aerobiose por 24 horas.

Após a incubação, os espécimes foram removidos dos tubos de ensaio e lavados com solução de NaCl 0,9% de forma breve e por cinco períodos, com auxílio de placas de microtitulação com 12 poços e de fundo chato, a fim de remover microorganismos fracamente aderidos (Figura 19).



Figura 18. Espécime sendo lavado de forma breve em NaCl 0,9% uma vez em cada poço da placa de microtitulação, totalizando 5 poços, para remoção das células fúngicas fracamente aderidas.

A seguir, os espécimes foram imersos em 10 mL de solução de NaCl 0,9% e agitados em vortex (Agitador de tubos Vortex AP 56, Phoenix Indústria e Comercio de Equipamentos Científicos Ltda, Araraquara, São Paulo, Brasil) durante 1 minuto (Figura 20) e em seguida deixados em repouso por 9 minutos. Após este período, os tubos foram novamente agitados por 1 minuto, a fim de desprender microorganismos ainda aderentes. Diluições de 10^{-1} foram obtidas a partir dessa solução inicial em que os espécimes foram imersos e agitados.

Com auxílio de uma pipeta, três alíquotas de $10\mu\text{L}$ da suspensão de microorganismos na diluição 10^{-1} foram depositadas equidistantes em uma extremidade da placa de Petri contendo ASD. Em seguida, a placa foi vertida de modo que a suspensão escorresse linearmente e percorresse todo o diâmetro da placa, formando assim, três fileiras onde cada uma representou uma placa de Petri na técnica da triplicata em três placas individuais (Figura 21). As placas foram,

então, incubadas por 48 horas a 37°C em condições de aerobiose, e em seguida realizou-se a contagem do número de colônias.

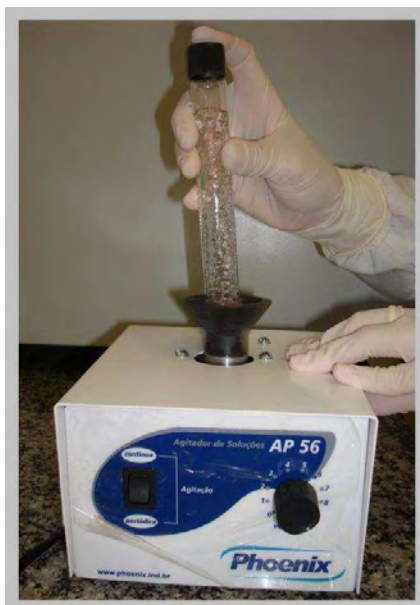


Figura 19. Espécime em tubo de ensaio com 10 mL de NaCl 0,9% estéril sendo agitado em vortex para desprendimento das células fúngicas aderidas à superfície polimérica.

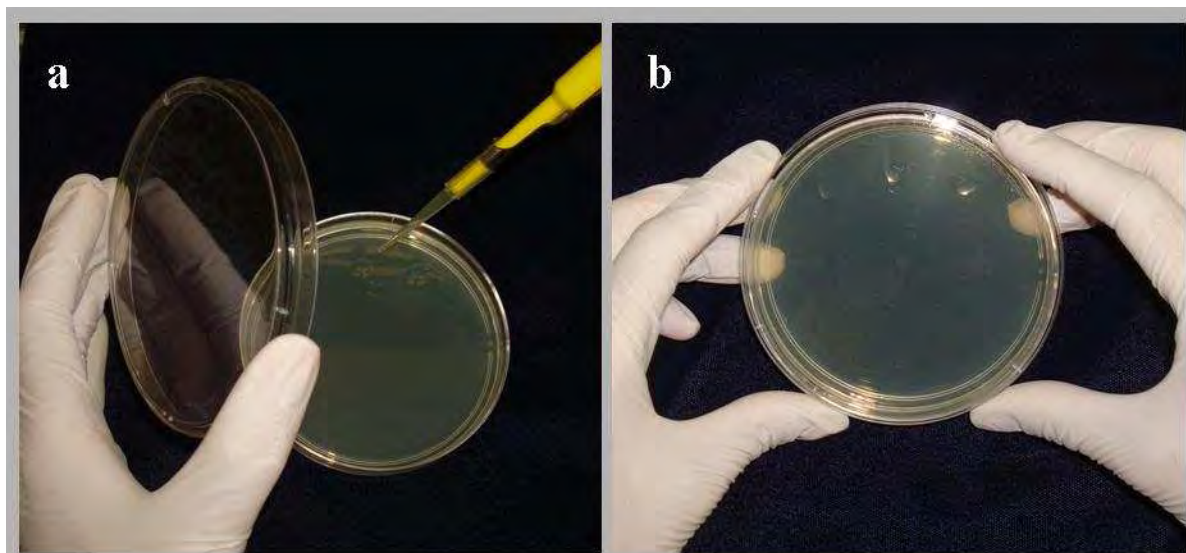


Figura 20. a) Meio ASD sendo inoculado com 3 alíquotas de 10 μ L cada. O inóculo correspondeu a diluição 10^{-1} da solução de NaCl 0,9% na qual o espécime foi agitado em vórtex para remoção das células aderidas em sua superfície; b) placa de Petri sendo inclinada para que as alíquotas escorressem e percorressem todo o diâmetro da placa.

6. Avaliação do crescimento de Candida albicans sobre a superfície polimérica

Após seu crescimento em ASD por 24 horas a 37°C em aerobiose, as células de Candida albicans foram adicionadas em solução de NaCl 0,9% e tiveram sua concentração ajustada para $1,1 - 1,5 \times 10^5$ UFC/mL (OD_{530nm}) em espectrofotômetro UV/Vis.

Em seguida, 100µL dessa suspensão foram inoculados com auxílio de alças de Drigalski em placas de Petri contendo meio ASD. Imediatamente após a inoculação, os espécimes estéreis foram posicionados sobre a superfície do meio de cultura inoculado (Figura 22).

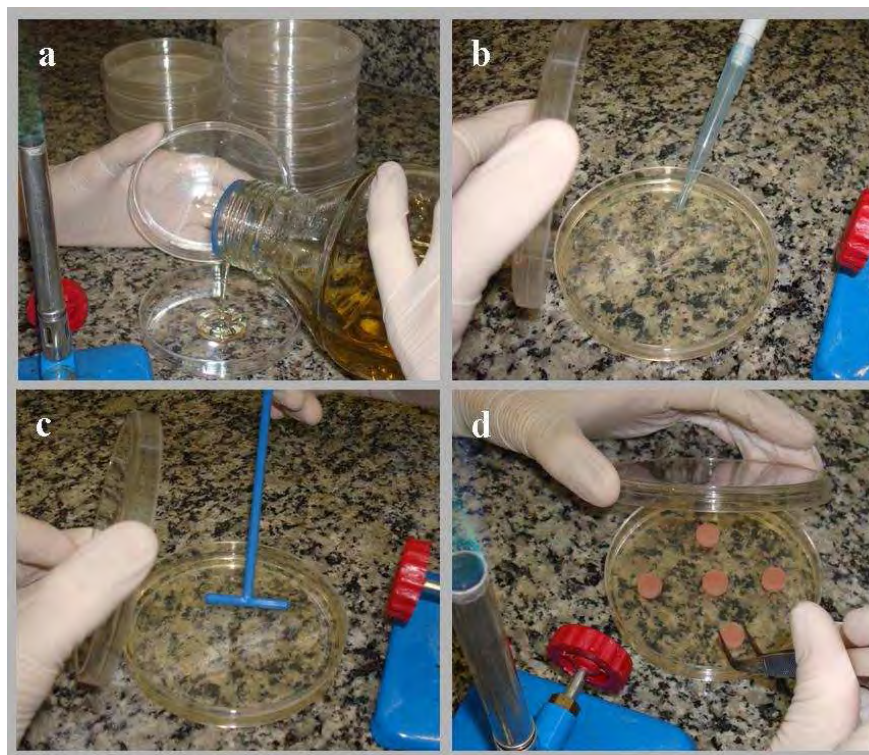


Figura 21. a) Meio ASD sendo vertido em placa de Petri; b) inserção do inóculo; c) inóculo sendo espalhado com alça de Drigalsky; d) posicionamento dos espécimes imediatamente após a inoculação do meio de cultura.

Após incubação de 48 horas a 37°C em aerobiose (Figura 23), os espécimes foram removidos das placas e imediatamente submetidos à análise em microscopia de luz (Microscópio Axiostar Plus, Carl Zeiss de México S. A. de C. V., Santa Catarina, Coyoacan, México) (Figura 24) para se verificar o crescimento fúngico sobre sua superfície.

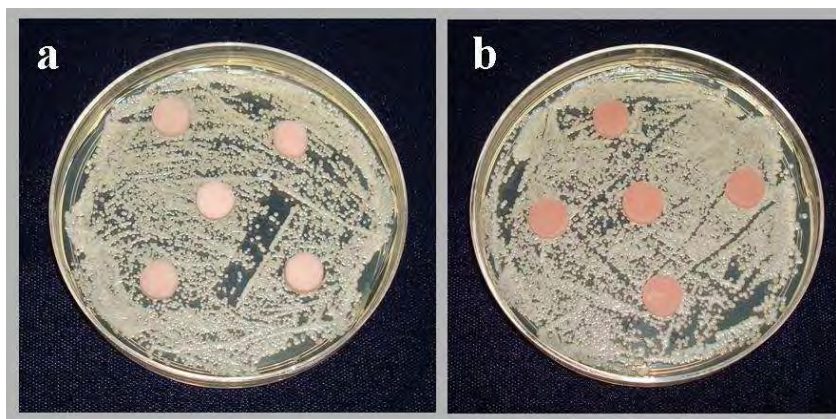


Figura 22. Espécimes sobre o meio ASD inoculado após 48 horas de incubação a 37°C, previamente a análise por microscopia de luz. **a)** nanocompósitos com maior concentração de nanopartículas de prata (5%); **b)** espécimes do grupo controle.

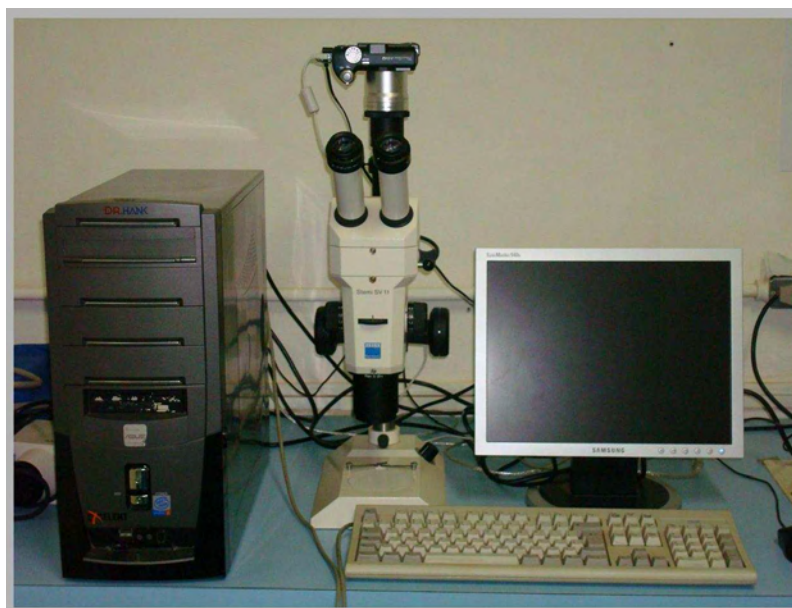


Figura 23. Microscópio de luz, Axiostar Plus, utilizado para análise do crescimento fúngico sobre a superfície dos espécimes de resina.

7. Análise crescimento de Candida albicans sobre a superfície do polímero através de microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Um espécime de cada grupo foi analisado por MEV. Para isso, os espécimes foram incubados em placas de microtitulação com 12 poços contendo 3,96 mL de CSD inoculado com 40 μ L de suspensão de Candida albicans (OD_{530}) $1,1 \times 10^7$ UFC/mL em cada poço, de modo que se obteve no final uma concentração de microorganismos de $1,1 \times 10^5$ UFC/mL (Figura 25). Os espécimes foram mantidos em estufa a 37° C por 5, 12 e 24 horas, em seguida, foram removidos cuidadosamente dos poços e lavados em PBS para remoção das células fúngicas fracamente aderidas. Posteriormente, os espécimes foram imersos em glutaraldeído 2,5% (Merck KGaA, Darmstadt, Hesse, Alemanha) à temperatura de 4°C por 2 horas. Então, foram novamente lavados em PBS por 3 períodos de 5 minutos cada.



Figura 24. a) Meio de cultura CSD em placa de microtitulação sendo inoculado para posterior adição dos espécimes; b) espécimes imersos em CSD inoculado previamente à incubação.

A desidratação dos espécimes foi realizada com imersões sucessivas em concentrações seriadas de álcool 70%, 95% por 10 minutos e três imersões em álcool 100% por 10 minutos. Imediatamente após, os espécimes foram imersos em hexametildesilazane 98% (Merck KGaA, Darmstadt, Hesse, Alemanha) por dois períodos de 20 segundos cada e secos à temperatura ambiente.

Após a fixação e desidratação os espécimes foram montados em *stubs*, submetidos à metalização áurica utilizando um metalizador (Balzers SCD-004, Liechtenstein, Germany) para tornar a amostra condutora (1KV, 150Ap) (Figura 26). A espessura do filme de ouro que cobriu os espécimes foi de 10 nm (Figura 27). Os espécimes metalizados foram, então, examinados por meio da MEV (Microscópio eletrônico XL30 TMP, Philips, Eindhoven, Netherlands) (Figura 28).



Figura 25. a) Metalizador Balzers SCD-004 utilizado para o recobrimento áurico dos espécimes; b) espécimes sendo submetidos ao recobrimento com ouro para análise por MEV.



Figura 26. Espécimes logo após o recobrimento com filme de ouro de 10 nm de espessura.



Figura 27. Microscópio Eletrônico de Varredura XL30 TMP, Philips utilizado para análise do crescimento de microorganismos na superfície polimérica em diferentes tempos.

Anexo B - Resultados

Tabela 1. Média do número de colônias e UFC/mL de cada espécime analisado do grupo controle.

Espécime	Número de colônias – Controle			Média	UFC/mL
	Triplicata				
	1	2	3		
1	10	20	0	10	1000
2	20	10	0	10	1000
3	10	20	30	20	2000
4	30	10	0	13,33	1333,33
5	20	20	10	16,67	1666,67
6	90	110	80	93,33	9333,33
7	30	0	0	10	1000
8	40	20	10	23,33	2333,33
9	50	30	50	43,33	4333,33
10	20	30	30	26,67	2666,67
11	10	10	20	13,33	1333,33
12	70	40	40	50	5000
13	40	70	100	70	7000
14	50	90	40	60	6000
15	130	80	120	110	11000
16	40	90	30	53,33	5333,33
17	30	60	30	40	4000
18	70	40	70	60	6000
19	30	20	40	30	3000
20	20	0	10	10	1000
21	0	20	30	16,67	1666,67
22	30	10	20	20	2000
23	0	20	10	10	1000
24	50	70	90	70	7000
25	10	30	10	16,67	1666,67
26	0	40	0	13,33	1333,33
27	10	0	0	3,33	333,333
28	100	50	50	66,67	6666,67
29	10	0	20	10	1000
30	40	30	10	26,67	2666,67
				33,89	3388,89

Tabela 2. Média do número de colônias e UFC/mL de cada espécime analisado do grupo de nanocompósito com concentração de 0,05% de nanopartículas com tamanho médio de 5 nm.

Número de colônias – PMMA/Ag com nanopartículas de tamanho médio de 5 nm – concentração 0,05%					
Espécime	Triplicata			Média	UFC/mL
	1	2	3		
1	0	10	0	3,33	333,33
2	0	30	0	10	1000
3	50	40	20	36,67	3666,67
4	0	0	10	3,33	333,33
5	10	0	0	3,33	333,33
6	10	40	10	20	2000
7	20	40	40	33,33	3333,33
8	0	0	20	6,67	666,67
9	20	30	0	16,67	1666,67
10	10	10	30	16,67	1666,67
11	60	80	20	53,33	5333,33
12	0	0	10	3,33	333,33
13	10	30	10	16,67	1666,67
14	0	20	40	20	2000
15	0	10	0	3,33	333,33
16	80	10	20	36,67	3666,67
17	0	10	10	6,67	666,67
18	0	0	0	0	0
19	10	30	10	16,67	1666,67
20	30	0	0	10	1000
21	10	30	30	23,33	2333,33
22	40	20	20	26,67	2666,67
23	20	0	20	13,33	1333,33
24	10	0	0	3,33	333,33
25	20	70	10	33,33	3333,33
26	10	10	40	20	2000
27	0	10	0	3,33	333,33
28	0	10	0	3,33	333,33
29	10	30	10	16,67	1666,67
30	0	0	10	3,33	333,33
				15,44	1544,44

Tabela 3. Média do número de colônias e UFC/mL de cada espécime analisado do grupo de nanocompósito com concentração de 0,05% de nanopartículas com tamanho médio de 10 nm.

Número de colônias – PMMA/Ag com nanopartículas de tamanho médio de 10 nm – concentração 0,05%					
Espécime	Triplicata			Média	UFC/mL
	1	2	3		
1	20	40	60	40	4000
2	10	10	10	10	1000
3	20	50	40	36,67	3666,67
4	0	0	0	0	0
5	0	10	0	3,33	333,33
6	0	0	0	0	0
7	10	10	0	6,67	666,67
8	10	0	10	6,67	666,67
9	20	10	0	10	1000
10	0	10	10	6,67	666,67
11	20	10	10	13,33	1333,33
12	30	0	40	23,33	2333,33
13	10	10	20	13,33	1333,33
14	30	30	60	40	4000
15	30	30	20	26,67	2666,67
16	30	20	10	20	2000
17	20	10	10	13,33	1333,33
18	0	0	10	3,33	333,33
19	0	40	40	26,67	2666,67
20	0	10	10	6,67	666,667
21	110	100	20	76,67	7666,67
22	10	40	20	23,33	2333,33
23	0	130	50	60	6000
24	10	20	10	13,33	1333,33
25	60	70	120	83,33	8333,33
26	10	10	0	6,67	666,67
27	0	10	40	16,67	1666,67
28	20	20	10	16,67	1666,67
29	20	10	10	13,33	1333,33
30	10	10	20	13,33	1333,33
				21	2100

Tabela 4. Média do número de colônias e UFC/mL de cada espécime analisado do grupo de nanocompósito com concentração de 0,5% de nanopartículas com tamanho médio de 5 nm.

Número de colônias – PMMA/Ag com nanopartículas de tamanho médio de 5 nm – concentração 0,5%					
Espécime	Triplicata			Média	UFC/mL
	1	2	3		
1	50	40	5	31,67	3166,67
2	10	10	2	7,33	733,33
3	0	0	1	0,33	33,33
4	10	10	1	7	700
5	50	80	3	44,33	4433,33
6	50	50	1	33,67	3366,67
7	20	20	1	13,67	1366,67
8	10	10	4	8	800
9	50	20	1	23,67	2366,67
10	10	10	0	6,67	666,667
11	10	20	2	10,67	1066,67
12	20	10	1	10,33	1033,33
13	30	70	8	36	3600
14	30	20	2	17,33	1733,33
15	0	20	0	6,67	666,67
16	0	10	2	4	400
17	10	10	0	6,67	666,67
18	60	70	3	44,33	4433,33
19	10	10	0	6,67	666,67
20	0	0	1	0,33	33,33
21	60	10	2	24	2400
22	0	0	1	0,33	33,33
23	0	0	1	0,33	33,33
24	0	0	3	1	100
25	10	0	0	3,33	333,33
26	20	30	4	18	1800
27	10	20	1	10,33	1033,33
				13,95	1395,06

Tabela 5. Média do número de colônias e UFC/mL de cada espécime analisado do grupo de nanocompósito com concentração de 0,5% de nanopartículas com tamanho médio de 10 nm.

Número de colônias – PMMA/Ag com nanopartículas de tamanho médio de 10 nm – concentração 0,5%					
Espécime	Triplicata			Média	UFC/mL
	1	2	3		
1	10	10	50	23,33	2333,33
2	10	10	0	6,67	666,67
3	0	0	10	3,33	333,33
4	10	10	10	10	1000
5	10	10	10	10	1000
6	10	0	0	3,33	333,33
7	20	30	20	23,33	2333,33
8	20	60	10	30	3000
9	20	10	10	13,33	1333,33
10	0	0	10	3,33	333,333
11	10	10	30	16,67	1666,67
12	30	10	10	16,67	1666,67
13	0	10	50	20	2000
14	30	0	10	13,33	1333,33
15	10	10	0	6,67	666,67
16	10	30	20	20	2000
17	0	0	10	3,33	333,33
18	30	20	10	20	2000
19	20	0	30	16,67	1666,67
20	20	30	20	23,33	2333,33
21	30	10	20	20	2000
22	0	0	20	6,67	666,67
23	0	10	0	3,33	333,33
24	60	10	70	46,67	4666,67
25	0	10	0	3,33	333,33
26	50	60	90	66,67	6666,67
27	0	20	20	13,33	1333,33
28	30	20	10	20	2000
29	0	0	10	3,33	333,33
30	10	30	20	20	2000
				16,22	1622,22

Tabela 6. Média do número de colônias e UFC/mL de cada espécime analisado do grupo de nanocompósito com concentração de 5% de nanopartículas com tamanho médio de 5 nm.

Número de colônias – PMMA/Ag com nanopartículas de tamanho médio de 5 nm – concentração 5%					
Espécime	Triplicata			Média	UFC/mL
	1	2	3		
1	10	20	0	10	1000
2	30	0	20	16,67	1666,67
3	10	20	0	10	1000
4	10	40	40	30	3000
5	0	0	0	0	0
6	40	10	30	26,67	2666,67
7	10	20	20	16,67	1666,67
8	10	30	40	26,67	2666,67
9	10	20	0	10	1000
10	0	0	10	3,33	333,33
11	20	50	20	30	3000
12	50	50	70	56,67	5666,67
13	0	10	0	3,33	333,33
14	10	10	10	10	1000
15	30	20	0	16,67	1666,67
16	40	30	20	30	3000
17	30	20	10	20	2000
18	10	10	10	10	1000
19	0	0	10	3,33	333,33
20	30	40	40	36,67	3666,67
21	0	10	10	6,67	666,67
22	0	0	10	3,33	333,33
23	50	50	60	53,33	5333,33
24	20	0	0	6,67	666,67
25	10	20	0	10	1000
26	20	0	0	6,67	666,67
27	20	20	0	13,33	1333,33
28	10	10	0	6,67	666,67
29	20	10	0	10	1000
30	20	10	0	10	1000
				16,44	1644,44

Tabela 7. Média do número de colônias e UFC/mL de cada espécime analisado do grupo de nanocompósito com concentração de 5% de nanopartículas com tamanho médio de 10 nm.

Número de colônias – PMMA/Ag com nanopartículas de tamanho médio de 10 nm – concentração 5%					
Espécime	Triplicata			Média	UFC/mL
	1	2	3		
1	30	10	40	26.67	2666.67
2	0	0	10	3.33	333.33
3	10	40	30	26.67	2666.67
4	60	70	40	56.67	5666.67
5	40	50	80	56.67	5666.67
6	10	0	0	3.33	333.33
7	10	0	0	3.33	333.33
8	10	20	30	20	2000
9	30	0	10	13.33	1333.33
10	70	30	20	40	4000
11	40	60	50	50	5000
12	0	0	20	6.67	666.67
13	10	40	30	26.67	2666.67
14	40	20	10	23.33	2333.33
15	30	20	20	23.33	2333.33
16	0	0	10	3.33	333.33
17	20	0	0	6.67	666.67
18	30	0	10	13.33	1333.33
19	10	20	10	13.33	1333.33
20	30	10	60	33.33	3333.33
21	20	10	70	33.33	3333.33
22	30	40	80	50	5000
23	10	10	10	10	1000
24	20	0	0	6.67	666.67
25	40	20	10	23.33	2333.33
26	80	120	80	93.33	9333.33
27	40	30	40	36.67	3666.67
28	20	20	10	16.67	1666.67
29	80	40	80	66.67	6666.67
30	20	10	0	10	1000
				26.56	2655.56

Tabela 8. Análise estatística com teste de Teste de Kruskal – Wallis.

Resultados				
H =	18,5912			
Graus de liberdade =	6			
(p) Kruskal – Wallis =	0,0049			
R 1 =	4120,0000			
R 2 =	2808,0000			
R 3 =	3674,5000			
R 4 =	2260,5000			
R 5 =	2855,0000			
R 6 =	2695,5000			
R 7 =	3114,5000			
R 1 (posto médio) =	137,3333			
R 2 (posto médio) =	93,6000			
R 3 (posto médio) =	122,4833			
R 4 (posto médio) =	83,7222			
R 5 (posto médio) =	95,1667			
R 6 (posto médio) =	89,8500			
R 7 (posto médio) =	103,8167			
Comparações (método de Dunn)	Dif. Postos	Z calculado	Z crítico	P
Postos médios 1 e 2	43,7333	2,8277	3,038	Ns
Postos médios 1 e 3	14,8500	0,9602	3,038	Ns
Postos médios 1 e 4	53,6111	3,3739	3,038	< 0,05
Postos médios 1 e 5	42,1667	2,7264	3,038	Ns
Postos médios 1 e 6	47,4833	3,0702	3,038	< 0,05
Postos médios 1 e 7	33,5167	2,1671	3,038	Ns
Postos médios 2 e 3	28,8833	1,8675	3,038	Ns
Postos médios 2 e 4	9,8778	0,6216	3,038	Ns
Postos médios 2 e 5	1,5667	0,1013	3,038	Ns
Postos médios 2 e 6	3,7500	0,2425	3,038	Ns
Postos médios 2 e 7	10,2167	0,6606	3,038	Ns
Postos médios 3 e 4	38,7611	2,4394	3,038	Ns
Postos médios 3 e 5	27,3167	1,7662	3,038	Ns
Postos médios 3 e 6	32,6333	2,1100	3,038	Ns
Postos médios 3 e 7	18,6667	1,2069	3,038	Ns
Postos médios 4 e 5	11,4444	0,7202	3,038	Ns
Postos médios 4 e 6	6,1278	0,3856	3,038	Ns
Postos médios 4 e 7	20,0944	1,2646	3,038	Ns
Postos médios 5 e 6	5,3167	0,3438	3,038	Ns
Postos médios 5 e 7	8,6500	0,5593	3,038	Ns
Postos médios 6 e 7	13,9667	0,9031	3,038	Ns

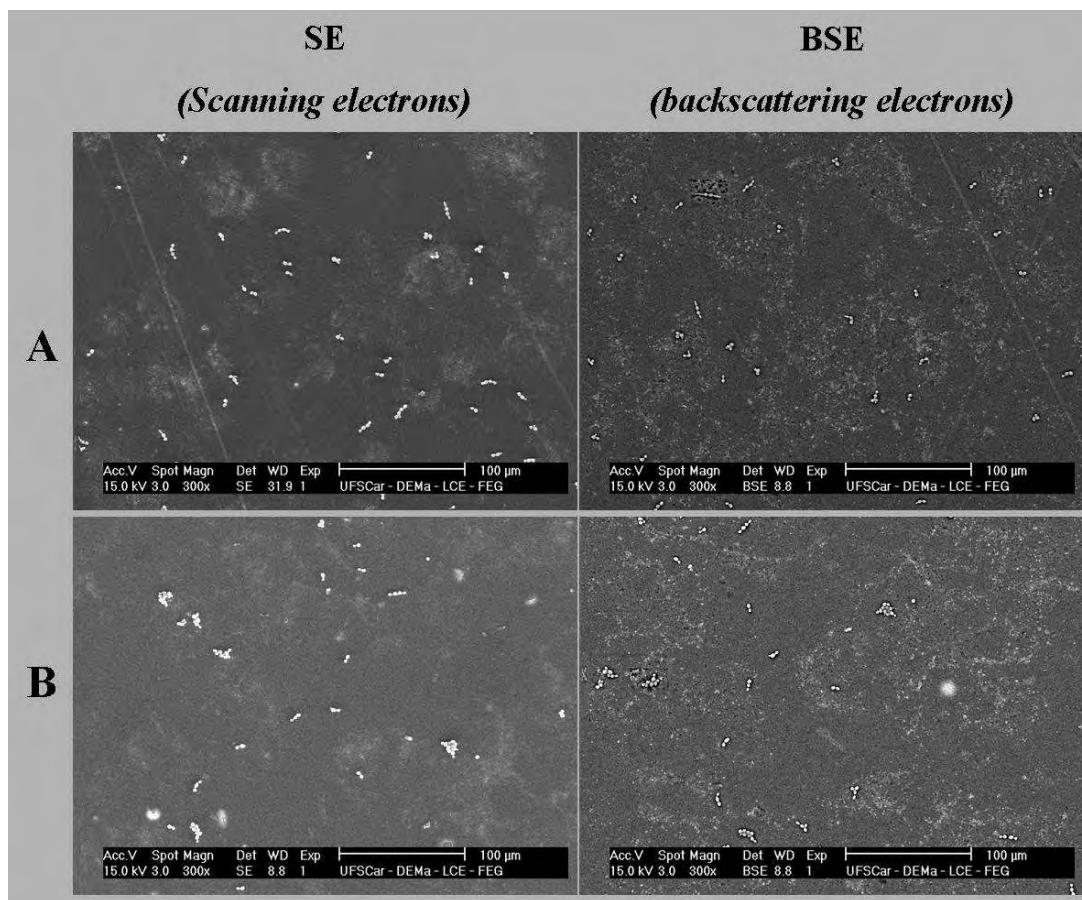


Figura 28. Imagens obtidas através da MEV com modos de análises *Scanning electrons* (SE) e *Backscattering electrons* (BSE). No modo BSE a imagem é gerada pela emissão de elétrons retroespalhados e demonstra diferenças composicionais na região selecionada da amostra. As imagens evidenciam a superfície do nanocompósito com pouco crescimento fúngico e grande quantidade de regiões com aglomerados de pontos mais claros, sendo um indicativo da presença de cálcio nessas regiões. **A)** nanocompósito com nanopartículas de tamanho 5 nm e concentração 0,05% (12 horas); **B)** nanocompósito com nanopartículas de tamanho 10 nm e concentração 0,05% (12 horas).

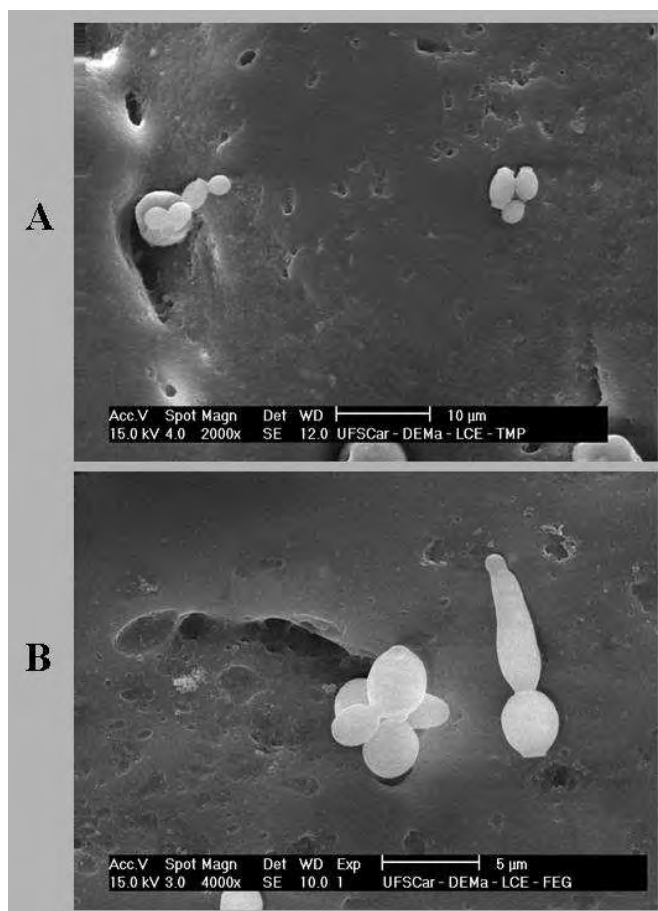


Figura 29. Imagens de MEV evidenciando presença de poros e/ou defeitos na superfície do nanocompósito com concentração de 5% de nanopartículas, e a localização de células de *C. albicans* no interior e adjacentes a essas áreas. **A)** nanocompósito com nanopartículas de tamanho 10 nm; **B)** nanocompósito com nanopartículas de tamanho 5 nm.

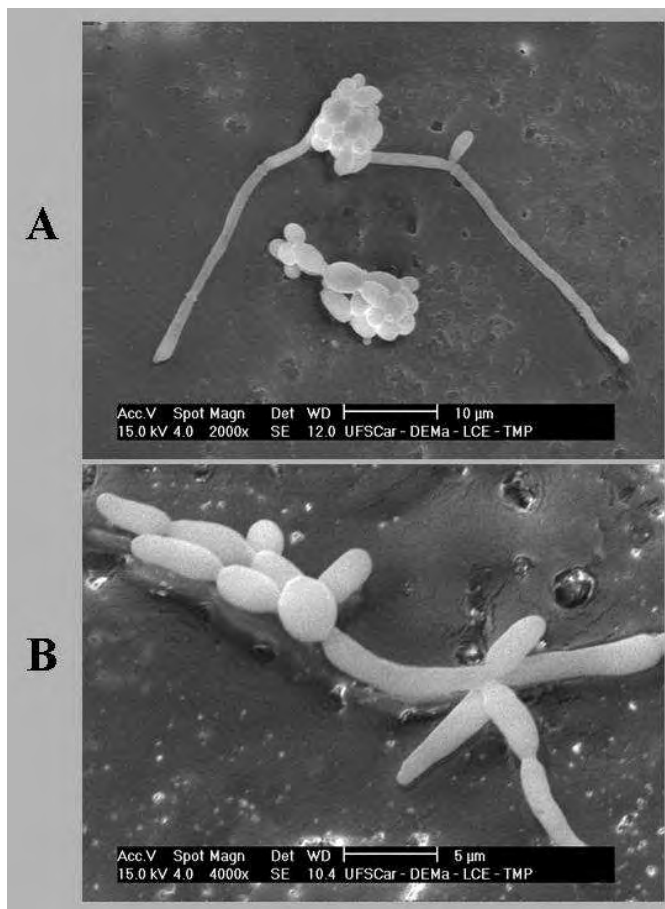


Figura 30. Presença de células de *C. albicans* na forma de hifas e pseudohifas na superfície do nanocompósito. **A)** nanocompósito com concentração de 5% de nanopartículas de prata com tamanho 10 nm; **B)** nanocompósito com concentração de 0,5% de nanopartículas de prata com tamanho 10nm.

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/redir.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>

