

PMMA ADITIVADO COM PRATA EM PRÓTESES ORAIS: FORMULAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO, ANÁLISE FÍSICO-QUÍMICA E BIOLÓGICA

VICTORIA BURMANN DA SILVA GUIMARÃES¹; JOSÉ ARTUR RAMOS DA SILVA², MARINA DA ROSA KAIZER³, ADRIANA FERNANDES DA SILVA⁴, RAFAEL GUERRA LUND⁵, SERGIO DA SILVA CAVA⁶

¹Universidade Federal de Pelotas – victoryabs@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas - artur2ramos@gmail.com

³University of New York – marinakaizer@gmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas – adrisilvapiva@gmail.com

⁵Universidade Federal de Pelotas - rafael.lund@gmail.com

⁶Universidade Federal de Pelotas - sergiocava@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

Soluções coloidais de metais como prata e ouro são sistemas em nano escala, particularmente interessantes, devido à variedade de métodos com que podem ser preparadas e modificadas quimicamente (JIN et al., 2016). Em um contexto mais atual, as nanopartículas de prata vêm sendo utilizadas em medicina e odontologia devido ao seu potencial antibacteriano e antifúngico (SHAHVERDI et al., 2007; ACOSTA et al., 2012; CHLADEK et al, 2012; MAGALHÃES et al, 2012; NAKKALA et al., 2017). Tanto nanopartículas de sais de prata como de prata metálica apresentam atividade antimicrobiana (DURÁN et al., 2016). No entanto, é importante considerar a estabilidade termodinâmica destas nanopartículas, que são susceptíveis a transformações químicas por exposição à diferentes meios, possivelmente alterando suas propriedades físico-químicas, atividade antimicrobiana e potencialmente toxicidade (DE LIMA et al., 2012; LEVARD et al., 2012; REINSCH et al., 2012).

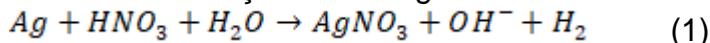
Usuários de próteses removíveis mal adaptadas ou mal higienizadas, ou ainda pacientes com deficiência imunológica são grupos de risco para o desenvolvimento de doenças bucais, como a cárie e a candidíase oral. Sendo assim, o objetivo deste estudo foi descrever um método simplificado de produção de nanopartículas de prata por reciclagem. As nanopartículas foram então caracterizadas química e fisicamente, e empregadas na formulação de um compósito à base de PMMA aditivado com prata nanoparticulada para aplicação como filme antibacteriano e antifúngico em bases de próteses removíveis totais ou parciais.

2. METODOLOGIA

2.1. Preparação da prata para a dissolução em HNO₃

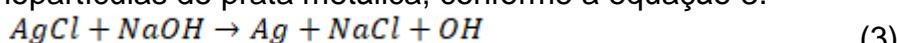
Fundi-se 5g de prata 99,9% granulada. Após laminação, cortou-se na forma de lâminas com dimensões de 5x5mm e 0,03mm de espessura.

Estas lâminas foram colocadas em um becker de 500mL com ácido nítrico, em uma relação em peso HNO₃/Ag de 10:1, e água fervente, durante 2h. A equação 1 ilustra a reação HNO₃/Ag.



Em seguida, adicionou-se NaCl, em uma relação em peso NaCl/Ag de 50:1, resultando em AgCl (equação 2). $AgNO_3 + NaCl \rightarrow NaN_3 + AgCl \quad (2)$

Adicionou-se NaOH na relação 10:1 NaOH/Ag. Como resultado, obtém-se as nanopartículas de prata metálica, conforme a equação 3.



Por último, esta prata nanoparticulada é submetida a secagem a 50°C.

2.2. Caracterização das nanopartículas de prata

As partículas de prata foram caracterizadas, quanto às suas fases cristalina e tamanho médio do cristalito por difração de raios-X (DRX), pelo método de pó.

A morfologia e composição elementar das nanopartículas foi avaliada em microscópio eletrônico de varredura e microscópio eletrônico de transmissão.

2.3. Confecção dos compósitos PMMA+prata

Para verificar os potenciais efeitos antibacteriano, antifúngico e citotóxico do compósito aditivado com nanopartículas de prata, foram utilizadas cinco concentrações de prata em PMMA (polimetilmacrilato): 5%, 10%, 15%, 20% e 25%.

2.4. Avaliação da alteração de cor da base de prótese após deposição de filme fino de PMMA+prata

Acrílico rosa foi utilizado para confeccionar espécimes simulando a base da prótese (10×10×3mm), enquanto acrílico translúcido foi utilizado para o preparo dos filmes finos (0.1mm de espessura) aditivados com prata.

As coordenadas de cor no sistema CIEL*a*b* foram avaliadas utilizando-se um espectrofotômetro. Os espécimes foram medidos com o filme de PMMA+prata posicionado sobre um fundo padrão cinza ($L^*=50$, $a^*=0$, $b^*=0$). A alteração de cor causada pelo filme PMMA+prata foi avaliada de acordo com a equação

$$\text{CIEDE2000: } \Delta E_{00} = \left[\left(\frac{\Delta L'}{K_L S_L} \right)^2 + \left(\frac{\Delta C'}{K_C S_C} \right)^2 + \left(\frac{\Delta H'}{K_H S_H} \right)^2 + R_T \left(\frac{\Delta C'}{K_C S_C} \right) \left(\frac{\Delta H'}{K_H S_H} \right) \right]^{\frac{1}{2}} \quad (4)$$

Na qual $\Delta L'$, $\Delta C'$ e $\Delta H'$ são as diferenças em valor, croma e matiz para um par de espécimes com filme translúcido (controle) e com filme de PMMA+prata. R_T é um fator de correção para a interação entre croma e matiz na região do azul. S_L , S_C e S_H ajustam a diferença total de cor para variação na localização do par de cores em L' , a' e b' . K_L , K_C e K_H são parâmetros de correção para as condições experimentais.

2.5. Teste antimicrobiano

100 μ L de inóculo de *Streptococcus mutans* (UA159) foram adicionados a um tubo estéril contendo 9mL de LMW + 1mL de glicose, e incubados por 18h em estufa de CO₂. Após este período, 10 μ L da mistura foram plaqueados em ágar sangue e incubados por 24h em estufa de CO₂. A partir do crescimento registrado na placa, foram coletadas colônias isoladas e transferidas para um tubo estéril com 9mL de LMW + 1mL de glicose e novamente incubadas por 18h em estufa de CO₂.

100 μ L de starter foram transferidos para um tubo contendo 40,5mL de meio LMW e 4,5mL de glicose. 2mL dessa mistura foram transferidos para cada poço de uma placa de poços. Um disco de PMMA+prata foi inserido em cada poço, e a placa foi então incubada em estufa de CO₂ por 24h. Os discos com biofilme formado em 72h, foram transferidos para um eppendorf com 1mL de solução de NaCl 0,9% (salina). Foi então realizada sonicação com potência de 30W, amplitude de 5%, com 3 pulsos de 10s cada, para dispensar todo o biofilme na solução salina e, a partir disso, foram realizadas diluições seriadas dos suspensos de biofilme, obtendo-se assim diluições de 10x (1), 100x (2), 1000x (3), 10000x (4), 100000x (5) e 1000000x (6). As amostras foram plaqueadas em meio ágar BHI, onde foram colocadas 3 alíquotas (20 μ L) de cada diluição. As placas foram então incubadas a 37°C, em ambiente de 10% de CO₂ por 24h, simulando as condições orais de temperatura e pressão de CO₂. Após o período de incubação, foi realizada a contagem das Unidades Formadoras de Colônias (UFC) de *S. mutans*.

Do mesmo eppendorf com suspenso de biofilme em solução salina, foram retirados 300 μ L para outro eppendorf pré-pesado e codificado. A solução foi

centrifugada por 5min, 10000g a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o tubo com o precipitado foi levado ao dessecador por 24-48h com pentóxido de fosforo. Após esse período, o eppendorf foi novamente pesado.

Aliquotas de *Candida albicans* (ATCC 62342) foram depositadas em placas de micro-poços sobre discos de PMMA+prata. Os biofilmes foram crescidos por 24h, o meio de cultura foi caldo sabouraud. Após 24h, os discos foram transferidos para eppendorfs com 1ml de salina estéril, e então sonicados conforme descrito acima. Em seguida, as suspensões de biofilme foram diluídas serialmente para contagem de microrganismos. As suspensões foram diluídas em solução salina estéril em séries de até 1:10⁻⁷ e imediatamente inoculadas em duplicata no meio de cultura ágar sabouraud. A obtenção do peso seco foi conduzida conforme o protocolo previamente descrito.

2.6. Ensaio de citotoxicidade (ensaio MTT)

O ensaio do brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT) foi utilizado para avaliar a função metabólica celular pela atividade da desidrogenase mitocondrial. Fibroblastos L929 (20.000/poço) foram mantidos em DMEM em placas de 96 poços durante 24h. Após a incubação, o meio foi removido e os diferentes testes foram realizados como descrito abaixo. Além dos grupos descritos na Tabela 1, um controle interno foi investigado, contendo apenas células de fibroblastos em DMEM, incubado por 24h sobre as células plaqueadas.

Após esse período, 180mL de DMEM foram adicionados a 20mL de solução de MTT (5mg de MTT/mL de PBS) e colocados em cada poço. Após 24h de incubação a 37°C no escuro, o precipitado de formazano azul foi extraído da mitocôndria usando 200IL/poço de dimetilsulfóxido (DMSO) em um agitador a 150rpm por 5min. A absorção foi determinada usando um espectrofotômetro em um comprimento de onda de 540nm. Foram preparadas quatro amostras para cada grupo em ambos os testes e o ensaio de toxicidade foi repetido pelo menos duas vezes.

2.7. Análise estatística

Diferenças entre grupos, para alteração de cor, efeitos microbiológicos e citotóxicos, foram investigadas por análise de variância (ANOVA) de uma via. Transformação em ranques foi utilizada quando os dados foram não paramétricos. O teste Student-Newman-Keuls foi utilizado para as comparações múltiplas. O nível de significância foi estabelecido em 5%.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com essa pesquisa sintetizou-se prata metálica nanoparticulada com baixo custo operacional e material. Desenvolveu-se um material compósito à base de PMMA aditivado com prata nanoparticulada, para ser utilizado em próteses dentais, comprovando-se suas propriedades antibacterianas, antifúngicas e citocompatibilidade, cujos objetivos primordiais são: prevenção e tratamento das doenças bucais comuns em usuários de próteses dentais, sem as contra indicações usualmente decorrentes dos medicamentos convencionais. Conforme análise do difratograma, detectou-se a presença de prata metálica (41%) e de AgCl (59%). O tamanho médio do cristalito calculado foi Ag = 30.65nm e AgCl = 67.44nm.

Conforme análise de EDX a composição química elementar do pó de prata demonstra que os elementos químicos majoritários são Ag, Cl e O, que somam 96,1%. Outros elementos podem ser considerados impurezas. Este resultado está de acordo com DRX, que detectou AgCl e prata metálica. Pode-se admitir que o oxigênio está em solução sólida tanto na prata metálica quanto no AgCl.

O cálculo da diferença de cor ($\Delta E00$) entre o grupo controle (0% Ag) e cada um dos grupos PMMA+prata resultou nas seguintes médias (desvio padrão) de alteração de cor: 5% = 11,5 (1,1), 10% = 12,1 (1,2), 15% = 13,2 (1,4), 20% = 13,3 (1,0), 25% = 13,2 (1,1). Os diferentes percentuais de prata não resultaram em diferenças de alteração de cor entre os grupos. No entanto, o filme de PMMA+prata causa alteração de cor perceptível.

Os resultados antifúngicos demonstraram que não houve diferença estatística entre os grupos testados contra *C. albicans*. No entanto, os compósitos de PMMA + Ag nas concentrações de 5, 10 e 25% mostraram redução na formação do biofilme de *Streptococcus mutans*. O nanopó de prata produzido não apresenta efeitos citotóxicos até a concentração de 20%. A adição de 25% de nanopartículas de prata ao PMMA resulta em viabilidade celular menor que 70%, o que é considerado citotóxico segundo norma ISO 10993:5.

4. CONCLUSÕES

Com base nas metodologias empregadas, pode-se concluir que os compósitos PMMA+Ag 5% e PMMA+10% foram os que apresentaram potencial antibacteriano e citocompatibilidade.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- JIN, R.C.; ZENG, C.J.; ZHOU, M.; CHEN, Y.X. Atomically Precise Colloidal Metal Nanoclusters and Nanoparticles: Fundamentals and Opportunities. **Chemical Reviews**, v. 116, n. 18, p. 10346-10413, 2016.
- SHAHVERDI, A.R.; FAKHIMI, A.; SHAHVERDI, H.R.; MINAIAN, S. Synthesis and effect of silver nanoparticles on the antibacterial activity of different antibiotics against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. **Nanomedicine:Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 3, n. 2, p. 168-171, 2007.
- NAKKALA, J.R.; MATA, R.; SADRAS, S.R. Green synthesized nano silver: Synthesis, physicochemical profiling, antibacterial, anticancer activities and biological in vivo toxicity. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 499, p. 33-45, 2017.
- MAGALHÃES, A.P.R.; SANTOS, L.B.; LOPES, L.G; et al. Nanosilver application in dental cements. **ISRN Nanotechnology**, v. 2012, p. 1-6, 2012.
- CHLADEK, G.; BARSZCZEWSKA-RYBAREK, I.; LUKASZCZYK, J. Developing the procedure of modifying the denture soft liner by silver nanoparticles. **Acta of Bioengineering and Biomechanics**, v. 14, n.1, p. 23-29, 2012.
- ACOSTA-TORRES, L.S.; MENDIETA, I.; NUÑEZ-ANITA, R.E.; et al. Cytocompatible antifungal acrylic resin containing silver nanoparticles for dentures. **International Journal of Nanomedicine**, v. 7, p. 4777-4786, 2012.
- DURÁN, N.; NAKAZATO, G.; SEABRA, A.B. Antimicrobial activity of biogenic silver nanoparticles, and silver chloride nanoparticles: an overview and comments. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, p. 6555-6570, 2016.
- LEVARD, C.; HOTZE, E.M.; LOWRY, G.V.; BROWN, J.R. GR, Environmental transformations of silver nanoparticles: impact on stability and toxicity. **Environmental Science & Technology**, v. 46, p. 6900-6914, 2012.
- REINSCH, B.C.; LEVARD, C.; LI, Z.; MA, R.; WISE, A.; GREGORY, K.B.; BROWN JR., G.R.; LOWRY, G.V. Sulfidation of silver nanoparticles decreases *Escherichia coli* growth inhibition, **Environmental Science & Technology**, v. 46, p. 6992-7000, 2012.
- DE LIMA, R.; SEABRA, A.B.; DURÁN, N. Silver nanoparticles: a brief review of cytotoxicity and genotoxicity of chemically and biogenically synthesized nanoparticles. **Journal of Applied Toxicology**, v. 32, p. 867-879, 2012.