



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

**JÉSSICA DIAS SANTOS**

**SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E ATIVIDADE  
ANTIMICROBIANA DE NANOFIBRAS DE POLIETILMETACRILATO  
/ NISTATINA PRODUZIDAS POR ELETROFIAÇÃO**

2017

**JÉSSICA DIAS SANTOS**

**SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE  
NANOFIBRAS DE POLIETILMETACRILATO / NISTATINA PRODUZIDAS POR  
ELETROFIAÇÃO**

Dissertação apresentada ao Instituto de Ciência e Tecnologia, Universidade Estadual Paulista (Unesp), Campus de São José dos Campos, como parte dos requisitos para obtenção do título de MESTRE, pelo Programa de Pós-Graduação em ODONTOLOGIA RESTAURADORA, Área de Prótese Dentária.

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Luiz Souto Borges  
Coorientadora: Profa. Dra. Cristiane Campos Costa Quishida

São José dos Campos

2017

Instituto de Ciência e Tecnologia [internet]. Normalização de tese e dissertação [acesso em 2016]. Disponível em <http://www.ict.unesp.br/biblioteca/normalizacao>

Apresentação gráfica e normalização de acordo com as normas estabelecidas pelo Serviço de Normalização de Documentos da Seção Técnica de Referência e Atendimento ao Usuário e Documentação (STRAUD).

Santos, Jessica Dias

Síntese, caracterização e atividade antimicrobiana de nanofibras de polietilmetacrilato / nistatina produzidas por eletrofiação / Jessica Dias Santos. - São José dos Campos : [s.n.], 2017.  
67 f. : il.

Dissertação (Mestrado em Odontologia Restauradora) - Pós-Graduação em Odontologia Restauradora - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos, 2017.

Orientador: Alexandre Luiz Souto Borges

Coorientadora: Cristiane Campos Costa Quishida

1. Eletrofiação. 2. Polietilmetacrilato. 3. Resina acrílica. 4. Candida albicans. I. Borges, Alexandre Luiz Souto, orient. II. Quishida, Cristiane Campos Costa, coorient. III. Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos. IV. Universidade Estadual Paulista 'Júlio de Mesquita Filho' - Unesp. V. Universidade Estadual Paulista (Unesp). VI. Título.

## **BANCA EXAMINADORA**

**Prof. Adj. Alexandre Luiz Souto Borges** (Orientador)

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

**Prof. Adj Cesar Rogério Pucci**

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

**Dr. Bruno Vinícius Manzolli Rodrigues**

Universidade Vale do Paraíba (Univap)

Campus de São José dos Campos

São José dos Campos, 19 de janeiro de 2017.

## *Dedicatória*

*A minha mãe , Rosana Aparecida Dias, por me apoiar incondicionalmente, por ser minha amiga, por todos os conselhos. Obrigada por estar sempre pronta a me ouvir, mesmo nos momentos mais difíceis e me acalantar, por todos abraços. Dedico a você essa conquista e sei que estaremos uma ao lado da outra até o fim, se é que existe um fim...*

*Aos meu avós, Paulo Ubirajara Dias e Lenice Theodoro Dias, por todo carinho, por serem um exemplo de como viver em família. Além de avós, são pais, pelo amparo em todos os momentos da minha vida, por me incentivar a prosseguir nos momentos em que meus sonhos pareciam tão distantes. Vó obrigada por toda essa doçura sempre no olhar.*

*A minha tia, Roseli Cristina Theodoro Dias, a quem devo muito dessa conquista, a quem sempre me inspirou por ser essa mulher guerreira. Tia estarei sempre com você !!! A minha prima Natália Dias Chad, com quem compartilho a mesma paixão, a Odontologia, por ser minha irmã mais velha, obrigada por todo companheirismo. A distância nunca abalou nossa amizade e todo nosso carinho, dedico essa conquista a vocês.*

*Ao meu amor, André Coelho Lopes, porque na maioria dos dias você acreditou mais em mim do que eu mesma, ouviu nos dias mais cansativos e nos de vitória, como hoje. Se cheguei até aqui foi porque você estava ao meu lado mesmo com toda distância você se fez e faz presente no meu dia a dia. Nosso futuro está cada vez mais perto. Dedico essa conquista a você, Te Amo!*

*A minha amiga Camila Girondi, companheira de graduação e mestrado, com você essa caminhada foi muito mais leve, dedico essa conquista a você.*

## **AGRADECIMENTOS**

**Ao meu orientador Alexandre Luiz Souto Borges, por todo conhecimento adquirido e toda paciência no decorrer do curso. Obrigada por acreditar em mim!**

**Ao Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP.**

**Ao Departamento de Materiais Dentários e Prótese do Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos – UNESP.**

**A todos amigos do curso de pós- graduação, pelos momentos de descontração e pelo constante apoio e incentivo.**

**Aos funcionários do Departamento de Materiais Dentários e Prótese pela ajuda na execução das tarefas.**

**MEUS SINCEROS AGRADECIMENTOS**

"Mesmo quando tudo parece desabar, cabe a mim decidir entre rir ou chorar, ir ou ficar, desistir ou lutar; porque descobri, no caminho incerto da vida, que o mais importante é o decidir ". CORA CORALINA

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS .....</b>	<b>9</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS .....</b>	<b>11</b>
<b>RESUMO .....</b>	<b>12</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>13</b>
<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>13</b>
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>16</b>
<b>2.1 Estomatite Protética .....</b>	<b>16</b>
<b>2.2 Desenvolvimento de materiais .....</b>	<b>18</b>
<b>2.3 Eletrofiação .....</b>	<b>20</b>
<b>2.3.1 O processo da Eletrofiação .....</b>	<b>21</b>
<b>2.3.2 Os parâmetros envolvidos.....</b>	<b>22</b>
<b>2.3.3 Liberação lenta de fármacos .....</b>	<b>24</b>
<b>3 PROPOSIÇÃO .....</b>	<b>25</b>
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>26</b>
<b>4.1 Ensaio da concentração inibitória mínima.....</b>	<b>26</b>
<b>4.2 Produção da solução .....</b>	<b>26</b>
<b>4.2.1 Síntese da solução de PEMA.....</b>	<b>26</b>
<b>4.2.2 Solução de PEMA com adição de NYS .....</b>	<b>27</b>
<b>4.3 Síntese das Nanofibras : Técnica da Eletrofiação .....</b>	<b>27</b>
<b>4.3.1 Síntese das Nanofibras de PEMA.....</b>	<b>28</b>
<b>4.3.2 Síntese das Nanofibras de PEMA com NYS .....</b>	<b>29</b>
<b>4.4 Testes para caracterização das NFs sintetizadas.....</b>	<b>30</b>
<b>4.4.1 Microscopia eletrônica de varredura .....</b>	<b>30</b>
<b>4.4.2 Análise do diâmetro médio das fibras .....</b>	<b>31</b>
<b>4.4.3 Análise da molhabilidade utilizando a técnica do ângulo de contato.....</b>	<b>31</b>
<b>4.4.4 Análise de difratometria de raios-X.....</b>	<b>32</b>
<b>4.4.5 Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier .....</b>	<b>32</b>

<b>4.5</b>	<b>Confecção das amostras de resina reembasadora .....</b>	<b>32</b>
<b>4.6</b>	<b>Micro-organismo e condições de crescimento.....</b>	<b>34</b>
<b>4.6.1</b>	<b>Teste de difusão em ágar.....</b>	<b>35</b>
<b>4.7</b>	<b>Análise Estatística .....</b>	<b>36</b>
<b>5</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>37</b>
<b>5.1</b>	<b>Ensaio da Concentração Inibitória Mínima.....</b>	<b>37</b>
<b>5.2</b>	<b>Testes para caracterização das Nanofibras sintetizadas.....</b>	<b>37</b>
<b>5.2.1</b>	<b>Microscopia Eletrônica de Varredura .....</b>	<b>37</b>
<b>5.2.2</b>	<b>Análise do diâmetro médio das fibras .....</b>	<b>41</b>
<b>5.2.3</b>	<b>Análise da molhabilidade utilizando a técnica do ângulo de contato.....</b>	<b>49</b>
<b>5.2.4</b>	<b>Análise de difratometria de raios-X.....</b>	<b>50</b>
<b>5.2.5</b>	<b>Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier .....</b>	<b>52</b>
<b>5.3</b>	<b>Teste de difusão em ágar.....</b>	<b>55</b>
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>56</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>61</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>62</b>

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Esquema do sistema de eletrofição.....	21
Figura 2 – Quatro regiões do jato da solução .....	22
Figura 3 – Efeito da variação da tensão aplicada na formação do Cone de Taylor	23
Figura 4 – Equipamento preparado para eletrofição.....	28
Figura 5 – Amostras de NFs cobertas por fina camada de ouro para análise em MEV.....	30
Figura 6 –Esquema da disposição dos corpos de prova dos grupos na placa de Petri .....	35
Figura 7 – Micrografias de NFs de PEMA .....	38
Figura 8 - Micrografias de NFs sintetizadas a partir da solução 1 de PEMA com nistatina.....	39
Figura 9 - Micrografias de NFs sintetizadas a partir da solução 2 de PEMA com nistatina.....	40
Figura 10 - Histogramas de frequência dos diâmetros ( $\mu\text{m}$ ) das NFs produzidas a partir da solução de PEMA 1 a 5.....	42
Figura 11 - Histogramas de frequência dos diâmetros ( $\mu\text{m}$ ) das NFs produzidas a partir da solução de PEMA 6 a 9.....	43
Figura 12 - Histogramas de frequência dos diâmetros ( $\mu\text{m}$ ) das NFs de 1 a 6,	

produzidas a partir da solução 1.....	44
Figura 13 - Histogramas de frequência dos diâmetros ( $\mu\text{m}$ ) das NFs de 5 a 12, produzidas a partir da solução 1.....	45
Figura 14 - Histogramas de frequência dos diâmetros ( $\mu\text{m}$ ) das NFs de 1 a 6, produzidas a partir da solução 2.....	47
Figura 15 - Histogramas de frequência dos diâmetros ( $\mu\text{m}$ ) das NFs de 5 a 12, produzidas a partir da solução 2.....	48
Figura 16 – Imagens representativas do comportamento da água destilada sobre as mantas.....	49
Figura 17 - Gráfico representativo da análise de DRX para a NF/PEMA .....	50
Figura 18 – Gráfico representativo da análise de DRX para a NF/20.....	51
Figura 19 – Gráfico representativo da análise de DRX para a NF/10.....	51
Figura 20 – Gráfico representativo da análise de DRX para as NFs.....	52
Figura 21– Espectros de absorção no infravermelho para a NF/PEMA.....	53
Figura 22 –Espectros de absorção no infravermelho para a NF/20 .....	53
Figura 23 – Espectros de absorção no infravermelho para a NF/10.....	54
Figura 24 – Espectros de absorção no infravermelho para as Nanofibras analisadas.....	54

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CIM	Concentração Inibitória Mínima
DMF	Dimetilformamida
DRX	Análise de Difractometria de Raios-X
EP	Estomatite Protética
FTIR	Espectroscopia Transformada por Fourier
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
NFs	Nanofibras
NYS	Nistatina
PBS	Solução fisiológica tampão fosfato
PEMA	Polietilmetacrilato
TCE	1,1,2,2- Tetracloroetano
UFC/mL	Unidade Formadora de Colônia por mililitro
YNB	Yeast Nitrogen Base

Santos JD. Síntese, caracterização e atividade antimicrobiana de nanofibras de polietilmetacrilato / nistatina produzidas por eletrofiação.[dissertação]. São José dos Campos (SP): Universidade Estadual Paulista (Unesp); 2017.

## RESUMO

O objetivo desse estudo foi sintetizar mantas não tecidas de nanofibras (NFs) de Polietilmetacrilato (PEMA) com adição de nistatina (NYS) e avaliar a atividade antimicrobiana nas resinas reembasadoras rígidas e macias. Realizou-se o teste microbiológico da CIM de NYS para a inativação da *C. albicans*. NFs foram sintetizadas pela técnica da eletrofiação, utilizando-se solução de PEMA puro e NYS e PEMA. Para a síntese das NFs de PEMA, foi produzida uma solução de PEMA dissolvido em Dimetilformamida (DMF) e 1,1,2,2 Tetracloroetano (TCE), logo após foram adicionadas duas concentrações de NYS (10 e 20 mg/ml) obtidas do teste CIM. As amostras foram analisadas em Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), Análise de molhabilidade, Análise de Difractometria de Raios-X (DRX) e Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR). Após a análise em MEV foi realizada a média dos diâmetros das fibras com Software ImageJ. As atividades antimicrobianas foram avaliadas por meio do teste de difusão em ágar. As NFs de PEMA apresentaram diâmetro menor, o padrão NF/PEMA apresentou 0,42µm enquanto que a NF/20 1,14 µm e a NF/10 foi de 0,87 µm. As fibras foram consideradas hidrofóbicas por meio da análise de molhabilidade. O DRX e o FTIR comprovaram a presença de PEMA e sugeriram a presença de NYS. O teste de difusão em ágar demonstrou que as fibras não conseguiram inibir a proliferação de *C. albicans*.

Palavras-chave: Eletrofiação. Polietilmetacrilato. Resina acrílica. *Candida albicans*.

Santos JD. *Synthesis, characterization and antimicrobial properties of nanofiber polymethylmethacrylate / Nystatin produced by electrospinning [dissertation]. São José dos Campos (SP): São Paulo State University (Unesp), Institute of Science and Technology; 2017.*

## **ABSTRACT**

*The objective of the study was to synthesize nanofibers (NFs) of Polyethylmethacrylate (PEMA) with addition of Nystatin (NYS) and to evaluate an antimicrobial activity in rigid and soft resins. Microbiological testing of NYS MIC for inactivation of *C. albicans* was performed. NFs were synthesized using the electrochemical technique using pure PEMA and NYS and PEMA solutions. For a synthesis of PEMA NFs, a solution of PEMA dissolved in Dimethylformamide (DMF) and 1,1,2,2 Tetrachloroethane (TCE) was produced, following doses of NYS concentrations (10 and 20 mg / ml) obtained from the CIM. As samples were analyzed in Scanning Electron Microscopy (SEM), Goniometer, X-ray Diffraction Analysis (XRD) and Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR). After an SEM analysis, a mean of the fiber diameters was performed with ImageJ Software. The antimicrobial activities were evaluated by means of the agar diffusion test. As the PEMA NFs presented smaller diameter, the NF / PEMA standard showed 0.42  $\mu\text{m}$  whereas NF / 20 1.14  $\mu\text{m}$  and the NF / 10 was 0.87 $\mu\text{m}$ . The fibers were considered hydrophobic by means of the wettability analysis. The DRX and the FTIR proved a presence of PEMA and suggested a presence of NYS. The diffusion test on agar demonstrated that as fibers failed to inhibit a proliferation of *C. albicans*.*

Keywords: *Electrospinning. Polyethylmethacrylate. Acrylic resin. Candida albicans.*

## 1 INTRODUÇÃO

A estomatite protética (EP) é uma inflamação da mucosa clinicamente caracterizada por pontos hiperêmicos, principalmente nas áreas que mantêm contato íntimo com a superfície interna da prótese (Wilson, 1998). A EP pode apresentar sintomas como: prurido, ardência, dor, sabor desagradável, desconforto, hemorragia na mucosa bucal, alteração no paladar e halitose (Olsen, Stenderup, 1990; Wilson, 1998). Um dos aspectos que denotam a sua importância para a Odontologia é a sua alta prevalência. Estudos têm demonstrado que a EP chega a atingir 70% dos usuários de prótese total (Webb et al., 1998; Chow et al., 1999; Gendreau, Loewy, 2011).

A etiologia da EP é considerada multifatorial, envolvendo causas de origem sistêmicas e locais. Dentre os fatores locais estão: o uso contínuo de próteses, rugosidade e porosidade da resina, traumas da mucosa causados pela prótese e deficiência na higienização (Webb et al., 1998). Além disso, outros fatores podem estar associados, como o uso noturno, o acúmulo de biofilme e contaminação por bactérias e leveduras em sua superfície. Entretanto, a infecção por *Candida spp*, especialmente *Candida albicans*, é considerada o principal fator etiológico (Dorko et al., 2001; He et al., 2006). Todos esses fatores parecem aumentar a capacidade da *Candida albicans*, tanto para colonizar a prótese quanto as superfícies da mucosa oral, onde atua como um agente patogênico e oportunista (Gendreau, Loewy, 2011).

Os tratamentos antifúngicos, tópico ou sistêmico, podem ser indicados para o tratamento da EP, entretanto, as próteses devem ser desinfetadas e mantidas limpas, pois esta pode servir como um foco de reinfecção. Caso o paciente não realize a higienização adequada há uma tendência à recidiva da EP quanto o tratamento antifúngico é interrompido (Muzyka, 2005; Mima et al., 2008; Gendreau, Loewy, 2011). Estes tratamentos antifúngicos tópicos e a própria higiene adequada das próteses e da mucosa são difíceis de implementar, pois a maioria dos pacientes são geriátricos e possuem um certo comprometimento cognitivo, reduzida destreza motora e perda de memória. Outro inconveniente do tratamento por antifúngico tópico seria sua fácil remoção por meio da saliva (Kulak et al., 1994; Chow et al., 1999). Além disso, o tratamento por antifúngico sistêmico vem apresentando um aumento significativo de insucesso quando ministrado em longo prazo, devido à tendência das células de *C.*

*albicans* a desenvolver resistência a esses fármacos promovendo a ineficácia deste método (Mishra et al., 2007).

Novos materiais estão sendo estudados com a finalidade de se evitar o desenvolvimento de biofilmes na superfície das próteses (Gendreau, Loewy, 2011), diversos agentes antimicrobianos têm sido incorporados em resinas acrílicas condicionadoras de tecidos (Chow et al., 1999) e em resinas reembasadoras para a base de prótese. Dentre os agentes antimicrobianos utilizados para esta finalidade encontra-se a nistatina (Trhular et al., 1994; Chow et al., 1999; Urban et al., 2006), fluconazol (Chow et al., 1999), itraconazol (Chow et al., 1999), clorexidina (Aalim et al., 2013), triclosan (Lefebvre et al., 2001), zeólito de prata (Matsuura et al., 1997), zeólito de zinco (Casemiro et al., 2008).

Diversas incorporações de materiais em resinas reembasadoras ou condicionadoras de tecido foram analisadas, porém foi observada dificuldade em manter o agente antimicrobiano presente nestes biomateriais por um tempo mais prolongado (Salim et al., 2013). Outro inconveniente foi que ao longo do tempo algumas substâncias acabavam por afetar negativamente as propriedades mecânicas do polímero (Casemiro et al., 2008). Baseado nesses estudos é possível notar que ainda existe a necessidade de se desenvolver um biomaterial, no qual o agente antimicrobiano atue de forma satisfatória nos microrganismos causadores da EP, evitando sua colonização ou recolonização e proliferação, permanecendo por um maior período de tempo de tal forma que este biomaterial não atue apenas no combate a EP como também em sua prevenção. Tomando como material de estudo as resinas reembasadoras, com finalidade terapêutica, faz-se necessário que o agente microbiano seja liberado de forma lenta e eficaz, permanecendo em meio bucal o equivalente a vida útil de tal resina.

A eletrofiação é uma tecnologia antiga, existe na literatura há mais de 60 anos e atualmente, tem sido muito estudada para a fabricação de NFs (Huang et al., 2003). Esta técnica consiste em um método com baixo custo, simples e versátil para a fabricação das NFs a partir de uma grande variedade de materiais que incluem polímeros, compósitos e materiais cerâmicos (Li, Xia, 2004). No processo de eletrofiação, quando a diferença de potencial supera a tensão superficial do polímero um jato líquido é ejetado, o jato é alongado e acelerado pelo campo elétrico e por fim é depositado sob um substrato. Este método permite ainda modificar propriedades

biológicas e físicas (Huang et al., 2003).

Diante disso, tem-se como hipótese para este estudo, que a confecção de NFs com propriedades antimicrobianas e que apresentem este efeito por período adequado de tempo, possam auxiliar no tratamento efetivo das infecções bucais decorrentes da utilização de prótese.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

A alteração patológica mais comumente observada na mucosa bucal, decorrente da utilização de próteses dentárias removíveis, parciais ou totais, tem sido denominada estomatite induzida por prótese ou estomatite protética, que afeta aproximadamente o palato de 65% de pacientes usuários de próteses (Chandra et al., 2001b; Gendreau, Loewy, 2011). Sua alta prevalência desperta grande interesse, principalmente quanto ao desenvolvimento de biomateriais que proporcionem um tratamento efetivo (Salim et al., 2013).

### 2.1 Estomatite Protética

A EP é caracterizada clinicamente pela presença de múltiplos pontos hiperêmicos, principalmente, na mucosa que mantém íntimo contato com a superfície interna da prótese, e em casos mais avançados também podem ser observadas áreas eritematosas difusas e hiperplasia papilar do palato (Wilson, 1998). A presença da prótese é um fator local iniciante para a doença, visto que, os organismos da *Candida* possuem habilidade para colonizar sua superfície porosa, contribuindo para o desenvolvimento da doença. O biofilme formado na superfície dessa prótese funciona como um reservatório de micro-organismos, expondo a mucosa a sua contínua presença (Gendreau, Loewy, 2011). A EP pode apresentar sintomas como: prurido, ardência, dor, sabor desagradável, desconforto, hemorragia na mucosa bucal, alteração no paladar e halitose (Olsen, Stenderup, 1990; Wilson, 1998).

Clinicamente a EP pode apresentar três estágios: o tipo I, no qual a inflamação fica localizada na saída dos ductos das glândulas salivares; no tipo II o eritema envolve a área sob a prótese e no tipo III o eritema está associado a hiperplasia papilomatosa (Newton, 1962).

A etiologia da EP está associada a vários fatores incluindo higienização bucal inadequada, uso contínuo da prótese, idade do usuário assim como a idade da prótese (Arendorf, Walker, 1979; Budtz-Jorgensen, 1974; Emami et al., 2008). Estão associadas também algumas condições predisponentes como a diminuição do fluxo

salivar, o hábito de fumar, presença de mucosa oral atrófica, presença de doenças da mucosa, como o líquen plano e o uso de corticosteroides (Budtz-Jorgensen, 1974; Gendreau, Loewy, 2011).

Diversos estudos relatam a etiologia multifatorial da EP em resposta a uma infecção causada por *C. albicans*, sendo considerada esta o principal fator etiológico (Dorko et al., 2001; Gendreau, Loewy., 2001; He et al., 2006; Salerno et al., 2011; Webb et al., 1998). A espécie *C. albicans* é considerada a mais prevalente e patogênica das espécies de *Candida*, sendo responsável por cerca de 70% dos casos de infecções (Nikawa et al., 1992). As espécies de *Candida* agem como patógeno oportunista, especialmente quando a resistência do hospedeiro é superada pela virulência dos micro-organismos (Pereira-Cenci et al., 2008).

A estratégia terapêutica adotada no tratamento da EP inclui criteriosa higienização e desinfecção das próteses que pode estar associada ao uso de antifúngicos, tópico ou sistêmico (Salerno et al., 2001; Webb et al., 1998). A utilização de medicamentos tópicos apresenta como desvantagem a fácil eliminação pela saliva e pela movimentação da língua, fazendo com que este tipo de tratamento seja prolongado (Banting et al., 1995; Kulak et al., 1994).

Em relação à utilização dos antifúngicos sistêmicos a grande desvantagem é a possibilidade das espécies microbianas desenvolverem resistência a esses fármacos. Além disso, a terapia medicamentosa não atua erradicando os micro-organismos que colonizam a prótese, sendo frequente a recorrência da infecção (Mishra et al., 2007).

Os tratamentos medicamentosos utilizados para se tratar as lesões pela candidíase são clássicos, tais como: a utilização do miconazol, da nistatina, do cetaconazol, do fluconazol e em menor frequência da anfotericina B.

A nistatina (NYS) é o fármaco mais utilizado para o combate a EP pois combate as leveduras de forma eficaz, porém após a interrupção de sua administração a patologia tende a retornar junto com seus sintomas clínicos. O miconazol a 2%, que por sua apresentação na forma de gel, permite uma maior exposição à lesão, refletindo uma melhor e mais rápida regressão do quadro quando aplicado três vezes ao dia, mas em virtude da alta recidiva da doença irá sempre ter sua ação limitada (Arendorf, Walker, 1997). Já se estudou clínica e microbiologicamente a atuação de um verniz de miconazol no tratamento da estomatite protética e encontrou-se que essa é uma

forma viável de tratamento, porém os efeitos tardios eram questionáveis (Dias et al., 1997).

Não havendo melhora no quadro apenas com a utilização da medicação tópica, o cetoconazol, medicação sistêmica, pode ser administrado, porém este é um medicamento hepatotóxico e pode causar arritmias cardíacas quando utilizado com antibióticos macrolídeos ou anti-histamínicos. Bem como o cetoconazol, o fluconazol, de ação sistêmica, também é hepatotóxico e pode acentuar o efeito de agentes hipoglicêmicos. A anfotericina B, era um antifúngico de referência, porém necessitava ser administrado endovenosamente e tem um potencial nefrotóxico, fazendo com que sua utilização seja descontinuada (McCullough et al., 1996).

A adesão dos micro-organismos às superfícies das próteses é um pré-requisito para formação de biofilme, importante fator relacionado ao desenvolvimento de patologias (Gendreau, Loewy, 2011). A resina acrílica apresenta carga positiva e alta energia de superfície o que acaba por atrair as glicoproteínas salivares que possuem carga negativa, essa atração resulta em forte adesão química. O micro-organismo, que possui carga negativa, acaba se aproximando dessa película por meio de forças de *Van der Waalls* e se unem por meio de adesinas e pontes de hidrogênio (Jorge, 1998).

## 2.2 Desenvolvimento de materiais

As próteses totais apresentam uma boa adaptação e estabilidade aos tecidos moles, porém o osso alveolar pode sofrer reabsorção fisiológica ocasionando uma desadaptação promovendo um desconforto ao paciente. Nesses casos é indicado o uso de materiais de reembasamento, que possuem a função de restabelecer a adaptação, estabilidade e realizar ajustes e correções na região do selado periférico. (Cerveira Netto, 1987; Telles, 2011).

A resina acrílica, material base das próteses totais, por ser um material rígido pode causar desconforto e até mesmo lesões aos tecidos bucais, devido ao atrito da base da prótese com a fibromucosa, nesses casos também é indicado o uso de materiais reembasadores (Bates, Smith, 1965; Feitosa et al., 2003; Krammer, 1971).

Devido à alta prevalência e recidiva da EP, o estudo de novos materiais com ação antimicrobiana vem ganhando espaço na pesquisa (Gendreau, Loewy, 2011). Diversos agentes antimicrobianos vêm sendo incorporados em resinas acrílicas condicionadoras de tecido e em resinas reeembasadoras.

Chow et al. (1999) realizaram um estudo *in vitro* no qual incorporou agentes antimicrobianos em condicionadores de tecido. Utilizou como agentes antimicrobianos a nistatina, fluconazol e o itraconazol nos reembasadores Coe soft e Viscogel. Foram testadas as concentrações: 1,3,5,7,9 e 11% com e sem saliva ,para cada grupo. O teste de difusão em ágar foi realizado, utilizando o micro- organismo *C. albicans*, e o diâmetro do halo inibitório foi avaliado durante 14 dias. Espécimes com saliva apresentaram os melhores resultados antifúngicos. Itraconazol alterou as propriedades físicas do Viscogel, esta combinação não é recomendada para uso clínico. A incorporação de 5% de itraconazol com Coe Soft apresentou- se eficaz, tendo seu pico antifúngico durante 3 dias.

Truhlar et al. (1994) avaliaram a atividade antimicrobiana do material reeembasador Viscogel e do Lynal impregnados com várias concentrações de nistatina, durante 14 dias. A concentração mais elevada de NYS resultou na maior inibição do crescimento de *C. albicans*, porém houve liberação rápida do antimicrobiano durante os primeiro e segundo dias. Urban et al. (2006) compararam a resistência à tração de um condicionador de tecido sem a incorporação de nistatina com o mesmo condicionador de tecido modificado pela adição de nistatina em duas concentrações diferentes (500.000 UI e 1.000.000 UI). Após o preparo, os espécimes foram imersos em água destilada por 24 horas e 7 dias . Os valores de resistência à tração obtidos para os grupos armazenados durante 7 dias foram estatisticamente menores do que os valores dos grupos armazenados por 24 horas. Os resultados deste estudo sugerem que a adição de NYS no condicionador de tecido investigado em concentrações inferiores a 1.000.000 UI não afetaram sua resistência à tração.

Salim et al. (2013) investigaram a eficácia de um polímero impregnado com fluconazol e clorexidina. As concentrações de clorexidina e fluconazol foram fugincidas. O grupo com clorexidina mostrou uma atividade antimicrobiana satisfatória para até 4 semanas, o que pode ser uma alternativa em casos de resposta não satisfatória aos antifúngicos convencionais. Lefebvre et al. (2001) objetivaram determinar se a adição de Triclosan na resina reembasadora Permasoft impede o

crescimento de *C. albicans* e se afeta a citotoxicidade do material. O efeito citotóxico foi avaliado pelo ensaio de MTT. Não houve diferença estatisticamente significativa entre Permasoft com ou sem Triclosan quanto ao crescimento de *C. albicans*, a citotoxicidade do material também não foi alterada.

Matsuura et al. (1997) realizaram um estudo cuja finalidade foi elucidar o efeito antimicrobiano, *in vitro*, da adição de zeólito de prata aos condicionadores de tecido. Os micro-organismos utilizados foram a *C. albicans*, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*. Foram selecionados cinco condicionadores de tecido disponíveis comercialmente: Visco-gel, GC Soft-Liner, Fitt, SR-Ivoseal e Shofu Tissue Conditioner. A atividade antimicrobiana foi avaliada por meio do teste de porcentagem de células viáveis. Os condicionadores de tecido contendo zeólito de prata mostraram possuir efeito antimicrobiano durante 4 semanas para a *C. albicans* e *Pseudomonas aeruginosa*.

Como citado, diversas incorporações de antifúngicos a resinas reembasadoras estão sendo estudadas, porém ainda existe a dificuldade de manter a liberação do agente antifúngico por um maior período de tempo (Chow et al., 1999; Matsuura et al., 1997; Salim et al., 2013; Truhlar et al., 1994;).

## 2.3 Processo de Eletrofiação

O processo de eletrofiação vem despertando o interesse de muitos pesquisadores, devido a sua versatilidade de aplicação para a produção de mantas constituídas por fibras, que variam de escala submicrométrica até escalas nanométricas (Cheng et al., 2008; Lan et al., 2015). A primeira patente sobre o processo ocorreu em 1934, porém havia pouco interesse na eletrofiação nessa época, a partir da década de 90 a comunidade científica passou a investigar mais essa técnica, sua publicação atingiu cerca de 200 artigos em 2003 (Dzenis, 2004).

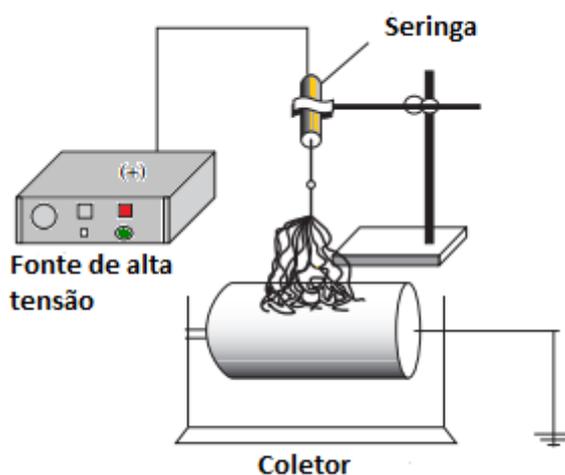
Alguns processos já foram utilizados para a produção de NFs poliméricas como: desenho, síntese de modelos, separação de fases e a automontagem, porém a eletrofiação vem se apresentando como a mais vantajosa por produzir Nfs contínuas de vários polímeros (Huang et al., 2003). As mantas de NFs podem ser eletrofiadas a

partir de soluções poliméricas, cerâmicas ou compósitos e podem ser utilizadas em processos de filtração, nanocatálises, suporte de crescimento de tecido, roupas de proteção, nanoeletrônicos, encapsulação de aditivos alimentícios, membranas de separação, produtos farmacêuticos e reforço de materiais compósitos (Borges et al., 2015; Cacciotti et al., 2014; Cheng et al., 2008; Shukla et al., 2005; Teo, Ramakrishna, 2006).

### 2.3.1 O processo da eletrofiação

A eletrofiação consiste na aplicação de forças eletrostáticas e de arraste na solução para a formação das mantas com fibras interconectadas. O sistema consiste, basicamente, em três elementos: uma fonte de alta voltagem, uma seringa com agulha de pequeno diâmetro e um coletor (Figura 1).

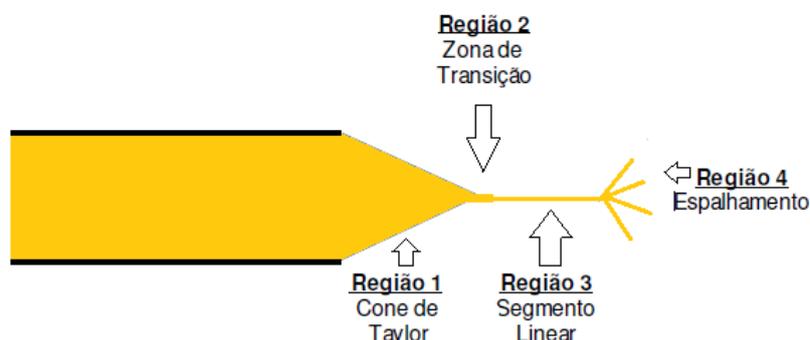
Figura 1- Esquema do sistema de eletrofiação



Fonte Guerrini et al. (2006).

A alta voltagem é utilizada para gerar um campo eletromagnético, o eletrodo positivo carrega eletricamente a ponta da agulha, enquanto que o eletrodo negativo (neutro) é posicionado no coletor. A solução fica mantida por tensão superficial, o que carrega eletricamente a superfície do líquido. Assim que a diferença de potencial gerada supera a tensão superficial da solução, a superfície hemisférica do fluído na ponta da agulha se alonga formando um cone, conhecido como cone de Taylor. O jato da solução sofre um alongamento e é ejetado em direção ao coletor, nesse momento o solvente evapora. Quando o jato é alongado e ejetado 4 regiões se formam: cone de Taylor, a zona de transição, o segmento linear e a região de espalhamento, conforme representado na Figura 2 (Ahmed et al., 2015; Costa et al., 2012; Huang et al., 2003; Rutledge, Fridrikh, 2007).

Figura 2 – Quatro regiões do jato da solução



Fonte: Costa et al. (2012).

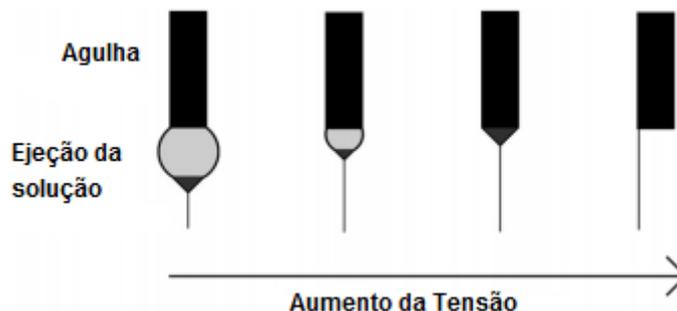
### 2.3.2 Os parâmetros envolvidos

O processo é relativamente simples, porém alguns parâmetros podem ser variados nesse processo a fim de se otimizar a produção de NFs como: a razão de fluxo com que a solução polimérica é ejetada, a diferença de potencial gerada no campo eletromagnético, a distância da ponta da agulha ao coletor e o diâmetro da agulha. Fatores ambientais como temperatura e umidade também influenciam. (Costa et al., 2012; Huang et al., 2003).

Heikkilä e Harlin (2008) concluíram que existe uma relação entre o diâmetro das fibras, a tensão aplicada e a distância entre a agulha e o coletor. A tensão aplicada pode ser considerada como o principal fator, pois é a responsável pela formação do jato de solução polimérica que vai da agulha para o coletor, se essa for muito baixa, não haverá uma diferença de potencial suficiente para superar a tensão superficial da solução polimérica e ocorrerá o gotejamento da solução na ponta da agulha, caso a tensão aplicada seja muito alta, o jato formado não será uniforme e as NFs geradas terão diâmetros variados podendo ocorrer a formação de defeitos (beads)(Figura 3).

Já a distância da ponta da agulha ao coletor foi considerada o segundo fator mais importante, se for muito grande o campo elétrico será fraco e com isso muitas fibras poderão não alcançar o coletor e acabarão ficando no caminho o que diminuirá a produtividade e haverá desperdício da matéria-prima. Se a distância for pequena não haverá espaço para a evaporação do solvente o que também poderá acarretar na formação de (beads).

Figura 3 - Efeito da variação da tensão aplicada na formação do Cone de Taylor



Fonte: Sill e Recum (2008).

A razão de fluxo muito elevada faz com que uma quantidade maior de polímero chegue à ponta da agulha e a diferença de potencial não consegue ejeta-la de maneira uniforme, o que resulta em Nfs instáveis com possível formação de beads (Zhang et al., 2013).

A manta de fibras eletrofiadas possui características como grande área superficial específica, alta porosidade e interconectividade, tornando-as adequadas para transporte de nutrientes e comunicação celular, sendo possível sua utilização em várias aplicações biomédicas.

As formas de administração de fármacos sempre foram um ponto importante para as áreas da saúde, a liberação de fármacos por NFs na cavidade oral torna-se um ponto de grande interesse visto que por meio da cavidade oral é possível obter efeitos tópicos e sistêmicos. A mucosa oral é altamente vascularizada e a liberação lenta de fármacos por essa via apresenta vantagens como: evita o metabolismo pré-sistêmico do trato gastrointestinal e a via de eliminação hepática, apresenta facilidade de administração do dispositivo, sem dor, com ação de início rápido, ótima aceitabilidade pelo paciente o que aumenta a sua adesão ao tratamento aumento assim a taxa de sucesso (Rossi et al., 2005).

### **2.3.3 Liberação lenta de fármacos**

A cavidade bucal é revestida por uma membrana mucosa que apresenta uma área de superfície em torno de 100 cm<sup>2</sup> e histologicamente pode ser classificada como: mucosa mastigatória, de revestimento e especializada. A mucosa mastigatória reveste a gengiva e o palato duro. Está firmemente aderida, por intermédio da lamina própria, ao osso subjacente e seu epitélio é altamente queratinizado. A mucosa de revestimento apresenta um epitélio não queratinizado, sua lamina própria é estruturada de modo a permitir mobilidade e não está firmemente aderida as estruturas subjacentes, recobre os lábios, a mucosa jugal, palato mole, ventre lingual e assoalho bucal. Já a mucosa especializada reveste a superfície da língua, embora funcionalmente seja mucosa mastigatória, este tecido contém papilas e botões gustativos que exercem funções especiais (Ten Cate, 2013). As regiões da cavidade oral onde a liberação lenta de fármacos pode ocorrer são: mucosa palatina, jugal, gengival e sublingual (Scholz et al., 2008).

A eletrofiação proporciona uma grande flexibilidade na escolha dos materiais para aplicação no processo de liberação lenta de fármacos. Materiais biodegradáveis ou não-degradáveis podem ser utilizados para a liberação de fármacos por livre difusão ou sobre auto-degradação. Um grande número de drogas pode ser utilizado como: antibióticos, proteínas e fármacos de combate ao câncer (Sill, Recum, 2008).

### 3 PROPOSIÇÃO

O objetivo desse estudo foi sintetizar mantas não tecidas de NFs de PEMA com adição do antifúngico NYS, caracterizar e avaliar a atividade antimicrobiana nas resinas reembasadoras rígida e macia.

Objetivos específicos:

- a) Definir a concentração inibitória mínima (CIM) de NYS para inativação de *Candida albicans*;
- b) Avaliar a influência dos parâmetros da eletrofiação (voltagem e distância), no diâmetro das fibras do polímero PEMA /NYS obtidas;
- c) Caracterizar a superfície da manta de PEMA e da blenda de NYS por meio de testes físico/químicos;
- d) Avaliar a influência das mantas de PEMA com NYS na inibição de crescimento nas colônias de *C. albicans*.

## **4 MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1 Ensaio da concentração inibitória mínima**

Inicialmente foi realizada a análise da atividade antifúngica da NYS por estimativa da CIM para a inativação de *Candida albicans* utilizando o ensaio de microtitulação em caldo de cultura. Para isto, foram dispensadas alíquotas de 200µL de suspensão de *C. albicans* padronizada a  $10^6$  células/ML, em espectrofotômetro, em placas de cultura de 96 compartimentos. Essas células fúngicas foram expostas a diluição seriada de NYS (20 mg/mL, 10 mg/mL, 5 mg/mL, 2,5 mg/mL, 1,25 mg/mL, 0,625 mg/mL, 0,3125 mg/mL, 0,15625 mg/mL, 0,07 mg/mL, 0,039 mg/mL, 0,019 mg/mL e 0,0097 mg/mL), diluída em caldo Yeast Nitrogen Base (YNB) suplementado com glicose. Em seguida, essa placa de cultura foi armazenada em estufa por 48 horas a 37°C. Após esse período a CIM foi definida como a menor concentração para a qual não houve crescimento visível por meio de inspeção visual (Wady et al., 2012). Este ensaio foi realizado em triplicata, ou seja, para cada concentração foram destinados três compartimentos da placa, além disso, o experimento foi realizado em três ocasiões diferentes, com a finalidade de aumentar a confiabilidade dos dados obtidos.

### **4.2 Produção das soluções poliméricas**

#### **4.2.1 Síntese da solução de PEMA**

A solução de PEMA foi preparada dissolvendo-se 1,2 g de PEMA, em 2,7 mL de (TCE) e em 2,7 mL de DMF. As proporções foram aferidas, o conjunto foi posicionado no agitador magnético (IKA RH Basic, Staufen, Alemanha) permanecendo em agitação constante por 24 horas.

#### **4.2.2 Solução de PEMA com adição de NYS**

Para a confecção da solução de PEMA com adição de NYS o primeiro passo foi o preparo da solução de PEMA (como descrito em 4.1.1). Foram preparadas duas soluções de PEMA.

O segundo passo foi adicionar NYS às duas soluções com as concentrações encontradas no teste de MIC, sendo que :

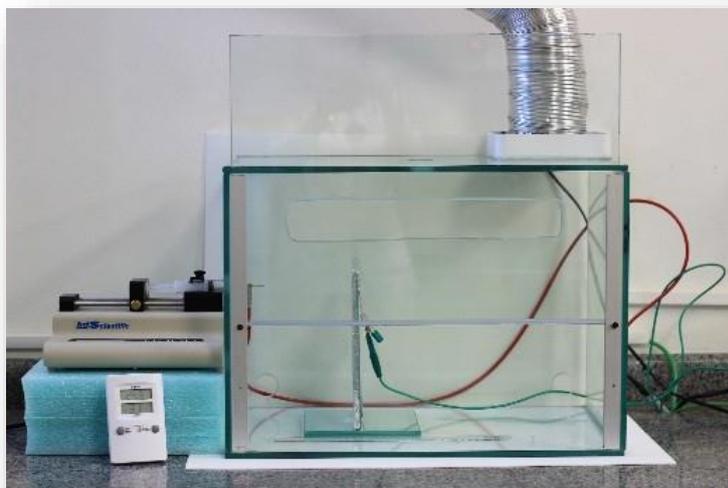
- Solução 1: solução de PEMA com NYS mais concentrada ( valor a ser definido pelo teste MIC);
- Solução 2: solução de PEMA com NYS menos concentrada ( valor a ser definido pelo teste MIC).

#### **4.3 Síntese das Nanofibras : técnica da eletrofiação**

Para a síntese das NFs experimentais, o equipamento de eletrofiação é constituído por uma fonte de alta tensão, uma seringa plástica de 5 mL com agulha de ponta reta e diâmetro do orifício de 0,7 mm<sup>2</sup>, (equipamento obtido por meio do processo FAPESP 2014/00668-4).

A eletrofiação possui algumas variáveis a fim de se otimizar o processo, como a tensão, a distância da ponta da seringa ao anteparo e o fluxo da solução. O processo de sintetização será realizado no laboratório de Bioengenharia e Biomateriais do Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos – UNESP, Figura 4 (sistema preparado para eletrofiação).

Figura 4 - Equipamento preparado para eletrofiiação



Fonte: Elaborado pelo autor.

#### 4.3.1 Síntese das Nanofibras de PEMA

Para esse estudo foram geradas 9 amostras de NFs de PEMA (NF/PEMA), variando a tensão em 10, 13 e 15KV, a distância da ponta da agulha ao anteparo alternou entre 10, 12 e 15 cm, o fluxo da solução foi mantido em 0,05 mL/h (Quadro 1).

Quadro 1 – Representação das variações dos parâmetros das amostras de NFs de PEMA testadas

		Tensão (Kv)		
		10	13	15
Distância (cm)	10	Amostra 1	Amostra 4	Amostra 7
	12	Amostra 2	Amostra 5	Amostra 8
	15	Amostra 3	Amostra 6	Amostra 9

### 4.3.2 Síntese das Nanofibras de PEMA com NYS

Foram geradas 24 amostras de NF de PEMA com NYS, ou seja, 12 mantas não tecidas obtidas para cada solução produzida. A solução de PEMA acrescida de NYS tornou-se mais viscosa e, devido a isso, foi necessário aumentar os valores de tensão para que a diferença de potencial restante fosse maior que a tensão superficial da solução e essa fosse ejetada de encontro ao anteparo. As tensões avaliadas foram: 13, 15, 18 e 20 KV. A distância da ponta da agulha ao anteparo alternou em 10, 12 e 15 cm. O fluxo da solução foi mantido em 0,05 mL/h como esquematizado no quadro 2. As fibras foram coletadas por um mesmo período de tempo (15 minutos) com objetivo de avaliar o volume das NFs produzidas.

Quadro 2 – Representação das variações dos parâmetros das amostras de NFs de PEMA com NYS testadas

		Tensão (Kv)			
		13	15	18	20
Distância (cm)	10	Amostra 1	Amostra 4	Amostra 7	Amostra 10
	12	Amostra 2	Amostra 5	Amostra 8	Amostra 11
	15	Amostra 3	Amostra 6	Amostra 9	Amostra 12

Após a realização da eletrospinação, variando os parâmetros exemplificados acima foi preciso determinar qual foi o parâmetro que otimizou a produção de NFs, ou seja, que resultou em NFs uniformes, sem defeitos (beads), para tal análise se fez necessário a caracterização físico/química dos grupos obtidos, para isto, na parte seguinte do estudo serão realizados os testes para caracterização das NFs sintetizadas.

#### 4.4 Testes para caracterização das NFs sintetizadas

Uma caracterização microestrutural desejável das NFs envolve a determinação da estrutura cristalina, composição química, quantidade, tamanho, forma e distribuição das fases.

##### 4.4.1 Microscopia eletrônica de varredura

As amostras de NFs obtidas na etapa anterior foram analisadas em MEV. Neste ensaio as amostras foram fixadas no suporte e recobertas por fina camada de ouro (SC7620 Mini Sputer Coater/Glow Discharge System, Emitech, East Sussex, RU)(Figura 5). Por meio deste teste foi analisada a orientação das fibras e sua morfologia.

Figura 5 – Amostras cobertas por fina camada de ouro para análise em MEV



Fonte: Elaborado pelo autor.

#### 4.4.2 Análise do diâmetro médio das fibras

O diâmetro das NFs foi calculado com o auxílio do software computacional, ImageJ (Versão 1.44, National Public of Health) por meio das micrografias obtidas em MEV. Para tal foram analisadas 33 micrografias onde realizou-se 10 mensurações de diâmetros em 10 diferentes regiões, sendo 100 análises para cada imagem.

As médias das variáveis avaliadas foram comparadas pela Análise de Variância (ANOVA) 1-fator, seguida pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ).

Foram escolhidas 1 amostra de cada grupo para análises posteriores, a escolha foi baseada em uma análise comparativa seguindo a ordem: ausência de defeitos (beads), menor diâmetro das fibras, menor coeficiente de variação, menor tensão utilizada para a síntese das fibras e menor distância utilizadas. Para as 9 amostras de NFs de PEMA a amostra padrão foi denominada NF/PEMA, para as 12 amostras de NFs de PEMA com NYS advindos da solução 1 o padrão foi denominado NF/20 e para a solução 2, NF/10.

#### 4.4.3 Análise da molhabilidade utilizando a técnica do ângulo de contato.

Para a análise da molhabilidade foram preparadas amostras das fibras: NF/PEMA, NF/20 e NF/10. Foram cortadas 3 amostras para cada tipo de fibra, em formato regular (2 cm X 2 cm). O ângulo de contato das superfícies foi analisado por meio de um Goniômetro Óptico (TL 1000 – Invoiced freight, Theta Lite, Attension, Lichfield, Staffordshire, RU), onde uma seringa de vidro do sistema (Gastight Syringes #1001 – 1 mL, Hamilton, Reno, Nevada, EUA) deposita uma gota de água destilada sobre a superfície da amostra. Uma série de imagens foi gravada pela câmara do equipamento pelo período de 15 segundos. O software OneAttension (Biolin Scientific, Lichfield, Staffordshire, RU) calculou os valores médios para cada amostra a partir das imagens obtidas.

#### **4.4.4 Análise de difratometria de raios-X**

Representa o fenômeno de interação entre o feixe de raios- x incidente e os elétrons dos átomos componentes de um material. Essa análise foi utilizada para realizar a caracterização microestrutural, estudar a estrutura cristalina e seu índice de cristalinidade (relação entre as partes cristalinas e não cristalinas do material).

As fases cristalinas foram identificadas por meio de um padrão de difração que depende do material em questão. Cada material, ao receber o feixe de raios- x, acaba por difratá-lo pela trama cristalina presente.

Amostras dos três grupos em questão (NF/PEMA, NF/10, NF/20) foram analisadas. Foram preparadas no formato 3x3cm e posicionadas no aparelho de DRX (Shimadzu XRD7000, radiação  $\text{CuK}\alpha$ ,  $2\theta = 20-80^\circ$ , 30 mA, 40 kV).

#### **4.4.5 Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier**

A técnica FTIR é considerada uma análise padrão, muito utilizada para caracterizar a estrutura dos polímeros. É utilizada para verificar a presença das bandas de absorção dos grupos funcionais presentes nas amostras, esse espectro é obtido pela pesagem da radiação que fornece os comprimentos de onda dos grupos funcionais presentes.

A referida análise foi realizada no IP&D da Univap utilizando o equipamento de FT-IR (Spotlight 400 – Perkin-Elmer) no modo ATR na região de  $4000 - 500 \text{ cm}^{-1}$ , 32 varreduras e resolução de  $4 \text{ cm}^{-1}$ .

### **4.5 Confeção das amostras de resina reembasadora**

Após a caracterização das mantas de NFs, foram selecionadas as condições experimentais que proporcionaram a obtenção das mantas de NFs mais adequadas,

sem defeitos e menor diâmetro, para serem aderidas aos corpos de prova de resinas reembasadoras.

Em seguida, foram produzidos 48 discos com 6 mm de diâmetro e 2 mm de espessura a partir das resinas reembasadoras autopolimerizáveis Kooliner Hard (**H**) e Soft Confort (**S**). A composição química de cada resina reembasadora está descrita no Quadro 3.

Quadro 3 – Composição química das resinas acrílicas reembasadoras utilizadas

Resinas Reembasadoras	Composição da Resina		Fabricante
	Pó	Líquido	
<b>Kooliner Hard</b>	Polietilmetacrilato (PEMA)	Metacrilato de isobutilo	GC America Inc., Alsip, Illinois, USA
<b>Soft Confort</b>	Polietilmetacrilato (PEMA)	Álcool desnaturado e plastificante	Dencril, São Paulo, Brasil.

Para a confecção das amostras o pó da resina foi proporcionado em balança de precisão utilizando frascos *dappen*. O volume de monômero foi dispensado com o auxílio de pipetas de vidro graduadas, utilizando-se pipetas diferentes para cada material. Após a mistura, a resina foi inserida na placa de vidro, já isolada, outra placa de vidro foi interposta de modo a gerar a espessura de 2 mm. Após a polimerização as placas de vidro foram separadas e, com auxílio de um cilindro metálico cortante, com 6 mm de diâmetro os discos foram cortados.

Foram obtidas amostras para os grupos experimentais descritos abaixo:

- **CH** = Grupo Controle com 16 discos da resina reembasadora Kooliner Hard;
- **CS** = Grupo Controle com 16 discos da resina reembasadora Soft Confort;
- **S+** NF/10 = 16 discos da resina reembasadora Soft Confort com a aplicação da manta não tecida de NFs de PEMA com NYS na concentração de 10 mg/ml;

- **S** + NF/20 = 16 discos da resina reembasadora Soft Confort com a aplicação da manta não tecida de NFs de PEMA com NYS na concentração de 20 mg/ml;

- **H+** NF/10 = 16 discos da resina reembasadora Kooliner Hard com a aplicação da manta não tecida de NFs de PEMA com NYS na concentração de 10 mg/ml;

- **H** + NF/20 = 16 discos da resina reembasadora Kooliner Hard com a aplicação da manta não tecida de NFs de PEMA com NYS na concentração de 20 mg/ml.

Todos os corpos de prova foram enviados para a esterilização em câmara de radiação gama de 20 kGy (cobalt 60) por 6 horas (Embrarad, São Paulo, Brazil). Após a esterilização dos corpos de prova foi realizado o ensaio microbiológico.

#### **4.6 Micro-organismo e condições de crescimento**

Previamente à realização dos ensaios microbiológicos foi realizado o crescimento da *C. albicans*. Desta forma, para o preparo do inóculo, o micro-organismo *C. albicans* (American Type Culture Collection - ATCC 18804, Manassas, EUA), mantido em freezer a menos 80°C no Laboratório de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos/UNESP, foi semeado sobre o meio de cultura ágar *Sabouraud* Dextrose (SDA - Himedia Laboratories, Mumbai, Índia) e incubado a 37 °C por 48 horas.

Após o período de incubação, duas alçadas da levedura, recém-cultivada, foram adicionadas em um frasco contendo Caldo *Sabouraud* Dextrose (Difco, Detroit, EUA) e incubados a 37°C por 24 horas e sob agitação de 75 rpm (estufa orbital). Decorrido o período de incubação os micro-organismos foram centrifugados a 2000 rpm a 21°C por 10 minutos e lavados duas vezes com solução fisiológica tampão fosfato estéril (PBS) (NaCl 100 mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 100 mM, pH 7,2) por meio de agitação e centrifugação. O sobrenadante foi desprezado e o sedimento foi suspenso em 10 mL de solução fisiológica tampão fosfato (PBS). Esse procedimento foi repetido novamente.

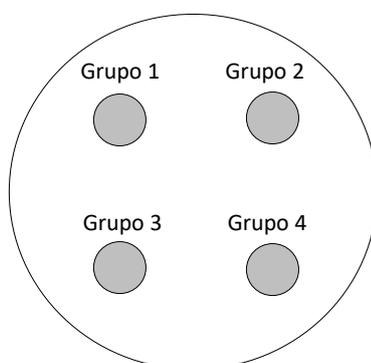
A densidade óptica da suspensão foi determinada e padronizada utilizando-se espectrofotômetro (B582, Micronal, São Paulo, Brasil) com filtro de 530 nm a um valor de  $1 \times 10^6$  células/mL. A partir da padronização das células fúngicas foi realizado o ensaio microbiológico descrito abaixo:

#### 4.6.1 Teste de difusão em ágar

Para verificação do efeito antimicrobiano ao longo do tempo três amostras referentes a cada período de armazenamento (24 h, 48 h, 7 dias, 15 dias, 30 dias e 60 dias) foram colocadas em contato com *C. albicans* para analisar a capacidade de inibição de crescimento desse micro-organismo resultando em uma análise dos quatro grupos.

Para a realização desse teste, uma alíquota de 100  $\mu$ L da suspensão de *C. albicans* ajustada a concentração de  $1 \times 10^6$  células/mL foi transferida para a placa de *Petri* e espalhada, com o auxílio de uma alça *Drigalsky* estéril, igualmente por toda a superfície do meio de cultura para que haja crescimento uniforme do micro-organismo. Em seguida, quatro amostras de resina, uma de cada grupo experimental, foram inseridas com o auxílio de uma pinça estéril em regiões equidistantes (Figura 6) e previamente identificadas através de um gabarito colocado sob a placa.

Figura 6 - Esquema da disposição dos corpos-de-prova dos grupos experimentais na placa



Fonte: Elaborada pelo autor.

Em seguida, a placa de *Petri* foi fechada e incubada em uma estufa bacteriológica à temperatura de 37°C durante pelos períodos preconizados (Pereira et al., 2010).

Após o período de incubação, com auxílio de um paquímetro digital (graduação de 0,01 mm) e uma fonte de luz refletida, foi realizada a mensuração dos diâmetros dos halos de inibição do crescimento microbiano ao redor das amostras de resina, utilizando como valor para análise a média de duas medidas perpendiculares entre si. Este experimento foi realizado em triplicata e em três diferentes ocasiões.

#### **4.7 Análise Estatística**

Para os dados obtidos pelos testes de DRX, MEV, MET e a FTIR, foram realizadas análises descritivas, com cálculos de média e desvio padrão.

Para as variáveis em análise, os dados foram submetidos a análise estatística por meio de programas computacionais : MINITAB (Minitab, version 17.2.1, 2015) e Origin (Mi-crocal origin®, 6.0, USA).

Os dados obtidos a partir dos testes microbiológicos foram submetidos, primeiramente à análise inferencial, ao teste de normalidade, utilizou-se o teste paramétrico (ANOVA) e o teste de comparação múltipla de Tukey (5%).O nível de significância escolhido foi o valor convencional de 5%.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Ensaio da Concentração Inibitória Mínima

A concentração mínima inibitória da solução de NYS 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 em 11 das 12 concentrações avaliadas, somente a solução mais diluída (0,0097 mg/mL) não apresentou atividade inibitória.

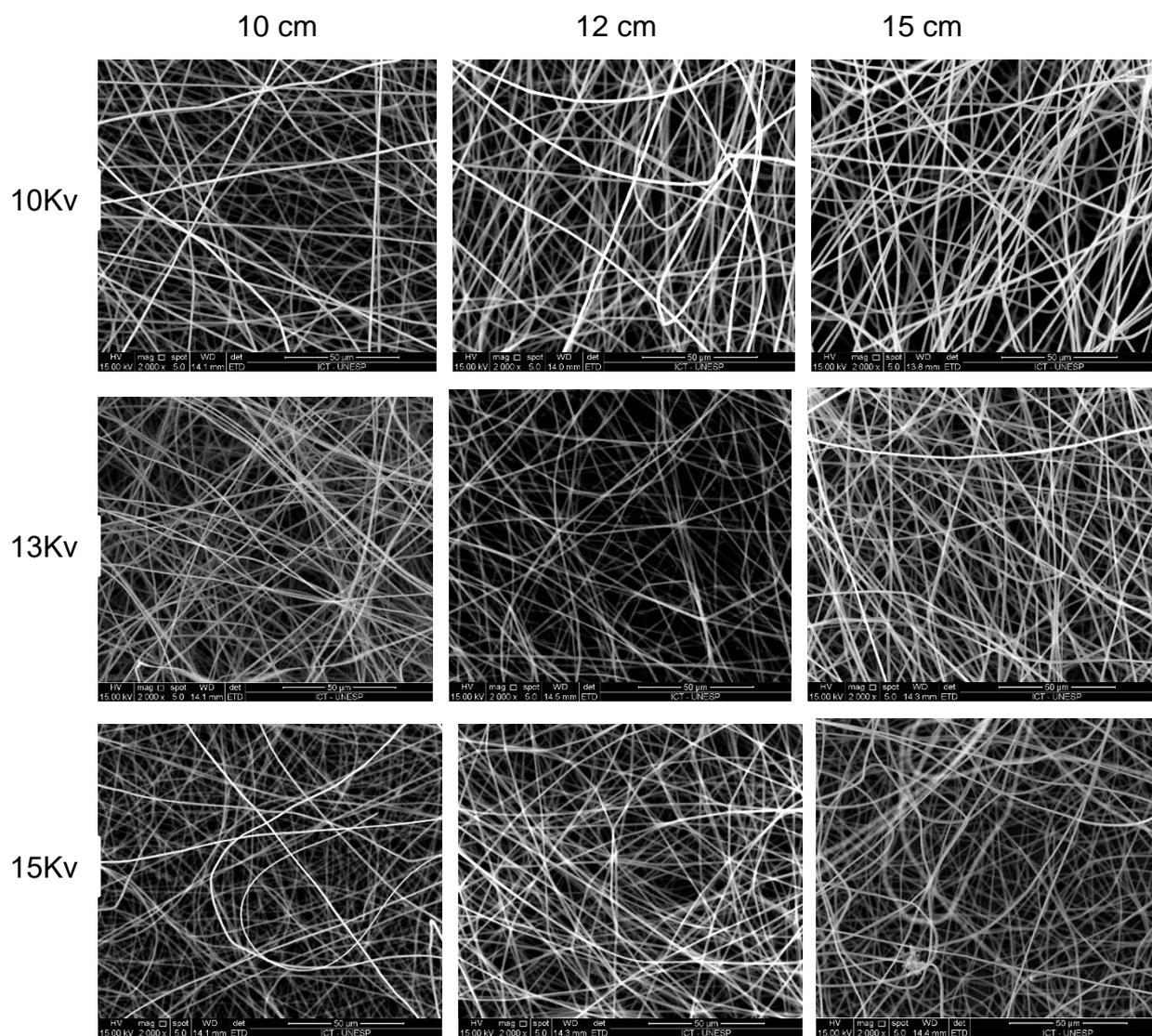
Foram escolhidas as concentrações de 20 mg/mL (solução 1), por ser a mesma concentração do antifúngico comercial Micostatin, e a concentração de 10 mg/mL (solução 2). Essas duas concentrações foram utilizadas para preparar as soluções de PEMA com NYS para eletrofiacção.

### 5.2 Testes para caracterização das Nanofibras sintetizadas

#### 5.2.1 Microscopia Eletrônica de Varredura

Por meio da análise em MEV foram obtidas 9 micrografias para as NFs de PEMA (Figura 7), 12 micrografias para as NFs obtidas a partir da solução 1 (PEMA com NYS), mais concentrada, representadas na Figura 8. As NFs obtidas a partir da solução 2 (PEMA com NYS) também foram analisadas em MEV como demonstra a Figura 9.

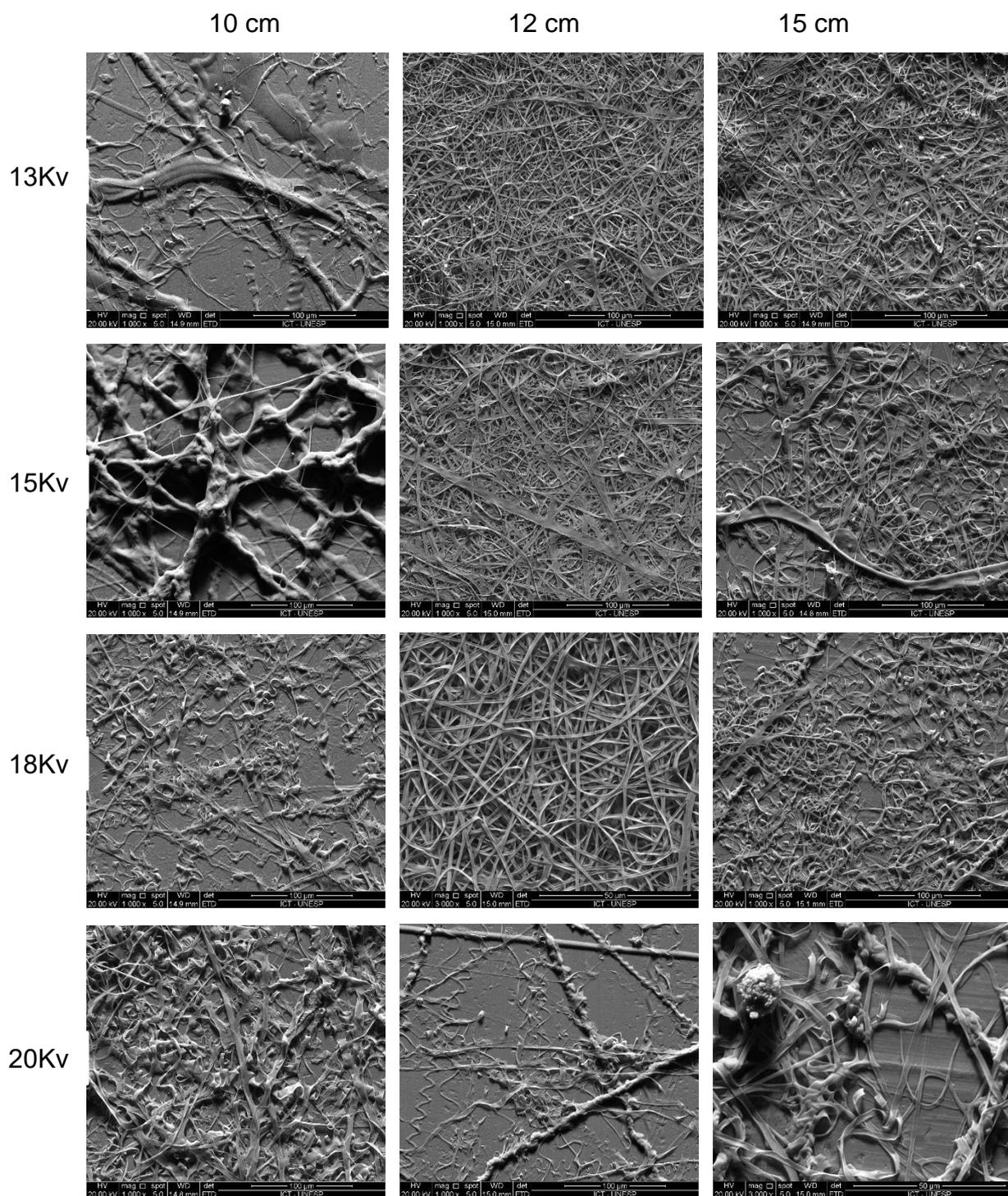
Figura 7- Micrografias de NFs de PEMA sintetizadas



Legenda: 2000x aumento.

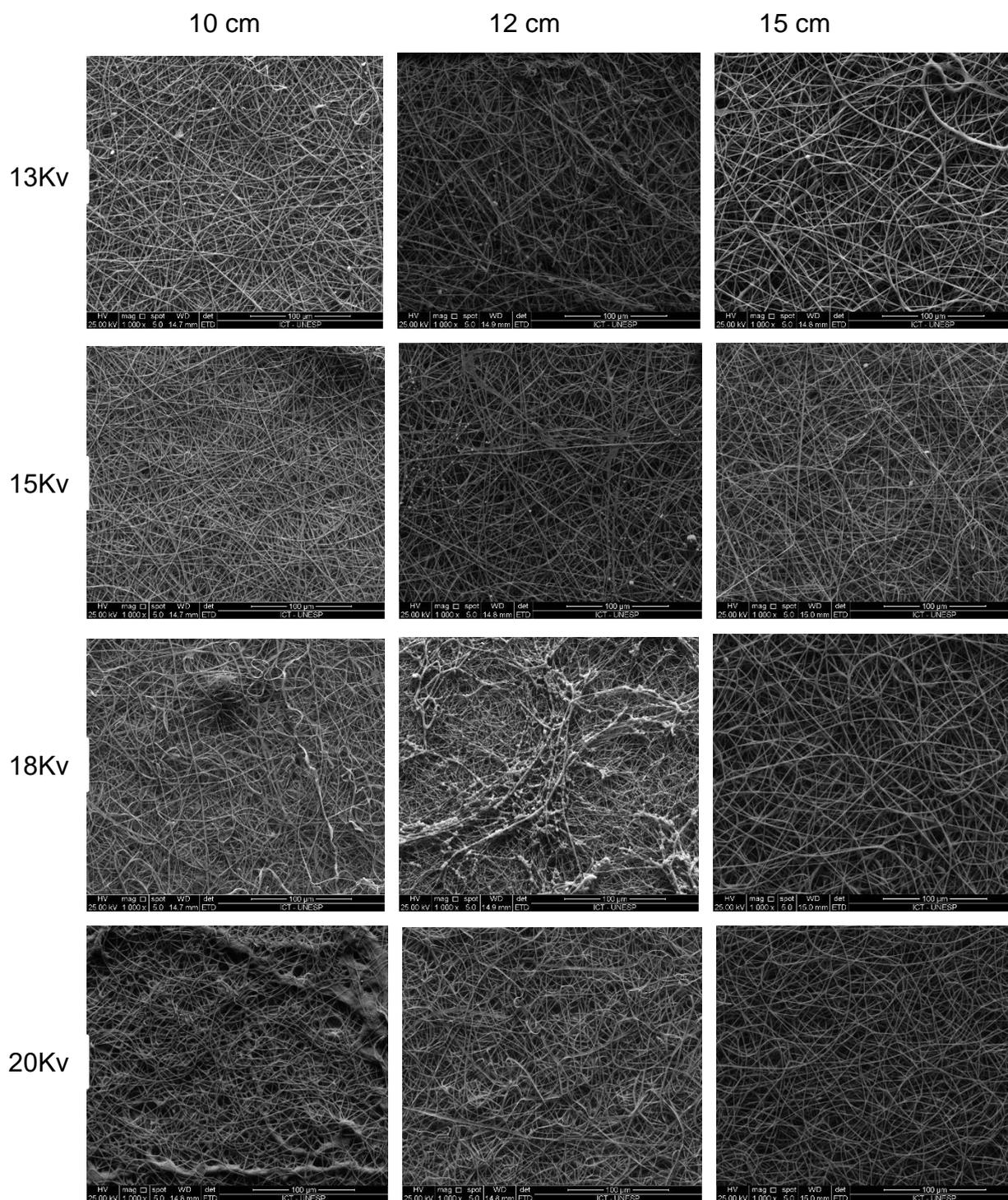
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 8- Micrografias de NFs sintetizadas a partir da solução 1



Legenda: 1000x aumento.  
Fonte: Elaborado pelo autor

Figura 9 - Micrografias de NFs sintetizadas a partir da solução 2



Legenda: 1000x aumento.

Fonte: Elaborado pelo autor

### 5.2.2 Análise do diâmetro médio das fibras

A estatística dos valores médios dos diâmetros das fibras estão apresentados na Tabela 1, 2,3 e 4.

Tabela 1 – Medida de tendência central (Média), desvio padrão (DP), coeficiente de variação(CV) em porcentagem, dos valores de diâmetro médio de fibras ( $\mu\text{m}$ ), para as NFs de PEMA.

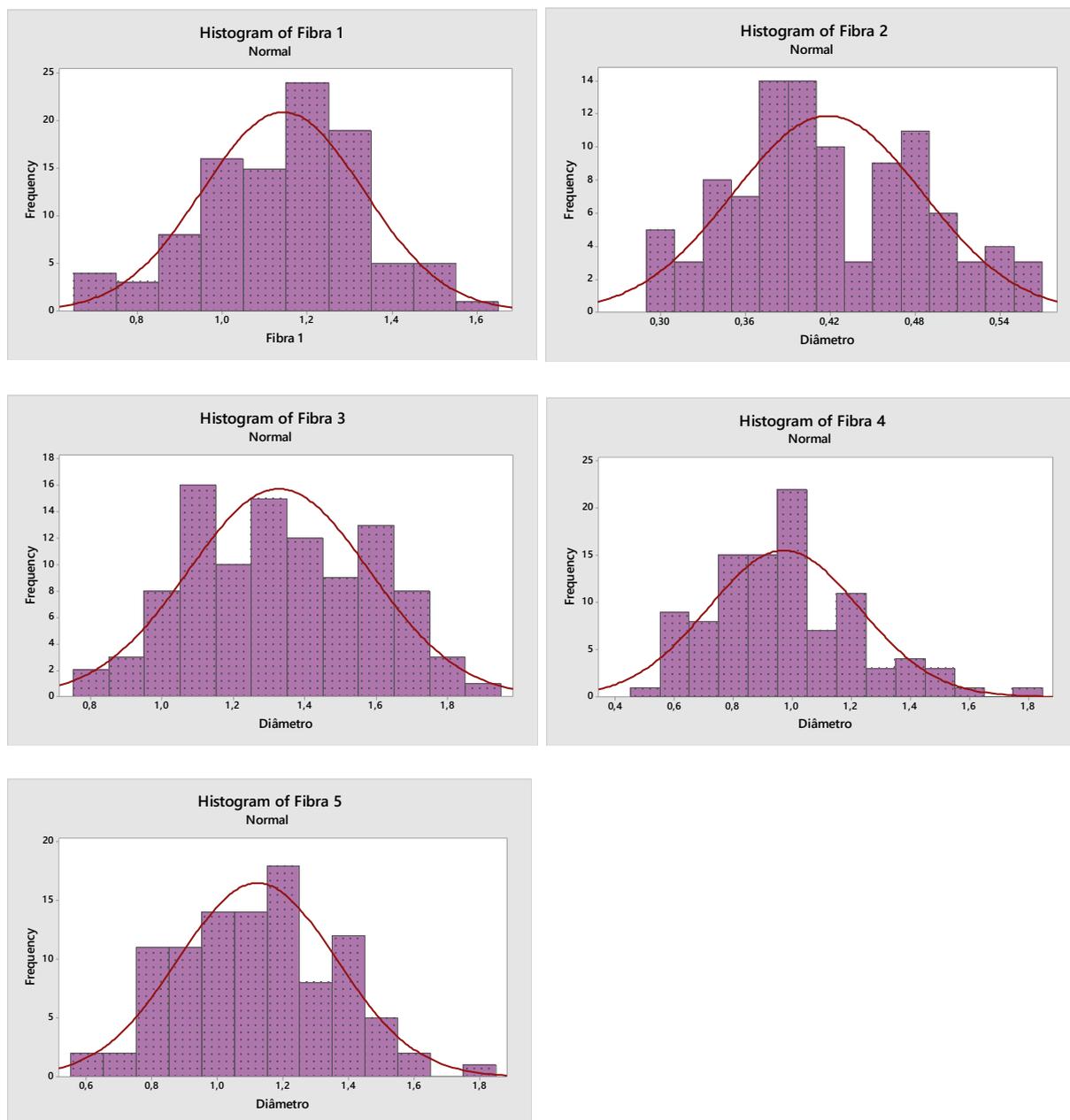
<b>Fibras</b>	<b>Média</b>	<b>DP</b>	<b>CV</b>
<b>1</b>	1,14	0,19	17
<b>2</b>	0,42	0,01	0,2
<b>3</b>	1,33	0,25	19
<b>4</b>	0,97	0,44	45
<b>5</b>	1,12	0,24	21
<b>6</b>	1,19	0,25	21
<b>7</b>	0,96	0,01	1
<b>8</b>	1,1	0,18	16
<b>9</b>	1,06	0,24	23

Fonte: Elaborado pelo autor

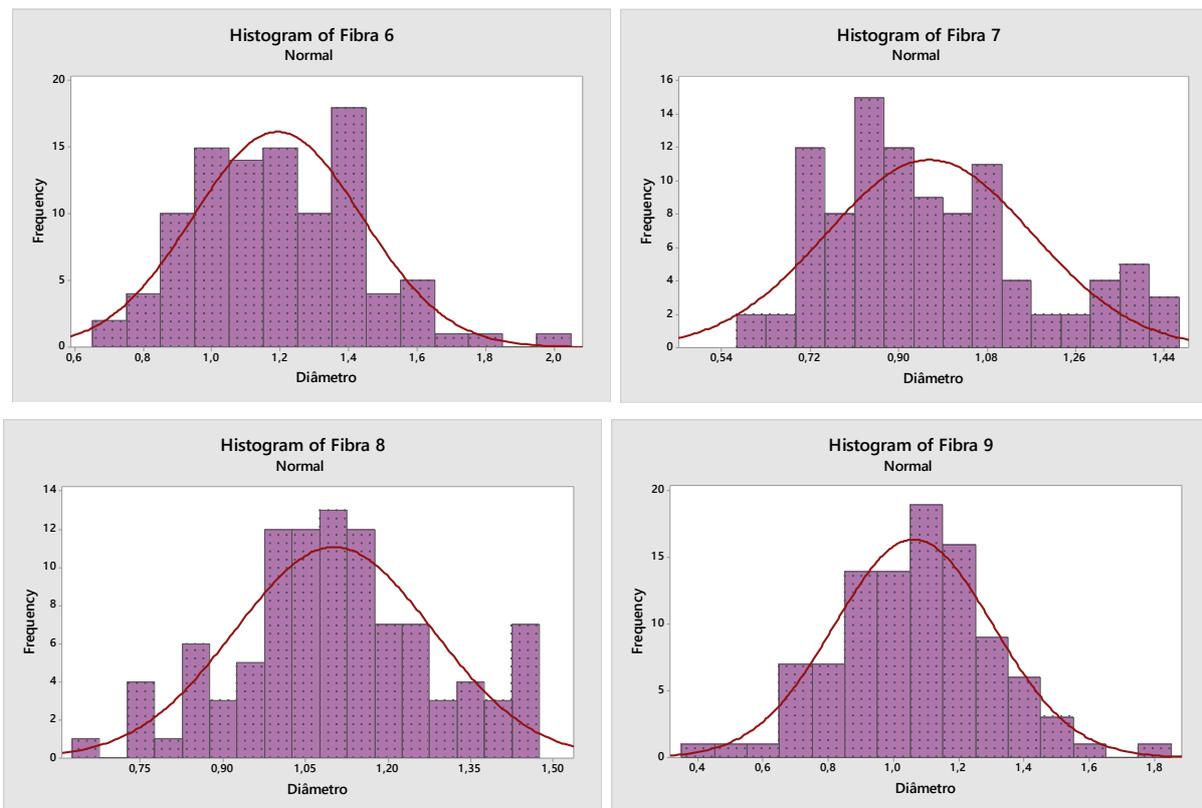
Tabela 2 – Análise de comparação dos fatores de Tukey para as NF de PEMA.

<b>Tensão</b>	<b>Distância</b>	<b>N</b>	<b>Mean</b>	<b>Grouping</b>
<b>10</b>	15	100	1,33	A
<b>13</b>	15	100	1,19	B
<b>10</b>	10	100	1,14	B C
<b>13</b>	12	100	1,12	B C
<b>15</b>	12	100	1,14	B C
<b>15</b>	15	100	1,06	C D
<b>13</b>	10	100	0,97	D E
<b>15</b>	10	100	0,96	E
<b>10</b>	12	100	0,42	F

Fonte: Elaborado pelo autor

Figura 10 - Histogramas de frequência dos diâmetros ( $\mu\text{m}$ ) das NFs de PEMA 1 a 5

Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 11 - Histogramas de frequência dos diâmetros ( $\mu\text{m}$ ) das NFs de PEMA 6 a 9

Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 3 – Medida de tendência central (Média), desvio padrão (DP), coeficiente de variação(CV) em porcentagem, dos valores de diâmetro médio de fibras ( $\mu\text{m}$ ), para as NFs de PEMA com NYS obtidas a partir da solução 1

Fibras	Média	DP	CV
1	4,7	1,19	25,32
2	3,44	2,56	74,38
3	3,28	1,62	49,46
4	1,32	0,10	7,62
5	1,66	0,69	41,50
6	1,87	0,69	37,10
7	1,15	0,31	27,28
8	4,13	2,23	54,12
9	1,68	0,67	39,73
10	2,77	2	54,68
11	2,50	1,13	45,16
12	1,79	0,62	34,65

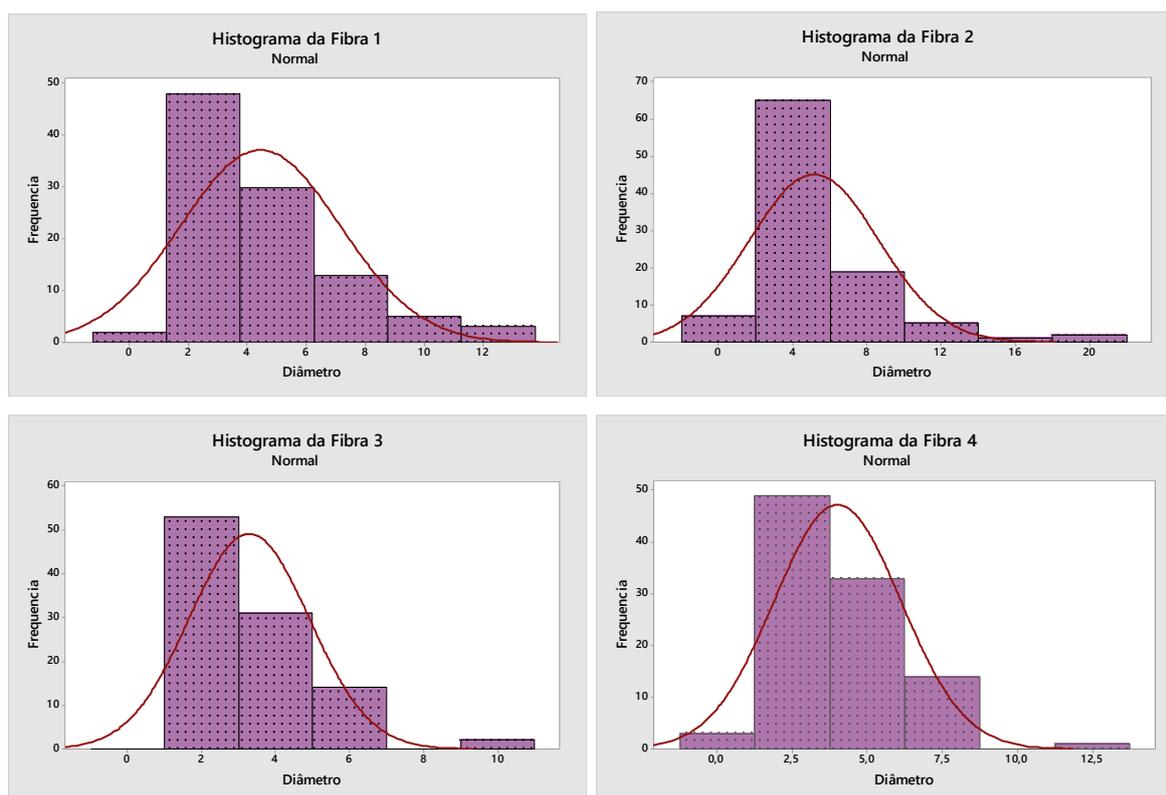
Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 4 – Análise de comparação dos fatores de Tukey para as NFs de PEMA com NYS obtidas a partir da solução 1

Tensão	Distância	N	Mean	Grouping
15	15	100	2,77	A
18	15	100	2,50	A
15	12	100	1,87	B
13	15	100	1,68	B
13	12	100	1,66	B
18	12	100	1,15	C

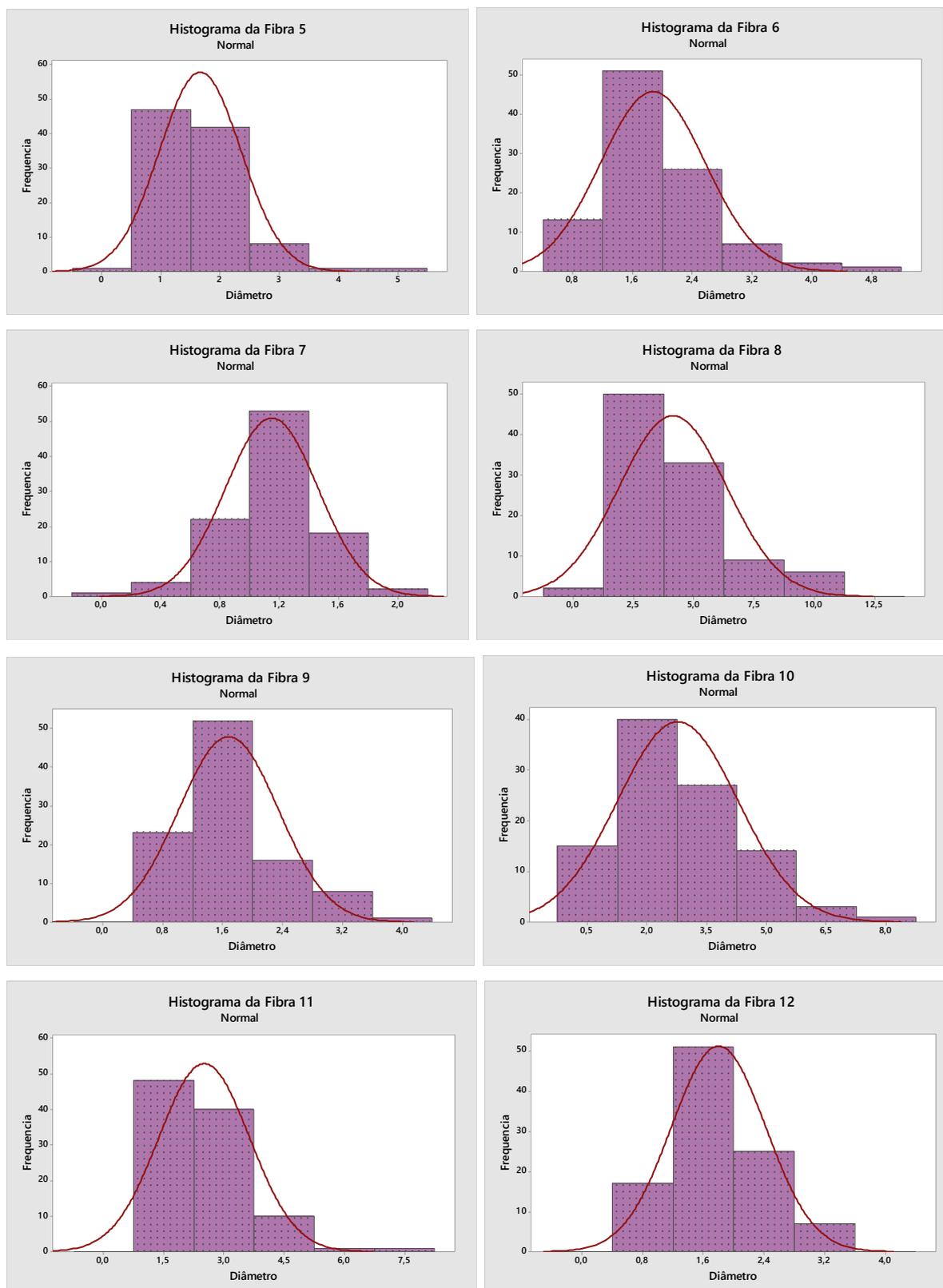
Legenda: Apenas para os grupos que resultaram na formação de NFs  
 Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 12 - Histogramas de frequência dos diâmetros ( $\mu\text{m}$ ) das NFs de 1 a 4, produzidas a partir da solução 1



Fonte: Elaborado pelo autor

Figura 13 - Histogramas de frequência dos diâmetros ( $\mu\text{m}$ ) das NFs de 5 a 12, produzidas a partir da solução 1



Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 5 – Medida de tendência central (Média) , desvio padrão (DP), coeficiente de variação(CV) em %, dos valores de diâmetro médio de fibras ( $\mu\text{m}$ ), para a solução 2

<b>Fibras</b>	<b>Média</b>	<b>DP</b>	<b>CV</b>
1	1,34	0,24	15,14
2	0,87	0,36	42,1
3	1,38	0,58	42,06
4	0,94	0,29	31,0
5	1,36	0,33	24,19
6	1,50	0,92	61,12
7	1,66	0,70	42,23
8	1,56	0,65	41,50
9	1,62	0,79	48,8
10	1,29	0,34	26,57
11	1,61	0,48	30,05
12	1,29	0,29	22,56

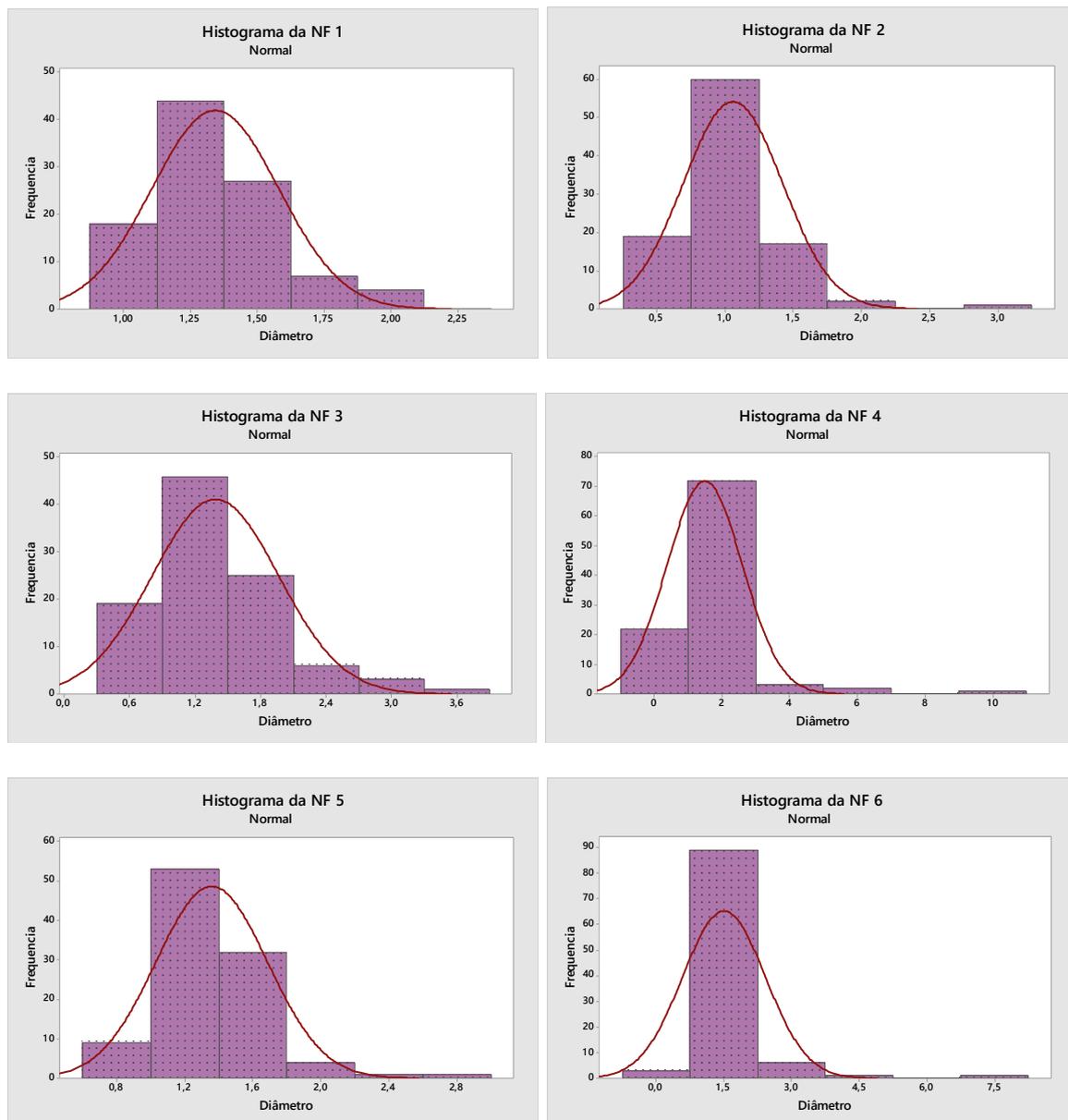
Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 6 – Análise de comparação dos fatores de Tukey para a solução 2

<b>Tensão</b>	<b>Distância</b>	<b>N</b>	<b>Mean</b>	<b>Grouping</b>
18	12	100	1,66	A
13	15	100	1,62	A B
18	15	100	1,61	A B
20	12	100	1,56	A B C
15	12	100	1,50	A B C
20	10	100	1,49	A B C
18	10	100	1,38	A B C
13	12	100	1,36	B C
13	10	100	1,34	B C D
20	15	100	1,3	C D
15	15	100	1,29	C D
15	10	100	0,87	D

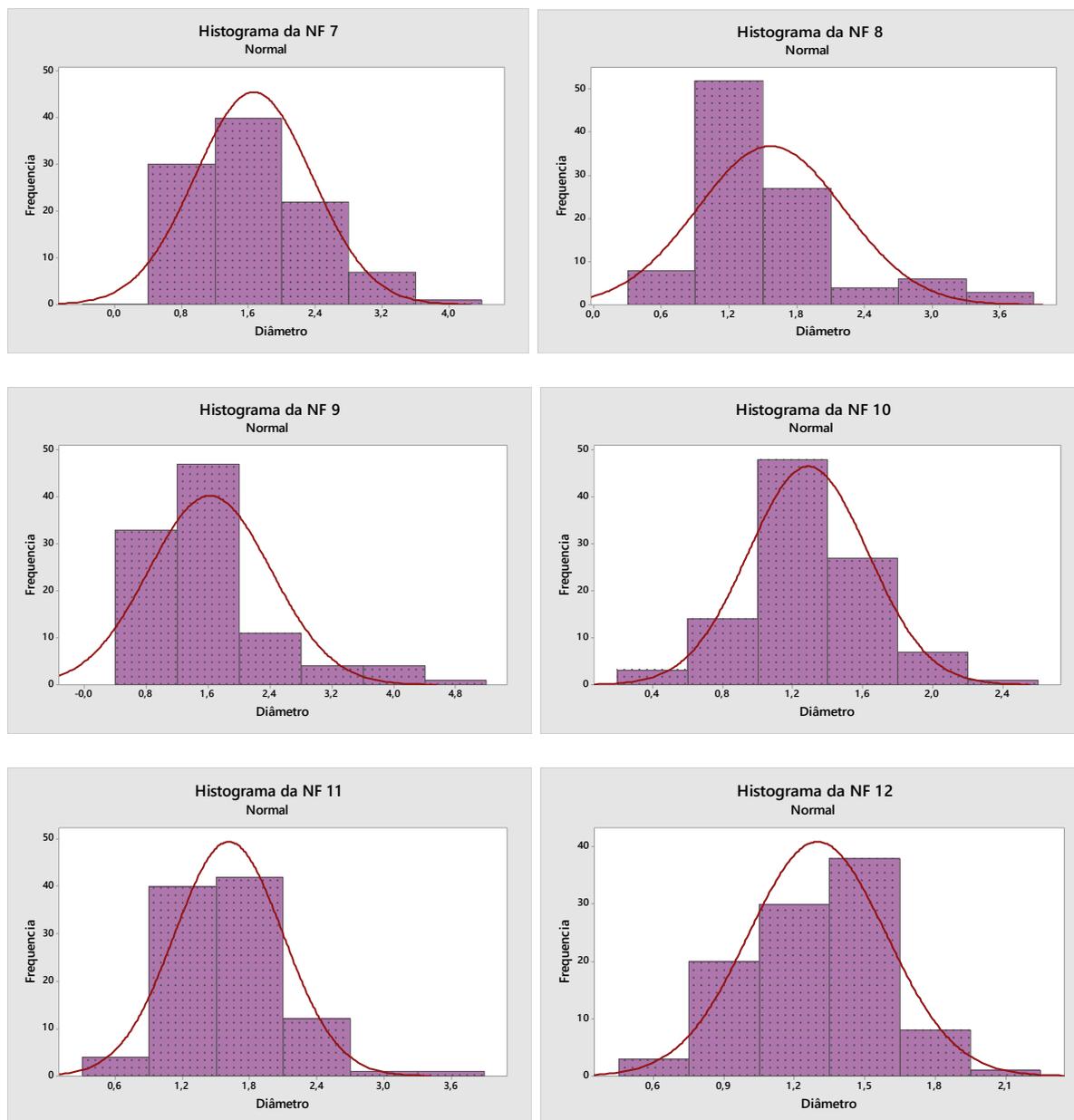
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 14 - Histogramas de frequência dos diâmetros ( $\mu\text{m}$ ) das NFs de 1 a 6, produzidas a partir da solução 2



Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 15- Histogramas de frequência dos diâmetros ( $\mu\text{m}$ ) das NFs de 7 a 12, produzidas a partir da solução 2



Fonte: Elaborado pelo autor.

Dentre os 12 padrões produzidos para cada solução, foi selecionado um padrão de cada para ser utilizado. Esta seleção foi baseada em uma análise comparativa seguindo a ordem: ausência de defeitos (*beads*), menor diâmetro das fibras, menor coeficiente de variação, menor tensão utilizada para síntese das fibras, menor distância utilizada.

Para a solução de PEMA o padrão escolhido foi o 2 (NF/PEMA) já que apresentou ausência de beads, menor diâmetro ( $0,42 \mu\text{m}$ ) e o menor coeficiente de variação. A tensão utilizada foi de 10 Kv e a distância de 12 cm da ponta da agulha ao anteparo.

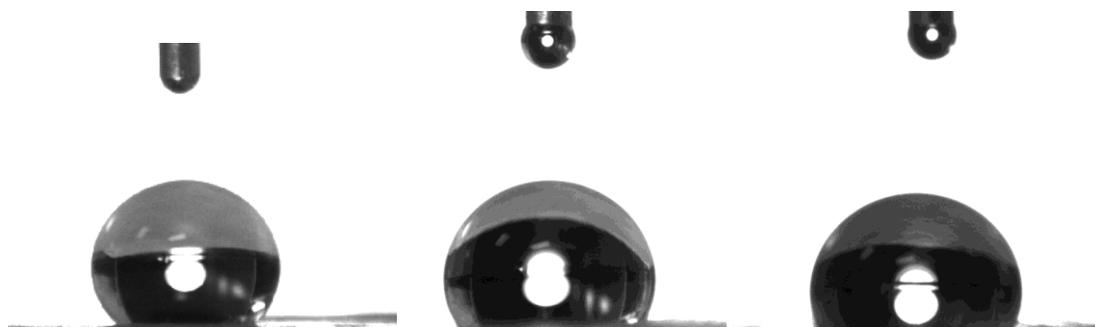
Para a solução 1, foi escolhida a Amostra 7 (NF/20) onde o menor diâmetro foi encontrado –  $1,14726 \mu\text{m}$ , as NFs não apresentaram beads, foi o menor coeficiente de variação, apresentaram volumosas e uniformes demonstrando ser um parâmetro promissor para o estudo em questão. A tensão utilizada foi de 18 Kv e a distância de 12 cm.

Para a solução 2, foi escolhida a amostra 2 (NF/10) onde o menor diâmetro foi encontrado-  $0,867 \mu\text{m}$ , com a tensão de 15 Kv e distância da agulha ao anteparo de 10 cm. As NFs não apresentaram (beads), foram volumosas e uniformes.

### 5.2.3 Análise da molhabilidade utilizando a técnica do ângulo de contato.

Para a análise de molhabilidade foi utilizado o ângulo de contato da água destilada, como demonstrado na figura 16.

Figura 16 – Imagens representativas do comportamento da água destilada sobre as mantas: NF/PEMA, NF/20 e NF/10, da esquerda para a direita



Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 7 – Análise de comparação dos fatores de Tukey para as médias dos ângulos obtidos

Factor	N	Mean	Grouping
NF/20	10	118,58	A
NF/10	10	118,09	A
NF/PEMA	10	109,31	A

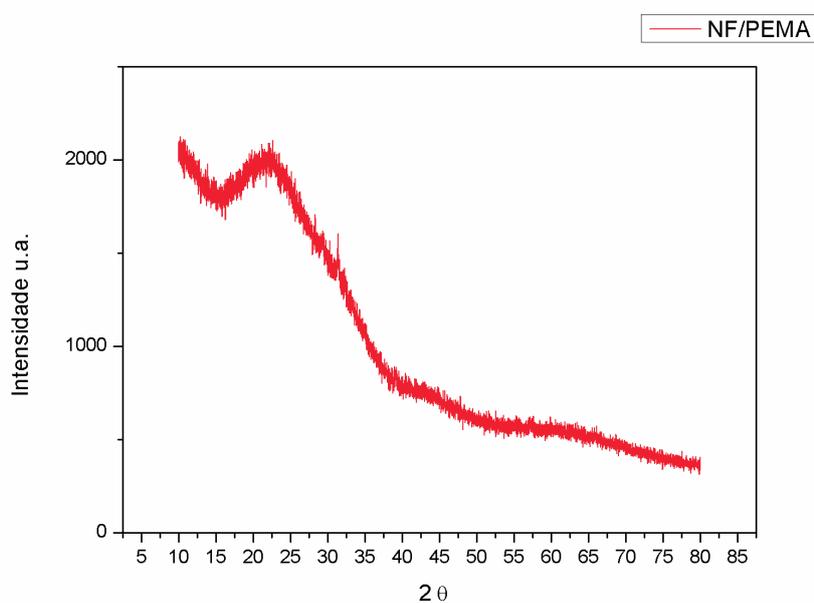
Fonte: Elaborado pelo autor.

Como observado na Tabela 7 não houve diferença estatisticamente significativa para os grupos estudados. Os ângulos variaram entre 109,31 a 118,58<sup>0</sup>, logo todas as mantas apresentaram valores maiores que 90<sup>0</sup> sendo consideradas predominantemente hidrofóbicas. (Kwok, Neumann, 1999)

#### 5.2.4 Análise de difratometria de raios-x

Os resultados da análise de DRX estão representados nas figuras: 17, 18, 19 e 20.

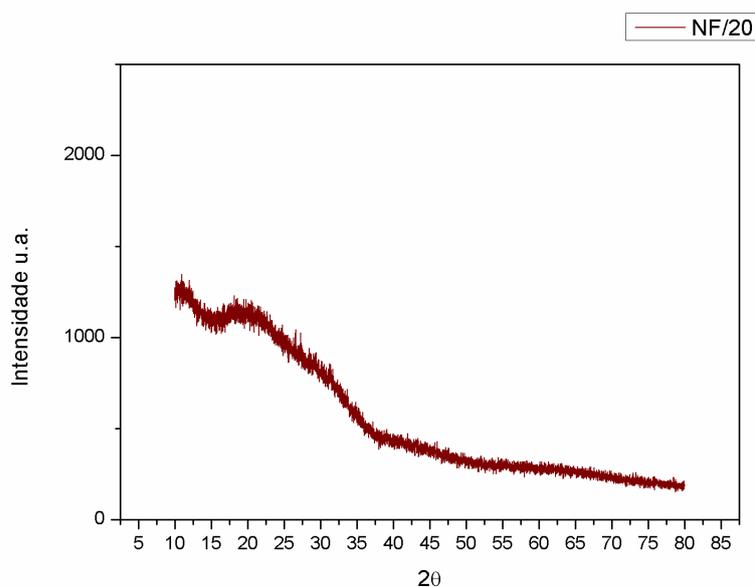
Figura 17 – Gráfico representativo da análise de DRX para a NF/PEMA



Fonte: Elaborado pelo autor.

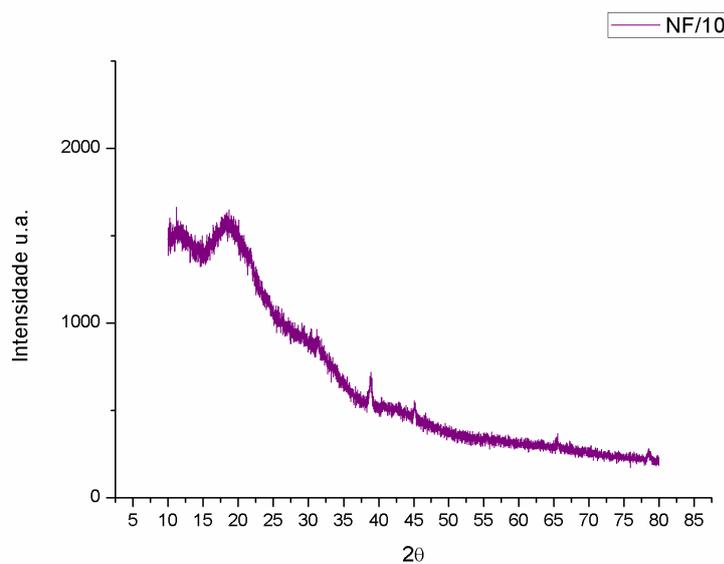
A Figura 17 demonstra que para a NF/PEMA não há linhas de difração acentuadas o que confirma a natureza não cristalina do polímero.

Figura 18 – Gráfico representativo da análise de DRX para a NF/20



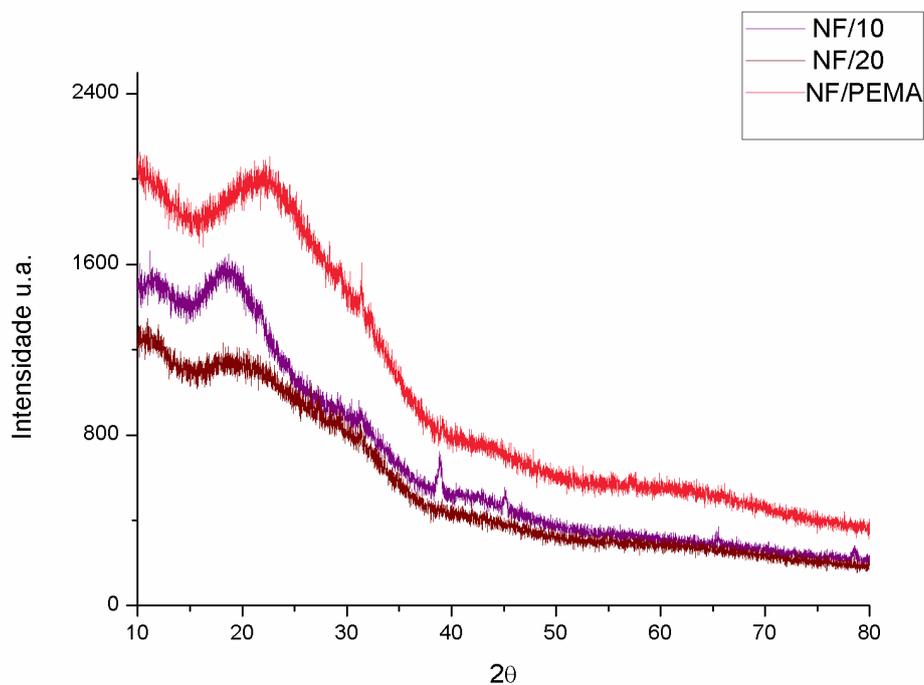
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 19 – Gráfico representativo da análise de DRX para a NF/10



Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 20– Gráfico representativo da análise de DRX para as Nanofibra analisadas



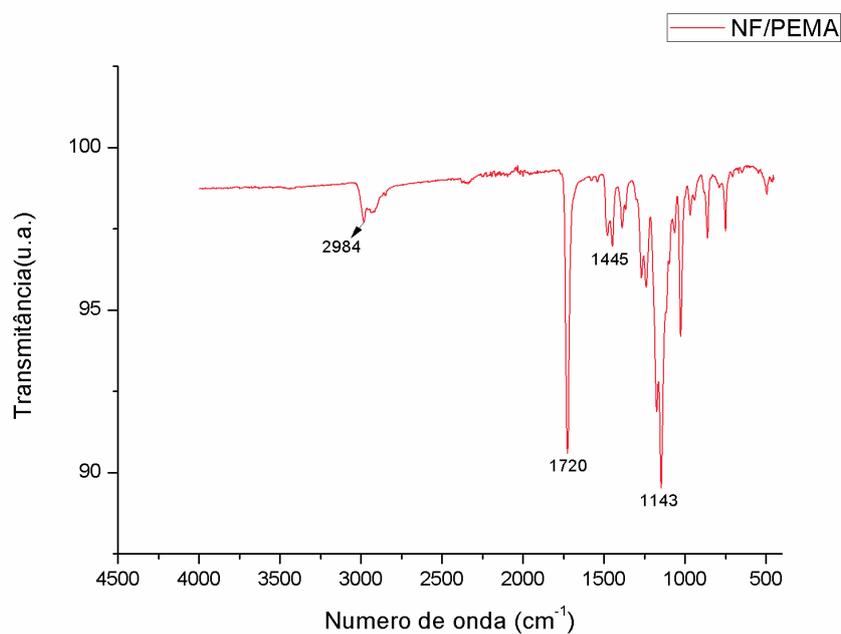
Fonte: Elaborado pelo autor.

A Figura 20 compara as 3 fibras demonstrando que a NF/20, mais concentrada, possui maior cristalinidade o que sugere a influência da NYS na análise.

### 5.2.5 Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier

Os gráficos obtidos a partir das análises de FTIR estão demonstrados nas figuras 21, 22, 23 e 24.

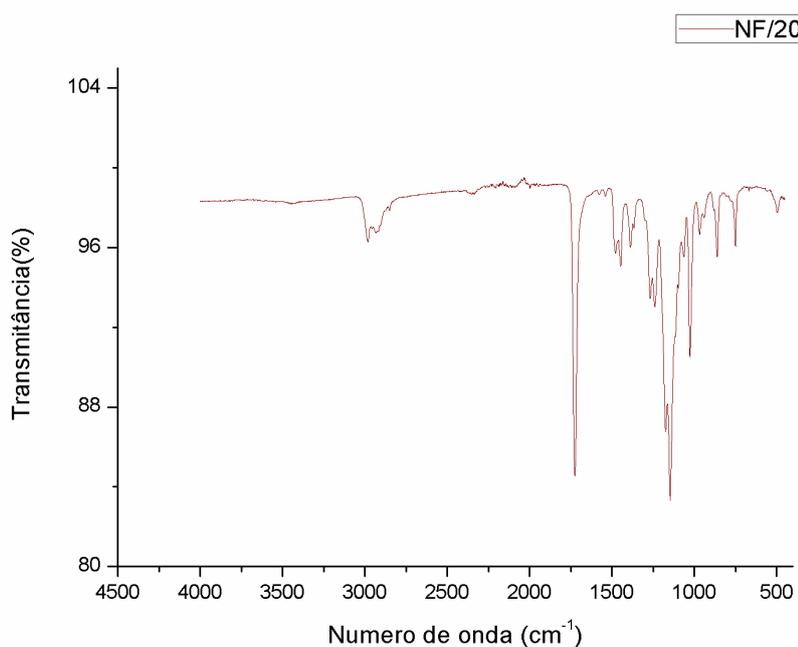
Figura 21 – Espectros de absorção no infravermelho para a NF/PEMA



Fonte: Elaborado pelo autor.

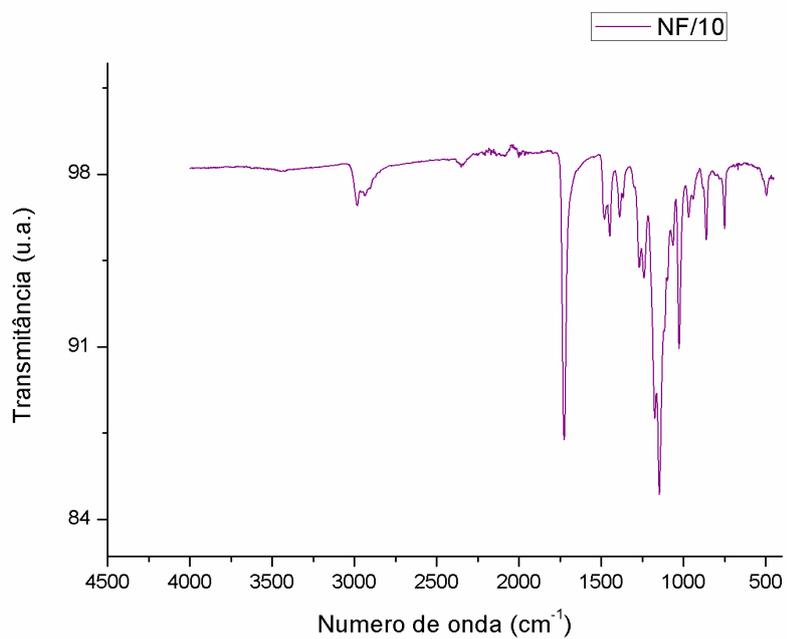
Na figura 21 podemos observar bandas características do PEMA : 2984, 1720, 1445 e 1143  $\text{cm}^{-1}$ .

Figura 22 – Espectros de absorção no infravermelho para a NF/20



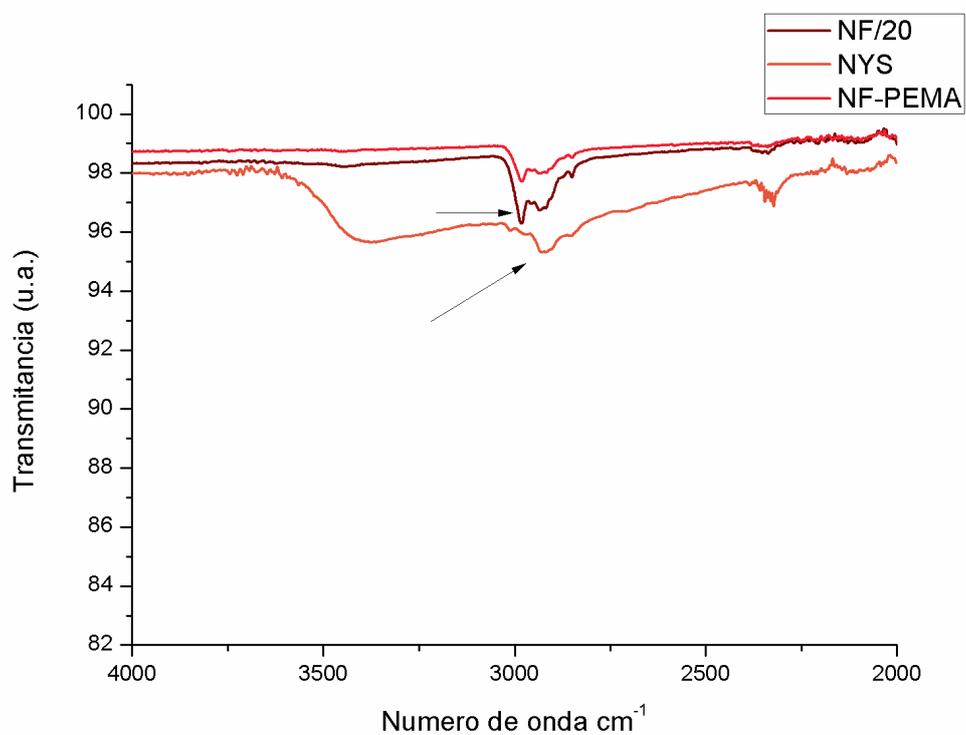
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 23 – Espectros de absorção no infravermelho para a NF/10



Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 24 – Espectros de absorção no infravermelho para as Nanofibras analisadas



Fonte: Elaborado pelo autor.

Na figura 24 observa-se um pico da curva da NYS pura em  $2919\text{ cm}^{-1}$  e um aumento de intensidade da curva do NF/20 nessa região, que não ocorre em NF/PEMA.

### **5.3 Teste de difusão em ágar**

No teste de inibição do crescimento por meio da difusão em ágar pode-se verificar a não formação do halo inibição em nenhuma das amostras testadas independentemente do tipo de resina ou concentrações ou período analisado.

## 6 DISCUSSÃO

O estudo em questão foi desenvolvido com o objetivo de preencher a lacuna existente quanto a um método eficaz no tratamento de infecções orais causadas por *C. albicans*, tendo em vista sua alta prevalência e incidência (Webb et al., 1998) onde a frequência das administrações fosse reduzida e a dependência do paciente fosse menor.

Tendo isso em vista optou-se por desenvolver um sistema, compatível com o material usado para o reembasamento de bases de próteses removíveis totais ou parciais, que permitiria a liberação lenta do fármaco de escolha em mucosa oral, utilizando para isso o processo de eletrofiação. Por meio desse processo faz-se possível a produção de mantas não tecidas de fibras em escala nanométrica que apresentam como vantagem sua grande área de superfície e maleabilidade (Huang et al., 2003), além de ser um processo relativamente simples e eficiente na encapsulação de fármacos.

Nesse sentido, o presente estudo centrou-se na síntese, caracterização e atividade antimicrobiana de nanofibras de Polietilmetacrilato (PEMA) com Nistatina (NYS). O PEMA apresenta uma boa resistência mecânica, alta transparência, elasticidade e boa adesão (Reiter et al; 2009). O antifúngico de escolha foi a Nistatina que pertence a classe de poliênicos de amplo espectro de ação, amplamente indicada para o tratamento de infecções causadas por *C. albicans* (Tavares et al.,2001).

O primeiro passo do foi encontrar a concentração inibitória mínima (CIM) da NYS contra o microrganismo *C.albicans*, onde foi encontrada a concentração de 0,019 mg/mL. Optou-se por utilizar, nas soluções que seriam eletrofiadas, as concentrações 20 mg/mL e 10 mg/mL, para as soluções 1 e 2 respectivamente aproximadamente 1000 e 500 vezes maior que a CIM. A concentração de 20 mg/mL foi escolhida por ser a mesma do antifúngico comercial Micostatin, além disso, foi escolhido um valor acima do CIM pois, não há base científica quanto a liberação de medicamento *in situ* para nanofibras utilizando como base o PEMA com adição de NYS.

Sabe-se que o processo de eletrofiação depende de alguns parâmetros como: fluxo da solução, a diferença de potencial que gera o campo eletromagnético, a distância da ponta da agulha ao coletor e o diâmetro da agulha (Costa et al., 2012;

Huang et al., 2003), além da umidade, temperatura, viscosidade. A variação desses parâmetros acaba por influenciar de forma direta a morfologia das fibras obtidas.

Com o objetivo de se otimizar a produção das fibras alguns parâmetros foram alternados. Optou-se por variar a distância da ponta da agulha ao anteparo (10,12 e 15 cm) e da diferença de potencial (inicialmente em 10,13 e 15 KV), mantendo fixos o diâmetro da agulha em 0,7 mm<sup>2</sup> e o fluxo da solução em 0,05 mL/h baseados em estudo piloto.

A solução de PEMA puro foi preparada dissolvendo o polímero em dimetilformamida e tetracloroetano seguindo a proporção de acordo com Bao et al. (2012) porém em seu artigo o polímero utilizado foi o Polimetilmetacrilato. A solução de PEMA ficou muito viscosa e não foi possível seguir para o processo de eletrofiação, então dissoluções seriadas foram realizadas para que a solução ficasse mais fluida. Após atingir a homogeneidade a solução foi eletrofiada gerando 9 amostras.

Ao observar as micrografias em MEV (Figura 7) é possível notar que todas as amostras resultaram na formação de fibras que se apresentaram uniformes e com a ausência de *beads*. O diâmetro das fibras variou entre 0,42 a 1,33 µm (Tabela 1). A amostra padrão escolhida foi a 2, com tensão aplicada de 10Kv e distância da ponta da agulha ao anteparo de 12 cm, pois apresentou o menor diâmetro com 0,42 µm (Tabela 2), mais volumosa e uniforme (Figura 7). Essa amostra foi escolhida para os testes de caracterização físico- química (NF/PEMA), sendo produzida em maior quantidade com auxílio do coletor rotatório (300 rpm) durante 10 horas, o que resultou em mantas de nanofibras desalinhasadas.

A solução 1 foi preparada em duas etapas: a primeira foi a dissolução do PEMA e após alcançar a homogeneidade, após 24 horas no agitador magnético, a NYS foi adicionada até atingir a concentração de 20 mg/mL. Em seguida o processo de eletrofiação foi iniciado. Devido à adição da NYS a solução se tornou mais viscosa e, atribui-se a isto, o fato de não ter sido possível a eletrofiação com 10 KV, então optou-se por aumentar os valores de tensão resultando em 12 amostras finais.

Como pode ser observado na Figura 8 algumas amostras resultaram em fibras com irregulares e com descontinuidade (amostras 1, 2, 3, 4, 8, 10, 11 e 12). A Tabela 3 mostra que o diâmetro dessas fibras variou de 1,14 a 4,7 µm. A amostra padrão, escolhida para testes posteriores, foi a 7 (NF/20) com o menor diâmetro e variância (Tabela 4) com 18 Kv e 12 cm.

A solução 2, com adição de NYS, também foi preparada em duas etapas, porém a NYS foi adicionada na concentração de 10 mg/mL. Visualmente apresentou-se menos viscosa que a solução 1 (menor quantidade de NYS) porém mais viscosa que a solução de PEMA puro.

A eletrofiação ocorreu variando os mesmos parâmetros da solução 1, totalizando quatro tensões avaliadas (13, 15, 18 e 20 Kv) e três distâncias (10, 12 e 15) gerando 12 amostras. De acordo com a Figura 9, fibras foram produzidas em todas as amostras, porém nas amostras 4 e 7 é possível observar algumas descontinuidades. O diâmetro médio das fibras variou entre 0,87 a 1,66  $\mu\text{m}$  conforme Tabela 5. A amostra 2 foi escolhida como amostra padrão (NF/10) pois obteve o menor diâmetro, 0,87  $\mu\text{m}$ , com a tensão de 15 Kv e 10 cm de distância da ponta da agulha ao coletor.

De acordo com a literatura, a viscosidade da solução influencia de forma direta no processo eletrofiação afetando o diâmetro médio das fibras produzidas. Uma solução polimérica de alta viscosidade produzirá fibras com maior diâmetro. Outro fator que exerce grande influência no processo é a tensão aplicada na ponta da agulha, quanto maior seu valor, o jato de solução apresentará um maior volume e, por consequência, um maior diâmetro final (Huang et al., 2003; Rutledge, Fridrikh, 2007; Costa et al., 2012).

Isto justifica o aumento do valor dos diâmetros das fibras do presente estudo que foi proporcional ao aumento de viscosidade das soluções. Para a solução 1 (mais viscosa) o padrão escolhido apresentou uma média de diâmetro de 1,14  $\mu\text{m}$  enquanto a solução 2 foi de 0,87 e a de PEMA puro de 0,47. O mesmo ocorreu quanto a tensão já que para a solução mais viscosa a tensão ideal foi de 18 Kv enquanto que para as outras foi de 15 Kv.

A análise do ângulo de contato é um importante parâmetro termodinâmico do material, consiste no ângulo formado entre a fase sólida e a tangente formada na interface líquido/ar (Wulf et al, 1999). O ângulo pode variar de acordo com a característica do material estudado, para  $\theta = 0$  a superfície pode ser considerada hidrófila, para ângulos entre 0 e 90 é considerado predominantemente hidrófila, para ângulos entre 90 e 180 a superfície é predominantemente hidrófoba e, se for igual a 180, é totalmente hidrófoba (Kwok, Neumann, 1999). Esses valores variam de acordo com o estado topográfico do material estudado e do nível de interação com o líquido

utilizado no teste (Oh et al., 2002).

As amostras analisadas apresentaram o mesmo comportamento, não tiveram diferença estatisticamente significativa, sendo assim, todas foram consideradas predominantemente hidrofóbicas como demonstrado na Tabela 7. Essa análise coincide com as características do material base utilizado para síntese das fibras, o PEMA, que é um polímero com características hidrofóbicas (Cerveira Netto, 1987). A adição de NYS em duas das amostras estudadas acabou por não afetar essa característica já que a maior parte da fibra é constituída de polímero.

O padrão da análise de DRX para a NF/PEMA é demonstrado na Figura 17, não apresenta linhas de difração acentuadas e a área de espalhamento sugere a presença de natureza amorfa. Segundo Fares (2012) o PEMA é caracterizado por essa natureza amorfa, pois possui uma estrutura não cristalina. Sakeer e colaboradores (2010) relatam que a NYS possui caráter cristalino. Na figura 20 pode-se observar os três padrões gerados no DRX para as fibras em questão, a curva da NF/20 apresenta uma maior tendência a um caráter cristalino sugerindo a presença da NYS.

A espectroscopia FTIR é importante na investigação da estrutura polimérica, por que fornece informações sobre os constituintes moleculares. A Figura 21 mostra os espectros FTIR para a NF/PEMA onde foi possível identificar bandas de transmitância 2984, 1720, 1445 e 1143  $\text{cm}^{-1}$  que são características do PEMA. De acordo com Sundaresan e colaboradores (2014) a banda vibratória 2984 é atribuída a ligação C-H do grupo metileno do PEMA, o alongamento C=O é observado na região de 1717  $\text{cm}^{-1}$ . A banda na região de 2982  $\text{cm}^{-1}$  é atribuída a ligação C-H (Rajendran et al., 2008).

As figuras 22 e 23 mostram os espectros de FTIR para as fibras NF/20 e NF/10 respectivamente, onde observa-se um deslocamento ao nível de intensidade quando comparadas a NF/PEMA o que sugere um predomínio do polímero nas fibras produzidas. Na figura 24 temos três curvas plotadas: a da NF/PEMA, NF/20 e da NYS pura. A NYS possui um pico em 2919  $\text{cm}^{-1}$ , que segundo Mandru e colaboradores (2011), representa a vibração do grupo CH<sub>2</sub>. Nessa região observa-se um aumento na intensidade da curva da NF/20, que não é observado em NF/PEMA, sugerindo a presença de NYS em NF/20.

No teste de difusão em ágar não houve a formação do halo de inibição em

nenhuma amostra estudada. Acredita-se que isso tenha ocorrido devido à baixa concentração de NYS presente na amostra, tendo em vista que o fluxo utilizado durante o processo de eletrofiação foi de 0,05 mL/h. Para a confecção das amostras foi necessário produzir uma manta não tecida para cada tipo de fibra estudada, a produção da manta durava cerca de 10 horas que resultou em 0,5 mL o que acabou diminuindo a concentração em massa da NYS no corpo de prova em relação ao PEMA. Um estudo piloto demonstrou que essa vazão produzia fibras sem defeitos e, portanto, adequada para a produção do produto.

Propõe-se para estudos futuros a diminuição da concentração de PEMA na solução para que seja possível aumentar a concentração de NYS. Outra alternativa seria utilizar polímeros biodegradáveis, como o Policaprolactano que é um poliéster alifático que se destaca pois tem a característica de se degradar lentamente e não liberar resíduos ácidos ou tóxicos (Woodruff, Hutmacher, 2010; Dash, Konkimalla, 2012), por essa razão, permite liberação controlada do fármaco.

## 7 CONCLUSÃO

Com base na proposta desse estudo pode-se concluir que:

- A concentração inibitória mínima da NYS para inativação de *C. albicans* foi de 0,019 mg/mL;

- A diferença de potencial e a distância da ponta da agulha ao anteparo afetaram de forma direta na morfologia das fibras assim como a viscosidade da solução;

- As caracterizações físico- químicas mostraram que as fibras apresentam um caráter hidrofóbico, demonstraram a presença do PEMA e sugeriram a presença da NYS;

- A atividade antimicrobiana mostrou que as fibras não inibiram o crescimento de *C. albicans*.

## REFERÊNCIAS\*

- Ahmed FE, Lalia BS, Hashaike R. A review on electrospinning for membrane fabrication: challenges and applications. *Desalination*. 2015;356:15-30.
- Arendorf TM, Walker DM. Oral candida populations in health and disease. *Br Dent J*. 1979;147(10):267-72.
- Arulsankar A, Kokila GP, Banulakshmi S, Jayanthi S, Sundaresan B. FTIR, XRD and AC Impedance Studies of the Polymer Electrolyte PEMA – KSCN added with SrTiO<sub>3</sub>. *Int J Chem Tech Res*. 2014;6(13):5366-71.
- Banting DW, Greenhorn PA, McMinn JG. Effectiveness of a topical antifungal regimen for the treatment of oral candidiasis in older, chronically ill, institutionalized, adults. *J Can Dent Assoc*. 1995;61(3):199-200.
- Bao Y, Luu QAN, Zhao LY, Fong H, May OS et al. Upconversion polymeric nanofibers containing lanthanide-doped nanoparticles via electrospinning. *Nanoscale*. 2012;4:7369-75. doi: 10.1039/c2nr32204h
- Bates JF, Smith DC. Evaluation of indirect resilient liners. *J Am Dent Assoc*. 1965;70(2):344-53.
- Borges ALS, Munchow EA, de Oliveira Souza ACO, Yoshida T, Vallittu PK, Bottino MC. Effect of random/aligned nylon-6/MWCNT fibers on dental resin composite reinforcement. *J Mech Behav Biomed Mater*. 2015;48:134–44. doi: 10.1016/j.jmbbm.2015.03.019
- Budtz-Jorgensen E. The significance of *Candida albicans* in denture stomatitis. *Scan J Dent Res*. 1974;82(2):151-90.
- Cacciotti I, Fortunati E, Puglia D, Kenny JM, Nanni F. Effect of silver nanoparticles and cellulose nanocrystals on electrospun poly(lactic) acid mats: Morphology, thermal properties and mechanical behavior. *Carbohydrate Polymers*. 2014;103:22-31. doi: 10.1016/j.carbpol.2013.11.052
- Casemiro LA, Gomes Martins CH, Pires-de-Souza F de C, Panzeri H. Antimicrobial and mechanical properties of acrylic resins with incorporated silver-zinc zeolite - part I. *Gerodontology*. 2008;25(3):187-94. doi: 10.1111/j.1741-2358.2007.00198
- Cerveira Netto H. *Prótese total imediata*. São Paulo: Editora Pancast; 1987.
- Chandra J, Kuhn DM, Mukherjee PK, Hoyer LL, McCormick T, Ghannoum MA. Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: development, architecture, and drug resistance. *J Bacteriol*. 2001a;183:5385-94.

\* 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](http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html)

Chandra J, Mukherjee PK, Leidich SD, Faddoul FF, Hoyer LL, Douglas LJ, et al. Antifungal resistance of candidal biofilms formed on denture acrylic in vitro. *J Dent Res.* 2011b;80(3):903-8.

Cheng ML, Lin CC, Su HL, Chen PY, Sun YM. Processing and characterization of electrospun poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) nanofibrous membranes. *Polymer.* 2008;49(2):546-53. doi: 10.1016/j.polymer.2007.11.049\_

Chow CK, Matear DW, Lawrence HP. Efficacy of antifungal agents in tissue conditioners in treating candidiasis. *Gerodontology.* 1999;16(2):110-8.

Costa RGF, Oliveira JE, Paula GF, Picciani PHS, Medeiros ES, Ribeiro C, Mattoso LHC. Eletrofiacção de polímeros em solução. Parte II: aplicações e perspectivas. *Polímeros.* 2012;22(2):178-85. doi: 10.1590/S0104-14282012005000026

Dash TK, KonkimallaVB. Poly- $\epsilon$ -caprolactone based formulations for drug delivery and tissue engineering: a review. *J Control Release.* 2012;158:15–33. doi: 10.1016/j.jconrel.2011.09.064

Dias AP, Samaranayake LP, Lee MT. Miconazole lacquer in the treatment of denture stomatitis: clinical and microbiological findings in Chinese patients. *Clin Oral Investig.* 1997;1(1):47-52.

Dorko E, Jenca A, Pilipcinec E, Danko J, Svicky E, Tkacikova L. Candida associated denture stomatitis. *Folia Microbiol.* 2001;46:443–6.

Dzenis YA. Spinning Continuous Fibers for Nanotechnology. *Science.* 2004;304:1917-19.

Emami E, Grandmont P, Rompré PH, Barbeau J, Pan S, Feine JS. Favoring trauma as an etiological factor in denture stomatitis. *J Dent Res.* 2008;87(5):440-4.

Fares S. Influence of gamma-ray irradiation on optical and thermal degradation of poly(ethyl-methacrylate) (PEMA) polymer. *Nat Sci.* 2012;4(7):499-507. doi: 10.4236/ns.2012.47067

Feitosa MAL, Vasconcelos LMR, Garcia RCMR, Cury AADB. Efeito dos limpadores químicos de próteses sobre o peso de reembasador resiliente temporário. *RPG Rev Pós Grad.* 2003;10(3):199-203.

Gendreau L, Loewy ZG. Epidemiology and etiology of denture stomatitis. *J Prosthodont.* 2011;20(4):251-60. doi: 10.1111/j.1532-849X.2011.00698.x.

Guerrini LM, Branciforti MC, Bretas RES, Oliveira MP. eletrofiacao do Poli(alcool vinilico) via solucao aquosa. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*. 2006(4);16:286-93.

He XY, Meurman JH, Kari K, Rautemaa R, Samaranayake LP. In vitro adhesion of *Candida* species to denture base materials. *Mycoses*. 2006;49(2):80-4.

Heikkilä P, Harlin A. Parameter study of electrospinning of Polyamide- 6. *Eur Polymer J*. 2008;44(10):3067-79.

Huang ZM, Zhang YZ, Kotaki M, Ramakrishna S. A Review on Polymers Nanofibers by Electrospinning and Their Applications in Nanocomposites. *Comp Sci Tech*. 2003;63(15):2223-53.

Jorge AOC. *Microbiologia bucal*. 2. ed. São Paulo: Santos, 1998. 122 p.

Krammer RK. Tissue conditioners. *J Prosthet Dent*. 1971;25(3):244-50.

Kulak Y, Arikan A, Delibalta N. Comparison of three different treatment methods for generalized denture stomatitis. *J Prosthet Dent*. 1994;72:283-8.

Kwok DY, Neumann AW. Contact angle measurement and contact angle interpretation. *Adv Colloid Interface Sci*. 1999 Sep;81(3):167-249. doi: 10.1016/S0001-8686(98)00087-6.

Lan T, Shao Z, Wang J, Ga M. Fabrication of hydroxyapatite nanoparticles decorated cellulose triacetate nanofibers for protein adsorption by coaxial electrospinning. *Chemical Engineering Journal*. 2015;260:818-25. doi

Lefebvre CA, Wataha JC, Cibirka RM, Schuster GS, Parr GR. Effects of triclosan on the cytotoxicity and fungal growth on a soft denture liner. *J Prosthet Dent*. 2001;85:352-56. doi: 10.1067/mpr.2001.115249

Li D, Xia Y. Electrospinning of nanofibers: reinventing the wheel? *Adv Mater*. 2004;16(14):1151–70. doi: 10.1002/adma.200400719

Mandru M, Ciobanu C, Ignat ME, Popa M, Verestiuc L, Vlad S. Sustained release of nystatin from polyurethane membranes for biomedical applications. *Dig J Nanomater Biostruct*. 2011;6( 3):1227-38.

Matsuura T, Abe Y, Sato Y, Okamoto K, Ueshige M, Akagawa Y. Prolonged antimicrobial effect of tissue conditioners containing silver zeolite. *J Dent*. 1997;25(5): 373-7.

McCullough MJ, Ross BC, Reade PC. *Candida albicans*: a review of its history, taxonomy, epidemiology, virulence attributes, and methods of strain differentiation. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 1996;25(2):136-44.

Mima EG, Pavarina AC, Neppelenbroek KH, Vergani CE, Spolidorio DM, Machado AL. Effect of different exposure times on microwave irradiation on the disinfection of a hard chairside reline resin. *J Prosthodont*. 2008;17(4):312-7.

Mishra NN, Prasad T, Sharma N, Payasi A, Prasad R, Gupta DK et al. Pathogenicity and drug resistance in *Candida albicans* and other yeast species. A review. *Acta Microbiol Immunol Hung*. 2007;54(3):201-35.

Muzyka BC. Oral fungal infections. *Dent Clin North Am*. 2005;49(1):49-65.

Nair RG, Samaranayake LP. The effect of oral commensal bacteria on candidal adhesion to denture acrylic surfaces: An in vitro study. *APMIS*. 1996;104(1-6):339-49.

Newton AV. Denture sore mouth, a possible aetiology. *Br Dent J*. 1962;112:357-60.

Nikawa H, Iwanaga H, Kameda M, Hamada T. In vitro evaluation of *Candida albicans* adherence to soft denture-lining materials. *J Prosthet Dent*. 1992;68(5):804-808.

Oh WS, Shen C, Alegre B, Anusavice KJ. Wetting characteristic of ceramic to water and adhesive resin. *J Prosthet Dent*. 2002;88(6):616-21.

Olsen I, Stenderup A. Clinical-mycologic diagnosis of oral yeast infections. *Acta Odontol Scand*. 1990;48(1):11-8.

Pereira-Cenci T, Del Bel Cury AA, Crielaard W, Tem Cate JM. Development of candida-associated denture stomatitis: new insights. *J Appl Oral Sci*. 2008;16(2):86-94.

Rajendran S, Ramesh Prabhu M, Usha Rani M. Characterization of PVC/PEMA Based Polymer Blend Electrolytes. *Int J Electrochem. Sci*. 2008;(3):282-90.

Reiter J, Krejza O, Sedlarikova M. *Solar Energy Mater. Solar Cells*. 2009;93:249-55.

Rossi S, Sandri G, Caramella CM. Buccal drug delivery: A challenge already won? *Drug Discov Today Technol*. 2005;2(1):59-65. doi: 10.1016/j.ddtec.2005.05.018.

Rutledge GC, Fridrikh SV. Formation of fibers by electrospinning. *Adv Drug Deliv Rev*. 2007;59(14):1384-91.

Sakeer K, Al-Zein H, Hassan I, Desai S, Nokhodchi A. Enhancement of dissolution of nystatin from buccoadhesive tablets containing various surfactants and a solid dispersion formulation. *Arch Pharm*. 2010;33(11):1771-9.

Salerno C, Pascale M, Contaldo M, Esposito V, Busciolano M et al. Candida-associated denture stomatitis. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2011;16(1):139-43.

Salim N, Moore C, Silikas N, *Silikas N*, Satterthwaite J, Rautemaa R. Candidacidal effect of fluconazole and chlorhexidine released from acrylic polymer. *J Antimicrob Chemother.* 2013;68(3):587–92. doi: 10.1093/jac/dks452.

Scholz AO, Wolff A, Schumacher A, Giannola LI, Campisi G, Ciach T, et al. Drug delivery from the oral cavity: focus on a novel mechatronic delivery device. *Drug Discov Today.* 2008;13(5-6):247-53. doi: 10.1016/j.drudis.2007.10.018.

Sill TJ, Recum HA. Electrospinning: Applications in drug delivery and tissue engineering. *Biomaterials.* 2008;29(13):1989-2006. doi: 10.1016/j.biomaterials.2008.01.011.

Shukla S, Brinley E, Cho HJ, Seal S. Electrospinning of hydroxipropyl cellulose fibers and their application in synthesis of nano and submicron tin oxide fibers. *Polymer.* 2005;46(26):12130-45. doi: 10.1016/j.polymer.2005.10.070

Tavares W. Manual de antibióticos e quimioterápicos antiinfeciosos. Rio de Janeiro: Atheneu; 2001.

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

Ten Cate AN. Histologia Oral. 8 ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2013.

Teo WE, Ramakrishna S. A review on electrospinning design and nanofibre assemblies. *Nanotechnology.* 2006;17(14):89-106.

Truhlar MR, Shay K, Sohnle P. Use of a new assay technique for quantification of antifungal activity of nystatin incorporated in denture liners. *J Prosthet Dent.* 1994;71(5):517-24.

Urban VM, de Souza RF, Arrais CA, Borsato KT, Vaz LG. Effect of the association of nystatin with a tissue conditioner on its ultimate tensile strength. *J Prosthodont.* 2006;15(5):295-9. doi: 10.1111/j.1532-849X.2006.00130.x

Wady AF, Machado AL, Zucolotto V, Zamperini CA, Berni E, Vergani CE. Evaluation of *Candida albicans* adhesion and biofilm formation on a denture base acrylic resin containing silver nanoparticles. *J Appl Microbiol.* 2012;112(6):1163-72. doi: 10.1111/j.1365-2672.2012.05293.x.

Webb BC, Thomas CJ, Willcox MDP, Harty DWS, Knox KW. *Candida*-associated denture stomatitis. Aetiology and management: a review. Part 3. Treatment of oral candidosis. *Aust Dent J.* 1998;43(4):244-9.

Wilson J. The aetiology, diagnosis and management of denture stomatitis. *Br Dent J.* 1998;185(8):380-4. doi: 10.1038/sj.bdj.4809821.

Woodruff M.A., Hutmacher D.W. The return of a forgotten polymer– polycaprolactone in the 21st century. *Prog Polym Sci.* 2010;35(10):1217–56.

Wulf M, Michel S, Grundke K, del Rio Ol, Kwok DY, Neumann AW. Simultaneous Determination of Surface Tension and Density of Polymer Melts Using Axisymmetric Drop Shape Analysis. *Colloid and Interface Science*. 1999;210(1):172–81.

Zhang Y, Chan HF, Leong KW. Advanced materials and processing for drug delivery: The past and the future. *Adv Drug Deliv Rev*. 2013;65(1):104-12. doi: 10.1016/j.addr.2012.10.003.