



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
Faculdade de Odontologia de Araraquara



**Amanda Fucci Wady**

**PROPRIEDADE ANTIFÚNGICA DE UMA  
RESINA PARA BASE DE PRÓTESE  
MODIFICADA COM NANOPARTÍCULAS DE  
PRATA**

Araraquara

2011



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
Faculdade de Odontologia de Araraquara



**Amanda Fucci Wady**

**PROPRIEDADE ANTIFÚNGICA DE RESINA PARA BASE DE PRÓTESE  
MODIFICADA COM NANOPARTÍCULAS DE PRATA**

**Dissertação apresentada ao Programa de Pós  
Graduação em Reabilitação Oral – Área de Prótese,  
da Faculdade de Odontologia de Araraquara, da  
Universidade Estadual Paulista para obtenção do  
título de Mestre em Reabilitação Oral**

**Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Ana Lucia Machado**

Araraquara

2011

**AMANDA FUCCI WADY**

**PROPRIEDADE ANTIFÚNGICA DE RESINA PARA BASE DE PRÓTESE  
MODIFICADA COM NANOPARTÍCULAS DE PRATA**

**COMISSÃO JULGADORA**

**DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE**

**Presidente e Orientador: Profa. Dra. Ana Lucia Machado**

**2 Examinador: Prof. Dr. Carlos Eduardo Vergani**

**3 Examinador: Prof. Dr. Valtencir Zucolotto**

Araraquara, 17 de fevereiro de 2011

## **DADOS CURRICULARES**

**Amanda Fucci Wady**

**NASCIMENTO:** 04/01/1986

**FILIAÇÃO:** Gilberto Elias Wady e Joana Fucci Wady

**2004-2007-** Graduação em Odontologia - Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP

**2008-2011-** Mestrado em Reabilitação Oral - Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP

## Dedicatória

### Dedico este trabalho:

A **Deus**, por proteger-me e me iluminar sempre, fazendo-me substituir as incertezas pela segurança e o medo pela vitória.

Senhor Jesus!!!

Agradeço pela Tua proteção no dia de ontem e no dia de hoje. Os trabalhos aos quais me dediquei foram profícuos, graças à Tua proteção e eu como uma criatura agradecida, venho aos Teus pés exultante, dar oferenda em sentimento das minhas vitórias, pois sei que tudo na vida está em Tuas Mãos. Agradeço, ainda pelas oportunidades que me foram dadas e, principalmente por ter conhecido pessoas tão especiais, que junto ao senhor puderam me mostrar caminhos, que tenho seguido. Muito obrigada pelas palavras consoladoras que me chegam de todas as formas.

Eu sigo e sempre seguirei os Teus passos a todo o instante e ofereço aos meus irmãos tudo o que o Tu me ensinas e que eu aprendo com avidez.

Sinto-me sempre amparada pelo Senhor!!

Muito obrigada!!!

Aos meus pais, **Gilberto** e **Joana**, que sempre me ensinaram a viver com dignidade e sempre se dedicaram para que eu conseguisse trilhar o meu caminho. Muitos momentos tiveram que renunciar seus sonhos e me ajudaram de todas as formas para que o meu fosse realizado.

Aos meus irmãos **Ariel, Ariane e Arthus** e aos meus cunhados **Paulo e Denise**, que também sempre estiveram ao meu lado, torcendo por mim, valorizando minhas conquistas e me ensinando a reconhecer ainda mais o valor da vida e de cada uma de suas fases.

Aos meus sobrinhos **Rafael, Marina e Pedro** por me darem tantas alegrias e momentos de diversão.

**Muito obrigado por tudo!**

**Amo vocês!**

## Agradecimentos Especiais

Ao meu amigo **Eduardo (Du)** que sempre está ao meu lado. Sei que sou uma pessoa de muita sorte, pois tenho um amigo verdadeiro!!! Sempre disposto a ajudar, não importa se será fácil ou difícil, sempre diz sim!! Fundamental em todas as etapas da minha vida!! Um amigo sincero, paciente e que respeita as dores, alegrias e cada momento que o próximo está vivendo!! Muito obrigada!!!

...E seu principal objetivo de ser o de ser amigo.

Precisa-se de um amigo que faça a vida valer a pena, não porque a vida é bela, mas por já se ter um amigo.

Precisa-se de um amigo que nos bata no ombro, sorrindo ou chorando, mas que nos chame de amigo.

Precisa-se de um amigo para ter-se a consciência de que ainda se vive.

Carlos Drummond de Andrade

À minha amiga **Camilinha**:

A primeira palavra que me vêm à cabeça é gratidão. Uma pessoa muito especial, com uma coração enorme que só poderia pertencer à ela. Todos seus atos são com extrema compreensão e bondade. Sinto muita admiração como pessoa e profissional e tenho-a como um exemplo. Não caberiam todas as palavras necessárias para expressar minha sincera felicidade em tê-la como amiga. Muito obrigada!

À minha querida orientadora, **Prof<sup>a</sup>. Ana Lucia**:

Desde quando comecei como aluna de iniciação científica, sentia uma admiração muito grande. Achava impressionante sua forma de ministrar aulas e sua capacidade de passar todo o conhecimento. Com o passar do tempo, fui também, conhecendo como orientadora, e então, pude ver uma verdadeira orientadora, que tem habilidade de ajudar seus orientados, não fazendo por eles, e sim ensinando-os como conduzir seus trabalhos. Além disso, sempre expressa seus gestos e atitudes com muita educação e elegância. Consegue admiravelmente, ampliar seu conhecimento e aprender mais a cada dia. Uma pesquisadora com coragem e ousadia em desenvolver novas pesquisas. Sem dúvida, pude melhorar muito com seus ensinamentos, como pesquisadora, dentista e como pessoa. Assim, nada mais do que agradecer pela paciência e dedicação durante esses anos!!

Ao querido **Prof. Vergani**, que com sua rigidez e carinho pode sempre estar junto à minha orientadora, acompanhando todos os passos de nossas pesquisas. Uma pessoa que atua com muita precisão e conhecimento em cada decisão e atitude a ser adotada. Aproveito, neste agradecimento, para mostrar sincera admiração e gratidão por tê-lo como professor. Muito obrigada!

Ao querido **Prof. Zucolotto**, que tenho muita admiração pela coragem em arriscar o desenvolvimento de uma pesquisa com profissionais de outra área, enfrentando as dificuldades. Uma pessoa muito paciente em ouvir, sempre buscou nos entender e fez com que nossos pedidos pudessem ser realizados. Muito obrigada!

Ao **Jörg**, que com seus conhecimentos pode nos ajudar em momentos muito difíceis durante o desenvolvimento dessa pesquisa. Sua dedicação e atenção foi fundamental para que o andamento deste estudo pudesse ser concretizado.

Aos professores da Prótese Parcial Removível, **Prof<sup>a</sup>. Eunice e Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Cláudia**, que junto à “família removível” formam uma verdadeira equipe e desenvolvem pesquisas com seriedade, dedicação e determinação. Obrigada por compartilhar comigo suas experiências científicas e de vida, as quais influenciaram de forma muito positiva em muitas de minhas decisões e encorajaram-me em diversos momentos.

Ao meu namorado **Vinícius**, que está sempre ao meu lado em todos os momentos, deixando-os muito mais felizes e maravilhosos. Agradeço a Deus sempre por ter colocado uma pessoa tão especial na minha vida.

O tempo é muito lento para os que esperam, muito rápido para os que têm medo, muito longo para os que lamentam, muito curto para os que festejam. Mas para os que amam, o tempo é eternidade. (William Shakespeare).

Meu amor, muito obrigada por tornar meus momentos eternos e por me acompanhar nessa conquista.

## **Agradecimentos**

Aos docentes e funcionários do Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP, por permitirem o desenvolvimento deste trabalho, em especial à Martinha, Malú, pela amizade e pela atenção dispensada.

Aos Professores do Curso de Pós-Graduação em Reabilitação Oral, pela orientação, pelos ensinamentos e pelo apoio.

Aos Funcionários da Pós-Graduação, por toda atenção, auxílio e disponibilidade, em especial à Mara.

Aos Funcionários da Biblioteca, pela ajuda prestada em prol deste trabalho.

À Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP.

A CAPES pela bolsa de mestrado e em especial à FAPESP, também pela bolsa de mestrado (processo 2008/07454-9) pelo auxílio à pesquisa concedido para a realização deste trabalho (processos 2008/11700-5).

Aos estimados amigos de Pós-Graduação, em especial Mariana Basílio, Sabrina, Filipe, Diana, Juliana, Marianinha, Karen, Fer, Pierri, Carol, Ana Paula, Larissa, Cadu, Ana Lu, Paula, Cris, Lívia pela amizade e pelos momentos de descontração.

Aos meus amigos Dani, Mari e Ewerton e por terem me acompanhado nessa trajetória e, mesmo longe permanecem no meu coração.

Aos meus amigos André e Juliê que com muito carinho e paciência me acompanham em cada momento de dificuldade e alegria.

À minha vó Ema e a todos os meus tios, primos e familiares que sempre acreditaram em mim e muito incentivaram a busca por meus ideais, e que sempre torceram pelas minhas conquistas.

Aos queridos amigos Ju Godoy, Vivian, Mamé, Ju Rossignolo, Bruna Lopes, Camila Rossignolo, Melissa, Ju Prata, Aline Lopes, Bruna Bochio, Delise e Mário Verzola que sempre mostraram gestos de carinho, atenção e delicadeza e me fizeram perceber o quanto vocês são especiais! Obrigada pela amizade!!

Aos amigos Marcelo Del'Acqua, Zé Maurício ao Prof. Kiko, Prof. Boreli e ao Prof. Rogério pela troca de conhecimentos e por se tornarem pessoas importantes na minha trajetória.

Às técnicas Sônia e Estela que sempre me ajudaram com muito carinho e muita atenção.

Às alunas de iniciação científica Patrícia e Haline que sempre com entusiasmo e eficiência puderam me ajudar.

À tia Nadir, ao tio Marco, à Patrícia e ao César por sempre acreditarem e torcerem por mim.

À minha amiga e professora de inglês Fernanda por me ensinar e ajudar a superar minhas dificuldades com tanta sabedoria e paciência. Muito obrigada!

À Néia por ter sempre a paciência de organizar tudo o que preciso.

Aos alunos Rodrigo e Elias por terem ajudado no desenvolvimento deste projeto.

**Muito obrigado a todos aqueles que, direta ou indiretamente,  
fizeram parte desta etapa de minha vida!**

*Cada um que passa em nossa vida,  
passa sozinho, pois cada pessoa é única  
e nenhuma substitui outra.  
(Antoine de Saint-Exupéry)*

# SUMÁRIO

---

Resumo.....	14
Abstract.....	17
1 Introdução.....	20
2 Revisão da Literatura.....	26
3 Proposição.....	49
4 Material e Método.....	51
4.1-Preparo e caracterização da solução de AgNPs.....	51
4.2-Microrganismo e condições de crescimento.....	51
4.3-Determinação da suscetibilidade antifúngica.....	53
4.4-Incorporação da solução de AgNPs à resina acrílica .....	54
4.5-Confeção dos corpos-de-prova.....	54
4.6-Medida do ângulo de contato para avaliar a hidrofobicidade/hidrofilicidade da superfície.....	57
4.7-Medida da rugosidade superficial.....	58
4.8-Teste de aderência.....	59
4.8.1- Microrganismo e condições de crescimento.....	59
4.8.2-Formação dos Biofilmes de <i>Candida albicans</i> nos corpos-de-prova.....	59
4.8.3-Ensaio de XTT.....	61
5 Resultado.....	63
5.1- <i>Caracterização da solução de nanopartículas de AgNPs</i> .....	64
5.1.1- Espectroscopia Eletrônica Ultravioleta Visível (UV-vis).....	64
5.1.2-Espectroscopia Vibracional na região do Infravermelho (FTIR).....	64
5.1.3- Espalhamento de luz (Dynamic Light Scattering - DLS).....	66
5.2- <i>Suscetibilidade antifúngica</i> .....	67
5.3- <i>Ângulo de contato</i> .....	67
5.4- <i>Testes de aderência e formação de biofilme</i> .....	68
6 Discussão.....	71
7 Conclusão.....	77

<b>8 Referências.....</b>	<b>79</b>
<b>9 Apêndice.....</b>	<b>87</b>

***RESUMO***

Wady AF. Propriedade antifúngica de resina para base de prótese modificada com nanopartículas de prata [Dissertação de Mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2011.

## **Resumo**

Apesar do uso de drogas antifúngicas no tratamento da estomatite protética, freqüentemente a infecção é persistente e a resistência microbiana tem sido observada nos biofilmes de *Candida albicans*. Dessa forma, existe a necessidade de se desenvolver outros agentes antimicrobianos tais como as nanopartículas de prata (AgNPs). Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito de uma solução preparada de AgNPs sobre *C. albicans* em suspensão. Além disso, os efeitos da incorporação de diferentes concentrações da solução de AgNPs em uma resina acrílica para base de prótese e o armazenamento por períodos de até 180 dias no ângulo de contato, adesão e formação de biofilme foram avaliados. A solução de AgNPs foi sintetizada por meio de redução química utilizando borohidreto de sódio (NaBH<sub>4</sub>) como agente redutor e polivinil álcool (PVA) como estabilizante, e foi caracterizada utilizando espectroscopia UV-visível (UV-vis), espectrometria de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) e espalhamento de luz dinâmico (DLS). A susceptibilidade antimicrobiana da solução de AgNPs de diferentes concentrações (de 1000 a 20 ppm) foi avaliada em *C. albicans* suspensão (ATCC 90028). A solução de AgNPs foi também misturada com o pó da resina para produzir resinas acrílicas com AgNPs incorporadas nas concentrações finais de 1000, 750, 500, 250 e 30 ppm. Resina sem AgNPs foi utilizada como controle. Amostras em forma de discos (13 × 2 mm) de cada concentração (n=72) foram preparadas e armazenadas em PBS estéril por 0, 7, 90 e 180 dias (n=18). Após esses períodos, os ângulos de contato foram mensurados em um goniômetro. A seguir, 9 amostras de cada concentração foram utilizadas para o teste de aderência de *C. albicans* (90 minutos de incubação), e 9 para o teste de formação de biofilme (48 horas de incubação). Os efeitos da solução de AgNPs e das amostras de resina acrílica para base de prótese na *C. albicans* foram avaliados utilizando o método de redução do XTT. O método de redução química descrito neste estudo possibilitou a obtenção de uma solução de AgNPs com, aproximadamente, 9 nm, que demonstrou alta

atividade antifúngica contra *C. albicans*, em todas as concentrações avaliadas. Após a incorporação da solução de AgNPs à resina acrílica para base de prótese, não houve efeito significativo contra *C. albicans*, em todas as concentrações avaliadas. A incorporação da solução de AgNPs à resina acrílica proporcionou redução dos valores médios de ângulo de contato; entretanto, não houve efeito significativo na aderência ou na formação de biofilme de *C. albicans*. Houve aumento dos valores de ângulo de contato e de absorbância obtidos nos testes de adesão e formação de biofilme após o armazenamento dos corpos-de-prova por períodos de 90 e 180 dias.

**Palavras-chave:** *Candida albicans*, nanopartículas, prótese total, biofilmes, estomatite.

***ABSTRACT***

Wady AF. Antifungal properties of a denture base resin modified with silver nanoparticles [Dissertação de Mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2011.

### **Abstract**

Despite the use of antifungal drugs to treat denture stomatitis, infection is often persistent and antifungal resistance has been observed in *C. albicans* biofilms. Therefore, there is a need to develop alternative antimicrobial agents such as silver nanoparticles (AgNPs). Thus, the objective of this study was to evaluate the effect of a prepared AgNPs aqueous solution against *C. albicans* suspension. Additionally, the effects of incorporation of different concentrations of the AgNPs solution into a denture base acrylic resin and storage for up to 180 days on the contact angle, *C. albicans* adhesion and biofilm formation were evaluated. The AgNPs solution was synthesized by chemical reduction using sodium borohydride as reducing agent and polyvinyl alcohol as stabilizer, and was characterized by UV-visible spectroscopy, Fourier transform infrared spectroscopy and Dynamic Light Scattering. The antimicrobial susceptibility of AgNPs solution of different concentrations (from 1000 to 20 ppm) was performed against *C. albicans* suspension (ATCC 90028). The AgNPs solution was also mixed with the acrylic powder to produce silver-incorporated acrylic resins at the final concentrations of 1000, 750, 500, 250 and 30 ppm. Resin without AgNPs was used as control. Disk-shaped samples (13 × 2 mm) of each concentration (n=72) were prepared and stored in sterile PBS for 0, 7, 90 and 180 days (n=18). After the storage periods, the contact angles were measured in a goniometer. Then, 9 samples of each concentration were used for the *C. albicans* adherence assay (90 minutes of incubation), and 9 for the biofilm formation assay (48

hours of incubation). The effects of the AgNPs solution and the denture base acrylic resin samples on *C. albicans* were evaluated using the XTT reduction assay. The AgNPs solution, with nanoparticles of, approximately 9 nm, demonstrated high antimicrobial activity in all tested concentrations. After the AgNPs were incorporated into the denture base acrylic resin, no effect was observed against *C. albicans*. The incorporation of the AgNPs reduced the contact angles of the denture base acrylic resin; however no effect on the *C. albicans* adherence and biofilm formation was observed. There was significant increase in the mean contact angles and mean absorbance values obtained in the *C. albicans* adherence and biofilm formation assays, after the specimens were stored for 90 and 180 days.

**Keyword:** *Candida albicans*, nanoparticles, dentures, biofilms, stomatitis

## ***INTRODUÇÃO***

## 1 Introdução

As espécies de *Candida* são encontradas na cavidade bucal de 60 a 100% dos pacientes usuários de próteses removíveis<sup>14</sup> e estão entre os agentes etiológicos mais comuns de infecções fúngicas<sup>53</sup>. Esses microrganismos se aderem à superfície da prótese, formando um biofilme<sup>59</sup> que atua como um reservatório de microrganismos<sup>21</sup>, podendo resultar em alterações patológicas na mucosa de revestimento. Dentre essas alterações, a mais comumente observada é a estomatite induzida por prótese<sup>11,58,73</sup>, que segundo Budtz-Jorgensen et al.<sup>7</sup>, ocorre em 72% dos usuários de prótese. Essa patologia pode se apresentar, clinicamente, como hiperemia localizada, área eritematosa difusa ou hiperplasia da mucosa, freqüentemente associada com áreas atróficas<sup>4</sup>. Apesar das espécies *Candida krusei*, *Candida glabrata* e *Candida parapsilosis*, entre outras, serem reconhecidas como importantes patógenos, a *C. albicans* ainda é considerada como o agente etiológico principal dessa patologia<sup>6,19</sup>. Embora as infecções orais por *Candida* não sejam diretamente associadas à mortalidade, elas constituem causa de morbidade e resultam em dor crônica e desconforto na mastigação, limitando a nutrição de indivíduos imunossuprimidos e idosos<sup>31</sup>.

Além da sua alta incidência em usuários de prótese, outra preocupação em relação à estomatite induzida por prótese é a possibilidade de desencadear infecção em outros sistemas. Tem sido relatado que a deglutição ou aspiração contínua de microrganismos presentes no biofilme formado nas superfícies das próteses expõe os pacientes a riscos de infecções<sup>39</sup>. Fanello et al.<sup>18</sup>, em 2006, demonstraram uma associação significativa entre a colonização oral e a infecção nosocomial por fungos em pacientes idosos hospitalizados. A disseminação das espécies de *Candida*, da cavidade bucal para o trato gastrointestinal superior ou vias sanguíneas torna-se ainda mais relevante nos indivíduos que apresentam o sistema imunológico comprometido, como os portadores do vírus HIV. Em estudo recente<sup>64</sup>, foi constatado que, dos 85 pacientes HIV positivos avaliados, 35 apresentaram infecções fúngicas invasivas, sendo a *C. albicans* o patógeno mais freqüente. Os 35 pacientes foram submetidos a tratamento antiviral e antifúngico, tendo sido observada resposta positiva em 27 e evolução para óbito em 8.

O tratamento da estomatite induzida por prótese varia de acordo com o grau de severidade da infecção fúngica e pode ser tanto tópico como sistêmico, utilizando-se antifúngicos como a nistatina, e o fluconazol<sup>48,56,67</sup>. Apesar de esses medicamentos proporcionarem melhora no quadro clínico, eles apresentam limitações como: dificuldade dos pacientes, particularmente os idosos, em seguir de forma correta a posologia recomendada<sup>49</sup>; aparecimento de cepas com resistência secundária que se desenvolvem como resposta da exposição do microrganismo à droga<sup>72</sup>; indução de efeitos hepatotóxicos e nefrotóxicos<sup>32</sup>.

Outro aspecto importante é que o biofilme presente na superfície das próteses constitui uma comunidade complexa na qual ocorrem interações das células com o substrato, entre os microrganismos, e a produção de matriz extracelular<sup>13</sup>. Os biofilmes são difíceis de serem eliminados e aumentam a resistência dos microrganismos aos agentes antimicrobianos<sup>11</sup>. Dessa forma, a reincidência da estomatite induzida por prótese foi observada em 50% dos casos, independentemente da terapia utilizada<sup>5</sup>. Além disso, estudos têm demonstrado que os biofilmes são significativamente menos susceptíveis aos agentes antimicrobianos que as células na forma planctônica<sup>17,36,63</sup>. Esses aspectos indicam que o tratamento dessa patologia deve inativar a *C. albicans* presente tanto na mucosa oral como nas próteses<sup>48</sup>. Alguns métodos têm sido recomendados para a remoção ou inativação do biofilme como: escovação da prótese associada com imersão em soluções desinfetantes<sup>44</sup> e irradiação com energia de micro-ondas<sup>3,38</sup>. Entretanto, da mesma forma que os agentes antifúngicos, esses métodos também apresentam algumas desvantagens, como possíveis efeitos citotóxicos das soluções desinfetantes<sup>57</sup>, alterações nas propriedades físicas e mecânicas das resinas acrílicas utilizadas na confecção das próteses<sup>8,35,45,50,71</sup> e a limitação motora dos pacientes idosos que pode dificultar a correta escovação<sup>49</sup>.

Em função das limitações e desvantagens apresentadas, uma importante alternativa terapêutica para a estomatite induzida por prótese seria a prevenção ou a redução da aderência da *C. albicans* sobre a parte interna das próteses. A adesão e colonização da *Candida*, tanto às superfícies orgânicas quanto inorgânicas<sup>43</sup> é um processo complexo e vários fatores estão envolvidos, dentre os quais podemos destacar a hidrofobicidade da superfície celular e do substrato<sup>16,19,26,43,47,60-61</sup>. Estudos têm demonstrado que existe uma relação entre o número de *Candida*

aderidas por unidade de área e o ângulo de contato do substrato, ou seja, quanto mais hidrofóbica a superfície, maior a aderência<sup>16,26,33,60</sup>. Segundo Klotz et al.<sup>26</sup>, em 1985, os resultados por eles obtidos evidenciaram que a aderência de *Candida spp.* às superfícies plásticas é predominantemente controlada por forças hidrofóbicas, designadas de forças de atração London van der Waals. As características da rugosidade da superfície do substrato também podem afetar a formação inicial e o desenvolvimento dos biofilmes de *C. albicans*<sup>30</sup>.

Um possível método para a prevenção ou redução da aderência da *C. albicans* sobre a parte interna das próteses seria a modificação das resinas para base de prótese, por meio da adição de agentes antimicrobianos. A prata é, de longa data, reconhecida por sua ampla propriedade antimicrobiana<sup>24,40</sup> e tem sido estudada no desenvolvimento de agentes antimicrobianos alternativos<sup>12,25,37,41,68</sup>. Materiais contendo esse metal têm sido utilizados em diversas aplicações, como por exemplo, na redução de infecções em tratamentos de queimadura, bem como na prevenção da colonização bacteriana em tecidos, próteses ortopédicas, cateteres, enxertos vasculares, materiais dentários restauradores e como inibidor de degradação em cosméticos<sup>20,23,27,34,42,55,76</sup>. Os íons de prata e os compostos que contêm prata são altamente tóxicos para os microrganismos, demonstrando alta atividade biocida em várias espécies de bactérias<sup>23,68</sup>. Os possíveis mecanismos por meio dos quais os íons de prata inativam os microrganismos são inibição da síntese de ATP, desnaturação do DNA e bloqueio das cadeias respiratórias dos microrganismos, atuando em algumas enzimas<sup>28</sup>. Outro aspecto relevante a ser mencionado é que os resultados, em geral, têm demonstrado que as bactérias apresentam baixa propensão ao desenvolvimento de resistência aos produtos que contêm prata<sup>12</sup>.

Recentes avanços têm proporcionado a oportunidade de se criar novos tipos de materiais nanoestruturados com características definidas de superfície e propriedades estruturais<sup>68</sup>. Segundo Kim et al.<sup>23</sup>, em 2007, a redução do tamanho das partículas dos materiais é um método eficiente e confiável para se aumentar sua biocompatibilidade. Além disso, tem sido proposto que a toxicidade é dependente do tamanho e da forma da nanopartícula<sup>40</sup>, tendo sido observado que nanopartículas menores que 10 nm foram capazes de atravessar a membrana celular, e assim, acumular-se dentro do microrganismo podendo alterar o seu funcionamento.

Panáček et al.<sup>42</sup>, em 2006, relataram que quanto menor o tamanho da partícula, maior a área superficial para a interação com a membrana da célula microbiana, aumentando o efeito bactericida. Assim, estudos recentes têm avaliado a atividade antimicrobiana de AgNPs, as quais, por apresentarem efetividade antimicrobiana<sup>12</sup> e baixa citotoxicidade em células de mamíferos<sup>23</sup>, têm sido um dos nanomateriais mais comumente utilizados. Kong, Jang<sup>28</sup>, em 2008, relataram que as AgNPs apresentam atividade biocida maior que os íons de prata, na mesma concentração. Sondi, Salopek-Sondi<sup>68</sup>, em 2004, avaliaram a atividade antimicrobiana de AgNPs contra uma bactéria Gram negativa e observaram, nas análises microscópicas, danos na parede celular, liberação de substâncias intracelulares, incorporação de AgNPs na membrana celular, bem como penetração de algumas dessas partículas no interior do microrganismo. Samuel, Guggenbichler<sup>62</sup>, em 2004, relataram que a incorporação de AgNPs em cateteres, mesmo em concentrações não consideradas bactericidas, apresentou efetiva ação antimicrobiana, prevenindo a aderência e proliferação dos microrganismos e diminuindo, conseqüentemente, a formação de biofilme. Também foi relatado que a incorporação de AgNPs em matrizes poliméricas resultou em uma superfície mais hidrofílica, o que diminuiu a aderência de microrganismos, a formação de biofilme e a deposição de proteínas e eletrólitos responsável pela colonização microbiana. Panáček et al.<sup>42</sup>, em 2006, sintetizaram AgNPs e avaliaram seu efeito bactericida, tendo observado que houve inibição do crescimento e da multiplicação de bactérias, incluindo cepas altamente resistentes a antibióticos. Kim et al.<sup>23</sup>, em 2007, avaliaram o efeito de AgNPs no crescimento de 2 bactérias (*Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*) e 1 fungo isolado de mastite bovina e verificaram que houve inibição da bactéria Gram negativa e do fungo, em baixa concentração dessas partículas. Kong, Jang<sup>28</sup>, em 2008, sintetizaram nanofibras de polimetil metacrilato (PMMA) contendo AgNPs e verificaram que essas fibras apresentaram excelente potencial biocida em bactérias Gram positivas e negativas, sugerindo sua aplicação em materiais utilizados na área biomédica. Um estudo recente<sup>55</sup> demonstrou, além da ação bactericida da prata, sua ação fungicida. Os autores recobriram a superfície de cateteres plásticos com AgNPs e avaliaram a atividade antimicrobiana utilizando 6 diferentes microrganismos, incluindo bactérias e a *C. albicans*, e a toxicidade sistêmica em ratos. Os resultados demonstraram que

os cateteres não apresentaram toxicidade e que, para a *C. albicans*, houve inibição de 100% do crescimento e de 84 a 98% da formação de biofilme.

Outro aspecto importante a ser considerado é que o material modificado pela incorporação de prata deve ser quimicamente durável e liberar gradativamente os íons de prata por longo período, mantendo, dessa forma, sua atividade antimicrobiana. A oxidação da prata metálica ( $\text{Ag}^0$ ) das AgNPs para a espécie ativa  $\text{Ag}^+$  é possível através da interação da prata com as moléculas de água<sup>29</sup>. Assim, a difusão da água na estrutura do polímero pode controlar a liberação desses íons<sup>29</sup>. Yu et al.<sup>75</sup>, em 2008, avaliaram a liberação de íons de prata de resina para prótese à base de polimetil metacrilato (PMMA) imersa em saliva artificial a 37°C por período de 54 dias. A liberação foi extremamente lenta indicando que atividade antimicrobiana prolongada pode ser obtida. A concentração de prata adicionada ao material também é um fator que pode influenciar essa liberação<sup>29</sup>. Além disso, resultados têm sugerido que, em polímero à base de metil metacrilato (MMA), não há relação direta entre o aumento da quantidade de prata adicionada e a atividade antimicrobiana e que existem concentrações ótimas para se prevenir a aderência de bactéria, como o *Streptococcus mutans*<sup>66</sup>. Embora alguns autores têm sugerido que a efetividade antimicrobiana dos polímeros que apresentam AgNPs incorporadas é relacionada com a liberação de íons de prata ou das próprias AgNPs<sup>22,28</sup>, outros tem relatado que o efeito inibitório foi provavelmente devido ao contato direto entre os microrganismos e os materiais<sup>1</sup>.

Esses resultados indicam que a incorporação de prata em resinas utilizadas na confecção das bases das próteses pode ser um método eficaz na prevenção da estomatite induzida por prótese. Embora esse procedimento possa resultar em benefício para os usuários de próteses, pouca informação foi obtida até o momento<sup>9,66,75</sup>, indicando a necessidade de novos estudos.

***REVISÃO DA LITERATURA***

## 2 Revisão da Literatura

Klotz et al.<sup>26</sup>, em 1985 avaliaram a afinidade hidrofóbica das células fúngicas por avaliação bifásica água-hidrocarbono e medida de ângulo de contato de monocamada de microrganismos e dos substratos (politetrafluorretileno –Teflon; Polietilertefalato - PET, polimetilmetacrilato - PMMA e poliestireno) objetivando a caracterização biofísica da aderência de *Candida* spp. às superfícies poliméricas. Além disso, os autores estudaram o envolvimento das forças eletrostáticas no processo de aderência, por meio da alteração de carga de superfície fúngica por bloqueio seletivo dos grupos amino e carboxil. Os resultados obtidos demonstraram que a hidrofobicidade fúngica correlacionou bem com a tendência dos microrganismos de aderirem-se ao poliestireno, independente do método utilizado (medida do ângulo de contato e avaliação bifásica água-hidrocarbono), exceto para a *C. krusei*, o que pode indicar que essa espécie possui um mecanismo adicional envolvido na aderência. Com relação à aderência fúngica aos polímeros, foi evidente que houve uma relação linear entre o número de células aderidas por unidade de área e o ângulo de contato do substrato, ou seja, quanto mais hidrofóbica a superfície, maior a aderência celular por unidade de área. Quando os autores avaliaram as alterações de cargas realizadas nas superfícies fúngicas, eles observaram que a carga positiva nos fungos ocasionou uma alteração do comportamento de aderência, tornando-os, consideravelmente, mais aderentes. Superfícies poliméricas apresentam vários graus de carga superficial negativa. Da mesma forma, todas as células vivas (incluindo os fungos) possuem carga superficial negativa. Diante disso, os autores concluíram que as interações eletrostáticas repulsivas realmente existem, porque na ausência delas, a aderência é aumentada. Eles ainda puderam supor que essas interações eletrostáticas, embora presentes e capazes de influenciar a cinética de aderência são menores quando comparadas às simultâneas forças atrativas de London-van der Waals, ou hidrofóbicas, considerando que mesmo na presença delas (forças repulsivas) a adesão ocorre. Por esse motivo, segundo os autores, as interações eletrostáticas repulsivas são sobrepostas pelas simultâneas forças atrativas de London-van der Waals.

Samaranayake et al.<sup>60</sup> (1994) compararam a adesão *in vitro* de vinte isolados orais de *C. krusei* e cinco isolados de *C. albicans* às células epiteliais e às superfícies acrílicas. Além disso, os autores fizeram a inoculação das suspensões fúngicas em ratos. Os resultados demonstraram que os isolados de *C. krusei* aderiram em números significativamente maiores às células e às superfícies acrílicas comparados aos isolados de *C. albicans*. Entretanto, a inoculação nos animais demonstrou que a *C. albicans* apresenta quase 11 vezes maior potencial de colonização comparada à *C. krusei*. Esse baixo potencial de virulência da *C. krusei* também foi encontrado na avaliação da adesão dessa espécie às células epiteliais bucais, onde valores menores de aderência foram encontrados comparados à adesão da *C. albicans*. Os autores sugerem que esses resultados apontam para o fato de que o fenômeno da adesão tem um papel decisivo na colonização oral pela *Candida*. O fato de a *C. krusei* ter apresentado afinidade cerca de 2 a 4 vezes maior para o acrílico comparado às células HeLa pode ser explicado pela maior hidrofobicidade da superfície celular dessa espécie comparada à *C. albicans*. Apesar desses resultados, os autores consideraram que, em termos clínicos, o achado mais interessante deste trabalho foi a redução significativa da aderência de *C. albicans* às células epiteliais bucais de indivíduos que se submeteram a transplantes de medula, em comparação às células de indivíduos saudáveis. Isto poderia ser explicado pelos regimes de drogas tópicas e sistêmicas aos quais esses pacientes são submetidos. Mas, os autores não puderam justificar a adesão similar da *C. krusei* às células epiteliais bucais, tanto de indivíduos saudáveis quanto de indivíduos doentes. Esse resultado indica que regimes de droga comumente utilizados para pacientes transplantados podem selecionar microrganismos menos comuns, tais como a *C. krusei* em preferência à *C. albicans*. Portanto, os autores concluíram que o mecanismo de adesão desempenha um papel significativo na colonização da *C. krusei* em ambos os indivíduos, doentes e saudáveis.

Luo, Samaranayake<sup>33</sup> (2002) compararam a hidrofobicidade relativa de superfície celular e a adesão às superfícies acrílicas de prótese de 34 isolados de *C. glabrata* e 15 de isolados de *C. albicans*. A relação positiva entre esses dois fatores também foi estudada para a *C. glabrata*, considerando que estudos anteriores com outras espécies de *Candida* demonstraram relação próxima entre eles. Além disso,

os autores avaliaram o efeito da temperatura de crescimento (25 °C e 37 °C) na hidrofobicidade de superfície celular e na aderência às superfícies acrílicas. A fim de avaliarem a aderência, os autores contaminaram corpos-de-prova de resina acrílica autopolimerizável de 5 x 5 mm<sup>2</sup> com os inóculos padronizados na concentração de 1 x 10<sup>7</sup> cel/ml, durante 1 hora, a 37 °C. A medida da aderência foi realizada por meio da técnica gram modificada e quantificada por meio de técnica automática e manual. A medida da hidrofobicidade foi realizada através de técnica de separação bifásica. Os resultados demonstraram que as duas espécies apresentaram boa aderência às superfícies acrílicas, entretanto, a *C. glabrata* apresentou aderência 247% maior às superfícies acrílicas quando comparada a *C. albicans*, além de maior hidrofobicidade relativa da superfície celular. As fotomicrografias demonstraram que todos os isolados da *C. glabrata* apresentaram tamanhos menores e coaderência mais pronunciada comparados aos isolados de *C. albicans*. Quando avaliada a relação entre a hidrofobicidade relativa da superfície celular e a adesão da *C. glabrata* e da *C. albicans*, correlação positiva significativa foi encontrada, ou seja, quanto maior a hidrofobicidade dos isolados, maior a tendência desses de aderirem-se às superfícies acrílicas. A variação de temperatura no meio de cultura afetou significativamente a hidrofobicidade relativa da superfície celular de 4 dos 6 isolados avaliados, entretanto, o padrão de alteração foi inconsistente. Da mesma forma, a aderência da *C. glabrata* às superfícies acrílicas acompanhou as alterações na hidrofobicidade da superfície celular induzidas pela variação de temperatura, ou seja, quando a hidrofobicidade da superfície celular de um determinado isolado de *C. glabrata* aumentou, devido à variação da temperatura, houve um aumento concomitante e proporcional na aderência às superfícies acrílicas. Portanto, os autores concluíram que os isolados de *C. glabrata* apresentaram hidrofobicidade de superfície celular e aderência ao acrílico superiores comparadas aos isolados de *C. albicans*, mas que estudos *in vivo* em modelos animais podem ser necessários para definir o significado desses achados na patogênese das infecções de *C. glabrata*.

Samuel, Guggenbichler<sup>62</sup>, em 2004, relataram que cateteres contaminados ou infectados são uma fonte importante de infecções hospitalares responsáveis por mais de 40% de todos os episódios de sepse hospitalar. A utilização de antibióticos, assim como modificações nas superfícies, não foi eficiente na prevenção da

contaminação do interior dos cateteres. Os antibióticos penetram no biofilme com certa dificuldade e não alcançam concentrações suficientes. É universalmente aceito que os antibióticos não podem ser utilizados para profilaxia, devido ao surgimento e indução de resistência. Eles são eventualmente utilizados para terapias. Foi demonstrado também que os desinfetantes são capazes de induzir a resistência antimicrobiana. Assim, a utilização da "atividade oligodinâmica" da prata poderia ser uma alternativa viável sem os efeitos adversos dos antibióticos e desinfetantes: a prata é um composto altamente ativo contra um amplo espectro de bactérias e fungos que colonizam superfícies plásticas. A distribuição uniforme de AgNPs ativa por grama em diversos polímeros, como poliuretano e silicone, resultaram em excelente atividade antimicrobiana contra um amplo espectro de microrganismos *in vitro*.

Sondi, Salopek-Sondi<sup>68</sup>, em 2004, avaliaram a atividade antimicrobiana de AgNPs contra *Escherichia coli* (modelo de bactéria Gram-negativa). Testes bacteriológicos foram realizados com diferentes concentrações de AgNPs. Essas partículas mostraram efeito bactericida. Microscopias eletrônicas de varredura e de transmissão (MEV e MET) foram utilizadas para o estudo da ação biocida dos nanomateriais avaliados. Os resultados confirmaram que as células de *E. coli* tratadas com AgNPs foram danificadas, mostrando a formação de "pits" na parede celular da bactéria e AgNPs foram observadas na membrana da bactéria. A membrana com essa morfologia exibiu aumento significativo da permeabilidade, resultando em morte celular. Assim, segundo os autores, esses nanomateriais podem ser preparados de maneira simples e com custo efetivo e podem ser adequados para a formulação de novos tipos de materiais bactericidas.

Kumar et al.<sup>29</sup>, em 2005, afirmaram que há muitas pesquisas sobre materiais antimicrobianos contendo prata. A prata metálica é praticamente não reativa mas, em meio aquoso, os íons de prata são liberados e a atividade antimicrobiana depende do acúmulo de baixa concentração de íons de prata no interior da célula. Amostras de poliamida, preenchidas com vários tipos de prata comerciais e um pó de prata elementar, foram preparadas com a dimensão de 20 × 10 × 1 mm. A seguir, a característica de liberação de íons de prata em meio aquoso foi avaliada e

discutida. A voltametria foi utilizada para estimar a quantidade de íons de prata liberada dos compósitos. A propriedade antimicrobiana foi avaliada utilizando-se *S. aureus*, *E. coli* e *C. albicans*. A sensibilidade desses microrganismos foi determinada pela contagem de colônias apresentada após o teste com o material contendo agente antimicrobiano durante um período de 28 dias. Foi observado que a liberação dos íons de prata é dependente do tempo de imersão em água e da natureza da prata. No armazenamento prolongado em água, a capacidade biocida do compósito contendo a prata elementar é promissora comparada àqueles contendo a prata comercial. Os compósitos liberaram íons de prata em concentrações capazes de apresentar eficácia antimicrobiana e serem ativos contra os microrganismos. Houve boa correlação entre os íons de prata liberados no experimento e os resultados dos testes antimicrobianos. Os resultados da influência da natureza da prata, a capacidade biocida da liberação de íons e a variação do armazenamento prolongado sobre a propriedade de liberação podem auxiliar na concepção de biomateriais se interesse industrial.

Morones et al.<sup>37</sup>, em 2005, relataram que é esperado que a nanotecnologia abra novos caminhos para combater e prevenir doenças por meio da escala nanométrica. Dentre os nanomateriais mais promissores, as nanopartículas metálicas possuem propriedades antibacterianas. O estudo dos nanomateriais bactericidas é particularmente oportuno, considerando o recente aumento de cepas de bactérias resistentes aos antibióticos mais potentes. O presente trabalho estudou o efeito de AgNPs com tamanho na faixa de 1-100 nm em bactérias Gram-negativas com a utilização a técnica “high angle annular dark Field” (HAADF) e MET. Os resultados indicaram que as propriedades bactericidas das nanopartículas são dependentes do tamanho, pois as nanopartículas que apresentam interação direta com as bactérias são aquelas que têm, preferencialmente, um diâmetro de aproximadamente, 1-10 nm.

Panáček et al.<sup>42</sup>, em 2006, afirmaram que a prata tem sido reconhecida pela sua atividade antibacteriana desde os tempos da Grécia antiga. A atividade antimicrobiana das partículas de prata coloidal é influenciada pelo tamanho de suas partículas, ou seja, quanto menores as partículas, maior o efeito antimicrobiano. A

forma mais comum de sintetizar AgNPs é a redução química de uma solução de sal de prata com um agente redutor como o borohidreto ( $\text{NaBH}_4$ ), citrato e ácido ascórbico. Assim, neste estudo, os autores avaliaram a síntese de AgNPs coloidal em um único passo, com controle do tamanho das partículas, bem como a atividade antibacteriana das mesmas. Na síntese, a redução do cátion  $[\text{Ag}(\text{NH}_3)_2]^+$  foi realizada utilizando-se 4 sacarídeos como agentes redutores: 2 monossacarídeos (glicose e galactose) e 2 dissacarídeos (maltose e lactose). Várias concentrações de amônia foram avaliadas (0,005 a 0,20 mol/L) e o pH também variou de 11,5 a 13,0. O tamanho médio, distribuição do tamanho, morfologia e estrutura das partículas foram determinados pelo DLS, MET e Uv-vis. Os testes microbiológicos foram realizados com bactérias Gram-negativas e positivas, incluindo cepas resistentes, determinando-se a concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM). Os resultados demonstraram que as partículas de prata coloidal sintetizadas apresentaram tamanho médio de 25 a 450 nm, dependendo da concentração de amônia e do tipo de agente redutor utilizado. O tamanho das partículas aumentou com o aumento da concentração de amônia. Já em relação ao agente redutor, o tamanho das partículas obtido com os dissacarídeos (lactose e maltose) foi, em geral, menor que aquele obtido com os monossacarídeos (glicose e galactose), na mesma concentração de amônia; resultados confirmados pelas análises MET e DLS. Os testes microbiológicos demonstraram que partículas de prata sintetizadas utilizando-se dissacarídeos como agentes redutores apresentaram maior efeito antibacteriano do que aquelas sintetizadas com monossacarídeos. Segundo os autores, esse fenômeno ocorre devido ao tamanho das partículas, que é menor quando utilizado dissacarídeos comparados aos monossacarídeos. Assim, o estudo concluiu que foi possível sintetizar AgNPs coloidal com tamanho controlado através do método avaliado. Além disso, o pH e o agente redutor utilizados influenciam no tamanho da partícula, assim como a concentração de amônia. A propriedade antibacteriana dessas nanopartículas foi demonstrada com sucesso contra bactérias Gram-negativas e positivas, incluindo cepas resistentes

Kim et al.<sup>23</sup>, em 2007, afirmaram que os efeitos antibacterianos dos sais de prata têm sido relatados desde a antiguidade. A prata é freqüentemente utilizada para o controle do crescimento bacteriano, em várias aplicações, incluindo trabalhos

dentais, cateteres e feridas por queimadura. O efeito antimicrobiano dos íons ou sais de prata são conhecidos, mas o efeito das AgNPs sobre os microrganismos e mecanismos antimicrobianos não são claramente relatados. Para o estudo, foi preparada uma solução de AgNPs à partir do nitrato de prata e do borohidreto como agente redutor. Após a solução obtida, foram realizados testes para avaliar o tamanho, forma e distribuição das AgNPs. Foram também realizados testes para avaliar a atividade antimicrobiana das AgNPs contra um fungo isolado de mastite bovina, *E. coli* e *S. aureus*, por meio do método da difusão em ágar. Os valores da concentração inibitória mínima (CIM) das AgNPs para os microrganismos foram determinados. Além disso, foi realizado um estudo do efeito antioxidante das AgNPs e nitrato de prata na atividade antimicrobiana. Para esse estudo foi utilizado a *E. coli* inoculada em placas de MHA com 20 µL de AgNPs e nitrato de prata na concentração de 33 nM, separadamente. Foi utilizado o N-acetilcisteína (NAC) como agente antioxidante. Os resultados para o fungo isolado de mastite bovina mostraram que a inibição do crescimento foi similar ao controle positivo (itraconazol) na concentração da solução de 33 nM, com significativa inibição na concentração de 13,2 nM. Assim, o CIM para esse fungo foi estimado entre 6,6 e 13,2 nM. Nos resultados deste estudo, as AgNPs foram mais efetivas contra a *E. coli*, com o CIM estimado entre 3,3 e 6,6 nM. Para *S. aureus* o efeito de inibição do crescimento foi suave mesmo em altas concentrações, e não teve efeito inibitório significativo comparado com o controle positivo (gentamicina). Os testes realizados com o antioxidante NAC mostraram que quando esse é utilizado, tanto para a solução de nanopartículas ou de nitrato de prata, o efeito antimicrobiano é anulado. Os autores discutem possíveis mecanismos de inibição do crescimento dos microrganismos, utilizando-se as AgNPs como agente antimicrobiano. Assim, os autores concluíram que as nanopartículas preparadas com a metodologia desse estudo apresentam-se promissoras como agente antimicrobiano. Baseados nesses resultados, as AgNPs podem resultar em descobertas em vários campos como dispositivos médicos e sistemas antimicrobianos.

Damm et al.<sup>15</sup>, em 2007, avaliaram AgNPs elementares, as quais foram sintetizados em poliamida 6 (PA6) com a redução termica de íons de prata durante o processamento da mistura do acetato PA6/silver. Foi avaliada a liberação de íons de

prata da PA6 saturada com 2% em peso de AgNPs durante 100 dias, obedecendo a uma lei de velocidade (quantidade de prata liberada por litro de líquido imerso e por  $\text{cm}^2$  da superfície da amostra. Durante esse período, foram liberados da superfície, aproximadamente, 17  $\mu\text{g}$  de prata por dia. O PA6/Ag-nanocompósito apresentou atividade contra *Escherichia coli*. Porém, não houve efetividade antimicrobiana para a PA6 pura. Além disso, a imersão em água destilada dos nanocompósitos contendo prata, durante 100 dias, não reduziu a atividade antimicrobiana contra *Escherichia coli*. Assim, os autores consideraram que a PA6 saturada com 2% em peso de nanopartícula de prata é um material antimicrobiano eficaz para aplicações em longo prazo.

Radziuk et al.<sup>52</sup>, em 2007, relataram que muitas pesquisas têm estudado a fabricação de AgNPs com potencial para aplicação em diversas áreas. Vários métodos têm sido desenvolvidos para o preparo de nanopartículas menores que 100 nm. Dentre esses métodos, a redução química é a mais comum onde se utilizam diferentes agentes redutores para a síntese de AgNPs como borohidreto de sódio, etanol, etileno glicol, ácido ascórbico e aminas alifáticas. A propriedade de sintetizar AgNPs consiste, principalmente, em determinar seu tamanho, forma e a estrutura do cristal. Materiais poliméricos são usualmente utilizados como estabilizantes para prevenir a aglomeração e a precipitação das nanopartículas. No presente estudo, foram preparadas AgNPs com tamanho de 23 nm sintetizadas pela redução química de nitrato de prata em meio aquoso de borohidreto de sódio. Foram utilizados como estabilizantes, o Poli(cloreto de dialildimetilamônio)– PDADMAC, hidrocloreto de polialilamina – PAH e polieletrólitos – PEG adsorvidos na superfície das AgNPs pela técnica de camada por camada (“layer-by-layer”). A caracterização das nanopartículas foi feita pela espectroscopia de UV-Vis e MET. Solução de NaCl, nas concentrações de 0,5, 0,1 e 0,01  $\text{mol.L}^{-1}$ , e microscopia de UV-Vis foram utilizadas para avaliar a agregação. As AgNPs com PDADMAC revelaram baixa estabilidade independentemente da concentração do sal. As AgNPs com o PAH e PEG foram estáveis nas concentrações de 0,1 e 0,01 M de NaCl; a solução de AgNPs não permaneceu estável na concentração de 0,5 M de NaCl. O PEG absorve íons do sal o que contribui para estabilização eletrostática, porém é diminuída em alta concentração do sal (NaCl). A diminuição da estabilidade das AgNPs tratadas com

PEG foi observada após o aquecimento a 90 °C. Mas, as AgNPs sem agente estabilizante aglomeraram e precipitaram após o aquecimento a 65 °C.

Pal et al.<sup>40</sup>, em 2007, avaliaram as propriedades antibacterianas de AgNPs de diferentes formas contra a bactéria Gram-negativa *E. coli*, tanto em sistemas líquidos como em placas de ágar. As imagens do MET revelaram mudanças consideráveis nas membranas celulares, devido ao tratamento com AgNPs, resultando em morte celular. As AgNPs triangulares com um plano reticulado apresentaram maior ação biocida, em comparação com nanopartículas esféricas e de forma cilíndrica e o nitrato de prata. Propõe-se que o tamanho da escala nanométrica e a presença do plano reticulado combinam-se para promover a ação biocidas. Para essa linha de pesquisa, esse é o primeiro estudo comparativo sobre as propriedades bactericidas de AgNPs de diferentes formas, e os resultados demonstraram que a interação entre a *E. coli* e as AgNPs foi dependente de sua forma.

Kim et al.<sup>24</sup>, em 2008, relataram que infecções cutâneas podem ser causadas por fungos como espécies de *Trichophyton* e *Candida*. Devido à resistência dos microrganismos aos medicamentos, há uma necessidade inevitável e urgente de novos medicamentos antifúngicos. Muitos estudos mostram o efeito antifúngico das AgNPs, mas contra patógenos cutâneos, esse efeito é pouco desconhecido. Neste estudo, foi investigado o efeito antimicrobiano das AgNPs sintetizadas contra espécies de *Trichophyton* e *Candida*. Foi preparada uma solução de prata com 1000 g de prata sólida dissolvida em ácido nítrico 100%, a 90°C, e foi adicionado 1 L de água destilada. Então, cloreto de sódio foi adicionado a essa solução, e os íons de prata foram reduzidos e dispersados para formação de nanopartículas monodispersas em meio aquoso. A concentração final da solução era de 60.000 ppm, sendo diluída em diferentes concentrações para utilização no estudo. O tamanho e a morfologia das nanopartículas foram examinados através da MET. Foi determinada a susceptibilidade antifúngica da solução inoculada com os microrganismos e o crescimento nos orifícios da placa foi acompanhado a cada 24 horas. Foi determinada como a menor concentração que inibiu o crescimento aquela que inibiu 80% do crescimento (IC80) em relação ao controle. A leitura do crescimento foi feita numa absorvância de 405 nm. A anfotericina B e o fluconazol

foram usados como controle positivo. A primeira observação deste estudo foi que as AgNPs inibiram o crescimento de dermatófitos, os quais causam infecções fúngicas superficiais. Secundariamente, o método de preparação das AgNPs neste estudo teve um custo vantajoso. Assim, os autores consideraram que as AgNPs podem ser excelentes agentes antimicrobianos contra dermatófitos em humanos.

Segundo Kong, Jang<sup>28</sup>, em 2008, os íons e as AgNPs têm sido reconhecidos como excelentes agentes antimicrobianos devido ao seu efeito biocida. O possível mecanismo de inativação dos microrganismos pelos íons de prata pode ser explicado por meio: 1 - da inibição de síntese de ATP, 2 - da desnaturação do DNA e 3 - do bloqueio da cadeia respiratória. Assim, neste estudo, nanofibras de polimetilmetacrilato (PMMA) contendo AgNPs foram sintetizadas, por meio de polimerização em dispersão radical mediada, e avaliadas como agente antibacteriano. Para a síntese da nanofibra, uma solução aquosa contendo íons de prata (nitrato de prata – AgNO<sub>3</sub>) e polivinil álcool (PVA) foi obtida. Em seguida, foram acrescentados o iniciador radical e redutor 2,2'-Azo-bis-isobutironitrila (AIBN) e o metil metacrilato (MMA) e a polimerização ocorreu sob vigorosa agitação a 60 °C por 24 horas. Após o preparo, foi feita a caracterização da solução. Os microrganismos selecionados para o estudo foram *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. Os testes para avaliar a propriedade antifúngica foram a cinética da atividade antibacteriana, a concentração inibitória mínima (CIM) e o teste de Kirby-Bauer modificado, para avaliar a zona de inibição. Os resultados demonstraram que a nanofibra proporcionou a morte dos microrganismos mais rapidamente do que o nitrato de prata e a sulfadiazina de prata. Para o CIM esse resultado manteve-se, sendo a nanofibra com maior efeito antimicrobiano que o nitrato de prata e esse maior que a sulfadiazina de prata. Também foi possível observar que o efeito antimicrobiano para a bactéria Gram-positiva, *S. aureus*, foi maior. Com todos esses aspectos, os autores relataram que as nanofibras poliméricas com AgNPs podem ser utilizadas em várias aplicações clínicas.

Kassae et al.<sup>22</sup>, em 2008, apresentaram um método simples e efetivo para o preparo de resina acrílica contendo AgNPs (AgNPs). Inicialmente, as AgNPs foram preparadas, via redução química dos íons de prata, por meio de um líquido acrílico

utilizado como agente redutor. As AgNPs preparadas foram, então, adicionadas em uma resina acrílica comercial (fabricada pela Denstply), e a polimerização foi iniciada à temperatura ambiente. O compósito de resina acrílica, carregado com 0,5% em peso com AgNPs, foi preparado da seguinte forma: as nanopartículas sintetizadas foram adicionadas ao líquido acrílico e colocadas em ultra-som durante 15 minutos. A suspensão foi, então, misturada ao pó da resina. Amostras sem AgNPs também foram preparadas para comparação. Para a análise das AgNPs foram realizadas difração de raio-X (DRX), MEV e MET. O teste de resistência à flexão foi realizado de acordo com a ISO 1567. Para verificar a liberação de íons de prata, amostras finas com área superficial de 2 cm<sup>2</sup> foram imersas em água destilada que foi analisada por voltametria após 1, 2, 4, 7, 11 e 15 dias. A análise da eficiência antimicrobiana foi realizada utilizando-se a bactéria *E. coli* (ATCC 25922). O sistema comercial de resina acrílica autopolimerizável consiste em um líquido e um pó. O líquido contém uma amina terciária (ou outro tipo de acelerador redox) que depois de misturado com o pó inicia a polimerização. Assim, esses aceleradores aparecem, neste estudo, como os agentes redutores utilizados para a redução do nitrato de prata (AgNO<sub>3</sub>) em nanopartículas puras de prata (AgNPs), cujo padrão DRX demonstrou picos fortes e estreitos que sugerem a formação de partículas de prata altamente cristalinas em nanoescala. O tamanho das partículas foi calculado, tendo sido aproximadamente 38 nm. A concentração de íons de prata nas amostras de água mostrou relação da liberação com o tempo de imersão, com relativo aumento nos primeiros 2 dias, o qual foi seguido por um gradual nivelamento até o valor de 1,175 mg/L nos demais períodos. Os íons de prata, nessas concentrações, são potentes contra *E. coli*, porém são bastante seguros para os humanos. A análise em MEV nos compósitos com AgNPs mostrou adequada dispersão das AgNPs na matriz do polímero, com pequena agregação. Após 24 horas de incubação, a concentração de bactérias não foi reduzida no controle (frascos sem amostras). Da mesma forma, nenhuma redução de bactéria foi observada em relação ao controle, na suspensão em contato com os compósitos sem AgNPs por 24 horas. Por outro lado, nenhuma bactéria pode ser detectada na suspensão em contato com o compósito que continha AgNPs por 24 horas. Os resultados dos testes mecânicos demonstraram que a adição de pequena quantidade de AgNPs melhorou

parcialmente a resistência e o módulo de flexão dos compósitos com AgNPs incorporados.

Roe et al.<sup>55</sup>, em 2008, afirmaram que mais de 200.000 infecções nosocomiais por ano ocorrem nos Estados Unidos e, na maioria delas, há relatos de uso de dispositivos intravasculares. Cateteres com propriedades antimicrobianas têm sido propostos como meio de proteção adicional e assim, reduzir o risco de infecção. Assim, o objetivo do estudo foi desenvolver um novo método de deposição de AgNPs na superfície de cateteres *in vitro* e analisar sua propriedade de liberação de prata *in vitro* e *in vivo*. Primeiramente, foi preparada uma solução de AgNPs, à partir do nitrato de prata, e adição de uma amina (utilizada como ligantes para metais). Os cateteres foram deixados durante 16 horas na solução de nanopartículas, e então, foram lavados. Cateteres com prata radioativa também foram preparados. Foram realizadas análises para avaliar a superfície tratada para o tamanho da partícula. Para os testes microbiológicos foram utilizados os microrganismos: *E. coli*, *Enterococcus*, *S. aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococci* para coagulase negativa e *C. albicans*. Cateteres sem tratamento de superfície foram utilizados para controle. A formação do biofilme foi analisada por meio do ensaio de XTT e os resultados foram expressos em porcentagem de inibição de crescimento. Para o estudo de liberação de prata *in vitro*, os cateteres com prata radioativa foram utilizados. A cada 10 dias era coletada uma amostra para a análise da radioatividade e os resultados foram expressos em µg/dia. Os resultados obtidos das análises dos cateteres tratados mostraram a presença de AgNPs distintas e esféricas com diâmetro de aproximadamente de 3 a 18 nm. A espessura do filme foi de aproximadamente 100 nm. Os resultados para a atividade bactericida e formação de biofilme demonstraram que os cateteres tratados inibiram o crescimento para todos os microrganismos estudados e em todos os períodos de biofilme. A quantidade de prata liberada dos cateteres em 10 dias foi, aproximadamente, 20% maior nos tratados com 1000 µg/g do que nos tratados com 600 µg/g. Os estudos nos camundongos não demonstraram nenhum sinal de toxicidade durante os 10 dias de experimentos. Além disso, não houve sinais de inflamação ou infecção na região onde foram implantados os cateteres.

Choi et al.<sup>12</sup>, em 2008, relataram que materiais com AgNPs têm ampla variedade de aplicação e, devido ao seu efeito antimicrobiano e baixa toxicidade em células mamárias, as AgNPs têm sido utilizadas em produtos de consumo. O objetivo do estudo foi avaliar o efeito das AgNPs, dos íons de prata e solução colóide de AgCl sob o crescimento de microrganismos heterotróficos e autotróficos. A solução de AgNPs foi preparada à partir do nitrato de prata, utilizando-se o borohidreto como agente redutor. O polímero polivinil álcool (PVA) foi utilizado para a estabilização da solução. Uma solução de nitrato de prata (14 mM) foi utilizada como origem para os íons de prata e a solução colóide de AgCl foi preparada à partir da mesma solução de nitrato de prata (14 mM) e uma solução de cloreto de sódio (28 mM). Então, foi realizada a caracterização da solução de AgNPs através de espectroscopia de UV-vis. Além disso, alíquotas foram utilizadas para determinar a estabilidade da solução e mensurar a concentração de íons de prata na suspensão de AgNPs. O tamanho das AgNPs e dos colóides de AgCl foram caracterizados pela MET. Para os testes microbiológicos foi feita a cultura de bactérias autotróficas nitrificadas e como microrganismo heterotrófico foi utilizado a *E. coli*. A avaliação de crescimento da bactéria autotrófica foi pela determinação de bactérias sobreviventes (medida da respiração celular) e a *E. coli* foi avaliada pelo teste de microtitulação automatizado. Além disso, foi estudada a interação entre os microrganismos e as nanopartículas. A concentração de íons de prata foi medida simultaneamente com a estabilidade da solução. No início, para fazer a solução, a concentração de íons era 27 mg/L. Quando a reação estava completa, a concentração de íons residuais foi de 0,6 mg/L. Essa concentração permaneceu inalterada até 24 horas após o preparo da solução, mantida à temperatura ambiente. Após esse período, a concentração de íons de prata foi aumentando gradualmente, com alteração de cor que é outro indicativo. Para minimizar a interferência da dinâmica de alteração das AgNPs em suspensão, a solução foi utilizada logo após o seu preparo, e não foi identificado alteração significativa da concentração de íons de prata, após o armazenamento de poucos dias à 4 °C. A inibição do crescimento dos microrganismos autotróficos foi de, aproximadamente, 86%, 42% e 46% quando utilizadas as soluções de AgNPs, íons de prata e solução colóide de AgCl, respectivamente. Para o microrganismo heterotrófico, a inibição de crescimento foi de aproximadamente 55%, 100% e 66% quando utilizadas as soluções de AgNPs, íons de prata e solução colóide de AgCl,

respectivamente. A concentração de íon de prata aumenta com o tempo e é associada com a alteração de cor da suspensão de AgNPs, demonstrando processo de oxidação, cristalização, dissolução e agregação envolvidos, os quais também podem estar envolvidos na interação das nanopartículas com o microrganismo. Assim, é necessário pesquisas para investigar as propriedades das nanopartículas como tamanho, forma, dissolução/agregação, superfície tratada e solubilidade, as quais podem interferir nas propriedades físico-químicas e de transporte, e resultar em impactos diferentes e significantes no crescimento de microrganismos.

Ahn et al<sup>1</sup>, em 2009, avaliaram a atividade antimicrobiana e propriedades físicas de adesivos ortodônticos fotopolimerizáveis modificados (ECAs) com AgNPs, comparando-os com adesivos convencionais. Foram adicionadas ao adesivo AgNPs em várias concentrações: 0 ppm, 250 ppm e 500 ppm, sendo designados, respectivamente, ECA1, ECA2 e ECA3. Então, os ECAs foram misturados durante 12 horas a 37 °C para obter uma mistura homogênea. Dois adesivos ortodônticos comerciais fotopolimerizáveis foram comparados com os ECAs: um sem liberação de fluoretos – TB (Transbond XT, 3M) e o RMGI (Fuji Ortho LC). A rugosidade e a energia livre de superfície das amostras (3,0 mm de diâmetro e 2,0 mm de espessura) foram analisadas para os testes microbiológicos. *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) e *Streptococcus sobrinus* (ATCC 33478) foram utilizados neste estudo. Saliva não estimulada de 1 voluntário saudável foi coletada, centrifugada 4.500 x g durante 5 minutos e o sobrenadante foi utilizado imediatamente nos testes de adesão. Com isso, foram incubadas 30 amostras de cada adesivo em 2 mL de saliva, em agitação, por 2 horas em temperatura ambiente. Para o controle negativo, as amostras foram incubadas em PBS estéril. Então, as amostras tratadas com saliva foram lavadas 3 vezes com PBS estéril e incubadas, sob agitação, em  $1 \times 10^9$  células suspensas em HBSS com 0,5% de soro bovino (HBSS-BSA) no período de 3 ou 6 horas a 37 °C. As amostras sem tratamento de saliva foram incubadas em HBSS contendo  $1 \times 10^9$  células, nas mesmas condições. O número de células aderidas foi determinado usando o contador de cintilação Beckman LS-5000TA. Todas as amostras foram contadas em triplicata e cada experimento foi repetido 6 vezes. Também foi determinado o crescimento bacteriano, sendo estimado pelo espectrofotômetro, e a presença do halo de inibição foi verificada, medida e

expressa em milímetros. Para o teste de cisalhamento, foram extraídos 85 pré-molares humanos saudáveis e cada adesivo foi aplicado, na superfície dos dentes de acordo com as instruções dos fabricantes e bráquetes de pré-molares superiores foram fixados. Após o teste de resistência ao cisalhamento, as superfícies de união de esmalte foram analisadas utilizando-se um estéreo-microscópio. Após a análise estatística, foi verificada diferença significativa na rugosidade entre os adesivos. ECA1 mostrou menor rugosidade e a incorporação de AgNPs aumentou a rugosidade. Quanto à energia livre de superfície, os valores dos ECAs foram basicamente semelhantes à do adesivo TB. Além disso, não houve diferença significativa entre a resistência ao cisalhamento dos adesivos. Já para o ensaio de adesão dos microrganismos avaliados (*S. mutans* e *S. sobrinus*), houve variação de acordo com o adesivo: não houve diferença significativa entre os valores observados para ECA2 e ECA3, sendo significativamente menores que os de ECA1 e dos adesivos convencionais (TB e RMGI); e, para o tratamento com saliva, não houve efeito significativo. Diferentes *streptococci*, tipos de adesivo e tempos de incubação tiveram efeitos significativos no crescimento bacteriano no meio líquido. Após 48 de incubação, não houve halo de inibição do crescimento para todas as amostras. Assim, este estudo mostrou que a incorporação de AgNPs nos adesivos proporcionou resultados satisfatórios, tanto nas propriedades físicas como antimicrobianas.

Kim et al.<sup>25</sup>, em 2009, afirmaram que o efeito biocida e o modo de ação dos íons de prata são conhecidos, entretanto, o efeito antifúngico e o modo de ação das nano-Ag contra os fungos são, em sua maior parte, desconhecidos. Neste estudo as nanopartículas foram preparadas a partir de uma solução de prata e adição de cloreto de sódio. Com a adição do cloreto de sódio, os íons Ag foram precipitados e, assim, agrupados para formar as nanopartículas (esféricas com 3nm) monodispersas na solução aquosa com concentração final de 60.000 ppm. Foram determinadas as concentrações inibitórias mínimas (CIMs) através da diluição seriada em duplicata e do ensaio de MTT. Após 48 horas de incubação a 28 °C, as CIMs foram definidas como as menores concentrações nas quais houve inibição de 90% do crescimento dos microrganismos avaliados (*Saccharomyces cerevisiae* (KCTC 7296), *Trichosporon beigellii* (KCTC 7707) e *C. albicans* (ATCC 90028),

quando comparadas ao crescimento do grupo controle respectivo de cada microrganismo. A atividade hemolítica de eritrócitos humanos também foi analisada para avaliar a citotoxicidade, além da análise da integridade da membrana plasmática das células de *C. albicans*, para que o mecanismo de ação das nano-Ag pudesse ser observado. A determinação da liberação de glicose e trehalose foram avaliadas pela medida da liberação de cada uma delas em suspensão de células, as quais foram expostas as nano-Ag ou anfotericina B. Os resultados mostraram que as células fúngicas tratadas apresentaram dano significativo, caracterizado pela formação de “pit” nas paredes e poros na membrana citoplasmática. Para o entendimento de como a atividade e a fisiologia intracelular são afetadas, o efeito das AgNPs no ciclo celular das células de *C. albicans* foi avaliado. Os resultados demonstraram que, na presença das nano-Ag, a porcentagem de células na fase G2/M aumentou em 15%, enquanto a da fase G1 diminuiu significativamente em 20%. Como resultado obtido de cada um dos ensaios realizados, foi observado que as nano-Ag exibiram eficiente atividade antifúngica na espécie testada com valores de CIM similares aos da anfotericina B. Esses resultados indicaram que as nano-Ag têm notável potencial como agente antifúngico para o tratamento de infecções fúngicas. As nano-Ag mostraram baixa atividade hemolítica, enquanto a anfotericina B apresentou atividade hemolítica ligeiramente maior, confirmando que o efeito das nano-Ag nos eritrócitos humanos não são tóxicos ou possuem baixa citotoxicidade. A manutenção dos componentes intracelulares é importante para a viabilidade celular; assim, a liberação de glicose e trehalose foram medidas durante a exposição da *C. albicans* às nano-Ag. As nano-Ag têm como mecanismo de ação o rompimento da membrana plasmática, alterando a bi-camada lipídica e, conseqüentemente, a liberação de íons e outros componentes intracelulares, bem como a formação de poros e potencial dissipação eletrolítica através da membrana. Já na análise de citometria de fluxo, os resultados mostraram que as nano-Ag paralisaram o ciclo celular na fase G2/M, sugerindo que elas inibiram alguns processos celulares, os quais são envolvidos com o crescimento normal. Assim, as nano-Ag exibiram potente efeito antifúngico com o microrganismo testado, provavelmente por meio da destruição da integridade da membrana, porém, merecem maior investigação para a aplicação clínica.

Panáček et al.<sup>41</sup>, em 2009, afirmaram que, recentemente, infecções fúngicas severas têm contribuído significativamente para o aumento da morbidade e mortalidade de pacientes imunossuprimidos, os quais necessitam de tratamento intensivo com antibióticos de amplo espectro. *Candida* spp. representa um gênero de patógenos mais relacionados a infecções fúngicas, frequentemente causadas por sepses hospitalares, com uma taxa de até 40% de mortalidade. Assim, este estudo teve o objetivo de determinar o efeito fungicida e fungistático de AgNPs contra fungos patogênicos selecionados de pacientes com infecção invasiva em tratamento no Hospital da Universidade Olomouc, República Tcheca. Além disso, também foi estudado o aumento da atividade antifúngica das AgNPs com agentes estabilizantes, utilizando-se polímeros e surfactantes. Foram preparadas uma solução de íons de prata, uma de AgNPs sem agente estabilizante e 4 soluções de AgNPs com diferentes agentes estabilizantes: SDS (dodecil sulfato de sódio), Tween 80 (monooleato de polioxietileno sorbitan), surfactantes do grupo Brij e polímeros como o PVP (polivinil pirrolidona) e o PEG (polietileno glicol). As espécies isoladas do soro do pacientes foram *C. albicans* (I e II), *C. tropicalis* e *C. parapsilosis*. O tamanho e a distribuição das AgNPs foram determinados pelo espalhamento de luz dinâmico (DLS) e a síntese de AgNPs foi confirmada MET utilizando JEM-1002 (Jeol) e UV-vis, na qual se pôde observar a presença de AgNPs no pico de absorção de 420 nm. A atividade fungicida das soluções de AgNPs com e sem agentes estabilizantes foi determinada pela concentração inibitória mínima (CIM) em cada espécie de *Candida* estudada. Também foram determinadas a atividade fúngica e fungicida dos íons de prata. Além disso, a citotoxicidade das AgNPs em fibroblastos humanos foi avaliada. As AgNPs, com diâmetro médio de 25 nm, mostraram efeito inibitório contra todos os fungos testados em concentrações similares aos dos íons de prata, variando de 0,21 mg/L (*C. albicans* II) a 1,69 mg/L (*C. parapsilosis*), dependendo da espécie. Para a concentração fungicida mínima (CFM), a concentração de nanopartículas que inativou todos os fungos foi de 27 mg/mL, enquanto a dos íons de prata foi de 13,5 mg/mL. O efeito inibitório das nanopartículas foi melhorado através de sua estabilização, observando valores de CIM entre 0,05 mg/L (*C. albicans* I) e 0,84 mg/L (*C. parapsilosis*), para as nanopartículas estabilizadas com dodecil sulfato de sódio. As AgNPs estabilizadas com polímeros e surfactantes exibiram alta atividade antifúngica como resultado da melhora da formação de agregados. Por outro lado, a

forma iônica da prata foi citotóxica para fibroblastos humanos na concentração de 1mg/mL, 10 vezes menor que a CFM (13,5 mg/mL). Além disso, a atividade fungicida das nanopartículas ocorreu em concentração 100 vezes menor que aquela observada no teste de citotoxicidade, demonstrando que o uso das nanopartículas como agente antifúngico é menos complicado em termos de citotoxicidade para células humanas, quando comparado aos íons de prata. Assim, a atividade antifúngica das AgNPs é comparável com a dos íons de prata, porém as AgNPs inibiram o crescimento dos fungos em pequenas concentrações, comparável com os antifúngicos comuns. Além disso, as AgNPs não exibiram efeito tóxico aos fibroblastos humanos nessas concentrações. Alto efeito bactericida e também fungicida pode levar à conclusão que as AgNPs constituem um efetivo agente antimicrobiano para ambos microrganismos patogênicos.

Jain et al.<sup>20</sup>, em 2009, relataram que a prata é um efetivo agente antimicrobiano com baixa citotoxicidade, que é especialmente importante no tratamento de queimaduras. O uso excessivo de antibióticos e as falhas na aplicação de práticas básicas de controle de infecção têm contribuído para a alta mortalidade e morbidade entre pacientes com queimaduras devido às infecções causadas por patógenos nasocomiais resistentes às diversas drogas. Assim, este estudo descreveu o desenvolvimento da formulação de um gel contendo AgNPs para utilização em queimaduras e feridas. As AgNPs foram sintetizadas por um processo que envolve a redução foto-assistida do íon de prata para AgNPs metálica e sua bio-estabilização. A caracterização das nanopartículas foi realizada com espectroscopia de UV-vis, microscopia eletrônica de transmissão de alta resolução (MET-AR) e DLS. Para os estudos de bio-atividade das nanopartículas foram realizados os seguintes testes: concentração inibitória mínima (CIM), concentração bactericida mínima (CBM), estudo do tempo para a morte celular, efeito após a exposição ao agente (PAE) e o índice da concentração inibitória fraccional (CiFI). Esses testes também foram realizados para avaliar a combinação de nanopartículas com antibióticos comumente utilizados (estreptomicina, cloranfenicol, canamicina, sulfato de polimixina B, ampiclox e ceftazidima). A maioria das espécies, em média 66% delas apresentaram  $CIM \leq 3,12 \mu\text{g/mL}$ . Além disso, 4% das cepas apresentaram CIM de  $0,78 \mu\text{g/mL}$ . As bactérias Gram-negativas foram inativadas mais

efetivamente (diminuindo 3 log<sub>10</sub> em 5 a 9 horas) do que as Gram-positivas (diminuindo 3 log<sub>10</sub> em 12 horas). Quando exposta à CIM, 97% de *C. albicans* foi inativada após 8 horas. O PAE das nanopartículas para *C. albicans* foi de 1,6 horas. Quando a interação de nanopartículas com antibióticos comumente utilizados foi avaliada, foi observado efeito sinérgico (ceftazidima), aditivo (estreptomicina, canamicina, ampiclox, sulfato de polimixina B) e antagonista (cloranfenicol). Os resultados de interação sinérgica e aditiva sugerem que, no futuro, algumas dessas combinações poderiam ser desenvolvidas para se obter formulações mais efetivas. Em relação à toxicidade, foi observada diminuição da função mitocondrial das células quando expostas às nanopartículas, evidenciado no ensaio de XTT, mas o valor CI<sub>50</sub> foi de 251 µg/mL. Os resultados MET revelaram a presença de agregados esféricos, escuros, eletro-densos no interior de mitocôndrias, quando as células foram expostas ao CI<sub>50</sub>. Essas estruturas, provavelmente, poderiam ser AgNPs. Os resultados dos testes realizados com o S-Gel mostraram que o efeito antibacteriano na concentração de 0,1 mg/g foi comparável com a formulação comercial da sulfadiazina de prata a 1% e, no estudo *in vivo*, não houve mortalidade ou sinais de intoxicação ou reação adversa. Os resultados da necrópsia mostraram que não houve anormalidades patológicas. Assim, os resultados claramente indicaram que as AgNPs podem ser uma alternativa a agentes antimicrobianos

Monteiro et al.<sup>36</sup>, em 2009, relataram que a prata é um metal conhecido por sua atividade antimicrobiana de amplo espectro contra bactérias Gram negativas e positivas, fungos, protozoários e certos vírus, incluindo espécies resistentes a antibióticos. O uso da prata e o número de produtos com prata disponíveis têm aumentado o que esclarece a importância da eficácia da prata contra diferentes microrganismos e biofilmes. Assim, foi realizada essa revisão de literatura utilizando referências dos últimos 35 anos a respeito da prata como agente antimicrobiano, especificamente zeólito de prata (SZ), nanopartículas de prata (SN) e íons de prata (SI) como também, a formação de biofilmes. A prata tem mostrado alta afinidade pelo zeólito que tem sido incorporado em condicionadores de tecido, resinas acrílicas e soluções para bochechos. As SN são insolúveis em tamanhos menores que 100 nm e podem ser preparadas a partir do nitrato de prata, com o citrato como agente redutor ou também o borohidreto. A atividade antimicrobiana das SN

depende de algumas variáveis como tamanho, forma, estabilidade da solução e concentração. Partículas menores possibilitam maior área de contato, proporcionando maior efeito antimicrobiano que partículas maiores. Partículas triangulares favorecem a atividade, pois possuem átomos mais fortes e densos em suas facetas do que as demais formas. A sulfadiazina de prata e o nitrato de prata apresentaram atividade antimicrobiana pela liberação de SI. Esses, em contato com a bactéria, formam precipitados pretos. Já as SN entram em contato com a bactéria sem formar precipitados. Assim, uma concentração efetiva das SN pode ser muito menor que a dos SI, e as SN apresentam melhor habilidade biocida do que os SI na mesma concentração. Diferentes resultados como a liberação de SI das nanopartículas também foram encontrados na literatura e, para muitos autores, a atividade antimicrobiana depende dos SI. A ação antimicrobiana também depende da célula bacteriana, podendo ela ser Gram- negativa ou positiva. As Gram-positivas têm de 3 a 20 vezes mais peptidoglicano que as Gram-negativas. Conseqüentemente, as bactérias Gram-positivas são, geralmente, menos suscetíveis aos agentes antibacterianos contendo SI que as Gram-negativas. Uma alternativa para a redução da adesão bacteriana nos dispositivos médicos é a liberação de agentes antimicrobianos, como a prata, desses materiais. Além disso, as propriedades antimicrobianas da prata têm sido relatadas na sua forma oxidada, a qual não está necessariamente presente na superfície tratada com prata metálica. Em relação à formação de biofilme, a condição da película formada pela camada de moléculas orgânicas aderidas à superfície, é considerada um fator precursor para a adesão de células planctônicas. A adesão do microrganismo à superfície depende da atração e repulsão das duas superfícies (microrganismo e substrato). Então, a adesão do microrganismo ocorre na superfície, e é subseqüentemente facilitada pela sinalização bacteriana. A maturação do biofilme é caracterizada quando a bactéria aderida produz substância polimérica extracelular (EPSs) que ajuda a retenção dos nutrientes vindo do meio circundante. O estágio final é a liberação de microrganismo para o meio, onde ele volta ao seu estado de célula planctônica. O efeito antimicrobiano é maior em células planctônicas que em células em crescimento no biofilme, levando em consideração o mesmo agente antifúngico e nas mesmas concentrações. Também tem sido relatado que a quantidade de prata liberada, abaixo dos valores necessários para atuar em biofilmes, foi tóxica às células

humanas. Sendo assim, se altas concentrações de SI livres são necessárias para o efeito bactericida contra biofilmes, então é fundamental que essas concentrações não interfiram na citotoxicidade e biocompatibilidade.

Yoshijima et al.<sup>74</sup>, em 2009, relaram que a aderência dos microrganismos às superfícies das próteses é um importante passo na etiologia da estomatite protética. Assim, a inibição desse processo poderia ser uma maneira efetiva para prevenir a ocorrência dessa patologia. Interações hidrofóbicas estão envolvidas na aderência de *Candida* ao acrílico, sugerindo que superfícies hidrofílicas poderiam inibir a aderência fúngica. Assim, este estudo investigou o efeito de camadas hidrofílicas sobre o acrílico com relação à aderência de *Candida*, especialmente de hifas de *C. albicans*. Para isso, amostras acrílicas recobertas com “carrageenan” e hidrocolóide foram usadas como substratos hidrofílicos e comparadas com amostras controles. As medidas de hidrofiliicidade superficial dessas amostras foram determinadas por meio do ângulo de contato entre a água destilada e a superfície acrílica. Suspensões fúngicas ( $2 \times 10^7$  ufc/ml) de isolados clínicos de *Candida* foram colocadas sobre as amostras acrílicas e incubadas por 30 minutos. Após esse período, todas as amostras foram lavadas com PBS e as células aderidas às superfícies acrílicas foram coletadas por meio do tratamento com tripsina a 0,25%. A hidrofobicidade de superfície celular foi estimada usando uma modificação da técnica do hidrocarbono. Os resultados obtidos demonstraram que quando as amostras acrílicas foram recobertas pelo substrato hidrofílico, a aderência dos isolados hidrofóbicos de *Candida* e hifas hidrofóbicas de *C. albicans* diminuiu, enquanto a aderência de *Candida* não hidrofóbica não foi afetada ou aumentou. Os autores sugeriram que coberturas hidrofílicas de superfícies protéticas poderia ser um método potencial para redução da aderência de células fúngicas relativamente hidrofóbicas, particularmente, hifas de *C. albicans*.

Chaloupka et al.<sup>10</sup>, em 2010, relataram que, polímeros com AgNPs em sua composição (NS), estão atraindo o interesse de uma gama de aplicações biomédicas, devido à sua potente atividade antibacteriana. Recentemente, foi demonstrado que os NS foram utilizados, ainda, com ação antiinflamatória e melhora da cicatrização, que pode ser explorada no desenvolvimento de curativos para

feridas e queimaduras. A chave para a sua ampla atividade e alta ação antibacteriana é o fato dos NS atuarem de múltiplas formas sobre os microrganismos. Assim, esses materiais têm sido utilizados como revestimentos antibacterianos sobre os dispositivos médicos para reduzir os índices de infecção hospitalar. Muitos métodos de síntese de novos NS surgiram e estão sendo avaliados para sua produção e aplicações médicas. A toxicidade dos NS também tem sido discutida criteriosamente, para assim poderem ser aplicados e difundidos na área médica.

***PROPOSIÇÃO***

### **3 Proposição**

Com base nos aspectos apresentados, consideramos oportuno avaliar o efeito de uma solução de AgNPs contra *C. albicans*. Além disso, o efeito da incorporação de diferentes concentrações de AgNPs em uma resina para base de prótese e o efeito do armazenamento em solução salina (até 180 dias) sobre o ângulo de contato, a adesão e formação de biofilme de *C. albicans* também foram avaliados.

## **MATERIAL E MÉTODO**

## 4 Material e Método

### 4.1 Preparo e caracterização da solução de AgNPs

Todos os reagentes, incluindo o nitrato de prata ( $\text{AgNO}_3$ ) e o PVA foram adquiridos da Aldrich e foram utilizados como recebido sem purificação adicional. Para o preparo da solução de AgNPs, foi utilizado ( $\text{NaBH}_4$ ) como agente redutor. As AgNPs foram obtidas a partir da redução controlada de um sal de prata, na presença de agente estabilizante. AgNPs com diâmetro médio de 9 nm foram obtidas por meio da adição de  $0,5 \text{ mmol.L}^{-1}$  de  $\text{AgNO}_3$  (90 mg/mL) e  $1 \text{ mmol.L}^{-1}$  do agente redutor  $\text{NaBH}_4$  (540 mg/mL), para se obter a prata metálica ( $\text{Ag}^0$ ). A reação ocorreu na presença de  $20 \text{ mmol.L}^{-1}$  do PVA (230 mg/mL), um polímero solúvel em água que age como agente estabilizante<sup>23,52</sup>. A reação ocorreu sob agitação em banho de gelo e o nanocompósito formado (PVA/AgNPs) apresentava a relação em massa de 4:1 de PVA:AgNPs. A caracterização da solução de AgNPs foi realizada utilizando-se UV-vis<sup>40</sup> (U-2800 spectrophotometer, Hitachi High Technologies Corporation, Tokyo, Japan), FTIR (Nicolet6700 FT-IR, Madison, WI, USA) e DLS (Zetasizer Nano ZS, Malvern Co, E.U.A).

### 4.2 Microrganismo e condições de crescimento

Para o preparo do inóculo, o microrganismo *C. albicans* (American Type Culture Collection - ATCC 90028, Manassas, EUA) foi semeado sobre o meio (SDA) (Sabouraud Dextrose Agar; Acumedia Manufactures Inc., Baltimore, Maryland, EUA.) e incubado a  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  por 48 horas (Figura 1). A seguir, duas alçadas da levedura recém cultivada foram adicionadas em um frasco contendo 20 mL de meio YNB (Yeast Nitrogen Base, Difco, Detroit, USA) adicionado de glicose 50 mM (Figura 2). Após a incubação a  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  por 24 horas e sob agitação (Quimis Aparelhos Científicos Ltda, Diadema, SP, Brasil. Modelo: Q816M20), as células foram centrifugadas a  $4.000 \times g$  por 5 minutos (Eppendorf AG, Hamburg, Alemanha. Modelo: 5810R) e lavadas duas vezes com solução PBS estéril ( $\text{NaCl}$  100 mM - Labsynth Produtos para Laboratórios Ltda, Diadema, SP, Brasil,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  100 mM-, pH 7,2) por meio de agitação e centrifugação a  $4.000 \times g$  por 5 minutos. As células lavadas foram ressuspensas em 20 mL de caldo YNB estéril adicionado de glicose 100 mM. A densidade óptica da suspensão foi determinada e padronizada utilizando-se

espectrofotômetro (Biospectro, produzido por Equipar Ltda, Curitiba, PR, Brasil. Modelo: SP-220), com filtro de 520 nm a um valor de  $1 \times 10^7$  células/mL.



FIGURA 1- *C. albicans* semeado SDA após 48 h.



FIGURA 2- *C. albicans* adicionada em 20 mL de YNB.

#### 4.3 Determinação da suscetibilidade antifúngica

A partir de uma solução de PVA/AgNPs (preparada como descrito anteriormente) com concentração de 3.580 ppm foram feitas diluições com o meio YNB para que fossem obtidas as seguintes concentrações: 1.000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100, 70, 50 e 30 ppm.

Em placas de cultura de células estéril de 96 orifícios (TPP, Trasadingen, Suíça), alíquotas de 200  $\mu$ L das respectivas concentrações de solução de PVA/AgNPs foram colocadas em cada orifício. Para posterior comparação, em cada placa havia também um orifício controle (YNB sem solução de PVA/AgNPs) e um orifício controle negativo. Em seguida, foram adicionados, a cada orifício, 2  $\mu$ L do inóculo preparado anteriormente, com exceção do controle negativo, e as placas de cultura foram mantidas à 37 °C sob agitação durante 24 horas. Após esse período, o crescimento microbiano foi analisado pela turvação do meio de cultura de cada orifício. Os testes foram realizados em triplicatas, ou seja, 3 orifícios para cada concentração, e em 3 ocasiões distintas. Além da turvação, um orifício de cada concentração foi selecionado, do qual foi retirada uma alíquota de 100  $\mu$ L para, então, realizar diluições seriadas em solução salina estéril (NaCl - 0,85 g em 100 mL de água destilada) e posterior plaqueamento. Esse foi realizado em duplicata no

meio de cultura SDA e, após 48 horas, os microrganismos foram quantificados pela técnica de contagem do número de unidades formadoras de colônias (UFC).

#### **4.4 Incorporação da solução de PVA/AgNPs à resina acrílica**

Nesta pesquisa foi utilizada uma resina para base de prótese incolor, específica para micro-ondas (Vipi Wave - VIPI Indústria e Comércio Exportação e Importação de Produtos Odontológicos Ltda Pirassununga, SP). Para a incorporação do nanocompósito PVA/AgNPs na resina, 40 mL da solução de PVA/AgNPs foram misturados, manualmente, em 75g de pó, sendo a mistura seca em estufa (Marconi Equipamentos Laboratoriais Ltda, Piracicaba, SP, Brasil. Modelo: MA 0324. Série: 9819911) à 37°C por 48 h. Após a secagem, foi realizado o peneiramento do pó em peneira de malha 60 (250 µm), seguido de homogeneização realizada através de moinho de bolas.

#### **4.5 Confeção dos corpos-de-prova**

Para a confecção dos corpos-de-prova, a resina Vipi Wave foi utilizada tanto na forma fornecida pelo fabricante, sem qualquer modificação (identificada como R0), como após a incorporação de AgNPs em 5 diferentes concentrações (identificadas como R1000, R750, R500, R250 e R30), determinadas a partir do teste de suscetibilidade antifúngica. Para cada resina, 72 amostras foram confeccionadas.

Os corpos-de-prova da resina sem modificação (R0) foram confeccionados utilizando-se matrizes metálicas, contendo cavidades de 13,8 mm de diâmetro x 2 mm de profundidade (Figura 3) que foram isoladas (Cel-Lac, fabricado por SSWhite, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) previamente à inclusão (Figura 4). Inicialmente, a parte inferior da mufla específica para micro-ondas (Mufla nº 6, fabricada por Jon Comércio de Produtos Odontológicos Ltda, São Paulo, SP, Brasil) foi isolada e preenchida com gesso (Gesso pedra tipo III Herodent; fabricado por Vigodent SA Ind. Com., Rio de Janeiro, RJ, Brasil) sobre o qual foi, então, posicionada uma placa de vidro de forma e tamanho compatíveis com as dimensões da matriz metálica aguardando-se a presa do gesso (Figura 5), e então, a matriz metálica foi fixada sobre a placa de vidro com adesivo (Super Bonder Loctite, Henkel Ltda., Itapevi, São Paulo, Brasil) (Figura 6). Para facilitar a remoção da matriz na fase de desinclusão, silicone (Labor Mass, fabricado por Vipi Ind. e Com. Ltda, Pirassununga, SP, Brasil)

foi manipulado e posicionado ao redor da mesma (Figura 7). Outra placa de vidro foi, então, fixada sobre a matriz com adesivo (Figura 8), a contra-mufla foi posicionada e preenchida com gesso de maneira convencional. Após a presa do gesso, a mufla foi aberta e a matriz foi preenchida com a resina, proporcionada conforme a recomendação do fabricante (14 g de pó e 6,5 mL de líquido). Em seguida, a mufla foi fechada e o processo de polimerização executado de acordo com o protocolo estabelecido pelo fabricante (Forno de 500W – 20 minutos com 20/30% de Potência + 5 minutos com 80/100% de Potência). Para a polimerização, foi utilizado Micro-ondas de dupla emissão de ondas, produzido por Brastemp, Manaus, AM, Brasil. Modelo: Sensor Crisp 38 – DES (Doubled Emission System). Após o resfriamento da mufla, a mesma foi aberta e os corpos-de-prova foram retirados e os excessos laterais removidos com o auxílio de uma tesoura estéril. Os corpos-de-prova foram confeccionados dentro de condições assépticas, por um único operador, atuando sobre superfície de papel estéril, utilizando instrumental esterilizado, roupas de proteção, luvas, óculos e máscaras descartáveis.



FIGURA 3 – Matriz Metálica.

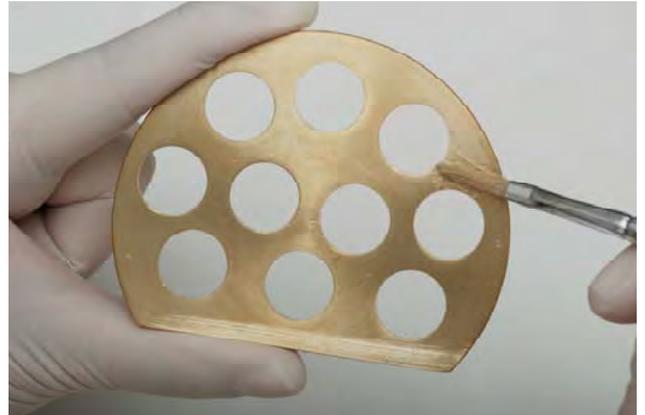


FIGURA 4- Matriz Metálica sendo isolada.



FIGURA 5 – Placa de vidro incluída.



FIGURA 6 – Matriz fixada sobre placa de vidro.



FIGURA 7 – Silicone colocado ao redor da matriz.



FIGURA 8 – Placa de vidro fixada sobre a matriz.

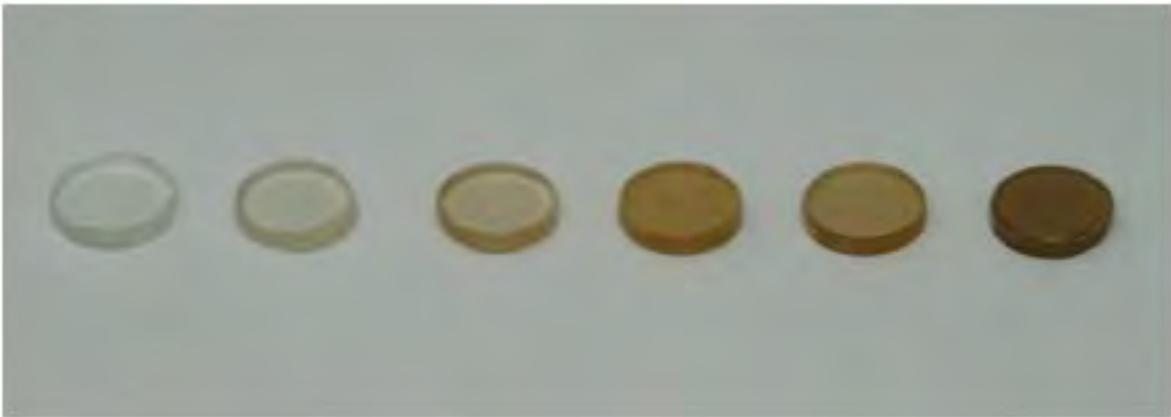


FIGURA 9- Corpos-de-prova obtidos das resinas R0, R30, R250, R500, R750, R1000, respectivamente da esquerda para a direita.

Previamente à confecção dos corpos-de-prova relativos às concentrações R1000, R750, R500, R250 e R30, foi feita a incorporação de AgNPs na resina para base de prótese, em 5 diferentes concentrações, conforme descrito anteriormente. Os corpos-de-prova de R1000, R750, R500, R250 e R30 foram confeccionados seguindo-se os mesmos procedimentos utilizados para R0. A Figura 9 ilustra os corpos-de-prova obtidos.

#### **4.6 Medida do ângulo de contato para avaliar a hidrofobicidade/hidrofilicidade da superfície.**

Do ponto de vista físico, a molhabilidade é definida como o ângulo de contato ( $\theta$ ) que se forma entre uma gota de líquido em equilíbrio térmico e uma superfície horizontal. Quando  $\theta = 0$ , corresponde à molhabilidade perfeita, na qual o líquido se

distribuí por toda a superfície, formando um filme. O ângulo de contato é definido como sendo o ângulo formado na intersecção entre um plano tangente à gota do líquido e o plano que contém a interface substrato-líquido<sup>54</sup>. Na Figura 10,  $\gamma_S$ ,  $\gamma_{LV}$ , e  $\gamma_{SL}$  correspondem à energia da superfície sólida, a tensão superficial do líquido em equilíbrio com o vapor, e a energia da interface sólido-líquido, respectivamente.

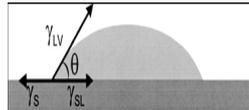


FIGURA 10 – Desenho esquemático de ângulo de contato na interface sólido-líquido.

Considerando a gota de líquido na Figura 10 em repouso, o ângulo de contato pode ser expresso pela equação de Young:

$$\gamma_{LV} \cos \theta = \gamma_S - \gamma_{SL}$$

A mensuração do ângulo de contato foi realizada utilizando-se um goniômetro (Ramé-Hart, 100-00), que possui uma câmera CCD que registra a imagem da gota de água deionizada colocada na superfície do corpo-de-prova, utilizando-se uma microseringa. Um software de processamento de imagem foi utilizado para determinar o ângulo de contato, sendo que para cada corpo-de-prova, foram realizadas 2 mensurações, obtendo-se a média. As mensurações do ângulo de contato foram realizadas logo após a confecção dos corpos-de-prova e foram repetidas após o armazenamento pelos períodos estabelecidos para este estudo (0, 7, 90 e 180 dias).

#### **4.7 Medida da rugosidade superficial**

Tendo em vista a possível influência da rugosidade na aderência de microrganismos<sup>46,51,69-70</sup>, foi considerado oportuno acrescentar à metodologia proposta inicialmente a mensuração da rugosidade superficial. Assim, a rugosidade de todos os corpos-de-prova foi medida utilizando-se um rugosímetro (Mitutoyo SJ 400 – Mitutoyo Corporation - Japão), com precisão de leitura de 0,01  $\mu\text{m}$ ,

comprimento de leitura de 2,5 mm, velocidade da ponta ativa de 0,5 mm/s, e o raio da ponta ativa de 5 µm. Foram realizadas três medidas para cada corpo-de-prova e a média entre as leituras foi determinada como o valor da rugosidade (Ra-µm). Todas as medidas foram realizadas por um único operador.

Após a leitura dos ângulos de contato e da rugosidade superficial, os 72 corpos-de-prova de cada resina (sem modificação – R0 e com a incorporação de AgNPs – R30, R250, R500, R750, R1000) foram designados, aleatoriamente, para um dos 4 períodos de armazenamento estabelecidos para este estudo (n=18): 0, 7, 90 e 180 dias. O armazenamento foi realizado em solução salina estéril tamponada com fosfatos (PBS) a 37°C. A solução PBS é composta de NaCl (4 g), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0,12 g), KCl (0,1 g) e Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (0,72 g) em 500 mL de água destilada. Para os períodos de 90 e 180 dias, a solução PBS foi substituída a cada 15 dias.

Para a avaliação da aderência e formação de biofilme de *C. albicans* foi utilizado o ensaio de redução de 2,3-bis[2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil]-5-[(fenilamino) carbonil] tetrazólio (XTT). Metade das amostras de cada período e concentração (n=9) foi avaliada após período de incubação de 90 minutos (fase de adesão) e a outra metade (n=9) foi avaliada após período de incubação de 48 horas (formação de biofilme). Previamente aos testes microbiológicos, todas as amostras foram esterilizadas durante 20 minutos na cuba ultrasônica (Lavadora Ultra-Sônica Digital; Sanders do Brasil LDA, Santa Rita do Sapucaí- MG, Brasil) e 15 minutos em luz UV (Veco do Brasil, Campina-SP, Brasil) em cada lado dos corpos-de-prova<sup>65</sup>.

#### **4.8 Teste de aderência**

##### **4.8.1 Microrganismo e condições de crescimento**

O preparo do inóculo do microrganismo *C. albicans* ATCC 90028 foi realizado seguindo os mesmos procedimentos utilizados no teste de avaliação da atividade antifúngica da solução de PVA/AgNPs (item 4.2).

##### **4.8.2 Formação dos Biofilmes de *C. albicans* nos corpos-de-prova**

Uma alíquota de 3 mL da suspensão de *C. albicans*, correspondendo a  $1 \times 10^7$  células/mL foi aplicada sobre os corpos-de-prova, relativos ao período de adesão e ao biofilme de 48 horas. As amostras foram posicionadas, individualmente, nos compartimentos de uma placa de cultura de células estéril de 12 orifícios (TPP,

Trasadingen, Suíça) e mantidos durante 90 minutos (fase de adesão) <sup>11</sup> à 37 °C sob agitação. Posteriormente, todos os corpos-de-prova foram lavados cuidadosamente com 3 mL solução PBS estéril (Figura 11). Essa lavagem foi realizada duas vezes com o objetivo de remover as células não aderidas, tamponar o meio e remover os metabólitos. Em seguida, os corpos-de-prova relativos ao período de adesão foram transferidos para uma nova placa de cultura de células estéril de 12 orifícios (Figura 12) para, assim, serem submetidos ao Ensaio de XTT, o qual avalia a atividade metabólica da *C. albicans*. As amostras relativas ao biofilme de 48 horas também foram transferidas para uma nova placa de cultura de células estéril de 12 orifícios, porém com YNB estéril adicionado de glicose 100 mM com o objetivo de fornecer mais nutrientes para os microrganismos, sendo, em seguida, mantidas a 37 °C sob agitação durante 24 horas. Decorrido esse período, os corpos-de-prova foram lavados duas vezes com 3 mL PBS estéril e, então, transferidos para outra placa de cultura de células com 12 orifícios contendo YNB estéril adicionado de glicose 100 mM. Em seguida, foram mantidos a 37 °C sob agitação durante 24 horas, até completar o período de 48 horas. Após completar 48 horas, as amostras foram transferidas diretamente (sem lavagem) para uma nova placa de cultura de células para que então, fossem submetidas ao Ensaio de XTT. Controles negativos foram constituídos por corpos-de-prova de cada grupo correspondente, mantidos em caldo YNB suplementado com glicose 100 mM, mas sem suspensão celular padronizada <sup>11</sup> e receberam os mesmos procedimentos de incubação, lavagem, transferência das placas de cultura e Ensaio de XTT correspondentes aos períodos de adesão (90 minutos) e biofilme de 48 horas.

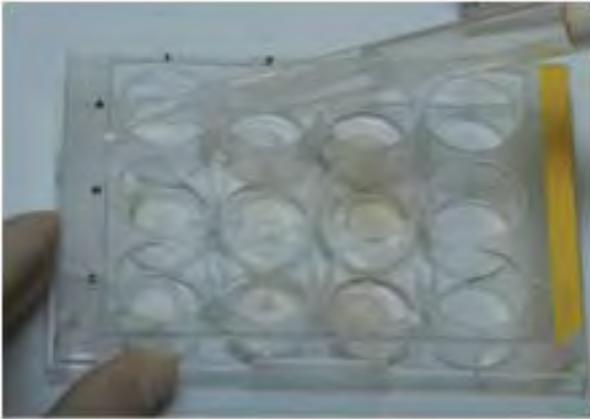


FIGURA 11- Corpos-de-prova sendo lavados.



FIGURA 12- Corpos-de-prova sendo transferido com PBS estéril.

#### 4.8.3 Ensaio de XTT

A formação dos biofilmes nos períodos de 90 minutos (fase de adesão) e 48 horas foi monitorada por meio do ensaio de XTT. O XTT (sal amarelo) é reduzido, por desidrogenases mitocondriais de leveduras metabolicamente ativas, em um produto solúvel em água – formazano, o qual é medido espectrofotometricamente.

Para esse ensaio, a solução de XTT (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo, USA) foi preparada utilizando-se água Milli-Q, a uma concentração de 1 mg/mL e mantida a -70 °C até o momento do experimento. A solução de menadione (Sigma Co., St. Louis, MO, EUA) foi preparada em acetona a 0,4 mM, antes de cada experimento. Após os períodos correspondentes (90 minutos ou 48 horas), os corpos-de-prova contendo os biofilmes formados foram transferidos para outras placas de cultura de células estéreis com 12 orifícios, cada um contendo 3 mL de solução composta por PBS com adição de 200 mM de glicose, solução de XTT previamente preparada e menadione recém-preparada, nas seguintes proporções: 2,37 mL de PBS, 0,6 mL de XTT e 0,03 mL de menadione. A placa foi, então, incubada, na ausência de luz, a 37 °C por 3 horas (Figura 13) e, após esse período, a solução presente em cada orifício foi homogeneizada com uma micro-pipeta (Boeco, Alemanha). Uma alíquota de 1 mL foi transferida para um tubo de Eppendorf e centrifugada a 5.000 × g durante 1 minuto para que a células fossem precipitadas. Em seguida, uma alíquota de 200 µL do produto da degradação do XTT (sobrenadante) foi transferida para o orifício de uma placa de leitura (Elisa) (Figura 14). O resultado desta reação química foi medido utilizando-se o espectrofotômetro

com filtro 492 nm. O experimento foi realizado em triplicata e em três ocasiões distintas.

Os efeitos da incorporação das AgNPs e do tempo de armazenamento no ângulo de contato, adesão e formação de biofilme de *C. albicans* foram avaliados por análises de variância de dois fatores, seguidas pelo teste de Tukey. O nível de significância de 0,05 foi utilizado em todos os testes estatísticos.



FIGURA 13- Ensaio XTT após 3 horas.



FIGURA 14- Sobrenadante do XTT em placa de leitura (Elisa).

**RESULTADO**

## 5 Resultado

### 5.1 Caracterização da solução de AgNPs

#### 5.1.1 Espectroscopia Eletrônica Ultravioleta Visível (Uv-vis)

A solução de AgNPs foi caracterizada por espectroscopia no UV-vis (Figura 15). A banda plasmônica na região de 419 nm indica a presença de AgNPs na solução<sup>12, 23,40,52</sup>.

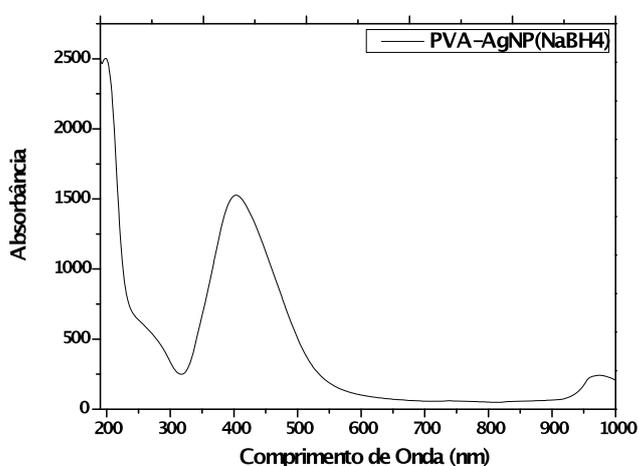


FIGURA 15- Espectro de UV-vis da solução de PVA-AgNPs utilizando NaBH<sub>4</sub> como redutor.

#### 5.1.2 Espectroscopia Vibracional na região do Infravermelho (FTIR)

A figura 16 apresenta a molécula do PVA e as figuras 17 e 18 os resultados de FTIR, confirmando a presença de cada componente estudado na solução.

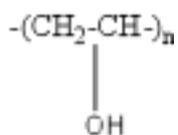


FIGURA 16 - Molécula de Poliálcool Vinílico (PVA).

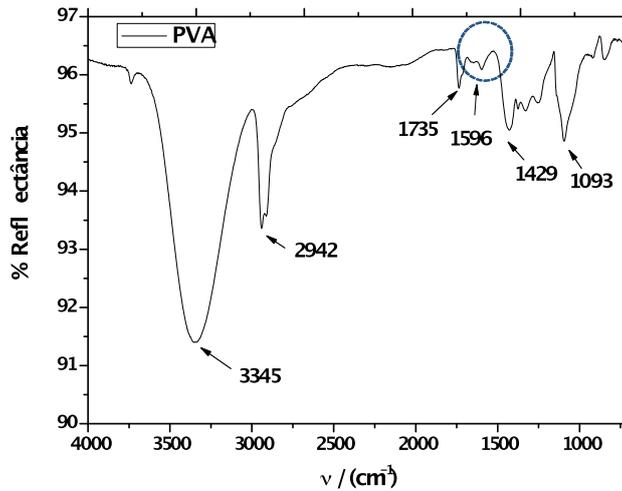


FIGURA 17 - Espectro na região do Infravermelho da solução de PVA.

Na figura 17 pode ser observada a presença de bandas de vibração –OH (3.200 a 3.400  $\text{cm}^{-1}$ ), C=O (1.735  $\text{cm}^{-1}$ ) e -C-O (1.093  $\text{cm}^{-1}$ ). Também podem ser observadas as bandas de vibração simétrica -C-H (2.942  $\text{cm}^{-1}$ ), -C-H metileno (1.596  $\text{cm}^{-1}$ ) e a assimétrica -C-H (1.429  $\text{cm}^{-1}$ ).

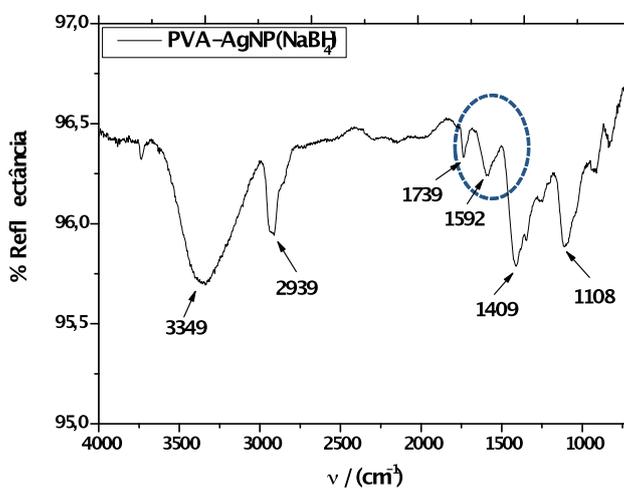


FIGURA 18 - Espectro na região do Infravermelho da solução de PVA-AgNp utilizando o borohidreto de sódio como redutor.

Na figura 18 pode ser observada a presença de bandas de vibração –OH (3.200 a 3.400  $\text{cm}^{-1}$ ), C=O (1.739  $\text{cm}^{-1}$ ) e -C-O (1.108  $\text{cm}^{-1}$ ). Também podem ser observadas as bandas de vibração simétrica -C-H (2.939  $\text{cm}^{-1}$ ) e a assimétrica -C-H

( $1.409 \text{ cm}^{-1}$ ). Pode ser observado, ainda, que a banda em aproximadamente  $1596 \text{ cm}^{-1}$  não é visível no espectro do PVA na presença de AgNPs (indicado no espectro por um círculo). Isso pode ser um indicativo de que as AgNPs influenciam na vibração das ligações dos átomos do polímero.

### 5.1.3 Espalhamento de luz (Dynamic Light Scattering - DLS)

A figura 19 apresenta os resultados de análises de tamanho das nanopartículas das soluções, utilizando-se espalhamento de luz (Dynamic Light Scattering - DLS).

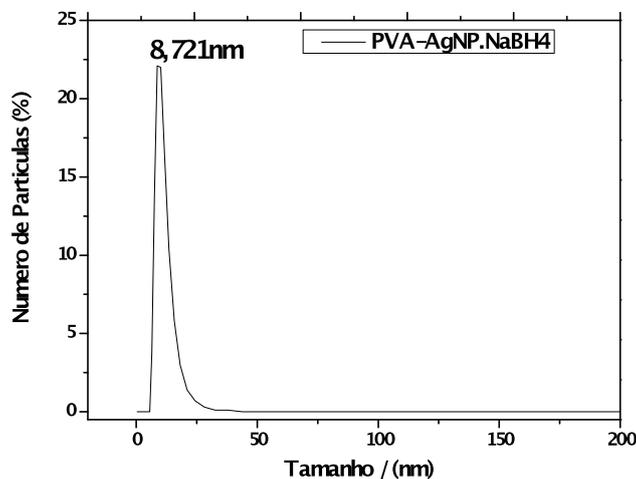


FIGURA 19- Distribuição do tamanho de AgNPs na solução de PVA utilizando-se borohidreto como redutor.

Pode-se observar na figura 19 que, utilizando-se o borohidreto de sódio como agente redutor a maior porcentagem de AgNPs apresentou tamanho de, aproximadamente, 9 nm. Pal et al.<sup>40</sup>, em 2007, relataram que a toxicidade é dependente do tamanho e da forma da nanopartícula, tendo em vista que nanopartículas menores que 10 nm podem atravessar a membrana celular e, assim, acumular-se dentro do microrganismo podendo alterar o seu funcionamento. Além disso, Panacek et al.<sup>42</sup>, em 2006, afirmaram que quanto menor o tamanho da partícula, maior a área superficial para a interação com a membrana da célula microbiana, aumentando o efeito bactericida.

## 5.2 Suscetibilidade antifúngica

O grau de inibição da solução de AgNPs contra a *C. albicans* foi determinado comparando-se a turvação do meio e a porcentagem de crescimento de colônias com aqueles dos controles. A solução de AgNPs demonstrou atividade antimicrobiana significativa em todas as concentrações testadas. Não houve turbidez do meio e a porcentagem de inibição de crescimento em comparação com os controles foi quase completa (variando de 95,1 a 100%) para todas as concentrações.

Os resultados demonstraram que todas as concentrações testadas inibiram o crescimento da *C. albicans*. Dessa forma, foram selecionadas, dentro da faixa avaliada, as concentrações de 1000, 500 e 30 ppm, bem como as de 750 e 250 ppm para serem incorporadas à resina acrílica. A resina modificada com a incorporação dessas concentrações foi identificada como R30, R250, R500, R750 e R1000.

## 5.3 Ângulo de contato

A tabela 1 apresenta os resultados dos ângulos de contato obtidos nas leituras realizadas logo após a confecção dos corpos-de-prova.

Tabela 1 – Estatísticas descritivas de ângulo de contato inicial

Resina modificada (ppm)	Mediana	Mínimo	Máximo
0	59,83	50,30	82,00
30	54,10	43,65	63,15
250	54,78	47,25	62,35
500	58,33	51,75	64,15
750	59,15	49,55	76,95
1000	54,70	49,10	60,55

O efeito dos períodos de armazenamento no ângulo de contato das amostras está apresentado na Tabela 2. Não houve diferença significativa tanto entre os períodos de armazenamento de 0 e 7 dias como entre os de 90 e 180 dias. Nos períodos de 90 e 180 dias de armazenamento, os valores de ângulo de contato foram significativamente maiores que aqueles observados nos períodos de 0 e 7 dias. A Tabela 2 também mostra que na concentração de AgNPs de 30 ppm ou

superior, os valores de ângulo de contato foram significativamente inferiores aos da condição R0 (resina controle, sem incorporação de AgNPs), independentemente do período de armazenamento. Houve uma tendência de diminuir o ângulo de contato com o aumento da concentração de AgNPs na resina acrílica.

Tabela 2 – Médias e desvios-padrão (DP) dos ângulos de contato dos corpos-de-prova nos períodos de armazenamento avaliados

Resina Modificada (ppm)	Período de armazenamento (dias)			
	0	7	90	180
R0	51,17 (4,17) <sup>Aa</sup>	50,89 (5,20) <sup>Aa</sup>	56,94 (5,39) <sup>Ba</sup>	56,10 (4,29) <sup>Ba</sup>
R30	48,51 (6,42) <sup>Ab</sup>	47,33 (6,55) <sup>Ab</sup>	54,13 (4,45) <sup>Bb</sup>	53,20 (4,74) <sup>Bb</sup>
R250	49,86 (4,65) <sup>Ab</sup>	46,08 (5,01) <sup>Ab</sup>	55,68 (4,80) <sup>Bb</sup>	52,28 (4,01) <sup>Bb</sup>
R500	46,74 (4,95) <sup>Abc</sup>	44,14 (4,30) <sup>Abc</sup>	51,04 (4,53) <sup>Bbc</sup>	52,70 (3,83) <sup>Bbc</sup>
R750	47,44 (6,04) <sup>Abc</sup>	44,43 (4,92) <sup>Abc</sup>	53,10 (4,78) <sup>Bbc</sup>	51,86 (4,03) <sup>Bbc</sup>
R1000	46,60 (4,95) <sup>Ac</sup>	43,96 (5,22) <sup>Ac</sup>	52,11 (5,39) <sup>Bc</sup>	50,65 (4,56) <sup>Bc</sup>

No sentido horizontal, letras maiúsculas idênticas mostram que os valores não são significativamente diferentes ao nível de significância de  $p > 0,05$ .

No sentido vertical, letras minúsculas idênticas mostram que os valores não são significativamente diferentes ao nível de significância de  $p > 0,05$ .

Conforme relatado, tendo em vista a possível influência das características do substrato na adesão e formação de biofilme, a rugosidade superficial de todos os corpos-de-prova foi mensurada e somente aqueles que apresentavam valores medianos de  $0,27 \mu\text{m}$  foram selecionados para este estudo.

#### 5.4 Testes de aderência e formação de biofilme

As análises de variância realizadas para os testes de adesão como para os de biofilme, demonstraram que houve efeito significativo para o fator período de armazenamento ( $p=0,000$ ). As análises também demonstraram que não houve efeito significativo para o fator resina ou para interação entre os dois fatores. Os valores de absorvância obtidos com os testes de aderência e formação de biofilme, para todos

os períodos de armazenamento avaliados, estão apresentados nas Figuras 20 e 21, respectivamente. Não houve diferença significativa entre os períodos de 0 e 7 dias e o mesmo resultado foi observado entre os períodos de 90 e 180 dias. Valores de absorvância significativamente maiores foram observados para os períodos de 90 e 180 dias quando comparados com os dos períodos de 0 e 7 dias de armazenamento. Não houve diferenças significantes entre a resina sem modificação e aquelas em que as AgNps foram incorporadas, independente da concentração utilizada.

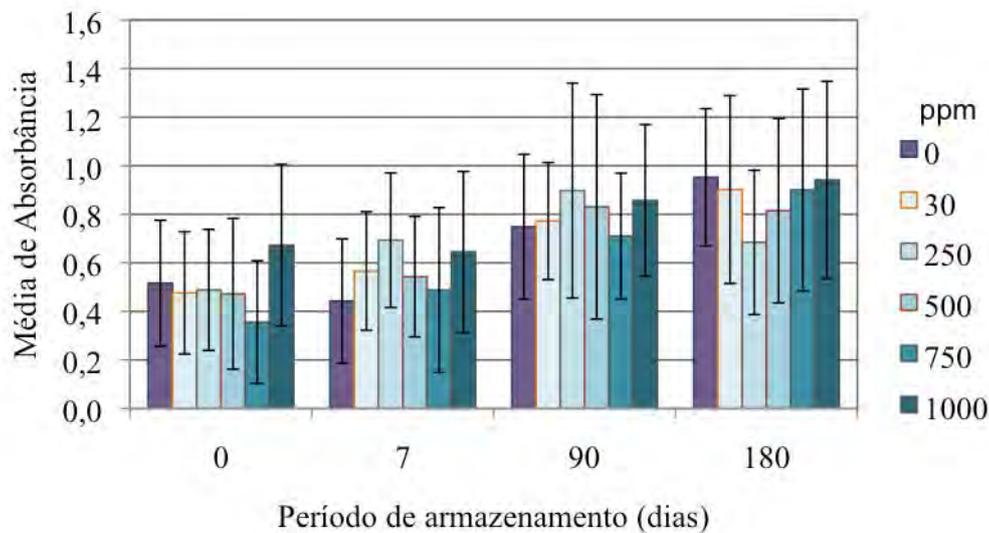


FIGURA 20 – Médias de absorvância (OD 492 nm) e desvios-padrão obtidos no teste de adesão (90 min) para todas as condições experimentais avaliadas.

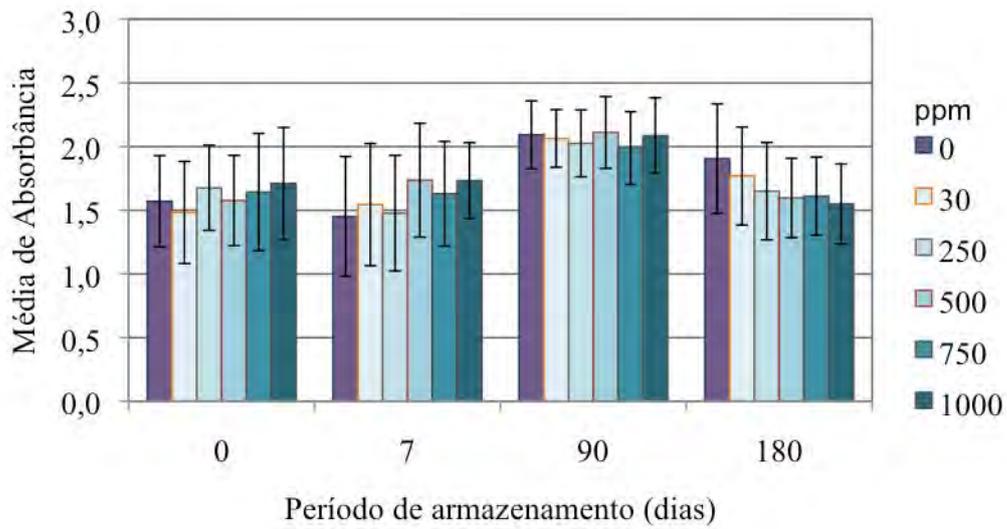


FIGURA 21 – Médias de absorbância (OD 492 nm) e desvios-padrão obtidos no teste de formação de biofilme (48 h) para todas as condições experimentais avaliadas.

***DISCUSSÃO***

## 6 Discussão

Devido ao aumento da resistência dos microrganismos às drogas, outros agentes têm sido desenvolvidos para a prevenção de doenças. Dentre eles a prata, tanto na forma de íons como de nanopartículas, tem sido reconhecida como excelente agente antimicrobiano<sup>20,28,42</sup>, apresentando grande variedade de aplicação na área médica<sup>10</sup>. Mais recentemente, as AgNPs têm sido investigadas por sua propriedade antibacteriana<sup>12,23-25,40-42</sup>. Entretanto, não existem muitos estudos na área odontológica<sup>1,22</sup>. O presente estudo descreve o efeito de AgNPs, em solução aquosa e após sua incorporação em uma resina acrílica para base de prótese, contra *C. albicans*.

Os resultados demonstraram que a solução aquosa de AgNPs apresentou alta atividade antimicrobiana contra *C. albicans*. A inibição do crescimento foi quase completa (~ 100%) na presença de AgNPs, para todas as concentrações testadas. O mecanismo dos efeitos inibitórios de AgNPs sobre microrganismos tem sido investigado. Estudos com bactérias têm demonstrado que as AgNPs podem ser incorporadas na membrana bacteriana<sup>37,40,68</sup>, o que tem sido caracterizado pela formação de "pits" irregulares<sup>40,68</sup>, causando alterações estruturais e degradação. Tem sido demonstrado que alterações estruturais dessa natureza podem aumentar a permeabilidade das membranas, levando ao transporte não regulado através da membrana plasmática e, finalmente, a morte celular<sup>40,68</sup>. Além disso, elementos contendo fósforo, como o DNA podem ser sítios preferenciais para a ligação das AgNPs, uma vez que a prata tem alta tendência para reagir com estes compostos<sup>36-37,42,40</sup>. Por outro lado, poucos estudos avaliaram o efeito das AgNPs contra *C. albicans* e sua ação antifúngica não é totalmente esclarecida<sup>24-25,41,55</sup>. Semelhante aos nossos resultados tem sido observado que as AgNPs exibiram potente atividade antifúngica contra *C. albicans*<sup>25,41</sup>. Foi demonstrado que as AgNPs causaram a despolarização da membrana fúngica e seu rompimento com aumento nos valores de glicose e trealose intracelular e liberados<sup>24</sup>. As células fúngicas também apresentaram dano em sua estrutura externa, o qual foi reconhecido pela formação de "pit" nas paredes celulares e poros na membrana plasmática<sup>25</sup>. Além disso, as AgNPs influenciaram o ciclo celular, inibindo o processo normal de "brotamento" (budding)<sup>25</sup>. Embora os efeitos microbiológicos que podem ter sido responsáveis

pela ação contra *C. albicans* observada neste estudo não foram explorados, é provável que a solução preparada de AgNPs inibiu o crescimento por meio da destruição da integridade da membrana. De acordo com Panáček et al.<sup>41</sup>, os efeitos inibitórios das AgNPs contra bactérias e *Candida spp.* podem ser considerados comparáveis, apesar das diferenças entre esses microrganismos. Entretanto, é importante ressaltar que as células eucarióticas de levedura, devido à sua estrutura mais complexa, podem resistir a concentrações mais altas de prata que as bactérias procarióticas.

O resultado obtido pelo espectro de UV-vis da solução de AgNPs apresentou banda de absorção em torno de 400 nm. Essa banda dá suporte para a presença de AgNPs<sup>12,23,28,42</sup>. Além disso, o pico centrado em cerca de 400 nm no espectro de absorção indica a presença de partículas de prata esférica<sup>12,40</sup>. Outros estudos<sup>12,23</sup> também avaliaram AgNPs esféricas e observaram que elas foram eficazes em inibir o crescimento de bactérias (*Escherichia coli*) e levedura (isolada de mastite bovina).

Os dados obtidos através da análise FTIR confirmaram a presença de PVA, que foi utilizado como o agente estabilizador para evitar aglomeração de nanopartículas<sup>12,28</sup>. Materiais poliméricos têm sido utilizados como estabilizantes para prevenir a aglomeração e a precipitação de nanopartículas<sup>52</sup>. Além disso, o grupo carboxílico do metil metacrilato da resina acrílica, à qual foram incorporadas as AgNPs, pode formar ligações de hidrogênio com o grupo hidroxílico do PVA<sup>28</sup>. A análise DLS<sup>41-42</sup> mostrou que o tamanho das partículas foi de, aproximadamente, 9 nm. O efeito antimicrobiano das AgNPs é dependente do seu tamanho<sup>37,42</sup>. Tem sido relatado que quanto menor o tamanho das partículas, maior o efeito antimicrobiano<sup>37,42</sup>. Isso tem sido atribuído ao fato de que as nanopartículas menores têm maior área superficial para a interação com os microrganismos<sup>37</sup>. Além disso, Morones et al.<sup>37</sup>, em 2005, demonstraram que nanopartículas menores que ~ 10 nm, não só interagiram com a membrana das bactérias, mas também foram capazes de penetrar no seu interior. Assim, o tamanho das AgNPs sintetizadas neste estudo, pode também ter sido responsável pela alta atividade da solução preparada contra *C. albicans*, em todas as concentrações testadas.

É importante ressaltar que, após as AgNPs terem sido incorporadas à resina acrílica para base de prótese, não houve efeito contra *C. albicans*. Para todas as concentrações de AgNPs avaliadas, os valores de absorbância obtidos com os

testes de aderência e de formação de biofilme não foram significativamente diferentes dos controles. A literatura revela que, embora alguns estudos têm investigado a atividade antimicrobiana de soluções de AgNPs contra várias bactérias, informações sobre o efeito dessas nanopartículas após a sua incorporação em polímeros para base de prótese é limitada<sup>22</sup>. Além disso, o efeito das AgNPs incorporadas à resina acrílica sobre a adesão e formação de biofilme de *C. albicans* não foi, até o momento, relatado na literatura. Alguns estudos têm sugerido que as AgNPs incorporadas em polímeros quando da interação com moléculas de água proporcionam eficácia antimicrobiana por meio da liberação de íons de prata ou AgNPs<sup>22,28</sup>. A liberação de íons de prata das AgNPs tem sido considerada como uma contribuição adicional para o efeito antimicrobiano das AgNPs<sup>37</sup>. Essa liberação é baseada na difusão de moléculas de água para dentro do material e na migração de íons de prata ou AgNPs através do polímero para o meio aquoso<sup>28,29</sup>. Assim, as propriedades da matriz polimérica e suas características de difusão de água desempenham papel importante para o processo de liberação<sup>15,29</sup>. A cinética de liberação de íons de prata pela poliamida 6 (PA6) e pelo polimetilmetacrilato (PMMA), ambos preenchidos com 2% em peso de nanopartículas esféricas de prata elementar, com diâmetros de 10 nm a 50 nm, foi investigada<sup>15</sup>. Foi verificado que o PMMA/Ag-nanocompósito liberou quantidades muito menores de íons de prata que o PA6/Ag-nanocompósito. Esses resultados foram explicados pela absorção de água da matriz. O PMMA, em comparação com a PA6, é um polímero hidrofóbico, e sua absorção de água pode não ser suficiente para a liberação de íons de prata a partir das partículas situadas na parte mais interna das amostras<sup>15</sup>. Assim, a ausência de propriedade antifúngica da resina acrílica à base de PMMA, após a incorporação das AgNPs, observada no presente estudo, poderia estar relacionada à pouca liberação de íons de prata ou de AgNPs pelas amostras. Os resultados deste estudo também podem ser atribuídos à estrutura da matriz polimérica. A resina acrílica para base de prótese Vipi Wave contém um agente de ligação cruzada (etileno glicol dimetacrilato) no monômero. Assim, é provável que, devido à configuração da estrutura polimérica formada nas amostras, os íons de prata ou as AgNPs ficaram retidas na estrutura reticulada do polímero e sua liberação para o meio aquoso foi restringida. Outra possível explicação poderia ser a espessura das amostras. Kong, Jang<sup>28</sup> sintetizaram

nanofibras de polimetil metacrilato (PMMA) contendo AgNPs e verificaram que houve difusão das AgNPs para o meio aquoso. Segundo os autores, tem sido relatado que a temperatura de transição vítrea ( $T_g$ ) do PMMA (125 °C) diminui com a redução da espessura do polímero. A  $T_g$  do PMMA é reduzida para valores mais baixos ( $T_g$  de filmes finos de PMMA: 75,3 °C) resultando em um PMMA mais flexível. Assim, neste estudo, a espessura das amostras (2 mm) pode ter tornado mais difícil a liberação das AgNPs a partir da matriz do polímero.

No presente estudo, a hidrofobicidade das amostras também foi avaliada. Os resultados mostraram que a incorporação das AgNPs resultou em diminuição pequena, mas significativa, do ângulo de contato da resina acrílica, em todas as condições experimentais avaliadas. Samuel, Guggenbichler<sup>62</sup>, em 2004, relataram que matrizes poliméricas contendo AgNPs apresentam propriedades de superfície hidrofílica, as quais auxiliam na prevenção da adesão de microrganismos, formação de biofilme e deposição de proteínas. Entretanto, neste estudo não houve diminuição da adesão e formação de biofilme de *C. albicans* na superfície da resina avaliada.

Com relação ao efeito dos períodos de armazenamento, os resultados demonstraram que houve um aumento pequeno, porém significativo, nos valores de ângulo de contato após os períodos mais longos de armazenamento (90 e 180 dias), indicando que as superfícies apresentavam-se mais hidrofóbicas. Foi observado, ainda, que, nesses mesmos períodos houve também aumento nos valores de absorvância obtidos nos testes de adesão e formação de biofilme. Klotz et al.<sup>26</sup>, em 1985, encontraram uma relação linear entre o número de células de *Candida* aderidas por unidade de área e o ângulo de contato do substrato, ou seja, quanto mais hidrofóbica a superfície, maior foi a aderência celular por unidade de área. Os resultados de Samaranayake et al.<sup>60</sup>, em 1994, e Luo, Samaranayake<sup>33</sup>, em 2002, também demonstraram que as espécies de *C. glabrata*, *C. krusei* e *C. albicans* apresentaram capacidade de aderência às superfícies acrílicas correlacionada positivamente com a hidrofobicidade da superfície celular, ou seja, quanto mais hidrofóbica a superfície celular do microrganismo, maior tendência desse microrganismo aderir às superfícies plásticas (hidrofóbicas). Recentemente, Yoshijima et al.<sup>74</sup>, em 2009 observaram que superfícies hidrofílicas poderiam inibir a adesão de cepas fúngicas relativamente hidrofóbicas. Assim, a maior hidrofobicidade das superfícies das amostras após 90 e 180 dias de armazenamento pode ter

contribuído, pelo menos em parte, para o aumento nos valores de absorvância, obtidos nos testes de adesão e formação de biofilme, observados nesses períodos.

Este estudo apresenta limitações considerando-se que somente uma espécie de *Candida*, uma resina para base de prótese e um método de incorporação foram avaliados. Apesar dessas limitações, o estudo demonstrou que, embora nenhum efeito sobre a *C. albicans* tenha sido observado após a incorporação das AgNPs na resina acrílica, os resultados evidenciaram que a solução de AgNPs preparada apresentou alta atividade contra esse fungo, justificando futuras investigações. Outros métodos de incorporação, tais como, formação das AgNPs durante a polimerização, utilização do próprio monômero da resina acrílica como agente redutor ou dispersão de AgNPs no líquido da resina<sup>22,36</sup>, poderiam proporcionar diferentes resultados e deveriam ser melhor estudados. Além disso, o efeito da resina contendo AgNPs incorporadas contra bactérias orais necessita ser avaliado.

**CONCLUSÃO**

## 7 Conclusão

- 1) O método de redução química descrito neste estudo possibilitou a obtenção de uma solução de AgNPs com aproximadamente, 9 nm, que demonstrou alta atividade antifúngica contra *C. albicans*, em todas as concentrações avaliadas.
- 2) Após a incorporação da solução de AgNPs à resina acrílica para base de prótese, não houve efeito antifúngico significativo, em todas as concentrações avaliadas.
- 3) A incorporação da solução de AgNPs à resina acrílica proporcionou redução dos valores médios de ângulo de contato; entretanto, não houve efeito significativo na aderência ou na formação de biofilme de *C. albicans*.
- 4) Houve aumento dos valores de ângulo de contato e de absorbância obtidos nos testes de adesão e formação de biofilme após o armazenamento dos corpos-de-prova por períodos de 90 e 180 dias.

## **REFERÊNCIAS**

## 8 Referências\*

1. Ahn SJ, Lee SJ, Kook JK, Lim BS. Experimental antimicrobial orthodontic adhesives using nanofillers and silver nanoparticles. *Dent Mater.* 2009; 25: 206-13
2. Balamurugan A, Balossier G, Laurent-Maquin D, Pina S, Rebelo AHS, Faure J et al. An in vitro biological and anti-bacterial study on a sol-gel derived silver-incorporated bioglass system. *Dent Mat.* 2008; 24: 1343-5
3. Banting DW, Hill SA. Microwave disinfection of dentures for the treatment of oral candidiasis. *Spec Care Dentist.* 2001; 21: 4-8
4. Bergendal T, Isacson GA. Combined clinical, mycological and histological study of denture stomatitis. *Acta Odontol Scand.* 1983; 41: 33-44
5. Bissell V, Felix DH, Wray D. Comparative trial of fluconazole and amphotericin in the treatment of denture stomatitis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1993; 76: 35-9.
6. Budtz-Jørgensen, E. Etiology, pathogenesis, therapy, and prophylaxis of oral yeast infections. *Acta Odontol Scand.* 1990; 48: 61-9.
7. Budtz-Jørgensen E, Mojon P, Banon-Clement JM, Baehni P. Oral candidosis in long-term hospital care: comparison of edentulous and dentate subjects. *Oral Dis.* 1996; 2: 285-90.
8. Campanha NH, Pavarina AC, Vergani CE, Machado AL. Effect of microwave sterilization and water storage on the Vickers hardness of acrylic resin denture teeth. *J Prosthet Dent.* 2005; 93: 483-7.
9. Casemiro LA, Gomes Martins CH, Pires-de-Souza Fde C, Panzeri H. Antimicrobial and mechanical properties of acrylic resins with incorporated silver-zinc zeolite - part I. *Gerodontology.* 2008; 25: 187-94.
10. Chaloupka K, Malam Y, Seifalian AM. Nanosilver as a new generation of nanoparticle in biomedical applications. *Trends in Biotechnology,* 2010; 28: 580-88
11. 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.

• De acordo com o estilo Vancouver.

• Disponível no site: [http://www.nlm.nih.gov/bsd/iniform\\_requirements.html](http://www.nlm.nih.gov/bsd/iniform_requirements.html)

12. Choi O, Deng KK, Kim NJ, Ross L Jr, Surampalli RY, Hu Z. The inhibitory effects of silver nanoparticles, silver ions, and silver chloride colloids on microbial growth. *Water Res.* 2008; 42: 3066-74.
13. d'Enfert C. Biofilms and their role in the resistance of pathogenic *Candida* to antifungal agents. *Curr Drug Targets.* 2006; 7: 465–70.
14. Dağistan S, Aktas AE, Caglayan F, Ayyildiz A, Bilge M. Differential diagnosis of denture-induced stomatitis, *Candida*, and their variations in patients using complete denture: a clinical and mycological study. *Mycoses.* 2009; 52: 266-71
15. Damm C, Münstedt H, Rösch A. Long-term antimicrobial polyamide 6/silver-nanocomposites. *J Mater Sci,* 2007; 42: 6067-73.
16. Dhadwar SS, Bemman T, Anderson WA, Chen P. Yeast cell adhesion on oligopeptide modified surfaces. *Biotech Adv.* 2003; 21: 395-406
17. Douglas LJ. *Candida* biofilms and their role in infection. *Trends Microbiol.* 2003; 11: 30-6.
18. Fanello S, Bouchara JP, Sauteron M, Delbos V, Parot E, Marot-Leblond A et al. Predictive value of oral colonization by *Candida* yeasts for the onset of a nosocomial infection in elderly hospitalized patients. *J Med Microbiol.* 2006; 55 :223-8
19. 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.
20. Jain J, Arora S, Rajwade JM, Omray P, Khandelwal S, Paknikar KM. Silver nanoparticles in therapeutics: development of an antimicrobial gel formulation for topical use. *Mol Pharm.* 2009; 6: 1388-401.
21. Karaagaclioglu L, Can G, Yilmaz B, Ayhan N, Semiz O, Levent H. The adherence of *Candida albicans* to acrylic resin reinforced with different fibers. *J Mater Sci Mater Med.* 2008; 19: 959-63.
22. Kassae MZ, Akhavan A, Sheikh N, Sodagar A. Antibacterials effects of new dental acrylic resin containing silver nanoparticles. *J Appl Pol Sci.* 2008; 110: 1699–703
23. Kim JS, Kuk E, Yu KN, Kim JH, Park SJ, Lee HJ et al. Antimicrobial effects of silver nanoparticles. *Nanomedicine.* 2007; 3: 95-101

24. 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.
25. Kim KJ, Sung WS, Suh BK, Moon SK, Choi JS, Kim JG et al. Antifungal activity and mode of action of silver nano-particles on *Candida albicans*. *Biometals.* 2009; 22: 235-42.
26. Klotz SA, Drutz DJ, Zajic JE. Factors governing adherence of *Candida* species to plastic surfaces. *Infect Immun.* 1985; 50: 97-101.
27. Kokura S, Handa O, Takagi T, Ishikawa T, Naito Y, Yoshikawa T. Silver nanoparticles as a safe preservative for use in cosmetics. *Nanomedicine.* 2010; 6: 570-4.
28. Kong H, Jang J. Antibacterial properties of novel poly(methyl methacrylate) nanofiber containing silver nanoparticles. *Langmuir.* 2008; 24: 2051-6.
29. Kumar R, Münstedt H. Silver ion release from antimicrobial polyamide/silver composites. *Biomaterials.* 2005; 26: 2081-8.
30. Lamfon H, Porter SR, McCullough M, Pratten J. Formation of *Candida albicans* biofilms on non-shedding oral surfaces. *Eur J Oral Sci.* 2003; 111: 465-71.
31. Li L, Redding S, Dongari-Bagtzoglou A. *Candida glabrata*: an emerging oral opportunistic pathogen. *J Dent Res.* 2007; 86 :204-15, Review.
32. Lombardi T, Budtz-Jørgensen E. Treatment of denture-induced stomatitis: a review. *Eur J Prosthodont. Restor Dent* 1993; 2: 17-22.
33. Luo G, Samaranayake LP. *Candida glabrata*, an emerging fungal pathogen, exhibits superior relative cell surface hydrophobicity and adhesion to denture acrylic surfaces compared with *Candida albicans*. *APMIS.* 2002; 110: 601-10.
34. Madhumathi K, Sudheesh Kumar PT, Abhilash S, Sreeja V, Tamura H, Manzoor K et al. Development of novel chitin/nanosilver composite scaffolds for wound dressing applications. *J Mater Sci Mater Med.* 2010; 21: 807-13.
35. Mima EGO, Pavarina AC, Nepelembroek KH, Spolidorio DMP, Giampaolo ET, Vergani CE. Effect of different exposure times on microwave irradiation on the disinfection of a hard chairside reline resin. *J Prosthodont.* 2008; 17: 312-7
36. 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
37. Morones JR, Elechiguerra JL, Camacho A, Holt K, Kouri JB, Ramírez JT et al. The bacterial effect of silver nanoparticles. *Nanotechnology*. 2005; 10: 2346-53
38. Neppelenbroek KH, Pavarina AC, Spolidorio DM, Vergani CE, Mima EG, Machado AL. Effectiveness of microwave sterilization on three hard chairside reline resins. *Int J Prosthodont*. 2003; 16: 616-20.
39. Nikawa H, Hamada T, Yamamoto T. Denture plaque--past and recent concerns. *J Dent*. 1998; 26 :299-304.
40. Pal S, Tak YK, Song JM. Does the antibacterial activity of silver nanoparticles depend on the shape of the nanoparticle? A study of the Gram-negative bacterium *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol*. 2007; 73: 1712-20.
41. Panáček A, Kolár M, Vecerová R, Pucek R, Soukupová J, Krystof V et al. Antifungal activity of silver nanoparticles against *Candida* spp. *Biomaterials*. 2009; 30: 6333-40.
42. Panáček A, Kvítek L, Pucek R, Kolar M, Vecerova R, Pizúrova N, et al. Silver colloid nanoparticles: synthesis, characterization, and their antibacterial activity. *J Phys Chem B*. 2006; 110: 16248-53.
43. Panagoda GJ, Ellepola ANB, Samaranayake LP. Adhesion of *Candida parapsilosis* to epithelial and acrylic surfaces correlates with cell surface hydrophobicity. *Mycoses*. 2001; 44: 29-35
44. Pavarina AC, Pizzollitto AC, Machado AL, Vergani CE, Giampaolo ET. An infection control protocol: effectiveness of immersion solutions to reduce the microbial growth on dental prostheses. *J Oral Rehabil*. 2003; 30: 532-6.
45. Pavarina AC, Neppelenbroek KH, Guinesi AS, Vergani CE, Machado AL, Giampaolo ET. Effect of microwave disinfection on the flexural strength of hard chairside reline resins. *J Dent*. 2005; 33: 741-8.
46. Pereira T, Del Bel Cury AA, Cenci MS, Rodrigues-Garcia RCM. In vitro *Candida* colonization on acrylic resins and denture liners: influence of surface free energy, roughness, saliva, and adhering bacteria. *Int J Prosthodont*. 2007; 20: 308-10.

47. Pereira-Cenci T, Cury AA, Crielaard W, Ten Cate JM. Development of candida-associated denture stomatitis: new insights. *J Appl Oral Sci.* 2008; 16: 86-94.
48. Perezous LF, Flaitz CM, Goldschmidt ME, Engelmeier RL. Colonization of *Candida* species in denture wearers with emphasis on HIV infection: a literature review. *J Prosthet Dent.* 2005; 93: 288-93.
49. Pietrokovski J, Azuelos J, Tau S, Mostavoy R. Oral findings in elderly nursing home residents in selected countries: oral hygiene conditions and plaque accumulation on denture surfaces. *J Prosthet Dent.* 1995; 73: 136-41.
50. Polyzois GL, Zissis AJ, Yannikakis SA. The effect of glutaraldehyde and microwave disinfection on some properties of acrylic denture resin. *Int J Prosthodont.* 1995; 8: 150-4
51. Radford DR, Sweet SP, Challacombe SH, Walter JD. Adherence of *Candida albicans* to denture-base materials with different surface finishes. *J Dent.* 1998; 26: 577-83.
52. Radziuk D, Skirtach A, Sukhorukov G, Shchukin D, Möhwald H. Stabilization of Silver Nanoparticles by Polyelectrolytes and Poly(ethylene glycol). *Macrom Rapid Commun.* 2007; 28: 848–55.
53. Ramage G, Mowat E, Jones B, Williams C, Lopez-Ribot J. Our current understanding of fungal biofilms. *Crit Rev Microbiol.* 2009; 35: 340-55
54. Rangel EC, Gadioli GZ, Cruz NC. Investigations on the stability of plasma modified silicone surfaces. *Plasmas Polym.* 2004; 9: 35-48.
55. Roe D, Karandikar B, Bonn-Savage N, Gibbins B, Rouillet JB. Antimicrobial surface functionalization of plastic catheters by silver nanoparticles. *J Antimicrob Chemother.* 2008; 61: 869-76.
56. Rowan R, McCann M, Kavanagh K. Analysis of the response of *Candida albicans* cells to Silver(I). *Med Mycol.* 2010; 48: 498-505.
57. Sagripanti JL, Bonifacino A. Citotoxicity of liquid disinfectants. *Surg Infect.* 2000; 1: 3-14
58. Samaranyake LP, McCourtie J, MacFarlane, TW. Factors affecting the in-vitro adherence of *Candida albicans* to acrylic surfaces. *Archs Oral Biol.* 1980; 25: 611-5.

59. Samaranayake LP, Nair RG. Oral *Candida* infections - a review. *Indian J Dent Res.* 1995; 6: 69-82.
60. Samaranayake YH, Wu PC, Samaranayake LP, So M, Yuen KY. Adhesion and colonisation of *Candida Krusei* on host surfaces. *J Med Microbiol.* 1994; 41: 250-8.
61. Samaranayake YH, Wu PC, Samaranayake LP, So M. Relationship between the cell surface hydrophobicity and adherence of *Candida Krusei* and *Candida albicans* to epithelial and denture acrylic surfaces. *APMIS.* 1995; 103: 707-13
62. Samuel U, Guggenbichler JP. Prevention of catheter-related infections: the potential of a new nano-silver impregnated catheter. *Int J Antimicrob Agents.* 2004; 23S1: S75–8
63. Seneviratne CJ, Jin L, Samaranayake LP. Biofilm lifestyle of *Candida*: a mini review. *Oral Dis.* 2008; 14: 582-90.
64. Shen YZ, Qi TK, Ma JX, Jiang XY, Wang JR, Xu QN et al. Invasive fungal infections among inpatients with acquired immune deficiency syndrome at a Chinese university hospital. *Mycoses.* 2007; 50 :475-80.
65. Sheridan PJ, Koka S, Ewoldsen NO, Lefebvre CA, Lavin MT. Cytotoxicity of denture base resins. *Int J Prosthodont.* 1997; 10: 73-7.
66. Shigenori, S. Resin for denture including a silver inorganic system antibacterial agent. *Gifu Shika Gakkai Zasshi.* 2000; 27: 249-60
67. Sims CR, Ostrosky-Zeichner L, Rex JH. Invasive candidiasis in immunocompromised hospitalized patients. *Arch Med Res.* 2005; 36: 660-71.
68. 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.
69. Tari BF, Nalbant D, Al DF, Kustimur S. Surface roughness and adherence of *Candida albicans* on soft lining materials as influenced by accelerated aging. *J Contemp Dent Pract.* 2007; 8: 1-11
70. Verran J, Maryan CJ. Retention of *Candida albicans* on acrylic resin and silicone of different surfaces topography. *J Prosthet Dent.* 1997; 77: 535-9.
71. Webb BC, Thomas CJ, Whittle T. A 2-year study of *Candida*-associated denture stomatitis treatment in aged care subjects. *Gerodontology.* 2005; 22: 168-76.

72. White TC, Holleman S, Dy F, Mirels LF, Stevens DA. Resistance mechanisms in clinical isolates of *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002; 46: 1704-13.
73. Yildirim M S, Hasanreisoglu U, Hasirci N, Sultan N. Adherence of *Candida albicans* to glow-discharge modified acrylic denture base polymers. *J Oral Rehabil.* 2005; 32: 518-25.
74. Yoshijima Y, Murakami K, Kayama S, Liu D, Hirota K, Ichikawa T et al. Effect of substrate surface hydrophobicity on the adherence of yeast and hyphal *Candida*. *Mycoses.* 2010; 53: 221-6.
75. Yu RU, Zhou YS, Feng HL, Liu XY. Silver-ion release and particle distribution of denture base resin containing nanometer-sized silver-supported antimicrobial agent. *Zhonghua Kou Qiang Yi Xue Za Zhi.* 2008; 43: 54-6.
76. Zhang F, Wu X, Chen Y, Lin H. Application of silver nanoparticles to cotton fabrics as an antibacterial textile finish. *Fibers Polym.* 2009; 10: 496-50.

**APÉNDICE**

## Apêndice

Tabela A1- Valores de rugosidade, Ângulo de contato inicial (Ângulo 1), Período de armazenamento, Angulo de contato final (Ângulo 2), ocasião e absorbância dos corpos-de-prova da resina R0 submetidos ao teste de adesão

Adesão (90 minutos)							
CP	Resina (ppm)	Rugosidade	Ângulo 1	Período	Ângulo 2	Ocasião	Absorbância
125	0	0,18	77,30	0	47,10	I	0,407
127	0	0,05	73,70	0	52,05	I	0,431
38	0	0,29	65,90	0	49,55	I	0,599
85	0	0,06	56,90	0	47,35	II	0,545
170	0	0,17	74,50	0	52,50	II	0,690
13	0	0,35	59,00	0	51,25	II	0,311
128	0	0,31	73,75	0	57,80	III	1,081
168	0	0,27	74,40	0	52,00	III	0,197
17	0	0,21	53,60	0	60,30	III	0,380
171	0	0,24	71,80	7	54,45	I	0,228
198	0	0,13	68,90	7	59,95	I	0,480
177	0	0,12	75,65	7	50,45	I	0,513
164	0	0,32	70,35	7	50,35	II	1,061
150	0	0,33	77,35	7	54,45	II	0,296
187	0	0,13	68,10	7	55,10	II	0,227
124	0	0,26	79,55	7	45,45	III	0,436
193	0	0,26	67,35	7	55,00	III	0,450
48	0	0,22	60,55	7	51,80	III	0,291
60	0	0,24	50,80	90	65,30	I	0,445
131	0	0,37	74,30	90	57,00	I	0,470
50	0	0,43	55,15	90	66,20	I	0,431
188	0	0,29	66,40	90	48,65	II	0,661
161	0	0,05	80,05	90	55,55	II	0,950
54	0	0,43	51,90	90	58,65	II	0,825
155	0	0,30	69,60	90	53,70	III	1,171
129	0	0,25	79,95	90	53,15	III	0,605
145	0	0,06	82,00	90	58,90	III	1,181
71	0	0,09	55,00	180	60,60	I	1,175
90	0	0,26	58,00	180	59,05	I	1,355
146	0	0,31	79,30	180	55,00	I	1,394
10	0	0,42	52,20	180	60,20	II	0,660
105	0	0,15	57,90	180	54,00	II	0,840
6	0	0,35	50,30	180	50,15	II	0,679
97	0	0,37	55,85	180	62,85	III	0,759
139	0	0,11	72,30	180	57,30	III	0,896
160	0	0,15	53,30	180	61,05	III	0,811

Tabela A2- Valores de rugosidade, Ângulo de contato inicial (Ângulo 1), Período de armazenamento, Angulo de contato final (Ângulo 2), ocasião e absorbância dos corpos-de-prova da resina R30 submetidos ao teste de adesão

CP	Resina (ppm)	Adesão (90 minutos)					Absorbância
		Rugosidade	Ângulo 1	Período	Ângulo 2	Ocasião	
125	30	0,36	50,30	0	43,15	I	0,511
147	30	0,26	58,45	0	50,40	I	0,536
152	30	0,39	60,85	0	53,10	I	0,159
112	30	0,35	59,60	0	49,20	II	0,469
3	30	0,28	48,20	0	49,20	II	0,444
84	30	0,27	53,60	0	47,20	II	1,015
131	30	0,06	44,70	0	59,75	III	0,358
40	30	0,24	52,85	0	57,85	III	0,602
82	30	0,35	54,00	0	56,15	III	0,191
73	30	0,26	52,50	7	40,95	I	0,589
94	30	0,15	43,65	7	45,45	I	0,597
153	30	0,32	57,30	7	44,20	I	0,582
129	30	0,37	54,85	7	53,10	II	0,219
156	30	0,22	52,00	7	54,70	II	0,494
50	30	0,41	59,60	7	59,30	II	0,309
110	30	0,18	58,90	7	47,80	III	1,093
140	30	0,28	52,85	7	57,70	III	0,644
68	30	0,39	51,05	7	46,00	III	0,570
99	30	0,26	47,30	90	58,10	I	0,581
44	30	0,23	54,00	90	57,55	I	0,676
9	30	0,33	59,40	90	62,80	I	0,323
116	30	0,27	55,30	90	48,30	II	0,951
171	30	0,21	53,60	90	47,95	II	0,771
38	30	0,24	52,55	90	55,50	II	1,134
33	30	0,28	56,30	90	50,25	III	0,808
96	30	0,10	50,05	90	55,70	III	0,709
135	30	0,18	57,30	90	52,00	III	0,995
21	30	0,37	54,70	180	52,45	I	1,130
120	30	0,37	50,70	180	50,65	I	1,424
165	30	0,29	52,80	180	58,65	I	1,450
28	30	0,35	63,15	180	55,70	II	0,698
15	30	0,07	53,75	180	54,05	II	0,471
134	30	0,31	55,50	180	63,20	II	0,638
124	30	0,27	50,35	180	54,10	III	0,541
34	30	0,34	54,80	180	50,50	III	0,612
143	30	0,33	55,50	180	52,60	III	1,152

Tabela A3- Valores de rugosidade, Ângulo de contato inicial (Ângulo 1), Período de armazenamento, Angulo de contato final (Ângulo 2), ocasião e absorbância dos corpos-de-prova da resina R250 submetidos ao teste de adesão

CP	Resina (ppm)	Adesão (90 minutos)					Absorbância
		Rugosidade	Ângulo 1	Período	Ângulo 2	Ocasião	
76	250	0,32	53,30	0	46,05	I	0,169
16	250	0,39	55,10	0	41,60	I	0,352
31	250	0,25	55,95	0	47,75	I	0,608
50	250	0,20	55,70	0	52,35	II	0,531
64	250	0,20	47,25	0	51,40	II	1,022
153	250	0,20	57,20	0	53,25	II	0,581
155	250	0,37	53,65	0	55,75	III	0,434
18	250	0,11	55,65	0	54,90	III	0,458
136	250	0,19	58,80	0	55,30	III	0,240
15	250	0,33	56,90	7	42,55	I	0,644
73	250	0,30	49,75	7	37,95	I	0,611
4	250	0,35	55,75	7	43,60	I	0,568
157	250	0,16	51,00	7	45,25	II	0,624
123	250	0,35	57,00	7	47,60	II	0,314
67	250	0,24	56,55	7	44,40	II	0,699
149	250	0,30	56,10	7	52,90	III	1,011
108	250	0,38	57,15	7	50,00	III	0,519
72	250	0,30	52,85	7	49,45	III	1,249
126	250	0,04	55,30	90	62,75	I	0,625
53	250	0,33	51,90	90	60,55	I	0,404
86	250	0,36	54,45	90	63,50	I	0,252
150	250	0,30	56,35	90	53,40	II	1,554
75	250	0,29	49,70	90	50,50	II	1,034
97	250	0,20	51,70	90	54,95	II	1,384
46	250	0,40	48,50	90	51,45	III	1,058
14	250	0,40	57,50	90	56,20	III	0,638
54	250	0,12	62,35	90	59,30	III	1,129
52	250	0,18	51,30	180	49,55	I	0,777
5	250	0,30	58,05	180	51,30	I	0,995
49	250	0,27	52,30	180	50,50	I	1,147
45	250	0,39	54,40	180	51,50	II	0,202
77	250	0,35	51,05	180	53,45	II	0,506
134	250	0,23	56,25	180	54,65	II	0,512
7	250	0,24	56,05	180	57,15	III	0,916
56	250	0,29	52,50	180	56,15	III	0,591
2	250	0,19	59,20	180	60,50	III	0,512

Tabela A4- Valores de rugosidade, Ângulo de contato inicial (Ângulo 1), Período de armazenamento, Angulo de contato final (Ângulo 2), ocasião e absorbância dos corpos-de-prova da resina R500 submetidos ao teste de adesão

CP	Resina (ppm)	Adesão (90 minutos)					Absorbância
		Rugosidade	Ângulo 1	Período	Ângulo 2	Ocasião	
112	500	0,36	57,50	0	42,45	I	0,158
156	500	0,14	55,20	0	41,20	I	0,365
73	500	0,26	61,15	0	43,05	I	0,113
90	500	0,35	52,75	0	50,85	II	0,800
125	500	0,38	55,60	0	47,20	II	0,835
119	500	0,30	56,30	0	51,45	II	0,890
60	500	0,18	56,25	0	51,95	III	0,154
103	500	0,30	55,15	0	52,00	III	0,561
29	500	0,27	57,75	0	50,20	III	0,373
23	500	0,31	58,85	7	41,10	I	0,364
78	500	0,31	57,15	7	36,70	I	0,553
127	500	0,24	56,35	7	44,50	I	0,610
121	500	0,31	57,75	7	43,40	II	0,419
76	500	0,29	57,20	7	45,55	II	0,432
4	500	0,39	58,05	7	42,75	II	0,142
85	500	0,23	61,50	7	51,05	III	0,555
39	500	0,27	58,60	7	46,50	III	0,859
14	500	0,27	58,90	7	49,15	III	0,952
137	500	0,09	60,20	90	56,75	I	0,346
86	500	0,31	58,30	90	55,55	I	0,433
110	500	0,29	59,05	90	56,95	I	0,270
158	500	0,19	58,75	90	50,85	II	0,905
92	500	0,20	53,45	90	46,15	II	0,709
42	500	0,25	59,75	90	50,95	II	0,732
12	500	0,23	57,70	90	51,05	III	1,413
93	500	0,37	57,35	90	42,35	III	1,588
50	500	0,23	54,00	90	50,05	III	1,078
152	500	0,34	58,60	180	54,25	I	1,432
97	500	0,30	58,45	180	54,60	I	0,855
51	500	0,29	59,65	180	57,00	I	0,834
1	500	0,18	64,15	180	48,90	II	0,546
26	500	0,15	56,90	180	45,85	II	0,330
47	500	0,32	60,15	180	50,40	II	0,360
118	500	0,19	59,50	180	57,00	III	1,190
82	500	0,34	56,55	180	55,85	III	0,666
45	500	0,16	56,25	180	59,20	III	1,121

Tabela A5- Valores de rugosidade, Ângulo de contato inicial (Ângulo 1), Período de armazenamento, Angulo de contato final (Ângulo 2), ocasião e absorbância dos corpos-de-prova da resina R750 submetidos ao teste de adesão

Adesão (90 minutos)							
CP	Resina (ppm)	Rugosidade	Ângulo 1	Período	Ângulo 2	Ocasião	Absorbância
177	750	0,34	52,80	0	36,55	I	0,107
145	750	0,29	53,95	0	37,65	I	0,190
81	750	0,25	70,25	0	47,60	I	0,454
142	750	0,24	51,15	0	47,95	II	0,349
99	750	0,28	69,20	0	49,25	II	0,925
147	750	0,28	59,00	0	41,25	II	0,490
125	750	0,36	57,70	0	51,30	III	0,110
178	750	0,23	51,85	0	47,85	III	0,300
122	750	0,18	60,60	0	54,00	III	0,277
148	750	0,39	58,45	7	42,40	I	0,257
104	750	0,10	68,65	7	46,05	I	0,292
80	750	0,16	71,50	7	38,05	I	0,249
52	750	0,30	74,85	7	46,55	II	0,545
97	750	0,17	74,85	7	43,15	II	0,275
118	750	0,36	53,05	7	44,60	II	0,501
127	750	0,35	56,05	7	52,95	III	1,273
87	750	0,18	75,25	7	48,35	III	0,732
66	750	0,19	72,35	7	48,15	III	0,265
76	750	0,03	74,60	90	58,60	I	0,509
112	750	0,35	58,05	90	54,95	I	0,606
149	750	0,17	52,60	90	57,45	I	0,596
175	750	0,23	55,40	90	50,00	II	1,366
163	750	0,22	51,95	90	48,65	II	0,644
94	750	0,36	69,90	90	47,65	II	0,725
69	750	0,31	73,15	90	52,75	III	0,779
128	750	0,13	53,75	90	50,85	III	0,561
171	750	0,26	52,90	90	51,25	III	0,603
160	750	0,33	51,45	180	53,70	I	0,875
105	750	0,23	72,00	180	55,30	I	1,049
63	750	0,25	72,90	180	53,90	I	1,362
16	750	0,34	53,35	180	51,65	II	0,562
64	750	0,24	68,25	180	51,65	II	0,323
96	750	0,04	72,75	180	56,55	II	0,281
110	750	0,26	57,25	180	49,65	III	1,288
133	750	0,27	55,95	180	43,95	III	1,245
9	750	0,32	56,90	180	48,15	III	1,118

Tabela A6- Valores de rugosidade, Ângulo de contato inicial (Ângulo 1), Período de armazenamento, Angulo de contato final (Ângulo 2), ocasião e absorbância dos corpos-de-prova da resina R1000 submetidos ao teste de adesão

CP	Resina (ppm)	Adesão (90 minutos)					Absorbância
		Rugosidade	Ângulo 1	Período	Ângulo 2	Ocasião	
21	1000	0,20	51,00	0	41,95	I	0,181
89	1000	0,13	60,25	0	44,40	I	0,180
115	1000	0,30	51,80	0	43,00	I	0,854
128	1000	0,33	49,15	0	45,50	II	1,023
3	1000	0,41	52,80	0	51,45	II	0,761
130	1000	0,37	54,05	0	42,15	II	0,835
111	1000	0,31	49,55	0	50,20	III	1,039
65	1000	0,19	56,95	0	52,20	III	0,771
4	1000	0,16	55,35	0	51,45	III	0,411
126	1000	0,26	50,75	7	41,55	I	0,460
60	1000	0,12	53,65	7	37,75	I	0,491
84	1000	0,10	53,60	7	42,45	I	0,688
136	1000	0,12	49,90	7	44,20	II	0,510
159	1000	0,24	57,00	7	43,85	II	0,229
10	1000	0,18	55,80	7	44,30	II	0,300
106	1000	0,26	51,65	7	51,20	III	0,953
32	1000	0,34	50,30	7	48,65	III	0,979
16	1000	0,18	50,85	7	46,35	III	1,195
50	1000	0,23	53,90	90	55,45	I	0,707
19	1000	0,38	53,80	90	58,95	I	0,625
104	1000	0,34	49,15	90	58,95	I	0,511
160	1000	0,12	57,75	90	48,95	II	1,302
146	1000	0,36	56,10	90	46,30	II	0,885
23	1000	0,38	54,80	90	47,20	II	1,341
51	1000	0,30	53,25	90	49,95	III	0,758
123	1000	0,11	53,25	90	52,60	III	0,535
144	1000	0,36	56,05	90	51,10	III	1,051
55	1000	0,12	55,15	180	48,60	I	1,554
28	1000	0,30	52,75	180	48,15	I	0,941
39	1000	0,38	58,05	180	48,45	I	0,758
129	1000	0,20	56,15	180	45,85	II	0,483
145	1000	0,30	51,10	180	43,95	II	0,600
158	1000	0,16	55,20	180	46,70	II	0,453
70	1000	0,34	57,70	180	53,45	III	1,362
34	1000	0,40	52,55	180	54,55	III	1,349
97	1000	0,18	55,40	180	58,10	III	0,975

Tabela A7- Valores de rugosidade, Ângulo de contato inicial (Ângulo 1), Período de armazenamento, Angulo de contato final (Ângulo 2), ocasião e absorbância dos corpos-de-prova da resina R0 submetidos ao teste de formação de biofilme

CP	Resina (ppm)	Biofilme (48 horas)					
		Rugosidade	Ângulo 1	Período	Ângulo 2	Ocasião	Absorbância
43	0	0,35	53,75	0	50,55	I	1,301
49	0	0,33	53,25	0	51,55	I	1,220
190	0	0,19	66,90	0	45,90	I	1,561
87	0	0,26	60,00	0	46,05	II	1,754
40	0	0,34	58,50	0	45,00	II	1,973
31	0	0,40	54,80	0	50,90	II	2,270
184	0	0,05	75,75	0	50,40	III	1,379
58	0	0,28	54,85	0	54,30	III	1,298
41	0	0,29	57,65	0	56,50	III	1,379
18	0	0,15	54,35	7	40,55	I	1,994
68	0	0,17	54,05	7	46,70	I	2,207
82	0	0,05	59,65	7	44,35	I	1,620
93	0	0,31	59,30	7	52,50	II	1,530
194	0	0,30	69,75	7	44,45	II	1,290
182	0	0,04	77,40	7	45,80	II	1,565
167	0	0,26	71,95	7	56,05	III	1,116
149	0	0,22	73,55	7	53,75	III	1,022
34	0	0,29	54,30	7	54,80	III	0,720
130	0	0,08	73,95	90	61,70	I	1,938
69	0	0,32	54,05	90	64,90	I	1,594
77	0	0,25	54,00	90	59,00	I	1,935
33	0	0,35	55,75	90	54,10	II	2,038
114	0	0,17	56,25	90	60,75	II	2,372
123	0	0,28	68,65	90	50,00	II	1,969
100	0	0,24	58,35	90	49,55	III	2,287
88	0	0,15	54,60	90	52,75	III	2,387
15	0	0,38	58,45	90	55,15	III	2,314
162	0	0,19	74,80	180	61,75	I	1,305
176	0	0,30	75,75	180	57,50	I	1,504
14	0	0,27	55,20	180	50,40	I	1,322
191	0	0,23	59,25	180	52,20	II	2,281
84	0	0,05	58,20	180	54,50	II	2,178
26	0	0,27	59,35	180	52,95	II	2,114
136	0	0,24	75,25	180	57,75	III	2,489
72	0	0,07	51,20	180	48,90	III	1,943
173	0	0,15	71,85	180	53,65	III	2,018

Tabela A8- Valores de rugosidade, Ângulo de contato inicial (Ângulo 1), Período de armazenamento, Angulo de contato final (Ângulo 2), ocasião e absorbância dos corpos-de-prova da resina R30 submetidos ao teste de formação de biofilme

CP	Resina (ppm)	Biofilme (48 horas)					
		Rugosidade	Ângulo 1	Período	Ângulo 2	Ocasião	Absorbância
22	30	0,39	53,70	0	38,75	I	1,494
46	30	0,21	52,70	0	40,70	I	0,899
162	30	0,35	54,20	0	50,95	I	1,451
133	30	0,10	55,40	0	38,20	II	2,055
178	30	0,24	50,90	0	44,05	II	1,941
144	30	0,27	57,90	0	40,80	II	1,889
139	30	0,43	56,30	0	51,95	III	1,271
45	30	0,32	56,30	0	51,95	III	1,138
52	30	0,40	51,70	0	49,75	III	1,207
59	30	0,17	48,05	7	37,55	I	2,107
107	30	0,32	53,45	7	36,15	I	2,155
11	30	0,33	55,85	7	40,60	I	2,067
146	30	0,32	53,35	7	47,90	II	1,574
70	30	0,07	56,80	7	41,75	II	1,516
105	30	0,27	53,20	7	46,60	II	1,413
93	30	0,32	49,80	7	51,35	III	1,071
76	30	0,14	52,35	7	49,80	III	1,141
13	30	0,31	58,85	7	51,10	III	0,856
154	30	0,25	59,80	90	62,45	I	1,968
127	30	0,33	53,20	90	57,60	I	1,740
163	30	0,31	53,45	90	54,85	I	1,901
122	30	0,14	57,35	90	55,25	II	1,811
136	30	0,16	56,15	90	51,25	II	2,225
177	30	0,25	53,85	90	50,25	II	2,032
42	30	0,39	56,10	90	53,25	III	2,309
61	30	0,40	50,30	90	52,45	III	2,224
6	30	0,14	55,60	90	48,80	III	2,367
89	30	0,33	46,25	180	56,60	I	1,336
12	30	0,36	54,40	180	49,70	I	1,428
35	30	0,23	61,75	180	49,75	I	1,194
117	30	0,20	54,55	180	49,65	II	2,416
111	30	0,20	58,00	180	53,55	II	2,024
27	30	0,28	55,25	180	56,70	II	1,938
2	30	0,09	51,45	180	47,25	III	1,777
141	30	0,37	60,55	180	43,35	III	1,887
172	30	0,34	54,30	180	59,20	III	1,920

Tabela A9- Valores de rugosidade, Ângulo de contato inicial (Ângulo 1), Período de armazenamento, Angulo de contato final (Ângulo 2), ocasião e absorbância dos corpos-de-prova da resina R250 submetidos ao teste de formação de biofilme

CP	Resina (ppm)	Biofilme (48 horas)					Absorbância
		Rugosidade	Ângulo 1	Período	Ângulo 2	Ocasião	
33	250	0,21	55,05	0	44,80	I	1,171
58	250	0,35	54,00	0	46,50	I	1,655
44	250	0,32	56,55	0	43,90	I	1,415
78	250	0,12	54,60	0	47,45	II	1,894
145	250	0,23	53,60	0	48,00	II	2,181
68	250	0,35	50,50	0	45,60	II	2,057
109	250	0,44	55,05	0	51,85	III	1,459
41	250	0,41	52,10	0	56,60	III	1,441
119	250	0,43	57,70	0	54,45	III	1,813
25	250	0,28	57,05	7	39,85	I	2,068
48	250	0,38	49,65	7	39,10	I	1,917
121	250	0,25	55,50	7	38,35	I	1,769
142	250	0,35	58,10	7	45,80	II	1,557
139	250	0,26	52,85	7	51,25	II	1,643
84	250	0,39	54,30	7	49,40	II	1,589
101	250	0,31	53,75	7	50,15	III	0,979
12	250	0,22	51,40	7	53,65	III	0,997
35	250	0,06	55,50	7	48,25	III	0,776
91	250	0,40	51,50	90	56,50	I	1,944
47	250	0,40	54,80	90	60,90	I	2,173
106	250	0,37	52,90	90	58,50	I	2,049
32	250	0,09	54,75	90	52,60	II	1,442
154	250	0,16	58,60	90	53,40	II	1,829
27	250	0,40	50,25	90	59,70	II	2,238
57	250	0,15	53,35	90	49,05	III	2,275
85	250	0,25	59,00	90	47,90	III	2,065
147	250	0,34	57,40	90	51,00	III	2,213
124	250	0,31	59,55	180	45,75	I	1,182
96	250	0,41	51,85	180	54,20	I	1,089
88	250	0,35	53,95	180	54,10	I	1,216
26	250	0,40	55,40	180	57,80	II	2,068
51	250	0,36	50,50	180	51,25	II	1,755
62	250	0,27	55,20	180	47,50	II	2,049
22	250	0,16	56,60	180	47,45	III	1,823
60	250	0,33	51,75	180	48,30	III	1,783
87	250	0,31	51,50	180	50,00	III	1,885

Tabela A10- Valores de rugosidade, Ângulo de contato inicial (Ângulo 1), Período de armazenamento, Angulo de contato final (Ângulo 2), ocasião e absorbância dos corpos-de-prova da resina R500 submetidos ao teste de formação de biofilme

CP	Resina (ppm)	Biofilme (48 horas)					Absorbância
		Rugosidade	Ângulo 1	Período	Ângulo 2	Ocasião	
63	500	0,31	59,25	0	41,25	I	1,560
94	500	0,34	53,75	0	39,85	I	1,293
166	500	0,16	56,85	0	37,40	I	1,288
116	500	0,35	56,65	0	49,50	II	1,766
95	500	0,43	54,80	0	46,70	II	2,213
142	500	0,29	58,50	0	43,50	II	2,055
132	500	0,29	59,05	0	53,45	III	1,321
34	500	0,34	60,35	0	48,40	III	1,335
20	500	0,20	58,40	0	50,95	III	1,359
70	500	0,29	57,20	7	36,60	I	2,503
54	500	0,17	58,45	7	38,50	I	2,076
2	500	0,26	58,85	7	39,80	I	2,195
36	500	0,33	57,00	7	46,35	II	1,670
147	500	0,35	59,55	7	46,05	II	1,481
151	500	0,30	59,95	7	44,50	II	1,748
99	500	0,32	58,35	7	49,40	III	1,558
27	500	0,16	59,20	7	43,70	III	1,231
55	500	0,32	59,25	7	48,85	III	1,165
138	500	0,34	56,75	90	54,35	I	1,929
114	500	0,31	60,80	90	57,30	I	1,698
64	500	0,32	61,85	90	56,95	I	1,970
66	500	0,29	58,15	90	49,35	II	2,325
115	500	0,19	55,10	90	45,05	II	1,852
3	500	0,34	51,75	90	46,75	II	1,976
30	500	0,33	57,60	90	47,05	III	2,439
41	500	0,29	58,40	90	49,80	III	2,439
7	500	0,27	59,95	90	51,40	III	2,367
74	500	0,27	60,25	180	51,75	I	1,087
167	500	0,38	55,95	180	52,45	I	1,158
11	500	0,42	56,20	180	52,05	I	1,454
117	500	0,42	56,70	180	55,75	II	1,953
109	500	0,06	62,20	180	52,70	II	1,851
87	500	0,15	60,50	180	44,05	II	1,859
124	500	0,16	60,40	180	51,10	III	1,733
46	500	0,37	59,40	180	53,00	III	1,735
21	500	0,28	56,65	180	52,65	III	1,542

Tabela A11- Valores de rugosidade, Ângulo de contato inicial (Ângulo 1), Período de armazenamento, Angulo de contato final (Ângulo 2), ocasião e absorbância dos corpos-de-prova da resina R750 submetidos ao teste de formação de biofilme

CP	Resina (ppm)	Biofilme (48 horas)					
		Rugosidade	Ângulo 1	Período	Ângulo 2	Ocasião	Absorbância
2	750	0,35	58,45	0	42,75	I	1,784
50	750	0,29	69,45	0	43,35	I	1,489
114	750	0,31	57,25	0	42,25	I	1,614
159	750	0,22	54,80	0	46,45	II	2,229
173	750	0,35	49,55	0	46,45	II	2,180
169	750	0,28	51,45	0	50,80	II	2,108
44	750	0,15	67,10	0	56,40	III	1,185
93	750	0,17	73,60	0	55,50	III	1,139
70	750	0,42	75,10	0	56,50	III	1,062
130	750	0,36	62,65	7	36,75	I	2,325
108	750	0,33	57,40	7	35,55	I	1,808
77	750	0,39	76,95	7	36,40	I	2,209
59	750	0,23	69,10	7	45,90	II	1,573
37	750	0,33	71,80	7	44,90	II	1,268
11	750	0,24	57,75	7	45,60	II	1,528
132	750	0,27	58,90	7	43,65	III	1,396
102	750	0,13	70,75	7	49,60	III	1,444
136	750	0,33	59,30	7	49,30	III	1,115
141	750	0,31	52,15	90	57,80	I	1,664
88	750	0,36	69,00	90	62,40	I	1,686
25	750	0,29	74,40	90	61,15	I	1,715
61	750	0,30	74,40	90	48,70	II	2,070
110	750	0,26	57,25	90	49,65	II	1,890
157	750	0,34	61,40	90	55,80	II	1,903
36	750	0,30	50,85	90	50,65	III	2,387
5	750	0,27	53,35	90	46,20	III	2,387
58	750	0,22	72,80	90	51,35	III	2,190
35	750	0,29	55,25	180	58,05	I	1,366
72	750	0,15	70,15	180	48,65	I	1,300
100	750	0,19	68,90	180	53,70	I	1,314
165	750	0,30	50,10	180	45,00	II	2,150
174	750	0,29	52,30	180	53,55	II	2,006
90	750	0,37	71,20	180	51,60	II	1,776
38	750	0,30	66,85	180	47,85	III	1,489
10	750	0,36	58,05	180	52,80	III	1,470
49	750	0,20	71,35	180	57,75	III	1,629

Tabela A12- Valores de rugosidade, Ângulo de contato inicial (Ângulo 1), Período de armazenamento, Angulo de contato final (Ângulo 2), ocasião e absorbância dos corpos-de-prova da resina R1000 submetidos ao teste de formação de biofilme

CP	Resina (ppm)	Biofilme (48 horas)					Absorbância
		Rugosidade	Ângulo 1	Período	Ângulo 2	Ocasião	
36	1000	0,21	54,95	0	39,50	I	1,976
52	1000	0,32	52,00	0	39,70	I	1,788
27	1000	0,22	51,80	0	37,90	I	1,639
98	1000	0,16	57,85	0	48,95	II	2,322
122	1000	0,30	53,35	0	49,45	II	2,063
155	1000	0,10	59,25	0	46,05	II	2,043
127	1000	0,21	49,10	0	51,85	III	1,327
117	1000	0,14	53,60	0	51,00	III	1,160
53	1000	0,26	54,20	0	52,05	III	1,070
72	1000	0,18	56,05	7	35,70	I	2,092
29	1000	0,20	54,65	7	37,45	I	1,973
6	1000	0,18	55,00	7	33,70	I	2,057
54	1000	0,11	56,90	7	47,20	II	1,585
75	1000	0,38	51,90	7	44,90	II	1,790
113	1000	0,32	57,95	7	45,25	II	1,870
134	1000	0,26	56,10	7	50,45	III	1,603
62	1000	0,39	55,65	7	52,05	III	1,356
38	1000	0,16	57,70	7	44,25	III	1,269
20	1000	0,19	54,80	90	54,60	I	1,848
61	1000	0,28	57,95	90	61,55	I	1,742
132	1000	0,37	59,85	90	61,85	I	1,916
152	1000	0,26	52,90	90	47,50	II	2,229
64	1000	0,12	58,90	90	46,55	II	2,012
40	1000	0,27	54,75	90	47,20	II	1,737
96	1000	0,24	55,65	90	45,10	III	2,356
131	1000	0,28	56,45	90	51,85	III	2,468
133	1000	0,10	60,55	90	52,35	III	2,461
121	1000	0,18	51,30	180	51,40	I	1,278
52	1000	0,32	52,00	180	49,30	I	1,364
100	1000	0,24	52,60	180	61,85	I	1,444
116	1000	0,12	53,95	180	50,00	II	1,815
68	1000	0,22	53,70	180	44,35	II	2,085
24	1000	0,25	54,80	180	52,35	II	1,913
120	1000	0,36	51,20	180	51,55	III	1,160
79	1000	0,17	55,30	180	50,20	III	1,410
18	1000	0,19	56,35	180	52,85	III	1,488

Autorizo a reprodução deste trabalho  
(Direitos de publicação reservados ao autor)

Araraquara, 17 de fevereiro de 2011.

AMANDA FUCCI WADY