



**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOFOTÔNICA APLICADA ÀS CIÊNCIAS
DA SAÚDE**

ALEXANDRE BERGAMO MORAES

**AVALIAÇÃO DA FORMAÇÃO DE BIOFILME SOBRE RESINA ODONTOLÓGICA
IRRADIADA COM 403 NM CONTENDO NANOPARTÍCULAS DE PRATA**

**São Paulo, SP
2020**



ALEXANDRE BERGAMO MORAES

**AVALIAÇÃO DA FORMAÇÃO DE BIOFILME SOBRE RESINA ODONTOLÓGICA
IRRADIADA COM 403 NM CONTENDO NANOPARTÍCULAS DE PRATA**

Tese apresentada à Universidade Nove de Julho, para obtenção do título de Doutor em Biofotônica Aplicada às Ciências da Saúde.

Orientador Prof. Dr. Andrey Jorge Serra

**São Paulo, SP
2020**

Moraes, Alexandre Bergamo.

Avaliação da formação de biofilme sobre resina odontológica irradiada com 403 NM contendo nanopartículas de prata. / Alexandre Bergamo Moraes. 2020.

44 f.

Tese (Doutorado) – Universidade Nove de Julho - UNINOVE, São Paulo, 2020.

Orientador (a): Prof. Dr. Andrey Jorge Serra.

1. Nanopartículas de prata. 2. Resinas da base da dentadura. 3. Terapia fotodinâmica antimicrobiana. 4. Efeito antifúngico.

Serra, Andrey Jorge. II. Título.

CDU 615.831

São Paulo, 26 de março de 2020

TERMO DE APROVAÇÃO

Aluno (a): Alexandre Bergamo Moraes

Título da Tese: "Avaliação da formação de biofilme de candida albicans sobre resina odontológica para base de prótese contendo nanopartículas de prata e irradiada com LED – estudo in vitro".

Presidente: PROF. DR. ANDREY JORGE SERRA



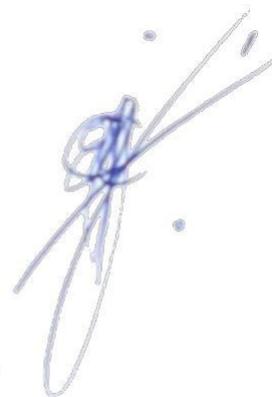
Membro: PROF. DR. RODRIGO LABAT MARCOS



Membro: PROFA. DRA. DANIELA DE FATIMA TEIXEIRA DA SILVA



Membro: PROF. DR. ERNESTO CESAR PINTO LEAL JUNIOR



Membro: PROFA. DRA. ILKA TIEMY KATO PRATES



AGRADECIMENTOS

Minha homenagem singular a Ricardo Bergamo. Jamais imaginei ir tão longe e sem a sua ajuda, aconselhamento e suporte, esse sonho não seria possível. Você sempre foi minha inspiração e te agradeço profundamente por todos os ensinamentos dentro e fora da profissão.

Agradeço à minha família, em especial à minha mãe Clarisse Bergamo Moraes e a minha esposa Marcia Fonseca Calmon de Passos, por todo o suporte e apoio.

Agradeço ao meu orientador Prof. Dr. Andrey Jorge Serra por toda ajuda e paciência que teve comigo durante este período, ele foi um ótimo orientador e parceiro. Fico muito lisonjeado de tê-lo como mestre.

Agradeço ao Prof. Dr. Renato Araújo Prates e ao Prof. Dr. Rodrigo Labat Marcos pela ajuda e colaboração no projeto.

Agradeço a Universidade Nove de Julho por proporcionar um curso tão qualificado, com excelentes professores e conteúdos administrados em aula.

Agradeço a todos os meus colegas da UNINOVE por colaborar comigo e me apoiar.

Agradeço as alunas de iniciação científica pela ajuda durante os experimentos.

Agradeço às funcionárias do laboratório da UNINOVE pela ajuda e colaboração.

RESUMO

A resina acrílica utilizada na construção de próteses orais é altamente colonizada por *Candida albicans*. A dificuldade na higiene, especialmente das próteses tipo protocolo parafusadas sobre implantes, favorece o aparecimento da candidíase oral. Este trabalho in vitro, avaliou o efeito antifúngico da incorporação de nanopartículas de prata (AgNPs) em amostras de resina acrílica de metil metacrilato irradiadas por luz LED e também as propriedades mecânicas deste novo material. As AgNPs foram sintetizadas pela redução do nitrato de prata e boroidreto de sódio em solução aquosa. As amostras impregnadas com as AgNPs, foram obtidas através de matrizes metálicas cilíndricas nas dimensões de 12 mm de diâmetro por 3 mm de altura. A solução contendo as AgNPs foi adicionada ao componente líquido da resina acrílica nas concentrações de 0% (0 ml), como controle e 2% (0,75 ml), 4% (1,5 ml) e 8% (3 ml), baseadas na massa de 28 g (38 ml) do polímero da resina. Essa mistura foi incluída em moldes de silicone e prensadas em mufla. As amostras foram infectadas por cepas de *Candida albicans* e o grupo 4 foi irradiado com uma fonte de luz LED de 403nm em três tempos diferentes, 60, 180 e 300 s, para avaliar seu efeito sobre as AgNPs. Testes mecânicos de elasticidade também foram realizados. **Conclusão:** Com as concentrações de AgNPs utilizadas, não aconteceram alterações antifúngicas em nenhum dos grupos, nem mesmo naqueles onde as amostras foram tratadas com a luz LED. Mecanicamente, o grupo impregnado com 2% de AgNPs mostrou discreto aumento do módulo de elasticidade.

Palavra-chave: nanopartículas de prata, resina da base das dentaduras, terapia fotodinâmica antimicrobiana, efeito antifúngico.

ABSTRACT

The acrylic resin used in the construction of oral prostheses is highly colonized by *Candida albicans*. The difficulty in hygiene, especially of the prostheses type protocol bolted on implants, favors the emergence of oral candidiasis. This study evaluated the in vitro antifungal effect of incorporation of nanoparticles of silver (AgNPs) in samples of acrylic resin of methyl methacrylate irradiated by LED light and also the mechanical properties of this new material. The AgNPs were synthesized by the reduction of silver nitrate and sodium borohydride in aqueous solution. The samples impregnated with the AgNPs, were obtained by means of cylindrical metal matrices in the dimensions of 12 mm in diameter by 3 mm in height. The solution containing the AgNPs was added to the liquid component of acrylic resin in concentrations of 0% as control, 2%, 4% and 8%, based on the mass of the polymer resin. This mixture was included in silicone molds and pressed in muffle. The samples were infected with strains of *Candida albicans* and the group with 8% was irradiated with a LED light source of 403nm at three different times, 60, 180 and 300 seconds, to evaluate its effect on the AgNPs. Mechanical tests of elasticity were also performed. Conclusion: With the concentrations of AgNPs used, there were no changes in any of the antifungal groups, even those where the samples were treated with the LED light. Mechanically, the group impregnated with 2% of AgNPs showed a slight increase in the Modulus of elasticity.

Keyword: silver nanoparticles, denture base acrylic, photodynamic therapy, antifungal effect.

LISTA DE ABREVIATURAS

%	Porcentagem
°C	Graus Célsius
µL	Microlitros
Ag	Prata
AgNPs	Nanopartículas de prata
Au	Ouro
<i>C. albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
cm ²	Centímetro quadrado
Cu	Cobre
ADD	Aproximação Dipolar Discreta
g	Gramma
h	Hora
Hz	Hertz
J	Joule
J/cm ²	Joule por centímetro quadrado
L	Litro
LED	Diodo emissor de luz
Log	Logaritmo
MET	Microscopia Eletrônica de Transmissão
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
min	Minuto
mL	Mililitro
mW	Miliwatt
mW/cm ²	Miliwatt por centímetro quadrado
nm	Nanometro
NP	Nanopartícula
O	Oxigênio
PBS	Solução salina tamponada com fosfato
PDT	Terapia fotodinâmica antimicrobiana
PMMA	Polimetacrilato de metila

ppm	Parte por milhão
ROS	Espécies reativas de oxigênio
s	Segundo
SH	Tiol
SOD	Superóxido-dismutase
SPR	Superfície de ressonância plasmônica
UFC	Unidades formadoras de colônia

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Inserção das matrizes em silicona	23
Figura 2 - Manipulação da resina acrílica.....	24
Figura 3 - Prensagem da resina acrílica.....	25
Figura 4 – Termopolimerizadora	25
Figura 5 - Os grupos dos corpos de prova para ensaios microbiológicos e biomecânicos.	26
Figura 6 - Desenvolvimento da suspensão fúngica sobre as amostras.....	28
Figura 7 - Diluição seriada.....	29
Figura 8 – Ensaio de módulo de elasticidade.....	30
Figura 9 - Modo fundamental de vibração planar utilizado para amostras em forma de disco. As regiões em azul representam os pontos em que a amplitude de vibração é mínima, enquanto as regiões em vermelho representam as regiões em que a amplitude de vibração é máxima.....	31
Figura 10 - Ensaio de módulo de elasticidade nas amostras. (Fonte: Autor)	32
Figura 11 - Gráfico da relação entre a amplitude e frequência entre os diferentes corpos de prova.....	32
Figura 12 - Módulo elástico dos corpos de prova de materiais associados ou não com nanopartículas de prata.....	35
Figura 13 - contabilização das UFC	36
Figura 14 – Crescimento microbiano Log 10 (UFC/ml)	36

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Parâmetros do LED utilizado nos experimentos (Dispositivo: protótipo criado pela Universidade Nove de Julho).....	29
Tabela 2 - Tamanho das nanopartículas de prata pelo valor da largura a meia altura da banda de plásmons mais energética e por microscopia eletrônica de transmissão (TEM), além dos valores de comprimento de onda de máxima absorção da banda de plásmons.....	34

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 CONTEXTUALIZAÇÃO	13
2.1 Candida albicans e Candidíase Oral	13
2.2 Candidíase Oral e Polimetacrilato de metila	13
2.3 Polimetacrilato de metila e Nanopartículas de Prata	16
2.4 Luz e Nanopartículas de Prata	18
3 OBJETIVOS	21
3.1 Objetivos gerais	21
3.2 Objetivos Específicos	21
4 MATERIAIS E MÉTODOS	22
4.1 Síntese das nanopartículas de prata (Melo Jr. et al., 2012)	22
4.2 Confecção das amostras de resina	23
4.2.1 Inclusão das Matrizes em Mufla Metálica	23
4.2.2 Prensagem	24
4.2.3 Desinclusão e Acabamento	26
4.2.4 Padronização da Rugosidade.....	26
4.2.5 Esterilização	27
4.3 Análise microbiológica	27
4.3.1 C. albicans.....	27
4.3.2 Desenvolvimento da suspensão fúngica sobre as amostras	27
4.3.3 Aplicação da Luz	28
4.3.4 Quantificação do biofilme	29
4.4 Análise mecânica do Módulo de elasticidade	30
5 RESULTADOS	34
5.1 Síntese das nanopartículas de prata	34
5.2 Análise do módulo de elasticidade	34
5.3 Análise microbiológica	35
6 DISCUSSÃO	37
7 CONCLUSÃO	39
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	40

1 INTRODUÇÃO

O Polimetacrilato de metila (PMMA) é o material mais utilizado na fabricação de próteses bucais, especialmente dentaduras. Em pacientes que usam esse tipo de prótese, aumenta o desenvolvimento da candidíase crônica pois a diminuição do fluxo de saliva e a dificuldade de higiene por conta da porosidade do material, estimulam o crescimento do fungo em biofilme. O tratamento para reduzir o número de *C. albicans* presentes deve ser direcionado tanto para a prótese como para a mucosa coberta por ela, no entanto, a remoção dos biofilmes de dentaduras é difícil devido à sua resistência aos tratamentos convencionais feitos através de antifúngicos sistêmicos e tópicos. Alternativas para estes tratamentos seriam não só a aplicação de Terapia fotodinâmica (do inglês photodynamic therapy, PDT), antimicrobiana utilizada no tratamento das lesões fúngicas existentes na boca como também a desinfecção das próteses as colocando em um forno micro-ondas tradicional de 450 watts por 3 minutos. Este procedimento é eficaz e pode ser utilizado como um método complementar de higiene das próteses.

O tratamento fica complicado quando a prótese total é do tipo protocolo, parafusada sobre implantes. A higiene na base da prótese é bem difícil porque ela fica assentada na gengiva do paciente suportada pelos implantes. Essas próteses são confeccionadas com o mesmo material plástico das dentaduras convencionais e por isso o biofilme formado sob elas se forma da mesma forma. O fato é que os protocolos só podem ser removidos da boca por um dentista e normalmente esse procedimento acontece semestralmente, o que agrava o aparecimento de infecções como a candidíase. Além disso, quando removidas, não podem ser desinfetadas no micro-ondas pois possuem uma infraestrutura metálica o que inviabiliza esse tipo de tratamento.

Surge então a necessidade de buscar alternativas para o tratamento das lesões nessas condições o que motivou o experimento em impregnar no plástico das próteses, nanopartículas de prata (AgNPs) devido a suas propriedades antimicrobianas e testar sua interação com uma luz LED para analisar um possível aumento dessas características.

2 CONTEXTUALIZAÇÃO

2.1 Candida albicans e Candidíase Oral

O gênero *Candida* spp. é constituído de aproximadamente 200 espécies diferentes, que vivem normalmente nos mais diversos nichos corporais, como orofaringe, cavidade bucal, dobras da pele, secreções brônquicas, vagina, urina e fezes. Entre as espécies que compõem esse gênero, a *Candida albicans* (*C. albicans*) apresenta maior relevância em função de sua taxa de prevalência em condições de normalidade e de doença (Chandra et al., 2001).

C. albicans está presente na microbiota bucal de 25 a 75% dos indivíduos saudáveis. A candidíase oral é uma infecção fúngica oportunista causada pelo organismo *C. albicans*. Apresenta-se clinicamente como uma infecção superficial localizada, aguda ou crônica, caracterizada pelo aparecimento de manchas brancas múltiplas e irregulares na mucosa da boca e língua. Os sintomas de infecção oral por *C. albicans* são dor, inflamação da mucosa oral, mau hálito, e fissuras dolorosas dos cantos da boca. Cerca de 40% a 70% dos pacientes sofrem de estomatite como resultado direto da infecção por *C. albicans*, o que pode comprometer sistema digestivo que se torna colonizado por leveduras (Santarpia et al., 1990; Nārhi et al., 1994).

2.2 Candidíase Oral e Polimetacrilato de metila

O polimetacrilato de metila (PMMA) é um polímero sintético termoplástico, opticamente transparente, resistente a impactos, leve, resistente à quebra, de fácil processamento, resistente a intempéries e a arranhões, inodoro e insípido. Outra característica marcante do acrílico é a seu alto grau de biocompatibilidade que faz com que ele tenha diversos usos na biomedicina e na odontologia. Devido à sua facilidade de processamento, ajuste preciso, estabilidade química no ambiente oral e custo baixo, o PMMA é o material mais utilizado na fabricação de próteses bucais, especialmente dentaduras. Em pacientes que usam esse tipo de prótese, aumenta o desenvolvimento da candidíase crônica (Akumru et al., 1992). As dentaduras agem como catalisadores para o início de candidíase, diminuindo o fluxo de saliva e pH sob a prótese e servindo como reservatório para proliferação dos organismos,

situação que é recorrente em pacientes que usam dentaduras continuamente dia e noite (Banting et al., 2001).

A estomatite associada ao uso de dentadura geralmente é causada por má higiene. (Budtz-Jorgensen, 1990), embora pode ser agravado por imunossupressão (por exemplo, doença HIV). A presença de uma prótese na mucosa oral, por si só altera as condições ambientais locais, devido à inacessibilidade de saliva e falta de limpeza mecânica pela língua. Dentaduras, portanto, atuam como reservatórios para o fungo crescer em biofilme. O tratamento para reduzir o número de *C. albicans* presentes deve ser direcionado tanto para a prótese como para a mucosa coberta por ela. (Davenport, 1970). No entanto, a remoção dos biofilmes de dentaduras é difícil devido à sua resistência aos tratamentos convencionais (Gilbert et al., 1997).

Na superfície do polimetacrilato de metila (PMMA), atuam fatores que regulam a adesão da *C. albicans*, em que se destacam a energia livre e aspereza de superfície (Moura et al., 2006). A energia livre na superfície regula a interação com elementos presentes no ambiente oral, tais como proteínas de parede celular de microrganismos e a saliva (Gocke et al., 2006). Além disso, a aspereza da sua superfície, devido a micro porosidades, aumenta a aderência de microrganismos que se tornam difíceis de remover por higienização mecânica ou química (Bollen et al., 1997; Radford et al., 1990), Radford et al., 1998; Verran et al., 1907). Embora o processo inicial de aderência da *C. albicans* tenha sido avaliado (Chandra et al., 2001; Kuhn et al., 2002), a influência das características de superfície de PMMA no desenvolvimento de biofilme permanece incerto. Quanto à relação entre *C. albicans* e a superfície de PMMA, um dos principais atributos da sua virulência é a sua capacidade de aderência formando comunidades conhecidas como biofilmes microbianos.

O desenvolvimento destas comunidades pode ser dividido em etapas sequenciais: adesão de microrganismos a uma superfície, colonização inicial, secreção de polissacarídeo extracelular com o desenvolvimento de uma estrutura matricial e a disseminação de células no biofilme (Sutherland et al., 2001). A complexidade estrutural do biofilme pode criar um gradiente de condições ambientais em que as células de *C. albicans* assume estados fisiológicos distintos. (Uppuluri et al., 2006). Enquanto nutriente das camadas superiores apresentam relativamente maior atividade metabólica, a deficiência de nutrientes de camadas basais mostra ter menor atividade metabólica (Ramage et al., 2001)

Embora é sabido que a estrutura tridimensional da matriz do biofilme oferece um arranjo complexo de microambientes, (Sutherland et al., 2001) estudos sobre o desenvolvimento de biofilmes de *C. albicans* em diferentes superfícies do biomaterial odontológico mostraram a complexidade destas estruturas microbiológicas porém, informações sobre o desenvolvimento das estruturas de biofilme permanece indefinido. (Chandra et al., 2001; Kuhn et al., 2002). Por isso, é importante avaliar este processo dinâmico de formação e desenvolvimento de biofilmes de *C. albicans* em materiais dentários protéticos para entender a patogenicidade e desenvolver tratamentos que controlem a proliferação da doença. (Da Silva et al., 2010)

A coloração de Gram é uma técnica simples de detecção destes fungos proporcionando um bom contraste com o material circundante. Uma vez confirmada a infecção por fungo, o tratamento tradicional é bimodal: em primeiro lugar, remover a fonte e, em segundo lugar, eliminar a infecção dos tecidos. Esses procedimentos incluem a melhoria da higiene oral e da prótese, remoção da dentadura no período noturno, o uso de antifúngicos sistêmicos ou tópicos e eventual substituição da dentadura. (Webb et al., 1998). Fundamentalmente, os pacientes devem manter uma adequada higiene oral da prótese, afim de reduzir a probabilidade de reinfecção. (Pires et al., 2002).

Os agentes antifúngicos tópicos como a nistatina, clorexidina e miconazol, embora sejam eficazes para aliviar os sintomas e sinais clínicos de infecção por

C. albicans, não necessariamente erradicam completamente o organismo (Kulak et al., 1994). O insucesso decorre, em parte, devido ao efeito diluente de saliva e aos movimentos da língua, o que reduz os agentes antifúngicos tópicos para concentrações não terapêuticas. Reinfecção após o tratamento antifúngico não é incomum e tem sido atribuída ao crescimento da cepa infectante original (Banting et al., 1995).

Terapia fotodinâmica (do inglês photodynamic therapy, PDT), antimicrobiana vem sendo utilizada no tratamento destas infecções fúngicas.

Esta terapia é baseada na interação de um fotossensibilizador não-tóxico com um determinado comprimento de onda de luz. Essa combinação, na presença de oxigênio, leva à formação de espécies reativas de oxigênio, que estimulam uma cascata de eventos biológicos que induzem a morte de microrganismos (Azizi et al., 2016). Porém, na PDT a maior eficácia é no combate às lesões existentes na boca que acabam por se tornarem recorrentes por conta da difícil irradicação do fungo

impregnado nas dentaduras

Embeber as dentaduras em soluções antifúngicas, em conjunto com tratamento antifúngico tópico, tem sido recomendada para evitar que isso ocorra. Embora as soluções antimicrobianas sejam eficazes *in vitro*, a embebição da dentadura em solução antifúngica em combinação com uma semana de terapia antifúngica tópica pode aliviar os sinais e sintomas de infecção por *C. albicans*, mas não erradicar o organismo da cavidade oral. Além disso as próteses totais podem ser desinfetadas colocando-as em um forno micro-ondas tradicional de 450 watts por 3 minutos. Esse procedimento é eficaz e pode ser utilizado como um método complementar de higiene das próteses (Banting et al., 2001).

2.3 Polimetacrilato de metila e Nanopartículas de Prata

As propriedades antimicrobianas de prata (Ag) são conhecidas desde a antiguidade. Seu mecanismo de ação é baseado na interação da prata com enzimas envolvidas no metabolismo bacteriano, causando a morte celular (Kwakye-Awuah et al., 2008). A Ag quando utilizada em nanopartículas promovem uma resposta tecidual bem tolerada e menos citotoxicidade. Nanopartículas de prata (AgNPs) apresentam forte atividade antimicrobiana contra bactérias gram-positivas e gram-negativas, incluindo cepas multirresistentes, fungos, vírus e parasitas, por isso recebem atenção no cenário alternativo de desenvolvimento de agentes antibacterianos (Kin et al., 2008; Lara et al., 2011, Monteiro et al., 2009). Nesse cenário, em comparação com antibióticos, as AgNPs possuem a vantagem de não induzir resistência antimicrobiana (de Lima et al., 2012).

A necessidade urgente e inevitável para o desenvolvimento de uma estratégia em impedir a aderência microbiana e a formação de biofilme sobre materiais odontológicos, faz do uso das AgNPs uma alternativa que deve ser profundamente estudada (Ahn et al., 2009; Burgers et al., 2009; Yang et al., 2014), especialmente no que diz respeito a sua incorporação na resina acrílica que produz a base de próteses totais, removíveis e protocolos parafusados sobre implantes a fim de evitar infecções fúngicas e bacterianas que se aproveitam da porosidade desse material para formar seu biofilme.

Pensando-se assim, a incorporação de AgNPs ao PMMA, poderia ser considerada como uma possível medida de prevenção para estomatite protética em

pacientes portadores de próteses com base em resina acrílica, uma vez que as mesmas apresentam baixa toxicidade às células humanas, possuem ação antimicrobiana em baixas concentrações (unidades mg/L) (Panáček et al., 2009; Panáček et al., 2006)

Em testes *in vitro*, esta incorporação mostrou-se eficaz no combate à formação de biofilme de *C. albicans* pois percebeu-se claramente as AgNPs enroladas ao redor das células fúngicas causando a ruptura da sua membrana e inibição do processo de brotamento normal. A análise microscópica de *C. albicans* presentes no biofilme dos espécimes de resina contendo 2% de nano-prata mostrou que a espessura média e percentagem de células dentro do biofilme, diminuíram significativamente e em amostras da resina contendo 5% de nano-prata, somente algumas células fúngicas foram encontrados promovendo inclusive a inibição de geração de tubos germinativos. (Zhe Li et al., 2014).

Quanto a possíveis alterações mecânicas das resinas contendo AgNPs, um estudo realizado por Fahimed et al., em 2014, mostra que ocorreu um aumento da condutividade térmica e da resistência à compressão da base de acrílico, porém diminuiu sua resistência à tração quando incorporação foi de 5 % da massa do polímero, sugerindo que novos estudos com proporções diferentes da mistura devem ser analisados para tentar melhorar esse inconveniente.

O mecanismo de ação inibitória dos íons de prata sobre os microrganismos acontece devido à sua interação eletrostática com o DNA das proteínas celulares contendo enxofre (especialmente o grupo tiol) carregando negativamente elementos da construção da membrana bacteriana. O grupo tiol (SH) possuem alta afinidade para íons de prata e a ação inibitória pode ser devido à redução da membrana celular pelas AgNPs. (Rahisuddin et al., 2015). A toxicidade AgNPs também tem sido associada com a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) e indução de stress oxidativo. (Jhonston et al., 2010)

As AgNPs quando em contato com biofilme de bactérias ou fungos são altamente capazes de se vincular com o SH das proteínas, devido a sua alta afinidade e alterar a sua estrutura original e propriedades (desnaturação). Os grupos SH são extremamente funcionais nos grupos antioxidantes, como a glutatona e superóxido-dismutase (SOD), tornando-se um ponto importante para o sistema de defesa antioxidante que ocorre devido à presença de íons de prata. O thiyl produzido pela reação entre os radicais tiol e as AgNPs é muito reativo com oxigênio, o que

produz outros radicais livres. Assim as AgNPs empobrecem os antioxidantes celulares e acumulam ROS sobre o biofilme (Jhonston et al., 2010). ROS são compostos altamente reativos que podem se ligar a moléculas biológicas (tais como a proteína, lipídios e DNA) causando danos. A produção das ROS no biofilme que excede a capacidade de defesa das células causa o estresse oxidativo, condição em que são afetadas moléculas como proteínas, carboidratos, lipídeos e ácido nucleicos. A adição de AgNPs, quando em grande quantidade, causa a formação desses radicais livres por este mecanismo, aumentando o acúmulo das ROS. Além disso, quando as AgNPs e o biofilme são irradiados com laser, ocorre a absorção de fótons pela matriz do biofilme e pelas AgNPs gerando mais ROS. Uma possível explicação da absorção da luz pela matriz do biofilme seria a possibilidade de que os microrganismos sensíveis a luz laser podem ter alguma substância que age como foto sensibilizador endógeno e que a sensibilidade pode variar de acordo com o nível ou tipo dessa substância (Imamura et al., 2014). Além disso, esta possibilidade leva a produção de mais ROs que se acumulariam com as ROS da outra reação. Mas esse mecanismo ainda é incerto.

Kim et al., em 2009, ao avaliar a ação das AgNPs com forma esférica e tamanho médio de 3nm encontraram que as mesmas inibiram células de *C. albicans* de forma semelhante à anfotericina B, causando menos lise de eritrócitos com a mesma concentração. Segundo os autores, as AgNPs agiram rompendo a membrana celular plasmática e inibindo processos normais da célula fúngica. Um requisito importante para as AgNPs manterem suas propriedades físicas e características antibacterianas e antifúngicas é manter o tamanho em nano escala. AgNPs tendem a agrupar-se, o que ocasiona a perda das suas propriedades ópticas e redução da área de superfície de contato (Shameli et al., 2011). Portanto é fundamental manter sua estabilidade de dispersão, evitando assim a agregação. (Kyaw et al., 2017).

2.4 Luz e Nanopartículas de Prata

As AgNPs também têm propriedades óticas extremamente interessantes. Elas interagem com os fótons dos lasers, absorvendo sua energia; os campos eletromagnéticos dos lasers causam a polarização dos elétrons da banda de condução (elétrons livres) na superfície das nanopartículas. Porque o campo

eletromagnético da luz oscila, a polarização dos elétrons também sofre oscilação. A diversidade de cores observada para esses materiais está relacionada às oscilações dos elétrons de condução, em ressonância com a luz incidente, denominada superfície de ressonância plasmônica (SPR) que pode ser conceitualmente compreendida como a oscilação coletiva dos elétrons de condução em fase com a radiação eletromagnética incidente. Quando uma superfície metálica é excitada por luz, as cargas induzidas (característica dos plásmons de superfície) podem se propagar como uma onda eletromagnética ao longo da interface entre materiais condutores e dielétricos. Elementos mais nobres, como Cu, Ag e Au, possuem bandas de transições d-d fazendo com que a frequência de plasma seja deslocada para a parte visível do espectro, proporcionando-lhes cor (Yugang S. et al., 2011).

Essas propriedades ópticas das AgNPs são devidas à química da sua superfície. A diferença significativa entre as nanopartículas e seus homólogos bulks originam-se numa maior relação superfície volume. Como resultado, partículas menores têm maiores frações do número de átomos da superfície em comparação com número total dos átomos. Como o tamanho das nanopartículas torna-se menor, a influência da química de superfície torna-se mais pronunciada na determinação de suas propriedades (Yugang S. et al., 2011).

Segundo Bonifácio, 2007, a teoria de Mie pode ser usada para quantificar a SPR por dispersão e absorção de luz por partículas pequenas em termos de sua extinção, dispersão e coeficiente de absorção. Mie desenvolveu sua lei a partir das leis do eletromagnetismo resolvendo as equações de Maxwell para sistemas esféricos com dimensões menores ou da ordem do comprimento da radiação incidente. Considera os processos de relaxamento como resultantes de colisões de elétrons e, permite prever corretamente o aumento da largura de banda para as partículas maiores uma vez que as colisões inter eletrônicas seriam mais frequentes. Porém, a teoria de Mie falha ao considerar a interação entre as esferas, bem como para descrever o comportamento espectral de partículas menores que 10nm. Portanto para estruturas mais complexas, vários métodos numéricos foram propostos, como por exemplo a Aproximação do Dipolo Discreto (ADD). Grande parte das simulações de espectros encontrados na literatura são feitas através da aplicação dos algoritmos da teoria de ADD. Entretanto, existe uma teoria recentemente proposta que explica o comportamento da interação entre plásmons. Essa teoria da hibridação de

plásmons, em que a deformação da nuvem eletrônica pode ser modelada como resultado da hibridização dos modos esféricos dos componentes (Yugang S. et al., 2011).

Segundo Sun et al, 2011, a densidade eletrônica reduzida altera a constante dielétrica das nanopartículas do material nos átomos da superfície e, conseqüentemente, influencia as propriedades SPR das nanopartículas. Este efeito químico é mais pronunciado quando o tamanho das nanopartículas diminui por expor uma maior percentagem de átomos da superfície para formar ligações químicas com moléculas de recobrimento. A incorporação desse efeito em um modelo de teoria multicamada de Mie leva a resultados que encaixam as observações experimentais muito bem.

A geração de calor das nanopartículas de prata ao interagir com a luz visível é devido ao fenômeno da SRP que ocorre quando o tamanho das nanopartículas é menor do que o comprimento de onda da luz. Em geral, existem quatro etapas envolvidas no processo de geração de calor: (1) elétrons livres coletivos na superfície de nanopartículas de prata (plasmon) absorvem a energia de fótons do laser; (2) o estado de equilíbrio é alcançado através de distribuição de elétron-elétron relaxamento da ordem de 10-100 fs; (3) temperatura de partículas na superfície das nanopartículas de prata aumenta devido ao efeito de acoplamento elétron - phonon. (4) a temperatura sobe no meio circundante, através da troca entre as nanopartículas e o seu meio circundante, o phonon - acoplamento phonon. (Liu et al., 2017).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivos gerais

Desenvolver uma metodologia para impregnar as AgNPs na matriz de Polimetacrilato de Metila e avaliar as propriedades mecânicas deste novo material.

3.2 Objetivos Específicos

Avaliar in vitro se a impregnação de AgNPs proporciona alguma propriedade antifúngica às amostras e como a irradiação por uma fonte de luz LED de 403 nm interfere nessas propriedades.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Síntese das nanopartículas de prata (Melo Jr. et al., 2012)

Soluções coloidais de nanopartículas de prata (AgNPs) podem ser facilmente preparadas e modificadas quimicamente.

Para a síntese das AgNPs foram utilizados os reagentes nitrato de prata P.A. (Labsynth Produtos para Laboratórios Ltda, Diadema, SP, Brasil) e boroidreto de sódio 98% (Acros, Geel, Belgium) em pó.

Os testes de estabilidade das nanopartículas foram realizados com soluções preparadas a partir de cloreto de sódio (Vetec, São Paulo, SP, Brasil) com pureza mínima de 99%. Polivinilpirrolidona (PVP, Aldrich) e poli álcool vinílico (PVA, Aldrich) foram utilizados em dias alternados para a estabilização das nanopartículas. Todas as soluções aquosas foram preparadas com água destilada. A solução alcoólica de potássio para limpeza das vidrarias foi preparada com 1,0 L de etanol 95%, 120 g de hidróxido de potássio 85% (Labsynth Produtos para Laboratórios Ltda, Diadema, SP, Brasil) e 120 ml de água destilada.

O PVA não é tão solúvel em água à temperatura ambiente quanto o PVP, portanto, na preparação da solução de PVA 0,3%, misturou-se a quantidade de 0,3 g de PVA com 100 ml de água destilada em uma autoclave de aço inox e o conjunto final foi mantido em estufa a 120 °C pelo período de 25 min.

Antes do início dos experimentos, toda a vidraria utilizada foi devidamente lavada com a solução de potássio alcoólica e água destilada. Qualquer impureza presente no meio pode servir como sítio de nucleação e promover a agregação das nanopartículas em solução.

Em um Erlenmeyer de 250 ml, adicionaram-se 75 ml de uma solução $2,0 \times 10^3$ mol L⁻¹ de boroidreto de sódio. O frasco foi então colocado em um banho de gelo durante 10 a 15 min. Em seguida, colocou-se uma barra magnética de agitação no frasco e levou-se o conjunto a uma placa de agitação. Com o auxílio de uma bureta, adicionaram-se, gota a gota, 25 ml de uma solução $1,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ de nitrato de prata. Essa adição ocorreu num período de aproximadamente 4 min e com taxa de adição de 1 gota s⁻¹. Obteve-se uma solução padrão de cor amarela que imediatamente teve seu espectro eletrônico obtido. Anotou-se o comprimento de onda de máxima absorção e estimou-se o valor da largura a meia altura da banda plásmons de

superfície.

4.2 Confeção das amostras de resina

As amostras utilizadas nos ensaios microbiológicos e testes mecânicos de dureza e rugosidade superficial, resistência à flexão, compressão e ao impacto, foram confeccionadas nas dimensões de 12 mm de diâmetro por 3 mm de altura pois essas dimensões favoreciam estes testes.

4.2.1 Inclusão das Matrizes em Mufla Metálica

As amostras foram confeccionadas a partir da inclusão de matrizes metálicas de mesmo formato e dimensão, para cada respectivo ensaio, em mufla metálica convencional (OGP, Produtos Odontológicos Ltda., São Paulo, SP, Brasil).

As matrizes metálicas eram imantadas e foram dispostas sobre uma base metálica plana proporcionando aderência. Inicialmente a base da mufla foi totalmente preenchida com silicone de condensação densa Zetalabor® (Zhermarck, Labordental Ltda., São Paulo, SP, Brasil) e as matrizes metálicas envolvidas, exceto em uma das faces planas, e niveladas pela base metálica na qual as matrizes estavam assentadas. Feito isso, completou-se o corpo da mufla com gesso pedra Tipo III (Gesso Rio, Orlando Antônio Bussioli ME, Rio Claro, SP, Brasil), espatulado mecanicamente na proporção de 30 ml de água para cada 100 g de pó até seu transbordamento para finalmente assentar a tampa da mufla sendo o conjunto levado para uma prensa hidráulica para eliminação dos excessos de gesso. Após a presa do gesso, foi finalizado o processo da inclusão (Figura 1).

Figura 1 - Inserção das matrizes em silicona.



4.2.2 Prensagem

Após a abertura da mufla e remoção das matrizes, foi realizado o isolamento do gesso e do silicone com Cel-Lac (SSWhite, Rio de Janeiro, RJ, Brasil). Em seguida, a prensagem da resina acrílica incorporada com as diferentes concentrações de AgNPs foi realizada. Preparou-se a resina VIPI CRIL PLUS observando a correta proporção entre pó e líquido respeitando a proporção recomendada pelo fabricante: colocou-se em um recipiente de mistura, de vidro, 13 ml de monômero VIPI CRIL PLUS (medida menor do dosador VIPI). Com auxílio de uma pipeta automática (Acura electro 925, Socorex Isba S/A, Ecublens, Lausanne, Suíça), a solução contendo as AgNPs foi adicionada ao componente líquido da resina acrílica nas concentrações de 0% (0 mL), como controle e 2% (0,75 ml), 4% (1,5 mL) e 8% (3 mL), baseadas na massa do polímero utilizado, agitando o recipiente até formar uma mistura homogênea. Em seguida, a essa solução obtida para cada grupo, adicionou-se 28 g (38 ml) do polímero da resina incolor (medida maior do dosador VIPI).

Esses materiais foram misturados com espátula 36 (Millenium, Golgran Ind. e Com. de Instrumental Odontológico Ltda, São Paulo, São Paulo, Brasil) no interior de potes de vidro (Figura 2) e, ao atingir a fase plástica, a resina acrílica contendo as AgNPs foi condensada no interior dos moldes em silicone. Na sequência, a mufla foi fechada e levada sob a prensa hidráulica.

Figura 2 - Manipulação da resina acrílica



Realizou-se uma prensagem inicial para eliminação dos excessos de resina

acrílica e uma prensagem final. A carga utilizada durante a prensagem inicial foi de 0,5 tonelada e na prensagem final cargas graduais de 0,5, 0,8 e 1 (Prensa Hidráulica Maxx 2 Essence Dental VH) tonelada. Ao atingir-se 1 tonelada de pressão, a mufla foi mantida sob a prensa por 30 min (Figura 3).

Posteriormente, a mufla foi retirada da prensa hidráulica, colocada em uma prensa de mão (Dentária Campineira Ltda, Campinas, São Paulo, Brasil) e levada para a polimerização em banho de água quente por 90 min a 73°C seguidos de 30 minutos a 100°C em uma termopolimerizadora automática. (Figura 4). Após a polimerização, a mufla foi resfriada sobre bancada por uma noite e as amostras desincluídas

Figura 3 - Prensagem da resina acrílica



Figura 4 – Termopolimerizadora



4.2.3 Desinclusão e Acabamento

Após a desinclusão, os excessos verificados nos espécimes foram removidos com uma fresa (Maxi-cut, Malleifer AS, Ballaiguer, Swetzerland) e os mesmos foram lixados com lixa d'água Norton 400, 600 e 1200. As dimensões foram avaliadas por meio de um paquímetro digital (Mitutoyo®, Japão).

Após o acabamento os corpos de prova foram armazenados em água destilada por 24 horas à 37°C. Para cada concentração foram confeccionadas dez amostras formando assim 4 grupos denominados: grupo 1, controle, grupo 2, com 2% de AgNPs, grupo 3 com 4% de AgNPs e grupo 4 com 8% de AgNPs impregnadas (Figura 5).

Figura 5 - Os grupos dos corpos de prova para ensaios microbiológicos e biomecânicos.



4.2.4 Padronização da Rugosidade

Dependendo do tipo de polimento e confecção das próteses, a resina pode apresentar superfícies mais polidas com rugosidade superficial de 0,03 μm a 0,3 μm ou mais rugosas variando de 1,2 μm a 3 μm . De acordo com a literatura a maioria dos micro-organismos presentes na microbiota oral sobrevive, apenas, ao aderir a micro rugosidades superficiais sendo 0,2 μm o limiar para favorecimento da adesão de micro-organismos em materiais.

Assim, para os ensaios microbiológicos os espécimes foram lixados e optou-se por padronizar a rugosidade através do Rugosímetro (Surftest SJ- 201P, Mitutoyo Corporation, Japan) em 0,2 μm . Uma vez padronizada a rugosidade, a superfície do material não influenciaria na adesão de biofilme e conseqüentemente nos resultados.

4.2.5 Esterilização

Antes dos experimentos, as amostras de resina acrílica de todos os grupos foram limpas por ultrassom em água destilada por 20 min e, em seguida, exposta à luz ultravioleta em condições de clima temperado e seco durante 30 min para evitar qualquer contaminação por micro-organismos sobre os espécimes.

4.3 Análise microbiológica

4.3.1 *C. albicans*

A investigação foi realizada em modelos de suspensão fúngica com a cepa padrão de *C. albicans* ATCC 10231 mantida nos estoques laboratoriais onde foram desenvolvidos os experimentos. Foram investigados modelos de criação em suspensão e métodos para sua irradiação e análise.

4.3.2 Desenvolvimento da suspensão fúngica sobre as amostras

Cada amostra foi colocada sobre a parte inferior de uma placa de microtitulação de 12 poços. Em seguida, 2 ml de suspensão padronizada de *C. albicans* ($1,0 \times 10^6$ células/ml) foi dispensado em cada cavidade da placa de microtitulação. (Figura 6). Após 24 horas de incubação a 37°C em condições de aerobiose, os modelos foram assepticamente removidos dos tubos e lavados por cinco vezes através da imersão em NaCl 0,9% estéril com o objetivo de remover microrganismos fracamente aderidos a superfície do polímero.

Figura 6 - Desenvolvimento da suspensão fúngica sobre as amostras.



4.3.3 Aplicação da Luz

A aplicação do LED foi feita em amostras infectadas do grupo controle (Grupo 1) pelo tempo de 300 s (tempo máximo). A estas amostras chamou-se de **1L5**. As amostras que não receberam o tratamento de LED chamaram-se de **1C**.

As amostras infectadas do grupo 4 foram irradiadas com LED em três tempos diferentes, 60, 180 e 300 s. Chamamos estas amostras de **4L1**, **4L3** e **4L5** respectivamente e as amostras desse grupo que não receberam LED chamaram-se de **4C**.

A fonte de luz utilizada nas amostras foi um LED com os parâmetros citados na Tabela 2, utilizando o comprimento de onda adequado à absorvância das AgNPs.

Tabela 1 - Parâmetros do LED utilizado nos experimentos (Dispositivo: protótipo criado pela Universidade Nove de Julho)

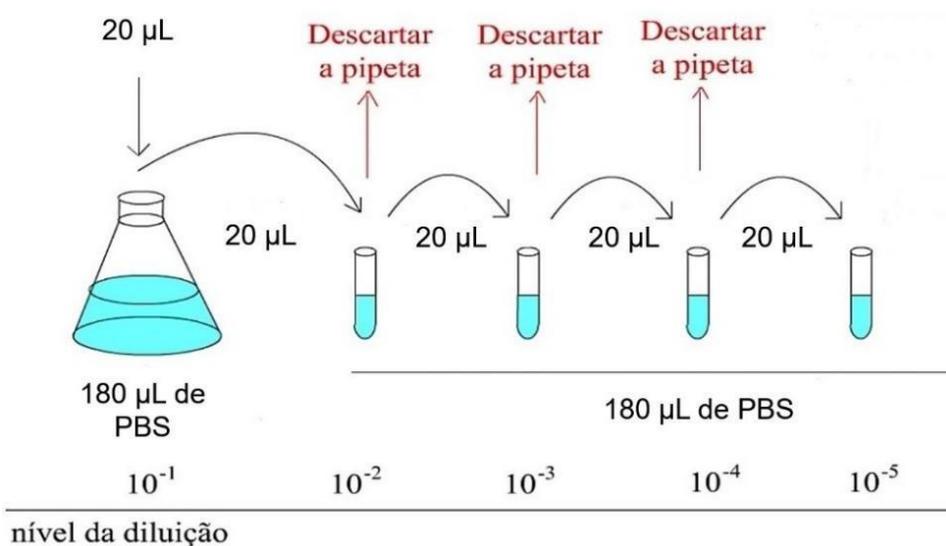
Parâmetros	
Comprimento de onda	403nm \pm 15
Modo	Contínuo
Potência	1 W
Polarização	Randômica
Área irradiada	1,7 cm ²
Irradiância no poço	0,58 W/cm ²
Tempos de irradiação	60, 180, 300 s
Energia	60, 180, 300 J
Exposição Radiante	35, 105, 174 J/cm ²

As amostras de todos os grupos foram então, transferidas para 10 ml de NaCl 0,9% e agitados em vortex durante 1min para remoção do biofilme formado sobre a superfície da resina.

4.3.4 Quantificação do biofilme

As diluições seriadas foram realizadas em placas de 96 poços, que foram preenchidas previamente com 180 μ L de tampão fosfato-salino ou phosphate buffered saline (PBS) e separadas por colunas, onde cada coluna representou um grupo distinto. Alíquotas de 20 μ L de cada grupo foram então diluídas nas relações de 1:10, 1:100, 1:1000, 1:10000 e 1:100000. (Figura 7)

Figura 7 - Diluição seriada



Alíquotas de 10 μ L das 5 diluições de cada grupo foram transferidas e semeadas em placas de ágar sangue. As placas foram incubadas em anaerobiose em uma estufa bacteriológica com uma temperatura regulada em 37°C por um período de 48h para formação de unidades formadoras de colônias (UFC) para serem contabilizadas para análise. Esse experimento foi realizado 3 vezes para contabilizar os dados.

4.4 Análise mecânica do Módulo de elasticidade

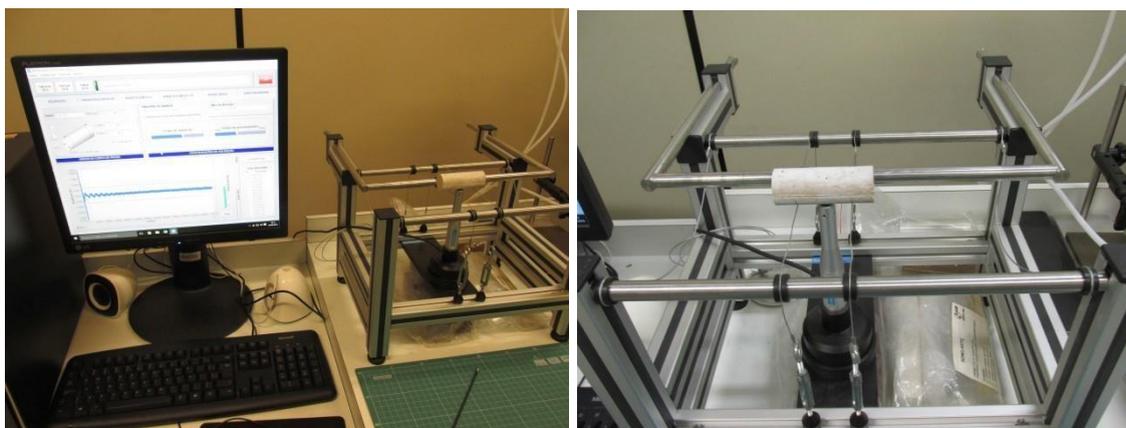
O comportamento mecânico de um material depende da sua resposta (ou deformação) à carga ou força à que é submetido. A propriedade que correlaciona a deformação elástica com a tensão é o módulo elástico. Devido à incorporação da AgNPs na resina é fundamental analisar se o módulo de elasticidade do material foi alterado de forma a melhorar ou piorar sua resistência.

Os corpos de prova dos diferentes grupos 1, 2, 3 e 4 foram usados para medições do módulo de elasticidade.

A medição do módulo de elasticidade foi feita com o uso do equipamento Sonelastic modelo SA-BC sistema computacional Windows XP, Software Sonelastic 3.0, representado na Figura 8. O princípio desta técnica é a excitação por impulso do corpo de prova.

Como as amostras possuíam dimensões pequenas foi usado um suporte menor para facilitar a obtenção dos resultados.

Figura 8 – Ensaio de módulo de elasticidade.

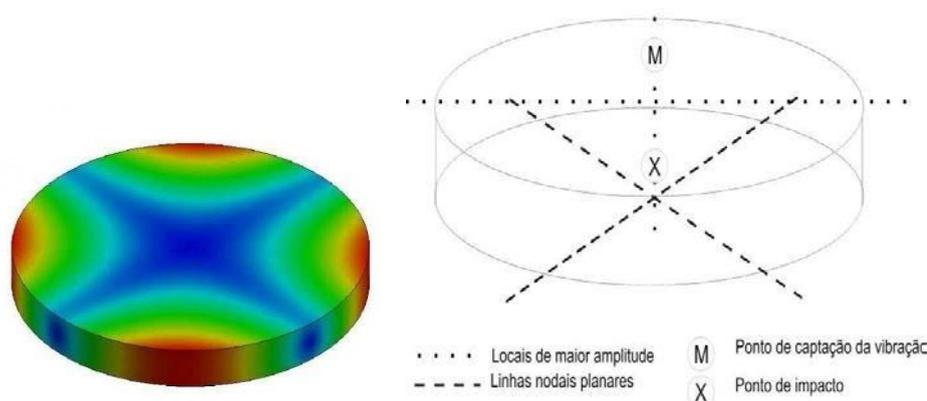


Fonte: D. Pereira - 2018

O modo de ensaio usado foi o “Modo Planar” para obtenção do módulo de

elasticidade com modelo de disco. O microfone foi configurado no modo padrão e a frequência escolhida foi a ultrassônica. Sensibilidade média e tempo de aquisição configurados em médio. Na Figura 09, está representada a condição de contorno ótima para o modo de vibração de um disco. A partir das frequências de ressonância da amostra (determinadas pelo modo de vibração) e empregando determinadas equações são calculados os módulos elásticos dinâmicos correspondentes.

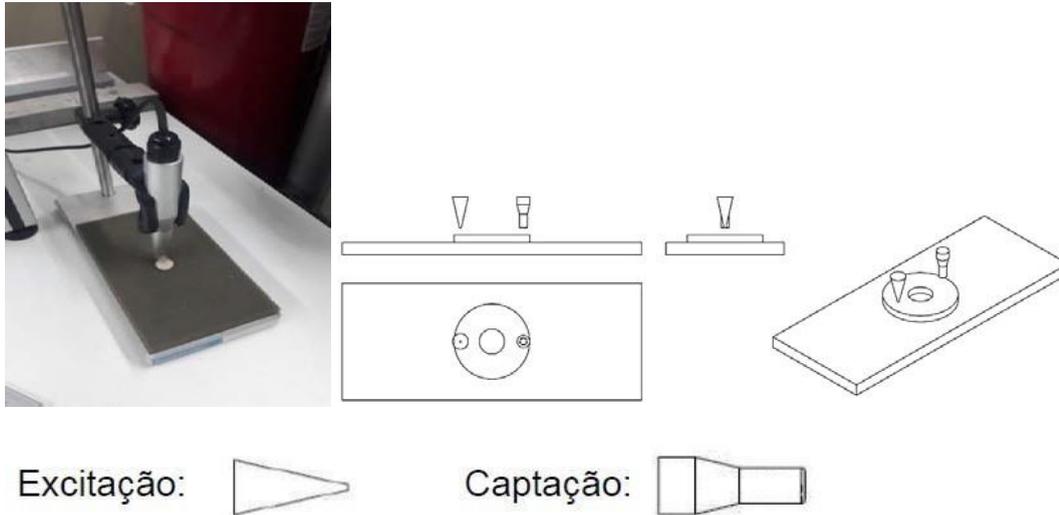
Figura 9 - Modo fundamental de vibração planar utilizado para amostras em forma de disco. As regiões em azul representam os pontos em que a amplitude de vibração é mínima, enquanto as regiões em vermelho representam as regiões em que a amplitude de vibração é máxima.



As amostras foram medidas com paquímetro analógico e pesadas em balança analítica. Uma vez feito isso as amostras uma de cada vez foram posicionadas no suporte com metade delas para fora do microfone para ocorrer o toque com o bastão, gerando assim a formação das ondas sonoras.

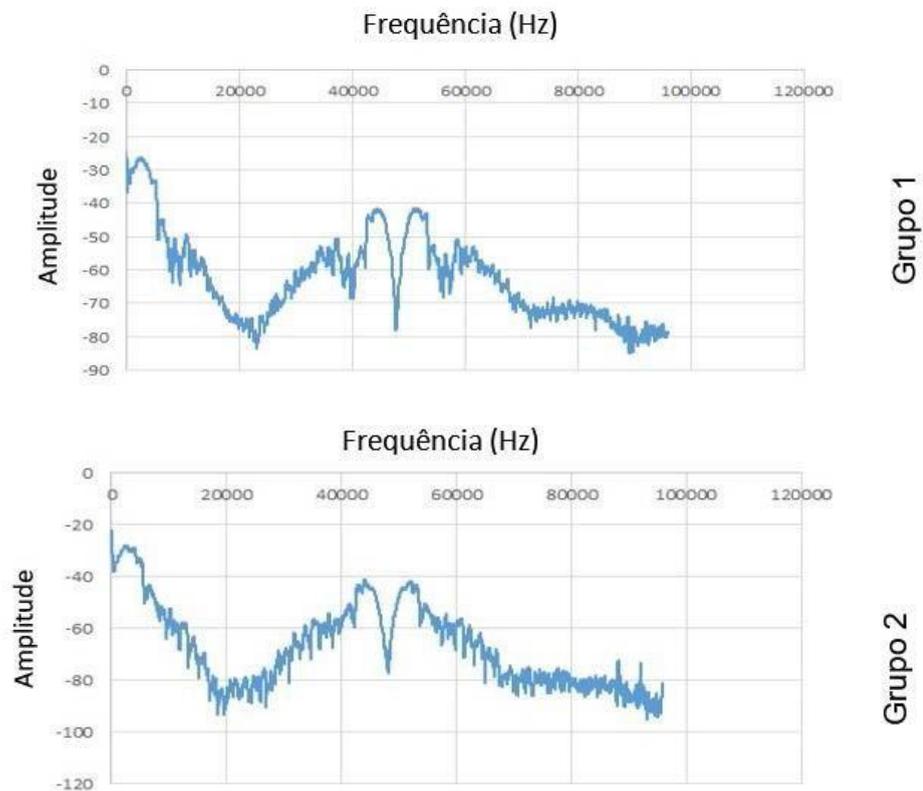
Todas as amostras foram executadas da mesma forma utilizando-se posteriormente e o software Sonelastic®, para processar a resposta acústica e fazer os cálculos necessários. Abaixo na figura 10 temos a amostra disposta no suporte.

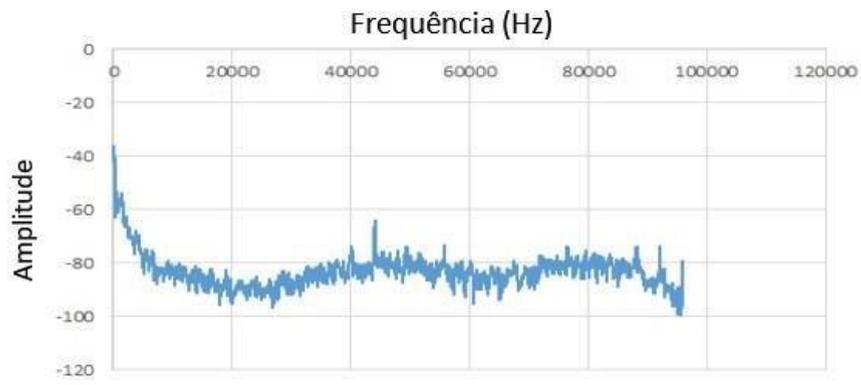
Figura 10 - Ensaio de módulo de elasticidade nas amostras. (Fonte: Autor).



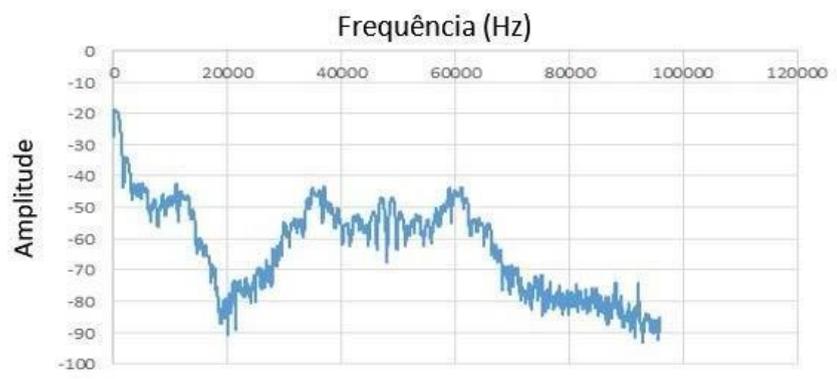
Para calcular os módulos de elasticidade das amostras, o software Sonelastic® fez os cálculos baseados nos gráficos apresentados abaixo (Figura 11) resultantes da leitura da excitação por impulso das amostras.

Figura 11 - Gráfico da relação entre a amplitude e frequência entre os diferentes corpos de prova.





Grupo 3



Grupo 4

5 RESULTADOS

5.1 Síntese das nanopartículas de prata

O procedimento da síntese das AgNPs possibilitou a obtenção de uma solução coloidal de coloração amarela estável. A estabilidade do sistema provém do fato que as nanopartículas formadas permanecem em suspensão e não se agregam para a formação de partículas maiores.

O espectro eletrônico da solução recém-preparada, também denominada como padrão, de cor amarela exibe uma banda com máximo de absorbância em

396 ± 5 nm e largura a meia altura de 61 ± 5 nm, referente à banda de ressonância dos plásmons de superfície dessas nanopartículas. Através de imagens de microscopia eletrônica de transmissão (TEM) mostrou que as AgNPs recém-preparadas tinham diâmetro médio de 20 nm. (Tabela 1) (Melo Jr et al., 2012).

Tabela 2 - Tamanho das nanopartículas de prata pelo valor da largura a meia altura da banda de plásmons mais energética e por microscopia eletrônica de transmissão (TEM), além dos valores de comprimento de onda de máxima absorção da banda de plásmons

Cor da solução	Diâmetro estimado pela largura a meia altura	Comprimento de onda máximo de absorbância	Diâmetro estimado por TEM
Amarela	62 ± 5 nm	396 ± 5 nm	20 ± 5 nm

5.2 Análise do módulo de elasticidade

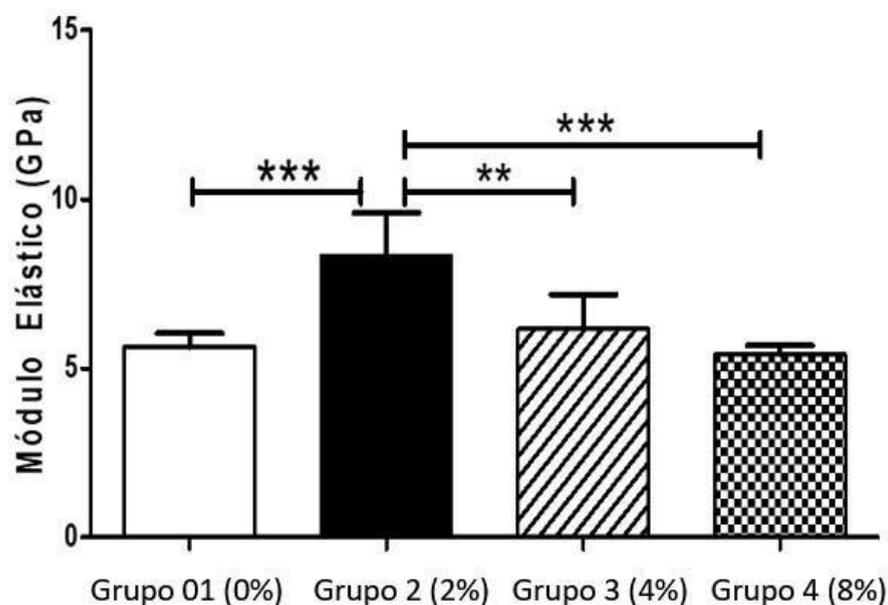
O gráfico abaixo, (figura 12), apresenta o módulo elástico das amostras de PMMA em diferentes apresentações, associados ou não com partículas de AgNPs em solução.

Foi observado aumento do módulo elástico no grupo 2 (2% de AgNPs) quando comparado ao grupo controle 1. (0% de AgNPs).

Os demais grupos 3 e 4 (4% e 8% de AgNPs respectivamente) não apresentaram diferenças significantes no módulo elástico quando comparados com

o grupo 1.

Figura 12 - Módulo elástico dos corpos de prova de materiais associados ou não com nanopartículas de prata.



5.3 Análise microbiológica

A análise microbiológica ocorreu no Laboratório de Pesquisa da Universidade Nove de Julho (Campus Vergueiro).

Foi realizada a contagem microbiana através da contagem de UFC/mL (figura 13).

Avaliação por ANOVA one-way e Bonferroni concluiu que todos os grupos foram iguais, ou seja, não houve morte microbiana em nenhum parâmetro. Foi realizado o Teste de normalidade Shapiro-Wilk concluindo que os dados tiveram distribuição normal (Figura 14).

Figura 13 - contabilização das UFC

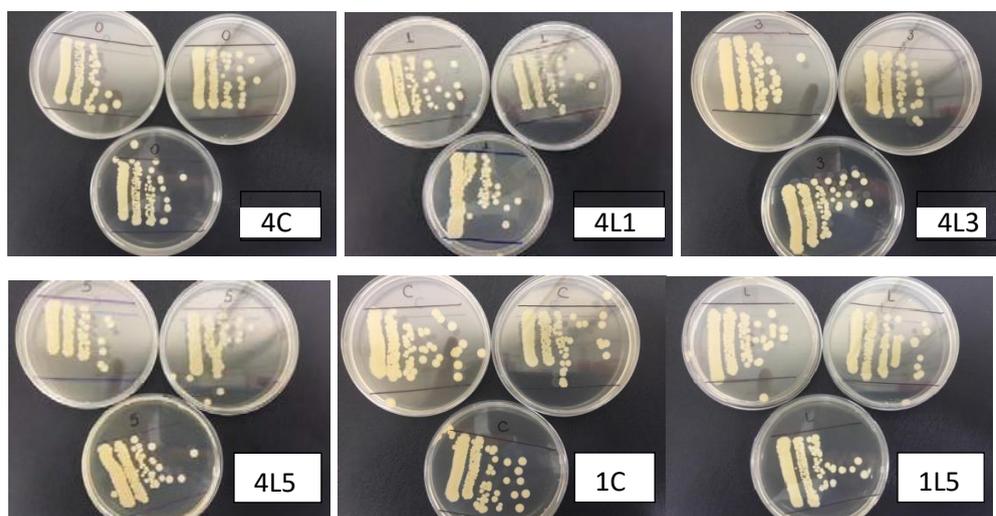
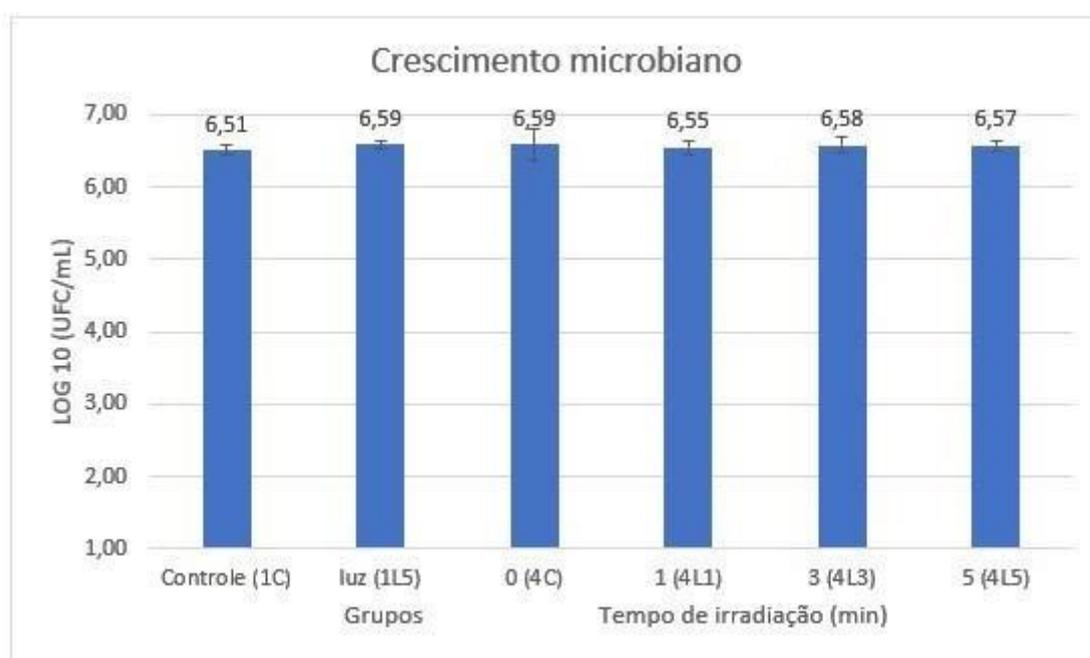


Figura 14 – Crescimento microbiano Log 10 (UFC/ml).



6 DISCUSSÃO

O presente trabalho analisou a atividade antimicrobiana de uma resina acrílica para base protética contendo nanopartículas de Ag com e sem irradiação de luz LED sobre o microrganismo *C. albicans*.

Os resultados ilustram que a incorporação de nanopartículas de AgNPs ao PMMA não reduziu a formação de biofilme de *C. albicans* sobre a superfície de resina acrílica e a irradiação com o LED também não surtiu benefícios.

O processo de adesão de *Candida* spp à superfície de resinas acrílicas para base protética é complexo. Fatores como pobre higiene oral e das próteses, baixo pH sob as mesmas, dieta rica em carboidratos, superfície da célula fúngica e sua hidrofobicidade, a energia livre de superfície da resina acrílica envolvendo forças eletrostáticas de atração e repulsão, interferem na adesão e colonização por *Candida* spp, (Bollen et al., 1997; Radford et al., 1990), Radford et al., 1998; Verran et al., 1907).

A hidrofobicidade do substrato tem sido considerada um dos fatores mais significantes no processo de adesão inicial do fungo e, portanto, no desenvolvimento do biofilme sobre superfícies poliméricas (Banting et al., 2001). Esperava-se que a presença das AgNPs poderia alterar as características físico-químicas da resina acrílica interferindo na hidrofobicidade de superfície do polímero, inibindo a formação de biofilme sobre o mesmo. Bürgers et al., 2009 ao incorporar AgNPs a uma resina composta observaram que as mesmas tornaram a resina mais hidrofóbica e o grau de hidrofobicidade foi dependente da concentração de micropartículas adicionadas, aumentando com o aumento da concentração de prata.

Acredita-se que o comportamento das AgNPs em tamanhos bem reduzidos seja semelhante ao de íons Ag⁺, o que reforçaria a possibilidade de ocorrer um aumento da hidrofilia do nano compósito, e conseqüentemente redução na formação de biofilme sobre o mesmo ao considerar que o microrganismo *C. albicans* pode ser qualificado como espécie mais hidrofílica com ângulos de contato entre 23 e 51°. Em outras palavras, esperava-se que ocorresse uma ação antimicrobiana do nano compósito o que poderia ser atribuído ao efeito da prata sobre a hidrofobicidade do substrato.

A semelhante adesão fúngica à superfície do nano compósito com nanopartículas frente ao grupo controle pode ter ocorrido também devido à dificuldade de homogeneização do colóide de AgNPs na massa de resina durante

o processamento laboratorial, fato que foi observado durante a manipulação da resina com maior concentração de colóide incorporado. Essa homogeneização dificultada pode ter impedido a dispersão das nanopartículas promovendo maior agregação, o que possivelmente levaria as partículas aglomeradas a se comportarem de maneira única, como massa, deixando de assumir a sua característica de ação antimicrobiana com alta reatividade em pequenos tamanhos.

Embora o mecanismo de ação antimicrobiano da Ag, especificamente na forma de nanopartículas, ainda não esteja totalmente claro na literatura, o fato de alguns trabalhos relatarem que tanto íons Ag como nanopartículas de Ag agiriam comprometendo a integridade da membrana plasmática de células fúngicas e que a Ag, por apresentar tamanho nanométrico, penetraria através da membrana celular do microrganismo e alteraria seu metabolismo celular, podendo levar a célula à morte, (Panáček et al., 2009; Panáček et al., 2006), reforça a necessidade realizarmos novos ensaios com concentrações maiores de AgNPs na incorporação.

Mallmann et al., 2015 concluiu que a irradiação com fonte de luz de 450nm tem significativo efeito fungicida sobre o biofilme de *C. albicans*. Segundo estes autores, a combinação da fonte de luz e AgNPs, proporciona maior redução do biofilme provavelmente devido ao aquecimento gerado pelas AgNPs ao interagir com a luz nesse comprimento de onda (450nm) que é muito maior que o tamanho das nanopartículas (na faixa de 20-180nm). Nesse estudo, esperava-se que o LED aumentasse o efeito fungicida das AgNPs devido ao seu comprimento de onda próximo ao utilizado por Mallmann, porém nenhuma alteração foi documentada. Como as propriedades ópticas das AgNPs dependem da sua permanência em nano escala, talvez, em decorrência da manipulação do material ou da forma como ele foi agregado à resina ocorreu a perda dessa propriedade.

Na análise mecânica do módulo de elasticidade das amostras notamos um aumento somente naquelas em que a incorporação de AgNPs foi menor (2%). Talvez a forma como ocorreu a distribuição do material no momento da mistura tenha interferido no resultado, assim como a concentração muito baixa das AgNPs impregnadas.

7 CONCLUSÃO

A incorporação de nanopartículas de prata em amostras de resina acrílica de metil metacrilato nas concentrações de 8% da massa do polímero, não teve efeito antifúngico. Tanto nas amostras do grupo 1 controle, como nas amostras do grupo 4, irradiadas por fonte de luz LED de 403nm e em todos os tempos de irradiação, não se observou alteração desses resultados. Na análise mecânica do módulo de elasticidade das amostras de todos os grupos ocorreu um aumento somente naquelas em que a incorporação de AgNPs foi menor (2%). Novos estudos utilizando AgNPs mais concentradas em estado não coloidal e utilizando a MEV para analisar sua disposição nas amostras plásticas, seriam promissores para contornar as limitações do presente estudo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHN SJ, LEE SJ, KOOK JK, LIM BS. Experimental antimicrobial orthodontic adhesives using nanofillers and silver nanoparticles. *Dent Mater*, 25: 206–13, 2009.

AKUMRU HN, BEYDEMIR K. The prevalence of *Candida albicans* in complete denture and removable partial denture wearers: a comparative study. *J Marmara Univ Dent Fac* 3:21822, 1992.

AZIZI A., AMIRZADEH Z., REZAI M., LAWAF S., RAHIMI A., Effect of photodynamic therapy with two photosensitizers on *Candida albicans*, *J. Photochem. Photobiol. B* 158, 267–273, 2016.

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* 61:199-200, 203-5, 1995.

BANTING, D. W., & HILL, S. A. Microwave disinfection of dentures for the treatment of oral candidiasis. *Special Care in Dentistry*, 21(1), 4–8.; 2001.

BONIFACIO, L. S.; Processos de Agregação e Fusão de Nanopartículas de Ouro: Uma Abordagem Química; Dissertação apresentada ao Instituto de Química de São Carlos, da Universidade de São Paulo, São Carlos, 2007.

BOLLEN CM, LAMBRECHTS P, QUIRYNEN MDM. Comparison of surface roughness of oral hard materials to the threshold surface roughness for bacterial plaque retention: A review of the literature. *Dent Mater* 13:258–269, 1997.

BÜRGERS, R., EIDT, A., FRANKENBERGER, R., ROSENTRITT, M., SCHWEIKL, H., ET AL. The antiadherence activity and bactericidal effect of microparticulate silver additives in composite resin materials. *Archives of Oral Biology*, 54, 595-601, 2009.

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* 183:5385–5394, 2001.

DA SILVA WJ, SENEVIRATNE J, SAMARANAYAKE LP, DEL BEL CURY AA. Bioactivity and architecture of *Candida albicans* biofilms developed on poly(methyl methacrylate) resin surface. *J. Biomed. Mater. Res. - Part B Appl. Biomater* 94(1):149–156, 2010.

DAMM C, MÜNSTEDT H, RÖSCH A. The antimicrobial efficacy of polyamide 6/silver-nano- and microcomposites. *Mater Chem Phys* ;108:61-66, 2008.

DAVENPORT, J.C. The oral distribution of candida in denture stomatitis. *Br. Dent. J.* 129, 151–156, 1970.

DE FARIAS, MARCELO A.; GONÇALVES, MARIA C. Superfície de ressonância plasmônica de nanoesferas de prata: efeito da razão estabilizante/precursor na dimensão da nanopartícula. In: 34ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Florianópolis, 2011.

DE LIMA R, SEABRA AB, DURAN N. Silver nanoparticles: a brief review of cytotoxicity and genotoxicity of chemically and biogenically synthesized nanoparticles. *J Appl Toxicol*, 32: 867–79, 2012.

DIOGENES H.J.F, COSSOLINO L.C, PEREIRA A.H.A, et al, Determinação do módulo de elasticidade do concreto a partir da resposta acústica, *Ibracom Structures and Materials Journal*, vol 4 n3, pp 792-813, 2011.

FAN, C., CHU, L., RAWLS, H.R., NORLING, B.K., CARDENAS, H.L., ET AL. Development of an antimicrobial resin—a pilot study. *Dental Materials*, 27, 322– 328, 2011.

GOCKE R, GERATH F, VON SCHWANNEWEDE H. Quantitative determination of salivary components in the pellicle on PMMA denture base material. *Clin Oral Investig* 6:227–235, 2006.

GILBERT, P., DAS, J. AND FOLEY, I. Biofilm susceptibility to antimicrobials. *Adv. Dent. Res.* 11, 160–167, 1997.

HOJATI, S.T., ALAGHEMAND, H., HAMZE, F., BABAKI, F.A., RAJAB-NIA, R., ET AL. Antibacterial, physical and mechanical properties of flowable resin composites containing zinc oxide nanoparticles. *Dental Materials*, 29, 495-505, 2013.

HOLTZ, R.D., LIMA, B.A., SOUZA FILHO, A.G., BROCCHI, M., & ALVES, O.L. Nanostructured silver vanadate as a promising antibacterial additive to water- based paints. *Nanomedicine*, 8, 935- 940, 2012.

IMAMURA T, TATEHARA S, TAKEBE Y, TOKUYAMA R, OHSHIMA T, MAEDA N, SATOMURA K Antibacterial and antifungal effect of 405 nm monochromatic laser on endodontopathogenic microorganisms. *Int J Photoenergy* 1:1–7,2014.

JAIN J, ARORA S, RAJWADE JM, OMRAY P, KHANDELWAL S, PAKNIKAR KM. Silver nanoparticles in therapeutics: development of an antimicrobial gel formulation for topical use. *Mol Pharm*; 6: 1388–401. 2009.

JHONSTON HJ, HUTCHISON G, CHRISTENSEN FM, PETERS S, HANKIN S, STONE V A review of the in vivo and in vitro toxicity of silver and gold particulates: particle attributes and biological mechanisms responsible for the observed toxicity. *Crit Rev Toxicol* 40:328–346, 2010.

KASSAEE, M.Z., AKHAVAN, A., SHEIKH, N. AND SODAGAR, A. Antibacterial effects of new dental acrylic resin containing silver nanoparticles. *J Appl Pol Sci* 110, 1699–

1703, 2008.

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

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

KONG, H. AND JANG, J. Antibacterial properties of novel poly(methyl methacrylate) nanofiber containing silver nanoparticles. *Langmuir* 24, 2051– 2056, 2008.

KULAK Y, ARIKAN A, DELIBALTA N. Comparison of three different treatment methods for generalized denture stomatitis. *J Prosthet Dent* 72:283-8, 1994.

KUHN DM, CHANDRA J, MUKHERJEE PK, GHANNOUM MA. Comparison of biofilms formed by *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* on bioprosthetic surfaces. *Infect Immun* 70:878–888, 2002.

KUMAR, V., JOLIVALT, C., PULPYTEL, J., JAFARI, R. & AREFI-KHONSARI, F. Development of silver nanoparticle loaded antibacterial polymer mesh using plasma polymerization process. *Journal of Biomedical Materials Research. Part A*, 101, 1121-1132, 2013.

KYAW K, ICHIMARU H, KAWAGOE T, TERAOKAWA M, MIYAZAWA Y, MIZOGUCHI D, TSUSHIDA M, NIIDOME T, *Effects of pulsed laser irradiation on gold-coated silver nanoplates and their antibacterial activity*, *Nanoscale*, 9, 16101, 2017

KWAKYE-AWUAH, B., WILLIAMS, C., KENWARD, M.A., & RADECKA, I. Antimicrobial action and efficiency of silver-loaded zeolite X. *Journal of Applied Microbiology*, 104, 1516–1524, 2008.

LARA HH, GARZA-TREVINO EN, IXTEPAN- TURRENT L, SINGH DK. Silver nanoparticles are broad-spectrum bactericidal and virucidal compounds. *J Nanobiotechnol*; 9: 30, 2011.

LIU X, SHAN G, YU J, YANG W, REN Z, WANG X, XIE X, CHEN H-J, CHEN X Laser heating of metallic nanoparticles for photothermal ablation applications. *AIP Adv* 7:2, 2017.

MALLMANN, Eduardo José J. et al., ANTIFUNGAL ACTIVITY OF SILVER NANOPARTICLES OBTAINED BY GREEN SYNTHESIS. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo, São Paulo*, v. 57, n. 2, p. 165-167, Apr. 2015.

MELO JR., M. A.; SANTOS, L. S. S.; GONÇALVES, M. c.; NOGUEIRA, A. F. Preparação de nanopartículas de prata e ouro: um método simples para a introdução da nanociência em laboratório de ensino. *Química Nova*, v. 35, n. 9, p. 1872-1878,

2012

MONTEIRO DR, GORUP LF, TAKAMIYA AS, RUVOLLO-FILHO AC, DE CAMARGO ER, BARBOSA DB. The growing importance of materials that prevent microbial adhesion: antimicrobial effect of medical devices containing silver. *Int J Antimicrob Agents* ;34:103-10, 2009.

MOURA JS, DA SILVA WJ, PEREIRA T, DEL BEL CURY AA, RODRIGUES GARCIA RC. Influence of acrylic resin polymerization methods and saliva on the adherence of four *Candida* species. *J Prosthet Dent*. 96:205–211, 2006.

NARHI TO, AINAMO A, MEURMAN JH. Salivary yeasts, saliva, and oral mucosa in the elderly. *J Dent Res* 72:1009-14, 1993.

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

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

PIRES, F.R., SANTOS, E.B., BONAN, P.R., DE ALMEIDA, O.P. AND LOPES, M.A. Denture stomatitis and salivary *Candida* in Brazilian edentulous patients. *J. Oral Rehabil.* 29, 1115– 1119, 2002.

RADFORD DR, CHALLACOMBE SJ, WALTER JD. Denture plaque and adherence of *Candida albicans* to denture-base materials in vivo and in vitro. *J Dent* 10:99–116, 1999.

RADFORD DR, SWEET SP, CHALLACOMBE SJ, WALTER JD. Adherence of *Candida albicans* to denture-base materials with different surface finishes. *J Dent* 26:577–583, 1998.

RAHISUDDIN TSA, KHAN Z, MANZOOR N, Biosynthesis of silver nanoparticles and its antibacterial and antifungal activities towards Gram-positive, Gram- negative bacterial strains and different species of *Candida* fungus. *Bioprocess Biosyst Eng*. s00449-015-1418-3, 2015.

RAMAGE G, VANDEWALLE K, WICKES BL, LOPEZ-RIBOT JL. Characteristics of biofilm formation by *Candida albicans*. *Rev Iberoam Micol* 18:163–170, 2001.

ROE D, KARANDIKAR B, BONN- SAVAGE N, GIBBINS B, ROULLET JB. Antimicrobial surface functionalization of plastic catheters by silver nanoparticles. *J Antimicrob Chemother*, 61: 869–76, 2008.

SANTARPIA R.P., POLLOCK J.J., RENNER R.P. An in vivo replica method for the

site-specific detection of *Candida albicans* on the denture surface in denture stomatitis patients: correlation with clinical disease. *J Prosthet Dent* 63:437-43, 1990.

SOLOMON, S. D.; BAHADORY, M.; JEYARAJASINGAM, A. V.; RUTKOWSKY, S. A.; BORITZ, C.; *J. Chem. Educ.* 84, 322, 2007.

SUN, Y.; GRAY, S. K.; PENG, S. Surface Chemistry: A NonNegligible Parameter in Determining Optical Properties of Small Colloidal Metal Nanoparticles. *Phys. Chem.*, 13, 11814–11826, 2011.

SUTHERLAND IW. Exopolysaccharides in biofilms, flocs and related structures. *Water Sci Technol* 43:77–86, 2001.

SUTHERLAND IW. The biofilm matrix—an immobilized but dynamic microbial environment. *Trends Microbiol* 9:222–227, 2001.

SHAMELI, K., AHMAD, M.B., ZARGAR, M., YUNUS, W.M.Z.W., RUSTAIYAN, A., ET AL. Synthesis of silver nanoparticles in montmorillonite and their antibacterial behavior. *International Journal of Nanomedicine*, 6, 581-590, 2011.

UPPULURI P, SARMAH B, CHAFFIN WL *Candida albicans* SNO1 and SNZ1 expressed in stationary-phase planktonic yeast cells and base of biofilm. *Microbiology* 152(Part 7):2031–2038, 2006.

VERRAN J, MARYAN CJ. Retention of *Candida albicans* on acrylic resin and silicone of different surface topography. *J Prosthet Dent* 77:535–539, 1997.

YANG, S.X., ZHANG, Y.H., YU, J.M., ZHEN, Z.C., & HUANG, T.Z. Antibacterial and mechanical properties of honeycomb ceramic materials incorporated with silver and zinc. *Materials & Design*,59: 461–465, 2014.

YUGANG S, STEPHEN K. G., SHENG P. Surface chemistry: a non-negligible parameter in determining optical properties of small colloidal metal nanoparticles. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2011,13, 11814-11826

WEBB, B.C., THOMAS, C.J., WILLCOX, M.D., HARTY, D.W. AND KNOX, K.W. *Candida*-associated denture stomatitis. Aetiology and management: a review. Part 3. Treatment of oral candidosis. *Aust. Dent. J.* 43, 244–249, 1998.

MELO JR., M. A.; SANTOS, L. S. S.; GONÇALVES, M. c.; NOGUEIRA, A. F. Preparação de nanopartículas de prata e ouro: um método simples para a introdução da nanociência em laboratório de ensino. *Química Nova*, v. 35, n. 9, p. 1872-1878, 2012