



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de São José dos Campos
Instituto de Ciência e Tecnologia

SÂMIA CAROLINA MOTA CAVALCANTI SACORAGUE

**AVALIAÇÃO MECÂNICA E MICROBIOLÓGICA DE
RESINAS ACRÍLICAS REFORÇADAS COM PARTÍCULAS
DE SILICA REVESTIDAS COM PRATA**

2016

SÂMIA CAROLINA MOTA CAVALCANTI SACORAGUE

**AVALIAÇÃO MECÂNICA E MICROBIOLÓGICA DE RESINAS
ACRÍLICAS REFORÇADAS COM PARTÍCULAS DE SILICA
REVESTIDAS COM PRATA**

Tese apresentada ao curso de Odontologia do Instituto de Ciência e Tecnologia, UNESP – Univ Estadual Paulista, Campus de São José dos Campos, como parte dos requisitos para a obtenção do título de DOUTOR, pelo Programa de Pós-Graduação em ODONTOLOGIA RESTAURADORA, Especialidade Prótese Dentária.

Orientador: Prof. Adj. Tarcisio José de Arruda Paes Junior

Coorientador: Prof. Adj. Fernando Henrique Cristovan

São José dos Campos

2016

Apresentação gráfica e normatização de acordo com:
Alvarez S, Coelho DCAG, Couto RAO, Durante APM. Guia prático para
Normalização de Trabalhos Acadêmicos do ICT. Rev. São José dos
Campos: ICT/UNESP; 2016.

Sacorage, Sâmia Carolina Mota Cavalcanti
Avaliação mecânica e microbiológica de resinas acrílicas reforçadas
com partículas de sílica revestidas com prata / Sâmia Carolina Mota
Cavalcanti Sacorage. - São José dos Campos : [s.n.], 2016.
82 f. : il.

Tese (Doutorado em Odontologia Restauradora) - Pós-Graduação em
Odontologia Restauradora - Instituto de Ciência e Tecnologia de São
José dos Campos, UNESP - Univ Estadual Paulista, 2016.

Orientador: Tarcisio José de Arruda Paes-Junior

Coorientador: Fernando Henrique Cristovan.

1. Nanopartículas. 2. Prata. 3. Base para dentaduras. 4.
Reembasadores de dentaduras. I. Paes-Junior, Tarcisio José de
Arruda, orient. II. Cristovan, Fernando Henrique, coorient. III.
Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos, UNESP -
Univ Estadual Paulista. IV. Universidade Estadual Paulista 'Júlio
de Mesquita Filho'. V. UNESP - Univ Estadual Paulista. VI. Título.

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Prof. Achille Bassi e Seção Técnica de Informática,
ICMC/USP com adaptações - STATi e STI do ICT/UNESP. Dados fornecidos pelo autor.

AUTORIZAÇÃO

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer
meio convencional ou eletrônico, desde que citada a fonte.

São José dos Campos, 03 de fevereiro de 2016
E-mail: samiamota@yahoo.com.br

Assinatura: _____

BANCA EXAMINADORA

Prof Adj. Tarcisio José de Arruda Paes Junior (Orientador)

Instituto de Ciência e Tecnologia

UNESP – Univ Estadual Paulista

Campus de São José dos Campos

Prof Adj. Alexandre Luiz Souto Borges

Instituto de Ciência e Tecnologia

UNESP – Univ Estadual Paulista

Campus de São José dos Campos

Profa Adj. Regina Tamaki

Faculdade de Odontologia

USP - Universidade de São Paulo

Prof Dr Marina Amaral

Universidade de Taubate

Prof Adj. Lafayette Nogueira Junior

Instituto de Ciência e Tecnologia

UNESP – Univ Estadual Paulista

Campus de São José dos Campos

São José dos Campos, 03 de fevereiro de 2016.

DEDICATORIA

A Deus, por ser fonte da minha força e coragem nessa caminhada, sempre iluminando minha mente e meu coração. Obrigado Pai.

A meus pais Argileu e Nilma, pois o que sou hoje eu devo a eles. Obrigado por todo esforço, dedicação, carinho e amor que dispenderam para que eu pudesse ser quem sou hoje. Amo vocês

A meu amor e marido, Hugo, por todo amor que compartilhamos. Obrigado por sua presença em minha vida.

Aos meus irmãos, Larissa e Kelvim, minhas sobrinhas Bruna e Jullia, e meu cunhado Rolando. O fato de vocês estarem em minha vida com certeza faz dela muito melhor e mais alegre.

Aos meus sogros Luiz e Luiza. Obrigado pelo carinho e conselhos que vocês me oferecem. É muito bom poder contar com pessoas tão especiais como vocês.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, na pessoa do diretor da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Prof. Prof Estevão Tomomitsu Kimpara e do vice-diretora Rebeca di Nicolo .

Ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia Restauradora, coordenado pelo Prof. Alexandre Luiz Souto Borges, e ao coordenador da Especialidade Prótese Dentária, Prof. Titular Marco Antonio Bottino, pela oportunidade concedida.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida.

Aos Professores do Programa de Pós-Graduação em Odontologia Restauradora, pelo aprendizado e conhecimento científico transmitido durante esses anos, e aos funcionários da secção de Pós-Graduação Rosemary, Ivan e Bruno.

Ao meu amigo e orientador Prof. Dr Tarcisio José de Arruda Paes Junior. Estar nessa jornada e ter você como guia foi uma honra. Você é um exemplo como profissional e como pessoa. Gostaria muito de um dia poder retribuir tudo que me ensinou.

Ao Prof Fernando Henrique Cristovan, meu co-orientador. Obrigado pela paciência e oportunidade em conhecer uma nova área. Sua colaboração foi essencial, e sem ela este trabalho não existiria.

Ao Prof Nelson Macedo, um exemplo de profissional, que tornou minha caminhada odontológica muito mais rica, e a quem eu tenho o prazer de chamar de amigo.

Aos funcionários Fernando, Marco Alfredo, Juliane, Lilan, Thais e Eliane, pela dedicação que vocês possuem a esta Universidade. Meu amigo Marcos Vestali (*in memoriam*) você foi um exemplo de pessoa e funcionário, e estará sempre nas lembranças.

Ao amigo Felipe Oliveira, companheiro neste trabalho na parte microbiológica. Obrigado pelos ensinamentos, e por me ajudar tão prontamente quando precisei.

A minha amiga Ana Carolina. Miga, contar com você em tantos momentos foi fundamental para a conclusão deste trabalho. Sua presença no laboratório, seja ajudando nos experimentos ou assistindo vídeos comigo, era garantia de alegria.

Aos amigos que Deus me enviou: Leila, João e padre Ivan. Obrigado pela amizade e orientação espiritual. Agradeço por ter conhecido pessoas tão do bem como vocês, que enriquecem meus dias.

Aos amigos/casais, que posso chamar de *Brothers*, que a pós-graduação me presenteou: Ana Carolina e Jean, Alecsandro e Milagros, Humberto e Marina, Fernanda e Fernando, Lilian e Julio, Pedro e Karen, Carolina e Leonardo. Obrigado pela convivência agradável e divertida. Vocês são responsáveis por muitas risadas durante o trabalho e fora dele.

Aos meus amigos da Pós Graduação: Anna Karina Fernanda e Sabrina Feitosa, Fernanda Campos, Mayra Cardoso, Vanessa Macedo, Tabata Sato, Pollyana Nogueira, Gabriela Freitas, Nathália Ramos, Vinícius Anéas, Cristiane Quishida, Ana Flávia Reis, Gabriela Nishioka, Aline Barcellos, Jéssica Dias, Aline Firmino. Obrigado pela convivência, por ajudar quando eu precisei, e pelos momentos de alegria. Vou levá-los sempre em meu coração.

Aos professores Rubens e Estela Tango, Paula Komori e Alexandre Borges, pelos ensinamentos e amizade dedicada neste período.

À Universidade Federal de São Paulo, onde realizei toda síntese do material e parte das análises para caracterização.

Ao Centro de Microscopia e Imagem da Faculdade de Odontologia de Piracicaba/UNICAMP, na pessoa da técnica Flavia Mariano e do prof Pedro Novaes, pelo auxílio nas imagens em microscopia de transmissão.

Ao prof Ivan Balducci, pelos “bate papos estatísticos” que me auxiliaram neste trabalho, mas também enriqueceram meu conhecimento de estatística e de vida.

A todos os meus familiares e amigos, que participaram direta ou indiretamente, mas sempre estiveram presente. Obrigada!

**"Conheça todas as teorias, domine todas as técnicas, mas
ao tocar uma alma humana, seja apenas outra alma humana".**

Carl Gustav Jung

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	11
LISTA DE QUADROS E TABELAS.....	14
RESUMO	16
<i>ABSTRACT</i>	17
1 INTRODUÇÃO	18
2 REVISÃO DE LITERATURA	22
2.1 Sobre resinas acrílicas e reembasadores.....	22
2.2 Nanotecnologia	33
2.2.1 Nanopartículas de prata (AgNp)	34
2.2.2 Nanopartículas de sílica/prata	38
3 PROPOSIÇÃO	41
4 MATERIAL E MÉTODOS	42
4.1 Síntese das nanopartículas de sílica com prata e caracterização	42
4.2 Preparos das amostras de resina com nanopartículas.....	43
4.3 Confeção de amostras para ensaios mecânicos	44
4.4 Ensaios Mecânicos	47
4.4.1 Resistência a flexão três pontos	47
4.4.2 Ângulo de contato (goniometria)	48
4.4.3 Rugosidade.....	49
4.5 Confeção das amostras para o ensaio de aderência fúngica e halo de inibição	49
4.6 Análises microbiológicas	51
4.6.1 Análise de aderência fúngica e halo de inibição	51
4.6.2 Concentração inibitória mínima (CIM).....	53
4.7 Análise estatística	54
5 RESULTADOS	55

5.1 Caracterização do material	55
5.2 Resistência à flexão por 3 pontos	60
5.3 Análise de ângulo de contato e rugosidade	62
5.4 Análise da aderência fúngica e halo de inibição.....	65
5.5 Concentração mínima inibitória.....	67
6 DISCUSSÃO.....	68
7 CONCLUSÃO	74
8 REFERÊNCIAS	75

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - a) padrões metálicos posicionados na mufla; b) Recobrimento com silicone de condensação pesado.	45
Figura 2 - Corpos de prova para ensaio de flexão. Na fileira superior resina acrílica, e inferior reembasador, sendo amostra do grupo controle, 10-0,5, 10-2, 30-0,5 e 30-2, da esquerda para a direita.	47
Figura 3 - medição do ângulo de contato pelo programa One attension.	48
Figura 4 - a) Dispositivo metálico para inclusão em mufla; b) posicionamento do dispositivo em mufla sobre silicone.	50
Figura 5 - Amostras cilíndricas para ensaio microbiológico. Na fileira superior resina acrílica, e inferior reembasador, sendo amostra do grupo controle, 10-0,5, 10-2, 30-0,5 e 30-2, da esquerda para a direita.	51
Figura 6 - Amostras inseridas na placa de 24 poços, com turvamento do meio, indicando formação do biofilme.	52
Figura 7 - Placa com 96 poços com as diluições preparadas. Na fileira superior com 10 mmols, e inferior com 30 mmols.	54
Figura 8 - Amostra de 30 mM após a secagem e moagem, com coloração branca.	55

Figura 9 - Imagens em microscópio eletrônico de varredura da amostra de 30 mM, em diferentes magnificações- a) 5.000 x; b) 20.000 x.	56
Figura 10 - Gráfico do EDS, da amostra de 10 mM mostrando picos de Silício e prata.	57
Figura 11 - Gráfico do EDS, da amostra de 30 mM mostrando picos de Silício e prata.	57
Figura 12 - Gráfico da difratometria de Raios-x de amostra de sílica pura e recoberta com prata nas concentrações de 10 e 30 mmols.	58
Figura 13 - Imagens das nanopartículas de sílica em diferentes magnificações: a) 100 k; b)200 k; c) 300 k.....	59
Figura 14 - Imagens em MET, de amostra em pó de 10 mmols em 3 magnificações: a) 100 k; b) 200 k; c) 300 k.....	59
Figura 15 - Imagens em MET, de amostra em pó de 30 mmols em 3 magnificações: a) 100 k; b) 200 k; c) 300 k. As setas vermelhas indicam nanopartículas de prata.	59
Figura 16 - Gráfico comparativo entre o grupo controle e modificados de reembasador. O traço superior indica similaridade entre os grupos que estão sob ele	65

Figura 17 - a) Gráfico comparativo entre o grupo controle e modificados de resina; b) Gráfico comparativo entre o grupo controle e modificados de reembasador. O traço superior indica similaridade entre os grupos que estão sob ele. 66

Figura 18 - a) Teste de inibição do crescimento com amostra de reembasador com nanopartícula de 10 mM, sem a formação de halo; b) Semeadura da solução de 30 mM à 2%, sem crescimento de levedura. 67

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1 - Delineamento dos grupos experimentais para ensaios mecânicos e microbiológicos.....	44
Tabela 1 - Estatística descritiva dos dados obtidos no ensaio de resistência à flexão (MPa)	60
Tabela 2 - Análise variância entre os grupos de resina acrílica.....	61
Tabela 3 - Média dos grupos de resina acrílica submetidos ao teste de tukey, com 95% de confiança	61
Tabela 4 - Análise variância entre os grupos de reembasador.....	62
Tabela 5- Média dos grupos de reembasador submetidos ao teste de Tukey, com 95% de confiança	62
Tabela 6 - Média e desvio padrão do ângulo de contato dos grupos de resina...	63
Tabela 7 – Média e desvio padrão do ângulo de contato dos grupos de reembasador	63
Tabela 8 - Média (Ra) e desvio padrão de rugosidade dos grupos de resina acrílica.....	64

Tabela 9 - Média (Ra) e desvio padrão de rugosidade dos grupos de reembasador	64
---	----

Tabela 10 - Média do número de colônias e desvio padrão dos grupos submetidos ao ensaio de aderência fúngica	66
--	----

Sacorague SCMC. Avaliação mecânica e microbiológica de resinas acrílicas reforçadas com partículas de sílica revestidas com prata [tese]. São José dos Campos (SP): Instituto de Ciência e Tecnologia, UNESP - Univ Estadual Paulista; 2016.

RESUMO

O objetivo desta pesquisa foi sintetizar e caracterizar partículas de sílica recobertas com nanopartículas de prata, e avaliar a influência destas quando incorporadas à resina acrílica termicamente ativada e reembasador rígido, em suas características mecânicas e microbiológicas. Uma solução de sílica foi sintetizada pelo método de hidrólise controlada do tetraetilortosilicato (TEOS) em meio alcoólico. Foi adicionada a essa uma solução de nitrato de prata, em duas molaridades (10 mmols e 30 mmols) formando partículas do tipo núcleo-casca. Após centrifugação e secagem, cada pó obtido foi adicionado em duas concentrações: 0.5% e 2%, às resinas analisadas. Foram confeccionadas barras retangulares (n=9) de 30 x 10x 3mm para realização do teste de resistência a flexão de três pontos, rugosidade e ângulo de contato; e 120 amostras em forma de disco (2 mmx10 mm) para análise microbiológica. Como grupo controle teve-se amostras sem nanopartículas. As nanopartículas foram analisadas em microscopia eletrônica de varredura com microanalisador por energia dispersiva de raios-X integrado (EDS), Difrátômetro de Raios-X e microscopia eletrônica de transmissão. Uma suspensão de *Candida albicans* foi utilizada para análise de aderência fúngica, halo de inibição e concentração inibitória mínima. As fotomicrografias mostraram que as nanopartículas de 10 mmols apresentam uma distribuição mais homogênea e menor agregação das nanopartículas de prata na superfície da sílica do que as de 30 mmols. Os resultados indicaram que a resistência a flexão foi afetada negativamente, em ambos materiais, com a adição de 2% de partículas, independente da molaridade. A adição das partículas não alterou a molhabilidade da superfície dos materiais, nem a rugosidade, exceto do grupo de reembasador com partículas de 10mmols, em ambas concentrações. As partículas não apresentaram ação antifúngica para os materiais testados em nenhuma concentração, nem houve a formação de halo. Entretanto, a solução apresentou concentração inibitória mínima a partir de 2.000 ppm. Concluiu-se que em baixas concentrações as nanopartículas não afetaram as características mecânica e de superfície da resina acrílica e do reembasador, entretanto elas não inibiram a formação de biofilme por *C. albicans* sob os materiais.

Palavras-chave: Nanopartículas.Prata. Base para dentaduras. Reembasadores de dentaduras.

Sacorage SCMC. Mechanical and microbiological evaluation of acrylic resins reinforced with silica-silver particles [doctorate thesis]. São José dos Campos (SP): Institute of Science and Technology, UNESP - Univ Estadual Paulista; 2016.

ABSTRACT

This research aimed to synthesize, characterize, and evaluate the influence of the addition of silica-silver core/shell particles in mechanical and antifungal characteristics of thermally active acrylic resins or hard reliner. Silica solution was produced by controlled hydrolysis method of tetraethylorthosilicate (TEOS) in an alcoholic. It was added a silver nitrate solution in two molarities, 10 and 30 milimols, forming core-shell particles. After centrifugation and drying, each obtained powder was added in two concentrations 0.5% and 2% in the resins analyzed. Rectangular samples (n=9) with 30 x 10 x 3 mm were made to three point bend test), roughness and contact angle, and 120 samples in disc (2 mm x 10 mm) for microbiological analysis. Samples without particles were used as control. The nanoparticles were analyzed by scanning electron microscopy with dispersive energy microanalyzer integrated X-rays (EDS), X-ray diffractometer and transmission electron microscopy. Candida albicans suspension was used to adhesion test, inhibition zone and minimum inhibitory concentration. Photomicrograph showed that nanoparticles with 10 milimols show a distribution more uniform and less aggregation of silver nanoparticles on the silica surface than 30 millimols. The Three point bend test results showed that the flexural strength was negatively affected in both materials, with the addition of 2% particles, in both molarity. The addition of the nanoparticles did not change the surface wettability or roughness of the materials, except for except the reliner group with 10mmols, in both concentrations. The nanoparticles showed no antifungal action for the materials tested at any concentration, neither was zone innibition. However, the solution presented minimal inhibitory concentration to 2.000 ppm. We conclude that low concentrations nanoparticles do not affect the mechanical characteristics and surface of the acrylic resin or reliner, however they do not reduce biofilm adhesion by C. albicans in the materials.

Keywords: Nanoparticules. Silver. Denture base. Denture liners.

1 INTRODUÇÃO

Os indivíduos portadores de prótese total são mais susceptíveis a infecções na mucosa de revestimento, principalmente no tocante a infecções fúngicas. Segundo dados da literatura, cerca de 50 a 70% dos pacientes usuários deste tipo de aparelho protético apresentam estomatite causada por *Candida albicans* (Daniluk et al., 2006; Pires et al., 2002; Budtz-Jrgensen et al., 1996; Lotfi-Kamran et al., 2009)

Apesar da *Candida ssp* ser um componente comum à flora da cavidade bucal ela pode se tornar um patógeno em algumas condições, tais como: inadequada higiene oral, hipossalivação, diabetes, o uso de próteses mal adaptadas ou com superfície desgastada e áspera (Pires et al. 2002).

Alguns estudos têm mostrado que a aderência de *Candida ssp* na superfície do polimetilmetacrilato (PMMA) é associada à hidrofobicidade apresentada tanto pelos microrganismos como pelas unidades monoméricas expostas na superfície, que interagem com os domínios hidrofóbicos de proteínas gerando fortes interações desta natureza (Park et al., 2003; Nikawa et al., 1992a, 1992b).

Diante disto faz-se importante estudar agentes que alterem estas interações, que atuem como antimicrobianos ao inibir a adesão bacteriana ou fúngica.

Um agente antimicrobiano que vem sendo amplamente estudado em outras áreas do conhecimento é a prata. Na medicina, estudos sugerem que as nanopartículas de prata tem um potente efeito anti-inflamatório e aceleram a cicatrização de feridas (Nadworny et al., 2008; Tian et al., 2007), principalmente no tratamento de queimaduras, onde a sulfadiazina de prata é utilizada como padrão ouro.

Outros autores têm como alvo a análise de materiais já disponíveis no mercado, que utilizam a prata como antibacteriano, onde se destacam os implantes cardiovasculares, cateteres venosos e neurológicos, e cimentos para osso a base de PMMA (Chaloupka et al., 2010). Ainda não se conhece por completo o mecanismo de ação da prata nos microrganismos, mas é certo que a prata ou as nanopartículas de prata em meio aquoso é biologicamente reativa e age sobre as bactérias, tendo efeito bactericida e bacteriostático (Völker et al., 2013).

Na odontologia, alguns estudos têm avaliado tanto as propriedades mecânicas quanto a morfologia, e a eficiência bacteriológica e fungicida das nanopartículas de prata quando adicionadas em resina acrílicas, compósitos, e reembasadores. A adição de nanopartículas de prata em resinas compostas fotoativadas em concentrações acima de 0,5% é capaz de inibir o crescimento bacteriano (Fan et al., 2011). A adição de nanopartículas de prata em resina acrílica para base de prótese, em concentrações de 0.05%, 0.5%, e 5%, apresentou bons resultados, indicando não haver perda de resistência mecânica da resina. Além disso, sugere-se que uma menor concentração de partícula gera uma melhor dispersão desta no interior da massa de resina, além destas se apresentarem na superfície do polímero (Monteiro et al., 2012).

Estudos recentes avaliaram a adição de nanopartículas de prata em resinas acrílicas quimicamente ativadas (RAAT) e compósitos à base de metacrilatos e siloranos (Kiriya et al., 2013; Kasraei, Azarsina, 2012). A pulverização de um composto inorgânico a base de prata em 3 concentrações (0,5%, 1,0% e 1,5%) sobre o PMMA mostrou-se eficaz frente ao *S. mutans*, *S. oralis*, *S. gorgonii*, *A. naeslundii* e *C. albicans*. A redução do número de células bacterianas e fúngicas parece estar diretamente ligada com a quantidade de ions/partículas de prata dispersas em meio aquoso. (Kiriya et al., 2013).

Outros materiais resinosos que necessitam de certa atenção quanto as

propriedades mecânicas e microbiológicas são os reembasadores. Os materiais reembasadores e condicionadores de tecido são amplamente utilizados para auxiliar na recuperação dos tecidos mucosos após trauma causado por prótese mal adaptadas ou para ajustar próteses em rebordos com grande reabsorção. Entretanto, estes materiais se degeneram muito rapidamente por apresentarem uma superfície porosa, o que facilita a colonização por micro-organismos. A adição de nanopartículas de prata em materiais condicionadores de tecido, a base de silicone, em concentrações variadas reduziu consideravelmente a colonização por *C. albicans*, mas a partir de 80 ppm as partículas de prata tendem a se aglomerar, o que pode reduzir sua eficiência antimicrobiana (Chladek et al., 2011; Chladek et al., 2012). Um dos problemas apresentados pela inserção das partículas de prata nos materiais é a alteração de cor, que varia conforme sua concentração, de amarelo a marrom escuro (Fan et al., 2011).

Sabe-se que, com a diminuição do tamanho da partícula têm-se uma alteração na ressonância plasmônica da superfície, ou seja, em partículas menores (1-2 nm), ela perde a sua cor característica (Nischala et al., 2011). Porém, essas partículas em meio líquido se tornam instáveis, e tendem a se aglomerar (Nischala et al., 2011). Uma tentativa de resolver este problema é a aglomeração destas partículas sobre partículas de sílica. A sílica é um material muito utilizado para formação de partículas bifuncionais, pois é quimicamente inerte, opticamente transparente e não afeta o núcleo dos materiais que estão em sua superfície (Hebalkar et al., 2011). A adição de sílica em resina a base PMMA, em concentrações variando entre 0,1%, 0,5%, 1% e 5%, proporcionou benefícios diretos na resistência à flexão do material (da Silva et al., 2012).

Frente às perspectivas apresentadas de ação antimicrobiana pela utilização destas partículas nos materiais odontológicos, estudos podem ser realizados na busca por características mais estáveis da prata e suas concentrações, e para determinar a influência destas quando associadas a

materiais poliméricos para prótese.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Sobre resinas acrílicas e reembasadores

Desde sua introdução no mercado odontológico em 1937, pelo dentista Walter Wright, a resina acrílica é utilizada com sucesso para confecção de próteses dentais totais e parciais, fixas unitárias e múltiplas provisórias, próteses oculares, dentre outros (John et al., 2001). Esta popularidade se consolidou devido a resina ser um material transparente e rígido, passível de pigmentação, com propriedades mecânicas, como dureza, solubilidade, biocompatibilidade e resistência à fratura, extremamente satisfatória, estáveis em ambiente bucal (Paes Junior et al., 1999; Anusavice, 2005).

A resina acrílica utilizada rotineiramente em odontologia é um polímero a base de polimetilmetacrilato (PMMA), apresentada em forma de pó e líquido. O pó é constituído por esferas polimerizadas de PMMA e uma pequena quantidade de peróxido de benzoíla, que atua como iniciador do processo de polimerização; o líquido contém metacrilato de metila e hidroquinona, que atua como inibidor da reação, prevenindo a polimerização do líquido durante o armazenamento. A reação de polimerização inicia-se a partir de um radical livre, normalmente o peróxido de benzoíla, que quando aquecido entre 50 °C e 100 °C se quebra e dá origem a dois radicais livres que possuem em sua estrutura um elétron livre não emparelhado. Para as resinas de ativação química, uma amina terciária é adicionada ao líquido que serve como ativador da reação de polimerização. Quando este radical livre se aproxima de uma molécula de metacrilato, acaba por atrair o elétron de uma dupla ligação existente entre carbono e oxigênio, tornando uma ligação simples e deixando livre outro elétron

que continuará o crescimento da cadeia. É usual a adição de agentes de ligação cruzada, como o glicol dimetacrilato de metila, com intuito de aumentar a resistência à deformação. A reação de polimerização pode ser desencadeada após a manipulação do material por ativação térmica - RAAT (calor seco, vapor, ou energia de micro-ondas), ativação química- RAAQ, ou luz visível (Anusavice, 2005; Paes-Junior et al., 2014).

Para a confecção de próteses totais mucossuportadas opta-se por utilizar a resina acrílica ativada termicamente. Isso se justifica pois esta apresenta propriedades biomecânicas e ópticas superiores às resinas de ativação química. Segundo Winkler (1984) ao comparar as resinas polimerizadas por ativação química (RAAQ) com aquelas polimerizadas por ativação térmica (RAAT) destaca-se uma perceptível diminuição da resistência a flexão nas RAAQ em relação às RAAT. O ponto chave atribuído à diferenciação entre as elas é o método de polimerização e o fato das RAAQ necessitarem de um ativador (amina terciária) para desencadear o processo de polimerização à temperatura ambiente, o que acaba por ter uma menor conversão do monômero em polímero, além de promover a oxidação da resina polimerizada a longo prazo, causando alteração de cor.

A contração de polimerização intrínseca às resinas acrílicas é um importante aspecto relativo ao do processo de exotermia. Um dos maiores problemas relatados pelo autor (Winkler, 1984) é a baixa taxa de conversão do monômero em polímero nas RAAQ, quando comparado à RAAT. Isto resulta em um alto nível de monômero residual, que o autor não acredita que este seja um desencadeador de efeitos irritativos ou alérgicos para os tecidos orais, mas que sua influência esteja diretamente relacionada às propriedades mecânicas do material polimerizado. A resistência transversa, na melhor das hipóteses, é para as RAAQ 80% daquela encontrada nas RAAT. Entretanto, uma das maiores vantagens das RAAQ é a melhor adaptação e estabilidade dimensional

conseguidas por não se introduzir nesta, o estresse de processamento, que é inerente à polimerização por ativação térmica. Além disso, as RAAQ possuem melhor estabilidade dimensional e adaptação, devido a não estarem sujeitas ao stress promovido durante o ciclo de polimerização em água aquecida.

Em uma revisão sobre estabilidade dimensional e métodos de polimerização de resinas para base de prótese, Takamata e Setcos (1989) investigaram a precisão de algumas resinas quanto ao tipo de polimerização, assim como o método para prensagem, buscando aqueles que proporcionassem a menor distorção durante o processamento. Apesar de novos métodos de processamento, novos materiais ou a associação entre eles (como resinas foto-ativadas ou polimerizadas por micro-ondas , e resinas polimerizadas em sistemas a vácuo de baixa temperatura) o método tradicional de polimerização de resinas por calor ainda é citada como melhor.

Bonnati et al. (2009) avaliou o efeito da polimerização na estabilidade de cor de resina para base de prótese. Segundo os autores, a mudança de cor pode ser causada por diversos fatores, como o grau de conversão e o monômero residual, assim como por excesso de porosidade por pressão insuficiente durante a prensagem. Os autores avaliaram a estabilidade de cor de uma resina acrílica polimerizada em micro-ondas, dividido em três grupos, variando o ciclo de polimerização. Como controles foram confeccionados grupos com resina termicamente ativada em banho de água quente, e quimicamente ativada. Algumas amostras de cada grupo foram cicladas em uma câmara de envelhecimento acelerado, e avaliadas após 20, 192 e 384 horas. Outra série de amostras foi imersa em água, café, chá, refrigerante a base de cola e vinho tinto e avaliadas após 1, 12 e 36 dias. A cor foi mensurada por um espectrofotômetro antes e após o envelhecimento. Os resultados mostraram que quanto ao envelhecimento, o teste de análise de variância mostrou significância de ambas as variáveis, grupo e tempo, assim como da interação entre elas. O grupo de

resina acrílica quimicamente ativada foi o menos estável, independentemente do tempo. Além disso, a variação de coloração apresentou-se fortemente diferente dos outros grupos para cada momento. A resina acrílica processada em forno de micro-ondas mostrou as menores alterações após 20 horas, independentemente do ciclo de polimerização. A mudança de cor após a imersão em diversas soluções somente foi significativa quando considerado o agente e o tempo, mas manteve-se estável entre os grupos. Os autores concluíram que as resinas termoativadas apresentaram resultados estáveis após o envelhecimento, quando comparado a RAAQ. Esse fato é possivelmente ocasionado pela diferente composição entre os materiais, como a presença de um ativador químico, que também pode gerar porosidades no material.

O ciclo de polimerização da resina também influencia diretamente a quantidade de monômero residual e consequentemente a resistência a flexão. Paes-Junior et al. (2006) avaliaram a resistência a flexão e quantificaram o monômero residual superficial de diversas resinas, variando os protocolos de polimerização. Foram utilizadas dois tipos de resina de ativação por energia de micro-ondas, dois de resinas de ativação térmica convencional em banho de água aquecida no ciclo longo, uma resina de ativação térmica em ciclo rápido, e dois grupos cuja resina era a mesma de ativação química, processada em duas condições: à temperatura ambiente e, por aquecimento adicional em banho de água. O autor concluiu que as resinas quimicamente ativadas e as que foram submetidas ao banho térmico curto apresentaram os piores valores de resistência a flexão, assim como os maiores valores de monômero residual. O aquecimento adicional em banho de água da resina de ativação química gerou uma diminuição considerável dos níveis de monômero residual e determinou o aumento da resistência a flexão do material.

A presença de monômero residual também está relacionada com a porosidade, conforme levantado por Kimpara et al. (2009). Os autores avaliaram

o efeito de diferentes ciclos de polimerização nas propriedades das RAAT por meio da verificação da quantidade do monômero residual superficial e da presença de porosidade. Amostras de resina acrílica foram submetidas a 4 ciclos diferentes ciclo I (65 °C por 30 min; 50 °C por 23 h 30 min e 100 °C por 1h); ciclo II (50 °C por 24 h; 65 °C por 1 h; 30 min para elevar a 100 °C e 1 h a 100 °C); ciclo III (72 °C por 9 h); e ciclo IV (65 °C por 1 h; 30 min para elevar a 100 °C e 1 h a 100 °C). Os resultados mostraram que os espécimes submetidos ao ciclo curto tinham a presença marcante de porosidades. Quanto ao monômero residual, nos ciclos longos, a elevação da temperatura ao final do ciclo foi importante para a diminuição do monômero residual.

Apesar de sua excelente estabilidade dimensional, boa reprodutibilidade e adaptação aos tecidos moles, alguns casos podem apresentar desajustes devido à contínua reabsorção do osso alveolar ou alterações em tecido mole, prejudicando a estabilidade do aparelho. A fim de minimizar danos aos tecidos de suporte, foram desenvolvidas técnicas e materiais para reembasamento das próteses. Estes recursos permitem restabelecer a retenção e a estabilidade, ajustes e correções na área do selado periférico.

Os sistemas de reembasamento quimicamente ativados (para uso direto) são uma excelente alternativa visto que não é necessária a retenção da prótese para envio ao laboratório, tornando a execução rápida (Cerveira Netto, 1987; Telles, 2011).

Segundo McCabe e Walls (2006), os materiais reembasadores podem ser divididos em 3 categorias: materiais rígidos, condicionadores e resilientes. Os materiais rígidos são resinas acrílicas, a base de monômeros de metacrilato de metila (MMA) com agentes plastificadores, ou monômeros de metacrilato maiores como a etila e butila. Estes agentes levam à diminuição da temperatura de transição vítrea, gerando possível aumento na instabilidade dimensional. Os condicionadores de tecido são materiais extremamente resilientes, que não

possuem monômeros acrílicos no líquido permitindo assim sua utilização após cirurgias ou em áreas traumatizadas, levando à recuperação dos tecidos moles sem irritação. Entretanto, sua durabilidade é curta sendo recomendada sua troca a em curto espaço de tempo. Os reembasadores resilientes não são tão flexíveis como os condicionadores, mas mantém esta propriedade por aproximadamente 2 meses, até enrijecerem. Estes materiais podem ser à base de acrílicos ou de elastômeros de silicone, que possuem uma composição similar aos silicones para moldagens, sendo basicamente polímeros de dimetilsiloxano (polidimetilsiloxano). Este é um líquido viscoso, que ao interagir com a borracha, por um agente de união, resulta em um material com boas propriedades elásticas.

Wyatt et al. (1986) compararam as características físicas de seis tipos de reembasadores rígidos: a temperatura até atingir a cura, os tempos de presa, e a porosidade de cada material. Com o auxílio de termopares e eletrodos, constatou-se que apenas dois grupos apresentaram altas temperaturas durante o tempo de presa, entre 70 °C e 80 °C, o que pode ser intolerante para boa parte dos pacientes. A avaliação em microscopia óptica de varredura (MEV) revelou duas camadas distintas: uma massa sólida abaixo de uma fina camada de material poroso. Essa camada externa porosa pode acumular placa bacteriana mais facilmente do que um material livre de poros. Os autores concluíram que as características físicas de qualquer um dos produtos avaliados não indicaram superioridade clínica entre eles.

Archadian et al. (2000) avaliaram o efeito da termociclagem na resistência à flexão de resinas e reembasadores. Foram confeccionados barras com 3 tipos de resina (Acron, Acron MC e Ivocap), barras com 3 tipos de reembasadores (Rebaron, Tokuso Rebase e Lite rebase), e a combinação entre eles(resina+reembasador). Os materiais foram manipulados conforme recomendação do fabricante, realizou-se o acabamento e polimento dos

espécimes, e estes foram armazenados em água destilada à 37 °C por 50 h. Metade dos espécimes foram termociclados durante 20.000 ciclos, entre 4 °C e 60 °C. Foi então realizado o teste de resistência a flexão de 3 pontos. Os resultados mostraram que após 48h depois de processados os espécimes em resina acrílica, não apresentaram valores abaixo de 100 MPa, mas após a termociclagem todos, exceto Ivocap, mostraram menor valor de resistência. Os reembasadores apresentaram valores de resistência inferiores se comparados a resina acrílica, e seguiram o mesmo padrão apresentando valores menores após a termociclagem. O autor relaciona os valores inferiores dos reembasadores ao agente plastificante e ao monômero residual, que no caso das resinas quimicamente ativadas é cerca de 10 vezes maior que as termo ativadas. Os grupos com materiais combinados apresentaram valores de resistência superiores ao de reembasadores somente. Após a termociclagem somente 3 grupos não apresentaram aumento na resistência.

Silva et al. (2013) avaliaram o efeito da termociclagem na tenacidade a fratura de uma resina acrílica termopolizável e 4 tipos de reembasadores a base de polietilmetacrilato (PEMA). Após a confecção dos espécimes com cada material (n=20), acabamento e polimento, eles foram divididos, sendo que 10 foram testados imediatamente e a outra metade foi termociclada, (banho de água, variando de 5 °C a 55 °C, durante 5000 ciclos) e posteriormente testada. Todos os espécimes foram submetidos a um teste de tenacidade a fratura de 3 pontos. Os resultados mostraram que o grupo controle (resina termo ativada) apresentou os melhores resultados de tenacidade frente aos reembasadores, independente da termociclagem. Entre os reembasadores, dois grupos apresentaram resultados similares, porém superiores a um dos materiais. A termociclagem não afetou negativamente a tenacidade à fratura dos materiais avaliados. Entretanto é lembrado que em condições clínicas os materiais estão sujeitos também ao estresse mastigatório.

Oliveira e colaboradores (2007) avaliaram o efeito da escovação na rugosidade superficial de dois materiais resilientes, a base de silicone, comparado com uma resina acrílica termoativada. Foram confeccionados 20 espécimes de cada material, sendo que 10 foram armazenados como controle, e os outros 10 submetidos a escovação mecânica, por 30.000 ciclos (5 ciclos por segundo), com uma carga de 300 g, o que equivale a aproximadamente 3 anos. O teste de rugosidade foi realizado em 2 momentos, antes e após a escovação. Os resultados mostraram menor rugosidade dos materiais antes da escovação, tendo a resina acrílica apresentado os melhores resultados. A escovação aumentou significativamente a rugosidade, principalmente de um dos reembasadores.

Chladek et al. (2014) apresentam em sua revisão sobre reembasadores resilientes de longa duração, composição, efeitos clínicos, colonização do material por microrganismo, e algumas propriedades mecânicas. Os autores afirmam que estes materiais garantem um aumento significativo no conforto dos pacientes, aliado a suas propriedades mecânicas e de desempenho favoráveis. Entretanto, a durabilidade destes materiais sob condições clínicas é limitada, principalmente devido à sua baixa resistência à colonização por *C. albicans*. Os resultados preliminares de vários estudos sugerem que o uso de agentes antimicrobianos podem melhorar as propriedades microbiológicas. Assim mais pesquisas são necessárias para explorar as potenciais aplicações de antimicrobianos, assim como a estabilidade deles no material. Essa melhoria também pode minimizar outro problema importante, que é a descolagem do material da base da prótese, e inerente migração de líquidos para o interior do material. Quanto às propriedades mecânicas, como dureza e viscoelasticidade elas se mantêm estáveis ao longo do tempo comparando os materiais resilientes a base de acrilato com os a base de silicone; a sorção e solubilidade são significativamente baixo quanto comparado aos materiais a base de silicone.

Entretanto, a cor é instável ao longo do tempo e podem ser alteradas por vários fatores, particularmente pela nicotina.

Mesmo com propriedades mecânicas adequadas, tanto a resina acrílica para base de prótese como para reembasamento, apresentam como uma de sua principal limitação a ausência de atividade antimicrobiana ou antifúngica (Samaranayake et al., 1994).

A *C. albicans* é um fungo que está presente na cavidade bucal de cerca de 50% da população. Em pacientes portadores de prótese total, após sua adesão sobre a superfície da resina, ela é um primeiro passo para a estomatite protética (Arendorf, Walker, 1987). A etiologia da estomatite protética é considerada multifatorial e está associada a irritação mecânica por uso contínuo da prótese, inadequada higiene bucal, reações alérgicas ao acrílico, alterações imunológicas sistêmicas, diabetes e, a colonização pelo fungo (Arendorf, Walker, 1987; Rodriguez Acosta et al., 2015).

Segundo Pires et al. (2002) a estomatite protética é frequentemente associada a altos níveis de *Candida ssp* na saliva e higiene oral e da prótese deficiente. Com intuito de analisar a incidência de estomatite e possíveis fatores predisponentes, os autores avaliaram 77 pacientes desdentados total antes e 6 meses após a instalação de um novo par de próteses. Durante a avaliação clínica, os pacientes com estomatite foram classificados em: Tipo I, quando se identificou inflamação localizada ou hiperemia; Tipo II quando mostrou-se eritema generalizado; Tipo III quando apresentou hiperplasia papilar no palato. A higiene da prótese foi classificada como bom (ausência de placa), regular (presença de placa removível na superfície interna da prótese), deficiente (presença de placa removível na superfície interna e externa da prótese) e pobre (presença de placa não-removível no exterior e / ou interior da prótese). Além disso, foi realizada a coleta da saliva não estimulada por 5 minutos e realizada a identificação e contagem de *Candida ssp*. Todos os pacientes receberam

orientação de higiene, e foram avaliados após 6 meses. Na primeira avaliação 50,6 % dos pacientes apresentaram algum tipo de estomatite, e 63% foram classificados como tendo uma higiene pobre. Na segunda avaliação a presença de estomatite caiu para 18,2%, e a higiene considerada boa ou regular para todos os pacientes. O fluxo salivar, a contagem de *Candida ssp* na saliva e espécies encontradas foram semelhantes em ambas as avaliações. Os autores concluíram que a substituição da prótese e a melhoria da higiene foram úteis para a resolução da estomatite. Entretanto, a higiene bucal deve ser contínua, uma vez que não houve redução na contagem de *Candida ssp* salivar

Além dos fatores sistêmicos e locais que predisõem a estomatite fúngica a característica da superfície da prótese assim como do material, podem influenciar e/ou facilitar a aderência do microrganismo na superfície. Segundo Park et al. (2003) a adesão inicial da *C. albicans* pode estar associada a hidrofobicidade do microrganismo que acaba interagindo com unidades monoméricas do PMMA que estão expostas na superfície. Os autores adicionaram ácidos metacrílico em diferentes concentrações na resina acrílica, com o intuito de modificar a carga na superfície da resina, diminuindo assim a interação com *C. albicans*. Os resultados mostraram que a medida que concentração de ácido metacrílico aumentava, houve diminuição na área de superfície com *C. albicans* aderida. Houve também diminuição significativa no ângulo de contato à medida que a proporção de ácido metacrílico aumentou. Os autores concluíram que é importante o papel da interação eletrostática na adesão, assim como introduziram um método eficaz para reduzir a adesão de *C. albicans* à superfície de PMMA através da modificação da carga da superfície dos biomateriais poliméricos.

A prevenção e tratamento da colonização dos reembasadores por *C. albicans* é de extrema importância, considerando as características do material e muitas vezes a situação clínica do paciente. Kang et al. (2013) avaliaram a

influência das características da superfície dos materiais reembasadores com a adesão de *C. albicans*. Foram selecionados 2 condicionadores de tecido, 2 reembasadores “soft” a base de acrílico, 2 reembasadores “soft” a base de silicone, e 2 reembasadores rígidos. Os espécimes foram confeccionados em forma de disco e analisados a rugosidade superficial, o ângulo de contato e a energia de superfície com quatro líquidos de referência: água, glicerol, etileno glicol e bromonaftaleno. Também avaliou-se a adesão de *C. albicans*. Os resultados indicaram diferenças significativas na rugosidade da superfície dos materiais analisado ($p < 0,001$). Os condicionadores de tecido e os reembasadores macios acrílicos mostraram superfícies mais ásperas do que os de silicone e os reembasadores rígidos. Os reembasadores macios acrílicos foram mais hidrófilos do que outros materiais. No geral, os reembasadores macios acrílicos e condicionadores de tecido mostraram significativamente maior adesão a *C. albicans* do que os outros materiais ($p < 0,05$). A correlação de Pearson indicou que os componente de base e o grau de hidrofobicidade / hidrofiliidade do material ($p = 0,005 / 0,008$), afeta a adesão microbiana de maneira mais significativa do que a energia de superfície total e a rugosidade da superfície ($p = 0,093 / 0,057$). Os autores concluíram que adesão de *C. albicans* nos materiais de reembasamento podem ser explicada por meio de interações ácido-base entre as superfícies.

Em uma revisão recente, Skupien et al. (2013) buscavam determinar a viabilidade de um protocolo de prevenção de colonização por *Candida ssp* em reembasadores de prótese e um tratamento eficaz após a colonização por fungos. Após a avaliação de 38 artigos, os autores relatam que a incorporação de agentes fungicidas nos matérias de reembasamento e nos condicionadores de tecido, ou a imersão da prótese em soluções contendo esses materiais de limpeza foi executada frequentemente para atingir os objetivos. A incorporação de nistatina foi avaliada em 8 estudos, assim como a adição de agentes antimicrobianos a

base de prata estava presente em 4 estudos. Os autores concluíram que a adição de agentes antifúngicos em reembasadores e condicionadores de tecidos parece evitar a colonização por *Candida ssp*, mas a concentração adequada ainda não é um consenso. A limpeza com hipoclorito de sódio 0,5% pode se útil para desinfecção. Mas os dados analisados são insuficientes para estabelecer um protocolo de adição de antifúngicos.

2.2 Nanotecnologia

A nanotecnologia é citada como uma resposta às questões mais desafiadoras enfrentadas pela sociedade nos dias atuais. Ela abrange um vasto e diversificado campo, com conhecimentos derivados de engenharia, biologia, física e química. Na medicina as nanopartículas possibilitaram o desenvolvimento de novas técnicas nas áreas de diagnóstico, imagem, e liberação de medicamentos. (Ambrogio et al., 2011; Patel et al., 2014; Ferrari, 2005.)

As nanopartículas são materiais com estrutura variando de 1-100 nm. Um nanômetro é definido como um bilionésimo de metro (10^{-9}m). Estas apresentam propriedades físicas e químicas (óptica, magnética, catalítica, termodinâmica e eletroquímica) diretamente dependentes de seu tamanho, assim como sua composição química e formatos influenciam nestas propriedades específicas. Elas podem ser preparadas com polímeros orgânicos (nanopartículas orgânicas) e/ou elementos inorgânicos (nanopartículas inorgânicas) (Sanvicens, Marco, 2008).

2.2.1 Nanopartículas de prata (AgNp)

Dentre as nanopartículas que apresentam efeito antimicrobiano os íons ou sais de prata são amplamente usados em diferentes áreas da medicina. Seu uso é relatado desde antes de 1800, no tratamento de doenças venéreas, úlceras na perna, assim como da folha de prata, que era aplicada em feridas cirúrgicas, melhorando a cicatrização pós-operatória, reduzindo infecções, e do lápis caustico (nitrato de prata com nitrato de potássio) utilizados para remoção de verrugas e debridamento de úlceras (Lansdown, 2002). Em 1965 Moyer introduziu um novo protocolo de tratamento de queimaduras utilizando nitrato de prata 0,5%. Em 1968, ela foi combinada com a sulfonamida, dando origem ao creme de sulfadiazina de prata, que é ainda hoje o tratamento padrão ouro para paciente com queimaduras (Klasen, 2000).

Além disso, existem uma variedade de produtos contendo prata comercialmente disponíveis, como cateter de poliuretano ventricular, cateter para medicação, curativos para feridas e cavidades, e géis. (Chaloupka et al., 2010).

O exato mecanismo de como a prata exerce sua atividade antimicrobiana ainda não é totalmente esclarecido e, também, depende do tamanho e forma da partícula. Uma possível explicação para a atividade bactericida das partículas de prata é que a transferência direta de íons de prata, a partir de nanopartículas oxidadas para sítios biológicos como proteínas ou a membrana celular. (Knetsch, Koole 2011). As nanopartículas de prata parecem aumentar os níveis de espécies de oxigênio reativo como os superóxidos O_2^- ou O_2^{--}), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radicais hidroxila (OH^-) ou nitroxila (NO^-), e subprodutos como radical alcóxila (RO^-), causando um estresse oxidativo, que danifica a membrana celular, a mitocôndria e pode apresentar afinidade pelo mesmo sítio

de ligação de importantes íons como cálcio e sódio, inibindo a troca iônica. (Volker et al., 2013). Desta forma, acredita-se que os íons de prata podem interagir com os três principais componentes da célula bacteriana: a parede celular de peptidoglicano e membrana plasmática; DNA (citoplasmático) bacteriano e proteínas bacterianas, especialmente as enzimas envolvidas nos processos celulares vitais, como a cadeia de transporte de elétrons (Chaloupka et al., 2010).

Segundo Kim KJ et al. (2008) e Panácek et al. (2009) as nanopartículas de prata apresentaram efeito inibitório no crescimento de *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. Krusei*, *C. tropicalis* e *Trichophyton mentagrophytes* em concentrações a partir de 0,21 µg/mL, dependendo do micro-organismo, com resultados semelhantes a anfotericina B.

Na odontologia, as nanopartículas de prata foram aplicadas em diversos materiais odontológicos, com a intenção de prevenir e/ou reduzir a formação de biofilme em compósitos e superfície de implantes, no tratamento de estomatites protéticas, agente antimicrobiano em materiais endodônticos obturadores, entre outros (Correa et al., 2015).

A incorporação de nanopartículas de prata na resina acrílica têm apresentado interessantes resultados quanto a sua atividade antibacteriana e antifúngica. Segundo Kassae et al. (2008) a adição de 0,5% de nanopartículas de prata a uma resina acrílica apresentou forte atividade antibacteriana contra *Escherichia coli*, não tendo formado nenhuma colônia após 24 horas contato com a resina experimental. A resistência e o módulo flexural exibiram ligeira melhora. Os efeitos antibacterianos foram atribuídos principalmente à liberação de íons de prata após imersão em água.

Fan et al. (2011) desenvolveram uma resina antimicrobiana, onde as nanopartículas de prata foram sintetizadas in situ nas resinas dentais (foto e quimicamente ativada), a partir do benzoato de Ag(AgBz). Foram avaliados o

efeito da concentração AgBz, a influência do método de polimerização e o grau de conversão, as características das nanopartículas, a liberação de íons de Ag em meio aquoso e a atividade antibacteriana. Os resultados mostraram que a microdureza Rockwell das resinas fotoativadas diminuiu significativamente em concentrações maiores que 0,1%, e acima de 0,2% a polimerização não foi satisfatória. Para as resinas quimicamente ativadas (-CC) a dureza não foi afetada, e estas apresentaram melhor distribuição das nanopartículas na massa do polímero. A liberação em meio aquoso após quatro semanas ainda pôde ser detectada. Quanto a atividade antimicrobiana, as resinas CC, com concentração de 0,2 e 0,5% (w / w) de AgBz foram testados para contra *Streptococcus mutans*, e os resultados mostraram uma inibição bacteriana de 52,4% e 97,5%, respectivamente. O desenvolvimento destes materiais tem como objetivo prevenir cáries secundárias e infecção de implantes.

A atividade antimicrobiana da AgNp em condicionadores de tecidos foi avaliada por Nam (2011). Segundo o autor estes materiais se degeneram rapidamente o que os torna susceptíveis a colonização por microrganismo. As nanopartículas de prata foram preparadas a partir de uma solução aquosa de prata com 10 mM, que foram adicionadas ao líquido em concentrações variadas: 0.1, 0.5, 1.0, 2.0 e 3.0% volume prata/ volume líquido). Avaliou-se a adesão de *S.aureus*, *S mutans*, e *C. albicans*. Os resultados indicaram que para *S. aureus* e *S. mutans*, mostrou-se o mínimo de efeito bactericida (MBC) na dose de 0,1%, e acima dela não foram detectadas células viáveis (nenhuma unidade formadora de colônia-UFC) a partir das condições de 1,0% acima. E para *C. albicans*, a concentração fungicida mínima foi na dose de 0,5%, e não foi detectada em nenhuma UFC acima de 2,0% . Não houve diferença estatística do efeito antimicrobiano entre 24 e 72 h do tempo de incubação ($p>0,05$).

Monteiro et al. (2012) avaliaram uma resina para base de prótese contendo nanopartículas de prata coloidal por meio de análise morfológica,

verificando a distribuição e dispersão destas partículas no polímero, e por ensaios de libertação de prata em água deionizada em diferentes períodos de tempo. As nanopartículas foram sintetizadas por meio da redução do nitrato de prata com citrato de sódio, e posteriormente adicionadas ao monômero do acrílico nas concentrações de 0,05%, 0,5%, e 5%, com base na massa do polímero. Os espécimes foram armazenados em água deionizada a 37 °C e analisada sua liberação por 7, 15, 30, 60, e 120 dias, além dos testes mecânicos e microbiológicos. Os resultados mostraram que a prata não foi detectada em água deionizada, independentemente das da concentração e do período de armazenamento. As imagens em microscopia mostraram que a dispersão das nanopartículas foi satisfatória no polímero em baixas concentrações. Além disso, após 120 dias de armazenamento, as nanopartículas estavam localizados principalmente na superfície dos espécimes. A resistência a flexão não foi influenciada, apresentando médias similares, onde o grupo com 0,5% obteve média 78,11 MPa e o grupo controle, 77,63 MPa. Os autores concluíram que a incorporação de nanopartículas de prata na resina acrílica foi evidenciada, e que a adição na resina de PMMA para obter um material com efeito antimicrobiano pode ser eficaz para ajudar o controle de infecções comuns envolvendo os tecidos da mucosa oral em usuários de próteses totais.

A dispersão via pulverização, de um composto antimicrobiano contendo zircônia e íons de prata sobre a superfície de uma resina acrílica autopolimerizável foi objeto de estudo de Kiriya et al. (2013). Os autores avaliaram as propriedades antimicrobianas e antifúngicas deste recobrimento sobre quatro tipos de microrganismos, assim como a quantidade de íons liberados. O agente foi disperso em 3 concentrações: 0.5, 1.0 e 1.5 %. A contagem de células viáveis na cultura de cada tipo de bactéria e fungos diminuiu significativamente quando comparada com a do polímero não tratados ($p < 0,01$). Além disso, o resíduo de células viáveis diminuiu significativamente

com o aumento da concentração de agente antibacteriano adicionado ao polímero ($p < 0,01$).

2.2.2 Nanopartículas de sílica/prata

Apesar das nanopartículas metálicas, como a prata, serem amplamente aplicadas em óptica, eletrônica, cateteres, biossensores, medicamentos com sistema de entrega, agentes de contraste, entre outros, elas tem como desvantagens sua baixa estabilidade coloidal, reatividade química e térmica, e toxicidade para os sistemas vivos, em algumas concentrações. Uma abordagem que vem sendo estudada é a utilização de estruturas em camadas, também conhecida como sistema core/shell ou núcleo/ casca. A sílica (SiO_2) é um dos os materiais mais populares como núcleo, pois possui elevada estabilidade térmica e química, por ser inerte quimicamente, ter grande área superficial e boa compatibilidade com outros materiais. Além disso, a sílica tende a fornecer boa estabilidade contra coagulação devido a um valor muito baixo constante de Hamaker, que define a força de Vander Waals de atração entre as partículas e o meio, dando mais estabilidade a casca (Nischala et al., 2011; Lismont et al., 2015).

Um dos métodos de obtenção das nanoesferas de sílica amplamente utilizado é o método de Stöber (Stöber et al., 1968). É um sistema de reações químicas que permite o crescimento controlado de partículas de sílica esféricas de tamanho uniforme, por meio de hidrólise do tetraetilortosilicato (TEOS) e subsequente condensação soluções alcoólicas, utilizando a amônia como um catalisador. Devido a sua simplicidade e eficácia diversos estudos utilizaram a síntese de Stöber para confecção de nanopartículas de sílica, com revestimento

de prata, ouro, titânia (Deng et al., 2007; Kim JH et al., 2008; Hebalkar et al., 2011; Nischala et al., 2011; Devi et al., 2014; Lismont et al., 2015).

Segundo Nischala et al. (2011) ao sintetizar nanopartículas de sílica com prata, em diferentes molaridades, a densidade das nanopartículas de prata como um material de revestimento na estrutura foi variada, e originou diferentes características de ressonância plasmônica de superfície, influenciando positivamente na coloração obtida. As partículas com núcleo e camadas que continham a menor concentração de nanopartículas não mostraram qualquer mudança de cor perceptível na cor do tecido de algodão branco ao qual foram incluídos. Mesmo a prata em tamanho tão pequeno (variando entre 1-5 nm) apresentou boa atividade antibacteriana, mesmo depois de dez lavagens. Quando diminui-se o tamanho de partícula em torno de 1-2 nm, existe uma alteração nos níveis de energia discretos que tendem a corresponder aos níveis de energia molecular. Em tais níveis de energia, a prata não apresenta ressonância plasmônica na superfície, e ela perde sua cor característica. Entretanto é extremamente difícil para imobilizar uma partícula tão pequena. No líquido, estas nanopartículas metálicas tendem a agregar caso não tenham estabilidade de dispersão. Assim essa morfologia core/shell é vantajosa pois ao ter partículas tão pequenas elas permanecem na cor branca, e quando são ligadas a superfície da sílica, minimiza-se a aglomeração que pode acontecer com o tempo e a temperatura. Além disso, por serem extremamente pequenas, as partículas de prata possuem uma grande área de superfície, sendo necessária uma quantidade muito pequena para mostrar efeito antibacteriano.

Devi et al. (2014) caracterizaram e avaliaram a atividade antibacteriana contra *Bacillus subtilis* e *Escherichia coli*, de nanopartículas core-shell de sílica e prata obtidas pelo método de eletro redução, com 3 tipos de ativação de superfície. As nanopartículas sintetizadas apresentaram tamanho variando entre 16-34 nm. O método de ativação influenciou na quantidade e tamanho da

nanopartícula de prata sobre a sílica. Além disso, as nanopartículas com mais quantidade de prata na superfície apresentaram a menor concentração mínima inibitória contra *E. coli*. A síntese por eletro redução exibiu efeito sobre as bactérias gram-positivas e gram-negativas, tendo potencial para várias aplicações.

A inserção de uma partícula bifuncional de sílica com prata em materiais odontológicos, principalmente a base de metilmetacrilato pode ser extremamente vantajosa principalmente para pacientes portadores de prótese total, que possuem alguma dificuldade no controle e prevenção da estomatite protética. Entretanto, não existem dados na literatura que avaliam a influência dessa partícula sobre tais materiais.

3 PROPOSIÇÃO

O objetivo geral deste trabalho foi de sintetizar, caracterizar partículas de sílica recobertas com nanopartículas de prata e avaliar a influência de sua adição nas propriedades mecânicas, e microbiológicas de resinas acrílicas de uso odontológico.

Os objetivos específicos foram:

- a) Obter partículas de SiO_2 pelo método de hidrólise e condensação controlada em meio alcóolico do tetraetilortosilicato (TEOS) (método de Stöber), e adicionar nanopartículas de prata à superfície da sílica;
- b) Caracterizar as partículas quanto ao tamanho, concentração, forma e disposição da prata sobre a sílica, através de microscopia eletrônica de transmissão, difração de raio-X e espectrometria de energia dispersiva de raios-X – EDS;
- c) Avaliar a influência da adição das nanopartículas em uma resina acrílica para base de prótese e um reembasador acrílico na resistência a flexão, em sua rugosidade e ângulo de contato;
- d) Avaliar a atividade antifúngica de nanopartículas de sílica com prata contra o biofilme de *C. albicans*.

As hipóteses nulas testadas foram de que não haveria diferença estatisticamente significativa quanto as propriedades mecânicas, ou ação/adesão fúngica entre os grupos testados, independentemente da presença e concentração das nanopartículas adicionados aos polímeros.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Síntese das nanopartículas de sílica com prata e caracterização

As partículas de sílica foram sintetizadas pela hidrólise e condensação controlada do TEOS em meio alcoólico (método de Stöber) . Para síntese das partículas foram utilizados os seguintes reagentes e soluções: Tetraetilortosilicato (TEOS) (LS chemical, São Paulo, Brasil - lote MKBP8202), Hidróxido de amônio PA (LS chemical, São Paulo, Brasil - lote 71008), Álcool etílico absoluto 99,5% (Neon comercial, São Paulo, Brasil - lote 20710), Nitrato de prata PA (LS chemical, São Paulo, Brasil - lote 119308/14) Dextrose anidra (LS chemical, São Paulo, Brasil - DA11.13), Carbonato de sódio anidro PA (Labsynth, São Paulo, Brasil - lote186610).

Preparou-se uma solução misturando 9 ml de TEOS com 75 ml de etanol, que foram mantidos sob agitação constante. Em seguida, uma segunda solução foi elaborada com a mistura de 15,5 ml de amônia, 75 ml de etanol, e 60 ml de água Mili-Q. A solução 2 foi vertida sob a 1 e, mantida sob agitação constante por 24 h.

Na sequência para cada 50 ml de solução de sílica, foram preparados 25 ml de solução de nitrato de prata e dextrose equimolar, (com 10 mM e 30 mM), que foi adicionada a suspensão, e mantida sob agitação. Após 30 min 50ml de uma solução de carbonato de sódio, foi adicionada a solução de sílica com prata, gota a gota, e agitada por mais 1 h.

As partículas foram separadas usando uma centrífuga, (9.000 rpm, a 10 °C, por 5 min), e lavadas com água destiladas três vezes para remoção das partículas sobrenadantes de prata. O precipitado foi seco a temperatura

ambiente, e então refinado em almofariz de ágata.

As amostras foram caracterizadas em microscopia eletrônica de varredura (Fei Inspect S50; Hillsboro, Estados Unidos), com microanalisador por energia dispersiva de raios-X integrado (EDX), e em Difratorômetro de Raios-X (Rigaku, Ultima IV; Shibuya-Ku, Tóquio, Japão) com anodo rotatório e radiação $\text{CuK}\alpha$ ($\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$). Ambas análises foram realizadas no Núcleo de Apoio à Pesquisa em Ciência e Engenharia de Materiais (NAPCEM), do ICT/SJC-UNIFESP. Foram realizadas análises em Microscópio Eletrônico de Transmissão (MET) (JEOL JEM 1400, Akishima, Tóquio, Japão), no Centro de Microscopia e Imagem da Faculdade de Odontologia de Piracicaba/UNICAMP. Os pós de sílica puro e recobertos com prata, nas concentrações de 10 mM e 30 mM foram dispersos em água destilada, e depositados sobre grade de cobre com 200 mesh recoberta com película polimérica, e secos em temperatura ambiente.

4.2 Preparos das amostras de resina com nanopartículas

Os materiais utilizados para confecção dos espécimes foram uma resina acrílica termicamente ativada Lucitone 550 (Dentsply, Rio de Janeiro, Brasil - lote 574724D), e o reembasador rígido Tokuyama Rebase II fast (Tokuyama dental Corporation, Tokyo, Japão - lote 147E92). Previamente a manipulação dos materiais, foi realizado o delineamento dos grupos experimentais, tanto para o ensaio de flexão, rugosidade e ângulo de contato, como para o ensaio de formação de biofilme e halo de inibição (Quadro 1).

A adição das nanopartículas as resina se deu através da mistura com o pó tanto da resina acrílica, como com o pó do reembasador. Para a resina, a cada 21 g de pó foram adicionados 0,152 g para os grupos com 0,5% e 0,6110 g para o

grupo com 2%. Para os grupos de reembasador, a cada 19 g de pó adicionou-se 0,0916 g para os grupos com 0,5%, e 0,372 g para os grupos com 2%. A incorporação foi feita em almofariz de cerâmica, durante 5 minutos. Este método permitiu uma melhora distribuição das nanopartículas na massa dos materiais.

Quadro 1 - Delineamento dos grupos experimentais para ensaios mecânicos e microbiológicos

Grupos	Material	Tipo de partícula	Concentração (%)
R	RAAT	--	--
R 10/05	RAAT	10 mM	0,5%
R 10/2	RAAT	10mM	2%
R30/05	RAAT	30 mM	0,5%
R 30/2	RAAT	30 mM	2%
L	Reembasador	--	--
L 10/05	Reembasador	10 mM	0,5%
L 10/2	Reembasador	10 mM	2%
L 30/05	Reembasador	30 mM	0,5%
L 30/2	Reembasador	30 mM	2%

4.3 Confeção de amostras para ensaios mecânicos

Para os teste de resistência a flexão resistência a flexão, rugosidade e ângulo de contato foram confeccionados corpos de prova em formato de barra (30 mm x 10 mm x 3 mm), para realização dos ensaios mecânicos das resinas acrílicas rígidas. Para a confeção das barras foram utilizados padrões metálicos, com as dimensões de 31 mm x 11 mm x 3.5 mm. Tais medidas foram propositalmente maiores que as exigidas para os corpos de prova, de modo a

permitir o correto acabamento das peças sem que se comprometessem os valores finais de dimensionamento.

Para a confecção dos espécimes em resina acrílica foram utilizadas muflas metálicas. Iniciou-se a inclusão pela base da mufla, a qual foi totalmente preenchida por gesso tipo II (Gesso Rio, São Paulo, Brasil) tendo o cuidado de se manter a superfície lisa. Logo após a perda de brilho do material, posicionou-se os padrões metálicos, de modo que apenas o lado de maior área ficasse em íntimo contato com a superfície do gesso (Figura 1a). Completada a presa do gesso aplicou-se uma fina camada de isolante para resina acrílica (Isofilm, Dental Vipi Ltda, São Paulo, Brasil) . Na sequência, foi utilizado um silicone de polimerização por condensação Labormass (Dental Vipi Ltda, São Paulo, Brasil). O silicone, por ser um material elástico, possibilitou a posterior remoção da peça sem maiores dificuldades. O silicone foi manipulado e condensado sobre os padrões metálicos de modo a copiar fielmente toda a superfície com a qual estava em contato (Figura 1b).

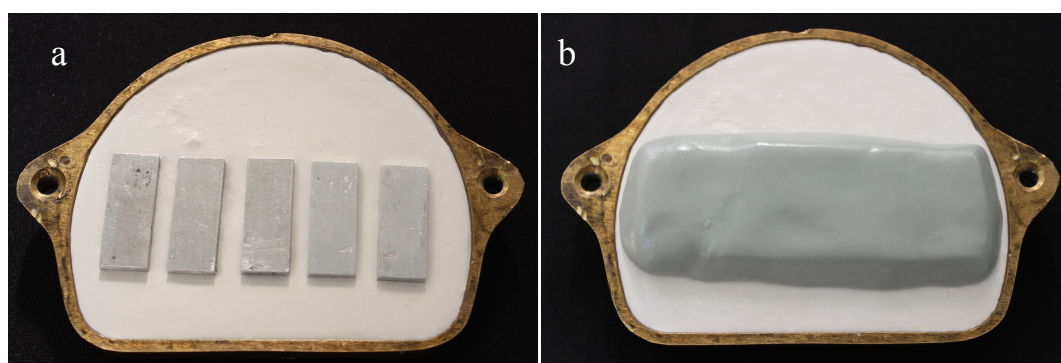


Figura 1 - a) padrões metálicos posicionados na mufla; b) Recobrimento com silicone de condensação pesado.

Dada a polimerização do silicone, fez-se a deposição do gesso comum na contra-mufla de modo convencional. Após a presa do gesso, procedeu-se a

abertura das muflas e a remoção dos padrões metálicos. Com as partes da mufla separadas, fez-se uma nova aplicação de isolante para resinas acrílicas com o uso de um pincel, sobre toda área de superfície do gesso exposta.

Para os grupos que continham as nanopartículas, realizou-se a mistura dos pós como citada anteriormente, e então adicionou-se 10 ml de monômero, dosado em proveta, em um pote de vidro com tampa. Aguardou-se a fase plástica, e então a resina fora acomodada nos espaços deixados pelos padrões metálicos. No grupo controle (sem nanopartículas) manteve-se a proporção 21 g de pó para 10 ml de monômero.

Na sequência, as muflas foram fechadas e posicionadas em prensas hidráulicas, para prensagem lenta e gradual, até que não houvesse escoamento da resina e estabilizada em 1000 Kgf. Essa pressão foi mantida por 1 h, seguindo-se a transferência das muflas para prensas manuais

O próximo passo foi o da polimerização da resina, em banho térmico, conforme as recomendações do fabricante, a 71 °C por 9 h. Terminado o ciclo e o completo resfriamento das muflas, as mesmas foram abertas e os corpos de prova removidos receberam acabamento com lixas d'água com granulação 180.

Para padronização dos espécimes com os materiais reembasadores, foi confeccionado um molde em silicone para laboratório a partir dos padrões metálicos. Após a homogeneização das nanopartículas com o pó do reembasador, dosou-se 7 ml do monômero do reembasador, e fez-se a mistura pó/liquido com espátula de plástico por 40 s. O material foi então inserido no molde com o auxílio da espátula, posicionada um folha de celofane e uma placa de vidro, que foi pressionada com 350 g sobre o molde para possibilitar o escoamento do excesso de material. Após a polimerização, os espécimes foram removidos do molde e realizado o acabamento conforme citado anteriormente.

Após esta etapa as amostras retangulares (de resina de base e reembasador rígido, Figura 2) foram armazenadas em frascos individuais, por 24 h, e então ensaiadas mecanicamente.

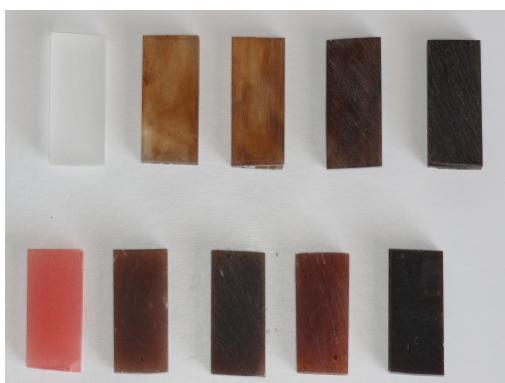


Figura 2 - Corpos de prova para ensaio de flexão. Na fileira superior resina acrílica, e inferior reembasador, sendo amostra do grupo controle, 10-0,5, 10-2, 30-0,5 e 30-2, da esquerda para a direita.

4.4 Ensaios Mecânicos

4.4.1 Resistência a flexão três pontos

Os espécimes retangulares foram submetidos ao teste de resistência à flexão três pontos. O ensaio foi realizado em uma máquina universal de ensaio (EMIC, São José dos Pinhais, Brasil), com uma célula de carga de 100 kgf, com velocidade de 1 mm/min a aplicação da carga determina a força necessária para fratura do espécime e é dado em Newtons. O resultado do cálculo da resistência a flexão é expresso em megapascal (MPa).

4.4.2 Ângulo de contato (goniometria)

O ângulo de contato é uma medida indireta da energia livre de superfície de um sólido, indicando a capacidade de molhabilidade de um sólido, sendo uma inversamente proporcional a outra. Ela é mensurada pelo ângulo formado entre um sistema sólido/liquido e a interação entre as forças de adesão. Quando ele θ (ângulo) = 0, significa que há a molhabilidade perfeita, formando uma espécie de filme. A análise do ângulo de contato foi realizada em goniômetro de bancada (Theta Lite, Biolin Scientific) sendo realizada leitura de 30 segundos, com pausa inicial de 10 s, e realização de 20 frames por s (n=4). A captação das imagens e processamento dos ângulos (Figura 3) foi realizada pelo programa One attention (Biolin Scientific).

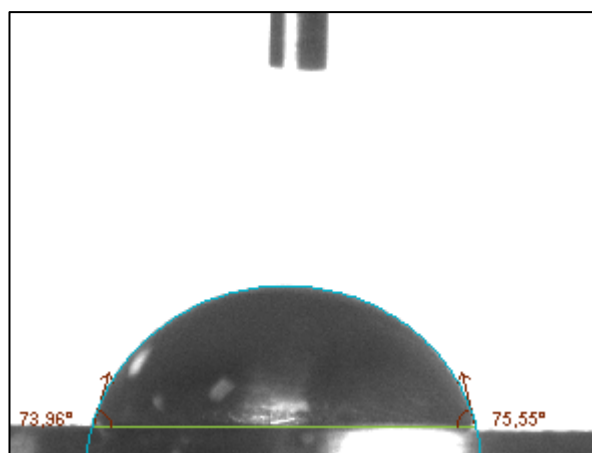


Figura 3 - medição do ângulo de contato pelo programa One attention.

4.4.3 Rugosidade

Em seguida as amostras foram submetidas ao ensaio de rugosidade em rugosímetro de bancada (SJ-400, Mitutoyo Corporation, Kawasaki, Japão). Este aparelho realiza a medição da rugosidade por contato, onde sua ponta ativa desliza sobre a superfície da amostra, registrando os parâmetros avaliados, neste caso o Ra, que é uma média dos picos e vales presentes na superfície. Foram realizadas três leituras de 3 mm por amostra, sendo 4 amostras por grupo.

4.5 Confeção das amostras para o ensaio de aderência fúngica e halo de inibição

Para a análise de aderência fúngica e halo de inibição foram confeccionadas amostras em formato de disco, com 10 mm de diâmetro e 2 mm de espessura, seguindo a mesma metodologia de confecção das amostras retangulares. Entretanto, para obter o formato cilíndrico, utilizou-se um dispositivo metálico com 2 mm de espessura, contendo 12 perfurações, com 10 mm diâmetro cada.

Durante o preenchimento da base da mufla incluiu-se uma base em silicone para laboratório Zetalabor (Zhermack, Badia Polesine, Itália). Completada a presa do gesso aplicou-se uma fina camada de isolante para resina acrílica, e posicionou-se o dispositivo metálico, e sobre ele uma nova base em silicone (Figura 4a e 4b), e fez-se o preenchimento da contra mufla. Após a presa do gesso, procedeu-se a abertura das muflas, e com as partes separadas, fez-se uma nova aplicação de isolante para resinas acrílicas com o uso de um pincel, sobre toda área de superfície exposta do gesso, metal e silicone. A

manipulação e inserção da resina acrílica foi realizada como citada anteriormente, assim como a prensagem e polimerização.

Para confecção das amostras de reembasador o mesmo dispositivo metálico fôra colocado sobre uma placa de vidro, o material foi inserido em seus orifícios e posicionada uma nova placa de vidro. Sobre o conjunto foi realizada uma pressão de 350 g. Após a polimerização os mesmos foram removidos com o auxílio de um dispositivo cilíndrico.

Todas as amostras receberam acabamento, com lixa d'água com granulação 180, foram limpas em ultrassom com água destilada por 5 min, e armazenadas em água destilada por 48 h. Após este período as amostras foram limpas novamente em ultrassom por 5min e secas.

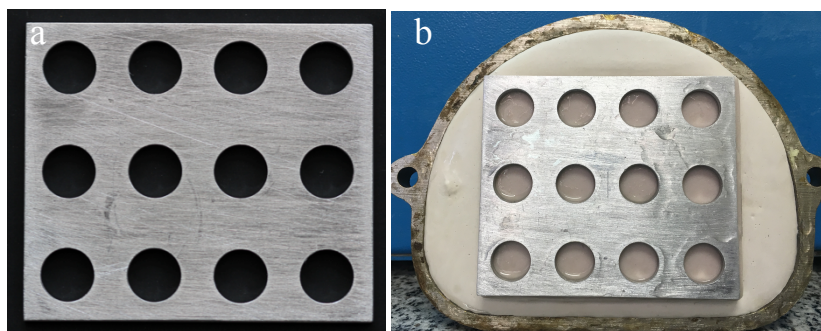


Figura 4 - a) Dispositivo metálico para inclusão em mufla; b) posicionamento do dispositivo em mufla sobre silicone.

As amostras (Figura 5) então foram submetidas à esterilização em autoclave, a 126 °C por 15 min, e submetidas aos testes microbiológico.



Figura 5 - Amostras cilíndricas para ensaio microbiológico. Na fileira superior resina acrílica, e inferior reembasador, sendo amostra do grupo controle, 10-0,5, 10-2, 30-0,5 e 30-2, da esquerda para a direita.

4.6 Análises microbiológicas

Nas análises microbiológicas utilizou-se uma suspensão da cepa de *C. albicans* ATCC 18804, proveniente da American Type Culture Collection, cultivada em meio Ágar Sabouraud Dextrose (Difco, Detroit, USA) e incubada a 37 °C durante 48 h. Os micro-organismos foram suspensos em solução salina estéril (NaCl 0,9%) e essa suspensão foi ajustada em espectrofotômetro (B 582, Micronal, São Paulo, Brasil) até a concentração de 10^6 células/mL. A densidade óptica e comprimento de onda utilizados para a obtenção dessa concentração foram, respectivamente, 0,284 e 530 nm.

4.6.1 Análise de aderência fúngica e halo de inibição

Para a análise de formação de biofilme os espécimes de resina acrílica estéreis foram inseridos em placas de 24 poços (Costar Corning, New York,

Para a o teste de halo de inibição, 100 μ L da suspensão padronizada foram adicionados a placa de Petri com ágar Sabouraud e semeadas com alça Drigalski. Em seguida, 2 discos de cada grupo foram posicionados sobre o meio de cultura. As placas foram, então, incubadas em estufa bacteriológica a 37 °C durante 24 h para posterior medição dos halos formados.

4.6.2 Concentração inibitória mínima (CIM)

Duas soluções de prata de 10 e 30 milimols foram preparadas, adicionando-se água Miliq aos pós, com concentração de 4000 ppm. Em placas de cultura de células estéril de 96 poços (Sarstedt, Nümbrecht, Alemanha) foram feitas 10 diluições seriadas das soluções de prata com o meio YNB (Figura 7), obtendo-se as seguintes concentrações: 2.000, 1.000, 500, 250, 125, 62,5, 31,25, 15,62, 7,81, 3,90 ppm. Além das diluições seriadas, foram feitos grupos controle positivo (alíquota de *C. albicans* com meio YNB) e controle negativo (meio YNB e salina estéril) para validação dos resultados. As placas foram mantidas à 37 °C durante 24 h. Após esse período, o crescimento foi analisado visualmente de acordo com a turvação do meio de cultura de cada poço. O turvamento do poço indica o crescimento de micro-organismos. Os poços que não apresentaram-se turvos e os poços correspondentes a uma concentração acima e uma concentração abaixo tiveram seu conteúdo semeado.

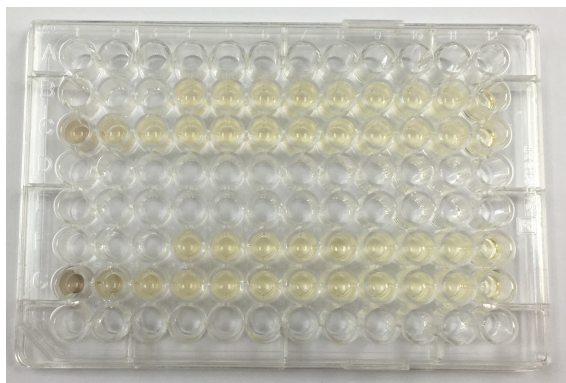


Figura 7 - Placa com 96 poços com as diluições preparadas. Na fileira superior com 10 mmols, e inferior com 30 mmols.

4.7 Análise estatística

Os dados de resistência à flexão foram comparados entre todos os grupos por análise de variância um fator e teste de comparações múltiplas de tukey; e assim como entre os grupos modificados, por análise de variância dois fatores e teste de Tukey.

Os dados de rugosidade (Ra) e ângulos de contato foram comparados por meio de análise de variância.

Os dados de UFC/ml, por não apresentarem distribuição normal, foram submetidos a testes não paramétricos, Kruskal-Wallis e Dunn..

O nível de significância utilizado para todos os testes foi de 5%, utilizando o programa Graphpad prism e Minitab 16.

5 RESULTADOS

As nanopartículas sintetizadas, independente da molaridade, apresentaram coloração branca, sem precipitado ou grânulos acinzentados, conforme (Figura 8).



Figura 8 - Amostra de 30 mM após a secagem e moagem, com coloração branca.

5.1 Caracterização do material

As imagens obtidas em microscopia eletrônica de varredura (Figura 9) não possibilitaram a adequada observação das características superficiais das amostras em pó, devido ao tamanho reduzido da partícula, assim como não foi possível realizar mensurações.

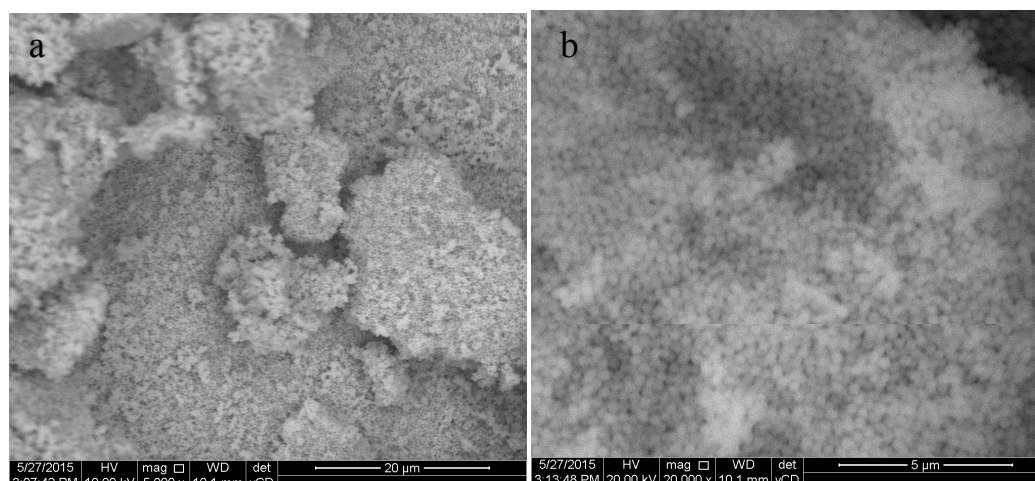


Figura 9 - Imagens em microscópio eletrônico de varredura da amostra de 30 mM, em diferentes magnificações- a) 5.000 x; b) 20.000 x.

A análise por energia dispersiva de raios X confirmou a presença de prata, em ambas as amostras, sendo que as amostras de 10mM apresentaram picos entre 2.6 e 3.5 keV, e as amostras de 30 mM entre 2.9 e 3.3 keV. O silício apresentou um pico único e elevado na região de 1.8 keV conforme Figuras 10 e 11. Os picos de sódio são provenientes do carbonato de sódio.

A difratometria de Raios X apresentou nas 3 situações analisadas um gráfico sem picos isolados, com uma onda de base ampla, típico de um material amorfo como a sílica. Não houve a presença de picos isolados indicando a prata (Figura 12), possivelmente, devido ao fato da técnica de difração de raios X ter baixa sensibilidade não sendo possível a observação dos picos da prata devido a baixa quantidade de prata nas amostras.

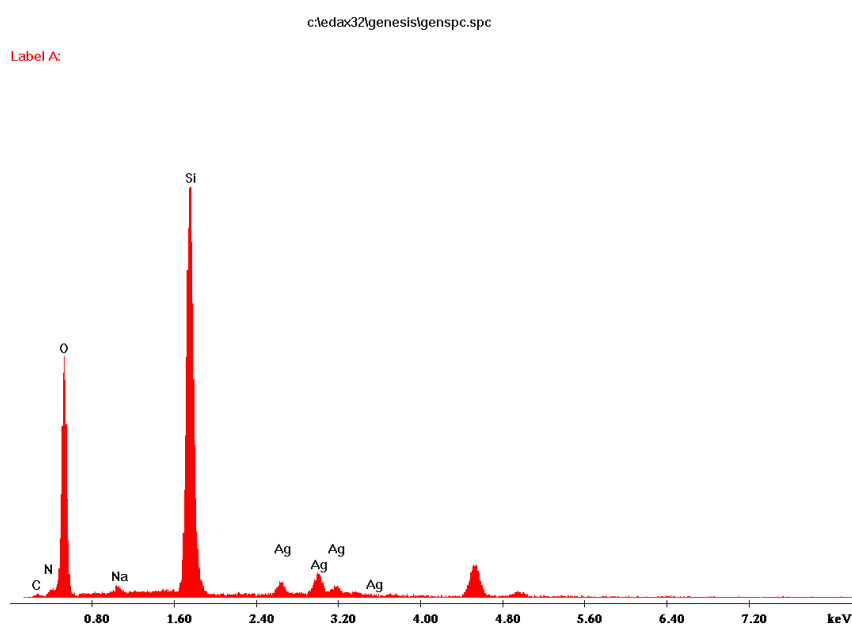


Figura 10 - Gráfico do EDS, da amostra de 10 mM mostrando picos de Silício e prata.

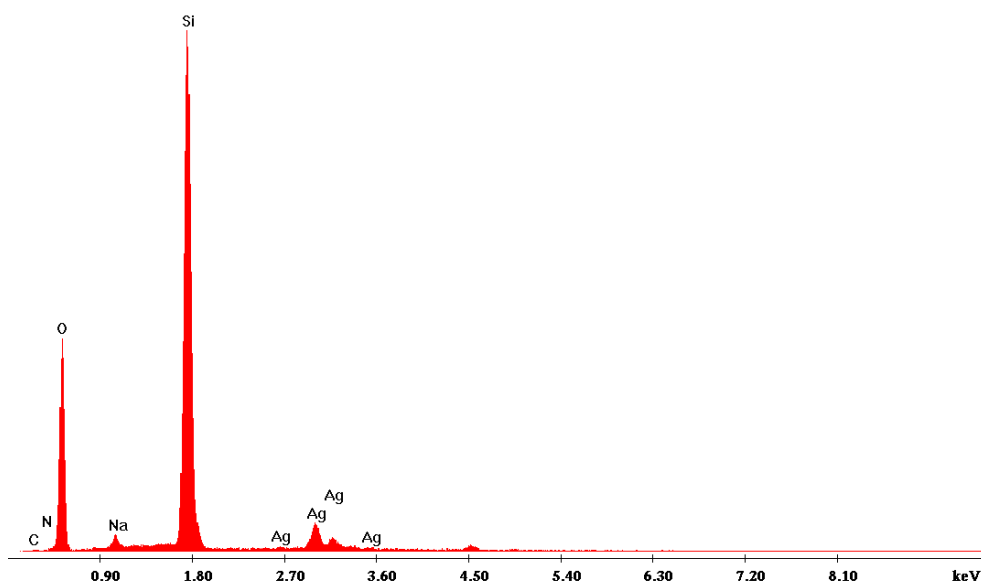


Figura 11 - Gráfico do EDS, da amostra de 30 mM mostrando picos de Silício e prata.

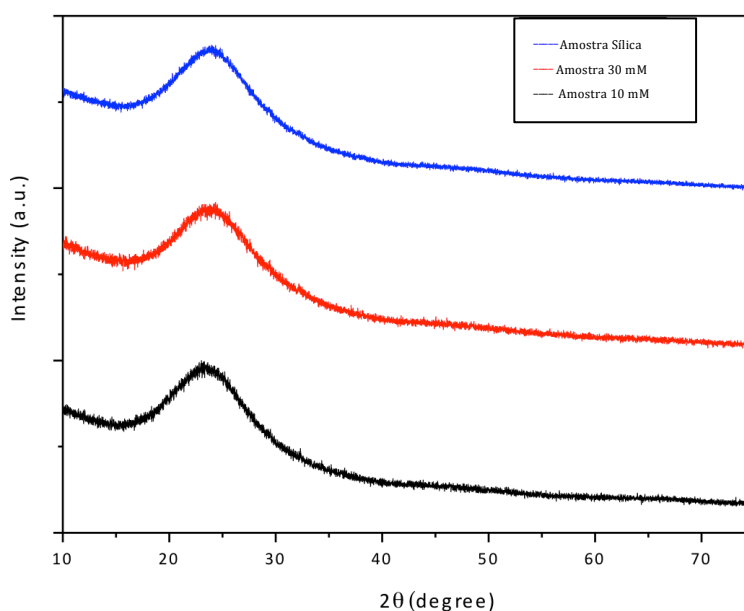


Figura 12 - Gráfico da difratometria de Raios-x de amostra de sílica pura e recoberta com prata nas concentrações de 10 e 30 mmols.

As imagens por microscopia eletrônica de transmissão confirmaram a formação de nanopartículas esféricas de sílica (Figura 13), assim como a presença de nanopartículas de prata dispersas sobre a sílica. Nas amostras de 10 mmols obtivemos a formação de partículas menores sobre a sílica, dando aspecto rugoso a superfície (Figura 14). Nas amostras de 30 mM, houve a formação de nanopartículas maiores e menos dispersas sobre a sílica (Figura 15). Com auxílio do programa Image J, realizou-se medidas nas nanopartículas. Após 130 medições de diversas imagens, obteve-se um tamanho médio de partícula de sílica de 369 nanômetros.

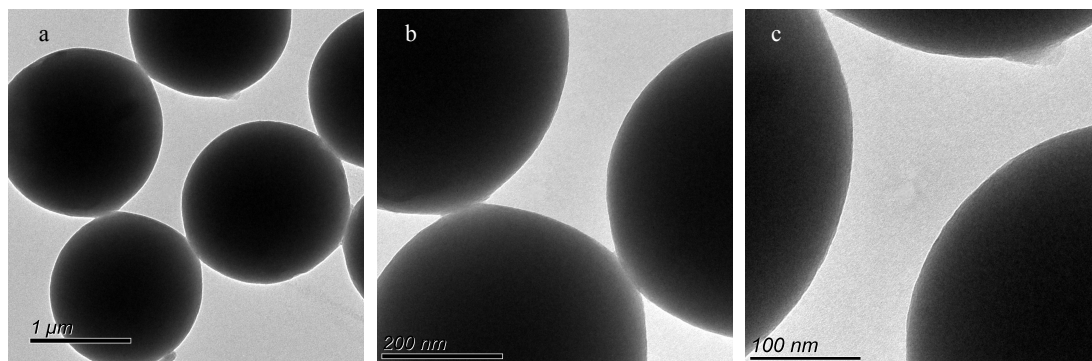


Figura 13 - Imagens das nanopartículas de sílica em diferentes magnificações: a) 100 k; b) 200 k; c) 300 k.

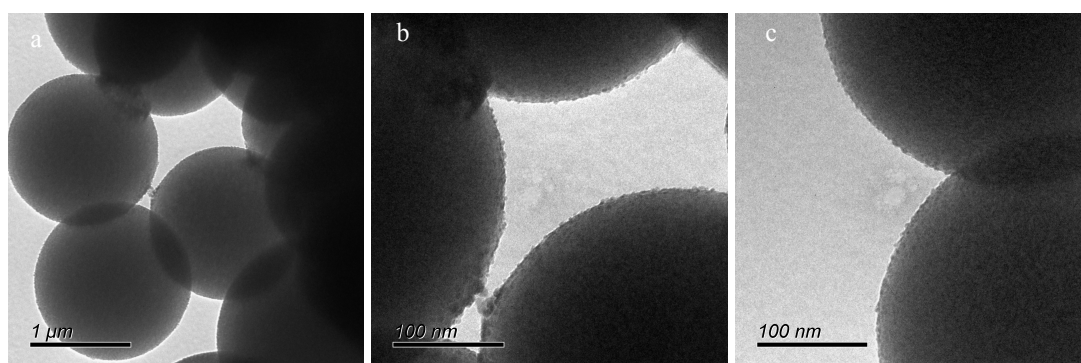


Figura 14 - Imagens em MET, de amostra em pó de 10 mmols em 3 magnificações: a) 100 k; b) 200 k; c) 300 k.

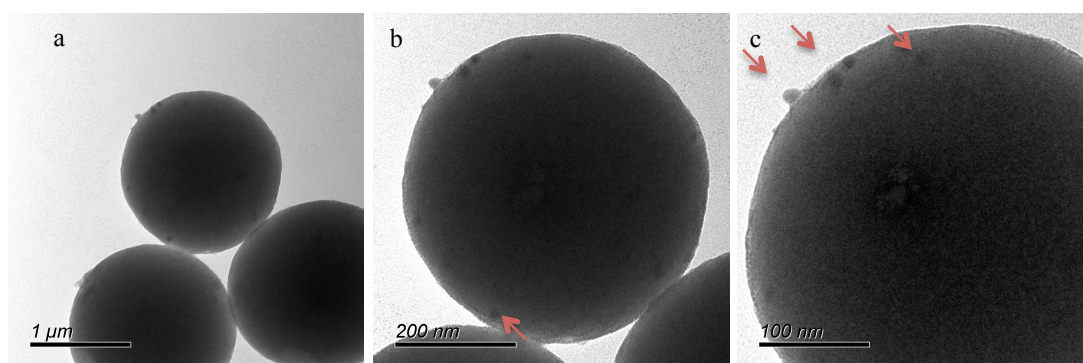


Figura 15 - Imagens em MET, de amostra em pó de 30 mmols em 3 magnificações: a) 100 k; b) 200 k; c) 300 k. As setas vermelhas indicam nanopartículas de prata.

5.2 Resistência à flexão por 3 pontos

Os valores de resistência à flexão foram apresentados em uma análise descritiva, na tabela 1. Para adequada avaliação inferencial dos dados obtidos, a análise estatística foi realizada entre todos os grupos, considerando o fator dependente (resistência a flexão).

Tabela 1 - Estatística descritiva dos dados obtidos no ensaio de resistência à flexão (MPa)

Grupos	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Máximo
R	97,13	8,69	85,23	109,8
R10-05	95,36	7,74	85,41	108
R10-2	83,66	9,94	66,62	97,20
R30-05	87,19	5,76	78,37	94,77
R30-02	67,22	3,69	60,46	71,44
L	61,542	2,238	58,12	64,32
L10-05	55,37	7,12	42,25	62,99
L10-2	34,48	4,70	36,47	67,09
L30-05	50,06	12,30	26,22	43,20
L30-2	43,58	10,44	30,61	62,24

A análise de variância um fator para os grupos de resina acrílica mostrou $p > 0,05$ (Tabela 2), indicando diferença entre os grupos analisados. O teste de Tukey (Tabela 3) sugere que o grupo controle apresentou o maior resultado de resistência a flexão, sendo este semelhante estatisticamente ao grupos modificados com 0,5% de partículas, independente da molaridade.

Tabela 2 - Análise variância entre os grupos de resina acrílica

Tabela ANOVA	SS	DF	MS	P
Resistência	5140,9	4	1285,2	0,000
Erro	2248,1	40	56,2	
Total	7389,1	44		

Tabela 3 - Média dos grupos de resina acrílica submetidos ao teste de tukey, com 95% de confiança

Grupos	Médias	Grupos homogêneos
R	97,1	A
R 10-0,5	95,4	A
R 30-0,5	87,2	AB
R 10-2	83,7	B
R 30-2	67,2	C

Médias com letras diferentes são estatisticamente diferentes.

Quanto aos grupos de reembasador, após a análise de variância um fator (Tabela 4), esta indicou haver diferença estatística entre os grupos ($p < 0,05$). Esta

diferença foi evidenciada no teste de Tukey (Tabela 5), onde os grupos modificados com 2% de partículas apresentaram resultados inferiores ao demais de resistência mecânica.

Tabela 4 - Análise variância entre os grupos de reembasador

Tabela ANOVA	SS	DF	MS	P
Resistência	3953,69	4	988,42	0,000
Erro	2705,98	40	67,65	
Total	6669,67	44		

Médias com letras diferentes são estatisticamente diferentes.

Tabela 5- Média dos grupos de reembasador submetidos ao teste de Tukey, com 95% de confiança

Grupos	Médias	Grupos homogêneos
L	61,5	A
L 10-0,5	55,4	AB
L 30-0,5	50,1	BC
L 10-2	43,6	CD
L 30-2	34,5	D

Médias com letras diferentes são estatisticamente diferentes

5.3 Análise de ângulo de contato e rugosidade

Na análise do ângulo de contato e rugosidade optou-se por realizar a comparação dos grupos modificados com o grupo controle, avaliando assim se a

presença das nanopartículas gerou alterações.

As médias e o desvio padrão dos resultados da goniometria estão descritos na tabela 6. A análise de variância mostrou não haver diferenças estatisticamente significantes entre os grupos, com $p=0,2003$. O ângulo de contato médio variou entre $61,2^\circ$ no grupo 30-0,5, a $70,67^\circ$ para o grupo controle.

Tabela 6 - Média e desvio padrão do ângulo de contato dos grupos de resina

	Controle	10-0,5	10-2	30-0,5	30-2
Média	70,67	64,42	63,29	61,2	69,01
Desvio padrão	4,086	2,887	4,017	7,569	5,607

Quanto aos grupos de reembasador, a análise descritiva é apresentada na tabela 7. A análise de variância mostrou não haver diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p=0,4001$). O ângulo de contato médio variou entre $75,93^\circ$ no grupo 30-0,5, e $84,99^\circ$ para o grupo controle.

Tabela 7 – Média e desvio padrão do ângulo de contato dos grupos de reembasador

	Controle	10-0,5	10-2	30-0,5	30-2
Média	84,99	79,16	79,12	75,93	77,24
Desvio padrão	1,699	2,84	6,745	6,416	7,939

Quanto a rugosidade, os grupos de resina acrílica controle e modificados apresentaram médias semelhantes (Tabela 8), não apresentando diferença estatisticamente significativa na análise de variância ($p=0,158$).

Tabela 8 - Média (Ra) e desvio padrão de rugosidade dos grupos de resina acrílica

	Controle	10-0,5	10-2	30-0,5	30-2
Média	2,127	1,827	1,773	1,661	1,819
Desvio padrão	0,2633	0,4059	0,5652	0,3238	0,3312

Entre os grupos de reembasador controle e os modificados, houve diferença estatística entre os grupos ($p=0.0067$). O teste de Dunnett (Tabela 9) indicou que o grupo controle e os modificados com nanopartículas de 30 mM apresentaram semelhança estatística, como mostra Figura 16.

Tabela 9 - Média (Ra) e desvio padrão de rugosidade dos grupos de reembasador

	Controle	10-0,5	10-2	30-0,5	30-2
Média	1,584 (A)	2,209	2,158	1,906 (A)	1,807 (A)
Desvio padrão	0,2764	0,3206	0,4713	0,2301	0,5157

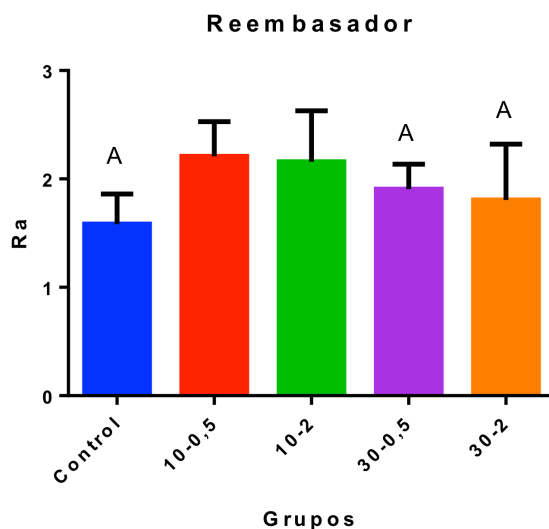


Figura 16 - Gráfico comparativo entre o grupo controle e modificados de reembasador. O traço superior indica similaridade entre os grupos que estão sob ele

5.4 Análise da aderência fúngica e halo de inibição

Os dados obtidos no ensaio de adesão fúngica, tanto para a resina acrílica quanto para o reembasador, estão descritos na Tabela 10.

Para os grupos de resina de base, o teste de Kruskal-Wallis apresentou $p=0.242$, indicando não haver diferença estatística entre os grupos analisados (Figura 17a).

Quanto ao reembasador, o teste de Kruskal-Wallis também indicou $p>0,05$ ($p=0.314$) sinalizando haver similaridade entre os grupos (Figura 17b).

Tabela 10 - Média do número de colônias e desvio padrão dos grupos submetidos ao ensaio de aderência fúngica

Grupos	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Máximo
R	4,55	3,35	1	11
R10-05	6,400	1,955	4	10
R10-2	8,33	6,538	1	20
R30-05	6,700	3,889	1	14
R30-02	8,556	3,321	3	12
L	15,20	8.46	4	32
L10-05	22,00	13.33	7	46
L10-2	12,67	4.84	6	20
L30-05	19,89	12.96	2	44
L30-2	19,11	8.06	10	48

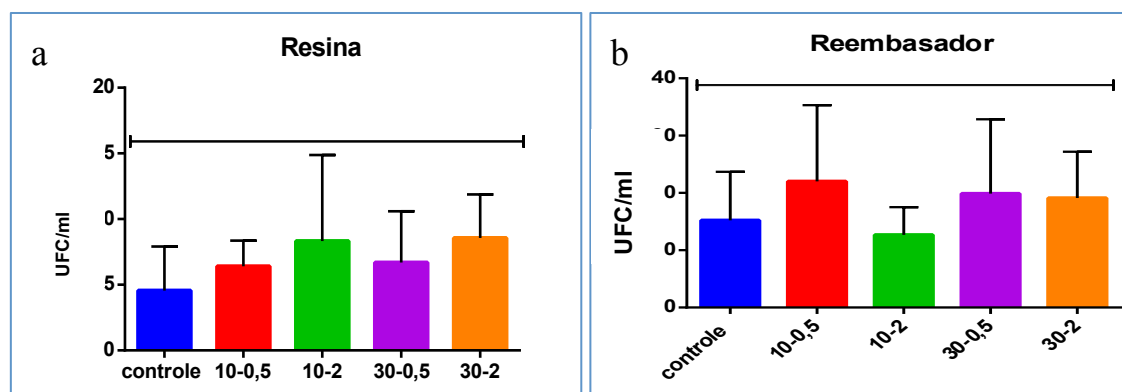


Figura 17 - a) Gráfico comparativo entre o grupo controle e modificados de resina; b) Gráfico comparativo entre o grupo controle e modificados de reembasador. O traço superior indica similaridade entre os grupos que estão sob ele.

No teste de inibição do crescimento pode-se verificar a não formação do halo inibição em nenhuma das amostras testadas independente do tipo de resina ou concentrações (Figura 18a).

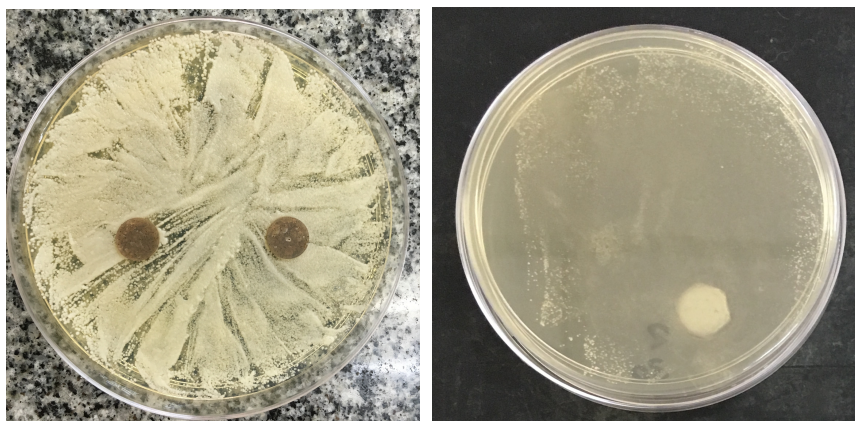


Figura 18 - a) Teste de inibição do crescimento com amostra de reembasador com nanopartícula de 10 mM, sem a formação de halo; b) Semeadura da solução de 30 mM à 2%, sem crescimento de levedura.

5.5 Concentração mínima inibitória

A concentração mínima inibitória da solução de nanopartículas de sílica com prata contra *C. albicans* foi determinada avaliando-se a turvação do meio e comparando o crescimento de colônias daqueles que não turvaram com o grupo controle negativo. A solução apresentou atividade inibitória somente na concentração de 2.000 ppm, em ambas as molaridades testadas (Figura 22b) .

6 DISCUSSÃO

Atualmente, a busca e o desenvolvimento de novos materiais com características mecânicas adequadas aliadas a propriedades antimicrobianas é crescente.

Na ultima década, inúmeros estudos foram realizados no intuito de controlar a formação de biofilme sobre as superfícies de próteses removíveis e consequentemente prevenir a estomatite protética, através da incorporação de agentes antimicrobianos em reembasadores temporários e condicionadores de tecido, bem como em resinas acrílicas. Entretanto, muitos destes materiais acabam sofrendo prejuízo nas propriedades mecânicas, tornando sua utilização inviável em diversos casos (Fan et al., 2011; Imazato et al., 2003; Kuroki et al., 2010; Seyfriedsberger et al., 2006; Silva et al., 2008).

A incorporação de nanomateriais a produtos odontológicos trouxe uma nova perspectiva e diversas opções para o aprimoramento dos materiais. A incorporação de um produto a uma resina acrílica pode afetar também suas propriedades mecânicas. Essas propriedades são cruciais para o sucesso clínico e a longevidade das próteses, principalmente porque os materiais utilizados para base protética devem ser capazes de suportar altas forças de impacto somadas às forças mastigatórias.

O presente trabalho avaliou a incorporação de nanopartículas de sílica recobertas com prata a uma resina acrílica para base protética e a um reembasador. Este tipo de nanopartículas, também conhecida como core-shell, ou núcleo-casca, tem sido pesquisada para aplicação na indústria têxtil, farmacêutica, biosensores e dispositivos de armazenamento de energia (Nischala et al., 2011; Lessard-Viger et al., 2009; Liu et al., 2014; Tang, Cheng, 2013). A

proposta deste trabalho foi o de integrar novas tecnologias, com um tipo de nanopartícula pouco explorada na odontologia, aos materiais, com intuito de suprir necessidades que a clínica nos tem mostrado.

A síntese das nanopartículas de sílica pelo método de Stöber utiliza a amônia como catalizador para a síntese da sílica. Este método apresentou resultados satisfatórios, com partículas de tamanhos similares, esféricas e sem alterações na superfície. A adesão das nanopartículas de prata a superfície das esferas de sílica se inicia logo após a adição das soluções de nitrato de prata, carbonato de sódio e glucose à suspensão de sílica coloidal. Os íons de prata formado aderem a sílica por interação eletrostática entre as cargas negativas dos grupos silanois formados. As características finais apresentadas pelas partículas sintetizadas estão de acordo com os resultados apresentados por Kim JH et al. (2008) e Devi et al. (2014), que utilizaram o mesmo método de síntese da sílica. Na difratometria por raio-x não houve a formação dos picos característicos da prata em nenhuma das concentrações, provavelmente devido ao tamanho reduzidos das nanopartículas de prata formada sobre sílica.

Alguns estudos sugerem que a adição de partículas de sílica em concentrações variando entre 0,1% e 1% é capaz de promover melhores resultados de resistência a flexão (da Silva et al., 2012; Mc Nally et al., 2006). Quanto a adição de nanopartículas de prata, estas não produziram alteração na resistência, na concentração de 0,05%, 0,5% e 5%, segundo Monteiro e colaboradores (2012). Entretanto os resultados apresentados neste trabalho não corroboram com estes achados, visto que os resultados indicaram que não houve melhora na resistência mecânica em nenhum dos materiais testados. Além disso, a adição de 2 % produziu efeito deletério nesta característica. É possível que as nanopartículas utilizadas neste estudo tenham atuado como uma área concentradora de tensão, enfraquecendo os materiais quando adicionada em

maior volume, devido a falha na interface nanopartícula/material. A utilização de uma nanopartículas estabilizada e silanizada pode promover melhores resultados mecânicos.

A adição de nanopartículas gerou uma alteração nas características visuais das amostras, o que poderia indicar alguma alteração na topografia destas. Os resultados de rugosidade encontrados corroboram com aqueles apresentados por Li et al. (2014), após adição de nanopartículas de prata (1%, 2%, 3% e 4%), onde não houve alteração nos valores de Ra. Entretanto, a rugosidade superficial dos grupos com reembasador modificados com partículas de 10mM apresentaram valores de Ra superiores ao controle. Quanto ao ângulo de contato, não foi encontrado nenhuma alteração nos grupos avaliados. Alguns estudos (Wu et al., 2015; Samuel, Guggenbichler, 2004) relatam que a adição de nanopartículas de prata, com tamanho entre 50-60 nm, em matrizes poliméricas torna a superfície mais hidrofílica, dificultando a adesão de microorganismos e formação de biofilme. No entanto, como as partículas de prata encontradas sobre a sílica deste trabalho, possuem tamanho muito inferior ao relatado na literatura, pode não ter influenciado na hidrofiliabilidade da superfície.

Neste trabalho optou-se por avaliar inicialmente a influência das nanopartículas de sílica com prata na formação de biofilme de *C. albicans*. Isso se deu pois, uma vez estabelecido o biofilme, os micro-organismos expressam genes num padrão diferentes de sua forma planctônica, levando a mudanças fenotípicas, o que pode alterar a resistência das células sésseis (Chavant et al., 2007). Ao se avaliar somente a solução em células na forma planctônica estas poderiam não simular o que ocorre clinicamente (*in vivo*). Embora a literatura apresente alguns estudos quanto avaliação antimicrobiana de partículas de prata contra *C. albicans* e outros patógenos bucais em polímeros para base de prótese,

não foi encontrado dados sobre a incorporação de nanopartículas de sílica recoberta com prata nestes materiais, ou avaliações antifúngicas sobre eles.

Quanto a adesão de células fúngicas, após as nanopartículas terem sido incorporadas à resina acrílica para base de prótese e no reembasador, não houve efeito contra a adesão e formação de biofilme de *C. albicans*. Para todas as concentrações e molaridades avaliadas, os valores obtidos com o teste de aderência fúngica não foram significativamente diferentes dos grupos controle, como o relatado por Li et al. (2014), onde resinas acrílicas modificadas por nanopartículas de prata, só apresentaram atividade antifúngica na concentração de 5%. Entretanto, Chladek et al. (2011) obtiveram eficácia antifúngica em reembasador modificado por prata em concentrações a partir de 10 ppm (0,001%). Nam (2011) relata ter redução na formação do biofilme de *C. albicans* em resina acrílica com concentrações a partir de 0,5% e Acosta-Torres et al. (2012), a partir de 1µg/ml. Estas diferenças nas concentrações pode ser explicada pelos diferentes métodos de síntese utilizados, obtendo-se assim partículas com propriedades diferentes. Não é apresentado na literatura nenhum estudo quanto a adição de nanopartículas de sílica recobertas com prata a resinas acrílicas.

O mecanismo de ação antimicrobiana da prata ainda não foi totalmente elucidado, mas sabe-se que tanto os íons como as nanopartículas podem atuar sobre a membrana plasmática (Knetsch, Koole, 2011; Volker et al., 2013). Quando a partícula apresenta um tamanho muito reduzido, menor que 10 nm, ela é capaz de penetrar no interior da célula e alterar seu metabolismo, levando a morte. (Morones et al., 2005). Alguns estudos sugerem que a liberação de íons de prata para o meio seja um dos mecanismos de ação antimicrobiana (Kassaei et al., 2008; Kong et al., 2008). Essa liberação é baseada na difusão de moléculas de água para dentro do material e na migração de íons de prata

através do polímero para o meio aquoso (Kong et al., 2008). Como o PMMA é um polímero hidrofóbico, a absorção de água pelo sistema pode ter sido insuficiente para a liberação dos íons.

Este mecanismo de liberação íons pode ter sido afetado também pela estrutura da matriz polimérica. As resinas acrílicas utilizadas contém um agente de ligação cruzada (etileno glicol dimetacrilato) no monômero. Este agente de ligação promove uma estrutura reticulada do polímero, retendo as nanopartículas e íons de prata, restringindo a liberação, e consequente ação antifúngica. A dificuldade de dispersão das nanopartículas na massa pode ser um fator capaz de minimizar a liberação de íons, concentrando nanopartículas em algumas regiões das amostras. Sabe-se que há uma forte interação dipolo-dipolo entre as partículas de prata, além do que a sílica apresentou uma distribuição heterogênea quando adicionada ao monômero. A adição de agentes surfactantes na solução poderia permitir uma melhor dispersão das nanopartículas na massa do polímero, podendo até facilitar a liberação de partículas/íons para o meio (Irzh et al., 2007). A adição de surfactante poderá reduzir as coalescências formadas entre as partículas, aumentando a área de superfície em contato com o meio

Este estudo apresenta limitações, visto que somente uma espécie de *Candida* e um método de incorporação foi avaliado. Apesar disto, o resultado do teste de concentração inibitória mínima, mostrou que a solução apresentou resultados satisfatórios com 2%, em ambas molaridades. Estudos que realizaram este teste ao utilizarem somente nanopartículas de prata obtiveram resultados satisfatórios de inibição em concentrações inferiores às encontradas (Monteiro et al., 2012). Segundo Monteiro et al. (2012) o método de síntese das nanopartículas pode produzir resultados diferentes, principalmente em testes de atividade planctônica. Pesquisas adicionais sobre métodos de incorporação e aplicação das nanopartículas na superfície podem proporcionar resultados

diferentes. Além disso, a redução do tamanho das partículas de sílica, alterando-se a proporção de reagentes e silanização (Arantes et al., 2012) pode gerar melhor interação com as cadeias poliméricas e produzir uma maior área de superfície para atuação da prata. Outrossim estudos sobre o comportamento deste materiais quando expostos a diferentes períodos e meios de imersão, e envolvendo outros patógenos bucais e citotoxicidade podem ser interessantes.

7 CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos pode-se concluir que as partículas de sílica recobertas com nanopartículas de prata foram obtidas adequadamente, com características semelhantes, mas não apresentaram ação antifúngica para os materiais testados em nenhuma concentração, nem houve a formação de halo. Entretanto, a solução aquosa das partículas, em ambas molaridades, a 2000 ppm, apresentou efeito inibitório sob a *C. albicans*. Quanto a resistência mecânica, na concentração de 0,5%, independente da molaridade, as partículas não afetaram as características mecânica e de superfície da resina acrílica ou do reembasador.

Assim as hipóteses nulas testadas foram parcialmente rejeitadas, pois apesar de não apresentar ação/adesão antifúngica entre os grupos testados, independentemente da presença e concentração das nanopartículas adicionados aos polímeros, a resistência a flexão foi prejudicada em algumas situações.

8 REFERÊNCIAS*

Acosta-Torres LS, Mendieta I, Nuñez-Anita RE, Cajero-Juarez M, Castaño VM. Cytocompatible antifungal acrylic resin containing silver nanoparticles for dentures. *Int J nanomedicine*. 2012;7:4777–86. doi: 10.2147/IJN.S32391

Ambrogio MW, Thomas CR, Zhao YL, Zink JJ, Stoddart JF. Mechanized silica nanoparticles: a new frontier in theranostic nanomedicine. *Acc Chem Res*. 2011 Oct 18;44(10):903-13. doi: 10.1021/ar200018x

Anusavice KJ. Phillips, materiais dentários. 11ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2005.

Arantes TM, Pinto AH, Leite ER, Longo E, Camargo ER. Synthesis and optimization of colloidal silica nanoparticles and their functionalization with methacrylic acid. *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp*. 2012 Dec 5; 415: 209-17. doi: 10.1016/j.colsurfa.2012.09.041

Archadian N, Kawano F, Ohguri T, Ichikawa T, Matsumoto N. Flexural strength of rebased denture polymers. *J Oral Rehabil*. 2000 Aug;27(8):690–6. doi: 10.1046/j.1365-2842.2000.00552.x

Arendorf TM, Walker DM. Denture stomatitis: a review. *J Oral Rehabil*. 1987 May;14(3):217-27. doi: 10.1111/j.1365-2842.1987.tb00713.x

Barbeau J, Seguin J, Goulet JP, de Koninck L, Avon SL, Lalonde B, et al. Reassessing the presence of *Candida albicans* in denture related stomatitis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2003 Jan;95(1):51–9. doi: 10.1067/moe.2003.44

Bonatti MR, Cunha TR, Regis RR, Silva-Lovato CH, Paranhos HF, de Souza RF. The effect of polymerization cycles on color stability of microwave-processed denture base resin. *J Prosthodont*. 2009 Jul;18(5):432-7. doi: 10.1111/j.1532-849X.2009.00458.x

Budtz-Jørgensen E, Mojon P, Banon-Clément JM, Baehni P. Oral candidosis in long-term hospital care: comparison of edentulous and dentate subjects. *Oral Dis*. 1996 Dec;2(4):285-90. doi: 10.1111/j.1601-0825.1996.tb00239.x

* Baseado em: International Committee of Medical Journal Editors Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical journals: Sample References [Internet]. Bethesda: US NLM; c2003 [atualizado 04 nov 2015; acesso em 25 jan 2016]. U.S. National Library of Medicine; [about 6 p.]. Disponível em: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

Cerveira Netto H. Prótese total imediata. São Paulo: Editora Pancast; 1987.

Chaloupka K, Malam Y, Seifalian AM. Nanosilver as a new generation of nanoparticle in biomedical applications. Trends Biotechnol. 2010 Nov;28(11):580-8. doi: 10.1016/j.tibtech.2010.07.006

Chavant P, Gaillard-Martinie B, Talon R, Hébraud M, Bernardi T. A new device for rapid evaluation of biofilm formation potential by bacteria. J Microbiol Methods. 2007 Mar;68(3):605-12. doi: 10.1016/j.mimet.2006.11.010

Chladek G, Barszczewska-Rybarek I, Lukaszczuk J. Developing the procedure of modifying the denture soft liner by silver nanoparticles. Acta Bioeng Biomech. 2012;14(1):23-9.

Chladek G, Mertas A, Barszczewska-Rybarek I, Nalewajek T, Zmudzki J, Król W, et al. Antifungal activity of denture soft lining material modified by silver nanoparticles-a pilot study. Int J Mol Sci. 2011;12(7):4735-44. doi: 10.3390/ijms12074735

Chladek G, Zmudzki J, Kasperski J. Long-Term Soft Denture Lining Materials. Materials. 2014; 7(8): 5816-42. doi: 10.3390/ma7085816

Corrêa JM, Mori M, Sanches HL, da Cruz AD, Poiate E Jr, Poiate IA. Silver nanoparticles in dental biomaterials. Int J Biomater. 2015;2015:485275. doi: 10.1155/2015/485275

da Silva LH, Feitosa SA, Valera MC, de Araujo MA, Tango RN. Effect of the addition of silanated silica on the mechanical properties of microwave heat-cured acrylic resin. Gerodontology. 2012 Jun;29(2):e1019-23. doi: 10.1111/j.1741-2358.2011.00604.x

Daniluk T, Tokajuk G, Stokowska W, Fiedoruk K, Sciepuk M, Zaremba ML, et al. Occurrence rate of oral *Candida albicans* in denture wearer patients. Adv Med Sci. 2006;51 Suppl 1:77-80.

Deng Z, Chen M, Wu L. Novel method to fabricate SiO₂/Ag composite spheres and their catalytic, surface-enhanced Raman scattering properties. J Phys Chem C. 2007;111(31):11692-8. doi: 10.1021/jp073632h

Devi P, Patil SD, Jeevanandam P, Navani NK, Singla ML. Synthesis, characterization and bactericidal activity of silica/silver core-shell nanoparticles.

J Mater Sci Mater Med. 2014 May;25(5):1267-73. doi: 10.1007/s10856-014-5165-9

Fan C, Chu L, Rawls HR, Norling BK, Cardenas HL, Whang K. Development of an antimicrobial resin--a pilot study. Dent Mater. 2011 Apr;27(4):322-8. doi: 10.1016/j.dental.2010.11.008

Ferrari M. Cancer nanotechnology: opportunities and challenges. Nature Reviews Cancer. 2005 Mar; 5(3):161-71. doi: 10.1038/nrc1566

Hebalkar NY, Acharya S, Rao TN. Preparation of bi-functional silica particles for antibacterial and self cleaning surfaces. J Colloid Interface Sci. 2011 Dec 1;364(1):24-30. doi: 10.1016/j.jcis.2011.07.087

Imazato S, Kinomoto Y, Tarumi H, Ebisu S, Tay FR. Antibacterial activity and bonding characteristics of an adhesive resin containing antibacterial monomer MDPB. Dent Mater. 2003 Jun;19(4):313-9. doi: 10.1016/S0109-5641(02)00060-X

Irzh A, Perkas N, Gedanken A. Microwave-assisted coating of PMMA beads by silver nanoparticles. Langmuir. 2007;23:9891-97. doi: 10.1021/la701385m .

John J, Gangadhar SA, Shah I. Flexural strength of heat-polymerized polymethyl methacrylate denture resin reinforced with glass, aramid, or nylon fibers. J Prosthet Dent. 2001 Oct;86(4):424-7. doi: 10.1067/mpr.2001.118564

Kang SH, Lee HJ, Hong SH, Kim KH, Kwon TY. Influence of surface characteristics on the adhesion of *Candida albicans* to various denture lining materials. Acta Odontol Scand. 2013 Jan;71(1):241-8. doi: 10.3109/00016357.2012.671360

Kasraei S, Azarsina M. Addition of silver nanoparticles reduces the wettability of methacrylate and silorane-based composites. Braz Oral Res. 2012 Nov-Dec;26(6):505-10. doi: 10.1590/S1806-83242012000600004

Kassaei MZ, Akhavan A, Sheikh N, Sodagar A. Antibacterial effects of a new dental acrylic resin containing silver nanoparticles. J Appl Polym Sci. 2008 Nov 5;110(3):1699-703. doi: 10.1002/app.28762

Kim JH, Bryan WW, Lee TR. Preparation, characterization, and optical properties of gold, silver, and gold– silver alloy nanoshells having silica cores. Langmuir. 2008 Oct 7; 24(19):11147-52. doi: 10.1021/la8016497

Kim KJ, Sung WS, Moon SK, Choi JS, Kim JG, Lee DG. Antifungal effect of silver nanoparticles on dermatophytes. *J Microbial Biotechnol*. 2008 Aug; 18(8): 1482-84.

Kimpara ET, Silva LH, Costa CB, Borges ALS, Tango RN, Paes Junior TJA . Resinas acrílicas para prótese total: efeito de ciclos de polimerização sobre a quantidade de monômero residual e porosidades. *RFO UPF*. 2009;14(1):37-41.

Kiriyama T, Kuroki K, Sasaki K, Tomino M, Asakura M, Kominami Y, et al. Antibacterial properties of a self-cured acrylic resin composed of a polymer coated with a silver-containing organic composite antibacterial agent. *Dent Mater J*. 2013;32(5):679-87. doi: 10.4012/dmj.2012-093

Klasen HJ. A historical review of the use of silver in the treatment of burns. II. Renewed interest for silver. *Burns*. 2000 Mar;26(2):131-8. doi: 10.1016/S0305-4179(99)00116-3

Knetsch ML, Koole LH. New strategies in the development of antimicrobial coatings: the example of increasing usage of silver and silver nanoparticles. *Polymers*. 2011;3(1):340-66. doi: 10.3390/polym3010340

Kong H, Jang J. Antibacterial properties of novel poly(methyl methacrylate) nanofiber containing silver nanoparticles. *Langmuir*. 2008 Mar 4;24(5):2051-6. doi: 10.1021/la703085e

Kumar R, Münstedt H. Silver ion release from antimicrobial polyamide/silver composites. *Biomaterials*. 2005 May;26(14):2081-8. doi: 10.1016/j.biomaterials.2004.05.030

Kuroki K, Hayashi T, Sato K, Asai T, Okano M, Kominami Y, et al. Effect of self-cured acrylic resin added with an inorganic antibacterial agent on *Streptococcus mutans*. *Dent Mater J*. 2010 May;29(3):277-85. doi: 10.4012/dmj.2009-076

Lansdown AB. Silver. I: Its antibacterial properties and mechanism of action. *J Wound Care*. 2002 Apr;11(4):125-30. doi: 10.12968/jowc.2002.11.4.26389

Lessard-Viger M, Rioux M, Rainville L, Boudreau D, FRET enhancement in multilayer core-shell nanoparticles. *Nano Lett*. 2009 Aug;9(8): 3066–71. doi: 10.1021/nl901553u

Li Z, Sun J, Lan J, Qi Q. Effect of a denture base acrylic resin containing silver nanoparticles on *Candida albicans* adhesion and biofilm formation. Gerodontology. 2014 Jul 28. doi: 10.1111/ger.12142

Lismont M, Páez CA, Dreesen L. A one-step short-time synthesis of Ag@ SiO₂ core-shell nanoparticles. J Colloid Interface Sci. 2015 Jun 1;447:40-9. doi: 10.1016/j.jcis.2015.01.065

Liu N, Lu Z, Zhao J, McDowell MT, Lee HW, Zhao W, et al. A pomegranate-inspired nanoscale design for large-volume-change lithium battery anodes. Nat Nanotechnol. 2014 Mar; 9(3):187-92. doi: 10.1038/nnano.2014.6

Lotfi-Kamran MH, Jafari AA, Falah-Tafti A, Tavakoli E, Falahzadeh MH. *Candida* Colonization on the Denture of Diabetic and Non-diabetic Patients. Dent Res J (Isfahan). 2009 Spring; 6(1):23-7.

Mc Nally L, O'Sullivan DJ, Jagger DC. An in vitro investigation of the effect of the addition of untreated and surface treated silica on the transverse and impact strength of poly(methyl methacrylate) acrylic resin. Biomed Mater Eng. 2006;16(2):93-100.

McCabe JF, Walls AWG. Materiais dentários diretos. 8. ed. São Paulo: Santos; 2006.

Monteiro DR, Gorup LF, Takamiya AS, de Camargo ER, Filho AC, Barbosa DB. Silver distribution and release from an antimicrobial denture base resin containing silver colloidal nanoparticles. J Prosthodont. 2012 Jan;21(1):7-15. doi: 10.1111/j.1532-849X.2011.00772.x

Morones JR, Elechiguerra JL, Camacho A, Holt K, Kouri JB, Ramírez JT et al. The bacterial effect of silver nanoparticles. Nanotechnology. 2005 Oct;16(10): 2346-53. doi: 10.1088/0957-4484/16/10/059

Nadworny PL, Wang J, Tredget EE, Burrell RE. Anti-inflammatory activity of nanocrystalline silver in a porcine contact dermatitis model. Nanomedicine. 2008 Sep;4(3):241-51. doi: 10.1016/j.nano.2008.04.006

Nam KY. In vitro antimicrobial effect of the tissue conditioner containing silver nanoparticles. J Adv Prosthodont. 2011 Mar;3(1):20-4. doi: 10.4047/jap.2011.3.1.20

Nikawa H, Iwanaga H, Kameda M, Hamada T. In vitro evaluation of *Candida albicans* adherence to soft denture-lining materials. J Prosthet Dent. 1992a;68(5):804-8. doi: 10.1016/0022-3913(92)90206-P

Nikawa H, Sadamori S, Hamada T, Okuda K. Factors involved in the adherence of *Candida albicans* and *Candida tropicalis* to protein-adsorbed surfaces. An in vitro study using immobilized protein. Mycopathologia. 1992b Jun;118(3):139-45. doi: 10.1007/BF00437146

Nischala K, Rao TN, Hebalkar N. Silica-silver core-shell particles for antibacterial textile application. Colloids Surf B Biointerfaces. 2011 Jan 1;82(1):203-8. doi: 10.1016/j.colsurfb.2010.08.039

Oliveira LV, Mesquita MF, Henriques GE, Consani RL. The effect of brushing on surface roughness of denture lining materials. J Prosthodont. 2007 May-Jun;16(3):179-84. doi: 10.1111/j.1532-849X.2006.00169.x

Paes Junior TJA, Carvalho PCK, Sacorague SCMC, Gonçalves FCP, Martinelli CSM. Indagações sobre as resinas acrílicas. In: Miyashita E. Reabilitação oral contemporânea baseada em evidências científicas. Nova Odessa, SP: Napoleão; 2014. p.494-518.

Paes Junior TJA, Kiausinis V, Kimpara ET, Luchini LC . Estudo das resinas acrílicas para bases de próteses totais com relação a resistência flexural e à quantidade de monômero residual superficial. RPG Rev Pos-grad. 2006;13(3):229-35.

Paes Junior TJA, Marchini L, Kimpara ET . Estudo in vitro da porosidade da resina acrílica ativada termicamente através de ciclo longo e por energia de microondas. PGR: Pós-Graduação em Revista. 1999;2(2):36-42. doi: 10.14295/bds.1999.v2i2.47

Panáček A, Kolár M, Vecerová R, Pucek R, Soukupová J, Krystof V, et al. Antifungal activity of silver nanoparticles against *Candida* spp. Biomaterials. 2009 Oct; 30(31):6333-40. doi: 10.1016/j.biomaterials.2009.07.065

Park SE, Periathamby AR, Loza JC. Effect of surface-charged poly(methyl methacrylate) on the adhesion of *Candida albicans*. J Prosthodont. 2003 Dec;12(4):249-54. doi: 10.1016/S1059-941X(03)00107-4

Patel SP, Patel PB, Parekh BB. Application of nanotechnology in cancers prevention, early detection and treatment. J Cancer Res Ther. 2014 Jul-Sep;10(3):479-86. doi: 10.4103/0973-1482.138196

Pires FR, Santos EB, Bonan PR, De Almeida OP, Lopes MA. Denture stomatitis and salivary *Candida* in Brazilian edentulous patients. J Oral Rehabil. 2002 Nov;29(11):1115-9. doi: 10.1046/j.1365-2842.2002.00947.x

Rodríguez Acosta EJ, da Silva PM, Jacobina M, Lara VS, Neppelenbroek KH, Porto VC. *Candida albicans* adherence to denture base material: chemical disinfection and the effect of acquired salivary pellicle formation. J Prosthodont. 2015 Apr;24(3):200-6. doi: 10.1111/jopr.12197

Samaranayake YH, Wu PC, Samaranayake LP, So M, Yuen KY. Adhesion and colonisation of *Candida Krusei* on host surfaces. J Med Microbiol. 1994 Oct;41(4): 250-8. doi: 10.1099/00222615-41-4-250

Samuel U, Guggenbichler JP. Prevention of catheter-related infections: the potential of a new nano-silver impregnated catheter. Int J Antimicrob Agents. 2004 Mar; 23 Suppl1:S75–8. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2003.12.004

Sanvicens N, Marco MP. Multifunctional nanoparticles--properties and prospects for their use in human medicine. Trends Biotechnol. 2008 Aug;26(8):425-33. doi: 10.1016/j.tibtech.2008.04.005

Seyfriedsberger G, Rametsteiner K, Kern W. Polyethylene compounds with antimicrobial surface properties. Eur Polym J. 2006 Nov;42(12):3383-9. doi: 10.1016/j.eurpolymj.2006.07.026

Silva CdeS, Machado AL, Chaves Cde A, Pavarina AC, Vergani CE. Effect of thermal cycling on denture base and autopolymerizing relined resins. J Appl Oral Sci. 2013;21(3):219-24. doi: 10.1590/1679-775720130061

Silva WJ, Rached RN, Rosalen PL, Del Bel Cury AA. Effects of nystatin, fluconazole and propolis on poly(methyl methacrylate) resin surface. Braz Dent J. 2008;19(3):190-6. doi: 10.1590/S0103-64402008000300003

Skupien JA, Valentini F, Boscato N, Pereira-Cenci T. Prevention and treatment of *Candida* colonization on denture liners: a systematic review. J Prosthet Dent. 2013 Nov;110(5):356-62. doi: 10.1016/j.prosdent.2013.07.003

Smith C Jr, Milewski E, Martin MA. The effect of colonizing mice with laboratory and wild type strains of *E. coli* containing tumor virus genomes. *Recomb DNA Tech Bull*. 1985 Jun;8(2):47-51.

Stöber W, Fink A, Bohn E. Controlled growth of monodisperse silica spheres in the micron size range. *J Colloid Interface Sci*. 1968 Jan;26(1):62-9. doi: 10.1016/0021-9797(68)90272-5

Takamata T, Setcos JC. Resin denture bases: review of accuracy and methods of polymerization. *Int J Prosthodont*. 1989 Nov-Dec;2(6):555-62

Tang L, Cheng J. Nonporous silica nanoparticles for nanomedicine application. *Nano today*. 2013 Jun;8(3):290-312. doi: 10.1016/j.nantod.2013.04.007

Telles DM. Prótese total – convencional. São Paulo: Santos; 2011.

Tian J, Wong KK, Ho CM, Lok CN, Yu WY, Che CM, et al. Topical delivery of silver nanoparticles promotes wound healing. *ChemMedChem*. 2007 Jan;2(1):129-36. doi: 10.1002/cmdc.200600171

Völker C, Oetken M, Oehlmann J. The biological effects and possible modes of action of nanosilver. *Rev Environ Contam Toxicol*. 2013;223:81-106. doi: 10.1007/978-1-4614-5577-6_4

Winkler S. Denture base resins. *Dent Clin North Amer*. 1984 Apr;28(2):287-97

Wu K, Yang Y, Zhang Y, Deng J, Lin C. Antimicrobial activity and cytocompatibility of silver nanoparticles coated catheters via a biomimetic surface functionalization strategy. *Int J Nanomedicine*. 2015 Dec 2;10:7241-52. doi: 10.2147/IJN.S92307

Wyatt CC, Harrop TJ, MacEntee MI. A comparison of physical characteristics of six hard denture reline materials. *J Prosthet Dent*. 1986 Mar;55(3):343-6. doi: 10.1016/0022-3913(86)90117-4