

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

“Propriedades físicas e de adesão bacteriana de uma resina composta fotopolimerizável modificada com nanopartículas de prata”

**Patrícia Bolzan Agnelli das Neves**

**São Carlos**  
**2014**

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

“Propriedades físicas e de adesão bacteriana de uma resina composta fotopolimerizável modificada com nanopartículas de prata”

**Patrícia Bolzan Agnelli das Neves**

Tese de Doutorado apresentada na Universidade Federal de São Carlos como parte dos requisitos para obtenção do título de doutora em Biotecnologia.

Orientadores:  
*Prof. Dr. Clovis Wesley Oliveira de Souza*  
*Prof.<sup>a</sup>. Dra. Cristina Kurachi*

**São Carlos**  
**2014**

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

N518pf

Neves, Patrícia Bolzan Agnelli das.

Propriedades físicas e de adesão bacteriana de uma resina composta fotopolimerizável modificada com nanopartículas de prata / Patrícia Bolzan Agnelli das Neves. -- São Carlos : UFSCar, 2014.  
102 f.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2014.

1. Biotecnologia. 2. Propriedades físicas. 3. Adesão bacteriana. 4. Resina composta. 5. Nanopartículas de prata. 6. *Streptococcus mutans*. I. Título.

CDD= 660.6 (20ª)

**Patricia Bolzan Agnelli das Neves**

Tese de Doutorado 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 Doutor em  
Biotecnologia

**Aprovado em: 24/11/2014**

**BANCA EXAMINADORA**



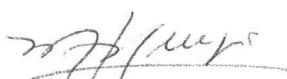
---

Prof. Dr. Clovis Wesley Oliveira de Souza (Orientador)  
(Departamento de Morfologia e Patologia /UFSCar)



---

Profa. Dra. Alessandra Nara de Souza Rastelli  
(Dep. Odontologia Restauradora/ UNESP)



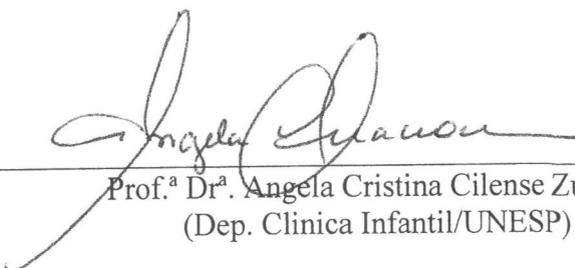
---

Profa. Dra. Mirna Helena Regali Seleglim  
(Dep. Ecologia e Biologia Evolutiva/ UFSCar)



---

Prof.ª Dr.ª Cristina Paiva de Sousa  
(Dep. Morfologia e Patologia/UFSCar)



---

Prof.ª Dr.ª Angela Cristina Cilense Zuanon  
(Dep. Clínica Infantil/UNESP)

## SÚMULA CURRICULAR

- Graduada em Odontologia pela Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FORP-USP)
- Especialista em Endodontia pela Associação Paulista dos Cirurgiões Dentistas, regional de São Carlos (APCD São Carlos)
- Especialista em Saúde da Família pelo Centro Universitário Central Paulista (UNICEP São Carlos)
- Mestre em Biotecnologia pela Universidade Federal de São Carlos (UFSCar)
- Tutora Virtual capacitada pela Universidade Federal de São Carlos (UFSCar) e pela Associação Nacional dos Tutores de Educação à Distância (ANATED)
- Tutora Virtual de Microbiologia no curso de graduação em Engenharia Ambiental da Universidade Federal de São Carlos, modalidade à distância (EaD-UFSCar)

## ARTIGOS RELACIONADOS À TESE

- Artigo publicado na *Revista Sul-Brasileira de Odontologia*:

Neves, P.B.A.; Souza, C.W.O.; Pizzolitto, E.L. *In vitro* reduction of *Streptococcus mutans* biofilm on silver nanoparticle-modified resin composite. Rev. Sul-Bras. Odontol., v. 11, n. 4, p. 368-376, 2014.

- Artigo publicado na *Brazilian Dental Journal*:

Neves, P.B.A.; Agnelli, J.A.M.; Kurachi, C.; Souza, C.W.O. Addition of silver nanoparticles to composite resin: effect on physical and bactericidal properties *in vitro*. Braz. Dent. J., v. 25, n. 2, p. 141-145, 2014.

## **AGRADECIMENTOS INSTITUCIONAIS**

Agradeço à empresa Nanox® Tecnologia S.A., (São Carlos - SP, Brasil) por fornecer as nanopartículas de prata para a realização das pesquisas que compõem essa tese.

Agradeço à CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior) pelo apoio financeiro, por meio do fornecimento da bolsa de doutorado.

Agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de São Carlos pela infra-estrutura fornecida ao curso e pelo apoio concedido aos alunos.

## AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

### *Agradeço de forma especial ...*

Aos meus orientadores, Clovis Wesley Oliveira de Souza (Departamento de Morfologia e Patologia – UFSCar) e Cristina Kurachi (Departamento de Física e Ciência dos Materiais – IFSC/USP), por tudo o que me ensinaram, pela orientação na execução deste trabalho e pela convivência harmoniosa que tivemos ao longo do curso.

Ao meu orientador, Clovis Wesley Oliveira de Souza, por dar-me a oportunidade de atuar durante vários semestres como tutora virtual de Microbiologia no curso de Engenharia Ambiental (da Educação à Distância - UFSCar), no qual é o professor responsável por essa disciplina. Ser tutora é motivo de muita satisfação, por poder acompanhar diariamente os alunos, ajudando-os a aprender os conteúdos, ajudando-os a seguir o curso de forma correta e determinada e compartilhando idéias e pensamentos.

Aos funcionários e funcionárias do Departamento de Morfologia e Patologia da UFSCar, onde passei a maior parte do tempo durante o meu curso de Mestrado e também de Doutorado, sobretudo Ivete Palombo e Zélia Venésio, pela colaboração na realização dos trabalhos práticos que foram realizados nesse departamento, mais especificamente dos ensaios de avaliação da atividade antimicrobiana do material experimental. Agradeço a elas também pela eficiência em manter o ambiente de trabalho agradável e organizado, e pelo carinho que destinam aos alunos e a todos que freqüentam o departamento.

Ao Prof. Dr. José Augusto Marcondes Agnelli (Departamento de Engenharia de Materiais, DEMa - UFSCar), como pai e como professor, pelo apoio concedido durante o curso e pela co-orientação em grande parte dos experimentos. Agradeço por orientar a execução dos ensaios de avaliação das propriedades físicas do material experimental, descritos nesta tese.

Ao Fábio Gomes Melchiades (DEMa - UFSCar), por colaborar realizando todas as medidas da espectrofotometria de cor.

À Lidiane Cristina Costa (Centro de Caracterização e Desenvolvimento de Materiais (CCDM), DEMa - UFSCar), pela grande ajuda na execução da medida de transmitância e pela preparação das amostras para o experimento de análise da distribuição e dispersão da prata do material experimental (através de Microscopia Eletrônica de Transmissão).

Ao Diego Davi Coimbra (Laboratório de Caracterização Estrutural (LCE), DEMa - UFSCar), por operar o microscópio eletrônico de transmissão, equipamento utilizado para a avaliação da distribuição e dispersão das nanopartículas de prata nas amostras de resina.

À Ana Claudia Moretti Vieira (Laboratório de Caracterização Estrutural (LCE), DEMa - UFSCar), por operar o microscópio de força atômica e o espectrômetro de fluorescência de raios X, equipamentos empregados respectivamente nos experimentos de avaliação da rugosidade superficial e análise da presença de prata no composto nanoparticulado.

À Prof.<sup>a</sup> Dra. Alessandra Nara de Souza Rastelli, com quem executei em conjunto vários trabalhos de pesquisa, agradeço pela troca de experiências e pelos conhecimentos adquiridos ao longo da positiva e prazerosa convivência que tivemos.

*... afinal, por trás de um bom trabalho sempre há uma grande equipe!*

*“O caminho mais curto para o sucesso é sempre tentar  
mais uma vez.”*

*Thomas Edison*

## RESUMO

A avaliação de novos materiais e biomateriais modificados com nanopartículas de prata é uma linha de pesquisa que vem ganhando força em várias áreas do conhecimento, inclusive na área odontológica. Porém, mesmo considerando a publicação científica internacional, ainda há poucas pesquisas que avaliam materiais restauradores dentários modificados desta forma.

*Proposição:* o propósito deste estudo foi comparar a resina composta fotopolimerizável modificada com um aditivo antimicrobiano nanoparticulado de prata (uma resina experimental), com a resina composta fotopolimerizável em sua forma não modificada, um material restaurador dentário disponível comercialmente, avaliando a propriedade antibacteriana, *in vitro*, e também algumas de suas principais propriedades físicas.

*Metodologia:* foram confeccionados discos de resina composta para 3 grupos experimentais: resina não modificada (grupo controle), e resina modificada com diferentes concentrações de nanopartículas de prata, 0,3 e 0,6% (grupos 1 e 2). A atividade antibacteriana na superfície das amostras foi avaliada pelo crescimento *in vitro* de biofilme de *Streptococcus mutans* e *Lactobacillus acidophilus* em meio de cultura contendo 20% de sacarose, seguido de contagem de células viáveis provenientes dos biofilmes após 3 períodos de incubação, 1, 4 e 7 dias, através de diluições seriadas (n=9). Um ensaio de transmitância óptica foi realizado para medir a porcentagem de transmitância das amostras (n=9). A rugosidade superficial foi avaliada por Microscopia de Força Atômica (n=9). A cor das amostras e a diferença de cor entre os grupos foi medida em um ensaio de colorimetria considerando o sistema CIELab. A presença de prata no aditivo nanoparticulado foi analisada por meio da Espectrometria de Fluorescência de Raios X. A qualidade da dispersão e distribuição da prata nas amostras foi analisada através da Microscopia de Transmissão. Foi também avaliada a liberação de prata em saliva artificial, *in vitro*, após 3 períodos de incubação das amostras, sob agitação, 60, 120 e 210 dias, através da técnica de Espectrometria de Emissão Óptica por Plasma Acoplado Indutivamente.

*Resultados:* para os 3 tempos de incubação, o número de células viáveis foi estatisticamente mais baixo nos grupos 1 e 2 do que no grupo controle ( $p < 0,05$ ), e os grupos 1 e 2 não mostraram entre si diferença estatisticamente significativa ( $p > 0,05$ ), para as 2 espécies bacterianas (ANOVA Two way/Tukey). Não houve diferença significativa na transmitância óptica entre o grupo 1 e o controle ( $p > 0,05$ ), já o grupo 2 apresentou um valor de transmitância menor que os demais grupos ( $p < 0,05$ )

(ANOVA/Tukey). A análise dos valores de rugosidade aritmética, obtidos através do software *NanoScope*, mostrou que não houve diferença significativa na rugosidade superficial entre os 3 grupos ( $p > 0,05$ ) (ANOVA/Tukey). A partir das medições de cores, a diferença total de cor ( $\Delta E$ ) entre todos os grupos foi superior a 1 (valor mínimo que representa uma alteração de cor perceptível à visão humana) e inferior a 3,3 ( $\Delta E$  crítico). A presença de prata no aditivo nanoparticulado foi confirmada no ensaio de Fluorescência de Raios X. A análise microscópica demonstrou boa distribuição de prata para o grupo 1 e 2 (com prata nos 4 quadrantes das regiões analisadas), e a dispersão foi melhor para o grupo 1 do que para o grupo 2 (que apresentou maior número de aglomerados de partículas). Após os 3 tempos de incubação, não foi detectada a presença de prata na saliva artificial, para os 3 grupos, sendo que, se presente, ela encontrava-se em uma concentração abaixo do limite de detecção da técnica ( $< 0,02$  mg/L).

**Conclusões:** a propriedade antibacteriana foi verificada nas superfícies das resinas experimentais para as duas espécies bacterianas cariogênicas consideradas, e a adição de prata não provocou alterações negativas na resina modificada com a menor concentração de nanopartículas, o que viabiliza a continuidade do estudo.

**Descritores:** propriedades físicas, adesão bacteriana, resina composta, nanopartículas de prata, *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus acidophilus*.

## ABSTRACT

The evaluation of new materials and biomaterials modified with silver nanoparticles is a line of research that has been gaining strength in various knowledge areas including dentistry. Even considering international scientific publications, however, there are still few studies evaluating dental restoration materials that are modified with silver nanoparticles.

*Proposal:* this study aimed to compare a photopolymerizable composite resin modified with an antimicrobial silver nanoparticle additive (an experimental resin), with the photopolymerizable composite resin in its unmodified form (a commercially available dental restoration material), by evaluating the *in vitro* antibacterial properties and also some of the primary physical properties of the resin.

*Methodology:* composite resin disks were made for three experimental groups: unmodified resin (control group) and modified resin with different silver nanoparticle concentrations: 0.3% and 0.6% wt (groups 1 and 2). The antibacterial activity on the surface of the samples was evaluated by *in vitro* growth of *Streptococcus mutans* and *Lactobacillus acidophilus* biofilms in a 20% sucrose medium, which is followed by counting the viable cells from the biofilms through serial dilutions after three incubation periods - 1, 4 and 7 days (n = 9). Optical transmittance was tested to measure the percentage of transmittance in the samples (n = 9). The surface roughness was evaluated using Atomic Force Microscopy (n = 9). The colour of the samples and the colour difference between the groups was measured in a colorimetry test according to the CIELab system. The presence of silver in the nanoparticle additive was analysed using X-Ray Fluorescence Spectroscopy. The quality of the dispersion and distribution of silver on the samples was analysed using Transmission Microscopy. The liberation of silver in artificial saliva was also evaluated *in vitro* after three incubation periods (60, 120 and 210 days) with agitation of the samples, using the Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectroscopy technique.

*Results:* for the three incubation times, the number of viable cells was statistically lower in groups 1 and 2 than in the control group ( $p < 0.05$ ), and groups 1 and 2 were not statistically different ( $p > 0.05$ ) for the two bacterial species (ANOVA Two way/Tukey). There was no significant difference in optical transmittance between group 1 and the control ( $p > 0.05$ ), and group 2 had a lower transmittance value than the other groups ( $p < 0.05$ ) (ANOVA/Tukey). The analysis of the values of the arithmetic roughness, which was obtained using the *NanoScope* software, showed that there was no significant difference in surface roughness between the three groups ( $p >$

0.05) (ANOVA/Tukey). From the measurements of the colours, the total colour difference ( $\Delta E$ ) between all of the groups was higher than 1 (the minimum value that represents a colour alteration perceptible to human vision) and lower than 3,3 (critical  $\Delta E$ ). The presence of silver in the nanoparticle additive was confirmed in the X-Ray Fluorescence test. Microscopic analysis showed good distribution of silver for groups 1 and 2 (with silver in the four quadrants of the regions analysed). The dispersion was better for group 1 than for group 2 (which showed a higher number of particle clusters). After the three incubation times, silver was not detected in the artificial saliva for the three groups or; if it was present, the concentration was below the limit of detection for this technique ( $< 0.02$  mg/L).

*Conclusions:* the antibacterial property on the surfaces of the experimental resins was verified for the two cariogenic bacteria considered. Furthermore, the addition of silver did not cause negative alterations to the resin modified with the lower concentration of nanoparticles, which makes the continuation of this study possible and valuable.

**Descriptors:** physical properties, bacterial adhesion, composite resin, silver nanoparticles, *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus acidophilus*.

# SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>14</b>
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>17</b>
2.1. OBJETIVO GERAL.....	17
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	17
<b>3. JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>18</b>
<b>4. REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>19</b>
<b>5. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>25</b>
5.1. CONFECÇÃO DOS ESPÉCIMES COM A RESINA COMPOSTA FOTOPOLIMERIZÁVEL MODIFICADA E NÃO MODIFICADA.....	25
5.2. ESTUDO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DA RESINA MODIFICADA.....	29
5.2.1. FORMAÇÃO DE BIOFILME BACTERIANO <i>IN VITRO</i> SOBRE OS ESPÉCIMES.....	29
5.2.1.1. EXPERIMENTO COM BIOFILME DE <i>STREPTOCOCCUS MUTANS</i> .....	30
5.2.1.2. EXPERIMENTO COM BIOFILME DE <i>LACTOBACILLUS ACIDOPHILUS</i> .....	32
5.2.2. ESTIMATIVA DO NÚMERO DE CÉLULAS VIÁVEIS PRESENTES NOS BIOFILMES.....	33
5.3. ESTUDO DAS PROPRIEDADES FÍSICAS DA RESINA MODIFICADA.....	35
5.3.1. AVALIAÇÃO DA TRANSMITÂNCIA ÓPTICA.....	35
5.3.2. AVALIAÇÃO DA RUGOSIDADE SUPERFICIAL.....	37
5.3.3. COLORIMETRIA.....	41
5.3.4. ANÁLISE DA PRESENÇA DE PRATA NO ADITIVO NANOPARTICULADO.....	44
5.3.5. ANÁLISE DA DISPERSÃO E DISTRIBUIÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE PRATA NOS ESPÉCIMES.....	46
5.3.6. ANÁLISE DA LIBERAÇÃO DE PRATA EM SALIVA ARTIFICIAL.....	49

<b>6. RESULTADOS.....</b>	<b>53</b>
6.1. ESTUDO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DA RESINA MODIFICADA.....	53
6.1.1. CONTAGEM DE CÉLULAS VIÁVEIS PARA O EXPERIMENTO COM BIOFILME DE <i>STREPTOCOCCUS MUTANS</i> .....	53
6.1.2. CONTAGEM DE CÉLULAS VIÁVEIS PARA O EXPERIMENTO COM BIOFILME DE <i>LACTOBACILLUS ACIDOPHILUS</i> .....	58
6.2. ESTUDO DAS PROPRIEDADES FÍSICAS DA RESINA MODIFICADA.....	64
6.2.1. AVALIAÇÃO DE TRANSMITÂNCIA ÓPTICA.....	64
6.2.2. AVALIAÇÃO DA RUGOSIDADE SUPERFICIAL.....	64
6.2.4. COLORIMETRIA.....	67
6.2.5. ANÁLISE DA PRESENÇA DE PRATA NO ADITIVO NANOPARTICULADO.....	68
6.2.6. ANÁLISE DA DISPERSÃO E DISTRIBUIÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE PRATA NOS ESPÉCIMES.....	71
6.2.7. ANÁLISE DA LIBERAÇÃO DE PRATA EM SALIVA ARTIFICIAL.....	72
<b>7. DISCUSSÃO.....</b>	<b>74</b>
<b>8. CONCLUSÕES.....</b>	<b>79</b>
<b>9. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....</b>	<b>80</b>
<b>10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>83</b>
<b>APÊNDICE 1.....</b>	<b>92</b>
<b>APÊNDICE 2.....</b>	<b>94</b>
<b>ANEXO 1.....</b>	<b>96</b>

## 1. INTRODUÇÃO

A Nanotecnologia consiste na tecnologia da manipulação dos materiais em escala nanométrica. Seu objetivo é conhecer e controlar as propriedades dos materiais nesta escala, que são diferentes do que as propriedades dos mesmos em escala macrométrica, para que seja possível a produção de estruturas e dispositivos inovadores (Salata, 2004; Duran et al., 2006; Li et al., 2008; Allaker et al., 2010; Blecher et al., 2011). Esta tecnologia tem sido cada vez mais compreendida e empregada nos dias atuais, em diferentes aplicações, sendo uma delas a produção de materiais com ação antimicrobiana. Cresce intensamente o uso de nanopartículas, em revestimentos para outros materiais ou incorporados neles, para a obtenção de utensílios que sejam menos favoráveis à proliferação microbiana em suas superfícies, após a descoberta de que alguns materiais apresentam atividade antimicrobiana quando nanoparticulados (Salata, 2004; Kim et al., 2008; De Muynck et al., 2009; Dror Ehre et al., 2010; Lemire et al., 2013).

As nanopartículas de prata já estão sendo utilizadas comercialmente como um componente antimicrobiano em instrumentos e equipamentos médicos, e até mesmo em material que ficará no interior dos organismos dos pacientes, como os cateteres, atualmente na fase de testes *in vivo* (Samuel & Guggenbichler, 2004). Também estão sendo empregadas, com a mesma finalidade de controle microbiano em superfície, em embalagens para alimentos e em peças de equipamentos eletrodomésticos, como máquinas de lavar, aparelhos de ar condicionado, purificadores de ar, purificadores de água e secadores de cabelo, inclusive em produtos já lançados comercialmente (Sanpui et al., 2008; Allaker, 2010). O emprego das nanopartículas de prata em instrumentos e equipamentos odontológicos, principalmente em revestimentos de cadeiras, refletores e bandejas, tem sido alvo de muitos estudos. Alguns materiais odontológicos que possuem o local de aplicação no interior da cavidade bucal, contendo nanopartículas de prata em sua composição, estão em fase de testes *in vitro* (Damm et al., 2007; Ahn et al., 2009; Burgers et al., 2009; Agnelli, 2011).

A formação do biofilme bacteriano ocasiona muitas doenças na cavidade bucal, sendo então muito importante buscar formas alternativas para o seu controle, o que tem ocorrido com grande frequência em recentes pesquisas na área da Odontologia (Jorge, 2007; Wolf & Hassell, 2008). A gengivite bacteriana é causada por biofilme, e pode evoluir para a periodontite, uma doença que danifica os tecidos de suporte do dente (osso alveolar, cemento e ligamento periodontal). Esta doença é de elevada gravidade por culminar na perda do elemento dental, caso não tratada precocemente

(Carranza & Neuman, 1997; Wolf & Hassell, 2008). A cárie dentária é uma doença infecciosa, causada por bactérias (denominadas cariogênicas) que formam biofilme nos dentes (Keyes, 1960). Ela consiste na desmineralização dos tecidos duros dentais (esmalte e dentina) causada pelos ácidos provenientes do metabolismo das bactérias cariogênicas que estão aderidas ao dente (Catalan et al., 1987; tem Cate, 2006). Os materiais restauradores, utilizados para o preenchimento de cavidades dentárias decorrentes de cáries ou fraturas, também podem ser colonizados por bactérias e acumular biofilme, assim como os materiais das próteses dentárias, fixas ou removíveis, e não apenas os dentes, portanto a prevenção do acúmulo do biofilme sobre tais materiais é de grande importância (Swift, 1988; Creanor et al., 1994; Wolf & Hassell, 2008).

A resina composta fotopolimerizável é um dos materiais restauradores dentais mais empregados atualmente, devido a vários fatores: características estéticas, propriedade de adesão ao dente (possibilitando preparos cavitários menos extensos), praticidade quanto à manipulação, grande tempo de trabalho e propriedades físicas que foram crescentemente melhoradas ao longo do tempo (Phillips, 1998; Perdigão & Ritter, 2001). Uma resina composta fotopolimerizável que dificulte a formação do biofilme bacteriano sobre sua superfície ajudará a prevenir a cárie recidivante, que é a cárie que volta a ocorrer ao redor de margens de restaurações ou na interface dente/restauração, além de colaborar na manutenção de uma boa condição de higiene bucal. O benefício da aplicação de uma resina composta com essa propriedade abrange ainda a prevenção da cárie que ocorre nas proximidades de *brackets* ortodônticos, visto que esta resina também é um dos materiais mais indicados para a colagem destes *brackets* no esmalte dental (Phillips, 1998; Perdigão & Ritter, 2001).

Os resultados registrados na literatura são promissores quanto à aplicação clínica de resinas incorporadas com nanopartículas de prata. Burgers et al. (2009) avaliaram a atividade antibacteriana de resina composta contendo nanopartículas de prata, em duas diferentes concentrações. Os autores verificaram em seus resultados vantagens das nanopartículas de prata nas resinas, pois uma maior quantidade de células bacterianas aderidas ocorreu nas amostras sem prata. Ahn et al. (2009) e Melo et al. (2013), que compararam dois adesivos resinosos convencionais com um adesivo contendo nanopartículas de prata, também verificaram a ação antibacteriana destas partículas, pois a adesão de células bacterianas foi menor sobre o adesivo experimental. Também verificamos resultados positivos em um trabalho anterior (Agnelli, 2011). Observamos a redução *in vitro* do biofilme de *Streptococcus mutans*, uma espécie bacteriana cariogênica, sobre uma resina composta fotopolimerizável

experimental, com 0,3% de nanopartículas de prata, sem que essa concentração reduzisse a sua resistência à compressão, conforme demonstrado em um ensaio de compressão realizado sob a norma *ASTM D 695-10 (2010)*.

Frente a estes resultados promissores tornam-se muito valiosos os novos estudos que verifiquem a ocorrência de inibição do biofilme microbiano sobre materiais restauradores acrescidos de nanopartículas de prata, que possuem ação bactericida. É essencial que os estudos verifiquem também se as propriedades físicas do material não são prejudicadas, para que continuem apresentando os requisitos estruturais de um bom restaurador dentário.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. OBJETIVO GERAL

O objetivo geral do estudo foi comparar a resina composta fotopolimerizável modificada com nanopartículas de prata, as quais possuem propriedade antimicrobiana (uma resina experimental), com a resina composta fotopolimerizável em sua forma não modificada, considerando a atividade antibacteriana exercida em superfície, e também algumas de suas principais propriedades físicas, a fim de avaliar a sua viabilidade para futuros ensaios *in vivo* e posterior emprego clínico.

### 2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Foram os objetivos específicos do trabalho:

- Confirmar a presença de prata nas partículas (no pó que contém nanopartículas de prata, em sua forma disponível comercialmente);
- Avaliar a atividade antibacteriana na superfície da resina modificada com nanopartículas de prata, *in vitro*;
- Avaliar a alteração da transmitância e da rugosidade superficial, decorrentes da modificação experimental da resina, a adição de nanopartículas de prata;
- Medir a alteração de cor que ocorreu em decorrência da modificação experimental, ou seja, medir e comparar a cor entre resina modificada e não modificada, utilizando uma mesma cor de resina;
- Analisar a qualidade da dispersão e da distribuição da prata nas amostras;
- Avaliar a liberação de prata proveniente das amostras em saliva artificial, *in vitro*.

### **3. JUSTIFICATIVA**

O estudo proposto, unido a outros estudos atuais e futuros com objetivos confluentes, poderá levar ao lançamento comercial de uma nova linha de resina composta fotopolimerizável, que apresente uma propriedade alternativa em relação àquela já disponível no mercado.

## 4. REVISÃO DE LITERATURA

Vários estudos já demonstraram a ação antimicrobiana que ocorre em decorrência da presença de nanopartículas de prata em soluções aquosas. *Hernandez-Sierra et al. (2008)* compararam os efeitos bactericidas e bacteriostáticos produzidos por nanopartículas de prata, óxido de zinco e nanopartículas de ouro, em meio nutriente líquido, sobre a espécie *S. mutans*. O objetivo foi obter a concentração inibitória mínima e a concentração bactericida mínima, para cada um destes materiais. Tanto a concentração inibitória mínima como a bactericida mínima foram mais baixas para a prata do que para o zinco e o ouro. *Dror-Ehre et al. (2009)* investigaram o efeito das nanopartículas de prata sobre a espécie *E. coli*, em meio nutriente líquido. As nanopartículas foram suspensas em diferentes concentrações, de 1 a 60 µg/mL, no caldo contendo células de *E. coli*. Nanopartículas de ouro foram usadas como controle, consideradas pelos autores como inertes. Na presença das nanopartículas de prata ocorreu redução do número de células bacterianas. Nenhuma redução foi verificada na presença de ouro. Os autores constataram que, quanto maior foi a concentração de nanopartículas de prata, maior foi a redução do número de células.

Os mecanismos antimicrobianos das nanopartículas de prata também foram relatados e explicados na literatura. Elas prejudicam o transporte de elétrons através da membrana celular, e acarretam uma inibição da síntese de DNA bacteriano quando conseguem adentrar nestas células. Entre os principais trabalhos que discutiram estes mecanismos estão os de *Li et al. (2008)*, *Allaker (2010)*, *Blecher et al. (2011)* e *Lemire et al. (2013)*.

Nas últimas duas décadas começaram a surgir estudos que avaliam a incorporação de nanopartículas de prata em biomateriais, que são materiais com indicação para serem usados em íntimo contato com o organismo humano ou então substituindo partes do organismo, e estes estudos vêm crescendo cada vez mais. A finalidade deles é verificar se é possível tornar os biomateriais menos favoráveis à adesão bacteriana e à sua proliferação. *Samuel & Guggenbichler (2004)* avaliaram a formação de biofilme bacteriano sobre a superfície de um cateter inovador, confeccionado com silicone e poliuretano, contendo também nanopartículas de prata, com o intuito de colaborar com o surgimento de novos métodos de prevenção de infecções relacionadas a cateteres, já que elas representam grande parte dos casos de septicemia em ambiente hospitalar. Neste cateter as partículas de prata são ativadas pela adição de eletrólitos e ácidos, usados para aumentar a atividade antimicrobiana devido ao aumento da liberação de íons prata. Tais cateteres

apresentaram importante atividade antimicrobiana *in vitro*. Percival et al. (2007) estudaram a atividade antimicrobiana de curativos modificados com nanopartículas de prata em relação a alguns tipos de microrganismos, *in vitro*. Foi verificada inibição do crescimento dos microrganismos pelos curativos modificados, em um teste padrão em ágar, para as seguintes espécies: *P. aeruginosa*, *C. albicans*, *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *E. faecalis* e *E. coli*.

Roe et al. (2008) também analisaram cateteres de plástico modificados com nanopartículas de prata, considerando a atividade antimicrobiana nas superfícies. Eles foram recobertos com prata através da técnica que utiliza AgNO<sub>3</sub> (surfactante e agente redutor), técnica denominada *coating*. Os cateteres apresentaram ação antibacteriana e redução na formação de biofilme, para as espécies *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *C. albicans*. Thom et al. (2009) investigaram a redução da formação de biofilme bacteriano em diversos biomateriais revestidos com prata e constataram este efeito em relação às espécies *P. aeruginosa* e *S. aureus*. Juan et al. (2010) estudaram a superfície do titânio recoberto com nanopartículas de prata, um biomaterial usado em implantes ósseos. Observaram atividade antibacteriana no titânio modificado, após experimentos com contagem do número de células bacterianas aderidas e observação do biofilme em microscópio eletrônico de varredura, atividade que foi verificada para *S. aureus* e *E. coli*.

Os materiais odontológicos que são empregados no interior da cavidade bucal, como os materiais para implantes dentários, materiais para próteses dentárias e os materiais restauradores dentais, também podem ser considerados biomateriais. Estudos que avaliam as propriedades dos materiais odontológicos modificados com nanopartículas de prata também começaram a surgir nos últimos anos, e ganham importância crescente no meio científico.

Carreira et al. (2009) investigaram, no campo Odontológico, o efeito de uma solução experimental contendo nanopartículas de prata na descontaminação de limas endodônticas, que são instrumentos empregados pelos dentistas no tratamento endodôntico (tratamento de canal radicular). As limas foram propositalmente contaminadas por *S. aureus*, *S. mutans*, *E. faecalis*, *E. coli* e *C. albicans*, e depois foram submersas na solução experimental, durante diferentes intervalos: 5, 10, 15 e 30 minutos. A solução com nanopartículas de prata promoveu uma redução do número de células bacterianas superior a 90% sobre todas as espécies bacterianas descritas, após o tempo de 30 minutos. Os autores constataram que a solução experimental foi efetiva na descontaminação das limas, e também que a eficácia da descontaminação foi diretamente relacionada ao tempo de contato com a solução.

*Oliscovicz (2014)*, em um estudo voltado aos materiais odontológicos usados em Implantodontia, avaliou a atividade antibacteriana e algumas propriedades físicas de um recobrimento de superfície à base de prata, o vanadato de prata nanoestruturado ( $\text{AgVO}_3$ ), quando aplicado em diferentes substratos correspondentes a materiais usados em dispositivos para implante dentário: poliacetal, teflon e resina acrílica. Um recobrimento foi aplicado com diferentes concentrações de  $\text{AgVO}_3$  (2,5, 5 e 10%). Em todas as concentrações houve atividade antibacteriana em relação às espécies *P. aeruginosa*, *E. coli*, *S. mutans*, *E. faecalis* e *S. aureus*, sendo a maior concentração (10%) a que mais se mostrou efetiva para todas as espécies. A rugosidade superficial foi estatisticamente maior nos substratos com filme de recobrimento do que nos sem filme, sendo que a concentração de 10% causou a alteração na rugosidade superficial mais significativa. A dureza superficial dos materiais estudados não foi afetada pela aplicação do recobrimento, apenas a concentração de 10% alterou significativamente a dureza superficial do teflon.

*Castro (2014)* avaliou o efeito da incorporação do  $\text{AgVO}_3$  (nas concentrações de 2,5, 5 e 10%) na atividade antimicrobiana e em algumas propriedades mecânicas das resinas acrílicas (usadas para base de próteses removíveis). Considerou-se uma resina acrílica autopolimerizável e uma termopolimerizável. A atividade antimicrobiana foi constatada em relação às espécies *C. albicans*, *S. mutans*, *S. aureus* e *P. aeruginosa*, para os dois tipos de resina acrílica, e foi dependente da concentração do aditivo. A rugosidade superficial de ambas não foi alterada com nenhuma das concentrações de aditivo. A resistência à compressão da resina autopolimerizável permaneceu inalterada, e a da resina termopolimerizável diminuiu consideravelmente com as concentrações mais altas, 5 e 10%.

Os estudos de *Carreira et al. (2009)*, *Oliscovicz (2014)* e *Castro (2014)*, somados aos demais estudos que serão relatados a seguir, e que avaliaram materiais usados em restaurações dentárias também associados a antimicrobianos nanoparticulados à base de prata, demonstram o quanto esta linha de pesquisa tem se tornado importante para a Odontologia. *Burguers et al. (2009)* relataram resultados positivos em relação à aplicação clínica dos materiais restauradores incorporados com nanopartículas de prata. Alguns autores já relataram também resultados positivos em relação a *primers* ou adesivos resinosos, que são aplicados nas cavidades dentárias previamente à resina composta, incorporados com nanopartículas de prata, como *Ahn et al. (2009)*, *Cheng et al. (2012)* e *Melo et al. (2013)*.

*Burguers et al. (2009)*, estudaram a redução do biofilme bacteriano exercida por uma resina composta odontológica adicionada de nanopartículas de prata. Este material foi um material apenas experimental, pois ainda não existem resinas

compostas contendo prata lançadas no mercado. A redução do biofilme foi avaliada em relação à espécie *S. mutans*. Foram preparadas amostras de resina circulares, com 10 mm de diâmetro, em 2 concentrações diversas de nanopartículas de prata: 0,3% e 0,6%. As amostras foram incubadas em saliva artificial por 120 minutos a 37°C, e depois em uma suspensão de *S. mutans* em PBS por 1 hora a 37°C. A atividade metabólica dos biofilmes foi comparada por meio de um ensaio de biofluorescência, com o uso do sal *Resazurin*. Uma maior atividade ocorreu nas amostras de resina composta sem prata, em relação às amostras de resina com prata, nas 2 concentrações, com significância estatística. Além disso, verificou-se que a hidrofobicidade das superfícies das resinas adicionadas de prata foi significativamente maior do que a hidrofobicidade da resina controle. Isso foi observado a partir de ensaios de medição de ângulos de contato da água com a superfície dos materiais, e os ângulos aumentaram com a adição de prata.

*Ahn et al. (2009)* realizaram um estudo com materiais odontológicos, comparando adesivos dentais resinosos experimentais, modificados com nanopartículas de prata, com dois adesivos convencionais, disponíveis comercialmente: um resinoso e um adesivo misto, à base de resina e de ionômero de vidro (que é também um outro tipo de material restaurador odontológico). A rugosidade e a energia livre da superfície foram caracterizadas por meio de Microscopia Confocal de Varredura a laser. A adesão bacteriana foi avaliada a partir das medidas da densidade óptica das suspensões de bactérias originadas a partir do biofilme aderido em cada adesivo. Os autores verificaram que a rugosidade do adesivo experimental foi maior devido à presença das partículas de prata, mas a adesão bacteriana foi menor.

*Cheng et al. (2012)* incorporaram nanopartículas de prata e dimetacrilato de amônio quaternário (QADM) em um *primer* de um sistema adesivo (solução que é aplicada na cavidade dental a ser restaurada antes do adesivo e da resina composta). Quatro grupos experimentais de materiais foram avaliados, o grupo controle, que correspondia ao *primer* em sua forma comercial, e outros 3 grupos, produzidos a partir da adição de QADM (10% em massa), adição de nanopartículas de prata (0,05% em massa), e adição dos dois componentes (mantidas as concentrações de 10 e 0,05%). A adesão à dentina não apresentou diferença estatística entre todos os grupos experimentais, ou seja, as modificações feitas no material original não prejudicaram a adesão ao dente. Os 3 grupos contendo *primer* modificado apresentaram significativamente maior atividade antibacteriana do que o grupo controle.

*Melo et al. (2013)* incorporaram nanopartículas de prata e fosfato de cálcio em um adesivo resinoso, e também avaliaram a atividade antibacteriana e a adesão à dentina dos materiais experimentais. O grupo experimental de adesivo contendo

nanopartículas de prata (na concentração de 0,1% em massa) apresentou aumento significativo da atividade antibacteriana em relação ao grupo controle, o adesivo em sua forma comercial, e em relação aos grupos contendo fosfato (com concentrações de 10, 20, 30 e 40%, em massa). A adesão à dentina não foi afetada por nenhuma das modificações feitas no adesivo, todos os grupos mostraram valores estatisticamente iguais para a força de adesão.

Alguns estudos têm sido desenvolvidos atualmente, também com o objetivo de prolongar a durabilidade de restaurações e prevenir a recorrência de cárie, através da redução da adesão de microrganismos nos materiais restauradores, mas com o auxílio de outras substâncias com atividade antimicrobiana, diferentes da prata. Eles investigam o acréscimo de certas substâncias, como monômeros modificados, clorexidina e nanopartículas de dióxido de titânio, nos materiais restauradores dentários ou em *primers* e adesivos dos sistemas adesivos (aplicados nas cavidades previamente à resina), e posteriormente avaliam a ação antimicrobiana na superfície de restauração modificada. Os resultados de alguns destes estudos foram promissores, como os de *Sanders et al. (2002)*, *Yudovin-Farber et al. (2008)* e *Elsaka et al. (2011)*, para materiais restauradores modificados, e os de *Sehgal et al. (2007)* e *Imazato (2009)*, para os adesivos modificados.

*Sanders et al. (2002)* avaliaram a atividade antimicrobiana na superfície do ionômero de vidro (um material restaurador dentário) adicionado de clorexidina. Amostras de ionômero com e sem clorexidina foram incubadas em meio com *S. mutans* por 4 semanas, e as amostras de ionômero modificado apresentaram redução significativa no número de células bacterianas presentes nos biofilmes até a terceira semana de incubação. *Yudovin-Farber et al. (2008)* relataram que a resina composta modificada com uma concentração de 1% de nanopartículas de polietilenoimina de amônio quaternário (QA-PEI) apresentou efeito antibacteriano contra *Streptococcus mutans*, e não resultou em efeito tóxico para células animais. *Elsaka et al. (2011)* investigaram a atividade antimicrobiana na superfície do ionômero de vidro adicionado de nanopartículas de titânio (TiO<sub>2</sub>), avaliando duas concentrações de nanopartículas: 3% e 5%, em massa. A redução do número de células de *S. mutans* aderidas nas amostras modificadas com titânio foi significativamente menor do que nas amostras controle, para as 2 concentrações.

*Sehgal et al. (2007)* modificaram um adesivo resinoso com cloreto de benzalcônio, uma substância com ação bactericida previamente comprovada, e verificaram que o adesivo experimental inibiu o crescimento bacteriano em relação à espécie *S. mutans*, sem prejudicar a força de adesão do material ao esmalte dental, comparando com a força de adesão do controle (o adesivo não modificado). *Imazato*

(2009) constataram em uma revisão de literatura a ação antibacteriana do monômero MDPB (brometo de metacriloiloxidodecilveridínio), um monômero que foi desenvolvido com a propriedade bactericida especialmente para ser incluído em sistemas adesivos resinosos odontológicos, para possibilitar a confecção de restaurações que exercem o controle do crescimento de biofilme em suas interfaces. Esta ação foi demonstrada em alguns estudos e posteriormente o produto MDPB passou a ser usado comercialmente, com sucesso, sendo um componente do *primer* pertencente ao sistema adesivo resinoso *Clearfil Protect Bond*.

Todos estes estudos acima citados, incluindo também os que avaliam as nanopartículas de prata em materiais restauradores, partem do conhecimento de que um material restaurador que seja menos favorável à adesão bacteriana colabora para uma condição bucal mais saudável, ajudando a evitar doenças gengivais e a recorrência de cárie em suas proximidades. Eles revelam a proposta moderna da Odontologia Restauradora, que é preservar os tecidos dentários sadios remanescentes, além de substituir o tecido dentário perdido, buscando, através do emprego de materiais inovadores e técnicas bem conduzidas, evitar a recidiva de cárie ao redor das margens das restaurações e até mesmo o aparecimento de novas cáries.

## 5. MATERIAL E MÉTODOS

### 5.1. CONFECÇÃO DOS ESPÉCIMES COM A RESINA COMPOSTA FOTOPOLIMERIZÁVEL MODIFICADA E NÃO MODIFICADA

Foram preparados para os experimentos 3 amostras, sendo os espécimes em formato cilíndrico (discos): resina composta não modificada e resina modificada com nanopartículas de prata, em 2 concentrações diferentes: 0,3% e 0,6%, em massa. A marca comercial de resina composta usada para o preparo das amostras foi a *Herculite Classic*, cor A2 (esmalte), produzida pela *SDS Kerr (Orange, CA, EUA)*, mostrada na Figura 1. Maiores informações sobre as resinas compostas e sobre esta marca comercial são encontradas no Apêndice 1. Tais concentrações foram escolhidas por apresentarem bons resultados em estudos anteriores (*Burguers et al., 2009; Agnelli 2011*). Os grupos experimentais, de acordo com o *tipo* de material avaliado, seguem ao longo da tese sendo denominados da seguinte maneira:

- *Grupo controle*: resina composta não modificada
- *Grupo 1*: resina composta modificada com nanopartículas de prata, com uma concentração de 0,3% (em massa) do aditivo nanoparticulado
- *Grupo 2*: resina composta modificada com nanopartículas de prata com uma concentração de 0,6% (em massa) do aditivo nanoparticulado



**Figura 1.** Seringa contendo 4 g de resina composta fotopolimerizável da marca *Herculite Classic*, da *SDS Kerr*.

As nanopartículas de prata usadas foram as produzidas pela empresa *Nanox® Tecnologia S. A. (São Carlos, SP, Brasil)*, em sua forma comercial, *Nanox Clean®*, assim como é fornecida para outras empresas para a incorporação em seus respectivos produtos. A sua aparência é de um pó muito fino e de cor cinza claro. Neste composto a prata fica adsorvida em uma matriz de óxido, com sílica amorfa ( $\text{SiO}_2$ ). O diâmetro médio das partículas é 10 a 12  $\mu\text{m}$  para a sílica, e de 20 a 50 nm para a prata, que se apresenta adsorvida nela, segundo informações fornecidas e certificadas pela própria empresa.

Foram utilizadas matrizes metálicas para a acomodação do material antes da polimerização e padronização do formato e tamanho dos discos de resina. Para os experimentos microbiológicos, que compõem o estudo da atividade antibacteriana, foram preparados discos a partir de uma matriz com um orifício circular de 4 mm de diâmetro por 2 mm de altura (Figura 2). Para alguns dos experimentos que compõem o estudo das propriedades físicas foram preparados discos em outro tamanho, com maior diâmetro e espessura menor, mas também com formato cilíndrico. Para isso foi usada uma matriz com um orifício circular de 10 mm de diâmetro por 1 mm de altura (Figura 3). Essas dimensões são indicadas para uma boa adaptação na maioria dos equipamentos utilizados para ensaios de comportamento físico de materiais odontológicos, por isso foram escolhidas. As duas matrizes foram produzidas na oficina do Departamento de Engenharia de Materiais da Universidade Federal de São Carlos.



**Figura 2.** Matriz metálica utilizada na confecção dos espécimes para os ensaios de avaliação da atividade antibacteriana, com orifício central de 4 mm de diâmetro e com 2 mm de altura.



**Figura 3.** Matriz metálica utilizada na confecção dos espécimes para os ensaios físicos, com orifício central de 10 mm de diâmetro e 1 mm de altura. A parte metálica principal se separa para facilitar a remoção do disco de resina após sua polimerização.

Para a confecção dos espécimes de resina composta modificada (experimental), foi realizada a pesagem dos componentes para a obtenção da concentração desejada (resina e nanopartículas), e a mistura dos mesmos. A incorporação das partículas na resina composta foi feita misturando-se manualmente as partículas à resina, sem grande dificuldade, já que esta é viscosa antes de sua polimerização, agregando facilmente partículas com as quais entra em contato. Para cada 1 g de resina a quantidade de partículas necessária foi pesada. Foi realizada uma incorporação prévia das partículas, sobre uma placa de vidro, com auxílio de uma espátula metálica, depois uma manipulação manual da massa resultante em várias direções, para que os dois materiais ficassem bem misturados, durante 1 minuto.

Em seguida procedia-se ao preenchimento da matriz. O material resultante era colocado em uma caixa escura para evitar a exposição prolongada à luz do ambiente, que ia sendo aberta apenas para pegar uma porção para o preenchimento de uma matriz. Isso foi necessário porque, em condições normais, pequena quantidade de resina é retirada da seringa, a sua embalagem original, e que oferece proteção à luz (somente a quantia que será usada). Na sequência ela já é colocada na cavidade dental, sem ficar muito tempo exposta à luz do ambiente, para evitar a polimerização precoce e perda da viscosidade antes de ser acomodada adequadamente e esculpida.

Após preenchida a matriz, placas de vidro transparentes eram colocadas em baixo e em cima da mesma, para condensar a resina e para que as superfícies circulares da amostra ficassem lisas e planas. Seguia-se então com a fotopolimerização da resina e a retirada do disco de resina para um novo preenchimento. Para a fotopolimerização da resina foi utilizado o aparelho fotopolimerizador de modelo *Optilight LD III* (Figura 4), produzido pela empresa *Gnatus*

(Ribeirão Preto, SP, Brasil), com potência de 15 VA, frequência de 50 Hz, e densidade de potência de 300 mW/cm<sup>2</sup>. Sua fonte de luz é um LED (Diodo Emissor de Luz), que emite luz num comprimento de onda ao redor de 470 nm. Este comprimento de onda é 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. O tempo de exposição à luz foi de 40 segundos, com a finalidade de se atingir a presa do material, de acordo com as instruções do fabricante. Esgotando-se a quantidade de 1 g, a sequência de procedimentos era repetida novamente, até a obtenção do número de amostras necessárias.

Ao final, todos os discos dos 3 grupos amostrais foram polidos em todas as suas superfícies com discos de lixa *Sof-Lex*, da *3M ESPE (EUA)*, e em seguida com as pontas de silicone *Enhance*, da *Dentsply (EUA)*, materiais odontológicos apropriados para o acabamento e polimento das restaurações de resina.



**Figura 4.** Aparelho fotopolimerizador para resinas compostas odontológicas, do modelo *Optilight LD III*, produzido pela *Gnatus*.

## 5.2. ESTUDO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DA RESINA MODIFICADA

### 5.2.1. FORMAÇÃO DE BIOFILME BACTERIANO *IN VITRO* SOBRE OS ESPÉCIMES

A atividade antibacteriana na superfície dos espécimes foi avaliada por meio de experimentos *in vitro* de formação de biofilme bacteriano sobre os mesmos, e posterior contagem das células viáveis derivadas da desagregação dos biofilmes. A finalidade foi comparar o biofilme formado sobre as amostras dos grupos 1 e 2 com as do grupo controle. Os tempos designados para a formação de biofilme foram 1, 4 e 7 dias. Tal avaliação é importante para verificar se o material restaurador modificado é menos favorável à adesão bacteriana, em relação às espécies consideradas.

As espécies utilizadas nos experimentos foram *Streptococcus mutans*, cepa ATCC 25175, e *Lactobacillus acidophilus*, cepa ATCC 4356. As cepas foram adquiridas sob a forma de culturas liofilizadas da FIOCRUZ (Fundação Oswaldo Cruz: Rio de Janeiro, RJ, Brasil). As amostras utilizadas foram as de tamanho menor, os discos de resina de 2 mm de altura e 4 mm de diâmetro, conforme descrição fornecida no item 5.1 do capítulo Material e Métodos. O experimento de formação e crescimento de biofilme de *Streptococcus mutans* sobre as amostras foi realizado 3 vezes (em 3 execuções independentes), sendo que em cada vez foi realizado em triplicata, ou seja, com 3 amostras de cada grupo para cada tempo de formação de biofilme estudado, resultando no total de 9 repetições. A formação de biofilme de *Lactobacillus acidophilus* foi realizada da mesma forma, com um total de 9 repetições. Todos esses experimentos foram realizados no Laboratório de Microbiologia do Departamento de Morfologia e Patologia (DMP) da Universidade Federal de São Carlos.

A seguir são descritas as características das espécies bacterianas utilizadas:

- A espécie *Streptococcus mutans* está relacionada à etiologia da cárie, que consiste na perda localizada de tecido dental mineralizado, decorrente de desmineralização, causada pelos produtos ácidos do metabolismo das bactérias cariogênicas aderidas ao dente, ocorrendo mancha branca e posterior cavitação (Keyes, 1960; Catalan et al., 1987). *Streptococcus mutans* é uma das espécies consideradas iniciadoras das lesões. Pertence à família *Streptococaceae*, composta de cocos Gram-positivos em cadeia e que são anaeróbios facultativos (Jorge et al., 2007). As suas enzimas, que fazem parte de um sistema para a produção de energia, utilizam a sacarose como substrato, separando-a em glicose e frutose, e por fermentação clássica

produzem energia e ácido láctico. A espécie possui também um sistema enzimático para o metabolismo da sacarose que possibilita a adesão em superfícies, o qual 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 as cáries dentárias, até mesmo em superfícies dentais 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, como as de restaurações e próteses (Bowen, 1989).

- *Lactobacillus acidophilus* pertence à família *Lactobacillaceae*, são bacilos Gram-positivos e anaeróbios facultativos. Quando em ambiente aeróbio é preciso que a proporção de oxigênio seja baixa, de 1 a 15%, e que haja de 5 a 10% de CO<sub>2</sub> no ambiente para que ocorra o crescimento, pois são microaerófilos. Esta espécie bacteriana também está relacionada à cárie dental, relacionada à progressão das lesões de cárie, ou seja, a uma fase mais adiantada da doença (Jorge et al., 2007).
- As colônias de *L. acidophilus* apresentam-se brancas, opacas, convexas e de superfície lisa. São maiores comparadas com as colônias de *S. mutans*, as quais são também mais transparentes e apresentam um aspecto de vidro moído (Barreto et al., 2003; Figueiredo & Passos, 2003).

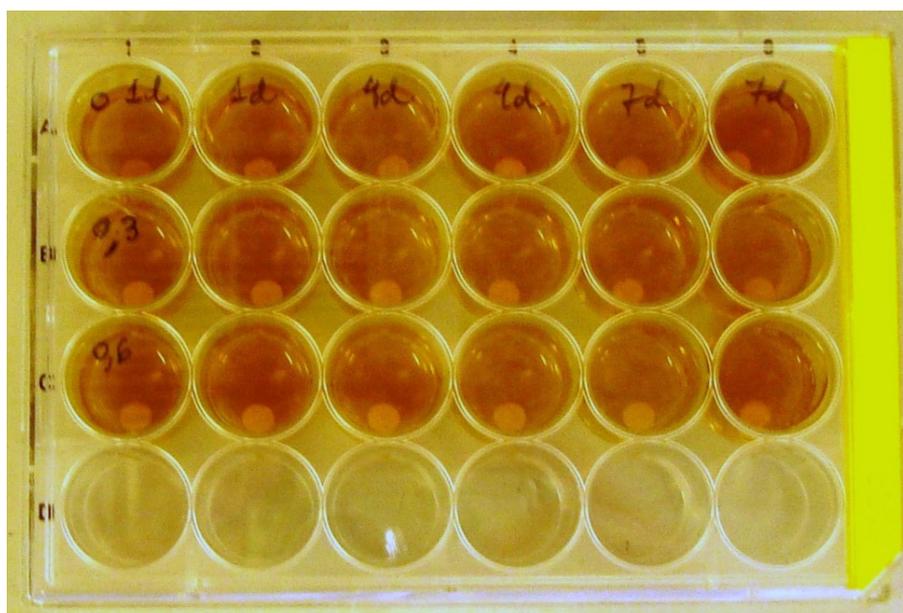
#### **5.2.1.1. EXPERIMENTO COM BIOFILME DE *STREPTOCOCCUS MUTANS***

A cultura liofilizada de *S. mutans* foi transferida, a fim de sua recuperação, para um meio de cultura líquido, o caldo MRS (*Himedia: Mumbai, MH, Índia*), nome que deriva de *Man, Rogosa & Sharpe*, os idealizadores deste meio de cultura (Rogosa et al., 1951; de Man et al., 1960). O caldo MRS foi modificado para esse experimento com o acréscimo de 20% de sacarose. A modificação de meios com sacarose costuma ser realizada quando o objetivo é a adesão e formação de biofilme *in vitro* (Borges et al., 2008; Souza et al., 2013). Maiores informações sobre a composição encontram-se no Apêndice 2. Seguiu-se com a incubação da cultura em caldo MRS com sacarose, por 24 horas, a 37°C, sob aerobiose (Balduino et al., 1999). Após o período de incubação a cultura foi misturada com 5% de glicerol, em volume, para

possibilitar o congelamento da mesma (-20°C). A mistura foi dividida em porções pequenas (900 µL), dentro de microtubos, que ficariam congelados para serem usados em ensaios posteriores.

Antes de cada experimento o conteúdo de um microtubo foi descongelado, inoculado em caldo MRS e incubado a 37°C, sob aerobiose, por 24 horas. Em seguida o tubo com caldo foi centrifugado a 3000 rpm por 20 minutos, na centrífuga *Excelsa II*, modelo 206-BL, da *FANEM (São Paulo, SP, Brasil)*, produzindo um precipitado de biomassa. O sobrenadante foi descartado e a biomassa foi suspensa em PBS (solução salina tamponada fosfatada), até atingir a absorbância padronizada de 0,08, lida sob 600 nm, turvação aproximada a 0,5 da escala de *MacFarland*, com uma quantidade de células da ordem de 10<sup>8</sup> UFC/mL (Unidades formadoras de colônia por mL).

Antes de proceder-se à formação do biofilme bacteriano os discos foram autoclavados (a 121°C, sob pressão de 1 atm, por 15 minutos) e colocados em poços de uma placa de poliestireno (placa para microcultura). Foi usada uma placa com 24 poços, *Nunclon™*, da *Nunc (Rochester, NY, EUA)*. Os poços foram preenchidos com 1 mL de meio de cultura líquido, o caldo MRS com sacarose, e com 200 µL da suspensão padronizada de *S. mutans* em PBS. Na direção vertical foi feita a marcação para os tipos de materiais (grupos amostrais), e na horizontal foram marcados os tempos de estudo (Figura 5).



**Figura 5.** Placa de poliestireno de 24 poços, utilizada para a formação *in vitro* de biofilme bacteriano sobre as superfícies das amostras.

A placa foi incubada a 37°C. Os meios de todos os poços foram trocados após as primeiras 48 horas por caldo MRS com sacarose, sem bactérias, com auxílio de um pipetador automático, e depois de mais 48 horas foram trocados novamente, para evitar esgotamento de nutrientes.

#### **5.2.1.2. EXPERIMENTO COM BIOFILME DE *LACTOBACILLUS ACIDOPHILUS***

O experimento com esta espécie foi feito de maneira semelhante ao que foi descrito em relação a *S. mutans*, com apenas algumas particularidades. A cultura liofilizada de *L. acidophilus* foi transferida também para o caldo MRS com 20% de sacarose. Seguiu-se com a incubação da cultura em caldo MRS com sacarose, por 48 horas, a 37°C, sob atmosfera de microaerofilia, em jarra lacrada (Klaenhammer, 1982; Barreto et al., 2003; Figueiredo & Passos, 2003). A incubação neste caso ocorreu por mais tempo, diferentemente do que ocorreu no experimento com *S. mutans*, porque o crescimento de *L. acidophilus* é relativamente mais lento, não se verificando turvação de meio líquido em apenas 24 horas. Após o período de incubação, de 48 horas, a cultura foi misturada com 5% de glicerol, em volume, para possibilitar o congelamento da cultura (-20°C) em porções pequenas (900 µL) dentro de microtubos (ependorfs).

Conforme comentado anteriormente, a espécie em questão apresenta crescimento satisfatório em baixas concentrações de oxigênio, por isso os tubos com meio de cultura, as placas de microculturas com poços e também as placas de *Petri* com ágar MRS, usadas para a contagem de colônias, foram mantidas em jarras de anaerobiose com o gerador de atmosfera em seu interior. Os geradores de atmosfera usados foram do tipo *Microaerobac*, da *Probac* do Brasil (São Paulo, SP. Brasil). Este é um gerador de microaerofilia, que produz uma atmosfera com 5 a 15% de O<sub>2</sub> e 10% de CO<sub>2</sub> dentro de jarras ou envelopes plásticos lacrados, após ser molhado com 20 mL de água (Murray et al., 2007).

Antes de cada experimento o conteúdo de um microtubo foi descongelado, inoculado em caldo MRS e incubado a 37°C, dentro da jarra apropriada, sob atmosfera com 10% de CO<sub>2</sub>, por 48 horas. Em seguida o tubo com caldo foi centrifugado a 3000 rpm por 20 minutos, na centrífuga Excelsa II, modelo 206-BL, da *FANEM*, produzindo um precipitado de biomassa. O sobrenadante foi descartado e a biomassa foi suspensa em PBS (solução salina tamponada fosfatada), até atingir a absorbância padronizada de 0,08, lida sob 600 nm, turvação aproximada à escala 0,5 de *MacFarland*, com uma quantidade de células da ordem de 10<sup>8</sup> UFC/mL.

Para provocar a formação do biofilme bacteriano sobre os discos foi realizada previamente a esterilização em autoclave, e então os mesmos foram colocados em poços de uma placa de poliestireno com 24 poços. Os poços foram preenchidos com 1 mL de meio de cultura líquido, o caldo MRS com sacarose, e com 200 µL da suspensão padronizada de *L. acidophilus* em PBS. A placa foi incubada a 37°C (sob 10% de CO<sub>2</sub>). Os meios de todos os poços também foram trocados após as primeiras 48 horas por caldo MRS com sacarose, sem bactérias, e depois de mais 48 horas foram trocados novamente, para evitar esgotamento de nutrientes.

O meio de cultura escolhido para os experimentos com as 2 espécies foi o MRS, o meio ideal para o crescimento da espécie *Lactobacillus acidophilus* (Rogosa et al., 1951; de Man et al., 1960). Tal espécie não cresce em grande número de meios, como ocorre com a espécie *Streptococcus mutans*. Por isso esse meio foi o escolhido, para que os 2 experimentos tivessem o mesmo meio de cultura e assim pudessem ser comparados. A sacarose foi adicionada ao meio pelo fato de ambas as espécies em estudo serem cariogênicas, tendo seu crescimento e sua propriedade de aderir em superfícies e formar biofilme favorecidos em ambientes com sacarose (Zickert et al., 1982; Germaine et al., 1984; Burnett et al., 1978; Jorge & Silva 2007).

### **5.2.2. ESTIMATIVA DO NÚMERO DE CÉLULAS BACTERIANAS VIÁVEIS PRESENTES NOS BIOFILMES**

Após os tempos de incubação designados para a avaliação dos biofilmes, 1, 4 e 7 dias, foram realizados os procedimentos de lavagem das amostras, desagregação do biofilme e sua avaliação quantitativa: a contagem de unidades formadoras de colônia (UFC) ou contagem de células viáveis. Para cada tempo foram realizados os mesmos procedimentos. Para a lavagem dos materiais foi retirado o meio de cada poço, sugando-o com um pipetador automático. Em seguida adicionou-se 2 mL de PBS esterilizado em cada poço, também com pipetador. Esta lavagem foi repetida 3 vezes. Em seguida os espécimes foram tirados dos poços com pinça esterilizada e colocados em um tubo com 5 mL de PBS. Os tubos foram vortexados por 1 min e colocados imersos em água dentro de uma cuba de ultrassom por 8 minutos, para que ocorresse a desagregação do biofilme, sendo novamente vortexados depois, por mais 1 min. A cuba utilizada foi a *Digital Ultrasonic Cleaner, modelo CD-4820*, produzida pela *Kondortech (São Carlos, SP, Brasil)*, com força de limpeza de 160 W (Figura 6). Esse procedimento foi feito com a finalidade de desagregação do biofilme e liberação das células bacterianas que estavam aderidas aos espécimes (Pizzolitto et al., 2001;

Leite, 2008), e as células viáveis da solução resultante após este procedimento foram contadas.

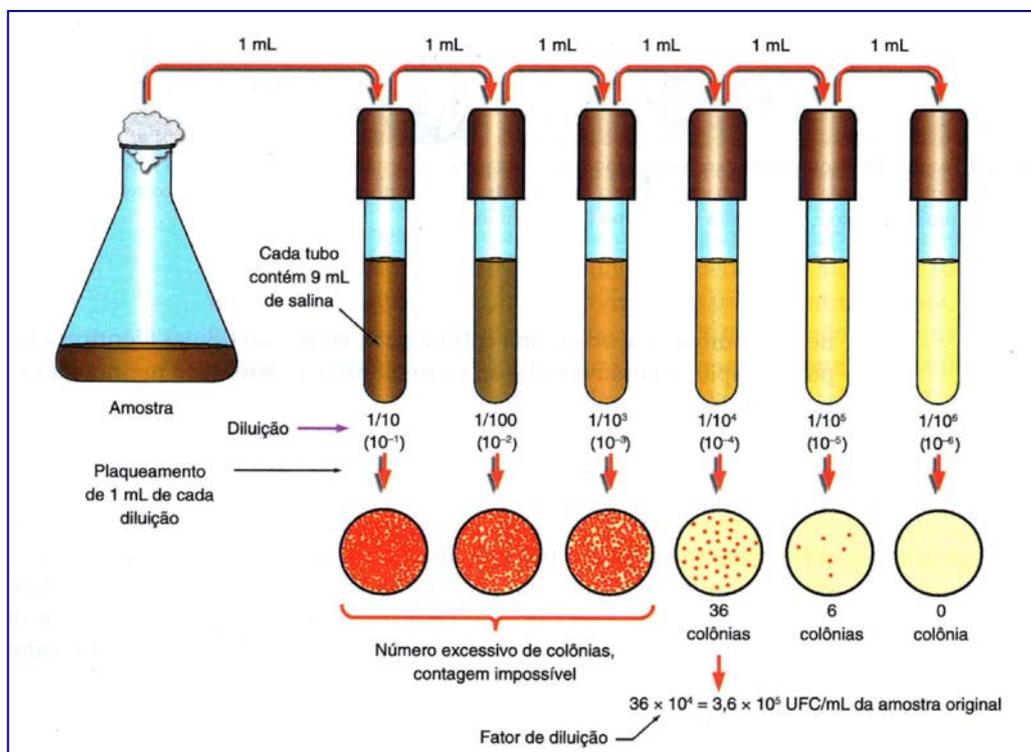


**Figura 6.** Cuba de ultrassom *Digital Ultrasonic Cleaner*, modelo CD-4820, produzida pela *Kondortech*, utilizada para a desagregação de biofilme, com tubos de ensaio contendo as amostras em seu interior

O método usado para a contagem foi o das diluições seriadas (Figura 7). Por este método fazemos várias diluições a partir da solução inicial, da qual se quer conhecer o número de células, e depois fazemos o plaqueamento das diluições, ou seja, a semeadura sobre meio de cultura sólido, seguida da contagem do número de colônias presentes nas placas. Este número é reflexo do número de unidades formadoras de colônia e, portanto, do número de células viáveis que existiam no momento do plaqueamento. A partir da suspensão resultante da desagregação de biofilme sob a ação do ultrassom, suspensão considerada inicial para o procedimento de contagem, foram feitas 5 diluições,  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  (diluídas em 10 vezes cada uma). Inoculou-se 100  $\mu\text{L}$  da solução inicial para um microtubo com 900  $\mu\text{L}$  de PBS, originando a diluição  $10^{-1}$ , dessa foram retirados 100  $\mu\text{L}$  para outro microtubo com 900  $\mu\text{L}$ , originando a diluição  $10^{-2}$ , e assim foi feito em diante, até finalizar as 5 diluições.

Cada diluição foi semeada sobre um meio de cultura contido em placa de *Petri* (de 90 x 15 mm), o meio ágar MRS com sacarose, por meio de um inóculo de 100  $\mu\text{L}$ , e o inóculo foi espalhado sobre a superfície deste meio com uma alça de *Drigalsky*. As placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 37°C para possibilitar o surgimento

de colônias. No experimento com *S. mutans*, as placas ficaram incubadas por pelo menos 24 horas, diretamente na estufa, e no experimento com *L. acidophilus* ficaram incubadas por pelo menos 48 horas, sob atmosfera de microaerofilia (10% de CO<sub>2</sub>), dentro de jarras. Segundo esta técnica de contagem deve-se escolher as placas que apresentam de 30 a 300 colônias para o cálculo do número de UFC da solução inicial. Com esses números foram feitas tabelas e gráficos que mostram o número de UFC para cada mL das soluções iniciais. Depois foi feita a análise estatística dos valores, submetendo-os à ANOVA Bifatorial (*Two Way*) e ao teste de Tukey ( $\alpha=0,05\%$ ), após realização do teste de normalidade e homogeneidade de variância, com o auxílio do programa *Origin*.



**Figura 7.** Esquema demonstrando a lógica do Método das Diluições Seriadadas. Figura disponível em *Vermelho et al., 2006*.

## 5.4. ESTUDO DAS PROPRIEDADES FÍSICAS DA RESINA MODIFICADA

### 5.4.1. AVALIAÇÃO DA TRANSMITÂNCIA ÓPTICA

Quando a luz incide em um material acontecem vários fenômenos físicos. Parte da luz é refletida de volta, uma parte é absorvida, e outra parte pode ser transmitida,

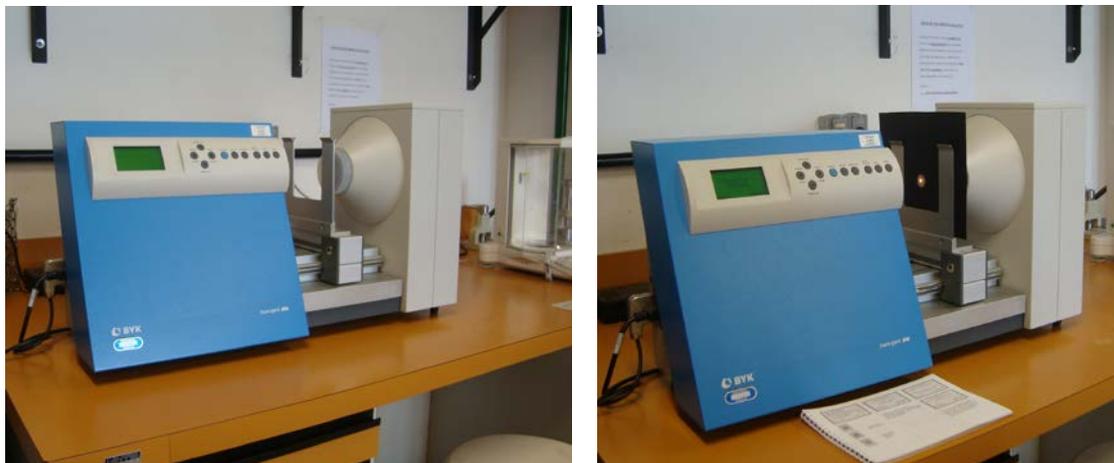
ou seja, atravessar o material. A luz transmitida, por sua vez, pode ser emitida sem mudança de direção, a chamada transmissão direta ou especular, ou com mudança de direção, ao que se denomina espalhamento ou dispersão. A transmitância total é a soma da transmissão direta e da transmissão de luz com espalhamento. Para materiais com elevada transparência, por exemplo, os valores da transmitância total e da transmitância especular são muito próximos. A luz transmitida com espalhamento costuma ser dividida em espalhamento com baixo ângulo e espalhamento com grande ângulo. A transmissão de luz com um espalhamento em ângulo maior que 2,5 graus é denominada de opacidade ou *haze*. Os equipamentos apropriados para medir a transmitância dos materiais calculam a transmitância total por meio da razão entre a intensidade de luz que atravessa a amostra e a intensidade de luz que incidiu na sua superfície, medida que depende da espessura da amostra e que é expressa em porcentagem (*Dariva, 2011; BYK Gardner, 2012*).

O ensaio de transmitância óptica é importante no contexto desta tese para colaborar no estudo da viabilidade da resina experimental como um novo material restaurador, porque a absorção de luz e a transmitância de luz são características essenciais para que as propriedades físicas da resina não sejam alteradas, já que ela é fotopolimerizável, ou seja, sua polimerização depende da interação com a luz.

O equipamento empregado para o ensaio de transmitância foi o *Haze-Gard Plus*, produzido pela *BYK Gardner (Alemanha)*, demonstrado na Figura 8, e a medida registrada foi a transmitância óptica total. Neste ensaio foram empregados os discos de resina com 10 mm de diâmetro e 1 mm de espessura, como já descrito no item 5.1, do capítulo Material e Métodos. Foram utilizados 3 discos de cada grupo, e foram feitas 3 medidas para cada disco. Em seguida foram calculados para cada grupo a média e o desvio padrão dos 9 valores obtidos para a porcentagem de transmitância total, e aplicada a análise estatística através da ANOVA *One Way* e teste de Tukey ( $\alpha=0,05\%$ ). Esse ensaio foi realizado no Centro de Caracterização e Desenvolvimento de Materiais (CCDM) do Departamento de Engenharia de Materiais (DEMa) da Universidade Federal de São Carlos.

Foi feita uma adaptação no suporte do equipamento para que se pudesse fazer a medição com esse tamanho de amostra, pois o feixe de luz incidente do equipamento utilizado é maior do que o diâmetro da amostra. A adaptação foi fixar a amostra em papel cartão preto, totalmente opaco, com um orifício central de 9 mm, de forma que a luz só pudesse passar através da amostra. O objetivo do ensaio foi comparar os valores obtidos para os materiais modificados com os do material controle, por isso a adaptação não desvaloriza o experimento, já que as amostras de

todos os grupos experimentais, inclusive as do grupo controle, foram posicionadas nas mesmas condições, com a mesma adaptação.



**Figura 8.** A primeira fotografia mostra o equipamento medidor de transmitância *Haze-Gard Plus*, da *BYK Gardner*, e na segunda pode-se verificar uma amostra fixada no suporte do equipamento, em posição para a medição da transmitância óptica.

#### 5.4.2. AVALIAÇÃO DA RUGOSIDADE SUPERFICIAL

A rugosidade superficial pode ser definida, sucintamente, como um conjunto de desvios microgeométricos formados pelas saliências e reentrâncias microscópicas de uma superfície. Ela consiste em uma importante característica para os materiais restauradores dentários, já que, de maneira geral, uma maior rugosidade favorece o acúmulo de resíduos alimentares e bactérias. Por isso foi programada uma avaliação da rugosidade superficial dos 3 tipos de amostras de resina. Tal avaliação foi realizada por meio de Microscopia de Força Atômica, com o intuito de comparar a rugosidade das amostras de resina composta modificada com a rugosidade das amostras de resina não modificada.

A Microscopia de Força Atômica é um dos tipos de Microscopia de Varredura por Sonda (do Inglês *Scanning Probe Microscopy*, SPM), a qual surgiu revolucionando a ciência dos materiais, a partir do ano de 1982 (*Binnig et al., 1982*), por possibilitar a obtenção de imagens topográficas tridimensionais de amostras ambientadas em ar ou em líquido. É também uma grande vantagem desse tipo de microscopia o fato de não ser necessária a preparação prévia das amostras se a dimensão das mesmas for compatível com a acomodação no equipamento. Por meio desse tipo de microscopia

podemos obter muitas informações sobre a superfície de materiais, como informações da topografia e da composição química, na forma de resultados numéricos, gráficos e imagens (Zhao, 2003). Nos microscópios de varredura por sonda a extremidade de uma sonda é colocada em contato com a amostra para varrer a sua superfície e analisar a topografia e as propriedades. Quando a interação medida é a força entre átomos da extremidade da sonda e os átomos da amostra, trata-se da Microscopia de Força Atômica.

Nos microscópios de força atômica a sonda é como uma agulha, uma sonda finíssima de 100 Å de diâmetro, montada na extremidade livre de uma mola microscópica triangular, com comprimento de aproximadamente 100 a 200 nm. O conjunto funciona como uma ponteira fixada na extremidade de uma haste flexível, ou *cantilever*, com comprimento de 100 a 500 µm. A força de interação entre a ponta da agulha e os átomos da superfície da amostra resulta na deflexão do *cantilever*. Os movimentos nanométricos da deflexão são detectados, originando sinais elétricos que são processados por um computador e convertidos em imagens topográficas da superfície do material.

Há 3 modos pelos quais é possível analisar uma amostra em um microscópio de força atômica: modo contato, modo não contato e o modo contato intermitente. O modo contato intermitente ou modo vibracional (*tapping mode*) é similar ao regime do modo não contato, porém a agulha (sonda) oscila e faz contato com a superfície da amostra de forma intermitente. A amplitude de vibração da haste varia entre 20 e 100 nm, mas a agulha somente encosta na amostra por um breve período do tempo total de vibração. Durante uma varredura, a oscilação vertical da agulha provoca o contato com a amostra por curtíssimo período de tempo, numa frequência de 50000 a 500000 vezes por segundo. Esta técnica é indicada para polímeros e materiais biológicos, pois diferentemente do modo contato, este modo elimina a influência das forças laterais de interação entre agulha e amostra, capazes de deformar e até danificar as amostras deste tipo (Junior et al., 2006).

O experimento de avaliação e comparação da rugosidade superficial das amostras de resina foi realizado no Laboratório de Caracterização Estrutural (LCE) do Departamento de Engenharia de Materiais (DEMa) da Universidade Federal de São Carlos, sob a orientação de um operador qualificado. Foram analisado maiores, com os espécimes de 10 mm de diâmetro e 1 mm de espessura, conforme descrito no item 5.1 do capítulo Material e Métodos, sendo analisadas 3 regiões de cada espécime, para 3 espécimes de cada grupo, resultando na obtenção de 9 valores de rugosidade por grupo. O microscópio utilizado foi o *Nanoscope V Multimode*, da *Bruker (EUA)*, com sonda de antimônio (Sb) dopado com silício (Si), e pode ser visualizado na Figura

9. O modo escolhido para a análise nesse microscópio foi o de contato intermitente, na presença de ar (*tapping mode in air*), adequado quando o objetivo principal é analisar a rugosidade da superfície de um material sólido. O software *NanoScope Analysis* © (versão 1.40, com direitos autorais pertencentes à Corporação *Bruker*) é um programa específico utilizado para a análise dos dados fornecidos pelos microscópios de varredura por sonda da *Bruker* durante a varredura de uma amostra. Com ele é possível visualizar as imagens sob diferentes configurações e em diferentes cores e também obter inúmeras informações numéricas sobre as áreas registradas (*Garcia & Perez, 2002; Giessibi, 2003*).

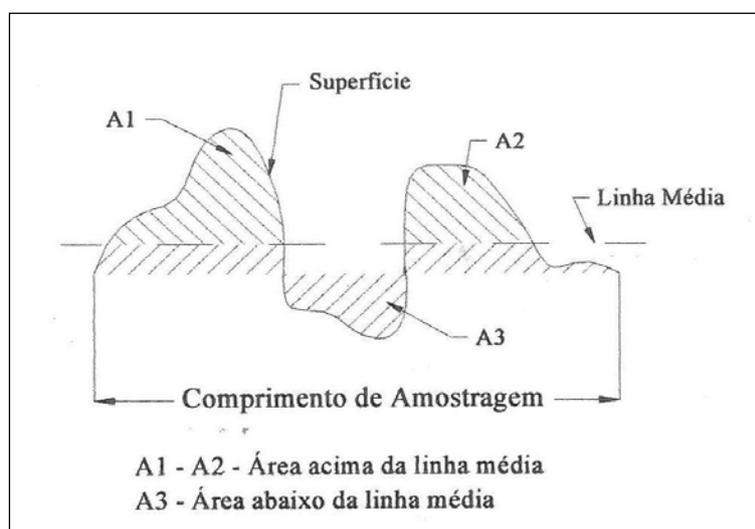


**Figura 9.** Fotografia do microscópio de força atômica *Nanoscope V Multimode*, da *Bruker*, utilizado para medir a rugosidade superficial das amostras de resina.

A comparação da rugosidade superficial entre as diferentes amostras foi baseada no aspecto das imagens tridimensionais e também nos valores obtidos para a rugosidade através do programa *NanoScope*. O parâmetro considerado neste experimento para medir a rugosidade foi a Rugosidade Aritmética (Ra), também chamada Rugosidade Média Aritmética. Há várias maneiras de medir a rugosidade, sendo o cálculo de Ra um dos mais utilizados. Foram calculadas as médias e desvios padrões de 9 valores de Ra fornecidos pelo programa para cada grupo experimental.

Em seguida foi realizada a análise estatística dos valores submetendo-os à ANOVA *One Way* e ao teste de Tukey ( $\alpha=0,05\%$ ).

Para um maior entendimento sobre as diferentes maneiras de medir a rugosidade superficial é preciso considerar que existem 2 sistemas de medição desta rugosidade: o Sistema M e o Sistema E. No Sistema M, ou Sistema da Linha Média, sistema indicado no Brasil pela ABNT e também o mais utilizado na maioria dos países (*ABNT NBR ISSO 4287, 2002*), todas as grandezas são definidas a partir de uma linha de referência, que é a chamada linha média. Trata-se de uma linha disposta dentro do trecho de medição, de tal forma que a soma das áreas superiores, compreendida entre ela e o perfil efetivo da rugosidade, seja igual à soma das áreas inferiores, como pode ser visto na Figura 10. O Sistema E se baseia em linhas envoltórias determinadas por dois círculos que rolam sobre a superfície de um material. Há vários parâmetros de medição da rugosidade para cada um dos 2 sistemas descritos. A Rugosidade Aritmética ( $R_a$ ), ou Rugosidade Média, é um dos parâmetros que é determinado em função da linha média do perfil de rugosidade, fazendo parte do Sistema M. Ela consiste na média aritmética dos valores absolutos das ordenadas dos afastamentos dos pontos do perfil de rugosidade, em relação à linha média, dentro do percurso de medição (*Filho et al., 2011*).



**Figura 10.** Esquema representando a linha média de um material a ser avaliado através do Sistema M em relação à sua rugosidade superficial. Figura adaptada de *Filho et al. (2011)*.

### 5.4.3. COLORIMETRIA

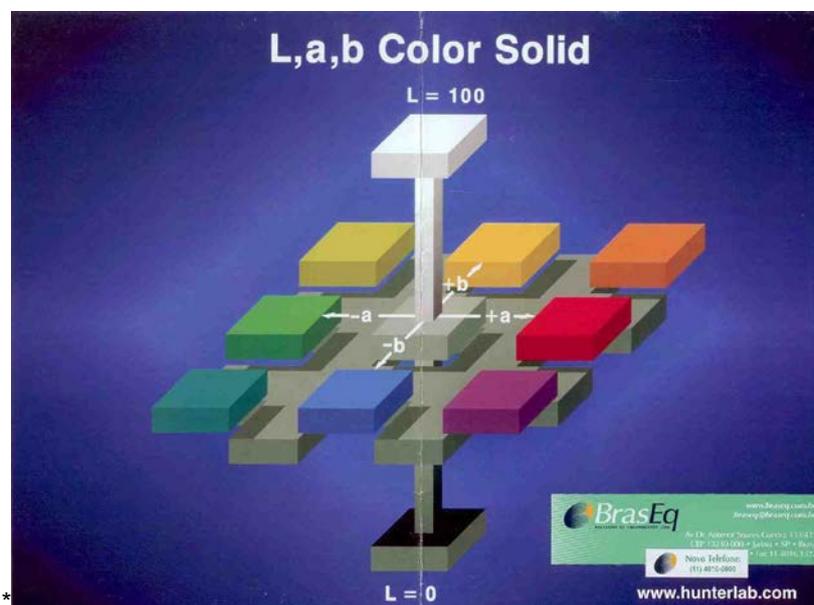
A cor é composta por vários elementos: a matiz (o estado puro da cor, por exemplo verde, azul, vermelho), a cromaticidade (também chamada intensidade ou saturação), e a claridade (luminosidade ou valor). A comparação de cor consiste em submeter amostras "padrão" ou "controle" e demais amostras a uma fonte de luz gradativamente variável na faixa de 400 a 700 nanômetros (faixa de comprimento de onda visível), sendo que, para cada comprimento de onda incidente, uma determinada porcentagem de luz é refletida pelo objeto (reflectância). Dessa forma cada cor avaliada terá seu gráfico característico de comprimento de onda *versus* reflectância. O branco, que reflete todos os comprimentos de onda, tem uma reta, na faixa dos 100% de reflectância. O preto, ao contrário, por absorver todos os comprimentos de onda, tem uma reta próxima do 0%. As curvas das outras cores apresentam picos na faixa de comprimento de onda correspondente à tonalidade predominante. A partir destes princípios básicos a diferença entre duas cores pode ser registrada numericamente.

Existem vários sistemas ou métodos para descrever cores. Um deles, o L, a, b, baseado em teorias de visão de cor, afirma que o sinal enviado do olho para o cérebro carrega informações em tons avermelhados ou esverdeados, amarelados ou azulados e com variações de luminosidade. Em 1976, a CIE, Comissão Internacional de Iluminação (*Commission Internationale de l'Eclairage*), padronizou fontes de luz pela quantia de energia emitida em cada comprimento de onda e passou a recomendar o sistema CIELab. O sistema possui três coordenadas cartesianas, uma denominada "L", outra "a" e a outra "b". A coordenada "L" determina e quantifica a luminosidade (ou claridade), e varia do preto ao branco, a coordenada "a" quantifica a variação das cores do verde para o vermelho, e a coordenada "b" a variação de azul para amarelo (Figura 11). Por este método podemos posicionar uma cor em relação às outras cores, todas no mesmo espaço, ou seja, obter números que expressam o "endereço" da cor. Ao registrar os valores de  $L^*a^*b^*$  do padrão e de  $L^*a^*b^*$  das demais amostras, é possível calcular as diferenças entre padrão e amostra em cada coordenada, e também uma diferença total. Por meio dos valores de delta  $L^*$ , delta  $a^*$ , e delta  $b^*$  ( $\Delta L$ ,  $\Delta a$  e  $\Delta b$ ) é possível saber a tendência da amostra em relação ao padrão. Este espaço de cores é uma excelente referência de posicionamento da cor, ou seja, a cada cor corresponde um respectivo endereço que possibilita a sua especificação.

Desta forma é possível calcular a diferença total entre duas cores através do delta E ( $\Delta E$ ). O  $\Delta E$  é o resultado de cálculos efetuados a partir das diferenças verificadas por leitura colorimétrica, em cada um dos três eixos, quando se comparam duas cores. A seguir está representada a fórmula para o cálculo de  $\Delta E$ :

$$\Delta E^* = \sqrt{(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2}$$

Ou seja, se determinamos o valor "zero" para a cor padrão, as diferenças encontradas nos eixos L, a e b são avaliadas em relação à cor derivada, obtendo-se assim a diferença total com relação ao padrão. Um  $\Delta E$  com valor superior a 1 é correspondente a uma alteração de cor perceptível à visão humana (Stober, 2001; Reis, 2003, Campos, 2009).



**Figura 11.** Representação esquemática do sistema CIE Lab, uma ferramenta para medir a cor e as diferenças de cor. Figura disponível em [WWW.hunterlab.com](http://WWW.hunterlab.com)

O ensaio de espectrofotometria de cor foi realizado com o objetivo de avaliar a alteração de cor, em decorrência da adição de nanopartículas de prata, dentro de uma mesma cor de resina, comparando a alteração de cor entre resina não modificada e resina modificada nas 2 diferentes concentrações. Esse experimento é importante para avaliar o grau de alteração de cor das amostras e levantar maiores discussões a esse respeito, já que a resina composta fotopolimerizável é um material restaurador dentário estético, amplamente empregado na atualidade por apresentar um aspecto visual bem semelhante ao dente, entre outras vantagens e qualidades.

Para as amostras de resina modificada, com as duas concentrações de nanopartículas de prata (grupos 1 e 2), foram medidos os  $\Delta E$  (mudança total de cor) em relação à cor designada como padrão para esse teste, que foi a cor das amostras de resina não modificada (grupo controle). Foram empregados os discos com 10 mm de diâmetro e 1 mm de espessura, como já descrito no item 5.1, da sessão Material e Métodos, todos confeccionados com a resina *Herculite Classic*, da cor A2, segundo a escala *VITA* (Figura 12). Foram feitas 3 medidas de cada disco, com 3 discos de cada grupo experimental, e usadas as médias dos valores de L, a e b. Estes valores médios foram usados para o posterior cálculo de  $\Delta L$ ,  $\Delta a$ ,  $\Delta b$  e  $\Delta E$ . Foram fixados os valores de L, a e b da cor padrão, e para os outros materiais foram calculados os valores de  $\Delta L$ ,  $\Delta a$ ,  $\Delta b$  e  $\Delta E$ .



**Figura 12.** Escala VITA, usada como escala referencial de cor para inúmeras marcas comerciais de resinas compostas fotopolimerizáveis, com cores variando de A1 a D4.

As medidas foram realizadas no Centro de Caracterização e Desenvolvimento de Materiais (CCDM) do Departamento de Engenharia de Materiais (DEMa) da Universidade Federal de São Carlos. O equipamento utilizado foi o *espectrofotômetro modelo CM-2500D*, da *Konica Minolta (Japão)*, demonstrado na Figura 13. O diâmetro das amostras, 10 mm, foi uma dimensão bem adequada para o encaixe no suporte deste espectrofotômetro e para a realização das medidas.



**Figura 13.** Espectrofotômetro de cor modelo *CM-2500D*, produzido pela *Konica Minolta*, usado para medir a cor das amostras dos 3 grupos experimentais.

#### **5.4.4. ANÁLISE DA PRESENÇA DE PRATA NO ADITIVO NANOPARTICULADO**

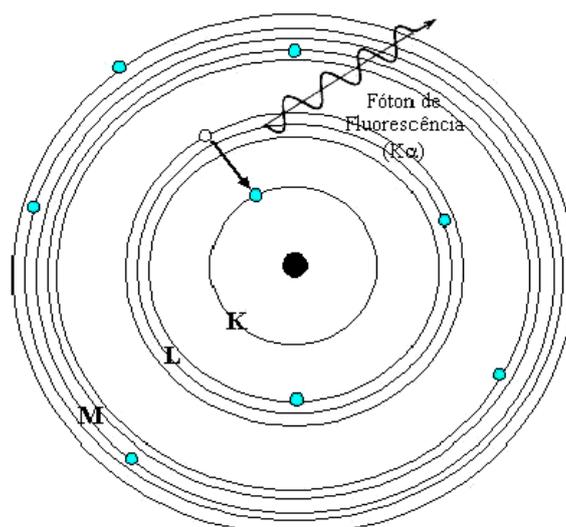
A Espectrometria de Fluorescência de Raios X é uma técnica analítica muito utilizada em geoquímica e na indústria mineral. A aplicação principal é a determinação de elementos presentes em rochas, solos e sedimentos. Tal técnica permite a análise qualitativa, a identificação de elementos presentes em um material, e também a análise quantitativa, permitindo estabelecer a proporção entre os elementos detectados. A fluorescência de raios X dos elementos presentes numa amostra ocorre depois que ela é atingida por radiação X proveniente do tubo emissor do equipamento, ou seja, pelos raios primários. Ao incidirem nos átomos da amostra, esses raios X primários ejetam elétrons das camadas próximas do núcleo. As vacâncias criadas são imediatamente preenchidas por elétrons das camadas mais externas e simultaneamente ocorre a emissão de raios X fluorescentes, ou secundários, cuja energia corresponde à diferença de energia entre os níveis e subníveis energéticos envolvidos nas transições eletrônicas. Essa emissão de raios X fluorescentes é diferente para cada elemento químico, já que cada um possui a sua estrutura atômica característica. Por isso o equipamento possibilita a detecção de diferentes elementos químicos em amostras (*Shimadzu, 2013*). A detecção vai ser superficial ou com certa profundidade dependendo do material analisado, ou seja, dependendo do quanto esse material é passível à penetração dos raios X.

Um dos princípios básicos para entender os resultados desse tipo de análise é o conhecimento de que cada elemento presente na amostra analisada vai gerar uma radiação X secundária característica, com seus picos característicos. Para que um pico seja gerado é preciso que elétrons de orbitais internos do material irradiado sejam arrancados de suas camadas e ejetados para fora do átomo. Em busca do retorno ao

estado de equilíbrio um elétron mais externo do átomo preenche a vacância deixada, mas há uma diferença de energia entre as duas camadas eletrônicas, que é liberada como um fóton de raio X. Visto que a energia de cada camada é diferente para cada elemento químico, a diferença entre os níveis e subníveis de energia também será. Portanto o fóton produzido será diferente e característico para cada elemento. Se um elétron ejetado da camada K tiver a vacância preenchida por um elétron vindo da camada L, o evento dará origem a um fóton da linha  $\alpha$  ( $K\alpha$ ), representado na Figura 14. Se o elétron vier da camada M será originado um fóton da linha  $\beta$  ( $K\beta$ ). Se um elétron da camada M preenche a vacância em L dará origem a um fóton da linha  $L\alpha$  (Belmonte, 2005; Parreira, 2006).

Uma análise qualitativa usando a técnica de fluorescência de raios X foi realizada para confirmar a presença de prata no agregado de partículas (o aditivo nanoparticulado), na sua forma comercial, assim como é fornecido pela empresa *Nanox* para outras empresas utilizarem em seus próprios produtos. Esse experimento foi realizado no Laboratório de Caracterização Estrutural (LCE) do Departamento de Engenharia de Materiais (DEMa) da Universidade Federal de São Carlos. Foram colocados 2 g do pó no suporte individual de amostra para a realização da análise. O equipamento utilizado foi o *espectrômetro Ray Ny, EDX – 720* (Figura 15), produzido pela *Shimadzu (Japão)*. Este equipamento tem como vantagem o tamanho compacto e a fácil operação, quando comparado com outros modelos, e as análises ao ar são possíveis, devido à pequena distância entre a amostra e o detector de raios fluorescentes.

Os resultados foram obtidos na forma de registros que mostram a radiação secundária (ou fluorescente) com os seus picos, emitida pela amostra analisada e detectada pelo equipamento. Nesses registros o eixo vertical se refere à intensidade da fluorescência emitida pela amostra, ou seja, à intensidade do feixe de radiação, em cps/uA (contagem por segundo com absorção normalizada), e o eixo horizontal se refere à energia do feixe de radiação, expressa em keV ( $10^3$  elétron-volt). A identificação dos picos é feita por comparação com os valores previamente tabelados das linhas de emissão de todos os elementos químicos.



**Figura 14.** Esquema da produção de um fóton de fluorescência em um átomo, onde um elétron da camada L preenche a vacância em K, originando um fóton da linha  $K\alpha$ . Figura adaptada de *Belmonte et al. (2005)*.

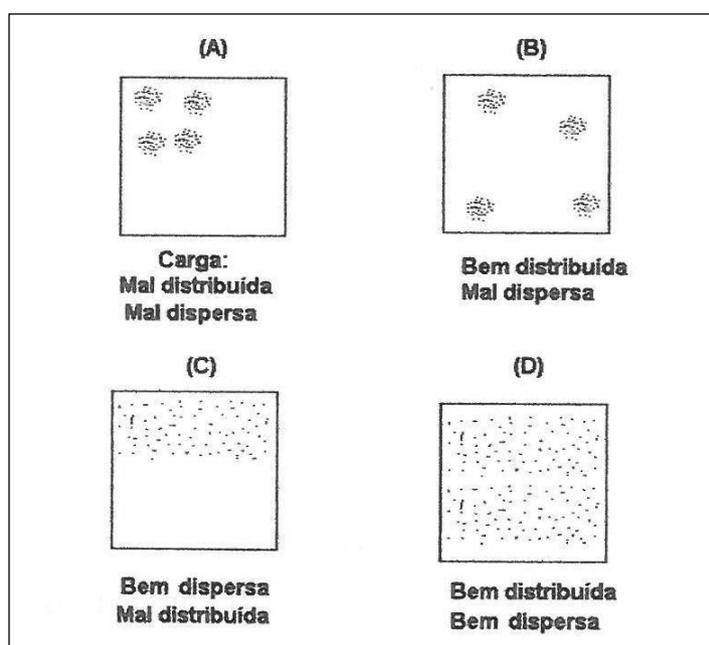


**Figura 15.** Espectrômetro de fluorescência de raios X, modelo *Ray NY EDX – 720*, produzido pela *Shimadzu*, usado para análise e detecção de elementos químicos em amostras.

#### 5.4.5. ANÁLISE DA DISPERSÃO E DISTRIBUIÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE PRATA NOS ESPÉCIMES

Há uma tendência natural de as partículas de carga adicionadas a um material formarem agregados, o que pode gerar concentração de tensões e outros problemas para as suas propriedades. O termo “distribuição de partículas” refere-se à localização das partículas em várias regiões do material que as recebeu, de forma igualitária, e

“dispersão de partículas” refere-se à forma com que estas partículas se encontram dentro do material, ou seja, se estão bem separadas entre si ou se estão formando aglomerados ou agregados de partículas (Figura 16). Quando a dispersão e distribuição de partículas que foram incluídas em um material mostram-se satisfatórias significa que a mistura é possível, foi bem realizada e que os materiais misturados podem realmente originar um compósito com boas propriedades (Rabello, 2000). Por isso foi idealizada uma análise da dispersão e distribuição das nanopartículas de prata nas amostras de resina modificada, por meio da Microscopia Eletrônica de Transmissão.



**Figura 16.** Esquemas de diferentes situações de dispersão e distribuição de partículas de carga em uma matriz polimérica, indicadas pelas letras A, B C e D. Figura adaptada de *Rabello (2000)*.

Um microscópio eletrônico de transmissão emite elétrons através de uma secção extremamente fina do material a ser estudado, que fica em um compartimento onde há vácuo, para gerar imagens bidimensionais. A secção de uma amostra deve apresentar, de modo geral, espessura de 50 a 100 nm, para a obtenção de uma boa imagem (Azevedo, 2006).

Para este experimento foram utilizados os espécimes menores, com 4 mm de diâmetro e 2 mm de espessura, descritos no item 5.1, do capítulo Material e Métodos. Eles foram previamente cortados em partes menores, e tais partes incluídas em uma

resina apropriada, resultando em um conjunto com um formato que se adaptasse ao ultramicrotomo para a realização dos cortes de filmes ultrafinos. A fim de possibilitar estes cortes foi preciso também resfriar as amostras a  $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$ , com auxílio de nitrogênio líquido. A velocidade de corte foi de  $0,4\text{ mm/s}$ , e a espessura dos filmes obtidos foi de  $50\text{ nm}$ . Os filmes cortados permaneceram em flutuação em solução aquosa de DMSO (dimetilsulfoxido), a 70%, até serem coletados em grades de cobre e armazenados em um porta-amostra apropriado.

O ultramicrotomo utilizado para o preparo das amostras foi o *Reichert Ultracut S*, da marca *Leica Reichert (EUA)*, pertencente ao CCDM do Departamento de Engenharia de Materiais da Universidade Federal de São Carlos. O microscópio eletrônico de transmissão do modelo *Tecnai/Edax G<sup>2</sup> Megaview*, produzido pela *FEI Company (EUA)*, disponível no LCE do Departamento de Engenharia de Materiais da Universidade Federal de São Carlos (Figura 17).



**Figura 17.** Microscópio eletrônico de transmissão *Tecnai/Edax G<sup>2</sup>* (FEI Company), usado para análise da distribuição e dispersão de prata nas amostras.

É importante para a interpretação de resultados o entendimento de que uma imagem obtida por Microscopia Eletrônica de Transmissão é formada pela interação dos elétrons com as diferentes regiões da amostra. Os elétrons que conseguem atravessar a amostra (elétrons transmitidos) chegam a uma tela fosforescente, um detector que possibilita a obtenção da imagem. Alguns elétrons não são desviados,

alguns sofrem desvios sem perda de energia, e outros com perda de energia, e estas diferentes situações geram uma imagem com locais que variam do branco ao preto, apresentando tons de cinza intermediários (Azevedo, 2006).

A imagem final pode ser de campo claro ou de campo escuro, de acordo com o feixe de elétrons selecionado para a sua formação e do tipo de detector onde ela será gerada. Os microscópios eletrônicos de transmissão possuem 2 detectores: um para as imagens de campo claro (*Bright Field*), e outro para as de campo escuro (*Dark Field*). Cada um desses modos de imagem fornece informações complementares sobre a amostra. Em um compósito, que possui porções orgânicas e inorgânicas, como é o caso da resina composta fotopolimerizável (vide Apêndice 1), as porções inorgânicas (partículas minerais), que dificultam a passagem de elétrons, serão correspondentes a pontos mais escuros na imagem do primeiro detector, o detector de campo claro, e as porções orgânicas (matriz) corresponderão a pontos relativamente mais claros, mais brancos, sendo o brilho ou claridade de certa região da imagem diretamente proporcional à quantidade de elétrons que atravessaram o material na região correspondente. Já na imagem gerada pelo segundo detector, o de campo escuro, as porções inorgânicas serão os pontos mais claros, e as porções orgânicas serão os pontos mais escuros (Durán, 2006; Rosa, 2008).

#### **5.4.6. ANÁLISE DA LIBERAÇÃO DE PRATA EM SALIVA ARTIFICIAL**

Analisar a ocorrência da liberação de prata proveniente dos espécimes de resina modificada na saliva que a circunda fornece uma informação importante, que servirá de base aos estudos acerca da possível toxicidade de uma restauração dentária feita com tal material.

A saliva humana é um fluido aquoso e transparente secretado pelas glândulas salivares diretamente na cavidade bucal e presente constantemente em contato com as mucosas bucais, com os dentes e restaurações. É constituída de água, enzimas (como mucina, ptialina, anidrase carbônica, lisozima, lactoferrina, peroxidase), minerais, aminoácidos e imunoglobulinas (IgA). Entre os ânions presentes na saliva destacam-se o bicarbonato, o monofosfato e o bifosfato, que fazem parte de sistemas com capacidade tamponante frente aos ácidos e as bases ingeridos na alimentação, o que possibilita a manutenção do pH salivar em torno de 6,9. Ela também pode ser constituída, durante certo período, por algum elemento adicional, não habitual, em

decorrência do uso de medicamentos por via sistêmica. A saliva contém também, em quantidades variáveis, células epiteliais, microrganismos e secreções gengivais, que não são de sua composição própria, mas que podem estar sendo carregados por ela, na cavidade bucal (*Santos et al., 2007*).

Para essa análise foi produzida uma saliva artificial contendo um conjunto padrão de elementos que geralmente são usados na produção de saliva artificial da maioria das marcas comerciais disponíveis no mercado brasileiro, atualmente. A fórmula seguida está descrita no Apêndice 2.

Foram feitas 3 análises da presença de prata na saliva, através da técnica de Espectrometria de Emissão Óptica por Plasma Acoplado Indutivamente (ICP-OES), denominada em Inglês "*inductively coupled plasma optical emission spectrometry*", técnica que será explicada adiante, para diferentes períodos de incubação da saliva artificial armazenada junto com os discos de resina: 60, 120 e 210 dias, ou seja, 2, 4 e 7 meses. Cada disco de resina, uma de cada grupo experimental para cada tempo de incubação determinado, foi armazenado dentro de um tubo com 10 mL da saliva. Os tubos foram mantidos em agitação constante, e a uma temperatura de 36,5 °C, em um agitador localizado no Laboratório de Microbiologia do Departamento de Morfologia e Patologia (DMP) da Universidade Federal de São Carlos (*Shaker MA 830, da Marconi Equipamentos - Piracicaba, SP, Brasil*). Foram utilizados os discos menores, com 4 mm de diâmetro e 2 mm de espessura, descritos no item 5.1, do capítulo Material e Métodos.

As análises foram executadas por meio do equipamento *VISTA* (da marca *Varian, São Paulo, SP, Brasil*), localizado no Centro de Caracterização e Desenvolvimento de Materiais (CCDM), do Departamento de Engenharia de Materiais da Universidade Federal de São Carlos (Figura 18). Após decorrido cada período de estudo designado, os tubos foram retirados do agitador e as amostras foram retiradas do contato com a saliva, e os tubos com 10 mL, referentes a cada grupo (as 3 amostras, que foram designadas de soluções 1, 2 e 3) foram conservados em geladeira, até que fosse possível a entrega no CCDM e a realização da análise pelo técnico habilitado do local.

Foi realizada a busca pelo elemento prata, em todos os espécimes. O resultado foi expresso em mg por L. A técnica tem um limite de detecção, isto é, existe uma concentração limite, abaixo da qual não é possível a detecção, limite que para o equipamento utilizado é fornecido durante a execução de cada ensaio. Pode-se então garantir que, se o resultado for negativo para a presença da prata, não há prata na amostra acima do limite de detecção.



**Figura 18.** Fotografia do espectrômetro *VISTA* (Varian) usado para a análise da presença de prata em saliva artificial, possivelmente liberada pelas amostras de resina.

As técnicas baseadas na Espectrometria de Emissão Óptica (OES) são técnicas muito empregadas atualmente para a determinação de concentrações de elementos inorgânicos em diversos tipos de amostras, sendo a sigla derivada do nome da técnica em Inglês, “*optical emission spectrometry*”. A Espectrometria de Emissão Óptica também é conhecida por Espectrometria de Emissão Atômica, “*atomic emission spectrometry*” (AES). A emissão atômica é a emissão de radiação característica nas regiões ultravioleta e visível do espectro eletromagnético por átomos ou íons excitados. O espectro de emissão registrado pode ser comparado com os registros padrões dos elementos químicos. O espectro de vários elementos pode ser registrado em uma mesma análise, e em um curto período de tempo, e os limites de detecção são muito bons (bastante baixos) para a maioria dos elementos. Estas técnicas primeiramente promovem a separação das moléculas contidas em um meio (amostra) em átomos livres, para depois estimularem os átomos e registrarem, na sequência, a emissão óptica. Para tanto, são utilizadas fontes térmicas como chamas, fornos ou descargas elétricas. Desde 1976, no Brasil, têm sido usados plasmas como fontes de atomização ou excitação para a OES. Os átomos da amostra analisada são excitados pelo calor do plasma (excitação), e o retorno ao estado fundamental (relaxação) permitirá a coleta do sinal analítico, ou seja, da emissão óptica característica (Giné-Rosias, 1998).

Existem 2 técnicas que utilizam o plasma: a Espectrometria de Plasma Acoplado por Indução e a Espectrometria de Plasma Acoplado Diretamente. Na Espectrometria de Plasma Acoplado por Indução ou de Plasma Acoplado Indutivamente (ICP) gera-se um plasma que fica acoplado no equipamento por indução, ao dirigir-se a energia de um gerador de alta frequência para um gás apropriado, Argônio, Hélio ou Nitrogênio. O plasma é confinado (ou seja, ocorre o acoplamento) devido a um campo magnético, gerado pela passagem de uma corrente elétrica de alta frequência através de uma espiral de indução. Tal indutor gera rapidamente um campo magnético oscilante orientado ao plano vertical da espiral. A ionização do gás inicia-se com uma faísca da espiral. Os íons resultantes e seus elétrons associados irão interagir com o campo magnético flutuante, e isto gera energia suficiente para ionizar outros átomos do gás em uma excitação por choque, o que produz um grande aumento de temperatura. Em um período de 2 ms é obtido um estado estável, com alta densidade de elétrons. A temperatura no plasma varia de 6000 a 10000 K, dependendo do equipamento e da radio-frequência aplicada (*Montasser & Golightly, 1992; Skoog et al., 1998*).

## 6. RESULTADOS

### 6.3. ESTUDO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DA RESINA MODIFICADA

#### 6.1.1. CONTAGEM DE CÉLULAS VIÁVEIS PARA O EXPERIMENTO COM BIOFILME DE *STREPTOCOCCUS MUTANS*

Os resultados demonstraram que a resina composta odontológica modificada com nanopartículas de prata, nas 2 concentrações estudadas, é um material menos favorável à adesão de *Streptococcus mutans*. A formação do biofilme de *Streptococcus mutans* foi menor nos grupos 1 e 2 em relação ao grupo controle, após os 3 tempos de incubação estudados, chegando a ocorrer, após 7 dias, uma redução de mais de 90% no número de células aderidas nas amostras do grupo 1 e também nas do grupo 2. As tabelas a seguir demonstram detalhadamente este resultado, e também uma porcentagem comparativa dos números obtidos para os grupos 1 e 2 em relação ao grupo controle (Tabelas 1, 2 e 3).

**Tabela 1.** Estimativa do número de células viáveis de *Streptococcus mutans* recuperadas dos biofilmes aderidos às superfícies dos espécimes após 1 dia de incubação, expressas em unidades formadoras de colônia (média e desvio padrão, com n = 9 para todos os grupos)

Material	UFC/mL	Porcentagem comparativa (%)
<b>Grupo Controle</b>	$2,2 \times 10^6 \pm 0,9 \times 10^6$	100
<b>Grupo 1 (0,3%)</b>	$1,3 \times 10^6 \pm 0,5 \times 10^6$	59,2
<b>Grupo 2 (0,6%)</b>	$1,1 \times 10^6 \pm 0,3 \times 10^6$	50,9

**Tabelas 2.** Estimativa do número de células viáveis de *Streptococcus mutans* recuperadas dos biofilmes aderidos às superfícies dos espécimes após 4 dias de incubação, expressas em unidades formadoras de colônia (média e desvio padrão, com n = 9 para todos os grupos)

Material	UFC/mL	Porcentagem comparativa (%)
<b>Grupo Controle</b>	$1,7 \times 10^7 \pm 0,7 \times 10^7$	100
<b>Grupo 1 (0,3%)</b>	$4,3 \times 10^6 \pm 0,9 \times 10^6$	25,5
<b>Grupo 2 (0,6%)</b>	$4,5 \times 10^6 \pm 0,9 \times 10^6$	26,7

**Tabela 3.** Estimativa do número de células viáveis de *Streptococcus mutans* recuperadas dos biofilmes aderidos às superfícies dos espécimes após 7 dias de incubação, expressas em unidades formadoras de colônia (média e desvio padrão, com n = 9 para todos os grupos)

Material	UFC/mL	Porcentagem comparativa (%)
<b>Grupo Controle</b>	$4,6 \times 10^7 \pm 0,8 \times 10^7$	100
<b>Grupo 1 (0,3%)</b>	$2,8 \times 10^6 \pm 0,9 \times 10^6$	6,2
<b>Grupo 2 (0,6%)</b>	$2,3 \times 10^6 \pm 0,9 \times 10^6$	4,9

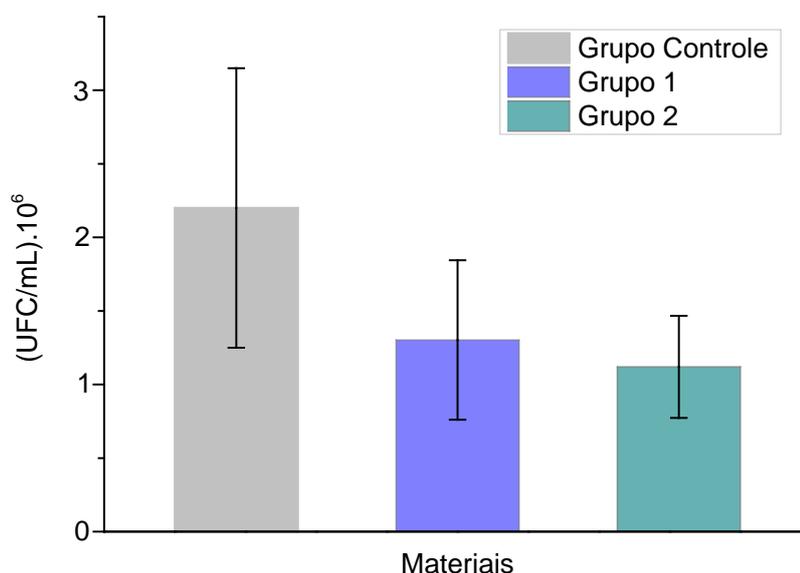
Após a realização da análise estatística dos resultados, foi possível verificar que, para os 3 tempos de incubação estudados, o número de células viáveis de *S. mutans* foi estatisticamente mais baixo nos grupos 1 e 2 do que no grupo controle ( $p < 0,05$ ). Os grupos 1 e 2 não mostraram entre si diferença estatisticamente significativa, para os 3 tempos de incubação ( $p > 0,05$ ). Dentro de cada grupo experimental, ou seja, para o mesmo material, os números variaram com diferença estatística entre os 3 tempos de incubação, valendo isso para todos os grupos ( $p > 0,05$ ). Estas considerações estão demonstradas na Tabela 4.

**Tabela 4.** Estimativa do número de células viáveis de *Streptococcus mutans* recuperadas dos biofilmes aderidos às superfícies dos espécimes após os 3 tempos de incubação, expressas em unidades formadoras de colônia por mL (média e desvio padrão). Em cada grupo experimental foram avaliadas 9 amostras (n=9)

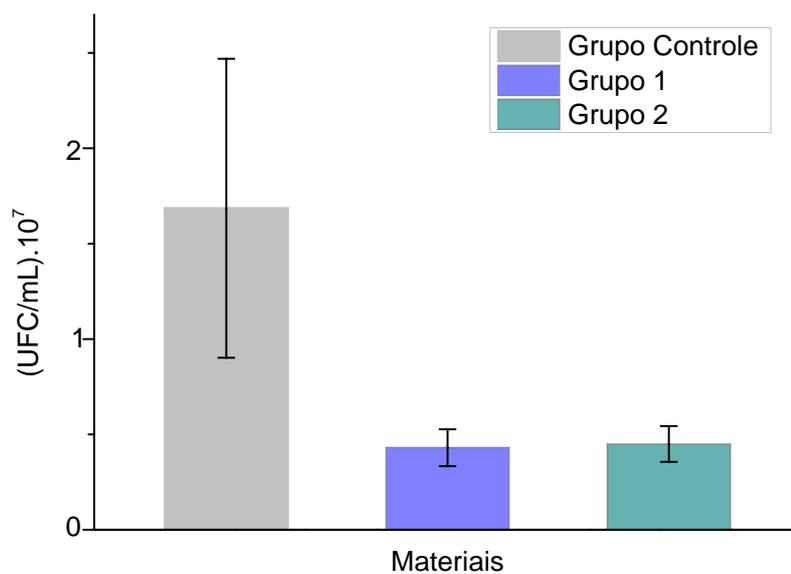
Material	UFC/mL		
	1 dia	4 dias	7 dias
<b>Grupo Controle</b>	$2,2 \times 10^6 \pm 0,9 \times 10^6$ <sup>aC</sup>	$1,7 \times 10^7 \pm 0,7 \times 10^7$ <sup>aB</sup>	$4,6 \times 10^7 \pm 1,4 \times 10^7$ <sup>aA</sup>
<b>Grupo 1 (0,3%)</b>	$1,3 \times 10^6 \pm 0,5 \times 10^6$ <sup>bC</sup>	$4,3 \times 10^6 \pm 0,9 \times 10^6$ <sup>bA</sup>	$2,8 \times 10^6 \pm 1,3 \times 10^6$ <sup>bB</sup>
<b>Grupo 2 (0,6%)</b>	$1,1 \times 10^6 \pm 0,3 \times 10^6$ <sup>bC</sup>	$4,5 \times 10^6 \pm 0,9 \times 10^6$ <sup>bA</sup>	$2,3 \times 10^6 \pm 1,1 \times 10^6$ <sup>bB</sup>

Letras diferentes indicam valores estatisticamente diferentes a um nível de significância de 0,05% (ANOVA/Tukey). As letras minúsculas indicam as diferenças dentro das colunas, e as letras maiúsculas revelam as diferenças dentro das linhas.

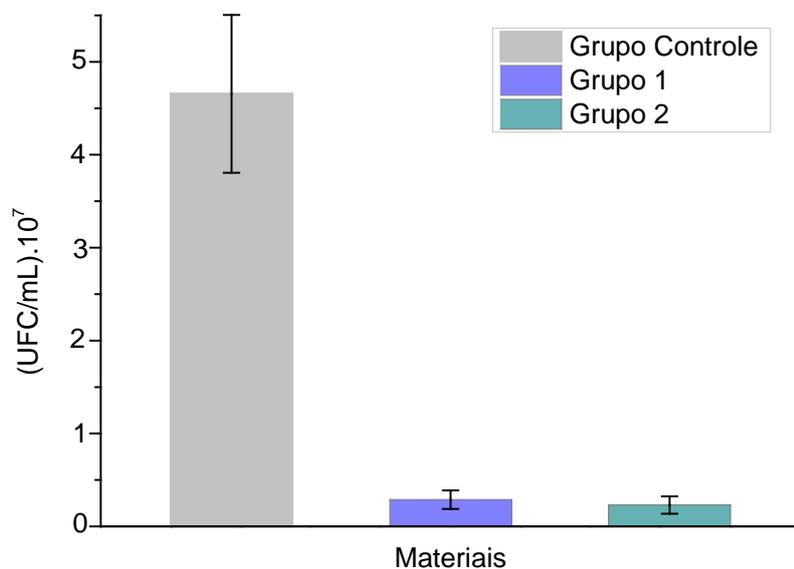
Os gráficos a seguir (Figuras 19 a 24) permitem uma interpretação visual mais clara dos resultados demonstrados na Tabela 4. As barras representam o desvio padrão dos valores.



**Figura 19.** Contagem de células viáveis de *Streptococcus mutans* recuperadas dos biofilmes aderidos às superfícies das amostras dos 3 grupos experimentais após 1 dia de incubação, expressa em unidades formadoras de colônia por mL.

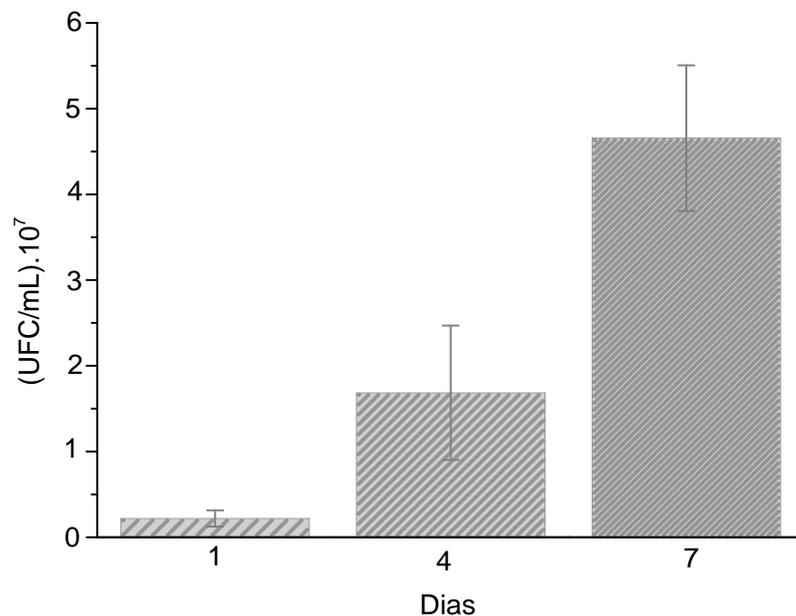


**Figura 20.** Contagem de células viáveis de *Streptococcus mutans* recuperadas dos biofilmes aderidos às superfícies das amostras dos 3 grupos experimentais após 4 dias de incubação, expressa em unidades formadoras de colônia por mL.

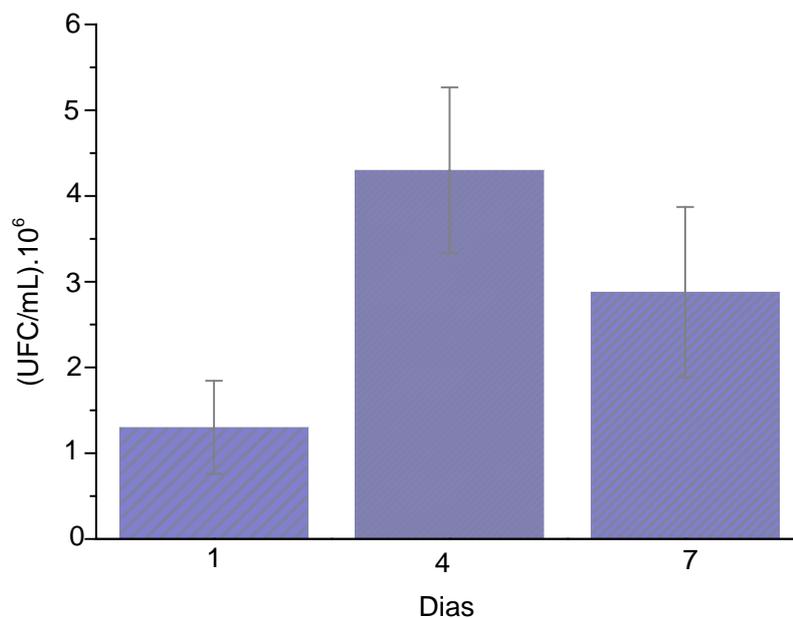


**Figura 21.** Contagem de células viáveis de *Streptococcus mutans* recuperadas dos biofilmes aderidos às superfícies das amostras dos 3 grupos experimentais após 7 dias de incubação, expressa em unidades formadoras de colônia por mL.

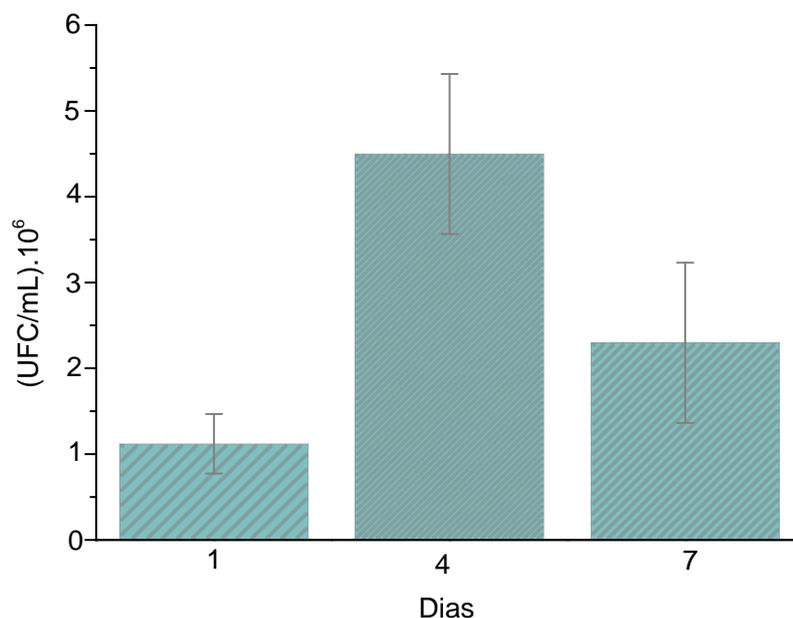
Os gráficos a seguir (Figuras 22 a 24) mostram a variação dentro de cada grupo experimental, ao longo do tempo. No grupo controle a contagem de células viáveis aumentou até 7 dias, e nos grupos de resina modificada (grupos 1 e 2) a contagem aumentou até 4 dias e depois diminuiu.



**Figura 22.** Contagem de células viáveis de *Streptococcus mutans* recuperadas dos biofilmes das amostras do Grupo Controle nos 3 tempos de incubação, expressa em unidades formadoras de colônia por mL.



**Figura 23.** Contagem de células viáveis de *Streptococcus mutans* recuperadas dos biofilmes das amostras do Grupo 1 nos 3 tempos de incubação, expressa em unidades formadoras de colônia por mL.



**Figura 24.** Contagem de células viáveis de *Streptococcus mutans* recuperadas dos biofilmes das amostras do Grupo 2 nos 3 tempos de incubação, expressa em unidades formadoras de colônia por mL.

### 6.1.2. CONTAGEM DE CÉLULAS VIÁVEIS PARA O EXPERIMENTO COM BIOFILME DE *LACTOBACILLUS ACIDOPHILUS*

Os resultados demonstraram que a resina composta odontológica modificada com nanopartículas de prata, nas 2 concentrações estudadas, torna-se um material menos favorável também à adesão de *Lactobacillus acidophilus*, de maneira semelhante ao que ocorreu com a espécie *Streptococcus mutans*. A formação do biofilme de *Lactobacillus acidophilus* foi menor nos grupos 1 e 2 em relação ao grupo controle, após os 3 tempos de incubação estudados, chegando a ocorrer, após 7 dias, uma redução de mais de 90% no número de células aderidas nas amostras do grupo 1 e também nas do grupo 2. As tabelas a seguir demonstram detalhadamente este resultado, e também uma porcentagem comparativa dos números obtidos para os grupos 1 e 2 em relação ao grupo controle (Tabelas 5, 6 e 7).

**Tabela 5.** Estimativa do número de células viáveis de *Lactobacillus acidophilus* recuperadas dos biofilmes aderidos às superfícies dos espécimes após 1 dia de incubação, expressas em unidades formadoras de colônia (média e desvio padrão, com n = 9 para todos os grupos)

Material	UFC/mL	Porcentagem comparativa (%)
<b>Grupo Controle</b>	$1,6 \times 10^5 \pm 0,5 \times 10^5$	100
<b>Grupo 1 (0,3%)</b>	$7,8 \times 10^4 \pm 0,9 \times 10^4$	47,3
<b>Grupo 2 (0,6%)</b>	$7,9 \times 10^4 \pm 0,8 \times 10^4$	47,5

**Tabelas 6.** Estimativa do número de células viáveis de *Lactobacillus acidophilus* recuperadas dos biofilmes aderidos às superfícies dos espécimes após 4 dias de incubação, expressas em unidades formadoras de colônia (média e desvio padrão, com n = 9 para todos os grupos)

Material	UFC/mL	Porcentagem comparativa (%)
<b>Grupo Controle</b>	$5,0 \times 10^6 \pm 0,8 \times 10^6$	100
<b>Grupo 1 (0,3%)</b>	$6,3 \times 10^5 \pm 0,8 \times 10^5$	12,6
<b>Grupo 2 (0,6%)</b>	$6,4 \times 10^5 \pm 0,9 \times 10^5$	12,8

**Tabela 7.** Estimativa do número de células viáveis de *Lactobacillus acidophilus* recuperadas dos biofilmes aderidos às superfícies dos espécimes após 7 dias de incubação, expressas em unidades formadoras de colônia (média e desvio padrão, com n = 9 para todos os grupos)

Material	UFC/mL	Porcentagem comparativa (%)
<b>Grupo Controle</b>	$7,4 \times 10^6 \pm 0,8 \times 10^6$	100
<b>Grupo 1 (0,3%)</b>	$3,1 \times 10^5 \pm 0,9 \times 10^5$	4,2
<b>Grupo 2 (0,6%)</b>	$2,8 \times 10^5 \pm 0,6 \times 10^5$	3,9

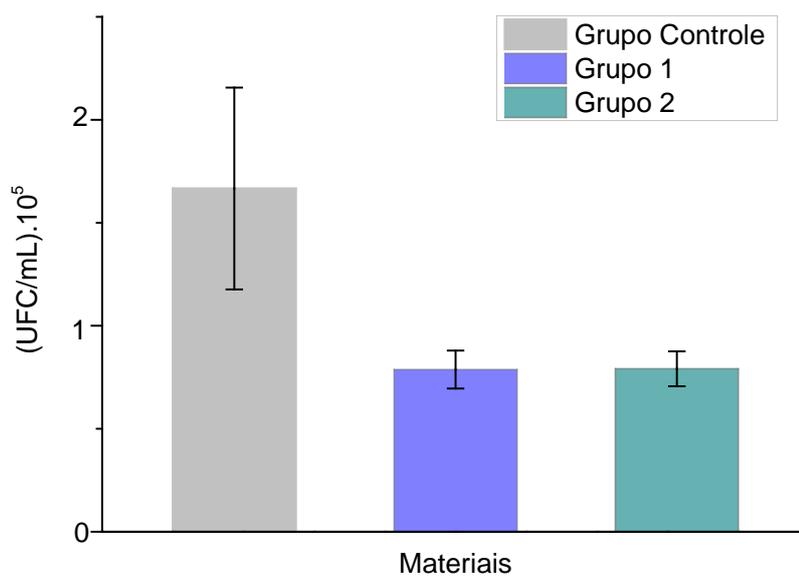
Considerando a análise estatística, os resultados mostraram que, para os 3 tempos de incubação estudados, o número de células viáveis de *L. acidophilus* foi estatisticamente menor nos grupos 1 e 2 do que no grupo controle ( $p < 0,05$ ). Os grupos 1 e 2 não mostraram diferença estatisticamente significativa entre si, para os 3 tempos de incubação ( $p > 0,05$ ). Dentro de cada grupo experimental, os números variaram com diferença estatística entre os 3 tempos de incubação, para todos os grupos ( $p > 0,05$ ). Estas considerações estão mostradas na Tabela 8.

**Tabela 8.** Estimativa do número de células viáveis de *Lactobacillus acidophilus* recuperadas dos biofilmes aderidos às superfícies dos espécimes após os 3 tempos de incubação, expressas em unidades formadoras de colônia por mL (média e desvio padrão). Para cada grupo experimental há o resultado de 9 amostras (n=9)

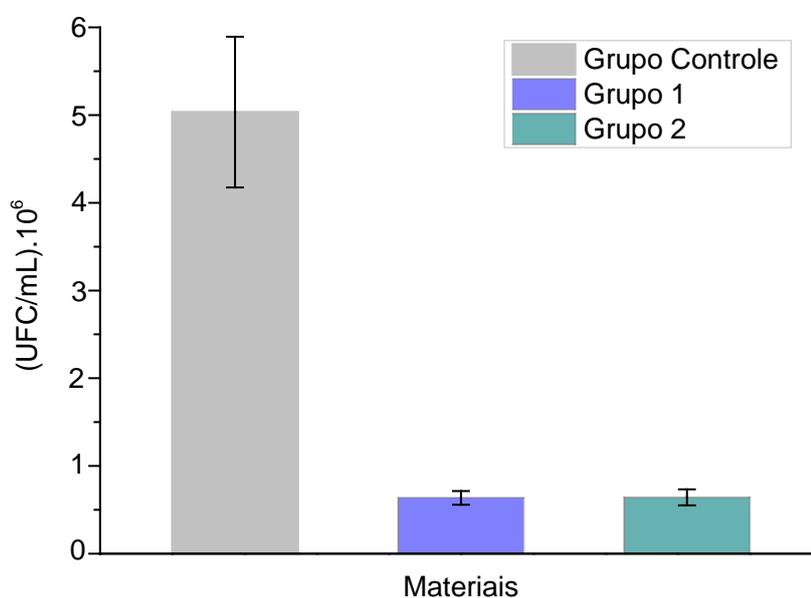
Material	UFC/mL		
	1 dia	4 dias	7 dias
<b>Grupo Controle</b>	$1,6 \times 10^5 \pm 0,5 \times 10^5$ aC	$5,0 \times 10^6 \pm 0,8 \times 10^6$ aB	$7,4 \times 10^6 \pm 0,8 \times 10^6$ aA
<b>Grupo 1 (0,3%)</b>	$7,8 \times 10^4 \pm 0,9 \times 10^4$ bC	$6,3 \times 10^5 \pm 0,8 \times 10^5$ bA	$3,1 \times 10^5 \pm 0,9 \times 10^5$ bB
<b>Grupo 2 (0,6%)</b>	$7,9 \times 10^4 \pm 0,8 \times 10^4$ bC	$6,4 \times 10^5 \pm 0,9 \times 10^5$ bA	$2,8 \times 10^5 \pm 0,6 \times 10^5$ bB

Letras diferentes indicam números estatisticamente diferentes a um nível de significância de 0,05% (ANOVA/Tukey). As letras minúsculas representam as diferenças dentro das colunas, e as letras maiúsculas demonstram as diferenças dentro das linhas.

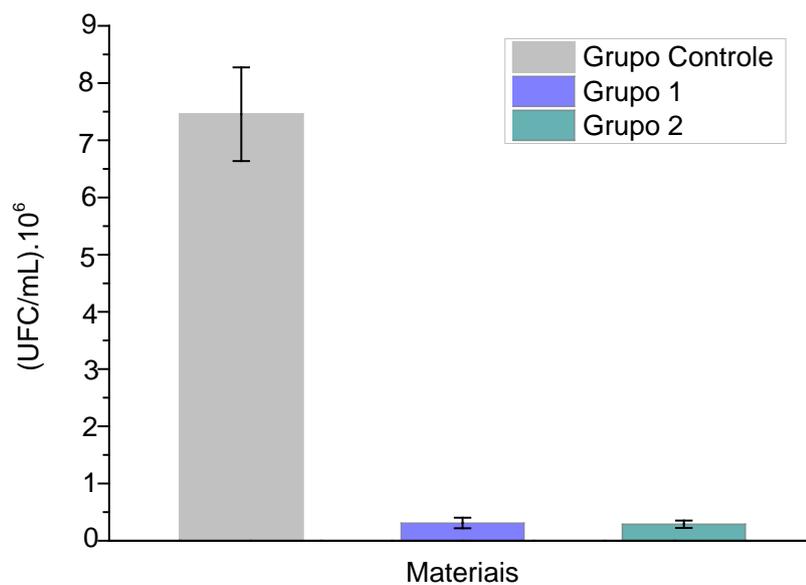
Os gráficos a seguir (Figuras 25 a 30) permitem uma interpretação visual dos resultados demonstrados na Tabela 8.



**Figura 25.** Contagem de células viáveis de *Lactobacillus acidophilus* recuperadas dos biofilmes aderidos às superfícies das amostras dos 3 grupos experimentais após 1 dia de incubação, expressa em unidades formadoras de colônia por mL.

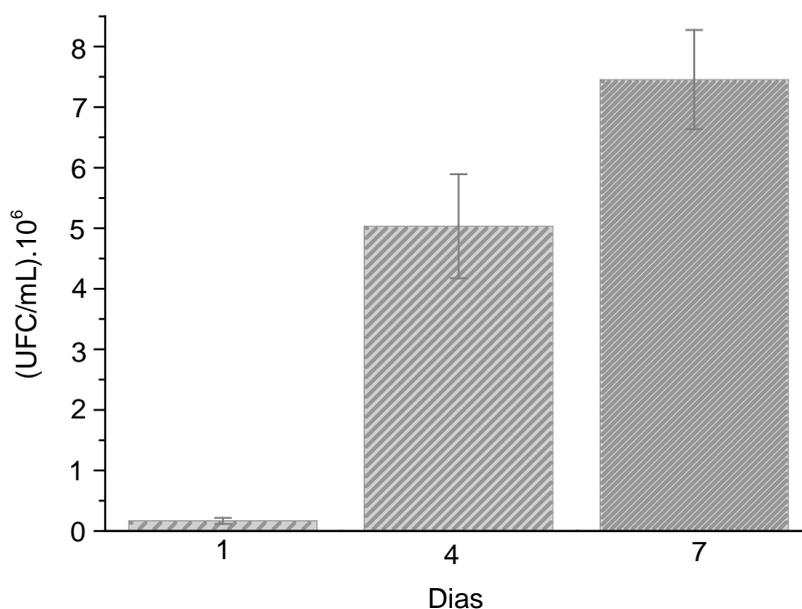


**Figura 26.** Contagem de células viáveis de *Lactobacillus acidophilus* recuperadas dos biofilmes aderidos às superfícies das amostras dos 3 grupos experimentais após 4 dias de incubação, expressa em unidades formadoras de colônia por mL.

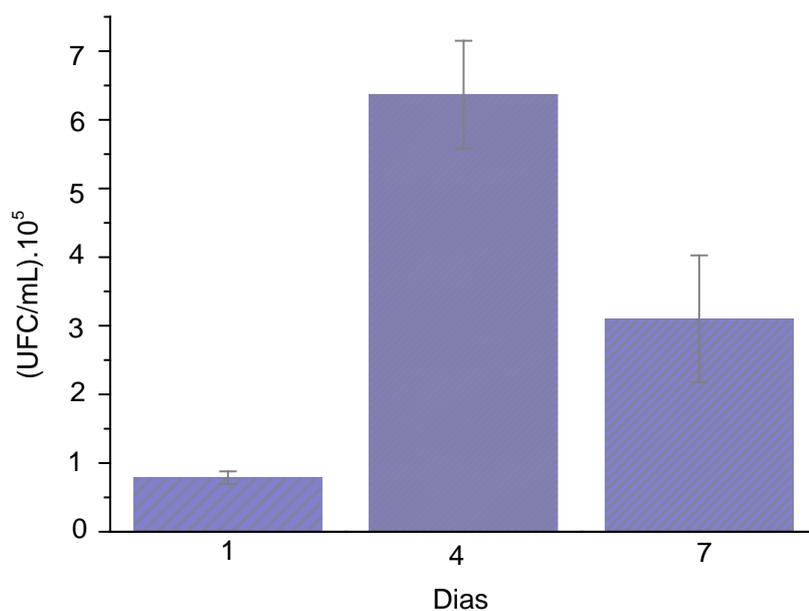


**Figura 27.** Contagem de células viáveis de *Lactobacillus acidophilus* recuperadas dos biofilmes aderidos às superfícies das amostras dos 3 grupos experimentais após 7 dias de incubação, expressa em unidades formadoras de colônia por mL.

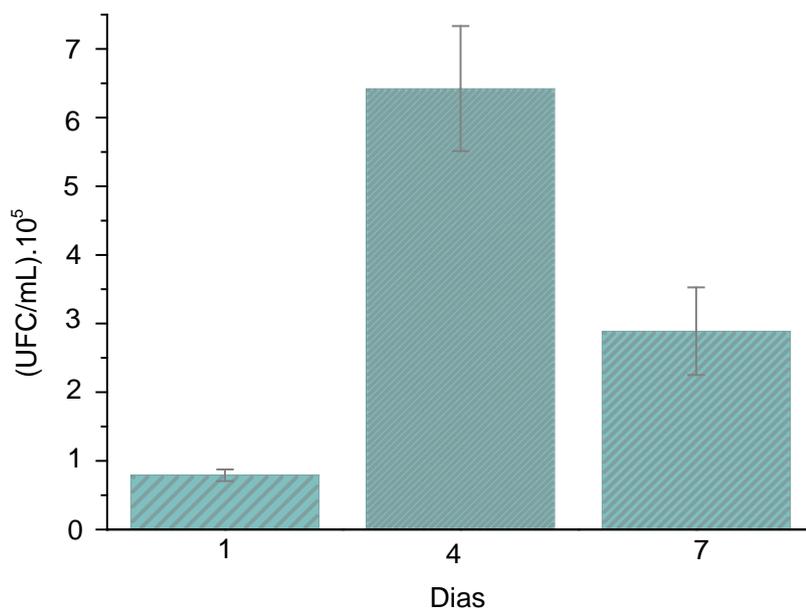
Os gráficos a seguir (Figuras 28 a 30) mostram a variação dentro de cada grupo experimental. No grupo controle a contagem de células viáveis aumentou até 7 dias, e nos grupos 1 e 2 a contagem aumentou até 4 dias e depois diminuiu.



**Figura 28.** Contagem de células viáveis de *Lactobacillus acidophilus* recuperadas dos biofilmes das amostras do Grupo Controle nos 3 tempos de incubação, expressa em unidades formadoras de colônia por mL.



**Figura 29.** Contagem de células viáveis de *Lactobacillus acidophilus* recuperadas dos biofilmes das amostras do Grupo 1 nos 3 tempos de incubação, expressa em unidades formadoras de colônia por mL.



**Figura 30.** Contagem de células viáveis de *Lactobacillus acidophilus* recuperadas dos biofilmes das amostras do Grupo 2 nos 3 tempos de incubação, expressa em unidades formadoras de colônia por mL.

## 6.4. ESTUDO DAS PROPRIEDADES FÍSICAS DA RESINA MODIFICADA

### 6.4.1. AVALIAÇÃO DE TRANSMITÂNCIA ÓPTICA

Após a aplicação da análise estatística foi possível verificar que não houve diferença da transmitância óptica total entre o grupo 1 e o grupo controle, porém o grupo 2 apresentou um valor de transmitância menor do que o grupo controle e do que o grupo 1 (Tabela 9).

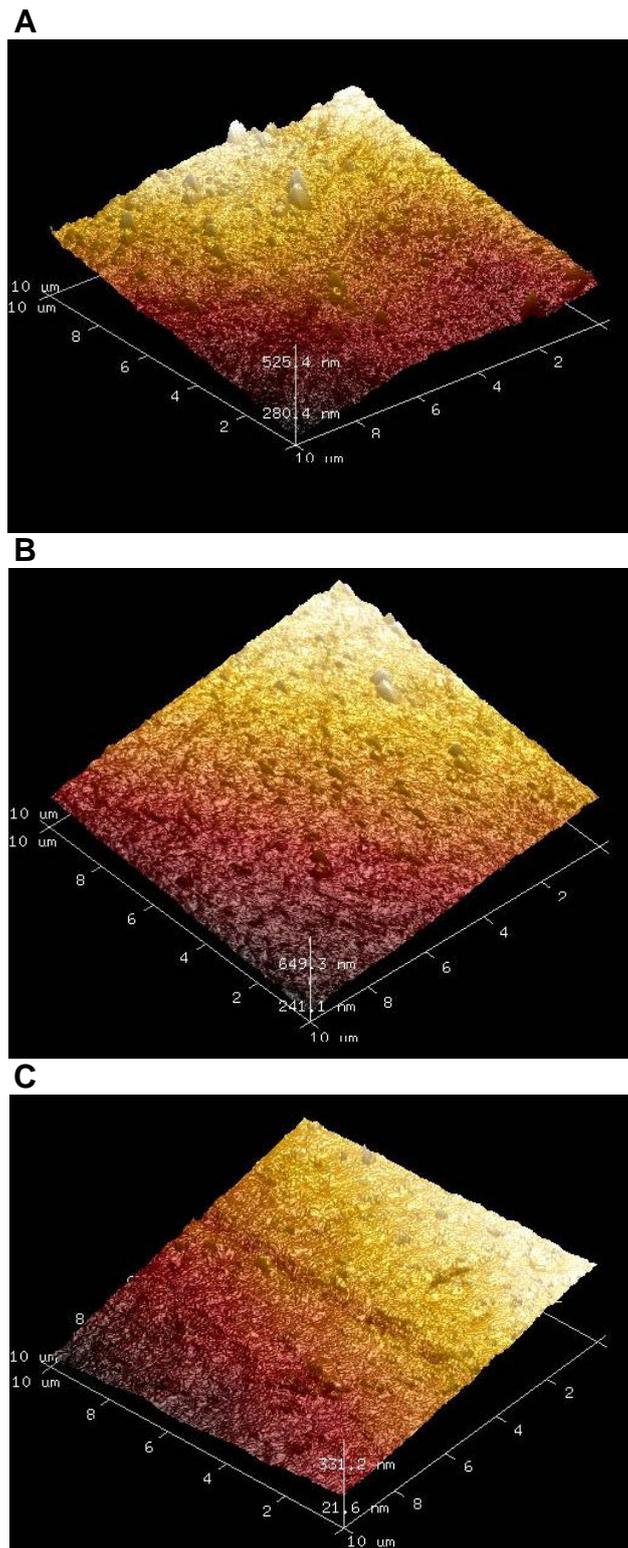
**Tabela 9.** Medidas de transmitância total da luz branca, em porcentagem, através dos espécimes de 1 mm de espessura (média e o desvio padrão, sendo  $n = 9$  para todos os grupos experimentais)

<b>Material</b>	<b>Transmitância (%)</b>
<b>Grupo Controle</b>	$5,88 \pm 0,33^a$
<b>Grupo 1 (0,3%)</b>	$5,74 \pm 0,43^a$
<b>Grupo 2 (0,6%)</b>	$3,68 \pm 0,17^b$

Letras iguais indicam números sem diferença estatística a um nível de significância de 0,05% (ANOVA/Tukey).

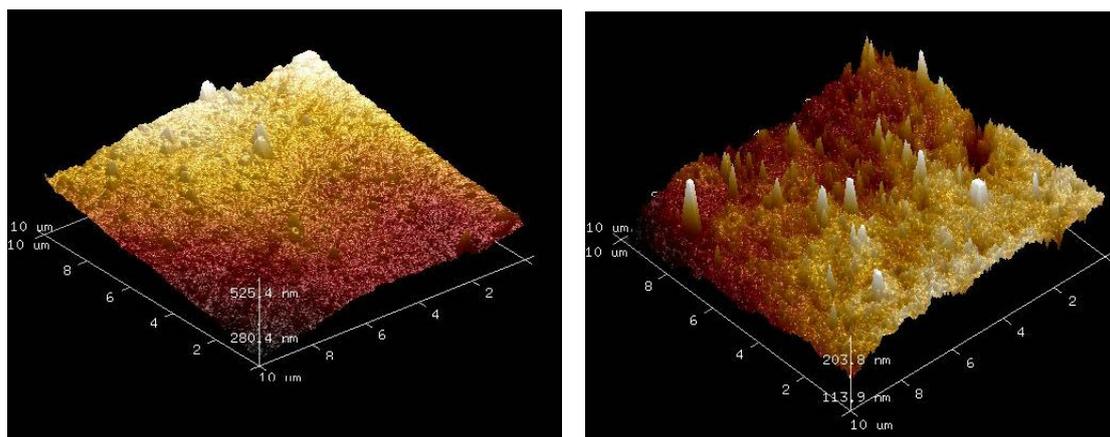
### 6.4.2. AVALIAÇÃO DA RUGOSIDADE SUPERFICIAL

A Figura 31 mostra imagens tridimensionais das superfícies das amostras, fornecidas pelo microscópio de força atômica. Estas imagens permitem verificar que o aspecto topográfico das amostras dos 3 grupos experimentais é semelhante.



**Figura 31.** Imagens superficiais tridimensionais de uma das regiões analisadas, de um espécime do grupo controle, em A, do grupo 1, em B, e do grupo 2, em C. As regiões mais claras são locais mais altos, e as mais escuras são locais mais baixos.

A Figura 32 permite a comparação entre uma amostra de resina composta polida e uma amostra não polida (intencionalmente), ambas do grupo controle, considerando também imagens de superfície fornecidas pelo microscópio de força atômica. Esta comparação permite a percepção do quanto estão semelhantes as imagens A, B e C, retratadas na Figura 31, em relação ao aspecto topográfico e à rugosidade superficial.



**Figura 32.** Imagem superficial tridimensional de uma região de um espécime do grupo controle no qual foi realizado o polimento padronizado na metodologia, à esquerda, e de uma região de outro espécime que propositadamente não recebeu o polimento, à direita.

Considerando o tratamento estatístico dos valores numéricos para a rugosidade, obtidos através do software *NanoScope* (Tabela 10), constatou-se que não houve diferença na rugosidade superficial entre os 3 grupos experimentais ( $p > 0,05$ ). A Tabela 10 apresenta os valores de medida de rugosidade no parâmetro Ra, que consiste na Rugosidade Aritmética ou Rugosidade Média. Parâmetro já explicado no item 5.3.2., do capítulo Material e Métodos.

**Tabela 10.** Valores da Rugosidade Aritmética (Ra) obtidos através do programa *NanoScope Analysis* após a realização das imagens topográficas dos discos de resina por meio de Microscopia de Força Atômica (média e desvio padrão, n = 9)

<b>Material</b>	<b>Rugosidade (nm)</b>
<b>Grupo Controle</b>	12,5 ± 2,1 <sup>a</sup>
<b>Grupo 1 (0,3%)</b>	12,1 ± 2,1 <sup>a</sup>
<b>Grupo 2 (0,6%)</b>	11,8 ± 2,6 <sup>a</sup>

Letras iguais indicam números sem diferença estatística a um nível de significância de 0,05% (ANOVA/Tukey).

### 6.2.3. COLORIMETRIA

Os valores de variação total de cor ( $\Delta E$ ) das amostras dos grupos experimentais 1 e 2 em relação às amostras do grupo controle (cor fixada como padrão), conforme descrito na Tabela 11, foram superiores ao valor 1, que é o valor mínimo perceptível à visão humana, mas foram inferiores ao valor de 3,3, que é o valor crítico acima do qual a variação de cor é considerada muito alta e clinicamente inaceitável para materiais dentários.

Os valores de  $\Delta L$  negativos indicam que a alteração de cor no eixo L tende mais para o escuro do que para o claro, ou seja, indicam que a luminosidade diminuiu (ocorreu um escurecimento). Os valores de  $\Delta a$  positivos indicam que a mudança de cor no eixo a tende mais para o vermelho do que para o verde, e os valores de  $\Delta b$  negativos indicam que a alteração de cor no eixo b tende mais para o azul do que para o amarelo. Esse padrão de variação é favorável, pois o amarelamento em vários tipos de materiais, e sobretudo em materiais restauradores dentários, está associado à aparência de material envelhecido e danificado.

**Tabela 11.** Valores médios de colorimetria das amostras seguindo o sistema CIELab (n = 9 para todos os grupos experimentais). Os espécimes do grupo controle (de cor A2) foram fixados como padrão, e os seus valores de colorimetria estão designados como base para a realização dos cálculos comparativos de alterações da cor.

<b>Material</b>	<b>L</b>	<b>a</b>	<b>b</b>	<b><math>\Delta L</math></b>	<b><math>\Delta a</math></b>	<b><math>\Delta b</math></b>	<b><math>\Delta E</math></b>
<b>Grupo Controle</b>	71,32	1,23	15,96				
<b>Grupo 1 (0,3%)</b>	70,94	2,01	13,65	- 0,38	0,78	- 2,31	2,45
<b>Grupo 2 (0,6%)</b>	70,36	2,44	13,24	- 0,96	1,21	- 2,72	3,13

#### **6.2.8. ANÁLISE DA PRESENÇA DE PRATA NO ADITIVO NANOPARTICULADO**

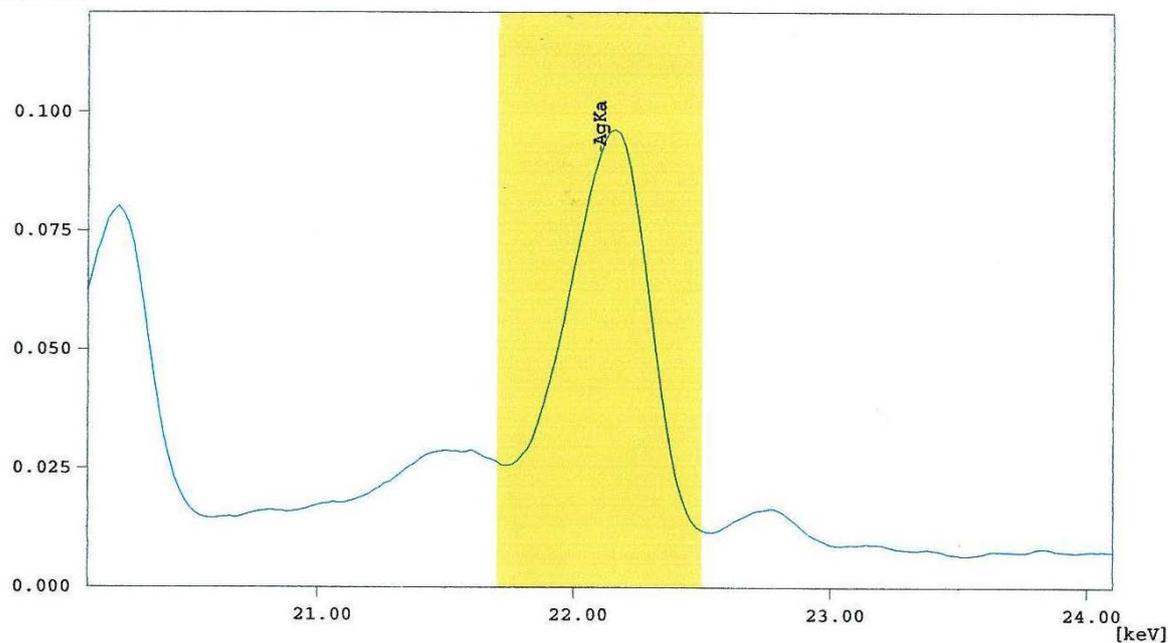
O resultado da análise confirmou a presença de prata (Ag) e de silício (Si) no agregado de partículas (pó), em sua forma comercial, que foi utilizado para a confecção das amostras de resina composta experimental. Os registros a seguir foram emitidos no momento da análise, e mostram o espectro de radiação secundária (ou fluorescente) com os seus picos característicos, emitido pela amostra e detectado pelo equipamento (Figuras 33 e 34).

## Measurement Condition

Instrument: EDX-720 Atmosphere: Vac. Collimator: 5 (mm)

Analyte	TG kV	uA	FI	Acq. (keV)	Anal. (keV)	Time (sec)	DT (%)
Ag	Rh 50	295-Auto	----	0 - 40	21.70-22.50	Live- 100	40

[cps/uA]



## Qualitative Result

Element: Ag

## Peak List

Channel	Line	keV	Net Int. (cps/uA)
Ag	AgKa	22.10	0.6322

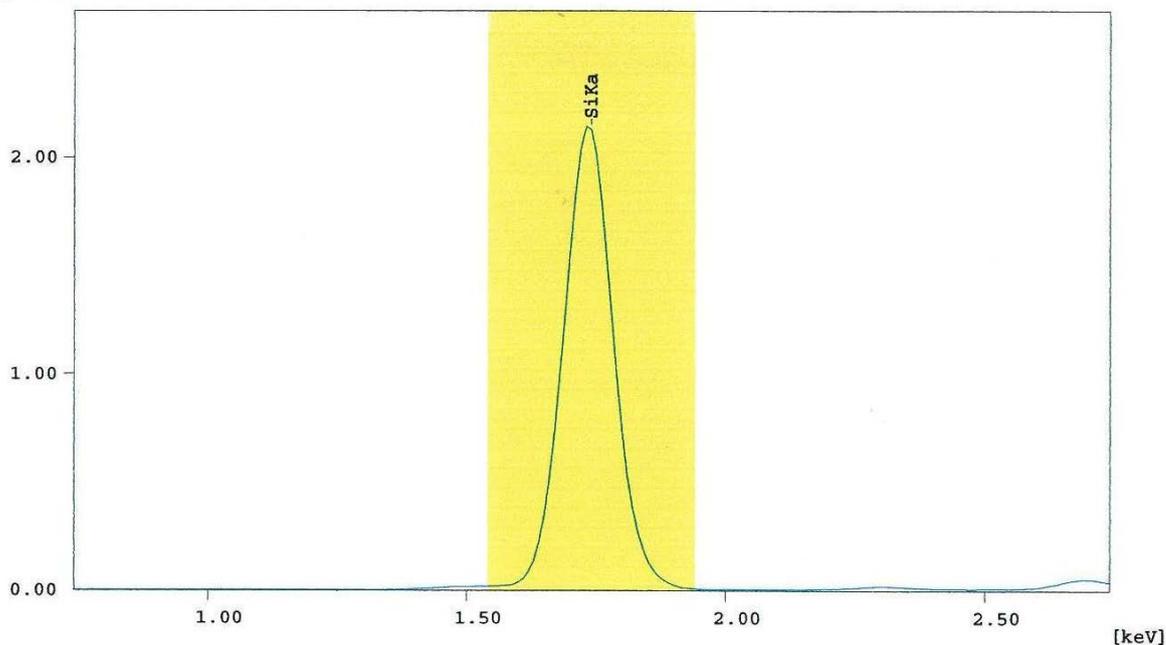
**Figura 33.** Espectro de radiação X fluorescente emitida pela amostra (aditivo contendo nanopartículas de prata), durante a busca por prata (Ag), registrado pelo espectrômetro de fluorescência de raios X.

## Measurement Condition

Instrument: EDX-720 Atmosphere: Vac. Collimator: 5(mm)

Analyte	TG kV	uA	FI	Acq. (keV)	Anal. (keV)	Time (sec)	DT (%)
Si	Rh 15	811-Auto	----	0 - 20	1.54- 1.94	Live- 100	40

[cps/uA]



## Qualitative Result

Element: Si

## Peak List

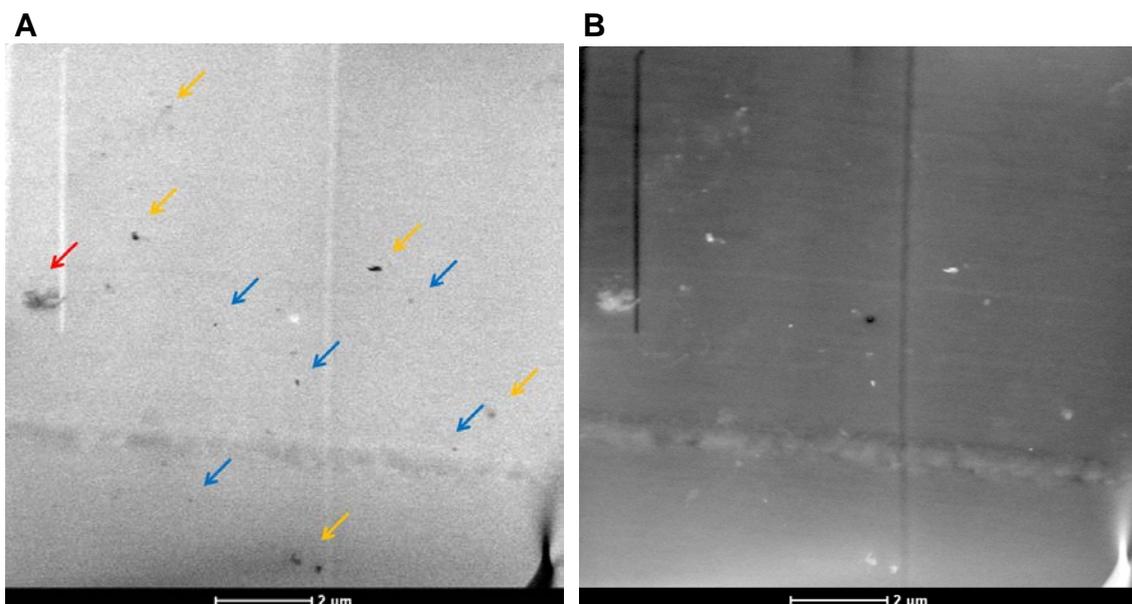
Channel	Line	keV	Net Int. (cps/uA)
Si	SiKa	1.74	0.2226 QF

**Figura 34.** Espectro de radiação X fluorescente emitida pela amostra (aditivo contendo nanopartículas de prata), durante a busca por silício (Si), registrado pelo espectrômetro de fluorescência de raios X.

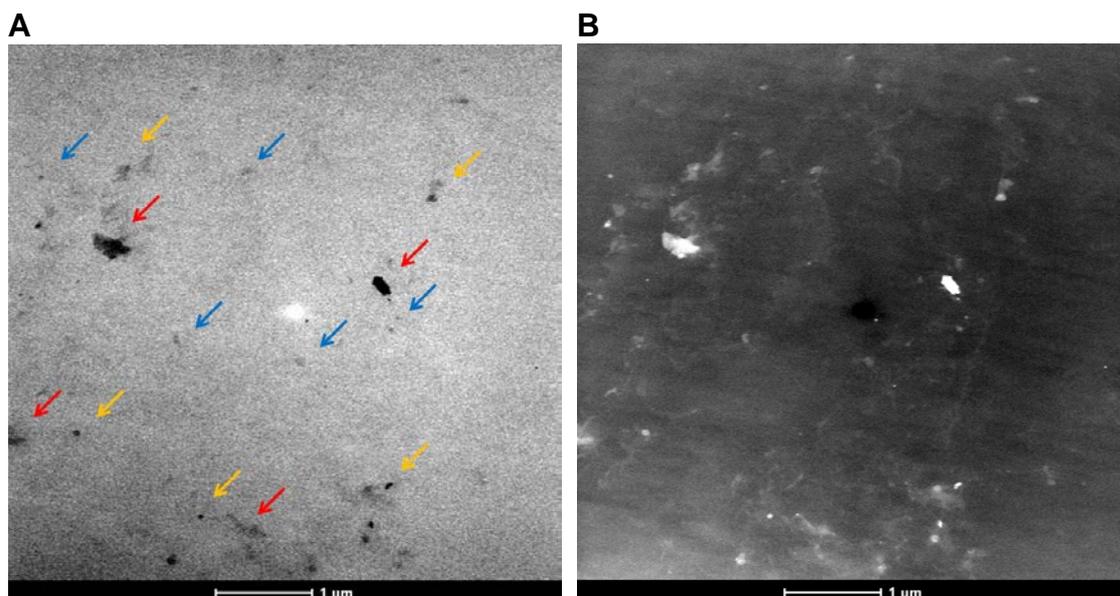
### 6.2.9. ANÁLISE DA DISPERSÃO E DISTRIBUIÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE PRATA NOS ESPÉCIMES

As Figuras de número 35 e 36 mostram as imagens obtidas no microscópio eletrônico de transmissão. Setas foram incluídas sobre as imagens com o intuito de facilitar a visualização, indicando onde estão as nanopartículas de prata, algumas vezes isoladas e em alguns locais formando aglomerados de partículas. A prata está nas regiões mais escuras das imagens de campo claro e está nas regiões mais claras das imagens de campo escuro.

Essa análise demonstrou boa distribuição das nanopartículas de prata, tanto para o grupo 1 como para o grupo 2, pois em ambos os grupos encontrou-se prata nos 4 quadrantes das regiões analisadas. Já a dispersão das nanopartículas foi melhor para o grupo 1 (resina com a menor concentração de prata) do que para o grupo 2, o qual apresentou maior número de grandes aglomerados de partículas.



**Figura 35.** Imagens obtidas por Microscopia Eletrônica de Transmissão, nos modos campo claro e campo escuro, designadas respectivamente por A e B, referentes a um espécime do grupo 1 (aumento de 6.500X). As setas indicam a presença da prata, nas regiões mais escuras das imagens de campo claro, e nas regiões mais claras das imagens de campo escuro. Setas azuis indicam partículas isoladas, setas amarelas indicam pequenos aglomerados de partículas e as setas vermelhas indicam grandes aglomerados de partículas.



**Figura 36.** Imagens obtidas por Microscopia Eletrônica de Transmissão, nos modos campo claro e campo escuro, respectivamente as imagens A e B, de um espécime do grupo 2 (aumento de 13.000X). As setas localizam a presença da prata, nas regiões mais escuras das imagens de campo claro, e nas regiões mais claras das imagens de campo escuro. As setas azuis indicam partículas isoladas, as setas amarelas os pequenos aglomerados de partículas, e as setas vermelhas apontam grandes aglomerados.

#### 6.2.10. ANÁLISE DA LIBERAÇÃO DE PRATA EM SALIVA ARTIFICIAL

Os resultados para a busca de prata em saliva por meio Espectrometria de Emissão Óptica por Plasma Acoplado Indutivamente (ICP-OES) foram expressos em mg/L e estão mostrados na Tabela 13. As 3 amostras líquidas foram denominadas durante a análise de solução 1, 2 e 3, sendo correspondentes às salivas armazenadas com as amostras do grupo controle, grupo 1 e grupo 2, respectivamente. Foi possível verificar que, para as 3 amostras, nos 3 tempos de armazenamento analisados, não foi detectada a presença de prata, sendo que, se presente, o elemento encontrava-se abaixo do limite de detecção da técnica.

Os certificados emitidos pelo CCDM com a explanação do resultado da análise estão em anexo no final desta tese, no Anexo 1. O primeiro certificado anexado é referente ao primeiro tempo de incubação sob agitação das amostras em saliva, 60 dias, o certificado identificado por CQ13-000142. Os outros certificados, o de identificação CQ13-000268 e o CQ14-000035 foram os certificados referentes respectivamente aos segundo e terceiro tempos de incubação, 120 e 210 dias. As

datas de retirada das amostras do agitador e do contato com a saliva foram: 05/08/2013, 05/10/2013 e 05/01/2014.

O limite de detecção da técnica é indicado pelo equipamento a cada experimento, durante a sua realização, podendo ser um pouco diferente (dentro de uma faixa de variação) em experimentos feitos independentemente, em dias diferentes, mesmo se tratando de um mesmo tipo de material e do mesmo volume de material a ser analisado. Os limites de detecção, como mostra a Tabela 13, foram diferentes para os 3 experimentos realizados (relativos aos 3 tempos de incubação), porém todos correspondendo a valores extremamente baixos. É possível escolher um dos valores para este limite de detecção para ser o limite comum aos 3 experimentos, o maior valor entre os 3, que é a situação mais desfavorável, no caso deste experimento, para que possa ser feita uma referência a estes 3 resultados de uma forma geral. Assim, pode-se dizer que para os 3 tempos de incubação, não foi detectada a presença de prata na saliva, para os 3 grupos experimentais, sendo que, se presente, ela encontrava-se em uma concentração abaixo do limite de detecção da técnica, 0,02 mg/L.

**Tabela 13.** Resultados da análise química realizada por meio da técnica de Espectrometria de Emissão Óptica com Plasma Induzido, com a finalidade de determinação dos teores percentuais de prata em 3 amostras de soluções. As amostras 1, 2 e 3 referem-se, respectivamente, às soluções obtidas após armazenamento das amostras de resina dos grupos controle, grupo 1 (0,3%) e grupo 2 (0,6%), em saliva artificial, decorridos 3 períodos de incubação a 36,5 °C sob agitação constante

Amostra	Concentração de prata (mg/L)		
	60 dias	120 dias	210 dias
<b>Solução 1</b>	< 0,02, se presente	< 0,015, se presente	< 0,010, se presente
<b>Solução 2</b>	< 0,02, se presente	< 0,015, se presente	< 0,010, se presente
<b>Solução 3</b>	< 0,02, se presente	< 0,015, se presente	< 0,010, se presente

## 7. DISCUSSÃO

Em relação à atividade antibacteriana, aqui investigada considerando o biofilme bacteriano aderido na superfície dos espécimes, encontramos resultados positivos, que se resumem na redução de biofilme sobre as resinas modificadas, com as duas concentrações de nanopartículas avaliadas, para duas espécies bacterianas cariogênicas. Para os 3 tempos de incubação, o número de unidades formadoras de colônia, provenientes dos biofilmes desagregados, foi estatisticamente mais baixo nos grupos 1 e 2 do que no grupo controle, e os grupos 1 e 2 não mostraram entre si diferença estatisticamente significativa, para as 2 espécies. Eles demonstraram que a atividade antibacteriana das nanopartículas de prata, já relatada anteriormente na literatura, continuou a existir mesmo após a mistura com a resina composta, na superfície da mesma, durante o processo de formação e maturação dos biofilmes.

Estes resultados são de grande importância porque o biofilme bacteriano aderido em restaurações dentárias pode causar a degradação precoce de uma restauração e também o aparecimento de cáries recidivantes (ao redor de uma restauração ou na interface dente/restauração). Resultados semelhantes em termos de atividade antibacteriana em resinas compostas, modificadas com nanopartículas de prata, foram relatados por *Burguers et al. (2009)*, em um trabalho citado no capítulo 4 desta tese, na Revisão de Literatura.

Em um trabalho anterior, realizado pela mesma equipe de pesquisadores (*Agnelli, 2001; Neves et al., 2014*), foram constatadas também diferenças morfológicas nos biofilmes de *S. mutans* aderidos às resinas modificadas com prata, em relação aos biofilmes observados nas superfícies da resina não modificada, constatações que convergem com os resultados de contagem de unidades formadoras de colônia provenientes dos biofilmes, apresentados nesta tese. Na fase de maturação dos biofilmes bacterianos, a espessura e a complexidade dos arranjos celulares aumentam, às custas da multiplicação celular: formam-se estruturas contendo muito material não celular, incluindo o exopolissacárido, e canais por onde circulam os nutrientes. Este arranjo de biofilme maduro só foi visualizado na superfície da resina não modificada com prata. A evolução típica da formação do biofilme não ocorreu nas amostras de resinas modificadas com prata, considerando todas as concentrações de aditivo testadas (0,1, 0,3 e 0,6%).

Em relação às propriedades físicas investigadas, é preciso analisar os resultados para cada uma delas, individualmente. As propriedades físicas de um material restaurador dentário que receba alguma modificação experimental não podem

sofrer alterações, a não ser que sejam positivas, ou que sejam negativas mas que possam ser corrigidas de alguma forma.

A transmitância óptica da resina composta é propriedade essencial, já que se trata de um material fotopolimerizável, cuja polimerização (endurecimento) depende da penetração da luz e da luz absorvida. Além disso, outras propriedades dependem da polimerização, como a resistência e a adesão ao dente. O ensaio de transmitância óptica revelou que não houve alteração desta propriedade apenas no grupo experimental modificado com a menor concentração do aditivo de prata (0,3%), pois não houve diferença significativa na porcentagem de transmitância entre este grupo (grupo 1) e o controle. O grupo 2 (0,6%) apresentou um valor de transmitância menor que os demais grupos, com significância estatística. Portanto, o resultado deste experimento foi favorável para o grupo 1 e desfavorável para o grupo 2.

A análise das medidas de rugosidade aritmética, obtidas por meio do software *NanoScope*, após realização de Microscopia de Força Atômica, não apontou diferença estatisticamente significativa na rugosidade superficial entre os 3 grupos. A rugosidade superficial é uma característica intimamente relacionada à adesão bacteriana e ao crescimento de biofilme bacteriano, visto que, segundo muitos trabalhos registrados na literatura (*Ikeda et al., 2007; Kantorski et al., 2008; Aykent et al., 2010*), uma superfície mais rugosa nos materiais dentários restauradores favorece o desenvolvimento dos biofilmes. Neste sentido a modificação da resina não causou alteração prejudicial nas 2 concentrações de nanopartículas avaliadas. Percebe-se ainda que este resultado foi coerente com o resultado dos ensaios microbiológicos, pois não poderia ter ocorrido redução do biofilme aderido na resina modificada se a sua rugosidade tivesse aumentado.

Uma análise por Microscopia Eletrônica de Transmissão demonstrou boa distribuição de nanopartículas prata para o grupo 1 e 2, pois elas foram visualizadas nos 4 quadrantes das regiões analisadas. Por outro lado, a dispersão foi melhor para o grupo 1 (0,3% de nanopartículas) do que para o grupo 2 (0,6%), no qual visualizou-se um maior número de aglomerados de partículas. A boa distribuição das partículas em ambos os grupos comprova que os materiais misturados, o aditivo contendo nanopartículas de prata e a resina composta, são compatíveis, e também que a mistura é possível. A pior dispersão das partículas no grupo 2 indica que baixas concentrações de partículas adicionadas a um material podem ser vantajosas, mas concentrações altas podem ser prejudiciais para as propriedades físicas do mesmo, sempre havendo uma concentração (ou intervalo de concentração) acima da qual algumas propriedades começam a ser afetadas.

O resultado da análise da dispersão das partículas de prata está compatível com os resultados da análise da transmitância óptica, visto que no grupo 2, onde a dispersão visualizada microscopicamente foi pior, a transmitância também sofreu alteração significativa. Também está compatível com os resultados do ensaio de resistência à compressão, obtidos em um trabalho anteriormente realizado, pela mesma equipe (*Agnelli P.B., 2011*), pois no grupo amostral com menor concentração de nanopartículas de prata (0,3%) a resistência em compressão aumentou, e no grupo com maior concentração (0,6%) diminuiu, com significância estatística. Isso sugere que a maior concentração de nanopartículas adicionada foi superior à concentração adequada para a obtenção do reforço da resina, e que a concentração de 0,3% deve estar dentro da faixa ideal de modificação para a otimização das propriedades mecânicas em compressão.

Um trabalho realizado por *Masouras et al. (2008)* relacionou a concentração de partículas de carga inorgânica em resinas compostas com as suas propriedades elásticas, avaliando 3 parâmetros, e o resultado foi uma correlação positiva entre o módulo de elasticidade e a concentração de partículas de carga nas amostras, com significância estatística. Este é mais um trabalho que demonstra que as propriedades físicas da resina composta realmente se relacionam com a concentração de partículas que são adicionadas em sua matriz orgânica.

A importância do experimento de medição da liberação de prata proveniente das amostras em saliva artificial deve-se ao fato de que nanopartículas de prata liberadas para a saliva poderiam ser tóxicas às células humanas, já que o material modificado terá aplicação na cavidade bucal, em restaurações dentárias. É interessante considerar, na discussão sobre a toxicidade do material modificado, que a prata é componente do amálgama dentário (também denominado amálgama de prata), material restaurador dentário que tem sido amplamente empregado desde o final do século XIX e que ainda é bastante utilizado, apesar de estar sendo cada vez mais substituído pelos materiais restauradores estéticos, nos dias atuais (*Phillips, 1998*). Porém, a prata no amálgama está presente de uma forma diferente, está contida em uma liga metálica, obtida após um processo de amalgamação com outros metais, então é preciso avaliar a toxicidade da prata quando empregada sob uma forma diferente, misturada a um material polimérico.

O resultado do experimento foi favorável, para todos os grupos, pois a concentração de prata liberada na saliva ou foi inexistente, ou foi muito baixa. Após os 3 tempos de incubação, não foi detectada a presença de prata na saliva, para os 3 grupos experimentais, sendo que, se presente, ela encontrava-se em uma concentração abaixo do limite de detecção da técnica de ICP-OES, 0,02 mg/L, ou seja,

uma concentração extremamente baixa ( $2 \times 10^{-5}$  mg/mL). Este resultado sugere que a ação antibacteriana das nanopartículas de prata ocorre por contato, nos biofilmes intimamente aderidos à superfície da resina modificada.

Em complementação ao resultado descrito, alguns estudos já demonstraram que as nanopartículas de prata não são tóxicas às células de animais e de humanos, da maneira como vêm sendo empregada nos materiais, como o de *Sayes et al. (2004)*, *Reddy et al. (2007)* e *Allaker (2010)*. *Panacek et al. (2009)* verificaram que a concentração de 0,2 µg/mL de nanopartículas de prata em ambiente líquido inibe *Candida spp.*, e que é necessária uma concentração de 30 µg/mL para que ocorra efeito tóxico em fibroblastos de humanos.

Finalizando a discussão sobre as propriedades físicas avaliadas, a alteração de cor causada pela adição de prata na resina composta é uma importante característica que foi considerada no estudo, já que trata-se de um material restaurador estético, disponível em várias cores muito semelhantes às dos dentes. O experimento de colorimetria mostrou que a diferença total de cor ( $\Delta E$ ), tanto entre o grupo 1 e o grupo controle, como entre o grupo 2 e o grupo 1, foi superior a 1, o valor mínimo que representa uma alteração de cor perceptível à visão humana. Este resultado é desfavorável para ambos os grupos de resina modificada, mais desfavorável para o grupo 2, que apresentou maior  $\Delta E$  em relação ao grupo controle, do que o grupo 1. Porém, isso não invalida o uso das resinas modificadas com a menor concentração de aditivo em restaurações dentárias, já que há como contornar o problema da alteração de cor e também indicações para seu uso mesmo com a cor alterada.

Primeiramente, a escala de cor, que se usa posicionada ao lado do dente para a escolha da resina que será aplicada, pode ser alterada, sendo criada uma escala apropriada para as cores (matizes e intensidades de cor) nas quais a resina modificada com prata estará disponível. Neste caso, apenas os pacientes com dentes de cores mais claras e menos intensas não terão a resina modificada próxima à cor de seus dentes, considerando a nova escala. Adicionalmente, vários autores consideram clinicamente inaceitável um valor de  $\Delta E$  maior que 3,3, valor tomado como referência em trabalhos na área da Odontologia que avaliam a alteração de cor das resinas decorrente de algum tipo de degradação ou envelhecimento (*Stober, 2001; Reis, 2003; Pires et al., 2007; Papadopoulos et al., 2010*). Assim, a alteração de cor do grupo 1 em relação ao grupo controle, que ocorreu como consequência da adição de prata, foi menor do que este valor crítico ( $\Delta E = 2,45$ ), já a do grupo 2, também em relação ao grupo controle, foi menor, porém bastante próxima deste valor ( $\Delta E = 3,13$ ).

É válido acrescentar ainda que, mesmo em pacientes onde a cor da resina modificada com prata não se ajuste ao dente, ela poderá ser usada em dentes

posteriores, nos quais não é essencial que a cor da restauração fique idêntica à cor dental. Até mesmo o amálgama dentário, material restaurador dentário que possui cor metálica, bem diferente da cor dos dentes, é usado ainda em restaurações de dentes posteriores, quando indicado, apesar da grande valorização da “estética dental” que existe na atualidade. A resina modificada, mesmo mais escura que o dente, ainda será de cor bem mais próxima do que o amálgama, e tem a propriedade da adesão ao dente (retenção adesiva), propriedade que o amálgama não apresenta, pois o mesmo fica retido na cavidade dentária apenas por embricamento mecânico (retenção mecânica).

## 8. CONCLUSÕES

A propriedade antibacteriana foi verificada nas superfícies das resinas experimentais, e apresentou-se como uma vantagem em relação à resina não modificada com prata, para as duas espécies bacterianas cariogênicas consideradas neste estudo. Em relação às propriedades físicas avaliadas (transmitância óptica, rugosidade, cor, dispersão e distribuição de partículas, liberação de prata) verificou-se que a adição de prata não provocou alterações negativas na resina modificada do grupo com a menor concentração de nanopartículas (0,3% em massa), o que valoriza a continuidade do estudo, empregando-se concentrações de aditivo próximas a este valor, inclusive com a realização de ensaios *in vivo*. O prosseguimento deste estudo é muito importante, visto que um material restaurador que apresente a propriedade de ser menos favorável à adesão bacteriana e ao crescimento de biofilme pode colaborar na prevenção das cáries dentárias recidivantes, em conjunto com uma higienização bucal adequada.

## 9. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

São sugestões de experimentos que darão continuidade aos experimentos já realizados, apresentados nesta tese:

- **Avaliação da propriedade antimicrobiana da resina modificada *in vivo*:**

Esta avaliação será importante pois há uma grande variedade de espécies de microrganismos que regularmente habitam a cavidade bucal, formando biofilmes aderidos aos dentes e restaurações, e ela permitirá determinar se existe efeito antimicrobiano das nanopartículas de prata sobre o conjunto destes microrganismos.

Uma das formas para realizar a avaliação microbiológica *in vivo (in situ)* seria confeccionar dispositivos intra-bucais palatinos em resina acrílica sobre modelos de gesso obtidos a partir de moldagem com alginato da arcada superior de pacientes voluntários. Nos dispositivos podem ser fixados os discos de resina composta. Assim, cada paciente possuirá em sua cavidade bucal, enquanto usa o dispositivo, amostras de resina composta não modificada (controle) e de resina modificada com nanopartículas de prata. Decorridos os tempos de uso a serem determinados para o estudo, sob protocolos de higienização pré-determinados, as amostras de resina são removidas do dispositivo e uma contagem das células provenientes dos biofilmes aderidos deve ser efetuada.

- **Estudo sobre a citotoxicidade da resina modificada:**

Este estudo permitirá verificar se há aumento da citotoxicidade da resina modificada em relação à resina não modificada, em decorrência do contato com tecido vivo, e isso é importante porque, em regiões da cavidade bucal, uma restauração em resina pode ter algumas de suas faces em contato direto com o epitélio, por exemplo o da língua, bochechas, e lábio (parte interna).

Um método possível para avaliar tal experimento seria a utilização de cultura de células, por exemplo de fibroblastos, de linhagem proveniente de bancos de células, com a realização do teste da difusão em ágar. Uma linhagem celular conhecida pode ser semeada em placa de Petri e incubada em condições adequadas. Após uma monocamada de células já formada, o meio de cultura é desprezado e adiciona-se um meio contendo ágar e o corante vermelho neutro. Fragmentos das amostras são colocados sobre o ágar antes da solidificação, sendo o controle a amostra de resina não modificada. As placas de Petri são incubadas novamente em condições adequadas, para favorecer o crescimento celular. As placas podem ser

analisadas macroscopicamente, quanto à presença de halo, e microscopicamente, quanto à integridade das células ao redor das amostras. A toxicidade é verificada pela presença de halo claro ao redor da amostra e pode ser avaliada pela medida do diâmetro do mesmo. Este halo surge quando há morte celular, e conseqüentemente lise celular, por causa da liberação do corante vermelho neutro previamente incorporado nas células, ficando a região com um aspecto descorado.

- **Determinação da hidrofobicidade das resinas por medição de ângulos de contato:**

Este experimento vai avaliar a hidrofobicidade das resinas modificadas, comparando com a da resina não modificada, a fim de verificar se este é um dos mecanismos responsáveis pela atividade antibacteriana que ocorre na superfície das resinas com nanopartículas de prata. A hidrofobicidade de um material tem importante papel na adesão de microrganismos e crescimento de biofilmes, conforme demonstrado por vários trabalhos. O ângulo de contato ( $\theta$ ) formado por uma gota de líquido sobre uma superfície sólida está diretamente relacionado com a molhabilidade da superfície por esse líquido. O ângulo de contato é definido como o ângulo formado na intersecção entre um plano tangente à gota do líquido e o plano que contém a interface substrato-líquido. Um valor de  $\theta = 0$  corresponde à molhabilidade perfeita, na qual o líquido se distribui por toda a superfície, formando um filme. A mensuração do ângulo de contato pode ser realizada utilizando-se um goniômetro que possui uma câmera para registrar a imagem da gota de um líquido colocada (com uma microseringa) na superfície de uma amostra, e um software de processamento de imagem fornece os resultados numéricos.

- **Avaliação da força de adesão da resina modificada ao adesivo resinoso:**

Este estudo verificará se a modificação da resina composta com a adição de nanopartículas de prata prejudica a adesão entre a resina e o adesivo resinoso, que é usado previamente à resina na cavidade dentária a ser restaurada, e, conseqüentemente, sua adesão ao dente. A força de adesão da resina modificada ao esmalte e à dentina pode ser medida e comparada com a força de adesão da resina não modificada a estes tecidos dentários, nas mesmas condições.

Ensaio de medição da força de adesão entre materiais dentários e a estrutura dental são ensaios muito realizados em pesquisas na área odontológica. Consistem basicamente na aplicação do material em cavidades confeccionadas em dentes de humanos de estoque, na região dental de interesse, sob um protocolo padronizado,

seguida da confecção de fragmentos de dimensões iguais, de modo que em uma extremidade do fragmento esteja o material e do outro tecido dentário. O fragmento é submetido à força de tração, em direções opostas, e a força em que ocorre a fratura pode ser medida, a qual corresponde à força de adesão entre o material e a estrutura dental.

- **Estudo de alternativas para amenizar a alteração de cor na resina modificada com prata:**

Este estudo verificará se a inclusão de branqueadores ópticos corrige parcialmente a alteração de cor da resina após a adição da prata. O uso de branqueadores ópticos é um recurso já utilizado industrialmente para corrigir alterações de cor em diversos materiais em decorrência de alguma modificação realizada nos mesmos.

## 10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. **ABNT NBR ISO 4287**. Especificações geométricas do produto – Rugosidade: método do perfil – Termos, definições e parâmetros de rugosidade. Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT), 2002.
2. **ASTM D 695**. Standard Test Method for Compressive Properties of Rigid Plastics. Anual Book of ASTM Standards, Philadelphia, 2010.
3. Agnelli, P.B. **Redução do biofilme de Streptococcus mutans sobre um material restaurador dentário modificado com nanopartículas de prata – estudo *in vitro***. 72 p. Dissertação (Mestrado) apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, na Universidade Federal de São Carlos. São Carlos, 2011.
4. Ahn, S.J.; Lee, S.J.; Kook, J.K.; Lim, B.S. Experimental antimicrobial orthodontic adhesives using nanofillers and silver nanoparticles. **Dent. Mater.**, v. 25, n. 2, p. 206-213, 2009.
5. Allaker, R. P. The Use of Nanoparticles to Control Oral Biofilm Formation. **J. Dent. Res.**, v. 89, p. 1175, 2010.
6. 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, n. 4, p. 221-227, 2010.
7. Azevedo, R.B. Microscopia Eletrônica. In: Durán, N.; Marais, C.; Mattoso, L.H.C. **Nanotecnologia: Introdução, preparação e caracterização de nanomateriais e exemplos de aplicação**. São Paulo: Artliber, 2006. Cap. 5, p. 101-109.
8. Balduino, R.; Oliveira A. S.; Haully, M. C. O. Cultura láctica mista com potencial de aplicação como cultura iniciadora em produtos cárneos. **Food Sci. Technol.**, v. 19, n. 3, p. 356-362, 1999.
9. Barreto, G.P.M.; Silva, N.; Silva, E.N.; Botelho, L.; Yim, D.K.; Almeida, C.G.; Saba, G.L. Quantification of Lactobacillus acidophilus, Bifidobacteria and Total bacteria in Probiotic Products Sold in Brazil. **Braz. J. Food Technol.**, v. 6, n. 1, p.119-126, 2003.
10. Belmonte, E.P. **Espectrometria por fluorescência de raios X por reflexão total: Um estudo simulado utilizando o método de Monte Carlo**. 164 p. Tese (Doutorado)

apresentada ao Programa de Pós-Graduação de Ciências em Engenharia Nuclear da Faculdade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, 2005.

11. Binning, G.; Rohrer, H.; Gerber, C.; Weibel, E. Surfaces studies by scanning tunneling microscopy. **Phys. Rev. Lett.**, v. 49, n. 1, p. 57-61, 1982.
12. Blecher, K.; Nasir, A.; Friedman, A. The growing role of nanotechnology in combating infectious disease. **Virulence**, v. 2, n. 5, p. 1-7, 2011.
13. Borges, M.F.; Castilho, A.R.F.; Pereira, C.V. Influência da sacarose, lactose e glicose + frutose no potencial cariogênico de *S. mutans*: estudo in situ e in vitro. **Rev. Odonto Ciênc.**, v. 23, n. 4, p. 360-364, 2008.
14. Bowen, R.L.; Eichmiller F.C.; Marjenhof, W.A.; Rupp, N.W. Adhesive bonding of composites. **J. Am. Coll. Dent.**, v. 56, p. 10, 1989.
15. 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. **Arch. Oral Biol.**, v. 54, p. 595-601, 2009.
16. Burnett, G.W. **Microbiologia oral e doenças infecciosas**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1978. 765 p.
17. BYK-Gardner GmbH. **Apostila BYK on line**. Disponível em: [http://www.byk.com/fileadmin/BYK/downloads/supportdownloads/instruments/theory/appearance/en/Intro\\_Transparency.pdf](http://www.byk.com/fileadmin/BYK/downloads/supportdownloads/instruments/theory/appearance/en/Intro_Transparency.pdf). Acessado em: 20 de dezembro de 2012.
18. Campos, R. **Metodologia de antecipação das paletas de cor nas tendências de moda**. 117 p. Dissertação (Mestrado) apresentada no Departamento de Engenharia têxtil da Universidade do Minho. Braga, 2009.
19. Carranza, F. A.; Newman, M. G. **Periodontia Clínica**. 8 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997. 238 p.
20. Carreira, C.M.; Pereira, C.A.; Bombana, A.C.; Jorge, A.O.C. Eficácia antimicrobiana das nanopartículas de prata sobre esporos, leveduras e bactérias. **Anais do XIII Encontro Latino Americano de Iniciação Científica e IX Encontro Latino Americano de Pós-Graduação da Universidade do Vale do Paraíba**. Vale do Paraíba, 2009.
21. Castro, D.T. **Efeito da incorporação de vanadato de prata nanoestruturado na atividade antimicrobiana, propriedades mecânicas e morfologia das resinas**

- acrílicas.** 119 p. Dissertação (Mestrado) apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Reabilitação Oral da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, na Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto, 2014.
22. Catalan, A.; Herrera, R.; Martinez, A. Denture plaque and palatal mucosa in denture stomatitis: scanning electron microscopic and microbiologic study. **J. Prosthet. Dent.**, v. 57, p. 581-586, 1987.
23. Cheng, L.; Zhang, K.; Melo, M.A.; Weir, M.D.; Zhou, X.; Xu, H.H. Anti-biofilm dentin primer with quaternary ammonium and silver nanoparticles. **J Dent Res.**, v. 91, n. 6, p. 598-604, 2012.
24. Creanor, S. L. et al. Fluoride uptake and release characteristics of Glass Ionomer Cements. **Caries Res.**, v. 28, p. 322-328, 1994.
25. Damm, C.; Münstedt, H.; Rosch, A. Long-term antimicrobial polyamide 6/silvernanocomposites. **J. Mat. Sci.**, v. 42, N. 15, p. 6067-6073, 2007.
26. Dariva, M.A. **Características ópticas das resinas compostas.** 32 p. Monografia (Especialização) apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Dentística da Faculdade de Odontologia da Uningá. Passo Fundo, 2011.
27. De Man, J.; Rogosa, M.; Sharpe, M. A médium for the cultivation of lactobacilli. **J. Appl. Bacteriol.**, v. 23, p.130-135, 1960.
28. De Muynck, W.; De Belie, N.; Verstraete, W. Antimicrobial mortar surfaces for the improvement of hygienic conditions. **J. Appl. Microbiol.**, v. 1, 2009.
29. Dror-Ehre A; Adin A, Markovich G; Mamane H. Control of biofilm formation in water using molecularly capped silver nanoparticles. **Water Res.**, v. 44, n. 8, p. 2601-2609, 2010.
30. 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, n. 2, p. 521-526, 2009.
31. Durán, N.; Marais, C.; Mattoso, L.H.C. **Nanotecnologia: Introdução, preparação e caracterização de nanomateriais e exemplos de aplicação.** São Paulo: Artliber, 2006. 208 p.

32. Elsaka, S.E.; Hamouda, I.M.; Swain, M.V. Titanium dioxide nanoparticles addition to a conventional glass-ionomer restorative: influence on physical and antibacterial properties. **J. Dent.**, v. 39, n. 9, p. 589-598, 2011.
33. Figueiredo, H.M.; Passos, F.J.V. Influência da fonte de nitrogênio no crescimento de *Lactobacillus acidophilus* UFV H2B20. **Sitientibus**, v. 28, p. 37-50, 2003.
34. Filho, A.P. et al. Rugosidade Superficial. In: **Terceiro Seminário de Metrologia**, maio de 2011, Brasília. Laboratório de Metrologia e Departamento de Engenharia Mecânica da Faculdade de Tecnologia da Universidade de Brasília (UnB), 2011. Disponível em: [ftp://ftp.demec.ufpr.br/disciplinas/TM314/Rugosidade%20Superficial%20Palestra\\_UFU\\_17\\_05\\_2011.pdf](ftp://ftp.demec.ufpr.br/disciplinas/TM314/Rugosidade%20Superficial%20Palestra_UFU_17_05_2011.pdf). Acessado em: 11 de março de 2013.
35. García, R.; Pérez, R. "Dynamic atomic force microscopy methods", **Surf. Sci. Rep.**, v. 47, p. 197-201, 2002.
36. Germaine, G.R. Infant infection with *Streptococcus mutans*: source and prevention. **North Dent.**, v. 63, p. 18-20, 1984.
37. Giessibl, F. "Advances in atomic force microscopy". **Rev. Modern Phys.**, v. 75, p. 949-983, 2003.
38. Giné-Rosias, M.F. **Espectrometria de emissão atômica com plasma acoplado indutivamente (ICP-AES)**. Série Didática, v.3. Seção Técnica da Biblioteca - CENA/USP (Centro de Energia Nuclear na Agricultura). Piracicaba: CENA, 1998. 148 p. Disponível em: <http://www.ebah.com.br/content/ABAAAeuMUAE/icp-oes>. Acessado em: 30 de julho de 2013.
39. 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**, v. 4, p. 237-240, 2008.
40. 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.**, v. 26, n. 6, p. 915-923, 2007.
41. Imazato S. Bio-active restorative materials with antibacterial effects: new dimension of innovation in restorative dentistry. **Dent. Mater. J.**, v. 28, n. 1, p. 11-19, 2009.

42. Jorge, A.O.C.; Silva, C.R.G. Microbiologia e Imunologia das Doenças Periodontais. In: Jorge, A.O.C. **Microbiologia Bucal**. 3. ed. São Paulo: Editora Santos, 2007. Cap. 8, p. 109-126.
43. Juan, L.; Zhimin, Z.; Anchun, M.; Lei, L. ; Jingchao, Z. Deposition of silver nanoparticles on titanium surface for antibacterial effect. **Int. J. Nanomedicine**, v. 15, n. 5, p. 261-267, 2010.
44. Junior, P.S.P.H.; Mattoso, L.H.C.; Filho, R.B.; Frommer, J.; Cidade, G.A.G.; Bisch, P.M.; Weissmuller, G. Microscopia de Varredura por Sonda: Aspectos práticos e suas aplicações na nanociência e nanotecnologia. In: Durán, N.; Marais, C.; Mattoso, L.H.C. **Nanotecnologia: Introdução, preparação e caracterização de nanomateriais e exemplos de aplicação**. São Paulo: Artliber, 2006. Cap. 6, p. 111-139.
45. 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.**, v. 56, n. 7, p. 740-747, 2008.
46. Keyes, P.H. The infectious and transmissible nature of experimental dental caries. **Arch. Oral Biol.**, v. 1, p. 304-320, 1960.
47. 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.**, v. 52, n. 4, p. 1446-1453, 2008.
48. Klaenhammer, T.R. Microbiological considerations in selection and preparation of lactobacillus strains for use as dietary adjuncts. **Journal Dairy Science**, v. 65, p. 1339-1349, 1982.
49. Leite, B.A. **Aderência bacteriana e formação de biofilme aos fios de dermossustentação facial**. 71 p. Dissertação (Mestrado) apresentada ao Programa de Pós- Graduação Interunidades em Bioengenharia da Universidade de São Paulo. São Carlos, 2008.
50. Lemire, J.A.; Harrison, J.J.; Turner, R.J. Antimicrobial activity of metals: mechanisms, molecular targets and applications. **Nat. Rev. Microbiol**, v. 11, p. 371-384, 2013.
51. Levine, R.S. Bases científicas da educação para saúde dental. In: Lindhe J. **Tratado de periodontia clínica**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1992. p. 252-259.

52. 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 Res.**, v. 42, p. 4 5 9 1 – 4 6 0 2, 2008.
53. Masouras, K.; Silikas, N.; Watts, D.C. Correlation of filler content and elastic properties of resin-composites. **Dent Mater.**, v.24, p. 932-939, 2008.
54. Melo, M.A.; Cheng, L.; Zhang, K.; Weir, M.D.; Rodrigues, L.K.; Xu, H.H. Novel dental adhesives containing nanoparticles of silver and amorphous calcium phosphate. **Dent. Mater.**, v. 29, n. 2, p. 199-210, 2013.
55. Montasser, A. & Golightly, D. Inductively Coupled Plasmas in Analytical Atomic Spectrometry. 2. ed. New York: Wiley-VCH, 1992.
56. Murray, P.R.; Baron, E.J.; Falen, M.A.; Tenover, F.C.; Tenover, R.H. **Manual of Clinical Microbiology**. 9. ed. Washington DC: ASM, 2007.
57. Neves, P.B.A.; Souza, C.W.O.; Pizzolitto, E.L. *In vitro* reduction of *Streptococcus mutans* biofilm on silver nanoparticle-modified resin composite. **Rev. Sul-Bras. Odontol.**, v. 11, n. 4, p. 368-376, 2014.
58. Oliscovicz, N.F. **Tratamento de superfície para dispositivos de Implantodontia com antimicrobiano nanoparticulado**. 196 p. Tese (Doutorado) apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Reabilitação Oral da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, na Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto, 2014.
59. 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.
60. Papadopoulos, T.; Sarafianou, A.; Hatzikyriakos, A. Colour stability of veneering composites after accelerated aging. **Eur. J. Dent.**, v. 4, n. 2, p. 137-142, 2010.
61. Parreira, P.S. Metodologia de EDXRF e aplicações com um sistema portátil. **Publicação Técnica do Laboratório de Física Nuclear Aplicada (LFNATEC), da Universidade Estadual de Londrina, ISSN 2178-4507**, v. 10, n. 1, p.1-16, 2006. Disponível em: <http://www.fisica.uel.br/gfna/metodoedxrf.pdf>. Acessado em: 8 de janeiro de 2013.

62. 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.**, v.4, n. 2, p. 186-191, 2007.
63. Perdigão, J.; Ritter, A. V. Adesão aos tecidos dentários In: Baratieri, L. N. **Odontologia restauradora: fundamentos e possibilidades**. 8. ed. São Paulo: Editora Santos, 2001. Cap. 4, p. 85-128.
64. 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. **Arch. Oral Biol.**, v. 53, p. 755-764, 2008.
65. Philips, R.W. Resinas para restauração. In: Anusavice, K.J. **Materiais Dentários**. 10. ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 1998. Cap.12, p. 161-177.
66. 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.
67. Pires-de-Souza, F.C.P.; Garcia, L.F.R.; Hamida, H.M.; Casemiro, L.A. Colour stability of composites subjected to accelerated aging after curing using either a halogen or a light emitting diode source. **Braz. Dent. J.**, v. 18, n. 2, p. 119-123, 2007.
68. 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.
69. Reis, Andréa Cândido. **Envelhecimento artificial acelerado de resinas compostas – Análise da superfície e estudo da alteração de cor por meio do Colorímetro Espectrofotométrico**. 99 p.
70. Souza, T.M.P.A.S.; Freires, I.A.; Lima, D.M.B.; Jovito, V.C.; Almeida, L.F.D.; Castro, R.D. Aderência in vitro de *Streptococcus mutans* à Superfície de Braquetes Ortodônticos Metálicos e de Policarbonato. **Rev Bras. Ciênc. Saúde**, v. 17 n. 1, p. 91-96, 2013.
71. Tese (Doutorado) apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Reabilitação Oral da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, na Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto, 2003.

72. Roe, D.; Karandikar, B.; Bonn-Savage, N.; Gibbins, B.; Roulet, J.B. Antimicrobial surface functionalization of plastic catheters by silver nanoparticles. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 61, n. 4, p. 869-876, 2008.
73. Rogosa, M.; Mitchell, J.A.; Wiseman R.F. A selective medium for the isolation and enumeration of oral lactobacilli. **J. Dent. Res.**, v. 30, p. 682-689, 1951.
74. Rosa, A.T. **Caracterização por Microscopia Eletrônica de Transmissão e Microanálise de Raios-x de filmes dielétricos crescidos termicamente sobre Carbetto de Silício.** Monografia (Especialização) apresentada no Instituto de Química da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2008.
75. Salata, O.V. Applications of nanoparticles in biology and medicine. **J. Nanobiotechnol.**, v. 2, n. 3, p. 1-6, 2004.
76. Samuel, U., Guggenbichler, J.P. Prevention of Catheter-Related Infections: The Potencial of a New Nano-Silver Impregnated Catheter. **Int. J. Antimicrobial Agents**, v. 23S1, p. S75-S78, 2004.
77. Sanders, B.J.; Gregory, R.L.; Moore, K.; Avery, D.R. Antibacterial and physical properties of resin modified glass-ionomers combined with chlohexidine. **J. Oral Rehabil.**, v. 29, n. 6, p. 553-558, 2002.
78. Sanpui, P.; Murugadoss, A.; Durga, P. V.; Ghosh, S. Chathopadhyay, A. The antibacterial properties of a novel chitosanAg-nanoparticle composite. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 124, p. 142-146, 2008.
79. Santos, PPA; Iglesias, D.P.P.; Souza, E.L.; Freitas, R.A.; Galvão, H.C. Saliva: Métodos Atuais para Coleta e Obtenção da Amostra. **Rev. Fac. Odontol. Porto Alegre**, v. 48, n. 1/3, p. 95-98, 2007.
80. Sayes, C.M.; Fortner, J.D.; Guo, W.; Lyon, D.; Boyd A.M.; Ausman, K.D.; Tao, Y.J. et al. The differential cytotoxicity of water-soluble fullerenes. **Nano Lett.**, v. 10, n. 4, p. 1881-1887, 2004.
81. Sehgal, V.; Shetty, V.S.; Mogra, S.; Bhat, G.; Eipe, M.; Jacob, S.; Prabu, L. Evaluation of antimicrobial and physical properties of orthodontic composite resin modified by addition of antimicrobial agents--an in-vitro study. **Am J Orthod Dentofacial Orthop.**, v. 131, n. 4, p. 525-529, 2007.

82. Shimadzu. Energy Dispersive X-ray Fluorescence Spectrometer. Apostila Shimadzu on line, p.1-20. Disponível em: [http://www.shimadzu.com.br/analitica/produtos/elemental/raios\\_x/eds/catalogos/edx.pdf](http://www.shimadzu.com.br/analitica/produtos/elemental/raios_x/eds/catalogos/edx.pdf) Acessado em: 9 de janeiro de 2013.
83. Skoog, D.A.; Holler, F.L.; Nieman, T.A. Principles of instrumental analysis. 5.ed. Philadelphia: Saunders College Publishing, 1998.
84. Stober, T.; Gilde, H.; Lenz, P. Color stability of highly filled composite resin materials for facings. **Dent. Mater.**, v. 17, p. 87-94, 2001.
85. Swift, E. J. Effect of mixing time on fluoride release from a glass ionomer cement. **Amer. J. Dent.**, v. 1, p. 132-134, 1988.
86. Cate J.M. Biofilms, a new approach to the microbiology of dental plaque. **Odontology**, v. 94, p. 1-9, 2006.
87. 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.**, v. 18, n. 8, p. 343-346, 2009.
88. Vermelho, A.B.; Pereira, A.F.; Coelho, R.R.; Souto-Pradón, T. **Práticas de Microbiologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1994. 239 p.
89. Wolf, H.F.; Hassel, T.M. **Manual de Periodontia: fundamentos, diagnóstico, prevenção e tratamento**. São Paulo: Artmed, 2008. 340 p.
90. 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.
91. Zhao, G.J. **Caracterização de amostras rugosas por microscopia de força atômica**. 32 p. Tese (Doutorado) apresentada na Faculdade de Engenharia Elétrica e de Computação da Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 2003.
92. Zickert, I. et al. Streptococcus mutans, lactobacilli and dental health in 13-14 years old Swedish children. **Comm. Dent. Oral Epidemiol.**, v. 10, p. 71-81, 1982.

## Apêndice 1: Características das resinas compostas fotopolimerizáveis e das nanopartículas de prata

### I - Características das resinas compostas fotopolimerizáveis

As resinas compostas fotopolimerizáveis (ou fotoativadas), usadas em Odontologia para confecção de restaurações dentárias adesivas, são compósitos formados por 3 porções básicas (*Perdigão & Ritter, 2001*):

- **Matriz de resina (a porção orgânica):** o principal monômero desta porção é o Bis-GMA, altamente viscoso. A utilização de um diluente é essencial para permitir a incorporação de cargas (partículas) na matriz e proporcionar a consistência adequada da pasta final. O diluente geralmente utilizado é o monômero TEDGMA (25% em peso).
- **Partículas inorgânicas (a porção inorgânica):** são adicionadas para melhorar as propriedades do material. São exemplos de cargas o quartzo moído ou sílica coloidal. Algumas cargas também são empregadas para dar cor às resinas, que são disponíveis em várias tonalidades de cor, incluindo tons de branco, amarelo e cinza.
- **Agente de união:** os agentes empregados geralmente são os organosilanos, que contém grupos silânicos, os quais podem aderir aos silanóis na superfície das cargas, devido à formação de uma união silânica (Si-O-Si). Os grupos metacrilato dos compostos organosilanos formam uma união covalente com a matriz da resina quando ela é polimerizada, consolidando-se desta forma o processo de união dos componentes dentro do material.

As resinas compostas usadas atualmente nos consultórios odontológicos são as ativadas por luz visível (azul), sendo possível polimerizar profundidades com até 2 mm de espessura. Assim, são colocadas em incrementos de aproximadamente 2 mm nas cavidades dentárias profundas. As resinas compostas fotopolimerizáveis são fornecidas em pasta única, contida em uma seringa. Na pasta, além dos componentes descritos acima, está presente um composto químico iniciador (que libera os radicais livres) e uma amina ativadora. Quando exposto à luz, dentro da faixa azul do espectro de luz visível, o iniciador se excita e interage com a amina, formando radicais livres, os quais iniciam uma polimerização por adição. O fotoiniciador geralmente é a

canforoquinona (0,2% em peso), que absorve luz num comprimento de onda de aproximadamente 468 nm. O ativador geralmente é o dimetilaminoetilmetacrilato (0,15% em peso) (Phillips, 1998).

As resinas compostas fotopolimerizáveis são materiais restauradores adesivos, são condensadas nas cavidades dentárias, em incrementos, após realização do ataque ácido, aplicação do *primer* e aplicação do adesivo resinoso (sendo este também fotopolimerizável), uma sequência de procedimentos que proporciona a adesão da resina ao dente (esmalte e dentina), e não apenas a sua retenção mecânica, como ocorre com outros materiais restauradores dentários.

## **II - Especificações da marca comercial da resina usada no trabalho**

A resina composta fotopolimerizável *Herculite Classic* é um compósito restaurador micro-híbrido polimerizável por luz, radiopaco, indicado para restaurações de cavidades em dentes anteriores e posteriores. A porção orgânica da resina corresponde ao Bisfenol-A-Glicidilo Metacrilato, BisGMA (o monômero predominante) e tri-Etilenoglicol-Dimetacrilato, TEGDMA (que atua como diluente). As cargas inorgânicas presentes nesta resina são vidro de borossilicato de alumínio e sílica coloidal (SiO<sub>2</sub>). O conteúdo total destas cargas é de 79% em peso, ou 59% em volume, e as partículas possuem tamanho médio de 0,6 µm. Organossilanos estão presentes como agentes de união. Há também neste compósito a canforoquinona (fotoiniciador), dimetilaminoetilmetacrilato (uma amina ativadora) e pigmentos de óxido de ferro.

## **III - Características das nanopartículas de prata produzidas pela Nanox<sup>®</sup> Tecnologia S.A. (São Carlos – SP, Brasil)**

As partículas empregadas nos experimentos descritos nessa tese são constituídas por uma matriz de óxido, com sílica amorfa (SiO<sub>2</sub>), na qual o metal, a prata, fica adsorvida. O diâmetro médio destas partículas é de 12 µm para a sílica, e de 50 nm para a prata, que fica adsorvida nela.

## Apêndice 2: Composição dos meios de cultura bacterianos e da saliva artificial

### I - Composição do caldo MRS:

- Peptona - 10 g
- Extrato de Carne - 10 g
- Extrato de Levedura - 5 g
- Dextrose - 20 g
- Polisorbato 80 - 1 g
- Citrato de Amônio ( $C_6H_{14}N_2O_7$ ) - 2 g
- Acetato de Sódio ( $C_2H_3NaO_2$ ) - 5 g
- Sulfato de Magnésio ( $MgSO_4$ ) - 0,1 g
- Sulfato de Manganês ( $MnSO_4$ ) - 0,05 g
- Fosfato Dipotássico ( $K_2HPO_4$ ) - 2 g
- Água destilada – 1000 mL

O caldo MRS é baseado na formulação de deMan, Rogosa e Sharpe (*deMan et al.*, 1960), e o pH final a 25°C é correspondente a  $6,5 \pm 2$ .

Para o preparo de caldo MRS modificado com sacarose foi acrescentado 20% de sacarose, na forma de açúcar de cozinha refinado (200 g para cada 1000 mL de água destilada).

### II - Composição do ágar MRS:

- Ágar – 12 g
- Protease Peptona – 10 g
- Extrato de Carne – 10 g
- Extrato de Levedura – 5 g
- Dextrose – 20 g
- Polisorbato – 1 g
- Citrato de Amônio ( $C_6H_{14}N_2O_7$ ) – 2 g
- Acetato de Sódio ( $C_2H_3NaO_2$ ) – 5 g
- Sulfato de Magnésio ( $MgSO_4$ ) – 0,1 g

- Sulfato de Manganês ( $\text{MnSO}_4$ ) – 0,05 g
- Fosfato Dipotássico ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ) – 2 g
- Água destilada – 1000 mL

O ágar MRS também é baseado na formulação de deMan, Rogosa e Sharpe (*deMan et al., 1960*), e o pH final a 25°C corresponde a  $6,5 \pm 2$ .

Para o preparo de ágar MRS modificado com sacarose foi acrescentado 20% de sacarose, na forma de açúcar de cozinha refinado (200 g para cada 1000 mL de água destilada).

### **III - Composição do PBS (Solução Salina Tamponada Fosfatada):**

- Cloreto de sódio ( $\text{NaCl}$ ) – 8 g
- Cloreto de Potássio ( $\text{KCl}$ ) – 0,2 g
- Hidrogenofosfato dissódico ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) – 1,15 g
- Diidrogenofosfato de Potássio ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) – 0,2 g
- Água destilada – 1000 mL
- pH = 7,4

### **IV - Composição da saliva artificial:**

- Cloreto de potássio: 0,96 g
- Cloreto de sódio: 0,67 g
- Cloreto de Magnésio: 0,04 g
- Fosfato de Potássio: 0,27 g
- Cloreto de Cálcio: 0,12 g
- Metilparabeno (Nipagin): 0,01 g
- Propilparabeno (Nipazol): 0,1 g
- Carboxil Metil Celulose: 8 g
- Sorbitol: 24 g
- Água purificada q.s.p.: 1000 mL
- pH = 6,9

**Anexo 1: Certificados emitidos pelo CCDM com a demonstração dos resultados do ensaio de determinação do teor de prata em saliva artificial**



CERTIFICADO CQ13-000142

Cliente: José Augusto Marcondes Agnelli  
 Contato: José Augusto Marcondes Agnelli  
 Endereço: Rodovia Washington Luiz, Km 235  
 Cidade: São Carlos Estado: SP CEP: 13565-905  
 OS: 5964/7480-0 (Comp.1)  
 Data de recebimento da(s) amostra(s): 06/08/2013  
 Período de realização: 07/08/2013 – 19/08/2013

## ANÁLISE QUÍMICA EM AMOSTRAS DE SOLUÇÕES

### 1 – OBJETIVO

Determinação dos teores percentuais de prata em três amostras de soluções.

### 2 – CONSIDERAÇÕES INICIAIS

Foram recebidas para análise no CCDM três amostras de soluções, cujas identificações estão apresentadas na Tabela 1.

*Tabela 1 – Identificações das amostras.*

Identificação do CCDM	Identificação do Cliente
CPC130184	Amostra de solução 01
CPC130185	Amostra de solução 02
CPC130186	Amostra de solução 03

### 3 – METODOLOGIA

Os elementos de interesse foram determinados por espectrometria de emissão ótica com plasma induzido (ICP OES), em equipamento VISTA da marca Varian.

### 4 – RESULTADOS

Os resultados obtidos estão expressos em miligrama por litro na Tabela 2

*Tabela 2 – Resultados obtidos das análises químicas (mg.L<sup>-1</sup>).*

Amostra	Ag *
CPC130184	< 0,02, se presente
CPC130185	< 0,02, se presente
CPC130186	< 0,02, se presente

\* não foi detectada presença de prata nas amostras, indicando que, se presente, o elemento químico encontra-se abaixo do limite de detecção.

São Carlos, 19 de agosto de 2013.



**RODRIGO DA SILVA**  
 Técnico em Química  
 silva@ccdm.ufscar.br



**IVAN MOROZ**  
 Engenheiro de Materiais  
 Pesquisador  
 ivanm@ccdm.ufscar.br

#### Cláusulas de responsabilidade:

- A amostragem relativa a este documento é de responsabilidade do cliente e estes resultados referem-se apenas às amostras ensaiadas (não extensivo a outras amostras);
- As amostras serão mantidas de acordo com o estabelecido no orçamento/contrato. Em caso de ensaios destrutivos serão mantidos somente os registros do serviço. Quando aplicável, a contra prova da amostra será mantida pelo prazo máximo de 1 ano, após a emissão deste documento. Os registros deste serviço serão mantidos por 5 anos.
- A reprodução deste documento deve ser realizada na íntegra. O laboratório não é responsável em caso de interpretação ou uso indevido que se possa fazer deste documento.

FIM DO DOCUMENTO



Cliente: José Augusto Marcondes Agnelli  
 Contato: José Augusto Marcondes Agnelli  
 Endereço: Rodovia Washington Luiz, Km 235  
 Cidade: São Carlos Estado: SP CEP: 13565-905  
 OS: 6362/7886-0  
 Data de recebimento da(s) amostra(s): 14/10/2013  
 Período de realização: 02/12/2013 – 05/12/2013

## ANÁLISE QUÍMICA EM AMOSTRAS DE SOLUÇÕES

### 1 – OBJETIVO

Determinação dos teores percentuais de prata em três amostras de soluções.

### 2 – CONSIDERAÇÕES INICIAIS

Foram recebidas para análise no CCDM três amostras de soluções, cujas identificações estão apresentadas na Tabela 1.

*Tabela 1 – Identificações das amostras.*

Identificação do CCDM	Identificação do Cliente
MET131247	Amostra 1
MET131248	Amostra 2
MET131249	Amostra 3

### 3 – METODOLOGIA

Os elementos de interesse foram determinados por espectrometria de emissão ótica com plasma induzido (ICP OES), em equipamento VISTA da marca Varian.

### 4 – RESULTADOS

Os resultados obtidos estão expressos em miligrama por litro na Tabela 2.

*Tabela 2 – Resultados obtidos das análises químicas (mg.L<sup>-1</sup>).*

Amostra	Ag
CPC131247	< 0,015, se presente
CPC131248	< 0,015, se presente
CPC131249	< 0,015, se presente

\* não foi detectada presença de prata nas amostras, indicando que, se presente, o elemento químico encontra-se abaixo do limite de detecção.

São Carlos, 05 de dezembro de 2013.



**RODRIGO DA SILVA**  
 Técnico em Química  
 silva@ccdm.ufscar.br



**ANNA ELISA BAREOSA DOS SANTOS**  
 Supervisora de laboratório  
 anna@ccdm.ufscar.br

**Cláusulas de responsabilidade:**

- A amostragem relativa a este documento é de responsabilidade do cliente e estes resultados referem-se apenas às amostras ensaiadas (não extensivo a outras amostras);
- As amostras serão mantidas de acordo com o estabelecido no orçamento/contrato. Em caso de ensaios destrutivos serão mantidos somente os registros do serviço. Quando aplicável, a contra prova da amostra será mantida pelo prazo máximo de 1 ano, após a emissão deste documento. Os registros deste serviço serão mantidos por 5 anos.
- A reprodução deste documento deve ser realizada na íntegra. O laboratório não é responsável em caso de interpretação ou uso indevido que se possa fazer deste documento.

----- FIM DO DOCUMENTO -----



CERTIFICADO CQ14-000035

Cliente: José Augusto Marcondes Agnelli  
 Contato: José Augusto Marcondes Agnelli  
 Endereço: Rodovia Washington Luiz, Km 235  
 Cidade: São Carlos Estado: SP CEP: 13565-905  
 OS: 6614/8295-0  
 Data de recebimento da(s) amostra(s): 15/01/2014  
 Período de realização: 17/01/2014 – 27/01/2014

## ANÁLISE QUÍMICA EM AMOSTRAS DE SOLUÇÕES

### 1 – OBJETIVO

Determinação dos teores percentuais de prata em três amostras de soluções.

### 2 – CONSIDERAÇÕES INICIAIS

Foram recebidas para análise no CCDM três amostras de soluções, cujas identificações estão apresentadas na Tabela 1.

*Tabela 1 – Identificações das amostras.*

Identificação do CCDM	Identificação do Cliente
MET140073	Amostra 1
MET140074	Amostra 2
MET140075	Amostra 3

### 3 – METODOLOGIA

Os elementos de interesse foram determinados por espectrometria de emissão ótica com plasma induzido (ICP OES), em equipamento VISTA da marca Varian.

### 4 – RESULTADOS

Os resultados obtidos estão expressos em miligrama por litro na Tabela 2.

*Tabela 2 – Resultados obtidos das análises químicas (mg.L<sup>-1</sup>).*

Amostra	Ag
MET140073	< 0,010, se presente
MET140074	< 0,010, se presente
MET140075	< 0,010, se presente

\* não foi detectada presença de prata nas amostras, indicando que, se presente, o elemento químico encontra-se abaixo do limite de detecção.

São Carlos, 27 de Janeiro de 2014.



**RODRIGO DA SILVA**  
 Técnico em Química  
 silva@ccdm.ufscar.br



**ANNA ELISA BARBOSA DOS SANTOS**  
 Supervisora de laboratório  
 anna@ccdm.ufscar.br

**Cláusulas de responsabilidade:**

- A amostragem relativa a este documento é de responsabilidade do cliente e estes resultados referem-se apenas às amostras ensaiadas (não extensivo a outras amostras);
- As amostras serão mantidas de acordo com o estabelecido no orçamento/contrato. Em caso de ensaios destrutivos serão mantidos somente os registros do serviço. Quando aplicável, a contra prova da amostra será mantida pelo prazo máximo de 1 ano, após a emissão deste documento. Os registros deste serviço serão mantidos por 5 anos.
- A reprodução deste documento deve ser realizada na íntegra. O laboratório não é responsável em caso de interpretação ou uso indevido que se possa fazer deste documento.

FIM DO DOCUMENTO