

**Universidade Federal de São Carlos  
Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia  
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia**

**%Redução do biofilme de *Streptococcus mutans*  
sobre um material restaurador dentário modificado  
com nanopartículas de prata . estudo *in vitro*+**

**Patrícia Bolzan Agnelli**

Dissertação de Mestrado apresentada ao  
Programa de Pós-Graduação em  
Biotecnologia da Universidade Federal de  
São Carlos como parte dos requisitos  
para obtenção do título de mestre em  
Biotecnologia.

Orientadores:

*Prof. Dr. Clovis Wesley Oliveira de Souza*  
*Prof<sup>a</sup>. Dra. Elisabeth Loshchagin Pizzolitto*

**São Carlos  
2011**

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da  
Biblioteca Comunitária da UFSCar**

A271rb

Agnelli, Patricia Bolzan.

Redução do biofilme de *Streptococcus mutans* sobre um material restaurador dentário modificado com nanopartículas de prata – estudo *in vitro* / Patricia Bolzan Agnelli. -- São Carlos : UFSCar, 2011.  
72 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2011.

1. Biofilme. 2. *Streptococcus mutans*. 3. Nanopartículas de prata. I. Título.

CDD: 576.15 (20ª)

**Patricia Bolzan Agnelli**

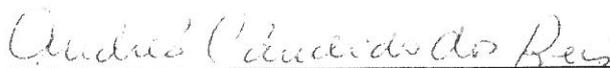
Dissertação de Mestrado submetida  
à Coordenação do Programa de  
Pós-Graduação em Biotecnologia,  
da Universidade Federal de São  
Carlos, como requisito parcial para  
a obtenção do título de Mestre em  
Biotecnologia

**Aprovado em: 25/03/2011**

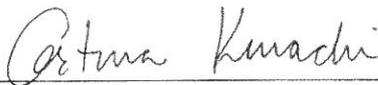
**BANCA EXAMINADORA**



Prof. Dr. Clóvis Wesley Oliveira de Souza (Orientador)  
Universidade Federal de São Carlos - DMP



Prof. Dra. Andréa Cândido Reis  
Universidade de São Paulo – Ribeirão Preto/SP



Prof. Dra. Cristina Kurachi  
Universidade de São Paulo - IFSC

# DEDICATÓRIA

Agradeço primeiramente a meus pais, que sempre se esforçaram ao máximo para possibilitar meu desenvolvimento e formação, **Elizabeth Bolzan Agnelli e José Augusto Marcondes Agnelli**. Agradeço pelo apoio em todas as fases de minha vida e dedico a eles este trabalho e as demais conquistas, as já obtidas e as que ainda estão por vir.

Dedico este trabalho de uma forma muito especial a meus orientadores, **Clovis W. O. de Souza e Elisabeth L. Pizzolitto**, docentes que são exemplos pela sabedoria que possuem e pelo dom de ensinar, e dedico a eles, ainda, a minha admiração pelos trabalhos que realizam.

# AGRADECIMENTOS

Agradeço à empresa Nanox® Tecnologia S. A., (São Carlos. SP, Brasil) por fornecer, para a realização do presente estudo, as nanopartículas de prata que produzem, as quais estão sendo muito usadas atualmente, incorporadas em diversos materiais e equipamentos.

Agradeço à CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior) pela ajuda financeira proporcionada através do fornecimento da bolsa de mestrado.

Agradeço às funcionárias do laboratório do Departamento de Morfologia e Patologia pelo carinho destinado aos alunos e professores, e pela eficiência em auxiliar o bom desenvolvimento dos experimentos ali desenvolvidos.

Agradeço aos funcionários do Laboratório de Caracterização Estrutural do DEMa (Departamento de Engenharia de Materiais), da UFSCar, pela ajuda técnica na realização de uma importante atividade do presente trabalho, a observação de biofilme bacteriano por meio de microscopia eletrônica de varredura.

Agradeço aos funcionários da oficina do Departamento de Engenharia de Materiais da UFSCar pela confecção das matrizes usadas para modelar os corpos de prova.

Ensinar é um exercício de imortalidade. De alguma forma o professor continua a viver naqueles cujos olhos aprenderam a ver o mundo pela magia da sua palavra. O professor, assim, não morre jamais+

***Ruben Alves***

## RESUMO

A bactéria *Streptococcus mutans* é uma das principais espécies iniciadoras do biofilme dentário e está relacionada à etiologia da cárie. Atualmente surgem muitos estudos que buscam novas maneiras de reduzir a adesão bacteriana e a formação de biofilme sobre biomateriais, com a finalidade de prevenir a ocorrência de infecções e a transmissão de doenças, tais como o uso de nanopartículas de prata incorporadas nestes materiais. Porém poucos são os estudos que investigam os benefícios destas partículas em materiais que são empregados dentro da cavidade bucal. O principal objetivo desta pesquisa foi comparar a formação do biofilme desta espécie bacteriana sobre a resina composta fotopolimerizável em sua forma comercial atual e uma resina composta experimental, onde foram acrescentadas nanopartículas de prata, que são bactericidas, utilizando um método de contagem de células viáveis recuperadas dos biofilmes. Foram produzidos corpos de prova cilíndricos, de 4 mm de altura e base circular de 4 mm de diâmetro, de resina e de resina com nanopartículas em três concentrações diferentes, 0,1, 0,3 e 0,6% em massa. Eles foram incubados em meio de cultura líquido com sacarose, contendo cerca de  $10^8$  UFC/ml, para que ocorresse a adesão bacteriana e a formação de biofilme, *in vitro*. A contagem de células viáveis provenientes dos corpos de prova foi feita após a desagregação dos biofilmes sobre eles aderidos em cuba ultrassônica, e foi realizada após 1 dia, 4 dias, e 7 dias de incubação. Considerando-se a média e desvio padrão dos valores, os resultados mostraram que sobre as resinas experimentais com as concentrações de 0,3 % e 0,6 % em massa de nanopartículas de prata, o número de células bacterianas aderidas foi menor do que na resina não modificada, sem prata, e também menor do que na resina a 0,1 %, nos 3 períodos de incubação estudados. A eletromicrografia de varredura do biofilme de *S. mutans* aderido sobre a superfície de cada corpo de prova foi realizada também após os mesmos intervalos de tempo, e permitiu a análise morfológica das células e da estrutura dos conjuntos celulares aderidos às superfícies. Foi realizado um ensaio de compressão para verificar se a inclusão das nanopartículas bactericidas na resina não prejudica o desempenho mecânico da mesma. Os resultados deste ensaio mostraram que, em comparação com a resina não modificada, a resina com a concentração de 0,3 % de nanopartículas teve um melhor desempenho mecânico em compressão, e a resina com a concentração de 0,6 % um desempenho pior. Concluiu-se que as resinas compostas com 0,3% de nanopartículas de prata são vantajosas para a aplicação clínica, pois se apresentaram como um material menos favorável à adesão bacteriana, sem prejuízo à sua resistência mecânica. Podem portanto beneficiar os pacientes, auxiliando na prevenção das cáries recidivantes, que ocorrem ao redor das margens de restaurações, e na manutenção de uma boa condição de higiene bucal.

## ABSTRACT

The bacterium *Streptococcus mutans* is one of the main initiators species of biofilm and is related to the etiology of caries. Currently there have been many studies investigating ways to reduce bacterial adhesion and biofilm formation on biomaterials, in order to prevent diseases and infections, such as the use of silver nanoparticles embedded in the materials. However, few studies have investigated the benefits of these particles in materials that are utilized within the oral cavity. The main objective of this research was to compare biofilm formation of this specie on the composite resin in its commercial form today and an experimental composite resin, which were added silver nanoparticles, which are bactericidal, using a method of counting viable cells recovered from the biofilms. Were produced cylindrical specimens of 4 mm in height and circular base of 4 mm in diameter, resin and resin with nanoparticles at three different concentrations, 0.1, 0.3 and 0.6% by mass. They were incubated in liquid medium with sucrose, containing about  $10^8$  CFU/ml, to cause bacterial adhesion and biofilm formation in vitro. The count of viable cells from the samples was made after the disintegration of biofilms on them adhered in ultrasonic tank, and was performed after 1 day, 4 days and 7 days of incubation. Considering the mean and standard deviation values, the results showed that on the experimental resins with concentrations of 0.3% and 0.6% of silver nanoparticles, the number of adhered bacterial cells was lower than in resin in its commercial form today, no silver, and also smaller than the resin to 0.1% in the three incubation periods studied. The scanning electron micrograph of a biofilm of *S. mutans* adhered to the surface of each specimen was also performed after the same time intervals, and allowed morphological analysis of the structure of cells and cell clusters attached to surfaces. A compression test was also performed to verify if the inclusion of antibacterial nanoparticles in the resin does not affect the mechanical performance of the same. The results of this trial showed that the resin with 0.3% concentration of nanoparticle had a better mechanical properties in compression, and resin with a concentration of 0.6% worse performance, compared with the resin without silver nanoparticles, It was concluded that the composites with 0.3% silver nanoparticles are advantageous for clinical application, because it showed how a material less favorable to bacterial adhesion, without prejudice to its mechanical resistance. They may therefore benefit patients, assisting in the prevention of recurrent caries, which occur around the margins of restorations, and in the maintenance of good oral hygiene.

# SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>8</b>
<b>3. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>9</b>
3.2. EMPREGO DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA PARA CONTROLE MICROBIANO EM MATERIAIS E EQUIPAMENTOS .....	9
3.3. BIOFILMES BACTERIANOS SOBRE MATERIAIS RESTAURADORES DENTÁRIOS .....	11
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>16</b>
4.1. CONFECÇÃO DOS CORPOS DE PROVA COM A RESINA COMPOSTA FOTOPOLIMERIZÁVEL .....	16
4.2. SELEÇÃO DA BACTÉRIA E PREPARO DA SUSPENSÃO BACTERIANA PADRONIZADA .....	19
4.3. FORMAÇÃO DE BIOFILME BACTERIANO <i>IN VITRO</i> SOBRE OS CORPOS DE PROVA .....	20
4.4. AVALIAÇÃO QUANTITATIVA DE CÉLULAS BACTERIANAS VIÁVEIS DOS BIOFILMES .....	21
4.5. PREPARO DOS CORPOS DE PROVA PARA ANÁLISE DO BIOFILME POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA .....	24
4.6. ENSAIOS DE COMPRESSÃO .....	26
<b>5. RESULTADOS</b> .....	<b>29</b>
5.1. CONTAGEM DE CÉLULAS VIÁVEIS .....	29
5.2. VISUALIZAÇÃO DO BIOFILME POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA .....	32
5.2.1. Imagens da superfície da resina composta sem bactérias .....	32
5.2.2. Imagens dos corpos de prova incubados por 1 dia .....	33
5.2.3. Imagens dos corpos de prova incubados por 4 dias .....	36
5.2.4. Imagens dos corpos de prova incubados por 7 dias .....	41
5.3. RESULTADOS DOS ENSAIOS DE COMPRESSÃO .....	45
<b>6. DISCUSSÃO</b> .....	<b>48</b>
<b>7. CONCLUSÕES</b> .....	<b>53</b>
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>54</b>
<b>SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS</b> .....	<b>62</b>
<b>APÊNDICE 1</b> .....	<b>63</b>
<b>APÊNDICE 2</b> .....	<b>65</b>

# 1. INTRODUÇÃO

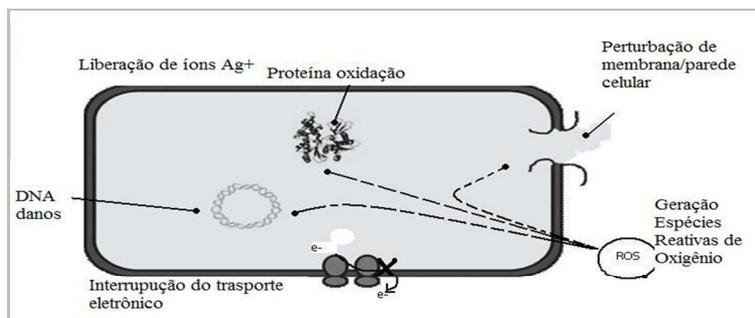
Na indústria de polímeros a preocupação com a redução da contaminação biológica dos produtos é intensa, objetivando a redução da transmissão e propagação de doenças, devido principalmente ao alto uso desses materiais para a área da saúde e também em embalagens para alimentos (**Crespilho et al., 2006**). Na tentativa de superar tal desafio surgem constantemente estudos com novos antimicrobianos, e entre eles estão os nanomateriais (**Li et al., 2008**). A nanotecnologia estuda o comportamento e manipula materiais em escala nanométrica. Seu objetivo é explorar e controlar as propriedades dos materiais nesta escala para poder fabricar estruturas e dispositivos, também em escala nanométrica, e usá-los de maneira mais eficiente (**Ramos et al., 2005**). Uma das propostas para melhorar as qualidades e propriedades de polímeros é a modificação dos mesmos por meio da formação de compósitos, que são considerados todos aqueles materiais nos quais duas ou mais fases de origens distintas coexistem, em escala pelo menos micrométrica, com interfaces bem definidas (**Duran et al., 2006**). O objetivo principal ao se produzir um compósito é combinar diferentes materiais para se obter um único dispositivo com propriedades superiores às dos componentes quando separados. A maior parte dos compósitos usados como biomateriais possuem partículas de materiais inorgânicos, matrizes poliméricas e agentes de união (**Oréfice, 2006**). Quando essas fases coexistem em escala nanométrica, costuma-se nomear esses produtos como nanocompósitos. Neles, a dimensão de pelo menos um de seus componentes está entre 1 e 100 nm (**De Muynck et al., 2009; Allaker, 2010**).

Pode-se vislumbrar, assim, a formação de um nanocompósito de matriz polimérica com propriedades sanitizantes, desde que neste caso uma das fases incorporadas tenha propriedades bactericidas ou bacteriostáticas (**Neto et al., 2008**). Assim, uma etapa inicial da busca desse produto é definir uma classe de nanopartículas com propriedades de interesse, e que possa ser incorporada regularmente a uma matriz desejada (**Kojima et al., 1993**).

A prata é um metal conhecido por seu largo espectro de ação contra bactérias, fungos, protozoários e alguns tipos de vírus. Sua ação antimicrobiana é conhecida há muito tempo, porém na forma de nanopartículas tem uma superfície de contato infinitamente maior e suas propriedades são muito aumentadas (**Morones et al., 2005; Kim et al., 2008**). Com a descoberta dos antibióticos, e sua introdução no uso medicinal, os elementos metálicos com atividade bactericida, como a prata, foram descartados. Todavia, cada vez mais as bactérias se tornam resistentes aos antibióticos disponíveis no mercado, sendo esta uma das causas da síntese constante de substâncias antibióticas alternativas e da volta dos trabalhos com colóides de prata no meio científico (**Kamat, 2002**).

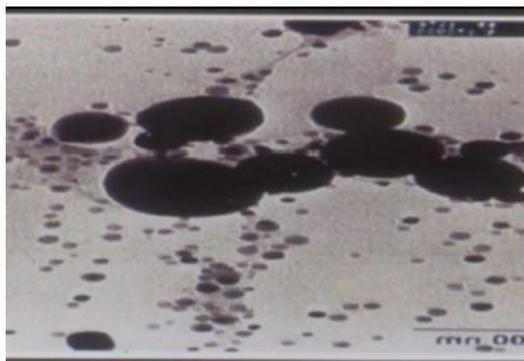
Vários nanomateriais, naturais ou sintéticos, têm demonstrado propriedades antimicrobianas através de diversos mecanismos, e são exemplos destes materiais o TiO<sub>2</sub>, ZnO, fulereno, quitosana, nanotubos de carbono e nanopartículas de prata. Os mecanismos antimicrobianos, como esquematizados na Figura 1, são: produção fotocatalítica de espécies reativas de oxigênio, que destroem componentes celulares das bactérias (no caso de TiO<sub>2</sub>,

ZnO e fulereno), danos à membrana celular bacteriana e ao transporte de elétrons (no caso da quitosana, nanotubos de carbono, ZnO e nanopartículas de prata), e inibição da síntese de DNA bacteriano (no caso da quitosana e nanopartículas de prata) (**De Muynck et al., 2009; Allaker, 2010**). Estudos mostraram também que as nanopartículas de prata não são tóxicas às células humanas, como o de **Sayes et al. (2004), Sondi & Salopek-Sondi (2004), Reddy et al. (2007), Yudovin-Farber et al. (2008) e Panacek et al. (2009)**.



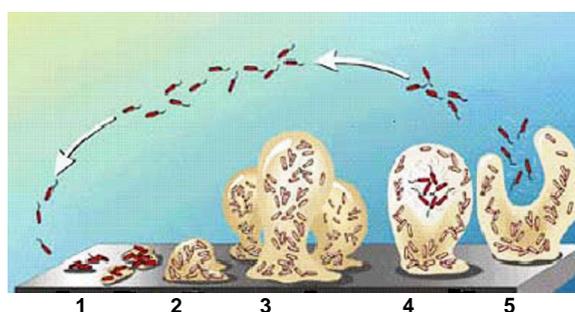
**Figura 1.** Mecanismos de atividade antimicrobiana exercidos pelos nanomateriais (*Li et al., 2008*).

Nanopartículas de prata já estão sendo aplicadas como antimicrobianos na agricultura, em recobrimentos de instrumentos e equipamentos biomédicos e odontológicos, em embalagens para alimentos, em recobrimentos de filtros de água, recobrimentos de peças de máquinas de lavar, refrigeradores e purificadores de ar (**Crespilho et al., 2006; Allaker, 2010**). É uma tendência atual do mercado aderir ao uso de prata nanodispersa como agente bactericida em vários materiais usados para a prática médica e odontológica (**Sanpui et al., 2008**). Um exemplo de uma nova tecnologia empregando nanopartículas de prata em materiais para a área da saúde é o cateter impregnado com estas partículas da Universidade de Erlangen (Figura 2). Este cateter feito em poliuretano e silicone passou por estudos *in vitro* e *in vivo* para avaliação da atividade antimicrobiana conseguida com a adição de partículas de prata ativadas pela adição de eletrólitos e ácidos (usados para aumentar a atividade antimicrobiana com aumento da liberação de íons prata). A atividade antimicrobiana nas superfícies de catéteres é importante por que o biofilme bacteriano formado sobre eles é responsável por grande porcentagem das infecções hospitalares, sendo essencial buscar alternativas que proporcionem a redução do acúmulo de biofilme nestes dispositivos (**Samuel & Guggenbichler, 2004**).



**Figura 2.** Nanopartículas de prata (partículas menores) distribuídas no polímero com sulfato de bário como condutor (partículas maiores) (Samuel & Guggenbichler, 2004).

Biofilmes microbianos podem ser definidos como associações de microrganismos e de seus produtos extracelulares, que se encontram aderidos a superfícies bióticas ou abióticas (**Sutherland, 2001**). Embora as bactérias possam ter uma existência livre no ambiente, a maior parte delas se encontra associada a um biofilme (**Levine et al, 1992**). O biofilme é um complexo ecossistema microbiano, bem estruturado, altamente dinâmico, que facilita a obtenção de nutrientes e a manutenção de um ambiente com condições físicas e químicas apropriadas (**Caixeta, 2008**). Em um biofilme bacteriano, as bactérias são muito mais resistentes a um antibiótico, quando comparadas às mesmas células livres, embora os mecanismos envolvidos nesta resistência sejam ainda pouco conhecidos (**Cappeletti, 2006**). Os estágios da formação de um biofilme são representados na Figura 3.



**Figura 3.** Ciclo de desenvolvimento de um biofilme, que pode ser dividido em cinco estágios: 1) adesão; 2) colonização; 3) acumulação; 4) comunidade clímax; 5) dispersão (Figura adaptada de Caixeta, 2008).

Na cavidade bucal, mesmo que os procedimentos de limpeza sejam convenientemente realizados, os dentes são recobertos dentro de poucos minutos pela película adquirida, um filme orgânico composto de proteínas e carboidratos, provenientes da saliva. A seguir, a película começa a ser colonizada por bactérias, e inicia-se então a formação do biofilme dental, uma comunidade microbiana embebida por uma matriz aglutinante e firmemente aderida sobre os dentes, também chamado de placa bacteriana ou placa dental (**Jorge, 2007**).

A gengivite é causada pela placa dental, e pode evoluir para a periodontite, uma doença que danifica os tecidos de suporte do dente (osso alveolar, cemento e ligamento periodontal). Tal doença conduz à perda do elemento dental, se não tratada adequadamente, resultando desse fato a sua gravidade. **(Carranza & Neuman, 1997)**. A Figura 4 ilustra a presença de biofilme sobre os dentes e sua relação com a gengivite.



**Figura 4.** Aspecto de uma gengiva normal, na primeira foto, e aspecto de uma gengiva inflamada, na segunda, devido à presença de biofilme dental clinicamente visível sobre os dentes *(Atlas de Odontologia, 2008)*.

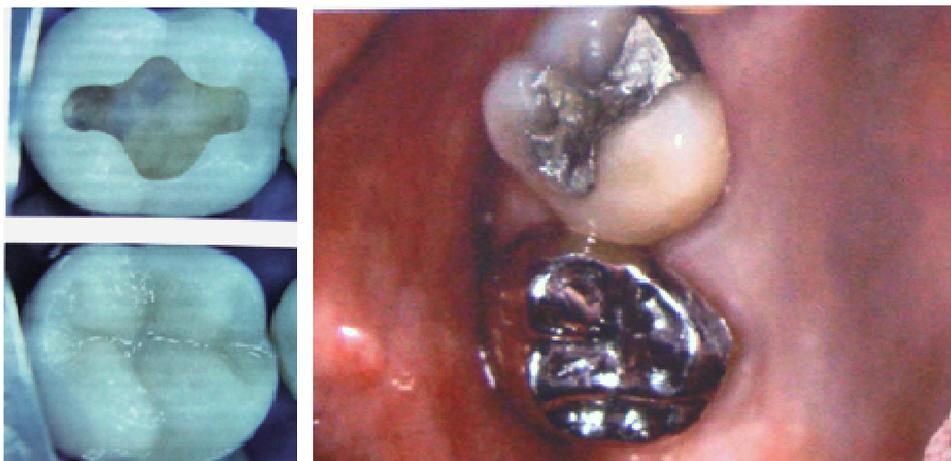
A cárie (Figura 5) é uma doença infecciosa e transmissível, já que é causada a partir da presença de bactérias cariogênicas na cavidade oral **(Keyes, 1960)**. Ela consiste em uma perda localizada de tecido duro, decorrente da desmineralização causada pelos produtos ácidos do metabolismo das bactérias cariogênicas que estão aderidas ao dente, ocorrendo uma posterior cavitação **(Baratieri, 1993)**. A bactéria *Streptococcus mutans* está relacionada à etiologia da cárie. Pertence à família Streptococaceae, composta de cocos Gram-positivos em cadeia, que não formam esporos, e que são imóveis e anaeróbios facultativos. As enzimas associadas à célula deste microrganismo usam a sacarose como substrato, separando-a em glicose e frutose, e, por fermentação clássica produzem energia e grande quantidade de ácido láctico. Possui um sistema enzimático para o metabolismo da sacarose, a substância mais cariogênica consumida pelos seres humanos, que converte a sacarose em glicano, um polímero de glicose extracelular, usando 3 enzimas, denominadas glicosiltransferases. Estas enzimas sintetizam o glicano insolúvel em água e o solúvel. Os produtos insolúveis em água são os maiores responsáveis pela adesão do *Streptococcus mutans* aos dentes, formando-se assim a matriz do biofilme dentário e conseqüentemente cáries dentárias, até mesmo em superfícies lisas. As células de *Streptococcus mutans* também possuem receptores na superfície, semelhantes a lectinas, que permitem que as mesmas tornem-se unidas às superfícies dentárias e outras superfícies sólidas na cavidade bucal. Algumas moléculas de glicose são convertidas em polissacarídeo intracelular de alto peso molecular (glicogênio), que funciona como reserva energética **(Jorge, 2007)**. A capacidade que essa bactéria apresenta em iniciar a adesão e formação de biofilme sobre superfícies sólidas, como dente, materiais restauradores, aparelhos ortodônticos e materiais de próteses, é considerada seu principal fator de virulência **(Phillips, 1998)**.



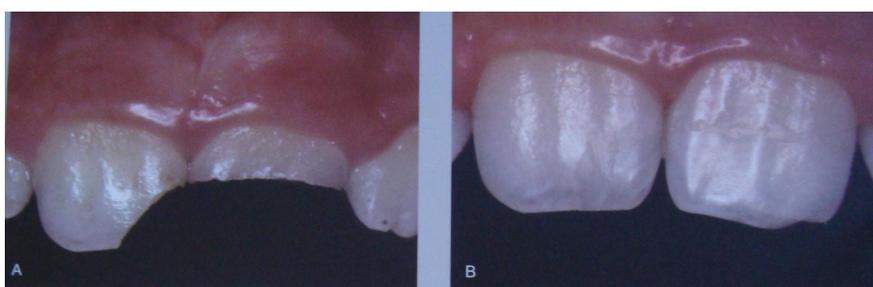
**Figura 5.** Cárie dental em dente posterior  
(*Atlas de Odontologia, 2008*).

Visto que o biofilme dental caracteriza-se como um agente determinante para o desenvolvimento da maioria dos problemas bucais, como a cárie dental, a gengivite e a periodontite, tornam-se essenciais os trabalhos que pesquisam novas formas de reduzir a formação deste biofilme sobre as diferentes superfícies encontradas na cavidade bucal. (**Oppermann, 1994**). Como os materiais restauradores utilizados em cavidades dentárias também podem ser colonizados e infectados por *Streptococcus mutans* e outros microrganismos, a prevenção do acúmulo destes microrganismos em um biofilme sobre tais materiais também é de grande importância (**Jorge, 2007**).

Uma restauração ou obturação odontológica é o procedimento em que se utiliza um material restaurador para devolver o formato original a um dente atingido por cárie ou fratura, recuperando a aparência estética e as funções mastigatória e fonética. Por várias décadas o amálgama foi considerado o material de escolha para restaurações em dentes posteriores. Amálgama é um tipo especial de liga que contém mercúrio como um de seus constituintes. Como o mercúrio é líquido em temperatura ambiente, é possível a formação de liga com outros metais que estejam no estado sólido. A liga para amálgama é feita com o mercúrio líquido e partículas de cobre, estanho, prata e zinco (amalgamação). Progressivamente, as resinas compostas, que são materiais poliméricos, foram substituindo o amálgama nas restaurações, por serem disponíveis em cores muito próximas às de nossos dentes. Antes do surgimento das resinas compostas, outros materiais eram usados quando era necessário restaurar um dente anterior, como o cimento de silicato e resinas acrílicas. Estes tinham a cor desejada, mas não as propriedades físicas suficientes para permanecerem em dentes posteriores, onde se usava apenas o amálgama (**Perdigão & Ritter, 2001**). As resinas de outros tipos, que não as compostas, possuíam alta contração de polimerização e alto coeficiente de expansão térmica, além de baixa resistência mecânica, gerando fracassos em restaurações sujeitas a grandes cargas compressivas, decorrentes da mastigação. Além da qualidade estética, que é uma de suas características, as resinas compostas foram apresentando, cada vez mais, melhores propriedades físicas, conforme foram sendo desenvolvidas novas gerações de resinas, o que já possibilitou seu uso também em dentes posteriores (**Phillips, 1998**). A Figura 6 ilustra restaurações com resina e com amálgama em dentes posteriores, e a Figura 7 ilustra a possibilidade da realização de restaurações estéticas em dentes anteriores com as resinas compostas.



**Figura 6.** Cavidade preparada e restauração com resina composta fotopolimerizável em dente posterior, à esquerda (Reis et al., 2006), e restauração de amálgama em dente posterior, imagem à direita (Atlas de Odontologia, 2008)



**Figura 7.** Restauração de uma fratura após um trauma dental, com resina composta fotopolimerizável (Atlas de Odontologia, 2008).

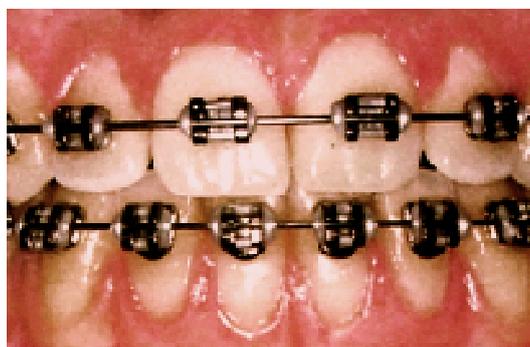
As resinas compostas odontológicas são exemplos de compósitos. Além da matriz polimérica (porção orgânica), diversos outros componentes estão presentes nos compósitos dentários. Existem as partículas de carga (porção inorgânica), que foram adicionadas para melhorar as propriedades físico-químicas do material. Para isso, porém, as cargas precisam estar bem unidas à matriz, caso contrário as cargas enfraquecem o produto final. Por isso existe também o agente de ligação ou união, o silano (Jansen et al., 2006). Os monômeros contidos nas resinas polimerizam por uma reação de adição, iniciada por radicais livres. Esses radicais livres podem ser gerados por ativação química ou por energia externa (luz). As resinas compostas para restaurações podem ter um destes meios de ativação. As resinas compostas fotopolimerizáveis são as ativadas por luz visível. Estas resinas são fornecidas em uma única pasta viscosa que vem em uma seringa. Nesta pasta há um fotoiniciador (geralmente a canforoquinona), que libera os radicais livres e uma amina ativadora. Enquanto estes compostos não são expostos à luz do aparelho fotopolimerizador eles não reagem, permitindo a manipulação e escultura do material, ainda viscoso. Mas se expostos à luz num comprimento de onda ao redor de 468 nm (luz visível no espectro azul), o iniciador se excita e interage com a amina para formar os radicais livres que iniciam a polimerização por adição, a qual vai levar o

material à sua consistência rígida ao final do processo (*Swartz, 1983; Vanherle & Smith, 1985; Wendt, 1990*). Devido à maior praticidade quanto à manipulação e maior tempo de trabalho, as resinas fotoativadas ou fotopolimerizáveis tornaram-se amplamente utilizadas para a confecção de restaurações (*Phillips, 1998; Perdigão & Ritter, 2001*)

Uma resina composta fotopolimerizável que dificulte a adesão e/ou proliferação bacteriana sobre sua superfície pode beneficiar os pacientes ao controlar a cárie recidivante, que é a cárie que ocorre ao redor de margens de restaurações ou na interface dente/restauração (Figura 8). Um dos objetivos da odontologia restauradora é a preservação dos tecidos dentários saudáveis, além da recomposição do tecido perdido, buscando, através do emprego de materiais adequados e técnicas bem conduzidas, evitar recidivas ou mesmo o aparecimento de novas cáries (*Swift, 1988; Creanor et al., 1994*). O benefício da aplicação de uma resina com tal característica ou propriedade abrange ainda a prevenção da cárie que ocorre ao redor de *brackets* ortodônticos (Figura 9), visto que esta resina também é um dos materiais indicados para a colagem destes *brackets* no esmalte dental, além de ter se tornado um dos materiais mais utilizados em restaurações logo após seu desenvolvimento (*Phillips, 1998; Perdigão & Ritter, 2001*). Sendo assim são muito valiosos estudos que verifiquem a ocorrência de inibição do biofilme bacteriano sobre materiais restauradores acrescidos de nanopartículas de prata, que possuem ação bactericida.



**Figura 8.** Cáries recidivantes nas margens de restaurações de dentes anteriores (*Dantas, 2010*).



**Figura 9.** *Brackets* ortodônticos fixados aos dentes com resina composta fotopolimerizável (*Phillips, 1998*).

## 2. OBJETIVOS

O objetivo do trabalho foi avaliar a redução do número de células bacterianas superficialmente aderidas à resina composta fotopolimerizável, material aplicado em restaurações dentárias, modificada com nanopartículas de prata, que possuem ação bactericida. O presente trabalho também se propôs a estudar a morfologia e o desenvolvimento do biofilme de *Streptococcus mutans* sobre este material restaurador, em diferentes intervalos de tempo, por meio de Microscopia Eletrônica de Varredura.

### 3. REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1. EMPREGO DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA PARA CONTROLE MICROBIANO EM MATERIAIS E EQUIPAMENTOS

**Samuel & Guggenbichler (2004)** avaliaram a adesão bacteriana e formação de biofilme sobre a superfície de um novo cateter impregnado com nanopartículas de prata, na tentativa de mais um avanço na prevenção de infecções relacionadas a cateteres, já que estas compõem 40 % dos episódios de septicemia em ambiente hospitalar. Foram feitos cateteres de silicone e poliuretano, com nanopartículas de prata, e eles apresentaram excelente atividade antimicrobiana *in vitro*. Neste cateter as partículas de prata são ativadas pela adição de eletrólitos e ácidos (usados para aumentar a atividade antimicrobiana com aumento da liberação de íons prata). Este foi um dos estudos que avaliaram o emprego de nanopartículas de prata em biomateriais (materiais que ficam em íntimo contato ou que estão substituindo partes do organismo humano), com a finalidade de torná-los menos propícios à adesão bacteriana.

**Percival et al. (2007)** estudaram a atividade antimicrobiana de curativos, que também podem ser considerados biomateriais, contendo prata, sobre os microrganismos que costumam se desenvolver em feridas, usando um teste padrão em ágar, onde foi medida a zona de inibição de cada material, de dois tipos de curativos contendo prata. O teste foi feito com várias espécies de bactérias. O curativo SCH (*silver-container hydrofiber*) foi mais efetivo contra *Pseudomonas aeruginosa*, *Cândida albicans* e *Staphylococcus aureus*. O NCS (*nanocrystalline silver-container*) foi mais efetivo contra *Klebsiella pneumoniae*, *Enterococcus faecalis* e *Escherichia coli*. Mas SCH demonstrou maior inibição, estatisticamente do que NCS.

**De Prijck et al. (2007)** avaliaram a eficácia de uma borracha que libera prata para a prevenção da formação de biofilme de *Pseudomonas aeruginosa* em recipiente com água, com o objetivo de colaborar com outro grupo de estudos também abundantemente efetuados nesta época, os que visam a redução da quantidade de bactérias em sistemas de veiculação e armazenamento de água. Os testes fizeram comparações usando uma borracha convencional e a que libera prata. O número de células aderidas ao material e o de células planctônicas na água foram mais baixos para a borracha experimental, contendo prata, apesar de o efeito de inibição bacteriana ter diminuído com o aumento do volume da água.

**Molloy et al. (2007)** também visando melhoria das condições de armazenamento de água, compararam filtros domésticos de água revestidos de cobre e prata com filtros revestidos apenas de cobre, quanto à quantidade de células viáveis da espécie *Legionella pneumophila* na água de seus reservatórios, ao longo do tempo. Foram feitas contagens de unidades formadoras de colônias, e os números foram mais baixos para o filtro contendo ambos os componentes do que o que só continha cobre.

**Roe et al. (2008)** testaram cateteres de plástico modificados por nanopartículas de prata, e analisaram a atividade antimicrobiana na superfície. Este é mais um trabalho que

avalia um benefício das nanopartículas de prata em biomateriais. Os cateteres foram cobertos com nanopartículas de prata segundo uma técnica que utiliza  $\text{AgNO}_3$ , um surfactante e um agente redutor (método *coating*). A liberação de prata foi analisada usando prata radioativa, por um período de 10 dias, e por todo este período a prata foi liberada, mostrando que por este método os cateteres podem liberar a prata no local de implantação. A liberação *in vivo* também foi analisada. Após 10 dias não ocorreu acúmulo em órgãos, e 15% foi liberada, sendo que 8% foi em excreção, nas fezes, e 3% foi liberada no sítio de implantação. Os cateteres cobertos com prata mostraram ação antibacteriana, prevenindo a formação de biofilme em relação à *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Candida albicans*.

**Hernandez-Sierra et al. (2008)** compararam os efeitos bactericidas e bacteriostáticos de nanopartículas de prata, óxido de zinco e ouro sobre *S. mutans*. Foi pesquisada a concentração inibitória mínima e a concentração bactericida mínima. Foi conseguido um maior efeito antimicrobiano com as partículas de prata, com uma concentração deste componente mais baixa do que o zinco e o ouro.

**Thom et al. (2009)** compararam a atividade inibitória do biofilme bacteriano nos revestimentos de iodine e de prata sobre biomateriais. Os autores concluíram que ambos os revestimentos exerceram um efeito antimicrobiano contra as espécies estudadas no biofilme, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*.

**Zodrow et al. (2009)** incorporaram nanopartículas de prata dentro de uma membrana de filtração para tratamento de água, feita à base de polisulfonas, que são polímeros termoplásticos, e ela exibiu propriedades antibacterianas e também antiviral, incluindo as espécies *Escherichia coli* e *Pseudomonas mendocina*, e o vírus bacteriófago MS2. Após um período correspondente à filtração de  $0.4 \text{ L/cm}^2$ , a análise XPS (*X-Ray Photoelectron Spectroscopy*) indicou uma liberação significativa de prata da membrana, o que resultou na ação antibacteriana e antiviral. A espectroscopia de raios-X ou XPS é uma técnica de análise química que fornece análise elementar e informação sobre ligações químicas. Mesmo assim análise ICP de material da membrana, que verifica o teor total de elementos em variados tipos de amostras, mostrou que ainda havia na membrana 90% da prata que havia sido adicionada. Isso é vantajoso, porque indica que a liberação de prata é lenta, e ainda continuaria por bastante tempo. O biofilme que se acumula na membrana de filtração e a penetração viral por ela são dois grandes obstáculos no tratamento de água, por isso os autores concluem que é urgente o emprego de membranas com propriedades antibacterianas e antivirais.

**Dror-Ehre et al. (2009)** buscaram elucidar o efeito das nanopartículas de prata na inativação da *Escherichia coli*, estudando as interações das partículas em meio aquoso. Nanopartículas foram misturadas nas concentrações de 1 a  $60 \mu\text{g/mL}$ , em suspensões contendo células de *E. coli*, para avaliar a inativação das mesmas. Partículas de ouro foram usadas como controle, consideradas pelos autores como inertes. Com as partículas ocorreu redução do número de células, já nenhum efeito se verificou na presença de ouro. Com um número maior de partículas a redução das células foi maior.

**Dror-Ehre et al. (2010)** também estudaram uma forma de controlar a formação de biofilme na água usando nanopartículas de prata. Elas foram usadas em um pré-tratamento na água, e o microrganismo testado foi *Pseudomonas aeruginosa*. As células planctônicas foram expostas às partículas e o biofilme formado com as células sobreviventes foi monitorado. As partículas retardaram a formação do biofilme, mesmo quando grandes porcentagens de células sobreviveram. Os autores concluíram que o baixo valor de biomassa de biofilme formada na presença de nanopartículas de prata provavelmente está associado com o prejuízo aos mecanismos moleculares que ocorrem nas células para realizarem a adesão e à contínua liberação de íons prata na amostra de água, mas que são necessários muitos estudos futuros complementares.

**Juan et al. (2010)** estudaram a deposição de nanopartículas de prata sobre a superfície do titânio, usado em implantes ósseos, e verificaram que o titânio modificado com estas partículas resultou em um promissor material com propriedades antibacterianas. A morfologia e os componentes químicos da superfície modificada desenvolvida foi analisada por microscópio eletrônico de varredura, equipado com recursos para espectroscopia de energia dispersiva (EDS). As bactérias usadas para teste do efeito antibacteriano foram *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. Após 24 h de incubação 94% da espécie de *S. aureus* e 95% de *E. coli* não sobreviveram sobre a superfície de titânio com prata, e a observação por microscopia eletrônica de varredura mostrou que haviam menos bactérias aderidas a esta superfície do que na superfície controle de titânio não tratada.

### 3.4. BIOFILMES BACTERIANOS SOBRE MATERIAIS RESTAURADORES DENTÁRIOS

**Shahal et al. (1998)** analisaram a aderência de *Streptococcus mutans* sobre materiais restauradores dentários, *in vitro*. Usaram 3 marcas comerciais de resina composta e 2 de cimento de ionômero de vidro. Os corpos de prova destes materiais foram cobertos com saliva coletada de pacientes voluntários, e incubados em solução de sacarose. Depois foram incubados com suspensão contendo bactérias marcadas com timidina tritiada. A adesão de bactérias aos materiais foi contada com um cintilador, que mede a emissão de radioatividade da amostra. Também foi feita observação por microscopia eletrônica de varredura. Não foram encontradas diferenças significantes entre os materiais. Trabalhos como esse demonstram interesse em estudar a adesão bacteriana sobre os materiais que se tornam parte da cavidade bucal, com o intuito de comparar alguns deles, verificando se um tipo é mais propício à adesão ou não.

**Auschill et al. (2002)** também avaliaram e compararam a formação de biofilme dental, sobre diferentes materiais restauradores, em um estudo *in vivo*. Para isso voluntários ficaram com pequenos discos do material testado fixado na cavidade bucal. Após 5 dias de acúmulo de biofilme sobre o material, de forma natural, os materiais foram retirados para observação por

meio de microscopia confocal de varredura a *laser*, para análise da porcentagem de biofilme vital. Os resultados sugeriram que amálgama, ouro e ionômero de vidro apresentam menor susceptibilidade à adesão bacteriana, comparados com resina e cerâmica.

**Steinberg & Eyal (2002)** estudaram a formação de biofilme de *Streptococcus sobrinus* sobre vários materiais restauradores dentários. O padrão de adsorção da saliva aos materiais foi determinado por valores de um gel de eletroforese acoplado a um sistema de computador próprio para realização da densitometria. A adesão bacteriana aos materiais cobertos por saliva foi testada por meio da marcação radioativa das bactérias, e a contagem de células viáveis do biofilme foi determinada usando a técnica das diluições seriadas. Segundo os resultados a resina acrílica e a resina composta da marca comercial Durafill apresentaram maior afinidade pelas proteínas salivares. A contagem de células viáveis foi maior, estatisticamente, na resina composta Fuji LC e no cimento de ionômero de vidro Fuji GC, do que na resina Durafill e na resina acrílica. Também seguindo o mesmo objetivo dos trabalhos anteriores, este e muitos outros trabalhos já foram descritos na literatura, por considerarem a adesão aos materiais restauradores um importante fator para a etiologia de cáries secundárias ou recidivantes (cáries que se formam ao redor delas).

**Montanaro et al. (2004)** também avaliaram a adesão de *Streptococcus mutans* sobre diferentes materiais restauradores dentários. A adesão foi investigada em três marcas comerciais de resina *flow*, três de resina composta, duas de ionômero de vidro, e uma marca comercial de cerâmica. A adesão foi promovida com a colocação dos materiais em uma suspensão bacteriana, no interior de microplacas de 24 poços. Foi feita uma medida da turbidimetria da quantidade de bactéria que foi retida em cada material. Os resultados mostraram que a cerâmica Admira e uma marca de ionômero, Fuji IX fast, apresentaram maior adesão bacteriana, e que os valores para a adesão bacteriana dos demais materiais não tiveram diferença estatisticamente significativa entre eles e entre eles e o material controle, a superfície de poliestireno.

**Brambilla et al. (2005)** testaram 12 marcas de materiais restauradores dentários, em relação à formação de biofilme bacteriano. Após discos dos materiais serem deixados em incubação em meio com *S. mutans*, foi realizado um teste colorimétrico, o ensaio do MTT, para avaliar a biomassa aderente nos diferentes discos. Esta técnica se baseia na redução de um sal amarelo de tetrazolium, que após reduzido pela ação bacteriana fica de cor púrpura. Quanto maior a intensidade da coloração púrpura maior a quantidade de bactérias. Os resultados mostraram que os cimentos de ionômero de vidro tiveram entre si valores sem diferença estatística em relação ao biofilme aderido, mas entre eles e os outros materiais eles apresentaram menor biomassa, e a diferença foi significativa. Os compômeros mostraram um mais alto valor, significativo, de colonização bacteriana do que todos os outros materiais. Este foi mais um dos trabalhos que investigaram um material restaurador mais apropriado, pois partem do conhecimento de que um material que seja menos favorável à adesão colabora para uma condição bucal mais saudável, ajudando a evitar doenças gengivais e a cárie em sua proximidade.

**Ikeda et al. (2007)** avaliaram a aderência de biofilmes à superfície de duas resinas compostas para técnicas de restaurações indiretas. Foram preparados discos ou corpos de prova dos dois materiais, alguns polidos com pasta diamantada para polimento e alguns com discos de lixa. Deixou-se ocorrer o crescimento de *Streptococcus mutans* sobre os materiais por 20 h, num ambiente que imitava a cavidade bucal humana. Depois os corpos de prova foram lavados e sonificados (sofreram desagregação por banho em cuba de ultrassom), a desta suspensão resultante contou-se o número de unidades formadoras de colônias, medindo-se assim a quantidade de biofilme que estava aderida nas superfícies. A aderência foi mais baixa quando os corpos de prova foram polidos com pasta diamantada apropriada. Este estudo também avalia a formação de biofilme sobre materiais restauradores, porém enfatiza o diferente resultado de acordo com diferentes tipos de polimentos realizados, diferenciando-se neste sentido dos demais.

**Kantorski et al. (2008)** analisaram a aderência de *Streptococcus mutans* a cerâmicas odontológicas e compômeros, também enfatizando a rugosidade dos materiais no estudo, como no trabalho anteriormente citado. Corpos de prova dos materiais foram incubados em meio com bactéria em microplacas de 24 poços, e o número de unidades formadoras de colônia após desagregação do biofilme foi contado, por métodos laboratoriais convencionais. O esmalte teve os valores mais altos de contagem, e de aderência bacteriana, portanto, seguido da cerâmica e depois pelo compômero. Esmalte dental de dente de humano foi usado como controle. A rugosidade da superfície também foi analisada. O esmalte foi a estrutura mais rugosa. A rugosidade dos materiais aumentou a aderência bacteriana para todos eles.

**Fúcio et al. (2009)** analisaram a formação de biofilme sobre materiais restauradores dentários, cerâmica, resina composta, ionômero de vidro convencional, e ionômero de vidro modificado com resina. Discos de vários materiais foram feitos e foram colocados em meio com *Streptococcus mutans* por 30 dias. Depois os corpos de prova foram analisados por microscopia confocal de varredura a laser. A espessura do biofilme foi diferente entre os materiais, com significância estatística: resina composta e cerâmica apresentaram biofilme mais espesso do que os demais materiais.

**Dezelic et al. (2009)** estudaram biofilmes de múltiplas espécies sobre materiais dentários e também avaliaram a influência da rugosidade da superfície e do tempo de contato na formação destes biofilmes. Os materiais dentários usados foram esmalte dental, amálgama e resina composta. Espécimes ásperos ou rugosos e lisos foram preparados. A adesão bacteriana foi permitida ocorrer por 15 min e 15 h sobre cada espécime ou corpo de prova de material, e as unidades formadoras de colônias foram contadas em ágar sangue, para fornecer uma comparação de formação de biofilme. Nenhuma diferença foi encontrada entre os índices de formação de biofilme entre todos os materiais testados no período de incubação mais longo. Apenas no período de incubação mais curto ocorreu diferença na adesão entre superfície lisa e rugosa para amálgama e resina. Concluiu-se que a rugosidade da superfície pode influenciar a aderência inicial, mas estas diferenças desaparecem com a ocorrência do crescimento e maturação do biofilme.

**Aykent et al. (2009)** também fizeram um estudo para examinar o efeito de diferentes polimentos e acabamentos sobre a rugosidade de superfície e sobre a adesão de *Streptococcus mutans* em materiais dentários. Os materiais estudados foram: uma resina composta para técnica indireta de restaurações, uma resina composta para restaurações diretas, e uma cerâmica. Foram feitos 40 corpos de prova de cada espécie, e eles foram divididos em 4 grupos, que foram tratados cada um com um acabamento diferente: brocas (instrumentos rotatórios de corte) diamantadas, discos de lixa, pontas de silicone, pastas diamantadas aplicadas com um disco de feltro. A rugosidade das superfícies foi medida com um perfilômetro. Os corpos de prova foram cobertos com saliva artificial e colocados em uma suspensão com bactérias, e a adesão foi avaliada por meio de microscopia eletrônica confocal de varredura a laser e de um programa de análise das imagens. Uma relação positiva foi observada entre a rugosidade da superfície e a adesão de *S. mutans*.

**Sousa et al. (2009)** estudaram o biofilme sobre materiais restauradores dentais, comparando diferentes materiais. Foi realizado um estudo *in situ*. Discos de vários materiais (resina composta, amálgama, ionômero de vidro e ionômero de vidro modificado com resina) foram fixados nos dentes de pacientes voluntários. Após o biofilme formado em 14 dias foi feita a contagem de células viáveis para cada material, mas não foi encontrada diferença estatística entre os resultados de todos eles. A desmineralização do esmalte foi determinada pelo exame de uma secção transversal de 20 a 70  $\mu\text{m}$  da margem de onde o material estava fixado, e apenas o ionômero de vidro modificado com resina apresentou mais baixa desmineralização do esmalte. Os autores concluíram que apenas este material oferece proteção adicional contra cáries secundárias, provavelmente por ser um material que possui fluoretos em sua composição.

**Burgers et al. (2009)**, avaliaram a atividade antibacteriana de uma resina composta contendo nanopartículas de prata, um material experimental, pois ainda não é assim apresentado em sua forma comercial. Este trabalho foi inovador em relação aos anteriores por idealizar e testar um novo material restaurador, com um componente adicional, possuidor de atividade antimicrobiana. Esta atividade pode resultar em uma menor aderência de biofilme, e foi avaliada pelos autores em relação a *Streptococcus mutans*. Foram feitos corpos de prova circulares com 10 mm de diâmetro, de resina com 2 diferentes concentrações de aditivo de prata: 0,3% e 0,6%, e foram feitos também só em resina para servir como referência em relação ao estudo. Eles foram incubados em saliva artificial por 120 min a 37<sup>o</sup>C, e depois em uma suspensão com *S. mutans* em PBS por 1 h a 37<sup>o</sup>C e as células aderidas foram quantificadas usando um ensaio de biofluorescência (*Resazurin*). Uma maior quantidade de células aderidas ocorreu nas amostras só com resina, em relação às amostras 0,3 e 0,6, com significância estatística. Foi realizada também a medição de ângulos de contato com a água, das diferentes amostras ou corpos de prova, e encontrou-se diferença estatística entre os valores medianos dos ângulos. Os resultados demonstraram que o aditivo de prata parece ter ação bactericida e de antiaderência em relação à espécie bacteriana testada.

**Ahn et al. (2009)** também realizaram uma pesquisa inovadora, comparando adesivos resinosos odontológicos experimentais, contendo nanopartículas de prata, com dois adesivos convencionais, um resinoso e um de resina modificado com ionômero de vidro. A rugosidade de superfície e a energia livre de superfície foram avaliadas usando microscopia confocal de varredura a laser. A atividade antibacteriana foi medida após um ensaio de adesão, que usou medidas de densidade óptica das suspensões de bactérias originadas a partir do conteúdo de cada adesivo. Resultados: a rugosidade do adesivo experimental foi maior devido à presença das partículas, mas a adesão bacteriana foi menor. A força de adesão ao esmalte de todos os adesivos foi avaliada para verificar se ocorrera prejuízo a esta propriedade, mas não foi encontrada diferença significativa entre o valor encontrado para o adesivo experimental e os valores para os adesivos convencionais.

**Carreira et al. (2009)** fizeram um estudo para avaliar a solução de nanopartículas de prata na descontaminação de limas endodônticas (instrumentos odontológicos para a limpeza e tratamento de canal radicular), o que ainda não havia sido testado anteriormente, segundo os registros de literatura. Limas contaminadas por 24 h, com suspensões de *S. aureus*, *S. mutans*, *E. faecalis*, *E. coli* e *C. albicans*, foram imersas na solução com prata, permanecendo em contato por diferentes tempos experimentais (5, 10, 15 e 30 min). Suspensão de *B. atrophaeus*, na forma esporulada, foi adicionada diretamente na solução com prata, e sua ação foi avaliada nos mesmos tempos descritos acima. Meios seletivos para cada microrganismo foram utilizados para a obtenção do número de UFC/mL. Dentre os microrganismos testados, o esporo demonstrou ser o mais resistente. As nanopartículas de prata promoveram redução superior a 90% de UFC/mL sobre as leveduras e demais bactérias testadas. Para todos os grupos houve diferença estatisticamente significativa entre o grupo controle com os demais tempos experimentais. Os autores concluíram que a solução de nanopartículas de prata foi efetiva na descontaminação de instrumentos, e sua eficácia está diretamente relacionada com o tempo de contato.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. CONFEÇÃO DOS CORPOS DE PROVA COM A RESINA COMPOSTA FOTOPOLIMERIZÁVEL

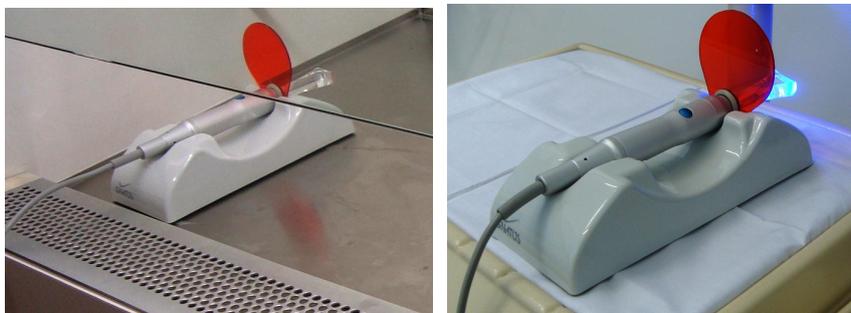
Foram preparados para o experimento 4 tipos de corpos de prova, os de resina apenas, e os de resina com nanopartículas de prata, em 3 concentrações diferentes: 0,1%, 0,3% e 0,6% em massa. A resina composta usada para o preparo dos corpos de prova foi a Filtek Z250, produzidas pela 3M-ESPE (Figura 10). Maiores detalhes sobre a composição das resinas compostas fotopolimerizáveis e sobre as especificações da resina Filtek Z250, usada no trabalho, são descritos no Apêndice 1.



**Figura 10.** Seringa contendo 4 g de uma resina composta fotopolimerizável utilizada para restaurações de cavidades dentais.

Foram utilizadas matrizes plásticas, para a acomodação do material antes da presa e padronização do formato e tamanho de todos os tipos de corpos usados no experimento microbiológico. As matrizes foram feitas a partir de um cilindro plástico que tinham 4 mm de diâmetro, e que foram cortados, produzindo várias outras matrizes menores, cada uma com uma altura de 4 mm. Elas foram produzidas na oficina do Departamento de Engenharia de Materiais da Universidade Federal de São Carlos. Os corpos de prova resultante foram, portanto, cilindros de base circular com 4 mm de diâmetro e altura de 4 mm. A resina precisou ser acomodada em matrizes, pois é viscosa inicialmente, não tendo como dar forma a ela sem auxílio de algum recipiente ou cavidade. A resina foi colocada em pequenos incrementos dentro do espaço da matriz e condensada sobre uma placa de vidro, para resultar numa lisura superficial das faces circulares. Cada incremento de cerca de 2 mm foi fotopolimerizado com o aparelho apropriado, com um tempo de exposição à luz de 40 s, conforme recomendado por **Pires et al. (1993)** e **Halvorson (2002)**, embora o tempo de exposição à luz indicado pelo fabricante, para a polimerização desta resina, seja de 20 s. Na face circular superior também foi colocada uma placa de vidro, para fornecer lisura superficial ao material, antes da fotopolimerização. Em seguida a matriz foi cortada delicadamente com lâmina de bisturi e removida.

O aparelho usado para a polimerização da resina foi o fotopolimerizador de modelo Optilight LD III, produzido pela empresa Gnatus, com potência de 15 VA, frequência de 50 Hz (sua fonte de luz é um LED, que emite luz num comprimento de onda de 470 nm). Este aparelho é usado para promover a presa de cada incremento de material com 40 segundos de exposição à luz (Figura 11).



**Figura 11.** Aparelho fotopolimerizador para resinas compostas. Este aparelho emite a luz em um comprimento de onda capaz de sensibilizar o fotoiniciador presente nas resinas, o qual possui um intervalo de absorção de 400 a 500 nm, que é uma faixa de comprimento de onda correspondente à zona azul do espectro de luz visível.

Para a confecção dos corpos de prova de resina contendo nanopartículas de prata foram seguidos os mesmos procedimentos, após a pesagem dos componentes (resina e nanopartículas) e a mistura dos mesmos. Ao misturar resina com as partículas de prata, que possui consistência de pó, tanto a resina quanto as partículas foram pesadas separadamente, e as partículas pesadas na porcentagem certa para resultar em cada concentração escolhida para o experimento. Após a mistura o material resultante foi sendo colocado na matriz e fotopolimerizado. As nanopartículas de prata foram fornecidas para a realização da presente pesquisa pela empresa Nanox® Tecnologia S. A., (São Carlos . SP, Brasil). As características básicas destas partículas são indicadas no Apêndice 1.

A incorporação das partículas na resina composta foi realizada misturando-se manualmente as partículas à resina, com luvas estéreis, sem grande dificuldade, já que esta, antes de sua presa ou endurecimento, é viscosa, agregando facilmente partículas com as quais entra em contato. Foi seguido um protocolo padronizado de manipulação para que todos os corpos de prova fossem produzidos da mesma forma. Após serem pesadas porções de resina e porções de partículas, segundo cálculos que resultavam na concentração desejada, a quantidade de resina era dividida em 4 partes, e a de pó também. Cada parte de resina era misturada com cada de pó, em várias direções. Depois duas partes eram misturadas entre si, em várias direções, por 30 s, e depois as duas partes finais foram misturadas, por mais 30 s, resultando em uma massa única, de onde foram sendo retiradas pequenas porções usadas para preencher a matriz, posteriormente fotopolimerizadas com o aparelho apropriado. Essa massa foi deixada protegida da luz em uma caixa escura, a fim de evitar a polimerização espontânea da resina com a luz natural e seu endurecimento antes da condensação na matriz. Grande quantidade foi retirada da embalagem (seringa) para a mistura com as nanopartículas,

para possibilitar uma pesagem mais precisa da resina e do pó, e essa quantidade não poderia ficar exposta à luz durante todo o tempo da colocação de pequenas porções nas matrizes.

Todos os corpos de prova foram embalados separadamente de acordo com o tipo (resina, resina com nanopartículas de prata a uma concentração de 0,1%, 0,3%, e 0,6% em massa), e esterilizados em autoclave (121<sup>o</sup> C, 1 atm), por 15 min, em embalagens apropriadas (Figura 12).



**Figura 12.** Os corpos de prova foram embalados separadamente, de acordo com o tipo (concentração de nanopartículas de prata), e foram esterilizados em autoclave.

**Observação importante:** durante a confecção dos corpos de prova constituídos apenas com resina, sem nanopartículas de prata, a divisão do material, os procedimentos de manipulação, imitando uma mistura, e seus tempos, também foram realizados, para permitir a ocorrência de semelhante incorporação de ar nos mesmos. Assim, todos os tipos de corpos de prova ficaram com espaços vazios semelhantemente, mesmo os de resina pura. Essa preocupação objetivou um bom resultado, o mais fiel possível, do teste de formação de biofilme *in vitro* e do teste de resistência à compressão, que foi feito para avaliar se ocorreu aumento ou diminuição da resistência da resina após a incorporação das nanopartículas de prata. Provavelmente ocorreria uma redução na resistência do material com as partículas devido à incorporação de ar durante a manipulação, se não fosse feito o mesmo com a resina sem partículas. Poderia ocorrer também maior acúmulo de biofilme devido aos espaços vazios, e não devido à presença de nanopartículas de prata. Tal problema de incorporação de ar e formação de  $\mu\text{caps}$  ou vazios microscópicos não ocorreria no caso de uma produção industrial, com incorporação das partículas juntamente com as demais cargas inorgânicas que já são componentes deste material odontológico.

#### 4.2. SELEÇÃO DA BACTÉRIA E PREPARO DA SUSPENSÃO BACTERIANA PADRONIZADA

A cepa de *Streptococcus mutans* usada na pesquisa foi ATCC 25175, fornecida pela Professora Doutora Elisabeth L. Pizzolitto, do Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho. O criotubo com o meio de cultura em caldo denominado BHI (*Brain Heart Infusion*), congelado, contendo a cepa ATCC 25175, foi descongelado naturalmente. Em seguida inoculou-se 100µL desta suspensão bacteriana, com o uso de pipetador automático, em 3 tubos com BHI. Três placas com ágar sacarose também foram inoculadas com 10µL da suspensão, com a alça de 10µL. Todos os tubos e placas inoculados foram incubados a 37<sup>o</sup>C, e verificou-se nas placas a presença de um único tipo de colônia bacteriana. Após 24h foram confeccionados 3 esfregaços dos meios contidos nos tubos para confirmar a presença de cocos Gram-positivos através da coloração de Gram, e o resultado foi o esperado.

De uma das placas com ágar sacarose na qual conseguiu-se melhor isolamento de colônias, retirou-se uma colônia que foi colocada em novo tubo com 5 mL de BHI, e outra em outro tubo. Estes dois tubos com BHI foram incubados por 24 h. Após isso, um foi separado para a padronização do número de células em espectrofotômetro, para ser utilizado no primeiro experimento, e o outro foi misturado com glicerol (em 20% do volume do meio) para novo congelamento da cepa. Desta mistura com glicerol foram retirados 3mL, 1mL para cada criotubo, e os 3 foram congelados. Da mesma placa retirou-se uma só colônia e foi feito estriamento em outra placa para verificação de que ali só havia mesmo uma espécie de bactéria.

A partir do tubo com BHI que ficou incubado por 24 h, para ser usado no experimento, foi preparada uma suspensão bacteriana com absorbância padronizada. Assim, sempre que o experimento foi repetido pudemos preparar uma suspensão nas mesmas condições, com a mesma turvação e portanto a mesma quantidade de células bacterianas, na qual os corpos de prova foram colocados, para a ocorrência de adesão bacteriana e formação de biofilme.

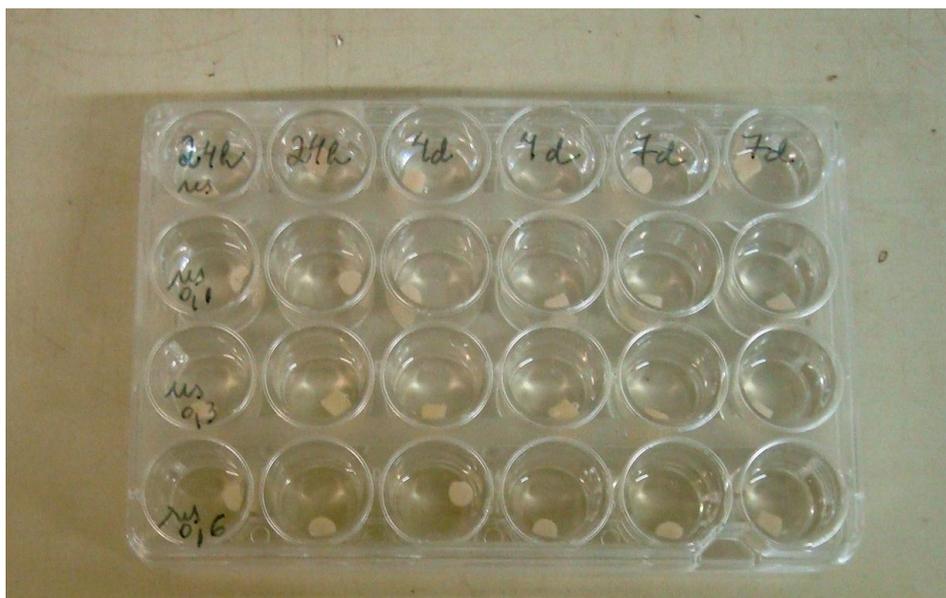
A cultura do tubo com BHI foi transferida para um tubo *Falcon* e foi centrifugada a 3000 rpm por 20 min (centrífuga Excelsa II, modelo 206-BL, FANEM), proporcionando um precipitado da biomassa. O sobrenadante foi descartado e a biomassa foi suspensa em PBS (solução salina tamponada fosfatada), com sacarose, até atingir a absorbância de 0,08, lida sob 600nm (espectrofotômetro FEMTO), turvação aproximada a 0,5 da escala de Mac Farland, com uma quantidade de células da ordem de 10<sup>8</sup> UFC/mL (unidades formadoras de colônia/mL).

Foi utilizado PBS com sacarose por ser um meio que se aproxima da constituição da saliva, meio presente no habitat natural da espécie *S. mutans*, sabendo-se ainda que a sacarose é usada pela espécie bacteriana para possibilitar sua adesão a superfícies. Esta suspensão de PBS com sacarose, com cerca de 10<sup>8</sup> UFC/mL, foi usada para preencher os poços de uma placa de poliestireno para cultura de tecidos, onde também foram colocados os

corpos de prova, para a incubação e formação de biofilme. A composição do PBS e do PBS com sacarose estão descritas no Apêndice 2.

### 4.3. FORMAÇÃO DE BIOFILME BACTERIANO *IN VITRO* SOBRE OS CORPOS DE PROVA

Para provocar a formação do biofilme bacteriano sobre os 4 tipos de corpos de prova (resina e resina com nanopartículas em 3 concentrações diferentes), os mesmos foram colocados em poços de uma placa de poliestireno (placa para microculturas). Foi usada uma placa com 24 poços, de fundo arredondado (Nunclon™, Nunc). Os poços foram preenchidos com a suspensão de *S. mutans* em PBS com sacarose padronizada em espectrofotômetro. Na direção vertical foi feita a marcação para os 4 tipos de materiais, e na horizontal foram marcados os tempos de estudo, 1 dia, 4 dias e 7 dias. Todo o teste para contagem de células viáveis foi realizado em triplicata. Primeiramente o experimento foi realizado uma vez, por completo, considerando os três tempos de incubação, e depois foram repetidos mais dois experimentos, concomitantemente. O início do experimento em duplicata é demonstrado na Figura 13.



**Figura 13.** Placa de poliestireno contendo dois corpos de prova para cada intervalo de tempo estudado no experimento, para realização de todo o teste de contagem de células viáveis de maneira duplicada.

Os meios de todos os poços foram trocados após as primeiras 24 h por PBS com sacarose, sem bactérias, e a cada 24 h foram trocados novamente, sucessivamente, para evitar esgotamento de nutrientes. Os meios foram sugados dos poços da placa com ponteiros esterilizados de pipetadores automáticos, e novo meio esterilizado era adicionado da mesma forma.

#### 4.4. AVALIAÇÃO QUANTITATIVA DE CÉLULAS BACTERIANAS VIÁVEIS DOS BIOFILMES

Após os tempos de incubação designados para a formação e desenvolvimento do biofilme, 1 dia, 4 dias e 7 dias, foram realizados os procedimentos de lavagem dos corpos de prova, desagregação do biofilme e sua avaliação quantitativa (ou contagem de UFC, ou, ainda, contagem de células viáveis). Para cada tempo foram realizados os mesmos procedimentos.

Para a lavagem dos materiais, após passado o tempo de incubação desejado, foi retirado o meio (conteúdo de 2 mL) de cada poço, referente a este tempo, sugando-o com um pipetador automático de 1 mL. Em seguida foi injetado 2 mL de PBS esterilizado em cada poço, também com pipetador, para fazer uma lavagem da superfície dos materiais, e ela foi repetida por 3 vezes (Figuras 14 e 15).



**Figura 14.** Remoção do meio líquido dos poços



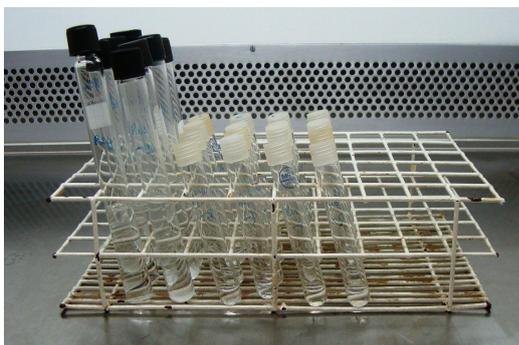
**Figura 15.** Lavagem dos corpos de prova com PBS.

Depois da lavagem os materiais foram tirados dos poços com pinça esterilizada e colocados em um tubo com 10 mL de PBS. Estes tubos foram agitados com auxílio de um agitador *Mortex+* por 1 min, e colocados imersos em água dentro de uma cuba ultrassônica, vista na Figura 16, por 8 min (*Digital Ultrasonic Cleaner*, produzida pela Kondortech, com força de limpeza de 160 W).



**Figura 16.** Cuba de ultrassom usada para provocar a desagregação do biofilme bacteriano aderido aos corpos de prova.

Esse procedimento foi realizado com a finalidade de desagregação do biofilme e liberação das células bacterianas que estavam aderidas ao material, e as células viáveis da solução resultante após este procedimento foram contadas. O método usado para esta contagem foi o das diluições seriadas, onde a partir desta solução inicial, da qual se quer conhecer o número de células, são produzidas várias diluições, e depois plaqueamento das diluições (semeadura sobre meio de cultura sólido), seguida da contagem de unidades formadoras de colônias (UFC) presentes nas placas. A partir da suspensão resultante após a desagregação de biofilme, suspensão considerada inicial para o procedimento de contagem, foram feitas 5 diluições,  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ . Da solução inicial para o tubo com 9 ml de PBS inoculou-se 1 mL, originando a diluição  $10^{-1}$ , e depois de um tubo para o outro inoculou-se 100  $\mu\text{L}$ , pois em cada tubo havia 900  $\mu\text{L}$  de PBS, sendo originadas assim as demais diluições (Figura 17).

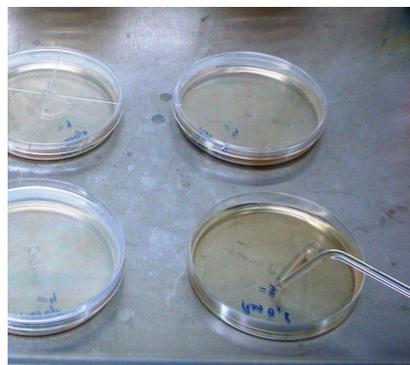


**Figura 17.** Sequência de tubos para a realização da técnica de contagem por diluição seriada, a figura mostra 4 sequências de diluições, uma para cada corpo de prova.

De cada diluição pipetou-se 100  $\mu$ L sobre um meio de cultura contido em placa de *Petri* (90X15 ml), o ágar sacarose (Figura 18), e este inóculo foi espalhado sobre a superfície deste meio com uma alça de *Drigalsky* (Figura 19). A composição do meio de cultura ágar sacarose está descrita no Apêndice 2.

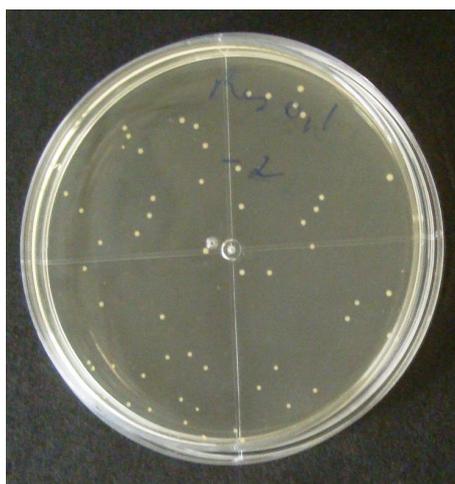


**Figura 18.** Inoculação de 100  $\mu$ L de cada diluição nas placas de *Petri* com meio de cultura sólido.



**Figura 19.** Espalhamento em superfície.

As placas foram incubadas a 37<sup>0</sup>C por 24h, para que ocorresse a multiplicação bacteriana a ponto de surgirem colônias visíveis a olho nu, sendo que cada colônia visível corresponde a uma unidade formadora de colônia que existia inicialmente, no momento da inoculação, após ocorrência da multiplicação celular ao longo do tempo. Segundo esta técnica de contagem deve-se escolher as placas que apresentam de 30 a 300 UFC para cálculo do número de UFC (Figura 20). Este número é multiplicado pelo fator da diluição para se obter o valor de UFC presentes na solução inicial a partir da qual foram feitas as demais diluições em série.



**Figura 20.** Exemplo de uma placa de *Petri* de ágar sacarose que foi usada para a contagem de unidades formadoras de colônias por conter um número de 30 a 300 colônias.

Para cada diluição inoculou-se duas placas de *Petri*, e foi feita a média entre elas, para calcular com esta média o valor do número de células da solução inicial (Figura 21).



**Figura 21.** Para cada diluição foram inoculadas e semeadas duas placas de *Petri* com meio de cultura, para retirada de uma média da contagem de unidades formadoras de colônias entre as duas placas.

Com os valores das contagens foram feitas tabelas que mostram o número de UFC para cada mL. Estes números também foram convertidos em UFC por  $\text{mm}^2$  de material, para facilitar a comparação com outros trabalhos nos quais os resultados possam estar descritos dessa forma. Tal conversão foi obtida multiplicando-se por 10 o valor de UFC contidas em 1 mL, pois o biofilme total de cada corpo de prova foi desagregado em um tubo com 10 mL de PBS, e dividindo-se esse valor pela área total de um corpo de prova cilíndrico. A área total de cada cilindro foi calculada de acordo com as suas medidas e é correspondente a  $75.36 \text{ mm}^2$ . Também foi calculada a porcentagem que os números obtidos sobre as resinas experimentais ou modificadas representam em relação ao número obtido sobre a resina sem nanopartículas de prata, a resina não modificada (controle). Esta porcentagem foi denominada porcentagem de sobrevivência. Isso permite comparar de uma outra forma, ou seja, em termos de porcentagem, o número de células que sobreviveram e permaneceram aderidas sobre as diferentes amostras.

#### **4.5. PREPARO DOS CORPOS DE PROVA PARA ANÁLISE DO BIOFILME POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA.**

A observação microscópica da aderência e formação de biofilme de *S. mutans* sobre a superfície dos materiais foi realizada após os mesmo períodos de tempo em que foram feitos os experimentos de contagem: 24 horas de incubação (1 dia), 96 horas de incubação (4 dias) e 168 horas de incubação (7 dias). Os procedimentos para incubação foram os mesmos em relação ao que foi realizado para o experimento de contagem de células viáveis. Os corpos de prova (um de cada tipo, um de resina e um de cada concentração de partículas) foram colocados nos poços de uma placa de poliestireno, também em uma suspensão bacteriana em PBS com sacarose padronizada, com cerca de  $10^8$  UFC, que foi usada para preencher os poços. A cada 24 h os meios dos poços foram trocados. Após cada tempo de incubação foram

lavados e retirados, cada um a seu tempo, e foram preparados para a observação microscópica. Foi feita a imersão dos corpos de prova em glutaraldeído a 2.5% durante 15 min para a fixação dos microrganismos, seguida da desidratação gradual em séries de álcool (15, 30, 50, 70, 90 e 100%), por 15 minutos cada um. As amostras foram coladas em suporte metálico para a observação (Figura 22). Como as amostras analisadas não apresentam condutividade elétrica, para esta fixação foi empregado um adesivo condutor, necessário para garantir um caminho condutivo. Em seguida as amostras foram metalizadas, cobertas com ouro, com o mesmo objetivo de torná-las condutivas.

Na observação por MEV foi utilizado o microscópio eletrônico de varredura de alta resolução, visto nas Figuras 23 e 24, modelo Philips XL30 FEG (*Field Emission Gun*), produzido pela *FEI Company*, do Laboratório de Caracterização Estrutural do DEMa (LCE-DEMa), UFSCar.



**Figura 22.** Suporte com as amostras.



**Figura 23.** Microscópio eletrônico aberto, com o suporte encaixado na parte central.



**Figura 24.** Microscópio fechado.

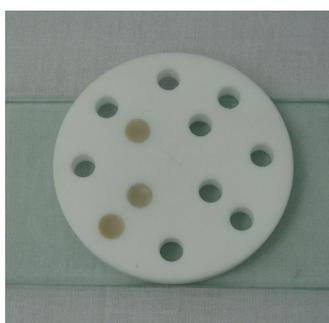
#### 4.6. ENSAIOS DE COMPRESSÃO

Após a realização dos testes microbiológicos, já com os resultados de contagem prontos, foi realizado no Departamento de Engenharia de Materiais da UFSCar um ensaio de compressão, experimento complementar ao experimento microbiológico, com intuito de avaliar se houve prejuízo à resistência mecânica da resina após sua modificação com a inclusão das nanopartículas de prata. Foram feitos corpos de prova em resina e resina com as concentrações de 0,3 % e 0,6 % em massa de nanopartículas (3 amostras), pois os resultados de contagem já haviam demonstrado significativamente um menor número de células bacterianas aderidas nestes dois materiais, em comparação com a resina sem nanopartículas e a resina contendo as mesmas em uma concentração de 0,1 %. Para a avaliação do comportamento mecânico das amostras foi escolhida a realização destes ensaios pelo fato de que as forças que mais incidem sobre as resinas compostas no seu local de aplicação são as forças de compressão, decorrentes da mastigação.

Os corpos de prova para este teste tiveram que ser maiores, para uma boa adaptação na máquina. Foi confeccionada uma matriz em Teflon, material antiaderente, vazada, com furos nas dimensões desejadas para moldar os corpos de prova (Figura 25). A partir de uma placa de Teflon de 1 cm de altura foram feitos furos circulares de 1 cm de diâmetro. Assim, após a condensação das resinas nos espaços da matriz, em pequenos incrementos, e posterior fotopolimerização, os corpos de prova resultaram em amostras cilíndricas, de base circular com 1 cm de diâmetro, e com altura de 1 cm (Figura 26). Matrizes de Teflon já foram empregadas para a acomodação da resina composta e confecção de corpos de prova (**Reis, 2003**).

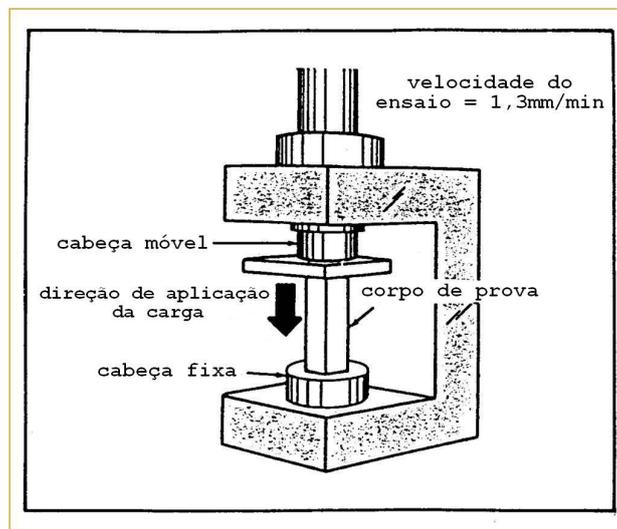


**Figura 25.** Na imagem da esquerda vê-se a matéria-prima (placa de Teflon) usada para a confecção da matriz e à direita ela já usinada, com as perfurações.



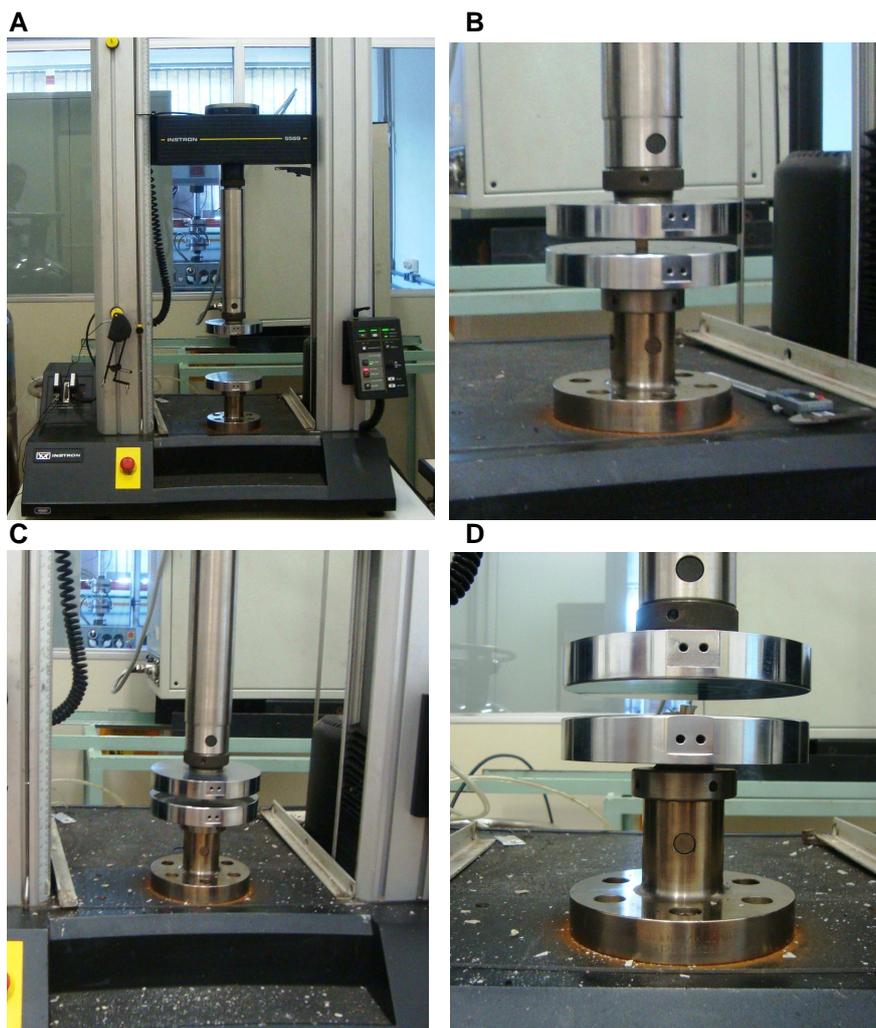
**Figura 26.** Matriz com alguns espaços já preenchidos com resina composta.

Os ensaios de compressão foram realizados com o emprego da Máquina Universal de Ensaio *Instron*, modelo 5569, do Laboratório de Polímeros, do Departamento de Engenharia de Materiais da UFSCar. O procedimento adotado foi baseado na Norma **ASTM D 695-10 (2010)**, sendo a velocidade dos ensaios de compressão igual a 1,3 mm/min e uma célula de carga de 10 KN. A Figura 27 apresenta uma ilustração sobre o ensaio de compressão. A Figura 28 mostra o equipamento onde os ensaios foram executados.



**Figura 27.** Ilustração do dispositivo experimental recomendado para a realização de ensaio de compressão.

Três parâmetros do ensaio de compressão foram medidos para as três amostras: a deformação de ruptura, a tensão de ruptura, e o módulo de elasticidade. A deformação de ruptura avalia a capacidade de deformação do material antes da sua ruptura ou fratura. A tensão de ruptura em compressão fornece a força mecânica por unidade de área necessária para romper o material, ou seja, a tensão necessária para o rompimento ou fratura, que foi considerada como o primeiro evento destrutivo da amostra solicitada em compressão (ponto de máximo em tensão). A força aplicada sobre um material dividida pela área da superfície em que incide resulta em uma tensão. A unidade mais usada para a tensão é o Pascal (Pa), correspondente a Newton por  $m^2$  ( $N/m^2$ ), por ser consistente com o Sistema Internacional de Unidades (SI). Geralmente os resultados são descritos em megapascal (MPa). Pode-se dizer que se um material fraturou a um nível de tensão de 100 MPa, a resistência à compressão desse material é 100 MPa. Porém, para uma análise mais complexa do desempenho do material frente às forças de compressão é preciso avaliar os três parâmetros, e não só a resistência à compressão. O módulo de elasticidade em compressão é uma medida da rigidez da amostra ensaiada, e é medido a partir da curva formada em um diagrama tensão/deformação, e por isso também tem como unidade o MPa. Quanto maior o módulo de elasticidade, mais rígido é o material.



**Figura 28.** A mostra o equipamento utilizado para a realização do ensaio de compressão. Em B é possível visualizar o corpo de prova em posição antes do início da aplicação da força compressiva sobre ele. Em C podem ser vistos os estilhaços da amostra espalhados pela máquina após a sua fratura e em D a amostra fraturada pode ser observada mais de perto.

## 5. RESULTADOS

### 5.1. CONTAGEM DE CÉLULAS VIÁVEIS

As Tabelas 1, 2 e 3 apresentam a média dos 3 experimentos de contagem de células viáveis realizados para cada tempo de incubação analisado, pois eles foram realizados em triplicata, e o desvio padrão, para assim permitir a comparação da adesão bacteriana entre os quatro materiais testados. A porcentagem indicada entre parênteses nas tabelas é a concentração em massa de nanopartículas de prata nas resinas. A partir destas tabelas foram feitos gráficos (Figuras 29 a 32), que são mostrados a seguir, onde as barras colocadas representam o desvio padrão referente a cada média do resultado, para cada material.

**Tabela 1.** Células viáveis de *Streptococcus mutans* recuperadas do biofilme aderido às superfícies dos corpos de prova após 24 horas de incubação.

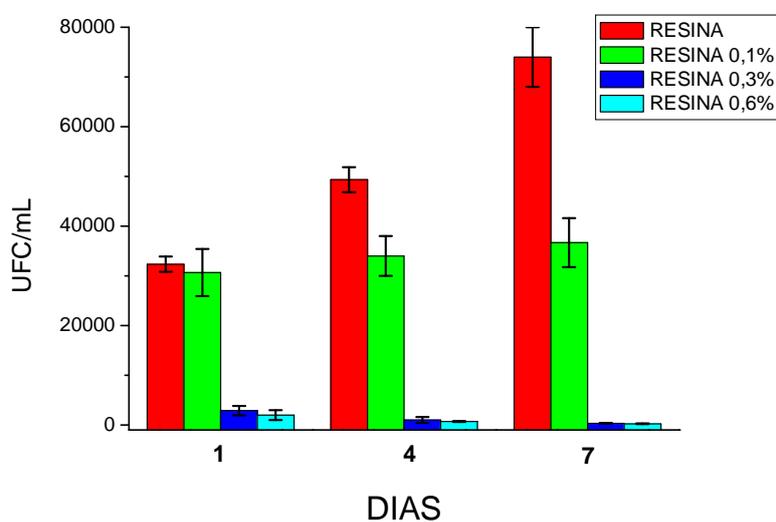
Material	UFC		Porcentagem de sobrevivência (%)
	/mL	/mm <sup>2</sup>	
Resina	$3,2 \times 10^4 \pm 0,2 \times 10^4$	$4,3 \times 10^3 \pm 0,2 \times 10^3$	100
Resina (0,1%)	$3,1 \times 10^4 \pm 0,5 \times 10^4$	$4,1 \times 10^3 \pm 0,6 \times 10^3$	94,8
Resina (0,3%)	$2,9 \times 10^3 \pm 1,0 \times 10^3$	$3,8 \times 10^2 \pm 1,3 \times 10^2$	9,0
Resina (0,6%)	$2,0 \times 10^3 \pm 1,0 \times 10^3$	$2,7 \times 10^2 \pm 1,3 \times 10^2$	6,2

**Tabelas 2.** Células viáveis de *Streptococcus mutans* recuperadas do biofilme aderido às superfícies dos corpos de prova após 4 dias de incubação.

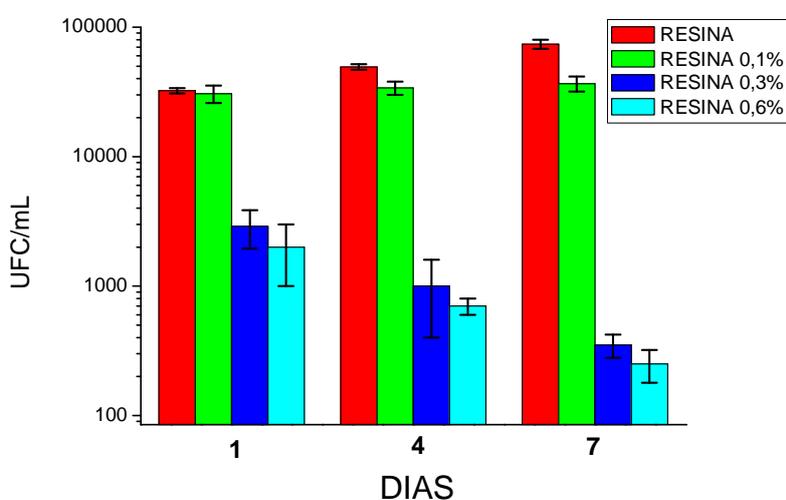
Material	UFC		Porcentagem de sobrevivência (%)
	/mL	/mm <sup>2</sup>	
Resina	$4,9 \times 10^4 \pm 0,3 \times 10^4$	$6,5 \times 10^3 \pm 0,3 \times 10^3$	100
Resina (0,1%)	$3,4 \times 10^4 \pm 0,4 \times 10^4$	$4,5 \times 10^3 \pm 0,5 \times 10^3$	68,9
Resina (0,3%)	$1,0 \times 10^3 \pm 0,6 \times 10^3$	$1,3 \times 10^2 \pm 0,8 \times 10^2$	2,0
Resina (0,6%)	$7,0 \times 10^2 \pm 1,0 \times 10^2$	$0,9 \times 10^2 \pm 0,1 \times 10^2$	1,4

**Tabela 3.** Células viáveis de *Streptococcus mutans* recuperadas do biofilme aderido às superfícies dos corpos de prova após 7 dias de incubação.

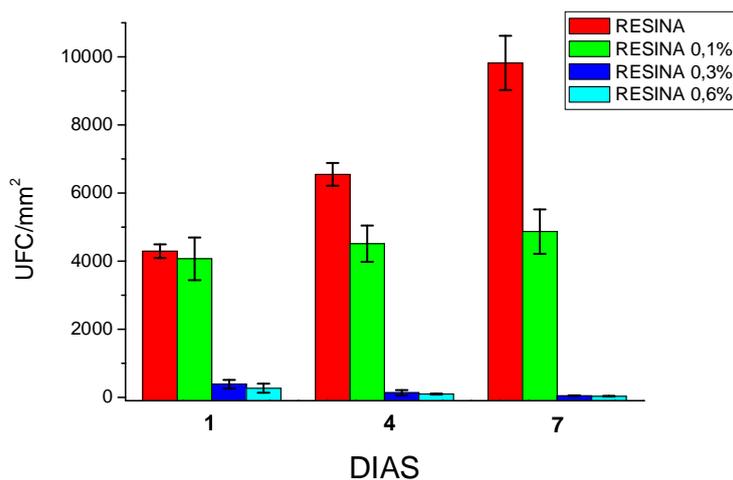
Material	UFC		Porcentagem de sobrevivência (%)
	/mL	/mm <sup>2</sup>	
Resina	$7,4 \times 10^4 \pm 0,6 \times 10^4$	$9,8 \times 10^3 \pm 0,8 \times 10^3$	100
Resina (0,1%)	$3,7 \times 10^4 \pm 0,5 \times 10^4$	$4,9 \times 10^3 \pm 0,7 \times 10^3$	49,5
Resina (0,3%)	$3,5 \times 10^2 \pm 0,7 \times 10^2$	$0,5 \times 10^2 \pm 0,1 \times 10^2$	0,5
Resina (0,6%)	$2,5 \times 10^2 \pm 0,7 \times 10^2$	$0,3 \times 10^2 \pm 0,1 \times 10^2$	0,3



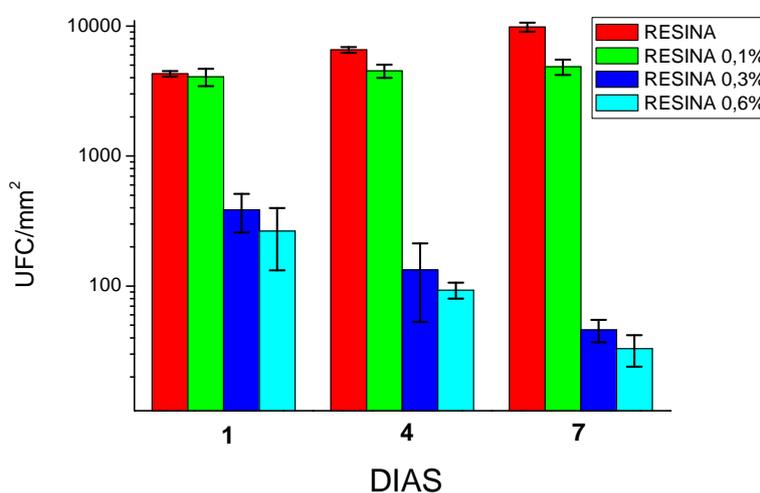
**Figura 29.** Unidades formadoras de colônias por mL para os quatro materiais após os três tempos de incubação.



**Figura 30.** Unidades formadoras de colônias por mL, em escala logarítmica, para os quatro materiais após os três tempos de incubação.



**Figura 31.** Unidades formadoras de colônias por  $\text{mm}^2$  para os quatro materiais após os três tempos de incubação.



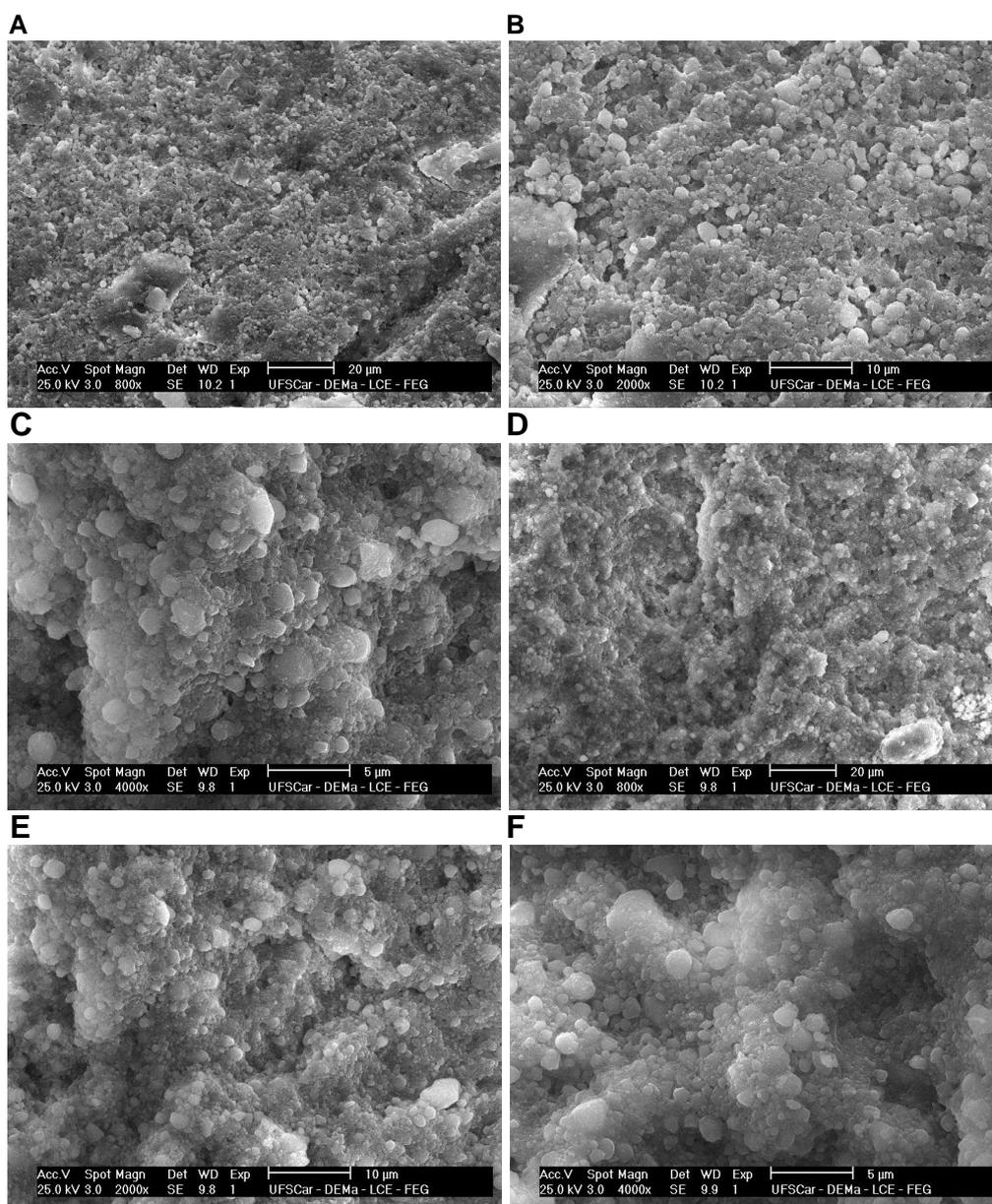
**Figura 32.** Unidades formadoras de colônias por  $\text{mm}^2$  em escala logarítmica, para os quatro materiais após os três tempos de incubação.

Os resultados de contagem de células viáveis mostraram que, após 1 dia, considerando-se a média e desvio padrão, o número de UFC/mL foi menor para resina 0,3 % e 0,6 % (mas sem diferença entre estas duas) em relação à resina e resina 0,1 % e à resina sem prata ou comercial (também sem diferença entre as mesmas). Após 4 dias verificou-se que o número de UFC/mL foi menor sobre resina 0,1 % do que sobre resina sem prata, e foi menor ainda nas resinas 0,3 % e 0,6 % (mas sem diferença entre estas duas concentrações) em relação à resina 0,1 %. Após 7 dias o número de UFC sobre resina 0,1 % foi menor do que sobre a resina, e sobre as resinas nas concentrações de 0,3 % e 0,6 % o valor foi menor ainda, em relação à resina 0,1 %. Não se pode afirmar que entre as duas, 0,3 e 0,6 %, houve diferença, considerando o desvio padrão. Quanto ao número de UFC/  $\text{mm}^2$  pode-se afirmar o mesmo sobre essa comparação entre os quatro materiais testados, visto que se tratou apenas de uma conversão dos valores para que eles pudessem ser analisados de uma outra forma, em relação à superfície dos materiais.

## 5.2. VISUALIZAÇÃO DO BIOFILME POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

### 5.2.1. Imagens da superfície da resina composta sem bactérias

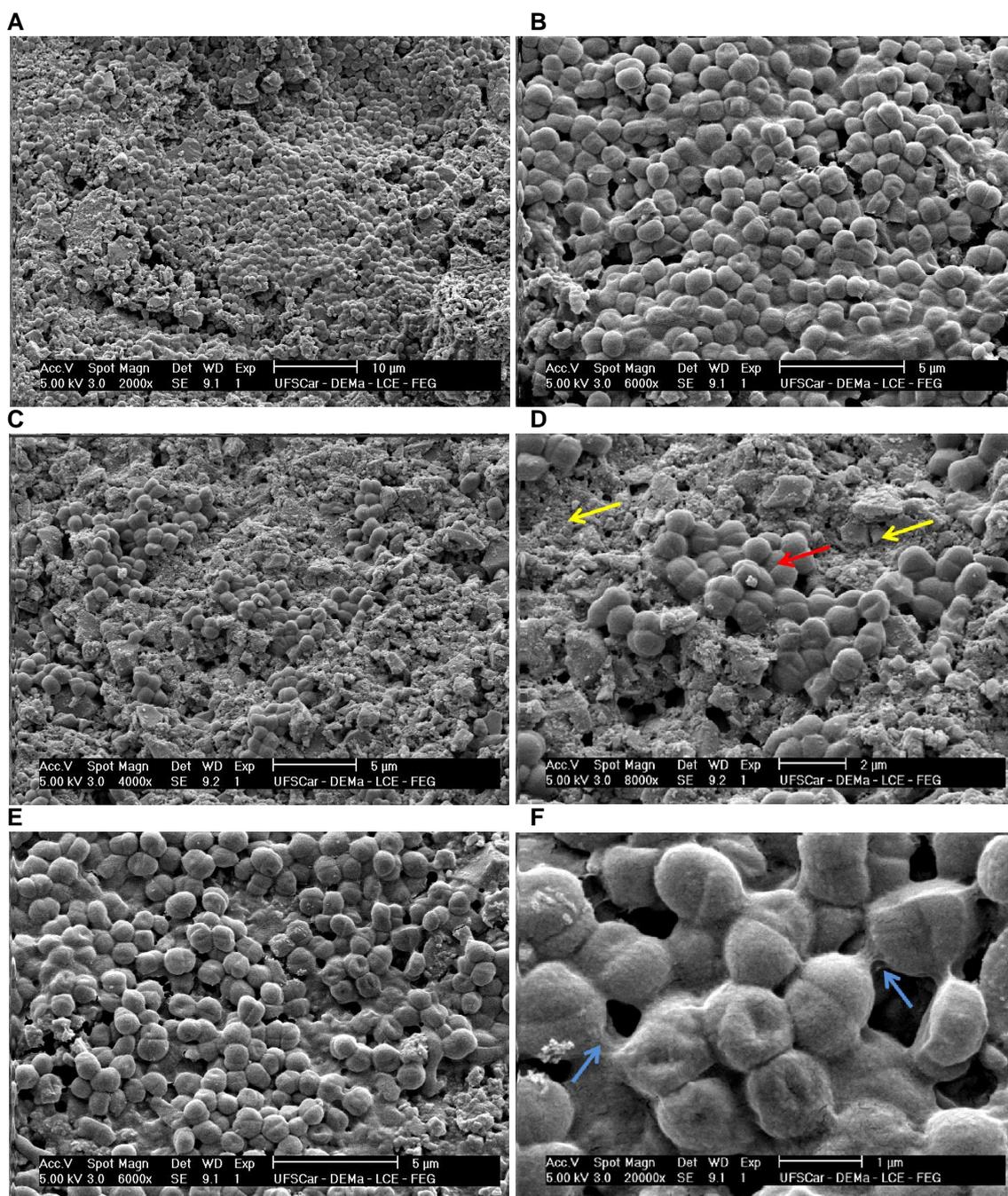
As imagens da Figura 33 permitem verificar o aspecto que a resina composta apresenta, bastante irregular, possibilitando a diferenciação entre regiões com e sem bactérias nas demais imagens, que foram feitas a partir dos corpos de prova onde provocou-se a formação de biofilme bacteriano, após a incubação em suspensão com *Streptococcus mutans*.



**Figura 33.** Imagens da resina composta fotopolimerizável, não modificada, obtidas de dois corpos de prova que não foram incubados em suspensão bacteriana. Os aumentos de cada imagem são indicados na targeta. Nas imagens **A**, **B**, e **C**, vemos uma mesma região do primeiro corpo de prova de resina, em ordem crescente de aumento. Em **D**, **E** e **F**, pode ser vista uma mesma região de um segundo corpo de prova de resina, também vários aumentos.

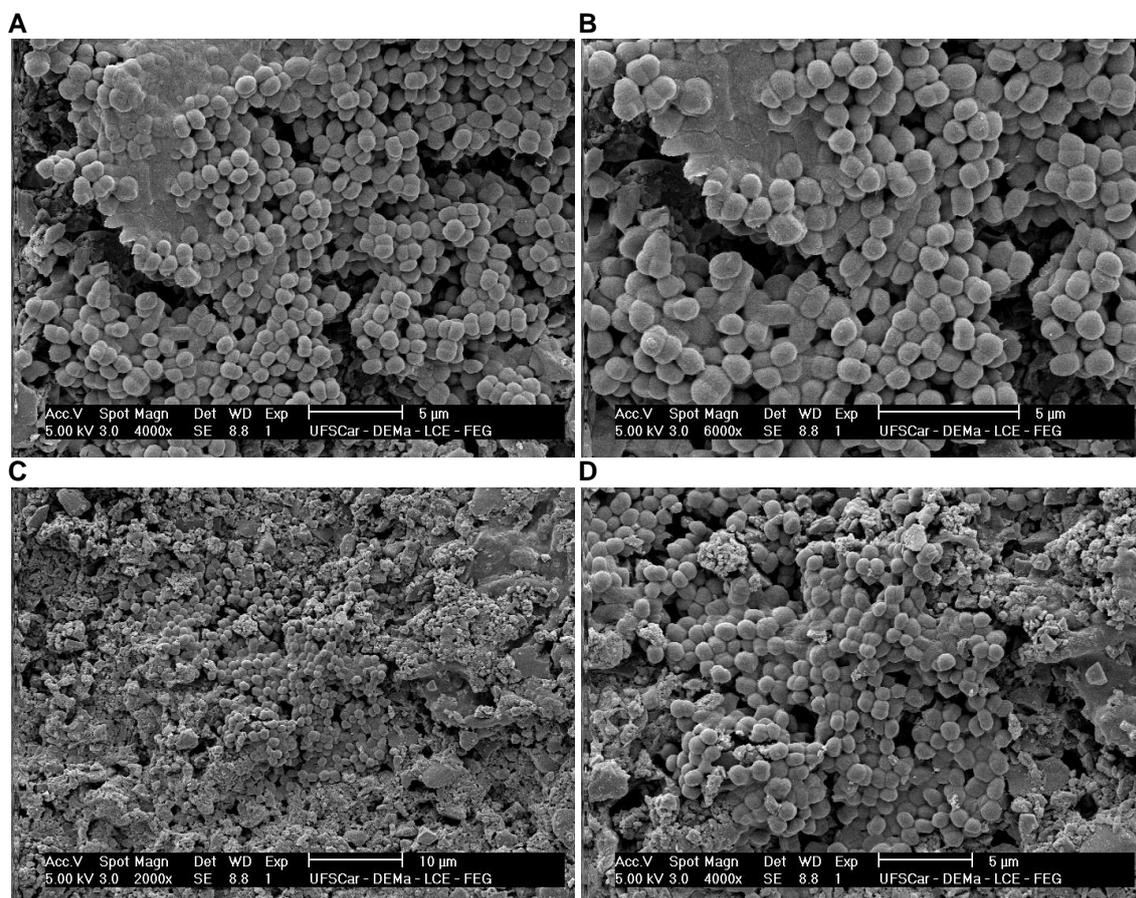
### 5.2.2. Imagens dos corpos de prova incubados por 1 dia

Nas imagens de *resina composta não modificada, sem prata* (Figura 34), é possível verificar a presença abundante de células bacterianas aderidas à superfície, e unidas entre si, situação que corresponde ao início da formação de biofilme bacteriano sobre a resina.



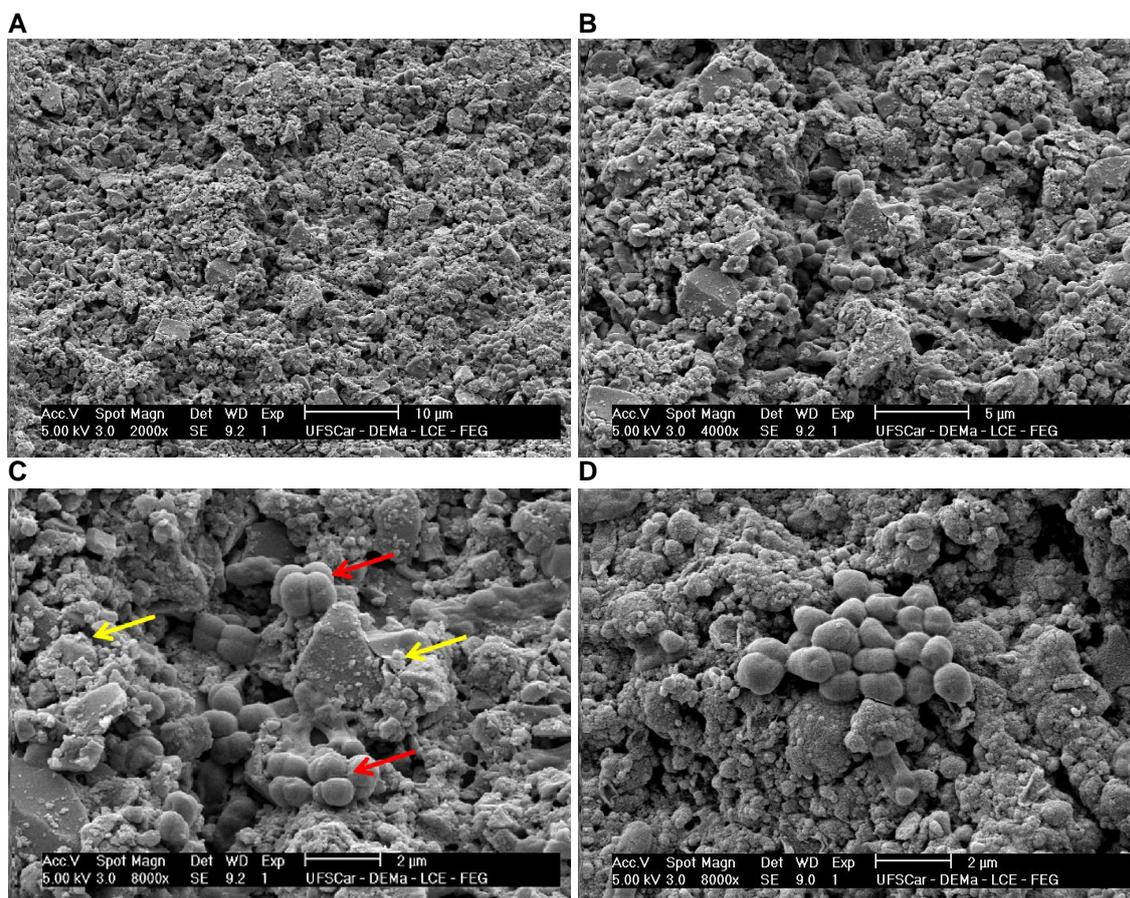
**Figura 34.** Imagens de três regiões focalizadas de um corpo de prova de resina composta, que ficou incubado em suspensão bacteriana durante 1 dia. **A** mostra um grupo de células de *S. mutans* sobre a resina, com grande número de células aderidas entre si e à superfície (2000x). Em **B** vemos este mesmo grupo em maior aumento (6000x). Em **C** estão alguns grupos celulares de uma outra região do mesmo corpo de prova (4000x). Em **D** esta região é vista em um maior aumento (8000x), onde a seta vermelha indica as células e as setas amarelas o material (a resina). **E** mostra outro grupo celular, abundante em células bacterianas (6000x), que foi focalizado em um aumento maior em **F** (20000x) para permitir a observação de matriz extracelular polissacarídica (indicada por setas azuis), que já está presente, unindo as células.

Situação semelhante pode ser visualizada através das imagens da superfície da **resina composta modificada**, com uma a concentração de **0,1 % de nanopartículas de prata**, em massa (Figura 35). As nanopartículas de prata não podem ser visualizadas nas imagens apresentadas neste trabalho, pois para isso seria necessária uma maior resolução das mesmas ou o uso da Microscopia Eletrônica de Transmissão.

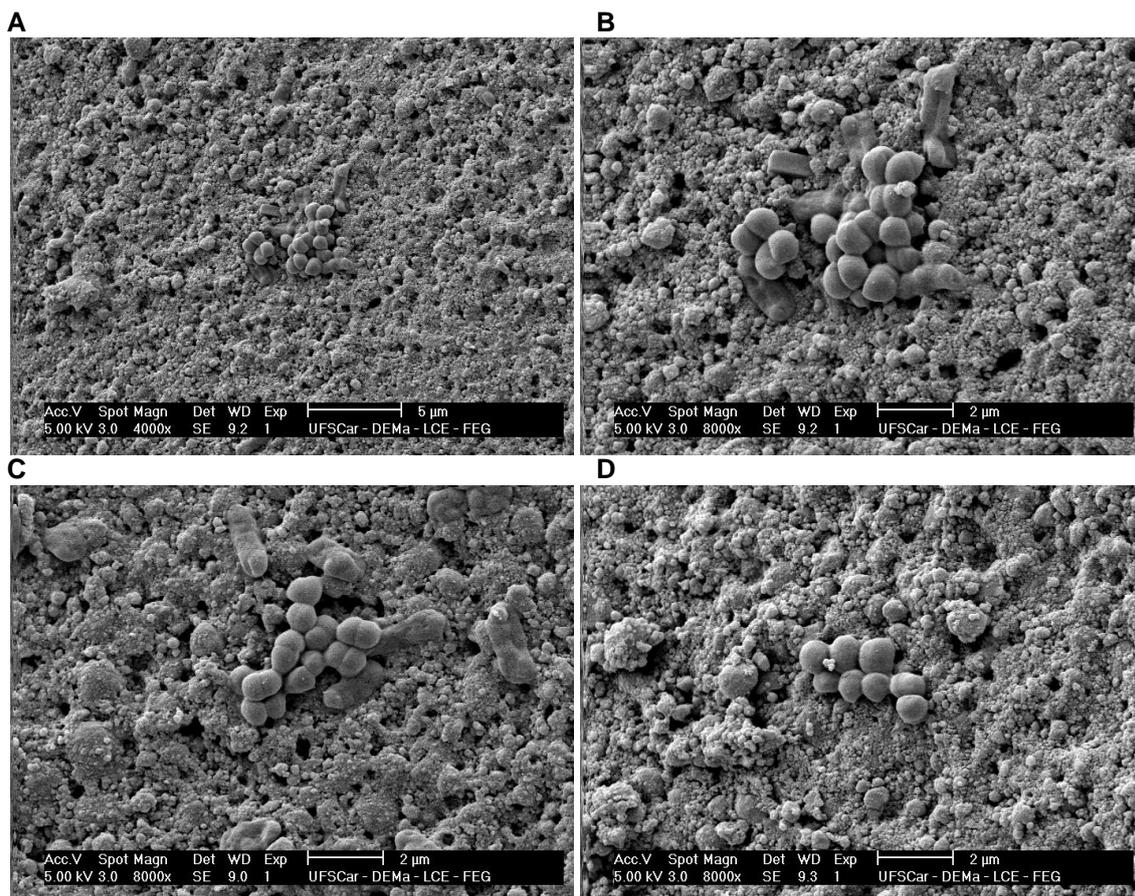


**Figura 35.** Imagens de duas regiões focalizadas e fotografadas de um corpo de prova de resina composta com 0,1 % de nanopartículas de prata, que ficou incubado por 1 dia. Em A pode ser visto um grupo de células de *S. mutans* contendo muitas células aderidas entre si e à superfície (4000x). B mostra este mesmo grupo em maior aumento (6000x). Em C está focalizado outro grupo celular, de uma outra região do mesmo corpo de prova (2000x), a qual é visível em um maior aumento em D (4000x).

Sobre a superfície da **resina composta com 0,3 % de nanopartículas de prata** foram encontrados poucos grupos celulares em toda a superfície deste corpo de prova analisado que podia ser varrida pelo microscópio eletrônico, e com menor número de células por grupo (Figura 36). Sobre a superfície da **resina composta com 0,6 % de nanopartículas de prata** situação semelhante foi encontrada (Figura 37).



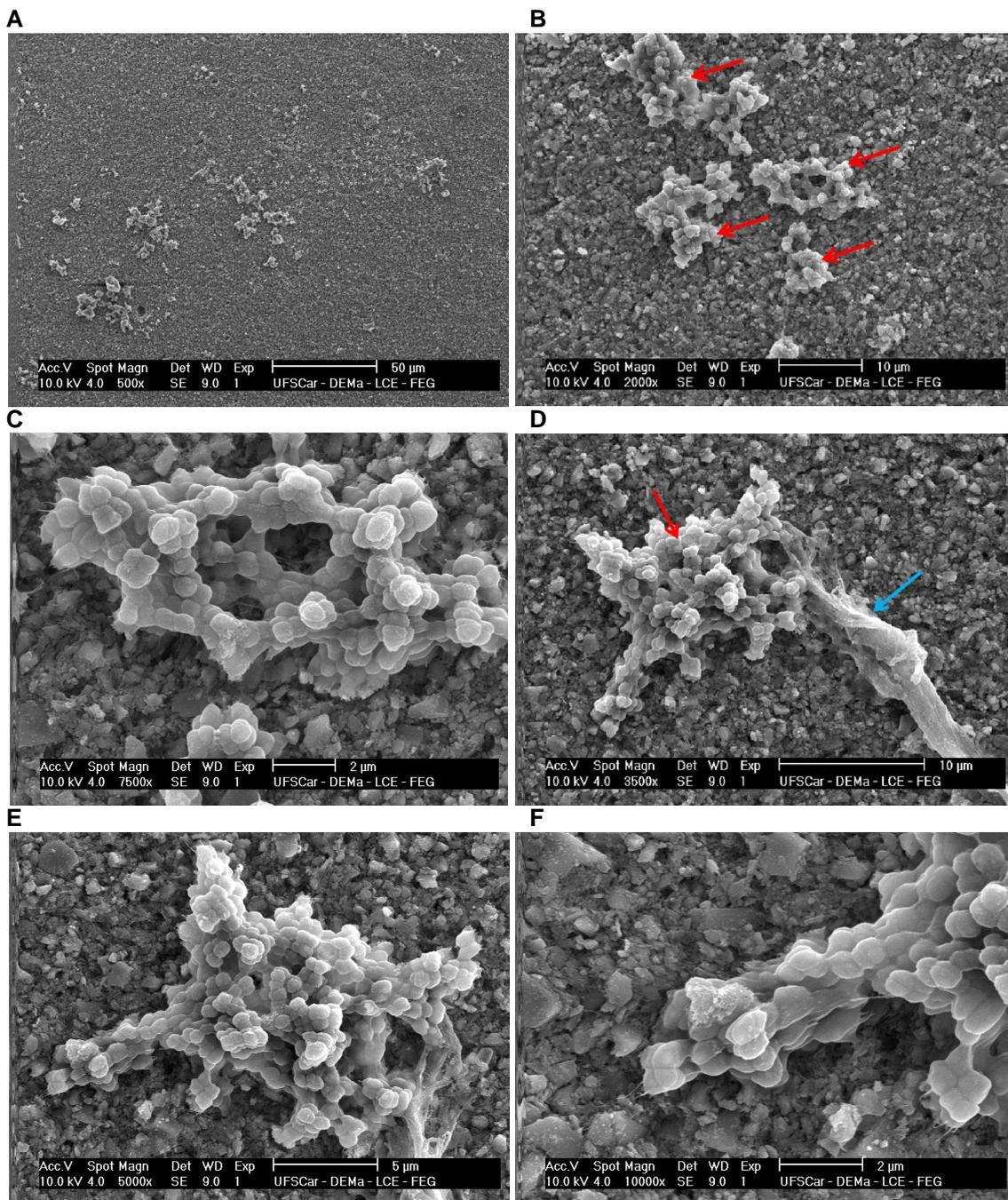
**Figura 36.** Imagens de duas regiões focalizadas e fotografadas de um corpo de prova de resina composta com 0,3 % de nanopartículas de prata, que ficou incubado por 1 dia. Em **A** se encontra um grupo celular que pode ser visto em maior aumento na imagem **B** (4000x). Em **C** esse mesmo grupo está focalizado em maior aumento (8000x), onde as setas vermelhas indicam as células, e as setas amarelas o material (a resina). Em **D** observa-se outro grupo celular, contendo pequeno número de células (8000x).



**Figura 37.** Imagens da superfície de um corpo de prova de resina composta com 0,6 % de nanopartículas de prata, que ficou incubado por 1 dia. Em **A** se encontra um grupo celular que pode ser visto em um maior aumento na imagem **B** (8000x). Em **C** outro grupo composto por poucas células bacterianas está focalizado (8000x). Em **D** observa-se outro grupo celular, também contendo pequeno número de células (8000x).

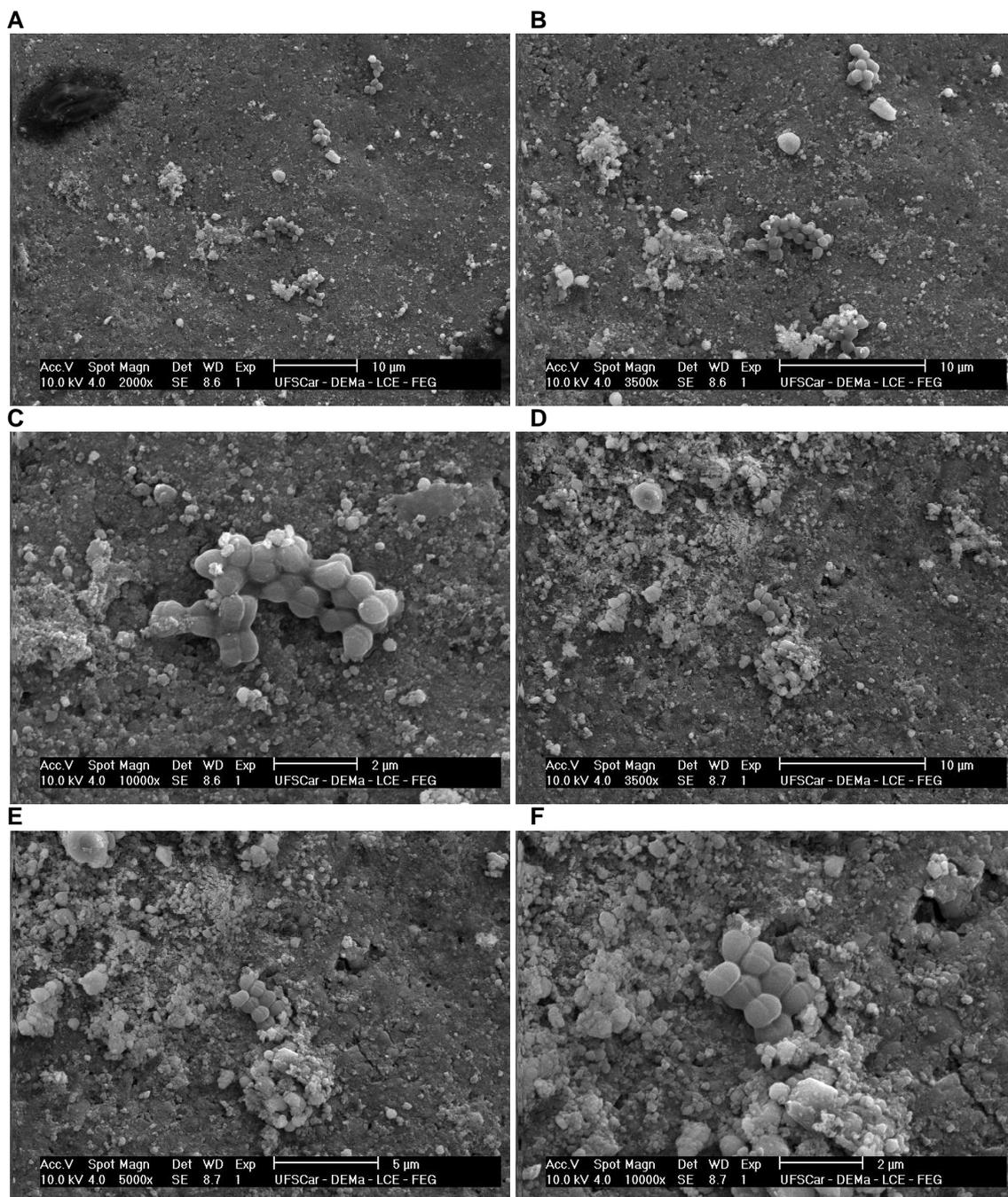
### 5.2.3. Imagens dos corpos de prova incubados durante 4 dias

Os conjuntos celulares focalizados em **resina, sem prata**, mostram uma agregação bacteriana complexa, madura, com matriz extracelular envolvendo e unindo as células, e com muitas células, como pode ser visto na Figura 38. As células apresentam um arranjo com ramificações e formação de canais ou espaços em meio a este arranjo.



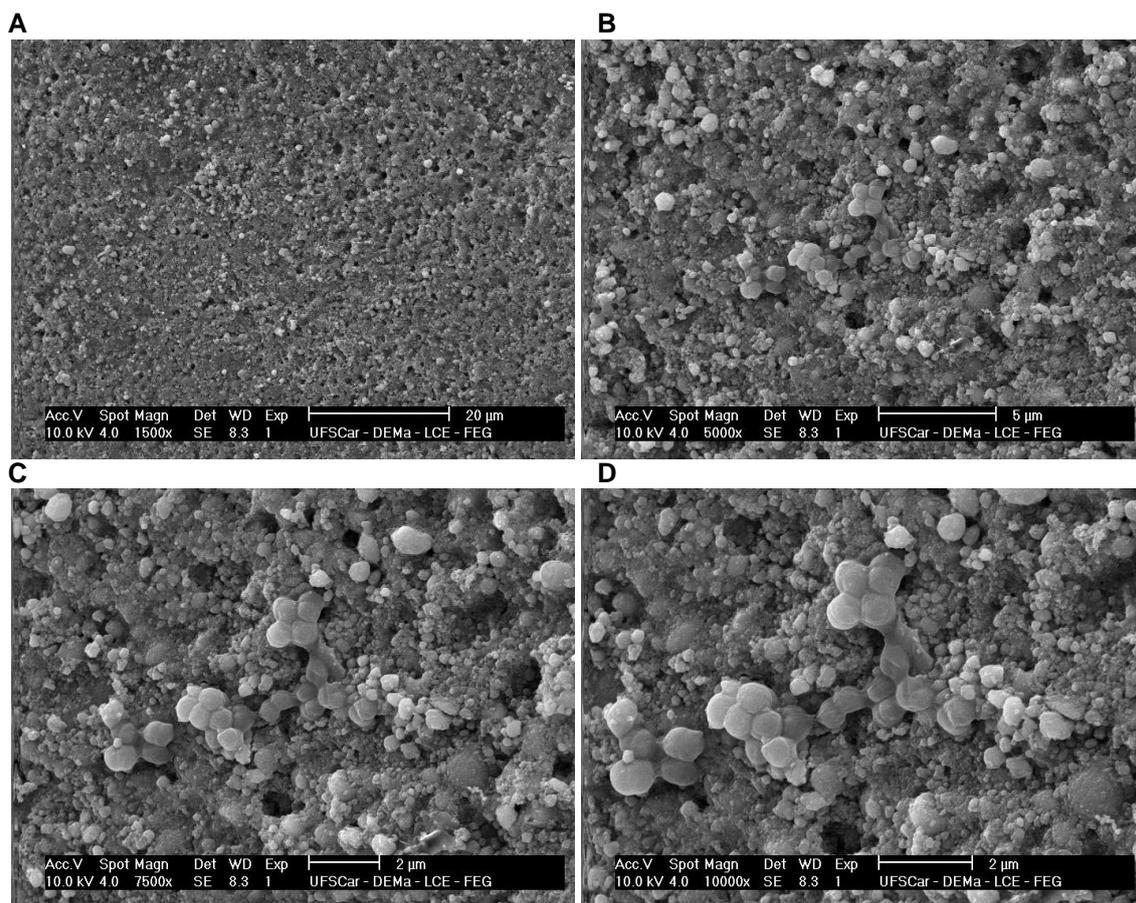
**Figura 38.** Imagens da superfície de um corpo de prova de resina composta não modificada (sem prata), que permaneceu incubado por 4 dias. A mostra vários grupos de células de *S. mutans* sobre a resina. Em B vemos quatro deles em maior aumento (2000x), indicados pelas setas vermelhas. Em C pode ser visto um dos grupos celulares (7500x), o qual possui grande número de células, bem unidas por polissacarídeo extracelular e arranjadas entre si de forma que ficaram estruturados canais para passagem de fluido, típicos de um biofilme maduro. Em D é visível uma segunda região focalizada da superfície da resina, podendo-se observar também um grande grupo celular, com muitas células, apontadas pela seta vermelha. A matriz extracelular que une as células entre si e as células à superfície está presente em abundância na região inferior direita da fotomicrografia (3500X), apontada pela seta azul. Em E as células são focalizadas em um maior aumento (5000x), e se apresentam em um arranjo complexo, com ramificações de células aglomeradas e canais (espaços) que permitem a passagem de líquido através do conjunto. Em F estão focalizadas as células de uma de suas ramificações.

Sobre a **resina com 0,1% de nanopartículas de prata** os conjuntos celulares focalizados apresentam menor número de células por grupo (Figura 39). Não foram encontrados, sobre a superfície abrangida pelo microscópio e observada, grupos com muitas células como aqueles vistos em resina, mas pode-se ver vários grupos celulares na primeira região focalizada, mostrada na Figura 39.



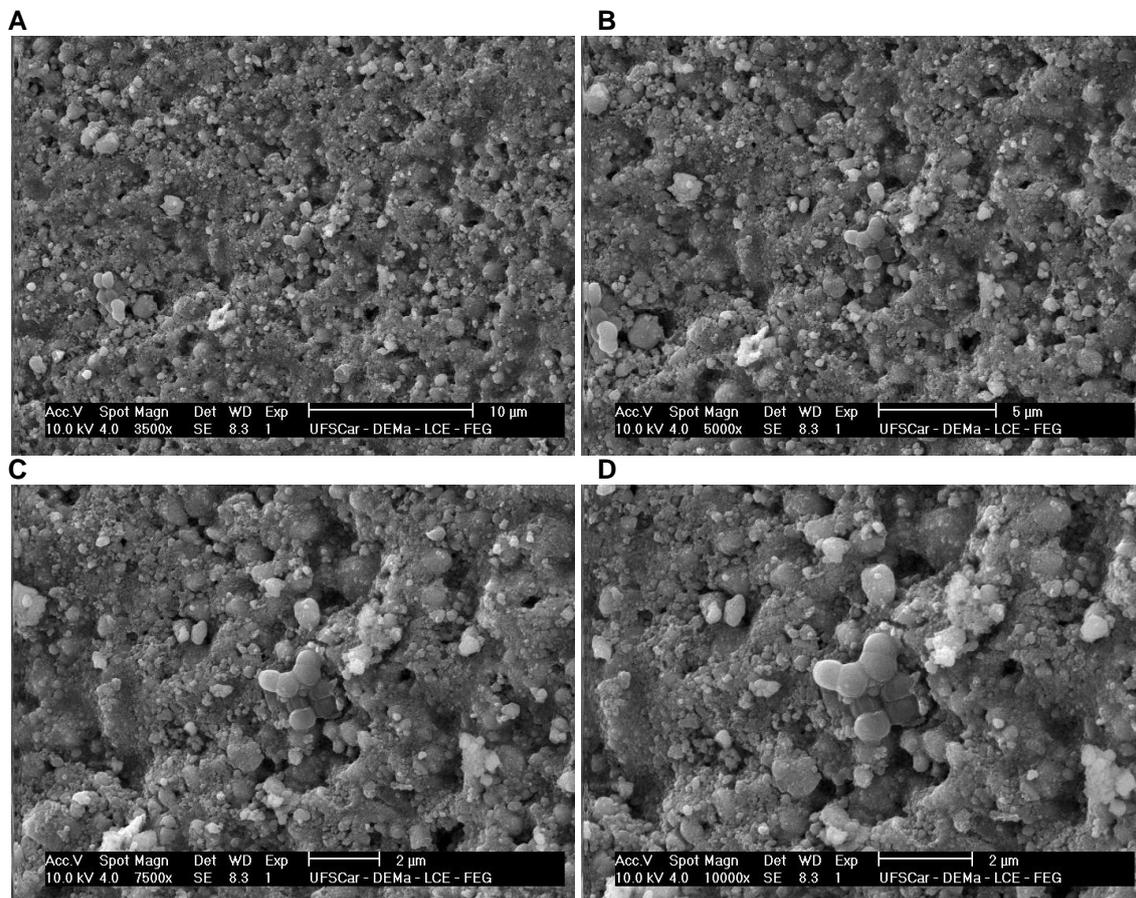
**Figura 39.** Superfície da resina com uma concentração de 0,1 % de nanopartículas de prata, que ficou incubada por 4 dias. Em **A** está focalizada uma primeira região deste corpo de prova, e são vistos vários grupos celulares (2000X). Eles estão focalizados em maior aumento em **B** (3500x). Em **C** um deles está focalizado, no centro, em maior aumento (10000x). **D** mostra uma segunda região focalizada da superfície de resina a 0,1 %, na qual vemos outros grupos celulares. **E** mostra um aumento maior do mesmo local (5000x). Em **F** o grupo central é focalizado, em maior aumento (10000x), podendo-se verificar nesta última imagem que as células estavam em processo de divisão.

Sobre a **resina com a concentração de 0,3 % de nanopartículas de prata** (Figura 40) não foram encontrados outros conjuntos celulares, na superfície que podia ser varrida pelo microscópio, deste corpo de prova, além dos que podem ser vistos na Figura 40. As células estão agregadas de uma forma não complexa e com poucas células, diferentemente como foi observado sobre a resina sem prata, onde havia muitas células por grupo e elas se mostravam bem unidas entre si, formando aglomerados e ramificações.



**Figura 40.** Região da resina a 0,3 % que foi focalizada por apresentar um conjunto celular bacteriano aderido em sua superfície, após 4 dias de incubação. Em **A** não são visualizados grupos celulares, apenas material e aglomerados de cargas. Em **B** podem ser vistos dois grupos celulares (5000x), que estão em maior aumento e podem ser melhor visualizados em **C** (7500X). A imagem **D** focaliza melhor as células unidas destes conjuntos celulares, em meio aos aglomerados de cargas do material, os quais muitas vezes se assemelham às próprias células (10000X). Nas demais regiões analisadas deste corpo de prova não foram encontrados outros conjuntos celulares, apenas se observou a superfície do material, com sua característica típica.

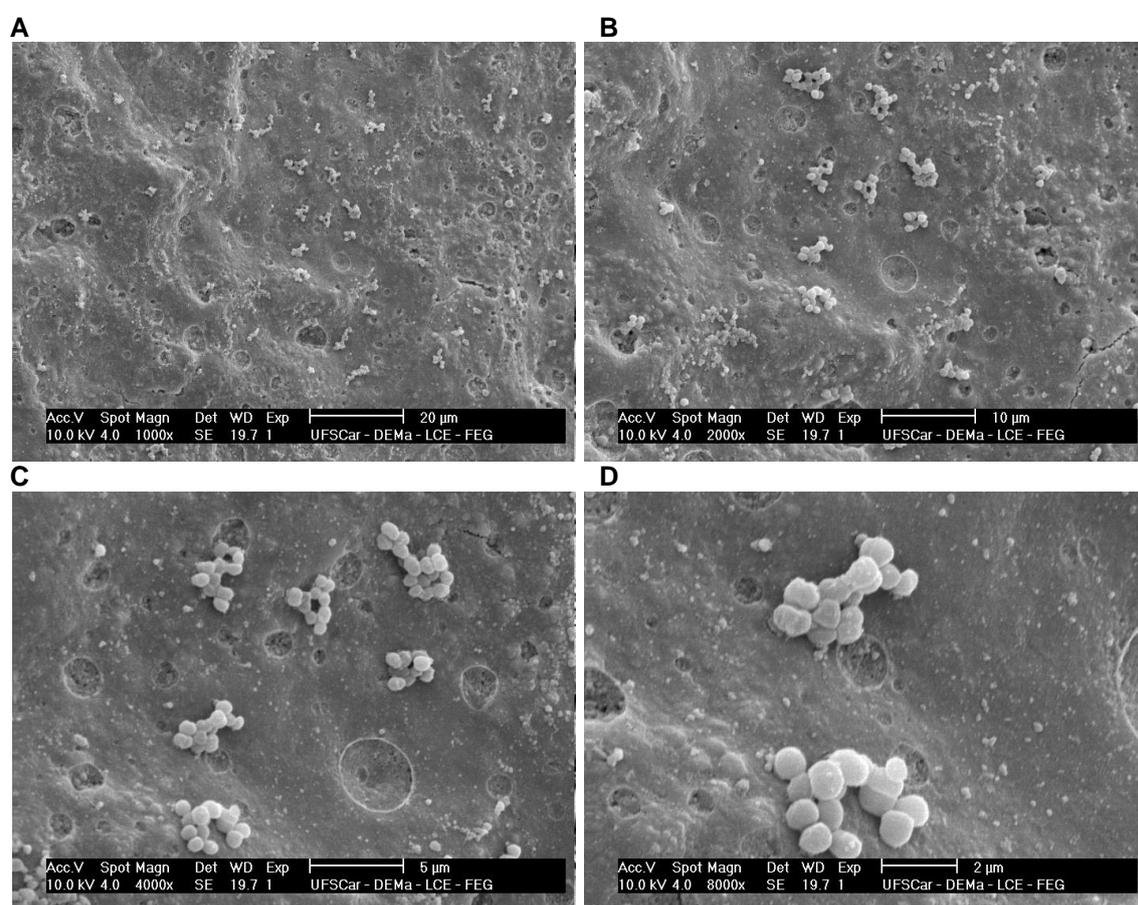
Na superfície da **resina com uma concentração de 0,6 % em nanopartículas de prata** (Figura 41) também não foi encontrado outro conjunto celular em toda a superfície que podia ser varrida pelo microscópio, neste corpo de prova. O conjunto celular visto nesta Figura apresenta uma agregação não complexa e com poucas células bacterianas.



**Figura 41.** Imagens de uma mesma região focalizada da superfície da resina a 0,6 %, que ficou incubada por 4 dias. Em A está presente um conjunto celular, no centro, que dificilmente pode ser visto, mas que em B e C torna-se visível, sendo B e C imagens exatamente da mesma região, em maiores aumentos (5000x e 7500x, respectivamente). Em D as células são vistas num aumento de 10000x. Imagens de outras regiões da superfície da resina a 0,6 % também foram analisadas mas não havia outros conjuntos celulares aderidos.

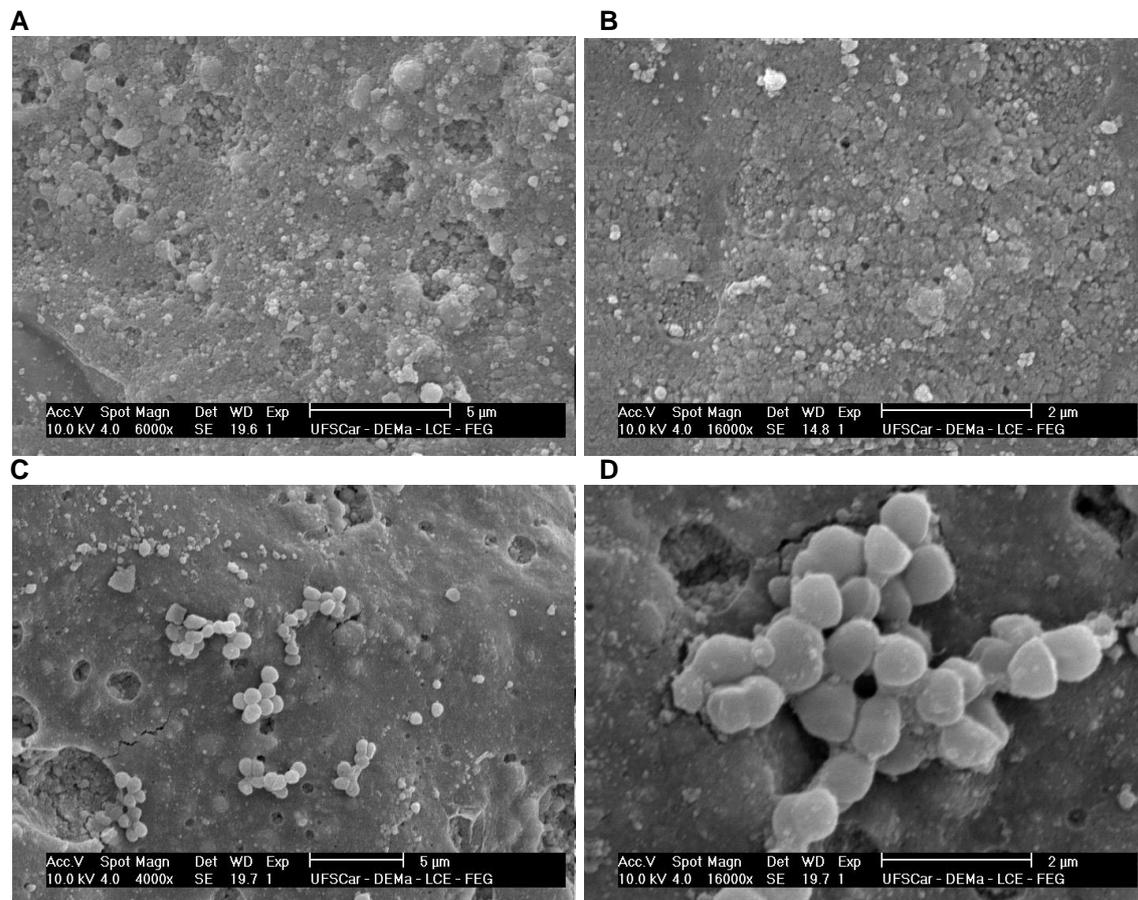
#### 5.2.4. Imagens dos corpos de prova incubados por 7 dias

Vários conjuntos celulares puderam ser focalizados sobre a **resina, sem prata**, na área varrida pelo microscópio eletrônico de um corpo de prova que permaneceu 7 dias incubado em meio de cultura líquido, como mostra a Figura 42. Após 7 dias o biofilme tende a se desmanchar porque a espessura já é muito grande, e começa a ocorrer grande dificuldade para o transporte e absorção de nutrientes, tendo início uma dispersão de células que vão iniciar novos agregados celulares em outros locais da superfície. Foi possível verificar a presença destes novos e pequenos grupos nas fotomicrografias realizadas após 7 dias de incubação sobre resina e sobre resina com a concentração de 0,1 % de nanopartículas de prata (Figuras 42 e 43, respectivamente), pois eles apresentam menos células e são menos complexos do que os vistos nas fotos referentes 4 dias de incubação.



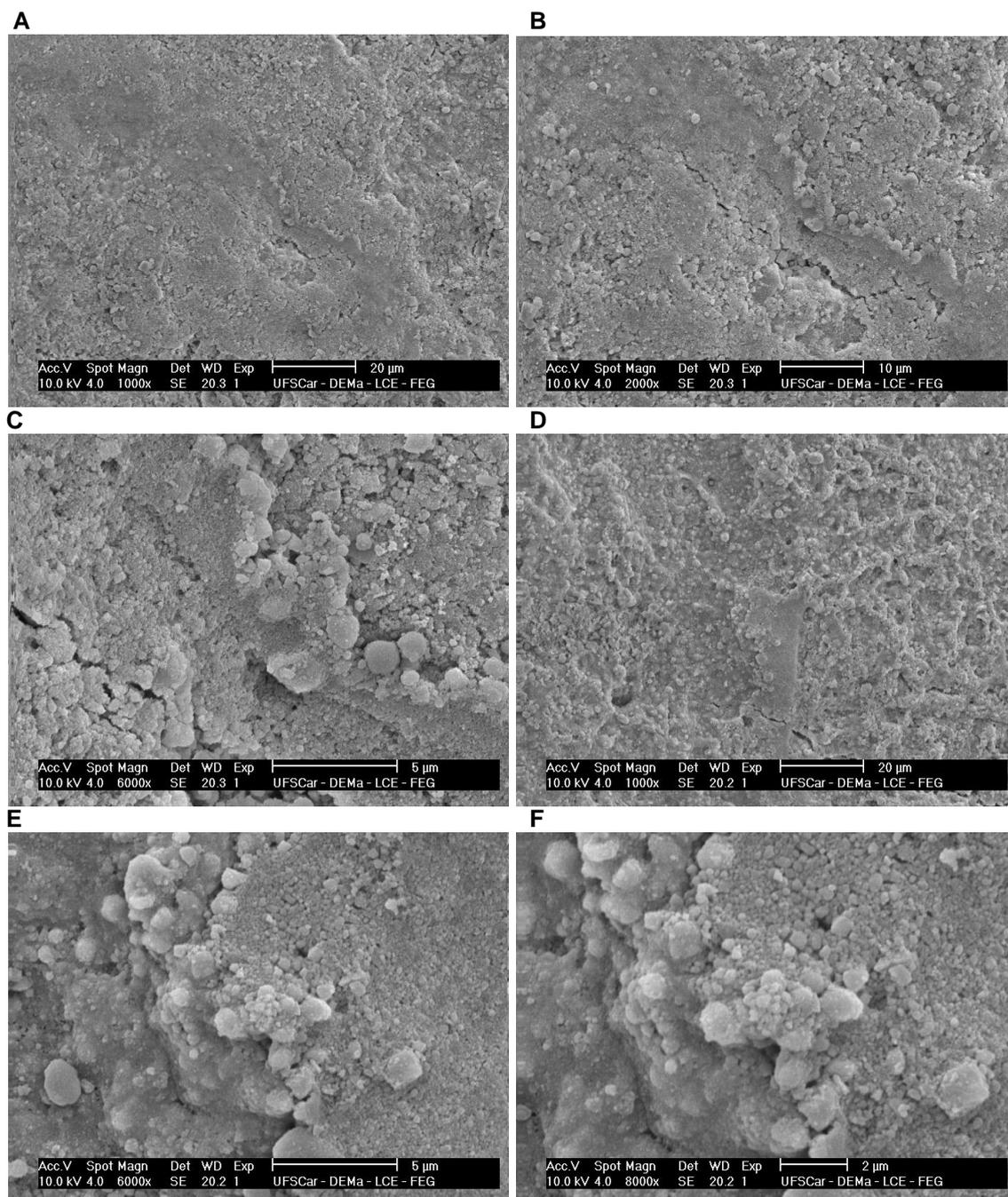
**Figura 42.** Região da superfície de resina após 7 dias de incubação. As imagens **A**, **B** e **C** mostram a mesma região em aumentos crescentes, sendo possível observar vários grupos celulares sobre o material. Em **D** são vistos mais dois grupos, em aumento ainda maior (8000x).

Sobre a **resina com 0,1% de nanopartículas de prata** também foram encontrados alguns grupos celulares na superfície analisada do corpo de prova, vistos na Figura 43.

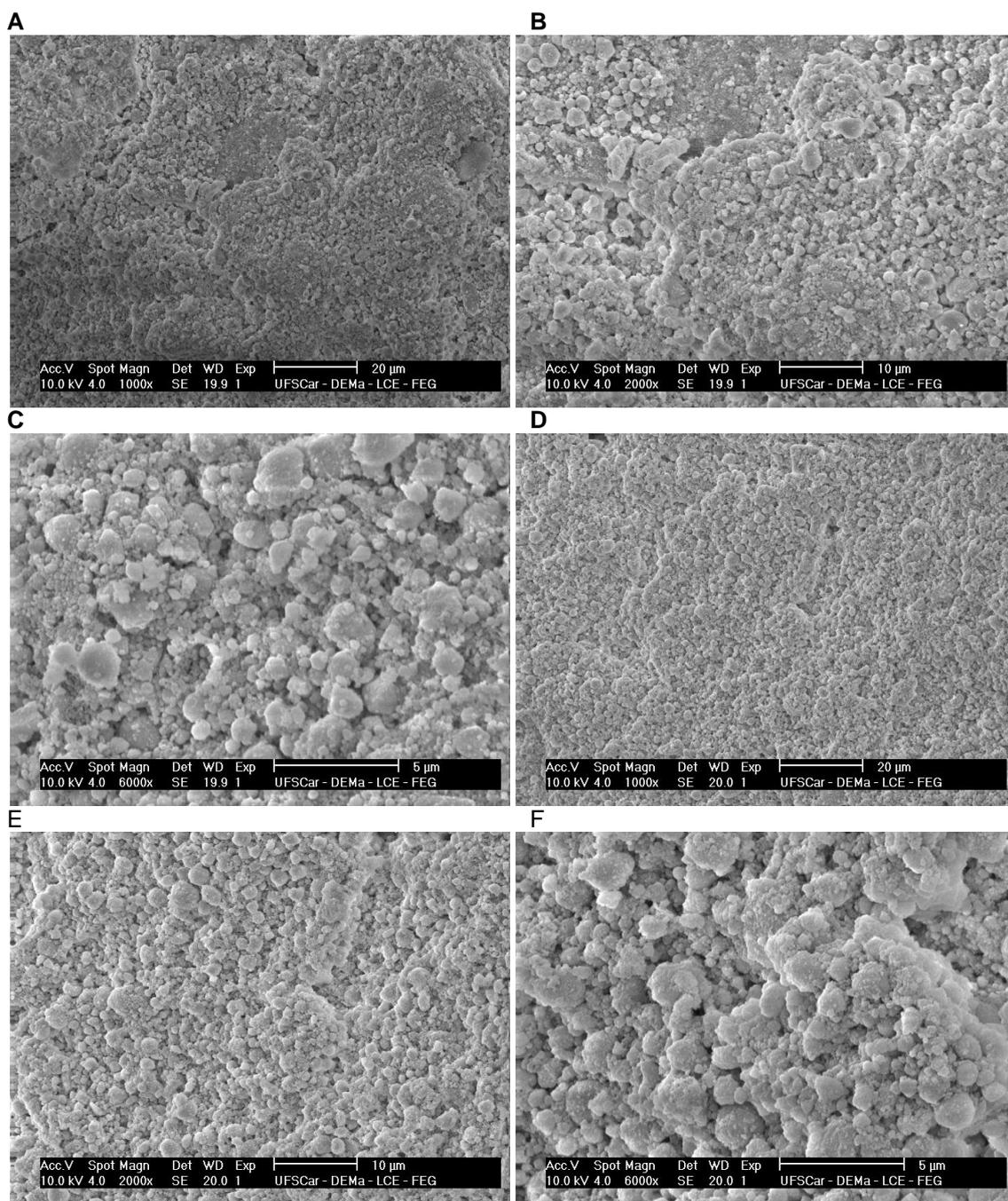


**Figura 43.** Superfície de resina a 0,1 %, após 7 dias de incubação. Em **A** e **B** há apenas material, sem grupos celulares aderidos. **C** focaliza uma região próxima à observada nas duas primeiras imagens, onde é possível ver vários grupos celulares sobre o material. Em **D** pode ser visto um outro grupo celular de uma região próxima, em maior aumento (16000x), com células bem unidas entre si.

Sobre as **resinas com as concentrações de 0,3% e de 0,6 % de nanopartículas de prata** não foi encontrado nenhum conjunto celular em toda a superfície que podia ser observada dos corpos de prova que foram incubados e depois analisados. Foram focalizadas e fotografadas em vários aumentos duas regiões de cada material, e as imagens estão nas Figuras de número 44 e 45.



**Figura 44.** Imagens de duas regiões de resina a 0,3 %, após 7 dias de incubação. Nas três imagens da primeira região, A, B e C, não há conjuntos celulares, apenas se observa o material. Nas imagens de uma segunda região desse corpo de prova, vistos em C, D e E, também não foram encontrados conjuntos celulares bacterianos.



**Figura 45.** Imagens de duas regiões do corpo de prova de resina com 0,6 % de nanopartículas, após 7 dias de incubação. Nas três imagens da primeira região, A, B e C, não há conjuntos celulares, apenas se observa o material, com sua característica típica. Imagens de uma segunda região dessa resina são vistas em D, E e F, na qual também não foram encontrados grupos celulares bacterianos.

### 5.3. RESULTADOS DOS ENSAIOS DE COMPRESSÃO

As Tabelas 4, 5 e 6 apresentam os resultados dos parâmetros determinados nos ensaios de compressão. De cada uma das 3 amostras (resina sem nanopartículas de prata, resina com a concentração de 0,3 % e resina com a concentração de 0,6 % destas partículas) foram feitos 5 corpos de prova, ou seja, o ensaio de compressão foi repetido 5 vezes para cada amostra, e a partir destes valores foram calculados média e desvio-padrão.

**Tabela 4.** Resultados dos ensaios de compressão para a resina composta fotopolimerizável sem nanopartículas de prata (resina não modificada).

Corpo de prova	Deformação de ruptura em compressão (%)	Tensão de compressão do primeiro evento de ruptura (MPa)	Módulo de elasticidade em compressão (MPa)
1	7,0	90	1.390
2	6,2	82	1.515
3	7,4	80	1.560
4	6,3	92	1.405
5	5,5	83	1.460
Média	6,5	85	1.465
Desvio-padrão	0,7	5	70

**Tabela 5.** Resultados dos ensaios de compressão para a resina composta experimental com a concentração de 0,3 %, em massa, de nanopartículas de prata.

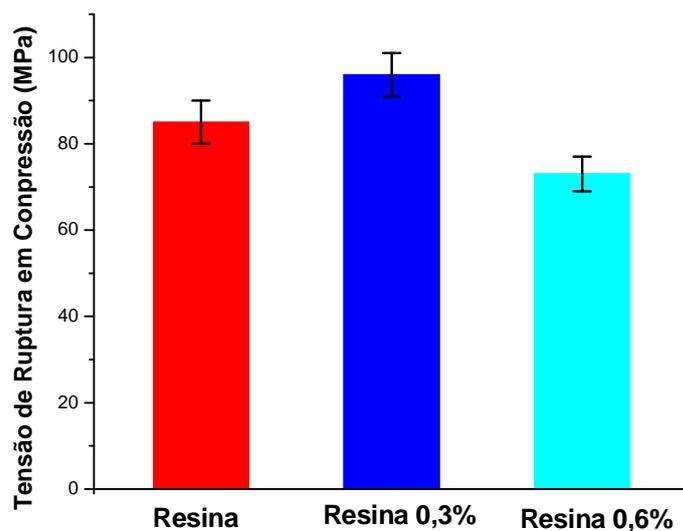
Corpo de prova	Deformação de ruptura em compressão (%)	Tensão de compressão do primeiro evento de ruptura (MPa)	Módulo de elasticidade em compressão (MPa)
1	7,3	90	1.640
2	7,2	94	1.735
3	8,5	102	1.765
4	8,2	94	1.710
5	7,5	100	1.775
Média	7,7	96	1.725
Desvio-padrão	0,6	5	55

**Tabela 6.** Resultados dos ensaios de compressão para a resina composta experimental com a concentração de 0,6 %, em massa, de nanopartículas de prata.

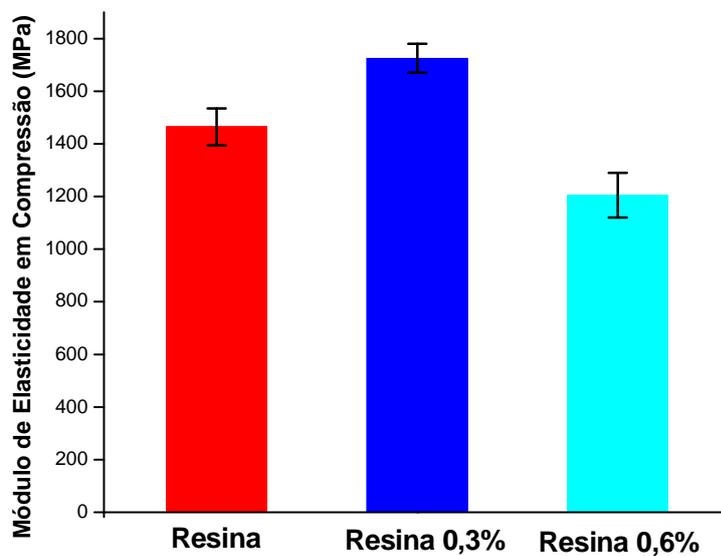
Corpo de prova	Deformação de ruptura em compressão (%)	Tensão de compressão do primeiro evento de ruptura (MPa)	Módulo de elasticidade em compressão (MPa)
1	5,3	79	1.155
2	5,0	74	1.260
3	6,1	70	1.305
4	5,5	68	1.215
5	4,8	73	1.090
Média	5,3	73	1.205
Desvio-padrão	0,5	4	85

Na comparação dos resultados pode ser observado que a amostra com 0,3 % de nanopartículas de prata apresentou o melhor desempenho mecânico em compressão, sendo superior ao comportamento da resina não modificada, pois os 3 parâmetros medidos apresentaram resultados mais satisfatórios. A amostra com 0,6 % de nanopartículas foi a que apresentou o pior resultado, indicando que o teor de nanopartículas foi superior ao teor adequado para que seja atingida a eficiência de reforçamento da resina. Os resultados da amostra com 0,3 % de nanopartículas sugerem, portanto, que esse teor deve estar dentro da faixa ideal de modificação para a otimização das propriedades mecânicas em compressão.

Os gráficos a seguir (Figuras 46 e 47) possibilitam uma melhor visualização dos resultados segundo os dois principais parâmetros para avaliação do desempenho em compressão descritos nas Tabelas 4 a 6.



**Figura 46.** Valores da tensão de ruptura em compressão para os três tipos de amostra. As barras que limitam o desvio-padrão para cada um dos três valores permitem uma comparação mais segura do resultado.



**Figura 47.** Valores do módulo de elasticidade em compressão para os três tipos de amostra. As barras que limitam o desvio-padrão para cada um dos três valores permitem uma comparação mais segura do resultado.

## 6. DISCUSSÃO

Até o momento poucos são os estudos publicados onde foram incorporadas nanopartículas de prata dentro de resinas odontológicas, com o intuito de avaliar sua ação bactericida e a redução do número de bactérias aderidas, e isso faz deste trabalho um estudo pioneiro em alguns pontos. Um destes pontos foi a confecção de imagens, por meio de microscopia eletrônica de varredura, do biofilme aderido sobre as resinas nas três concentrações testadas. É também pioneiro em combinar, com o teste microbiológico, o ensaio de compressão de amostras com as concentrações nas quais se obteve redução de células bacterianas aderidas. **Burgers et al. (2009)** avaliaram a atividade antibacteriana de resina composta contendo nanopartículas de prata, em duas diferentes concentrações. A atividade também foi avaliada em relação a *Streptococcus mutans*, porém com diferente metodologia para a contagem de células viáveis aderidas. Os autores verificaram em seus resultados vantagens das nanopartículas de prata nas resinas, pois uma maior quantidade de células aderidas ocorreu nas amostras sem prata. **Ahn et al. (2009)**, que compararam dois adesivos resinosos convencionais com um adesivo contendo nanopartículas de prata, também verificaram a ação antibacteriana destas partículas, pois a adesão das células foi menor sobre o adesivo experimental. Os resultados registrados na literatura são promissores quanto à aplicação clínica de materiais restauradores incorporados com nanopartículas de prata.

Neste trabalho também foram verificados resultados positivos no controle do biofilme bacteriano sobre nanocompósitos odontológicos experimentais, após a formação de biofilme *in vitro* sobre os corpos de prova. Concluiu-se que houve diferença entre o número de bactérias aderidas sobre a resina sem prata (não modificadas) e sobre as resinas com prata (modificadas). Os resultados de contagem de células viáveis mostraram que para os três períodos de tempo estudados, 1 dia, 4 dias e 7 dias, as resinas com as concentrações de nanopartículas de prata de 0.3 % e de 0.6 %, em massa, apresentaram menor número de células bacterianas aderidas, considerando a média e o desvio padrão, em comparação com a resina em sua forma comercial atual, sem prata. Estes resultados são importantes, pois mostram menor adesão bacteriana sobre as resinas experimentais com estas duas concentrações, e um produto comercial com estas características permitirá menor acúmulo bacteriano sobre as regiões dentais restauradas, ajudando a prevenir a cárie recidivante e auxiliando na manutenção de uma boa condição de higiene bucal, em conjunto com procedimentos adequados de escovação. Em termos da qualidade de manutenção de uma superfície menos propícia à adesão bacteriana, seriam vantajosas para uma aplicação clínica as resinas com as concentrações de 0,3 % e 0,6 %. Porém é necessário unir estes resultados aos resultados do ensaio de compressão.

O ensaio de compressão foi realizado com o intuito de verificar se o acréscimo das nanopartículas, procedimento idealizado para controlar o crescimento de bactérias sobre a resina, não prejudicaria este material restaurador dentário em suas qualidades mecânicas. A expectativa era por um resultado de desempenho em compressão das resinas experimentais

(com prata) igual ou melhor do que a resina controle (sem prata), pois um resultado assim não impede que elas sejam aplicadas clinicamente, para a confecção de restaurações dentárias. A partir do ensaio de compressão realizado, verificou-se que os corpos de prova com 0,3 % de nanopartículas de prata apresentaram melhor desempenho mecânico em compressão, em relação à resina, sem prata, mas na concentração de 0,6 % o desempenho piorou. Ou seja, entre as concentrações testadas neste estudo que apresentaram redução do acúmulo de biofilme, está indicada para uma aplicação clínica, em termos de qualidade mecânica, a resina com 0,3 %, em massa, de nanopartículas de prata. Sendo assim, uma resina com esta concentração é um material aplicável clinicamente em restaurações dentárias, podendo colaborar na prevenção do acúmulo de biofilme bacteriano na cavidade bucal. Não buscou-se comparar os resultados do teste de compressão com valores já descritos na literatura devido ao fato de ter ocorrido uma inclusão de ar junto com as nanopartículas, devido à mistura manual que foi necessária para incorporá-las bem ao polímero, o que não ocorreria no caso de uma mistura mecanizada, se elas fossem incorporadas industrialmente, em conjunto com as outras partículas de carga de materiais inorgânicos que a resina composta já possui em sua formulação. Mas o importante é que foi realizada uma comparação do desempenho mecânico de corpos de prova de resina sem prata e com prata preparados da mesma forma, ou seja, nos corpos de prova só de resina também provocou-se uma inclusão de ar semelhante, pois foi seguido um protocolo de manipulação padronizado, conforme já descrito na metodologia.

As imagens das superfícies por meio de Microscopia Eletrônica de Varredura tiveram como intuito principal a observação da morfologia das células de *Streptococcus mutans* e a formação e evolução do seu biofilme, e não medir ou avaliar quantitativamente a redução da adesão bacteriana em alguns dos materiais estudados. Apesar disso, o que pode ser observado nas imagens está compatível com o teste de contagem feito no laboratório de Microbiologia, em relação à redução da adesão, principalmente quando avaliamos os números convertidos em UFC/mm<sup>2</sup>, pois sobre as resinas com as concentrações de 0,3 % e 0,6 %, durante as análises microscópicas, sempre foram encontrados grupos celulares em menor número, ou nenhum grupo celular, em toda a superfície que podia ser varrida dos corpos de prova analisados. Para os três períodos de tempo de incubação estudados, nas três sessões de imagens, existiu uma grande dificuldade em se localizar grupos celulares aderidos sobre as resinas nestas duas concentrações maiores de prata, em comparação com o que ocorreu na análise dos corpos de prova apenas de resina, sem prata, e dos de resina com a concentração de 0,1 %, sendo que em ambos os grupos celulares foram localizados e focalizados facilmente.

O teste de contagem de células viáveis recuperadas do biofilme aderido sobre as superfícies foi realizado em triplicata para cada um dos 3 tempos de incubação, e para o tempo de 7 dias, em um dos três experimentos de contagem realizados não ocorreu crescimento de unidades formadoras de colônia para as resinas a 0,3 % e 0,6%. As tabelas 1, 2 e 3 apresentaram a média da contagem de células viáveis de 3 experimentos. Quando o resultado de contagem de células viáveis recuperadas do biofilme é zero, não ocorrendo crescimento nas placas semeadas com nenhuma das diluições, isso significa que há menos de uma célula para

cada 0,1 mL da suspensão inicial, que foi o volume plaqueado em ágar sacarose. Os resultados da contagem sugerem que ao longo do tempo a ação bactericida da prata aumentou, pois o número de bactérias aderidas em 7 dias de incubação foi menor do que em 4 dias e em 1 dia, e ocorreu um resultado nulo de contagem para o período experimental de 7 dias. O fato de o meio de cultura usado ser pobre em nutrientes colaborou para os baixos valores de contagem para as resinas a 0,3 % e a 0,6 %, e também colaborou nos resultados de grupamentos celulares menos complexos e com menor número de células no biofilme presente após a incubação por 7 dias, para todos os materiais, inclusive o controle, só resina, conforme verificado nas imagens feitas por microscopia para esse período, em comparação com as imagens para o período de 4 dias. Mas isso não exclui a ação das nanopartículas, que existiu, pois foi feita uma comparação das resinas experimentais com as resinas sem nanopartículas, o material controle para o estudo da adesão bacteriana, a qual também permaneceu no mesmo meio de cultura por 7 dias, e apresentou maiores números de contagem e vários grupos celulares aderidos. Alguns estudos de formação de biofilme *in vitro* nos quais as amostras foram incubadas em PBS (**Peeters et al., 2008; Burgers et al., 2009**) ou em saliva artificial (**Ikeda et al., 2007; Pereira-Cenci et al., 2008**), para imitar as condições da cavidade oral, serviram como base para a escolha do meio. Foi utilizado como meio de cultura durante a formação do biofilme, no presente trabalho, o PBS com sacarose, sendo que a sacarose foi acrescentada por ser essencial à adesão inicial da bactéria *Streptococcus mutans* ao dente e próteses, na cavidade oral (**Shahal et al., 1998; Featherstone, 2000; Jorge, 2007**).

Não foi um intuito deste trabalho avaliar o tempo necessário para o início da adesão bacteriana, pois todos os corpos de prova foram deixados pelo menos 1 dia em incubação em PBS com sacarose, contendo bactérias. Foram observados 3 tempos de incubação, mas foi permitido pelo menos um tempo de incubação de 1 dia para que ocorresse a adesão e formação de biofilme. Serviram de base trabalhos de pesquisa que demonstram que, numa fase inicial de formação de biofilme, de 15 min a 8h após a limpeza bucal adequada, se houver disponibilidade de sacarose, proveniente da dieta, poderá ocorrer implantação de *S. mutans* (**Nyvad, 1990; Featherstone, 2000; Jorge, 2007**).

Não foi julgado necessário, após levantamento bibliográfico, deixar que ocorresse a formação de biofilme em meio de cultura que ficasse sob agitação. Já foi bastante evidenciado que o biofilme se forma mesmo em meio líquido que esteja em repouso, sem perturbação. São exemplos de trabalhos que desempenharam a formação de biofilme desta forma, e também utilizando placas de microcultura para incubação de suspensões bacterianas, trabalhos como os de **Montanaro et al. (2004), Pereira-Cenci et al. (2008), e Peeters et al. (2008)**. São exemplos de trabalhos que conservaram o meio de cultura sob agitação, para a formação de biofilme, os trabalhos onde foi considerada necessária uma maior uniformidade na distribuição do biofilme, como os de **Pizzolitto et al. (2001), Tunney et al. (2002), Leite (2008)**.

Para complementar este trabalho são necessários estudos futuros a fim de avaliar o controle de biofilme em períodos maiores de tempo. O fato de as nanopartículas ficarem bem presas ao polímero, devido à presença do agente de união (silano), e também o fato de

estarem misturadas por todo o material, e não só recobrimo a superfície, sugerem que a ação de controle do biofilme aderido ao compósito experimental se mantenha a longo prazo e que a liberação da prata é lenta e gradual, concomitante com a degradação da resina. Conforme já descrito na literatura, ocorre um certo grau de degradação das resinas ao longo do tempo. Isso acontece devido à plastificação, um processo no qual os fluidos são absorvidos pelas resinas resultando em degradação das propriedades mecânicas, e à hidrólise, que pode quebrar ligações covalentes dentro das fibras colágenas da dentina e dos polímeros da resina. Estes processos foram documentados *in vitro* (**Armstrong et al., 2003; Shirai et al., 2005; De Munk et al., 2003, 2005**), e *in vivo* (**Hashimoto et al., 2000, 2001**), e segundo **Santerre et al. (2001)** e **Pashley et al. (2004)**, são aumentados por enzimas liberadas de bactérias e da própria dentina.

Uma questão importante a ser discutida, completando os resultados até aqui obtidos, são informações sobre a toxicidade das nanopartículas de prata ao ser humano. Ainda são necessários mais estudos em relação a esta questão, e entre os que existem há contradições (**Allaker, 2010**), mas alguns trabalhos descritos na literatura demonstram que o uso delas nas resinas não prejudicará o ser humano neste sentido. Alguns estudos revelaram que as nanopartículas de prata não são tóxicas às células humanas, como o de **Sayes et al. (2004)** e **Reddy et al. (2007)**. Foi também demonstrado por **Yudovin-Farber et al. (2008)** que essas nanopartículas, quando incorporadas na resina composta em uma concentração de até 1 % em massa, não causaram maior efeito tóxico sobre cultura de células e sobre tecidos experimentais de animais, em comparação com as resinas não modificadas. Em comparação com outros metais a prata é menos tóxica às células humanas, segundo **Sondi & Salopek-Sondi (2004)**. Segundo **Panacek et al. (2009)** 0,2 µg/mL é uma concentração destas nanopartículas que inibe *Candida spp.*, bem menor que a concentração de 30 µg/mL, necessária para demonstrar efeito tóxico sobre fibroblastos de humanos.

Além dos trabalhos descritos na literatura, os produtos e equipamentos que já foram lançados no mercado, e que possuem as nanopartículas de prata incorporadas em seu interior ou em seus recobrimentos, indicam que elas não são tóxicas, pelo menos da maneira e nas concentrações em que estão sendo utilizadas, pois passaram por alguns testes exigidos pela legislação local e foram aprovados. É fato, por exemplo, que empresas como a IBBL (Itu-SP), a TAIFF (Diadema-SP), a FORTINOX (Guarulhos-SP), e Dabi Atlante (Ribeirão Preto-SP) já usam nanopartículas de prata em seus produtos, fornecidas pela empresa Nanox (São Carlos-SP), produtos estes que já estão à venda no mercado (bebedouros de água, secadores de cabelo, utensílios de cozinha e hospitalares em inox, equipamentos para consultórios odontológicos). As normas que devem ser seguidas pelas empresas para a liberação de produtos de toxicidade duvidosa no mercado variam de região para região. Não existe uma legislação à respeito do uso de nanomateriais, cada órgão cria as suas próprias exigências que devem ser seguidas, e todo material deve ser analisado de acordo com as suas recomendações antes de ser aprovado. No caso da ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), para a liberação de cosméticos contendo nanopartículas de prata, por exemplo, os

ensaios de toxicidade que devem ser realizados são os mesmos aplicados a qualquer outro produto, nanomaterial ou não: ensaio de toxicidade oral e inalatória e ensaios pré-clínicos de compatibilidade dérmica. Já para o caso de incorporação em produtos que terão contato com alimentos a ANVISA exige um ensaio de migração total e específica de prata.

Muito importantes foram os achados recentes de que a prata em partículas de dimensões micrométricas pode causar a obstrução das membranas celulares, e o consequente envenenamento por prata, conhecido como *Argyria*, porém isso não acontece com o uso de partículas de prata em dimensões nanométricas. Essas partículas são tão finamente dispersas e estão em tão baixa concentração que podem circular pelas membranas celulares sem ocasionar danos a organismos superiores segundo alguns autores, como **Sondi & Salopek-Sondi (2004)**, **Sayes et al. (2004)**, **Oliveira (2006)**, e **Reddy et al. (2007)**.

É válido acrescentar ainda que a prata é um material presente no amálgama, que já é empregado no ambiente bucal há muito tempo, e que por muitos anos foi usado como material restaurador preponderante para a prática da Odontologia, a despeito de sua composição (**Innes & Youdelis, 1963; Duperon, 1970; Fairhurst & Ryge, 1978; Ferracane et al., 1987**). Historicamente ligas de amálgama contêm pelo menos 65% de prata, 29% de estanho e menos de 6% em cobre, e cerca de 0,01% em zinco (**Phillips, 1998**). Ao longo da história da odontologia muito mais se discutiu sobre a toxicidade do mercúrio, também contido no amálgama dental, conhecidamente tóxico, e sua eliminação na cavidade bucal e efeito para o organismo, porém não de forma que abalasse o amplo uso deste produto em restaurações dentárias (**Mahler et al., 1982; Sarkar, & Park, 1988; Sutow et al., 1989**).

## 7. CONCLUSÕES

1. Nas superfícies das resinas compostas experimentais com as duas maiores concentrações de nanopartículas de prata (0,3 % e 0,6 %, em massa), o número de células bacterianas aderidas não se apresentou diferente, e foi menor do que na resina em sua forma comercial atual, sem prata, e também menor do que na resina a 0,1 %, nos 3 períodos de incubação estudados (1 dia, 4 dias e 7 dias), considerando-se a média e desvio-padrão dos valores.
2. As nanopartículas de prata, quando acrescentadas na resina composta fotopolimerizável em uma concentração de 0,3 % em massa, não provocaram prejuízo no desempenho mecânico deste material restaurador, conforme verificado em um ensaio de compressão, teste complementar ao estudo microbiológico.
3. Conforme observado em imagens da superfície da resina composta sem prata, obtidas por Microscopia Eletrônica de Varredura, após 1 dia de incubação, a 37°C, as células de *Streptococcus mutans* já se apresentam unidas entre si e também à superfície, envoltas por matriz extracelular. Após 4 dias elas estão organizadas sob a forma de grandes e espessos arranjos, e após 7 dias novos grupos celulares começam a se formar, após a dispersão das células do biofilme maduro.
4. As imagens das resinas com as concentrações de 0,3 e 0,6 % de nanopartículas de prata não mostraram esta evolução do arranjo das células no processo de formação do biofilme sobre suas superfícies.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ahn, S.J.; Lee, S.J.; Kook, J.K.; Lim, B.S. Experimental antimicrobial orthodontic adhesives using nanofillers and silver nanoparticles. *Dent Mater.*, 25(2), p. 206-13, 2009.
2. Allaker, R. P. The Use of Nanoparticles to Control Oral Biofilm Formation. *J Dent Res.*, v. 89, p.1175, 2010.
3. ASTM D 695 . Standard Test Method for Compressive Properties of Rigid Plastics+ Annual Book of ASTM Standards, Philadelphia (2010).
4. Araujo, F. B. de; Garcia-Godoy, F.; Cury, J. A.; Conceição, E. N. Fluoride Release from Fluoride-Containing Materials. *Oper. Dent.*, V.21, n.5, p.185-90,1996.
5. Armstrong, S.R.; Vargas, M.A.; Fang, Q.; Laffoon, J.E. Microtensile bond strength of a total-etch 3-step, total-etch 2-step, self-etch 2-step,self-etch 1-step dentin bonding system through 15-month water storage. *J. Adhes. Dent.*, v.5, p.47-56, 2003.
6. Auschill, T.M.; Arweiler, N.B.; Brex, M.; Reich, E.; Sculean, A.; Netuschil, L. The effect of dental restorative materials on dental biofilm. *Eur J Oral Sci.*, 110(1), p. 48-53, 2002.
7. Aykent, F.; Yodem, I.; Ozyesil, A.G.; Gunal, S.K.; Avunduk, M.C.; Ozkan, S. Effect of different finishing techniques for restorative materials on surface roughness and bacterial adhesion. *Prosthet Dent*, v. 103(4), p. 221-7, 2010.
8. Azad, N.; Rojanasakul, Y. Nanobiotechnology in Drug delivery. *American Journal of Drug Delivery*, v. 4, p. 79, 2006.
9. Baratieri, L.N. Dentística: procedimentos preventivos e restauradores. In: Baratieri, L.N. *Odontologia Restauradora: Fundamentos e possibilidades*. Quinta edição. São Paulo . SP, Brasil. Editora Santos,1993. Cap. 6, p. 186.
10. Barbon, R.F.; Takamiya, A.S.; Gorup, L.F.; Monteiro, D.R.; Barbosa, D.B. Avaliação da estabilidade de nanopartículas de prata em resina acrílica para base de próteses. Dissertação (Mestrado) apresentada na Faculdade de Odontologia de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Araçatuba-SP, Brasil, em 2009.
11. Brambilla, E.; Cagetti, M.G.; Gagliani, M.; Fadini, L.; García-Godoy, F.; Strohmenger, L. Influence of different adhesive restorative materials on mutans streptococci colonization. *Am J Dent.*, 18(3), p. 173-6, 2005.
12. Bright, K.R., Gerba, C.P.; Rusin, P.A. Rapid reduction of *Staphylococcus aureus* populations on stainless steel surfaces by zeolite ceramic coatings containing silver and zinc ions. *J Hosp Infect*, v. 52, p. 307. 309, 2002.
13. Burguers, R.; Eidt, A.; Frankenberg, R.; Rosentritt, M.; Schweiki, H.; Handel, G.; Hahnel, S. The ant-adherence activity and bactericidal effect of microparticulate silver additives in composite resin materials. *Archives of oral biology*, v. 54, p. 595-601, 2009.
14. Caixeta, D.S. Sanificantes químicos no controle de biofilmes formados por duas espécies de *Pseudomonas* em superfície de aço inoxidável. Dissertação (mestrado) apresentada na Universidade Federal de Lavras, Lavras-MG, Brasil, em 2008.
15. Capelletti, R.V. Avaliação da atividade de biocidas em biofilmes formados a partir de fluido de corte utilizado na usinagem de metais. Dissertação (Mestrado) apresentada na Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas-SP, Brasil, em 2006.

16. Carranza, F. A., Newman, M. G. *Periodontia Clínica*. Oitava edição. Rio de Janeiro . RJ, Brasil. Editora Guanabara Koogan, 250 p., 1997.
17. Carreira, C.M.; Pereira, C.A.; Bombana, A.C.; Jorge, A.O.C. Eficácia antimicrobiana das nanopartículas de prata sobre esporos, leveduras e bactérias. XIII Encontro Latino Americano de Iniciação Científica e IX Encontro Latino Americano de Pós-Graduação, na Universidade do Vale do Paraíba, Vale do Paraíba-SP, Brasil, em 2009.
18. Carvalho, A. S. de; Cury, J. A. Liberação de flúor de materiais restauradores. *Rev. Odont. Univ. São Paulo*, v.12, n.4, p.367-73, out./dez. 1988.
19. Cooley, R. L.; Mccourt, J. W. Fluoride releasing removable appliances. *Quintessence Int.*, v.22, p.299-302, 1991.
20. Costa, B. Avaliação *in vitro* da atividade antimicrobiana e liberação de flúor de cimentos de ionômero de vidro restauradores químico e fotoativados. Dissertação (Mestrado) apresentada na Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo (USP), Bauru . SP, Brasil, em 1995.
21. Creanor, S. L. et al. Fluoride uptake and release characteristics of Glass Ionomer Cements. *Caries Res.*, v.28, p.322-8, 1994.
22. Creo, A. L. et al. Sustained fluoride release from an experimental CI Core Build-up/restorative. *J. Dent. Res.*,v.72, p.221, 1993.
23. Crespilho, F. N.; Zuccoloto, V.; Bret, C. M. A.; Oliveira, O. N.; Nart, F. C. Enhanced charge transport and incorporation of redox mediators in layer-by-layer films containing PAMAM-encapsulated gold nanoparticles. *Journal of Physical Chemistry B*, Washington, v. 110, n. 35, p. 17478-17483, 2006.
24. Crisp, S.; Lewis, B. G.; Wilson, A. D. Glass ionomer cement: chemistry of erosion. *J. Dent. Res.*, v. 55, p.1032- 41, 1976.
25. De Munk, J.; Van Landuyt, K.; Peumans, M., et al. A critical review of the durability of adhesion to tooth tissue: methods and results. *J. Dent. Res.*, v.84, p.118-132, 2005.
26. De Munk, J; Van Meerbeek, B.; Yoshida, Y., et al. Four-year water degradation of total-etch adhesives bonded to dentin. *J. Dent. Res.*, v.82, p.136-140, 2003.
27. De Muyneck, W.; De Belie, N.; Verstraete, W. Antimicrobial mortar surfaces for the improvement of hygienic conditions. *Journal of Applied Microbiology*, 2009.
28. De Prijck, K.; Nelis, H.; Coenye, T. Efficacy of silver-releasing rubber for the prevention of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation in water. *Biofouling.*, 23(5-6), p. 405-11, 2007.
29. Devine, D.A.; Percival, R.S.; Wood, D.J.; Tuthill, T.J.; Kite, P.; Killington, R.A.; Marsh, P.D. Inhibition of biofilms associated with dentures and toothbrushes by tetrasodium EDTA. *J Appl Microbiol.*, v. 103(6), p. 2516-24, 2007.
30. Dezelic, T.; Guggenheim, B.; Schmidlin, P.R. Multi-species biofilm formation on dental materials and an adhesive patch. *Oral Health Prev Dent.*, v. 7(1), p. 47-53, 2009.
31. Dror-Ehre A, Adin A, Markovich G, Mamane H. Control of biofilm formation in water using molecularly capped silver nanoparticles. *Water Res.*, v. 44(8), p. 2601-9, 2010.
32. Dror-Ehre, A.; Mamane, H.; Belenkova, T.; Markovich, G.; Adin, A. Silver nanoparticle-E. coli colloidal interaction in water and effect on E. coli survival. *J Colloid Interface Sci.*, v. 15(2), p. 521-6, 2009.

33. Duperon D.F.; Nevile, M.D.; Kasloff, Z. Clinical evaluation of corrosion resistance of conventional alloy, spherical-particle alloy, and dispersion-phase alloy. *J Prosthet Dent*, v. 25, p. 650, 1971.
34. Duran, N.; Marais, C.; Mattoso, L.H.C. *Nanotecnologia: Introdução, preparação e caracterização de nanomateriais e exemplos de aplicação*. Primeira edição. São Paulo-SP, Brasil, Editora Artliber, 2006, 208 p.
35. Fairhurst, C.W.; Ryge, G. X-ray diffraction investigation of the Sn-Hg phase in dental amalgam. In: Mueller, W.M. *Advances in X-ray analysis*. New York, Plenum Press, 1962, cap.5.
36. Ferracane, J.L.; Mafiana, P.; Cooper, C.; Okabe, T. Time-dependent dissolution of amalgams into saline solution. *J Dent Res*, v. 66, p. 1331, 1987.
37. Featherstone, J.D. The science and practice of caries prevention. *J Am Dent Assoc*, v. 131, p. 887-99, 2000.
38. Forss, H. Effects of glass ionomer cements in vitro and the oral environment. *Proc. Finn. Dent. Soc.*, v.89, n.3/4, p.123-4, 1993.
39. Forsten, L. Short and long term fluoride release from glass ionomer and other fluoride-containing filling materials in vitro. *Scand. J. dent. Res.*, v.98, p.179-85, 1990.
40. Fúcio, S.B.; Puppim-Rontani, R.M.; de Carvalho, F.G.; Mattos-Graner R.O.; Corrêa-Sobrinho, L.; Garcia-Godoy, F. Analyses of biofilms accumulated on dental restorative materials. *Am J Dent.*, 22(3), p. 131-6, 2009.
41. Furlong, D. N.; Launikonis, A.; Sasse, W. H. F.; Sanders, J. V. Colloidal platinum sols - preparation, characterization and stability towards salt. *Journal of the Chemical Society Faraday Transactions*, Cambridge, v. 1, n. 80, p. 571, 1984.
42. Garcia-Bennett, F. Better safe than sorry: Understanding the toxicological properties of inorganic nanoparticles manufactured for biomedical applications. *Adv Drug Deliv Rev*, 2009.
43. Hallgren, A.; Olieby, A.; Twerman, S. Salivary fluoride concentrations in children with glass ionomer cement orthodontic appliances. *Caries Res.*, v.24, n.4, p.239-41, 1990.
44. Halvorson, R.H.; Erickson, R.L.; Davidson, C.L. Energy dependent polymerization of resin-based composite. *Dent Mater*, v.18, p. 463-469, 2002.
45. Hashimoto, M.; Ohno, H.; Kaga, M.; Endo, K.; Sano, H.; Oguchi, H. In vivo degradation of resin dentin bonds in humans over 1 to 3 years. **J. Dent. Res.**, v.79, p.1385-1391, 2000.
46. Hashimoto, M.; Ohno, H.; Kaga, M.; Endo, K.; Sano, H.; Oguchi, H. Resin-tooth adhesive interfaces after long-term function. **Am. J.Dent.**, v.14, p.211-215, 2001.
47. Hernández-Sierra, J.F.; Ruiz, F.; Pena, D.C.C.; Martínez-Gutiérrez, F.; Martínez, A.E.; Guillén, A.J.P. Tapia-Pérez, H.; Castañón, G.M. The antimicrobial sensitivity of *Streptococcus mutans* to nanoparticles of silver, zinc oxide, and gold. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, v. 4, p. 237. 240, 2008.
48. Ikeda, M.; Matin, K. Nikaido, T.; Foxton, R.M.; Tagami, J. Effect of surface characteristics on adherence of *S. mutans* biofilms to indirect resin composites. *Dent Mater J.*, 26(6), p. 915-23, 2007.

49. Innes, D.B.K., and Youdelis, W.V. Dispersion-strengthened amalgams. *Can Dent Assoc J*, v. 29, p. 587, 1963.
50. Jansen, W.C.; Giovannini, J.F.B.G.; Neves, A.D.; Segura, M.E.C. Biomateriais em Odontologia. In: Oréfice, R.L.; Pereira, M.M.; Mansur, H.S. Biomateriais: Fundamentos e Aplicações. Primeira edição. Rio de Janeiro-RJ, Brasil, Editora Cultura Médica, 2006, cap. 15, p.457-478.
51. Jorge, A.O.C.; Silva, C.R.G. Microbiologia e Imunologia das Doenças Periodontais. In: Jorge, A.O.C. Microbiologia Bucal. Terceira edição. São Paulo-SP, Brasil, Editora Santos, 2007, cap.8, p.109-126.
52. Juan, L.; Zhimin, Z.; Anchun, M.; Lei, L. ; Jingchao, Z. Deposition of silver nanoparticles on titanium surface for antibacterial effect. *Int J Nanomedicine.*, 15(5), p. 261-7, 2010.
53. Júnior, A.B.;Carniel,C.Z.; Duarte, C.A. et al. Atlas de Odontologia. Segunda edição. São Paulo . SP, Brasil, Editora Odonto Atual, 2008, 120 p.
54. Kamat, P. V. Photophysical, Photochemical and Photocatalytic Aspects of Metal Nanoparticles. *Journal of Physical Chemistry B*, Washington, v. 106, p. 7729-7744, 2002.
55. Kawahara, K., Tsuruda, K., Morishita, M. and Uchida, M. Antibacterial effect of silver-zeolite on oral bacteria under anaerobic conditions. *Dent Mater*, v.16, p. 452. 455, 2000.
56. Kantorski, K.Z.; Scotti, R.; Valandro, L.F.; Bottino, M.A.; Koga-Ito, C.Y.; Jorge, A.O. Adherence of *Streptococcus mutans* to uncoated and saliva-coated glass-ceramics and composites. *Gen Dent.*, 56(7), p. 740-7, 2008
57. Keyes, P.H. The infectious and transmissible nature of experimental dental caries. *Arch Oral Biol*, v.1, p. 304-20, 1960.
58. Kim, J.; Pitts, B.; Stewart, P.S.; Camper, A.; Yoon, J. Comparison of the antimicrobial effects of chlorine, silver ion, and tobramycin on biofilm. *Antimicrob Agents Chemother.*, 52(4), p. 1446-53, 2008.
59. Kojima, Y.; Usuki, A.; Kawasumi, M. Mechanical Properties of Nylon 6-Clay Hybrid. *Journal of Materials Research*, Pittsburgh, v. 8, n. 5, p. 1185-1189, 1993.
60. Leite, B.A. Aderência bacteriana e formação de biofilme aos fios de dermossustentação facial. Dissertação (Mestrado) apresentada ao Programa de Pós- Graduação Interunidades em Bioengenharia da Universidade de São Paulo, São Carlos. SP, Brasil, em 2008.
61. Levine, R.S. Bases científicas da educação para saúde dental. In: Lindhe J. Tratado de periodontia clínica. Segunda edição. Rio de Janeiro-RJ, Brasil, Editora Guanabara Koogan, 1992, p. 252-9.
62. Li, Q.; Mahendra, S.; Lyon, D.Y.; Brunet, L.; Liga, M.V.; Li, D.; Alvarez, P.J.J. Antimicrobial nanomaterials for water disinfection and microbial control: Potential applications and implications. *Water Research*, v. 42, p. 4591 - 4602, 2008.
63. Lim, B.S.; Lee, H.J.; Lee, J.W.; Ahn, S.J. Quantitative analysis of adhesion of cariogênica streptococci to orthodontic raw materials. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*, v. 133, p. 882-8.
64. Loesche WJ. Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. *Microbiol Rev*, v. 50, p. 353-80, 1986.

65. Lutz, F.; Phillips, R.W. A classification and evaluation of composite resin systems. *J Prosthet Dent*, v. 50, p. 480, 1983.
66. Mahler, D.B.; Terkla, L.G.; Van Eysden, J.; Reisbick, M.H. Marginal fracture versus mechanical properties of amalgam. *J Dent Res*, v. 49, p.1452, 1970.
67. Mahler, D.B.; Adey, J.D.; Marek, M. Creep and corrosion of amalgam. *J Dent Res*, v. 61, p. 33, 1982.
68. Marshall, K.C.; Stout, R.; Mitchell, R. Mechanism of initial events in the sorption of marine bacteria to surfaces. *Journal General Microbiology*, v.68, p.337-348, 1971.
69. Matsumura, Y., Yoshikata, K., Kunisaki, S. and Tsuchido, T. Mode of bactericidal action of silver zeolite and its comparison with that of silver nitrate. *Appl Environ Microbiol*, v. 69, p. 4278. 4281, 2003.
70. Molloy, S.L.; Ives, R.; Hoyt, A.; Taylor, R.; Rose, J.B. The use of copper and silver in carbon point-of-use filters for the suppression of *Legionella* throughput in domestic water systems. *J Appl Microbiol.*, 104(4), p. 998-1007, 2008.
71. Montanaro, L.; Campoccia, D.; Rizzi S.; Donati M.E.; Breschi, L.; Prati, C.; Arciola, C.R. Evaluation of bacterial adhesion of *Streptococcus mutans* on dental restorative materials. *Biomaterials*, v. 25 (18), p. 4457-63, 2004.
72. Morones, J.; Elechiguerra, J.; Camacho, A.; Holt, K.; Kouri, J.; Ramirez, J. Yacaman, M. The bactericidal effect of silver nanoparticles. *Nanotechnology, Bristol*, v. 16, p. 2346-2353, 2005.
73. Nel, A.E.; Madler, L.; Velegol, D.; Xia T.; Hoek, E.M., Somasundaran, P. Understanding biophysicochemical interactions at the nano-biointerface. *Nat Mater* v. 8., p. 543-557, 2009.
74. Neto, E.A.B.; Ribeiro, C.; Zucolotto, V. Síntese de nanopartículas de prata para aplicação na sanitização de embalagens. Comunicado técnico 99 da Embrapa, ISSN 1517-4786, São Carlos-SP, Brasil, novembro de 2008.
75. Nyvad B, Kilian M. Comparison of the initial streptococcal microflora on dental enamel in caries-active and in cariesinactive individuals. *Caries Res*, v. 24, p. 267-72, 1990.
76. Oppermann, R.V. Diagnóstico e tratamento das doenças cárie e periodontal. In: Mezzomo E et al. Reabilitação oral para o clínico. Segunda edição. Santos-SP, Brasil, Editora Artmed, 1994, p. 40-2.
77. Oréfice, R.L. Materiais Poliméricos: Ciência e Aplicação como Biomateriais. In: Oréfice, R.L.; Pereira, M.M.; Mansur, H.S. Biomateriais: Fundamentos e Aplicações. Terceira edição. Rio de Janeiro-RJ, Brasil, Editora Cultura Médica, 2006, cap. 4, p.87 a 157.
78. Panacek, A.; Kolar, M.; Vecerova, R.; Pucek, R. Soukupova, J.; Krystof, V. Antifungal activity of silver nanoparticles against *Candida* spp. *Biomaterials*, v.30, p.6333-6340, 2009.
79. Parsek, M.R.; Singh, P.K. "Bacterial biofilms: an emerging link to disease pathogenesis". *Annual Review of Microbiology*, v. 57, p. 677. 701, 2003.
80. Pashley, D.H.; Tay, F.R.; Yiu, C., et al. Collagen degradation by host-derived enzymes during aging. *J. Dent.Res.*, v.83, p.216-221, 2004.
81. Peeters, E.; Nelis, H.J.; Coenye, T. Comparison of multiple methods for quantification of microbial biofilms grown in microtiter plates. *Journal of Microbiological Methods*, v.72, p. 157-165, 2008.

82. Percival, S.L.; Bowler, P.G.; Dolman, J. Antimicrobial activity of silver-containing dressings on wound microorganisms using an in vitro biofilm model. *Int Wound J.*, 4(2), p. 186-91, 2007.
83. Perdigão, J.; Ritter, A. V. Adesão aos tecidos dentários In: Baratieri, L. N. *Odontologia restauradora: fundamentos e possibilidades*. Oitava edição. São Paulo-SP, Brasil, Editora Santos, 2001, cap.4, p.85-128.
84. Pereira-Cenci, T.; Deng, D.M.; Kraneveld, E.A.; Manders, E.M.M.; Cury, A.A.D.B.; Cate, J.M.T.; Crielaard, W. The effect of *Streptococcus mutans* and *Candida glabrata* on *Candida albicans* biofilms formed on different surfaces. *Archives of oral biology*, v. 53, p. 755-764., 2008. Disponível em [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com).
85. Philips, R.W. Resinas para restauração. In: Anusavice, K.J. *Materiais Dentários*. Décima edição. Rio de Janeiro-RJ, Brasil, Editora Guanabara, 1998, cap.12, p.161-177.
86. Pires, J.A.F. et al. Effects of curing tip distance on light intensity and composite resin microhardness. *Quintessence Int.*, v. 24, n.7, p. 517-21, 1993.
87. Pizzolitto, E.L.; Pizzolitto, A.C.; Pozetti, G.L. Chemical and Microbiological evaluation of the internal surfaces of aluminium tubes both unlined and lined with exopoxi resin by means of the stereoscope and scanning electron microscope . *J.Microbiol.*, v.32, p.340-344, 2001.
88. Ramos, F.G.F. "Nanocompósitos PP/Bentonita Verde Lodo. I . Influência da Modificação e Teor de Argila nas Propriedades Mecânica". *Revista Matéria*, v. 10, n. 1, pp. 24 - 30, 2005. Disponível em <http://www.materia.coppe.ufrj.br/sarra/artigos/artigo10643>, consultado em 24/10/2006.
89. Reddy, M.P.; Venugopal, A.; Subrahmanyam, M. Hydroxyapatite-supported Ag. TiO<sub>2</sub> as *Escherichia coli* disinfection photocatalyst. *Water Res.*, v. 41, p. 379. 386, 2007.
90. Reis, A.C. Envelhecimento artificial acelerado de resinas compostas . Análise da superfície e estudo da alteração de cor por meio de colorímetro espectrofotométrico. Tese (Doutorado) apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Reabilitação Oral da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto. SP, Brasil, em 2003.
91. Reis, A.C.; Ribeiro, J.C.R.; Moyses, M.R.; Dias, S.C. *Reabilitação Estética e Funcional em Odontologia*. Primeira edição. São Paulo-SP, Brasil, Editora Lovise, 2006, 320 p.
92. Roe, D.; Karandikar, B.; Bonn-Savage, N.; Gibbins, B.; Roulet, J.B. Antimicrobial surface functionalization of plastic catheters by silver nanoparticles. *J Antimicrob Chemother.*, 61(4), p. 869-76, 2008.
93. Roulet, J.F. The problems associated with substituting composite resins for amalgam: a status report on posterior composites, *J Dent*, v. 16, p. 101, 1988.
94. Samuel, U., Guggenbichler, J.P. Prevention of Catheter-Related Infections: The Potencial of a New Nano-Silver Impregnated Catheter. *International Journal of Antimicrobial Agents*, v. 23S1, p. S75-S78, 2004.
95. Sanpui, P.; Murugadoss, A.; Durga, P. V.; Ghosh, S. Chathopadhyay, A. The antibacterial properties of a novel chitosanAg-nanoparticle composite. *International Journal of Food Microbiology*, Amsterdam, v. 124, p. 142-146, 2008.
96. Santerre, J.P.; Shaju, L.; Leung, B.W. Relation of dental composite formulations to their degradation and the release of hydrolyzed polymeric-resin-derived products. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.*, v.12, p.136-151, 2001.

97. Sarkar, N.K.; Park, J.R. Mechanism of improved corrosion resistance of Zn-containing dental amalgams. *J Dent Res*, v. 67, p.1213, 1988.
98. Sayes, C.M.; Fortner, J.D.; Guo, W.; Lyon, D.; Boyd, A.M.; Ausman, K.D.; Tao, Y.J.; Sitharaman, B.; Wilson, L.J.; Hughes, J.B.; West, J.L.; Colvin, V.L. The differential cytotoxicity of water-soluble fullerenes. *Nano Lett.*, v. 4 (10), p. 1881. 1887, 2004.
99. Schwermer, C.U.; Lavik, G.; Abed, R.M. "Impacto do nitrato sobre a estrutura e função das comunidades de biofilme bacteriano em dutos utilizados para injeção de água salgada nos campos de petróleo". *Applied and Environmental Microbiology*, v.74 (9), p. 2841-51, 2008.
100. Shahal, Y.; Steinberg, D.; Hirschfeld, Z.; Bronshteyn, M. Kopolovic, K. In vitro bacterial adherence onto pellicle-coated aesthetic restorative materials. *J Oral Rehabil.*, 5(1), p. 52-8, 1998.
101. Shao, W.; Zhao, Q. Influence of reducers on nanostructure and surface energy of silver coatings and bacterial adhesion. *Surface & Coatings technology*, v.204, p. 1288-1294, 2010.
102. Shirai, K.; De Munk, J.; Yoshida, Y., et al. Effect of cavity configuration and aging on the bonding effectiveness of six adhesives to dentin. *Dent. Mater.*, v.21, p.110-124, 2005.
103. Sondi, I.; Salopek-Sondi, B. Silver nanoparticles as an antimicrobial agent: a case study on *E. coli* as a model for Gram-negative bacteria. *J Colloid Interface Sci*, v.275, p.177-182, 2004.
104. Sousa, R.P.; Zanin, I.C.; Melo, M.A.; Beltrão, H.C.; Rodrigues, L.K. In situ effects of restorative materials on dental biofilm and enamel demineralisation. *J Dent.*, 37(1), p. 44-51, 2009.
105. Steinberg D, Eyal S. Early formation of *Streptococcus sobrinus* biofilm on various dental restorative materials. *J Dent.*, 30(1), p. 47-51, 2002.
106. Sutherland, I. W. The biofilm matrix . an immobilized but dynamic microbial environment. *Trends in Microbiology*, n.5, v.9, p. 222-227, 2001.
107. Sutow, E.J.; Jones, D.V.; Hall, G.C. Correlation of dental amalgam crevice corrosion with clinical ratings. *J Dent Res*, v. 68, p. 82, 1989.
108. Swartz, M.L.; Phillips, R.W.; Rhodes, B. Visible light-activated resins: depth of cure. *J Am Dent Assoc*, v. 106, p. 634, 1983.
109. Swift, E. J. Effect of mixing time on fluoride release from a glass ionomer cement. *Amer. J.Dent.*, v.1, p.132-4, 1988.
110. Thorn, R.M.; Austin, A.J.; Greenman, J.; Wilkins, J.P.; Davis, P.J. In vitro comparison of antimicrobial activity of iodine and silver dressings against biofilms. *J Wound Care.*, 18(8), p. 343-6, 2009.
111. Tunney, M.M.; Gorman, S.P. Evaluation of a poly(vinyl pyrrolidone)-coated biomaterial for urological use. *Biomaterials*, v. 23, p. 4601-4608, 2002.
112. Vanherle, g.; Smith, D.S. Posterior composite resin dental restorative materials. St. Paul, MN, 3M Dental Products Division, 1985.

113. Vermelho, A.B.; Pereira, A.F.; Coelho, R.R.; Souto-Pradrón, T. Práticas de Microbiologia. Primeira edição. Rio de Janeiro-RJ, Brasil, Editora Guanabara Koogan, 1994, 239 p.
114. Wendt, S.L.Jr.; Leinfelder, K.F. The clinical evaluation of heat-treated composite resin inlays. *J Am Dent Assoc*, v.120, p. 177, 1990.
115. Wilson, A. D.; Kent, B. E. The glass ionomer cement: a new translucent dental filling material. *J. Appl. Chem.Biotechnol.*, v.21, p.313, 1971.
116. Yudovin-Farber, I.; Beyth, N.; Nyska, A.; Weiss, E.I.; Golenser, J.; Domb, A.J. Surface characterization and biocompatibility of restorative resin containing nanoparticles. *Biomacromolecules*, v.9, p.3044-3050, 2008.
117. Zodrow, K.; Brunet, L.; Mahendra, S. ; Li, D. ; Zhang, A.; Li, Q. ; Alvarez, P.J. Polysulfone ultrafiltration membranes impregnated with silver nanoparticles show improved biofouling resistance and virus removal. *Water Res.*, v.43(3), p. 715-23, 2009.

# SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

## **1. Avaliação da alteração de cor das resinas modificadas com prata**

Para esta avaliação seria necessário o preparo de corpos de prova com várias cores disponíveis da resina composta, sendo para cada cor um só de resina e outro com nanopartículas de prata, com o intuito de verificar se ocorreu alteração de cor, devido à presença das mesmas na resina. A cor dos corpos de prova seria medida em um aparelho apropriado.

## **2. Análise da dispersão e distribuição das nanopartículas de prata dentro das resinas experimentais**

Este estudo teria a finalidade de verificar se as partículas ficam bem distribuídas e dispersas no interior de corpos de prova, e de propor métodos alternativos para melhorar estas características, se necessário, sendo as mesmas condições essenciais para a manutenção das propriedades físicas da resina.

## **3. Ensaio de medida da adesão ao dente com as resinas experimentais**

O objetivo neste caso seria o de verificar se as partículas de prata interferem na adesão, por meio da comparação da força de adesão entre a resina não modificada e a modificada com prata.

## **4. Ensaio para avaliação do grau de conversão das resinas após a fotopolimerização**

O objetivo neste caso seria o de verificar se as partículas de prata interferem no grau de conversão da resina composta modificada (quantidade de duplas ligações entre carbonos (C=C) que foi quebrada) durante o processo de polimerização.

## **5. Avaliação de alteração da rugosidade superficial**

Esta avaliação compararia a rugosidade superficial entre corpos de prova de resina não modificada e resina modificada com nanopartículas de prata.

## **6. Quantificação da liberação de prata em meios semelhantes à saliva humana**

Este estudo permitiria a quantificação da liberação da prata contida na resina composta, a fim de confrontar os resultados com os dados obtidos por estudos sobre a toxicidade das nanopartículas de prata às células humanas, já realizados e descritos na literatura.

## **7. Estudo *in situ* para avaliação do efeito de nanopartículas de prata na redução da formação de biofilme sobre as resinas compostas**

Este estudo corresponderia a uma avaliação da redução da adesão de células bacterianas sobre corpos de prova de resina composta contendo nanopartículas de prata instalados *in situ*, ou seja, na cavidade bucal.

## Apêndice 1

### Características das resinas odontológicas

As resinas odontológicas usadas para restaurações dentais são compósitos que possuem a seguinte composição (*Perdigão & Ritter, 2001*):

- **Matriz de resina (porção orgânica):** o principal monômero desta porção é o Bis-GMA, que faz com que a resina seja altamente viscosa. A utilização de um diluente é essencial para conter uma grande quantidade de carga e produzir uma consistência de pasta. Os diluentes podem ser monômeros de metacrilato, mas geralmente emprega-se o monômero de dimetacrilato, o TEDGMA. Este reduz a viscosidade, mas aumenta a contração de polimerização, o que não é desejável, então há uma porcentagem adequada dele no compósito (25% em peso).
- **Partículas de carga (porção inorgânica):** a adição visa melhorar as propriedades do produto final, geralmente são quartzo moído ou sílica coloidal. Há também cargas para dar cor às resinas. Hoje as resinas existem em várias tonalidades de cor, incluindo vários tons de branco, amarelo e cinza, o que possibilita a escolha da cor que se aproxima mais ao dente do paciente para a confecção de uma restauração.
- **Agente de união (silano):** são empregados mais comumente os organosilanos. O silano contém grupos silânicos que podem aderir aos silanóis na superfície das cargas, pela formação de uma adesão silânica (Si-O-Si). Os grupos metacrilato dos compostos organosilanos formam uma união covalente com a resina quando ela é polimerizada, completando assim o processo de união.

Atualmente os compósitos deste tipo usados na prática da Odontologia são ativados por luz visível, sendo possível polimerizar incrementos de 2 mm a 2.5 mm por vez, que é a espessura atingida pela ação da luz na resina. No dente são colocados vários incrementos, que vão sendo fotopolimerizados, até se obter o preenchimento completo da cavidade a ser restaurada. São fornecidas em uma única pasta que vem em uma seringa. Nesta pasta há um iniciador que libera os radicais livres e uma amina ativadora. Se expostos à luz num comprimento de onda ao redor de 468 nm, o iniciador se excita e interage com a amina para formar os radicais livres que iniciam a polimerização por adição. O fotoiniciador mais comumente empregado é a canforoquinona, que tem um intervalo de absorção de 400 a 500 nm, que é a zona azul do espectro de luz visível. Este iniciador está presente em 0,2% do peso. Um exemplo de ativador é a dimetilaminoetilmetacrilato, presente em 0,15% em peso. Para prevenir a polimerização espontânea da pasta, com a luz natural do ambiente, durante a manipulação dela no consultório são adicionados inibidores de polimerização nas resinas

compostas, os quais têm alta reatividade com os radicais livres. Quando todos os inibidores forem consumidos a propagação da cadeia ocorrerá. Um exemplo típico é o hidroxitoluenobutilado, empregado em 0,01% em peso (*Phillips, 1998*).

### **Especificações da resina usada no trabalho**

A resina composta fotopolimerizável Z250 é um compósito polimerizável por luz, radiopaco, indicado para restaurações de cavidades em dentes anteriores e posteriores. Os monômeros que compõem a sua porção orgânica são Bisfenol-A-glicidilmetacrilato (Bis-GMA), UDMA e BIS-EMA. O tipo de carga inorgânica presente nesta resina é zircônia/sílica. O conteúdo da carga é de 84,5 % em peso, ou 60% em volume. Esta é uma moderna resina, que já pertence à geração das resinas nanoparticuladas, ou seja, suas partículas de carga inorgânica possuem tamanho a partir de 10 nm.

### **Características das nanopartículas de prata empregadas**

As nanopartículas de prata foram fabricadas e fornecidas pela empresa Nanox® Tecnologia S. A., (São Carlos . SP, Brasil). Há uma matriz de óxido, com sílica amorfa ( $\text{SiO}_2$ ), na qual o metal, a prata, fica adsorvida. O diâmetro médio das partículas é 10 a 12  $\mu\text{m}$  para a sílica, e de 20 a 50nm para a prata, que se apresenta adsorvida nela.

## Apêndice 2

### Composição do meio ágar sacarose modificado:

- TSA (*Tryptic Soy Agar*) . 15 g
- Extrato de levedura . 5 g
- Acetato de sódio . 20 g
- Sulfito de sódio . 0.1 g
- L-cisteína . 0.2 g
- Casitone . 15 g
- Sacarose . 200 g
- Água destilada . 1000 ml

### Composição do PBS (solução salina tamponada fosfatada, pH 7.4):

- NaCl . 8 g
- KCl . 0.2 g
- Na<sub>2</sub> HPO<sub>4</sub> . 1.15 g
- KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> . 20g
- Água destilada . 1000 ml

Para o preparo de PBS com sacarose foi incluído além dos componentes acima 20 % de sacarose (açúcar de cozinha refinado).