# JULIANA DIAS AGUIAR

Avaliação do efeito antibacteriano e da citotoxicidade de um adesivo com nanopartículas de prata e sua resistência de união à dentina associado ao uso de nanopartículas de hidroxiapatita

> São Paulo 2019

# JULIANA DIAS AGUIAR

Avaliação do efeito antibacteriano e da citotoxicidade de um adesivo com nanopartículas de prata e sua resistência de união à dentina associado ao uso de nanopartículas de hidroxiapatita

## Versão Corrigida

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, pelo Programa de Pós-Graduação em Odontologia (Biomateriais e Biologia oral) para obter o título de Doutor em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Igor Studart Medeiros

Co-orientadora: Profa. Dra. Ericka Tavares Pinheiro

São Paulo 2019 Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Catalogação-na-Publicação Serviço de Documentação Odontológica Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

Aguiar, Juliana Dias.

Avaliação do efeito antibacteriano e da citotoxicidade de um adesivo com nanopartículas de prata e sua resistência de união à dentina associado ao uso de nanopartículas de hidroxiapatita / Juliana Dias Aguiar ; orientador Igor Studart Medeiros; coorientador Ericka Tavares Pinheiro. -- São Paulo, 2019. 145 p. : fig., tab. ; 30 cm.

Tese (Doutorado) -- Programa de Pós-Graduação em Odontologia. Área de Concentração: Biomateriais e Biologia Oral. -- Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

Versão corrigida

1. Adesivos dentinários. 2. Antibacterianos. 3. Resistência à tração. 4. Citotoxicidade imunológica. I. Medeiros, Igor Studart. II. Pinheiro, Ericka Tavares. III. Título.

Aguiar JD. Avaliação do efeito antibacteriano e da citotoxicidade de um adesivo com nanopartículas de prata e sua resistência de união à dentina associado ao uso de nanopartículas de hidroxiapatita. Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor pela Pós-graduação em Ciências.

Aprovado em: 31/01/2019

Banca Examinadora

Prof(a). Dr.Igor Studart Mdeiros (presidente).

Instituição: Universidade de São Paulo (USP), Faculdade de Odontologia, Departamento de Biomateriais e Biologia Oral.

Prof(a). Dr(a).Maristela Dutra Correa (membro).

Instituição: Universidade Paulista (UNIP), Faculdade de Odontologia, Departamento de Dentística. Julgamento: Aprovada.

Prof(a). Dr. Sandro Cordeiro Loretto (membro)

Instituição: Universidade Federal do Pará (UFPA), Faculdade de Odontologia, Departamento de Dentística. Julgamento: Aprovada.

Prof(a). Dr. Roberto Ruggiero Braga (membro).

Instituição: Universidade de São Paulo (USP), Faculdade de Odontologia, Departamento de Biomateriais e Biologia Oral. Julgamento: Aprovada.

Dedico este trabalho aos meus pais, pois através de seu amor, incentivo e suporte incondicionais, pude realizar este sonho. Hmo vocés!!!!

## AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus e a Nossa Senhora de Nazaré. Pois, através de sua infinita bondade, me deram proteção durante todos estes anos, além de forças para lutar e me agraciaram com inúmeras bênçãos.

Aos meus pais, Iracy e Plácido, os quais sempre me apoiaram para que eu corresse atrás dos meus sonhos, mandavam mensagens diariamente com palavras de apoio, fé e coragem para enfrentar os desafios impostos por esta jornada. Amo vocês!!!

Ao meu noivo, Luiz Fernando, que há quase 13 anos acompanha minha história de vida. Amor, obrigada por todo incentivo, por você ter abaraçado meus sonhos como se fossem seus, e por sua incessante disponibilidade em me ajudar no que fosse preciso. Não posso deixar de agradecer por ter vindo mais de 30 vezes a São Paulo, o que encurtou os mais de dois mil quilômetros que nos separavam fisicamente. Te amo!!!

À minha família por todo carinho e torcida positiva. Às minhas amigas, em especial Nathália Cabral e Renata Reis pelos 17 anos de amizade, as quais sempre se preocupavam comigo, resolviam meus problemas e compartilhavam minhas angústias, tristezas, decepções e davam forças para eu continuar.

Ao meu orientador, Igor Medeiros, o qual aceitou me orientar e viu naquela menina uma "luz no fim do túnel". Agradeço enormemente por toda paciência em momentos de tensão, por sua incessante disponibilidade, calma e racionalidade para encontrar soluções aos desafios, E por, verdadeiramente, se preocupar com o lado humano de cada aluno que orienta.

À minha co-orientadora, Ericka Pinheiro, pela paciência em ensinar e por disponibilizar horários que seriam de sua família para responder questionamentos e auxiliar no que fosse preciso. À profa. Mácia Marques, por sempre responder em tempo recorde e-mais, e por sua simpatia em ensinar a redigir um texto e explicar minunciosamente dúvidas que surgiram ao longo do trabalho.

Aos Profs. Sérgio Toma e Koiti Araki que deram início a este projeto, ofereceram várias sugestões e contribuições importantíssimas para realização deste trabalho. Agradeço, em especial, ao prof. Sérgio pela ajuda fundamental na síntese e caracterização das nanopartículas, pelas análises microscópicas da interface adesiva, e por tirar minhas dúvidas inúmeras vezes.

À profa. Maristela Dutra-Correa, por sua enorme simpatia e porque sempre esteve dispostal a ajudar no que fosse preciso. Agradeço também à profa. Ivana Suffredini pela sua valiosa contribuição na realização dos ensaios de difusão em ágar.

Aos professores e colegas do Departamento de Biomateriais, pelos ensinamentos e pela convivência saudável e harmônica durante todos estes anos.

Aos funcionários da FOUSP (dona Fran, Eli, Rosinha e Douglas) por serem sempre solícitos e cordiais. Ao Antônio, que foi um verdadeiro anjo durante todos estes anos, suas dicas, ensinamentos e suporte foram fundamentais nesta caminhada.

Aos amigos que a Pós-graduação me presentiou, Ines Villacis, Katherine Zurita, Marcelo Cascante e Sabrina Mascarenhas. Foi maravilhoso ter conhecido vocês, a jornada, certamente, foi muito mais leve e divertida. Pudemos compartilhar anseios, angústias, dores e alegrias. Levarei vocês no meu coração pelo resto da vida!

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Sperior (CAPES), pela concessão da bolsa de doutorado.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo auxílio financeiro referente ao meu projeto de doutorado (Projeto FAPESP 2017/10894-0).

"É geníal festejar o sucesso, porém, é maís ímportante aprender com as líções do fracasso". Bill Gates

#### RESUMO

Aguiar JD. Avaliação do efeito antibacteriano e da citotoxicidade de um adesivo com nanopartículas de prata e sua resistência de união à dentina associado ao uso de nanopartículas de hidroxiapatita [Tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2019. Versão Corrigida.

O desenvolvimento de adesivos bioativos mostra-se como uma alternativa interessante para agregar benefícios aos novos materiais. O objetivo do estudo foi sintetizar nanopartículas de prata (NAg) e de hidroxiapatita (NHA), avaliar sua influencia no efeito antibacteriano, citotoxicidade de um adesivo com NAg e sua resistência de união à dentina associado ao uso de NHA. As nanopartículas foram caracterizadas por fluorescência de raio x por reflexão total (TRXF), difratometria de raio x (DRX), microscopia eletrônica de transmissão (TEM) e espalhamento de luz visível (DLS). O sistema Scotchbond Multi-Purpose (SBMP) foi modificado com adição de 0,05% e 0,1% de NAg no primer e no bond. Molares humanos foram restaurados com o sistema adesivo modificado após o pre-tratamento da dentina com suspensão aquosa de NHA a 0,5% e 1% para realização do ensaio de resistência de união imediata (24h) e após 1 ano de envelhecimento. A interface adesiva foi caracterizada por Microscopia Confocal Raman (MCR). Para mensurar o efeito antibacteriano (S.mutans) do adesivo com NAg foi realizado o ensaio de difusão em ágar com template e contagem de Unidades Formadoras de Colônias (UFC). A citotoxicidade foi avaliada com uso de células tronco da polpa dentária (DPSCs) em contato com adesivos não polimerizados e polimerizados em diferentes concentrações de meio condicionado (0% 25%, 75% e 100%). Foram produzidas NAg esféricas, com estrutura cúbica de face centrada, e com 16 nm de diâmetro médio. As NHA exibiram estrutura prismática com tamanho médio de 79,4 nm. O adesivo com NAg e o tratamento da dentina com NHA não afetaram a resistência de união imediata ou após 1 ano de envelhecimento, e as interfaces adesivas mostraram-se íntegras. Os adesivos modificados por NAg exibiram citotoxicidade similar ao adesivo controle e maior efeito antibacteriano. Os adesivos com adição de NAg são promissores quanto à obtenção de um material bioativo antimicrobiano que não altera a resistência de união ou a biocompatibilidade.

Palavras-chave: Adesivos dentinários. Agentes Antibacterianos. Resistência à Tração. Citotoxicidade.

### ABSTRACT

Aguiar JD. Evaluation of antibacterial effect, cytotoxicity of adhesive modified by silver nanoparticles, and bond strength to dentin when associated to the use of hydroxyapatite nanoparticles [Thesis] São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2019. Versão Corrigida.

The development of bioactive adhesives is shown an interesting alternative to add benefits to the new materials. The aim of the study was to synthesize silver nanoparticles (NAg) and hydroxyapatite (NHA) and to evaluate their influence on the bond strength, antimicrobial effect, and biomaterials cytotoxicity. The nanoparticles were characterized by x-ray fluorescence by total reflection (TRXF), x-ray diffractometry (XRD), transmission electron microscopy (TEM) and visible light scattering (DLS). The Scotchbond Multi-Purpose system (SBMP) was modified with 0.05% and 0.1% silver in the primer and bond. Human molars were restored with the modified adhesive after pre-treatment of dentin with 0.5% and 1% NHA for the immediate bond strength test (24h), and after 1 year of aging. The adhesive interface was characterized by Confocal Raman Microscopy (MCR). To measure the antibacterial effect (S.mutans) of the adhesive with NAg, the agar diffusion assay with template was performed and counting of Colony Forming Units (UFC). In order to evaluate the cytotoxicity, dental pulp stem cells (DPSCs) were used in contact with unpolymerized and polymerized adhesives in different concentrations of conditioned medium (0% 25%, 75% and 100%). Spherical NAg, with a cubic face centered structure, and 16 nm in diameter were produced. The NHA exhibited a prismatic structure with approximately 79.4 nm. The adhesive with NAg and the treatment of dentin with NHA did not affect the bond strength immediately or after 1 year of aging, and the adhesive interfaces were shown to be intact. NAg-modified adhesives exhibited cytotoxicity similar to the control adhesive and higher antibacterial effect. The adhesives with NAg addition are promising in obtaining a bioactive antimicrobial material that does not alter the bond strength or the biocompatibility.

Keywords: Dentin adhesives. Antibacterial Agents. Tensile Strength. Cytotoxicity.

# LISTA DE FIGURAS

Figura 4.1 – Equipamento de Espalhamento de Luz Dinâmico (Malvem, Zetasizer NanoSizer90) utilizado para indicação do tamanho médio das partículas 
Figura 4.2 – Espectrômetro de fluorescência de raios X por reflexão total (TRXF) da Bruker, modelo S2 Picofox, utilizado para detecção da composição das amostras
Figura 4.3 – Difratômetro D2-phaser, Bruker, do Laboratório de Química Supramolecular e Nanotecnologia do Instituto de Química da USP46
Figura 4.4 – Corte oclusal para exposição da dentina superficial, observação do dente após remoção das cúspides, politriz, e padronização da camada de esfregaço
Figura 4.5 – Corte para confecção de palitos de dente-adesivo-resina composta49
Figura 4.6 – Ensaio de microtração. Palito (dente-adesivo-resina composta) fixado no Jig e posicionado na máquina de ensaio universal
Figura 4.7 – Padrões de fratura Erro! Indicador não definido.
Figura 4.8 – Microscópio confocal Raman52
Figura 4.9 – Desenho esquemático de placa de ágar com os halos de inibição
<ul> <li>Figura 4.9 – Desenho esquemático de placa de ágar com os halos de inibição</li></ul>
<ul> <li>Figura 4.9 – Desenho esquemático de placa de ágar com os halos de inibição</li></ul>
<ul> <li>Figura 4.9 – Desenho esquemático de placa de ágar com os halos de inibição</li></ul>
<ul> <li>Figura 4.9 – Desenho esquemático de placa de ágar com os halos de inibição</li></ul>
<ul> <li>Figura 4.9 – Desenho esquemático de placa de ágar com os halos de inibição</li></ul>

Figura 5.4 –	Resultado da difratometria de raio-X (DRX) das nanopartículas de hidroxiapatita (NHa)
Figura 5.5 –	Imagem de difratometria de raio-X (DRX) das nanopartículas de prata (NAg)
Figura 5.6–	Imagem de microscopia eletrônica de transmissão (TEM) das nanopartículas de hidroxiapatita
Figura 5. 7 –	Imagem de microscopia eletrônica de transmissão (TEM) das nanopartículas de prata
Figura 5.8 –	Imagem de microscopia eletrônica de transmissão (TEM) da nanopartículas de prata (NAg) em maior aumento70
Figura 5.9 –	Histograma obtido por microscopia eletrônica de transmissão (TEM) das nanopartículas de prata
Figura 5.10 – R	esistência de união imediata e após 1 ano de armazenagem73
Figura 5.11 –	Tipos de fratura classificadas como: A) adesiva; M) mista; CR) coesiva em resina e CD) coesiva em dentina73
Figura 5.12 –	Grupo SBMP (controle): A) Imagem ótica da interface adesiva. B) Contraste para evidenciar a presença de <i>tags</i> resinosos. C) Contraste para evidenciar a dentina. D) Associação das imagens B e C. E) Espectros: E1. Resina, E2. Dentina, E3. Interface
Figura 5.13 – (	Grupo NHa 0,5% + SBMP: A) Imagem ótica da interface adesiva. B) Contraste para evidenciar a presença de <i>tags</i> resinosos. C) Contraste para evidenciar a dentina. D) Associação das imagens B e C. E) Espectros: E1. Resina, E2. Dentina, E3. Interface
Figura 5.14 –	Grupo NHA 1% + SBMP: A) Imagem ótica da interface adesiva. B) Contraste para evidenciar a presença de <i>tags</i> resinosos. C) Contraste para evidenciar a dentina. D) Associação das imagens B e C. E) Espectros: E1. Resina, E2. Dentina, E3. Interface
Figura 5.15 – C C F E	Grupo SBMP com NAg 0,05% A) Imagem ótica da interface adesiva. B) Contraste para evidenciar a presença de <i>tags</i> resinosos. C) Contraste para evidenciar a dentina. D) Associação das imagens B e C. E) Espectros: E1. Resina, E2. Dentina, E3. Interface
Figura 5.16 –	NHA 0,5% + SBMP com NAg 0,05% A) Imagem ótica da interface

- Figura 5.22 Grupo NHA 1%: Interface adesiva evidenciando a hidroxiapatita (PO<sub>4</sub>-<sup>3</sup>), colágeno (amida I) e adesivo/resina (Bis-GMA)......123
- Figura 5.23 Grupo NAg 0,05%: Interface adesiva evidenciando a hidroxiapatita (PO<sub>4</sub><sup>-</sup> <sup>3</sup>), colágeno (amida I), adesivo/resina (Bis-GMA) e nanopartículas de prata (NAg)......125

- Figura 5.27 Halo de inibição bacteriana de acordo com os grupos experimentais 107

## LISTA DE TABELAS

Tabela 4.1 – Grupos experimentais para o teste de efeito antimicrobiano por contagem de unidades formadoras de colônias
Tabela 4.2 – Grupos experimentais para os testes de citotoxicidade
Tabela 5.1 – Análise de Variância da resistência de união72
Tabela 5.2 – Média ± desvio padrão (DP) da resistência de união e tipos de fratura (A: adesiva; M: mista; CR: coesiva em resina; CD: coesiva em dentina) mensurados em 24h e após 1 ano de armazenagem74
Tabela 5.3 – Principais elementos espectrais observados a partir de bandas indexadas por Toledano, 20173775
Tabela 5.4 – Atividade bactericida de acordo com halo de inibição (mm), Média ± desvio padrão (DP) segundo ANOVA e Tukey
Tabela 5. 5 – Dados das porcentagens de viabilidades inferiores a 50% em relação às concentrações dos meios condicionados dos grupos não polimerizados
Tabela 5.6 – Dados das porcentagens de viabilidades inferiores a 50% em relação às concentrações dos meios condicionados dos grupos polimerizados.113
Tabela 5.7 – Comparações entre os dados de viabilidade de DPSCs submetidas ao contato com meios condicionados por <i>bond</i> polimerizados. Comparação entre linhas (concentração dos meios) e colunas (grupos experimentais). Média e desvio padrão da densidade óptica (nm) resultante do teste de redução do MTT, segundo ANOVA e Tukey113
Tabela 5.8 – Comparações entre os dados de viabilidade de DPSCs submetidas ao contato com meios condicionados por <i>primers+bond</i> polimerizados. Comparação entre linhas (concentração dos meios) e colunas (grupos experimentais). Média ± desvio padrão da densidade óptica (nm) resultante do teste de redução do MTT, segundo Kruskal-Wallis e

# LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

4-MET	4-metacriloiloxietila ácido trimetílico
10-MDP	10-metacriloiloxidecil fosfato de di-hidrogênio
ACP	Fosfato de cálcio amorfo
ATP	Adenosina trifosfato
BHI	Brain Hearth Infusion
Bis-EMA	Bisfenol A diglicidil dimetacrilato etoxilado
Bis-GMA	Bisfenol A glicidil metacrilato
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DMSO	dimethyl sulfoxide
DLS	Espalhamento de luz dinâmico
DP	Desvio padrão
DPSC	Células tronco da polpa dentária
DRX	Difratometria de raio X
EMA	Etídio mono-azida
Fenil-P	metacriloiloxi-etil fenil fosfato de hidrogênio
HAP	Hidroxiapatita
HEMA	2-hidroxietilmetacrilato
MCR	Microscopia Confocal Raman
MDPB	12-metacriloiloxidodecilpiridínio brometo
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MMPs	Matriz de metaloproteinases
MPa	Megapascal
MTT	(3-(brometo de 4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolio)
NAg	Nanopartículas de prata
NHA	Nanopartículas de hidroxiapatita
PBS	Phosphate buffred saline
PMA	Propídio mono-azida
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PEG	Polietileno glicol dimetacrilato
PEG-	
UDMA	Polietileno glicol dimetacrilato com uretano dimetacrilato
ppm	Partes por milhão
QAM	Quaternário amônio metacrilato
q-PCR	Reação em cadeia da polimerase
RNA	Acido ribonucleico
ROS	Espécies reativas de oxigênio
	Reação de transcriptase reversa associada a reação em cadeia da
	polimerase em tempo real
SRINIL	Scolchbona Multi-Purpose
	Carpeio de Silicio
IBAEMA	

TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TEGDMA	Trietilenoglicol dimetacrilato
TEM	Microscopia Eletrônica de Transmissão
TRXF	Fluorescência de raios X por reflexão total
UDMA	Uretano dimetacrilato
UFC	Unidades formadoras de colônias
VBNC	Bactérias viáveis mas não cultiváveis
XTT	2,3-bis(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-5-[(fenilamino)carbonil]-
	2H-tetrazoliohidróxido

# LISTA DE SÍMBOLOS

- °C Graus Celsius
- μL Microlitro Bond
- В
- Hora h kV
- Quilovolt MiliAmpére mΑ
- mm Milímetro
- Milímetro quadrado mm<sup>2</sup>
- Nanômetro nm
- Ρ Primer
- Segundo s

# SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	.27
2	REVISÃO DA LITERATURA	.29
2.1	CÁRIE SECUNDÁRIA	.29
2.2	SISTEMAS ADESIVOS	.30
2.3	NANOPARTÍCULAS	.33
2.3.1	Adesivos com nanopartículas de fosfato de cálcio	.34
2.3.2	Adesivos com nanopartículas de prata	.34
2.4	EFEITO ANTIMICROBIANO	.35
2.5	BIOCOMPATIBILIDADE	.37
3	PROPOSIÇÃO	.40
3.1	OBJETIVO GERAL	.40
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	.40
3.3	HIPÓTESES	.40
3.3.1	Resistência de união	.41
3.3.2	Ação antibacteriana	.41
3.3.3	Citotoxicidade	.41
4	MATERIAL E MÉTODOS	.42
4.1	COMPOSIÇÃO DO ADESIVO DE TRÊS PASSOS (SCOTCHBO MULTI- PURPOSE)	ND .42
4.2	SÍNTESE E FUNCIONALIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS	.42
4.2.1	Síntese das nanopartículas de hidroxiapatita (NHA)	.42
4.2.2	Síntese e funcionalização das nanopartículas de prata (NAg)	.43
4.3	PREPARO DOS PRIMERS E BONDS COM ADIÇÃO DE NAg	.43
4.4	CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS	.43
4.4.1	Espalhamento de luz dinâmico (DLS)	.44

4.4.2	Fluorescência de raios X por reflexão total (TRXF)	44
4.4.3	Difratometria de raio X (DRX)	45
4.4.4	Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM)	46
4.5	ASPECTOS ÉTICOS	46
4.6	RESISTÊNCIA DE UNIÃO À DENTINA	47
4.6.1	Grupos experimentais e procedimento adesivo	47
4.6.2	Ensaio de Microtração	49
4.6.3	Análise dos padrões de fratura	50
4.6.4	Estatística da resistência de união	51
4.7	CARACTERIZAÇÃO DA INTERFACE ADESIVA	51
4.7.1	Microscopia Confocal Raman (MCR)	51
4.8	EFEITO ANTIMICROBIANO	52
4.8.1	Difusão em Ágar com <i>template</i>	52
4.8.2	Análise estatística do teste de difusão em ágar	54
4.8.3	Efeito dos biomateriais sobre biofilmes de S. mutans	55
4.8.3.1	Preparo dos corpos de prova	55
4.8.3.2	Formação do biofilme de Streptococcus mutans	56
4.8.3.3	Análise estatística	57
4.9	CITOTOXICIDADE	57
4.9.1	Grupos experimentais	57
4.9.2	Cultura de células	57
4.9.3	Condicionamento do meio de cultivo	59
4.9.4	Avaliação da citotoxicidade	60
4.9.5	Análise estatística	61
5	RESULTADOS	62
5.1	CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS	62
5.1.1	Espalhamento de luz dinâmico (DLS)	62

5.1.2	Fluorescência de raios X por reflexão total (TRXF)	.63
5.1.3	Difratometria de raio X (DRX)	.67
5.1.4	Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM)	.69
5.2	RESISTÊNCIA DE UNIÃO À DENTINA	.71
5.2.1	Ensaio de microtração e padrões de fratura	.71
5.3	CARACTERIZAÇÃO DA INTERFACE ADESIVA	.74
5.3.1	Microscopia Confocal Raman (MCR)	.74
5.4	EFEITO ANTIBACTERIANO10	)77
5.4.1	Difusão em Ágar com <i>template</i> 10	)77
5.4.2	Efeito dos biomateriais sobre biofilmes de S. mutans10	)88
5.5	CITOTOXICIDADE110	)10
6	DISCUSSÃO11	55
7	CONCLUSÕES12	200
	REFERÊNCIAS121	21
	APÊNDICE1	33
	ANEXOS1	35

### 1 INTRODUÇÃO

Desenvolver materiais com princípios bioativos é de extrema importância à era da odontologia minimamente invasiva. Diante da tendência de conservar o máximo de estrutura dental, muitas bactérias podem permanecer após preparo cavitário(1-4) e também podem infiltrar a interface dente-restauração através de fendas marginais(1-7). É interessante que sistemas adesivos tenham atividade antimicrobiana para inibir cáries secundárias e aumentar a longevidade da restauração(1-4, 6-12). Aos adesivos também podem ser incoporados compostos minerais (como fosfato de cálcio amorfo e hidroxiapatita) com os objetivos de neutralizar os ácidos bacterianos, inibir cáries, remineralizar os tecidos duros ou proteger a camada híbrida da degradação hidrolítica ou enzimática(1, 3, 8, 9, 13).

Muitos dos compostos antimicrobianos e remineralizadores são propostos na forma de nanopartículas, pois possuem elevada relação área de superfície-volume e maior atividade biológica(3, 9, 14, 15), mesmo quando utilizadas em baixas concentrações(9, 16). Foram propostos agentes de união com adição de nanopartículas de prata (Ag)(9, 16, 17), titânio (Ti)(7), iodo de cobre (Cu)(18), hidroxiapatita (HA)(19-22), fosfato de cálcio amorfo (ACP)(1, 3, 8, 9), além da grande classe de monômeros antibacterianos, os quaternário amônio metacrilatos (QAM)(1-3, 8, 9, 11, 12), e substâncias como a arginina(5), extrato de planta de quercetina(10), peptídeo de nisina(6) e epigalocatequim (EGCG)(4). Mais recentemente, a associação de componentes antimicrobianos e remineralizadores tem sido proposto para otimizar os sistemas adesivos(1, 3, 8, 9, 23-25).

As nanopartículas de prata (NAg) tem apresentado destaque devido à atividade antimicrobiana associada à alta efetividade, baixa toxicidade e virtualmente baixa resistência dos microrganismos(16, 23-29). Muitas discussões restam sobre mecanismo de ação das NAg que parece estar relacionado à oxidação da superfície da partícula, liberação de íons prata e geração de espécies reativas de oxigênio(30-33). As NAg tem sido incorporadas em materiais odontológicos em concentrações que variam de 0,005% a 0,1% com resultados antimicrobianos favoráveis em relação as bactérias causadoras da cárie(9, 16, 23-29, 34-36). A hidroxiapatita é o principal componente mineral dos tecidos dentários e também tem sido destaque nas pesquisas que visam a mineralização. Algumas estratégias de mineralização intrínseca e extrínseca estão associadas ao uso de nanopartículas a base de fosfato de cálcio com o propósito de ancoragem direta sobre o colágeno ou como fonte de íons para a formação de cristais de apatita(37-39).

Quando novos componentes antimicrobianos e remineralizadores são adicionados aos sistemas adesivos, torna-se relevante avaliar os efeitos na resistência de união aos tecidos dentários, sua biocompatibilidade, assim como o efeito antimicrobiano. Neste sentido, o objetivo deste estudo foi sintetizar nanopartículas de prata (NAg) a 0,05% e 0,1% e de hidroxiapatita (NHA) a 0,5% e 1%, avaliar sua influencia no efeito antibacteriano, citotoxicidade de um adesivo *etch-and-rinse* de três passos com NAg, sua resistência de união à dentina imediata e após 1 ano de envelhecimento associado ao uso de NHA.

### 2 REVISÃO DA LITERATURA

Este capitulo foi dividido em seções.

## 2.1 CÁRIE SECUNDÁRIA

A cárie secundária é a principal causa para substituição de restaurações(3, 5, 6, 12, 23, 24, 26, 27, 34, 36, 40, 41). Esta é uma doença infecciosa sacarosedependente que ocorre em interfaces previamente restauradas(42) e os microrganismos responsáveis pelo seu surgimento são os mesmos envolvidos na cárie primária(42). Os principais agentes etiológicos são do gênero streptococci, como o *Streptococcus mutans* e o *S. sobrinus*(34, 36, 40, 43).

Dentre os materiais restauradores de uso direto, a resina composta é aquele que mais acumula biofilme(3, 4, 24, 26, 36, 44), a adesão inicial desses microorganismos ocorre após a deposição da camada de proteínas que está associada a forças Van de Waals e eletrostáticas(42). Assim, estudos sugerem que quanto maior a energia livre e maior hidrofilia do material, maior a adesão microorganismos(8, 42).

Na película adquirida, uma camada de proteínas salivares que recobre superfícies de dentes e restaurações, aderem os colonizadores microbianos iniciais, e à medida que aumenta adesão microbiana, é formado o biofilme(8, 15, 44). O biofilme oral é uma comunidade composta por mais de mil espécies por mL de saliva (15, 23, 34, 36) ou mg de placa(15), embebidas em uma matriz de substância polimérica extracelular (EPS)(33, 35, 45-49), constituída de polissacarídeos, proteínas, ácidos nucléicos e lipídios(15). Diferentemente do crescimento planctônico, no biofilme os microrganismos aderem uns aos outros e a uma superfície(33) e são 1000 vezes mais resistentes à antimicrobianos(15). Como resultado da fermentação da sacarose proveniente da dieta pelos microorganismos são gerados ácidos, como o ácido lático(9, 23, 24, 26, 27, 34, 36), responsáveis pela desmineralização do esmalte e dentina, além da degradação da interface adesiva(42).

Vários fatores podem favorecer o surgimento de cáries secundárias, dentre os quais: microfendas (acima de 50-60  $\mu$ m)(6, 42) originadas da contração de polimerização do material restaurador, selamento cavitário insatisfatório, degradação hidrolítica e enzimática da interface adesiva e acúmulo de biofilme sobre a restauração e a estrutura dental, etc.(4-6, 23, 24, 26, 34, 42, 44, 46, 50).

Diante de uma odontologia minimamente invasiva e cada vez mais conservadora, é preconizada a remoção da dentina infectada e a dentina afetada é deixada no fundo da cavidade, o que pode resultar em bactérias residuais após preparo cavitário(3, 5, 23, 24, 26, 34, 36, 45-47, 51, 52).

É estimado que de 50 a 70% dos procedimentos restauradores ocorrem para substituição de restaurações deficientes, devido a presença de cáries secundárias(12, 23, 24, 26, 47). Então, lançar mão de mecanismos que possam inibi-las torna-se primordial para promover maior longevidade das restaurações diretas em resina composta.

#### 2.2 SISTEMAS ADESIVOS

Os sistemas adesivos tem a função de unir o material restaurador ao substrato dental. Podem promover adesão através de retenção micromecânica, química ou ambas(53). Basicamente são compostos de ácido, primer, adesivo, além de fotoiniciadores, inibidores de polimerização, e podem ser adicionadas cargas inorgânicas(53-55), inibidores de metaloproteinases(4, 52, 56, 57), repelentes de proteínas(8, 41), agentes antibacterianos(3-9, 11, 12, 23, 24, 26, 27, 34-36, 40, 45-48, 51, 55, 58-61), e agentes remineralizadores(3, 5, 8, 9, 23, 24, 27, 48, 60). A classificação atual destes sistemas leva em consideração o tipo de interação que estabelecem com o substrato, os quais podem ser categorizados como sistemas de condicionamento total, auto condicionantes ou universais, e com o número de passos operatórios, classificados em três, dois ou um passo(62).

Nos sistemas de condicionamento total, um ácido forte (pH = 1 à 2), geralmente o ácido fosfórico a 37% é aplicado no substrato dental para: remover a camada de esfregado, comumente denominada *smear layer*, desminerarizar o tecido, criar microporosidades e aumentar a energia de superfície do dente(53, 54, 57). O primer,

por sua vez, contém monômeros hidrofílicos, como o 2-hidroetil metacrilato (HEMA) associado a solventes orgânicos como álcool, acetona ou água, que servem para deslocar a água do substrato e carrear os monômeros para o entorno das fibras colágenas(53, 54, 57). Além disso, os primers servem como um intermediário para ligação do substrato hidratado ao adesivo hidrofóbico e posterior formação da camada híbrida(53, 57). Os adesivos podem apresentar monômeros hidrofílicos, como o HEMA, e hidrofóbicos como o BisGlicidilmetacrilato (Bis-GMA), uretano dimetacrilato (UDMA) e etilenoglicol dimetacrilato (TEGDMA), e sua função é preencher luz dos túbulos dentinários expostos, os espaços interfibrilares, responsáveis pela retenção micromecânica(53). Esses sistemas podem ser de três passos: aplicação do ácido, *primer* e *bond*; ou de dois passos: ácido, *primer/bond* associados(53, 57, 62). A aplicação de primer e adesivo em etapas distintas tem mostrado maior resistência de união quando comparados a frascos únicos (54) (53, 63).

A técnica de condicionamento total é extremamente sensível, pois conta com a subjetividade da quantidade de água que deve ser deixada no substrato, após processo de lavagem do agente condicionante(57). Em esmalte, devido a sua natureza altamente inorgânica, 96% de cristais de hidroxiapatita, 1% de matriz orgânica, principalmente proteínas, e 3% de água em volume(54), a adesão é bastante favorável, e este pode ser seco até obtenção de aspecto opaco(53, 54). Porém, a dentina tem composição bastante heterogênea, 50% de matriz inorgânica composta por hidroxiapatita, 30% de proteínas (principalmente colágeno tipo I), e 20% de água em volume(53, 54), e deve ser deixada levemente úmida após lavagem, para a manutenção e sustentação da trama de colágeno exposta após o condicionamento com ácido(54, 56, 57). Neste sentido, se a água for removida em excesso, ocorre o colapso das fibras colágenas, e os monômeros resinosos não penetram adequadamente entre os espaços interfibrilares(53, 54, 57). Por outro lado, se a dentina for deixada muito úmida, os monômeros são diluídos, o que interfere diretamente no grau de conversão do material(54).

Além disso, o tempo de condicionamento e de aplicação do sistema adesivo devem ser seguidos rigorosamente, pois se o dente for condicionado em excesso ou se o adesivo não for aplicado pelo tempo recomendado, monômeros podem não adentrar totalmente nas áreas condicionadas, deixando uma região de colágeno desprotegida, o que favorece o processo de nano-infiltração e, consequentemente, a degradação da interface adesiva(50, 64). Falhas na hidridização dos tecidos pode causar sensibilidade pós operatória, nano-infiltração, e tornar o colágeno susceptível a degradação hidrolítica, ação de metaloproteinases (MMPs) e catepsinas endógenas da dentina, o que compromete a longevidade da restauração(50, 56, 64).

Nos adesivos auto-condicionantes não há uma etapa separada de condicionamento. Logo, podem ser de dois passos, aplicação do primer acídico e bond, ou de etapa única que associa ácido/primer/bond(53). Sendo assim, monômeros acídicos têm a função de condicionar e simultaneamente infiltrar no substrato, logo, a smear layer é incorporada a camada híbrida, e a hidroxiapatita residual protege as fibras colágenas da degradação(53, 57, 63, 64). Esses sistemas podem ser divididos de acordo com sua acidez e profundidade de penetração em: ultra suaves, pH> 2,5 (0,2-0,5 µm), suaves, pH~2 (0,5-1 µm), intermediários, pH 1-2  $(1-2 \mu m)$  e fortes, pH $\leq 1$  ( $\geq 5 \mu m$ )(57, 63). Além disso, contém grupos funcionais como: 10-metacriloiloxidecil fosfato de di-hidrogênio (10-MDP), 4-metacriloiloxietila ácido trimetílico (4 MET) e metacriloiloxi-etil fenil fosfato de hidrogênio (fenil P), que podem ligar-se quimicamente ao cálcio da hidroxiapatita(53, 56, 57, 63). Nesses sistemas não há a subjetividade quanto a quantidade de água remanescente, pois não existe a etapa de lavagem do substrato, além disso, minimiza o problema de haver uma área condicionada e não infiltrada por monômeros, reduzindo o risco de sensibilidade pós operatória, e apresentam desempenho previsível nos substratos dentinários(56, 57, 63). Um ponto negativo destes adesivos é sua alta hidrofilia, pois a água é necessária para ionizar os monômeros, o que os torna suscetíveis a sorção hídrica e degradação da interface adesiva(53, 56, 57).

Os adesivos universais são uma associação das duas propostas anteriores. Pois, podem ser utilizados na técnica de condicionamento total ou auto-condicionante, dependendo da conveniência do clínico(62, 65). Eles têm como *marketing* tornar o procedimento mais versátil e facilitar a utilização clínica(62, 65). Contudo, a maioria dos fabricantes recomenda que se a cavidade envolver esmalte e dentina proceda com o condicionamento seletivo do esmalte com ácido fosfórico(62, 65). Estes adesivos também podem funcionar como *primers* metálicos e cerâmicos(65). Contudo, assim como os adesivos auto-condicionantes, estes materiais simplificados são altamente susceptíveis à degradação da camada híbrida, devido a sua natureza hidrofílica(65)

Alguns cuidados clínicos podem ser tomados para favorecer maior longevidade clínica quando os adesivos são utilizados. Além de orientar o paciente e controlar o

32
biofilme, medidas relacionadas à técnica adesiva podem são importantes, dentre as principais estão: respeitar o tempo de condicionamento para cada substrato; realizar a aplicação ativa e de múltiplas camadas do sistema adesivo, para facilitar sua penetração, e garantir a infiltração dos monômeros; além de aumentar o tempo de foto-ativação, visando elevar seu grau de conversão(50, 57, 64). Em relação à técnica restauradora, deve-se realizar a técnica incremental, para evitar a excessiva tensão de contração de polimerização, o que pode gerar fendas na interface; correta adaptação do compósito na cavidade e fotoativação por tempo igual ou superior ao recomendado pelo fabricante, para evitar falhas, minimizar a sorção de água e a degradação hidrolítica precoce do material; além de um bom polimento da restauração, para dificultar a adesão de microorganismos(42). Contudo, mesmo com todos estes cuidados, a cavidade oral é um ambiente muito agressivo devido a mastigação, carregamentos oclusais, ciclos térmicos, presença de água, enzimas salivares e bacterianas(5, 9, 26, 42, 50, 64). Logo, espera-se que novos biomateriais apresentem benefício adicional ao que são originalmente propostos, dentre os quais a ação remineralizadora e antimicrobiana.

## 2.3 NANOPARTÍCULAS

São consideradas nanopartículas, materiais com dimensões menores que 100 nm(14, 15, 30). Essas nanopartículas podem ter formato esférico, cúbico, pontiagudo(15, 66) e triangular(66), além disso, a redução de partículas a tamanhos nanométricos aumenta sua área de superfície(14), e modifica as propriedades como dureza, reatividade química, e atividade biológica(14, 15), portanto, podem ter benefícios mesmo quando aplicadas em baixas concentrações(30, 33). Seu tamanho diminuto está diretamente relacionado com o aumento da capacidade de penetração em membranas celulares(14). As nanopartículas metálicas podem ser utilizadas para controlar biofilmes devido suas propriedades biocidas, anti-adesivas e de liberação de substâncias(15).

#### 2.3.1 Adesivos com nanopartículas de fosfato de cálcio

Diversos estudos têm incorporado fosfato de cálcio amorfo ou hidroxiapatita [Ca<sub>10</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>6</sub>(OH)<sub>2</sub>] em agentes de união ou aplicado como um pré-tratamento da dentina (3, 8, 9, 19, 21, 23, 24, 27, 48). A adição de fosfato de cálcio tem como objetivo promover uma biomineralização da interface adesiva e inibir cáries secundárias(3, 8, 9, 23, 24, 27, 30, 48). As nanopartículas são lançadas e depositados entres as fibras colágenas e podem guiar o crescimento de apatita, o que viabiliza a mineralização interfibrilar e intrafibrilar das fibras colágenas(19, 30), e pode resultar em aumento do módulo de elasticidade da camada híbrida(9, 39). Além disso, as nanopartículas preenchem espaços vazios na interface que são propensos a degradação hidrolítica e à ação de metaloproteinases(37). Desta forma, esses adesivos bioativos previnem a diminuição da resistência de união ao longo do tempo(27, 39), e promovem a remineralização para prevenção de cáries(3, 8, 23, 24, 30, 48).

#### 2.3.2 Adesivos com nanopartículas de prata

O efeito antimicrobiano visa inviabilizar bactérias que podem ter permanecido após preparo cavitário, ou a ação de bactérias que possam invadir a interface dente – restauração através das fendas marginais(23, 24, 26). Vários antimicrobianos foram incorporados nos sistemas adesivos com destaque na literatura para as nanopartículas de prata (3, 4, 6, 8, 9, 12, 23, 24, 26, 27, 34-36, 40, 45-48, 51, 58-60). Essas partículas têm principalmente ação antimicrobiana, antifúngica e antiviral(15, 31), além de ações anti-inflamatórias e anti-tumorais(31). Seu tamanho nanométrico permite que tenham grande área de superfície em relação ao volume ocupado e potencial de ação em pequenas concentrações, o que é muito favorável por não afetar significativamente a cor, ou as propriedades mecânicas material(9, 23, 24, 26, 27, 34, 36, 67).

Desta forma, foi desenvolvido um método, que utiliza o monômero 2-(tertbutilamino)etil metacrilato (TBAEMA) para reduzir o sal de prata a nanopartículas de prata *in situ*, e introduzir as nanopartículas funcionalizadas à matriz orgânica do adesivo(9, 23, 24, 26, 27, 34, 36). Esta técnica favorece a dispersão das nanopartículas nos monômeros resinosos, reduz a formação de aglomerados, a vinculação das nanopartículas à rede polimérica(9, 23, 24, 26, 27, 34, 67).

Outra técnica utilizada é a funcionalização das nanopartículas de prata com polivinilálcool associado ao etanol(16). Esse método também permite que as nanopartículas não formem aglomerados e sejam incorporadas à matriz polimérica propiciando ação prolongada, pois as nanopartículas não são liberadas ao meio(16).

O mecanismo de ação da prata ainda não foi completamente elucidado(31-33). Várias teorias referem-se à atuação da prata iônica, relacionadas à atração eletrostática existente entre a membrana celular bacteriana de peptideoglicanos, carregada negativamente, e os íons de prata, carregados positivamente, essa interação promove o aumento da permeabilidade celular, dano a membrana e, consequentemente, inviabilidade da bactéria(15, 30-32, 66, 68). Ao penetrar na membrana, íons de prata podem gerar espécies reativas de oxigênio (ROS)(14, 15, 30, 32, 33, 66), além de ligar-se as bases do DNA bacteriano citoplasmático(14, 15, 23, 24, 26, 30-32, 34, 36, 60, 66), o que promove sua condensação, e inviabiliza a replicação(31). Adicionalmente, a prata iônica pode desnaturar ribossomos, o que inibe a síntese proteica(15, 31, 35, 66). Por fim, foi relatado que íons de prata inibem enzimas respiratórias e, consequentemente a produção de adenosina trifosfato (ATP), utilizada nas necessidades energéticas bacterianas(15, 32, 66).

Em relação toxicidade do material, quando as nanopartículas são aplicadas na medicina e odontologia, foi demonstrado que de maneira geral, as nanopartículas de prata são altamente citotóxicas à bactérias, fungos e alguns vírus(15, 31). Porém exibem baixa toxicidade a células humanas(23, 24, 26, 32, 33, 36, 66).

#### 2.4 EFEITO ANTIMICROBIANO

Dentre as técnicas utilizadas para avaliar o efeito antimicrobiano, os métodos de cultura mais difundidos são o ágar disco difusão, que mensura o diâmetro do halo de inibição promovida pelo antibacteriano(6, 24, 26, 35, 36, 59, 61); mínima concentração inibitória (MCI) e mínima concentração bactericida (MCB), que representam a quantidade de material (µg/mI) necessária para inibir o crescimento ou

matar os microrganismos(26, 51, 69); contagem de unidades formadoras de colônias (UFC), contabiliza as colônias bacterianas formadas em placas de ágar(3, 8, 17, 23, 24, 26, 27, 34, 36, 40, 41, 45, 46, 48, 59, 61, 70-75); 3-(brometo de 4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolio (MTT), mensura a atividade metabólica de bactérias pela absorbância do meio de cultivo(3, 8, 12, 23, 24, 26-28, 34, 41, 47, 48, 60); produção de ácido lático, que contabiliza a concentração de lactato produzido pelo biofilme(3, 8, 12, 23, 24, 26-28, 34, 36, 46, 47); ensaio live/dead, demonstra qualitativamente as células bacterianas com a membrana comprometida, as quais são pigmentadas de vermelho, mediante atuação do corante propídio iodo, e as células bacterianas com membrana intacta coradas de verde pelo syto 9(3-6, 8, 10, 12, 23, 24, 26-28, 34-36, 2,3-bis(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-5-[(fenilamino)carbonil]-2H-41, 45-48, 61); tetrazoliohidróxido (XTT), que semelhantemente ao MTT mensura a atividade mitocondrial por medida colorimétrica(6, 10); microscopia eletrônica de varredura (MEV), para análise morfológica do biofilme ou de sua adesão em determinada superfície(76).

Além dos métodos de cultura previamente citados, existem os métodos moleculares como a reação em cadeia da polimerase (PCR), que detecta a presença ou ausência de determinado gene(77); a reação em cadeia da polimerase em tempo real (gPCR), técnica que quantifica o ácido desoxirribonucleico (DNA) presente em uma amostra(12, 46, 77); a reação de transcriptase reversa associada a reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-qPCR), quantifica ácido ribonucleico (RNA) usado para medir a atividade metabólica bacteriana ou a expressão de determinado gene(28, 77-81), dentre outros. Para identificação da viabilidade celular, o método adotado deve avaliar a atividade metabólica ou mensurar o RNA amplificado, visto que o RNA degrada-se prontamente após inviabilidade celular, ou detectar a integridade da membrana(78, 82). Além disso, os ensaios podem ser feitos com um único microrganismo(4, 6, 10, 24, 26, 28, 35, 45, 47, 59-61, 70-75, 80), com vários microrganismos(5, 12, 46, 48, 55, 69, 75), ou com um microcosmo(3, 8, 17, 23, 24, 26, 27, 34, 40, 41), no qual, geralmente a saliva humana é utilizada como inóculo, pois simula mais fielmente o ambiente oral(3, 8, 26, 27, 40, 41). As análises podem ser realizadas em microrganismos tanto na forma planctônica(5, 24, 28, 35, 60, 61, 69, 71, 72) ou de biofilme(3, 4, 8, 10, 12, 17, 23, 24, 26-28, 34, 36, 40, 41, 45-48, 59, 61, 75).

Os métodos de cultura têm a desvantagem de serem incapazes de detectar bactérias viáveis mas não cultiváveis (VBNC), as que requerem condições especiais de cultivo, ou aquelas mortas(77, 83), além disso, são trabalhosos, caros, e subestimam o número de células(43, 77). Dentre os métodos moleculares, o mais lavrado é o qPCR, pois é capaz de quantificar a população de uma amostra, porém, tem como desvantagem a inabilidade de distinguir as bactérias vivas das mortas, o que superestima a contagem destes microorganismos(43, 83, 84). Com intuito de contornar tal limitação deste procedimento molecular, foi proposta uma técnica que utiliza o corante etídio monoazida (EMA), que se liga quimicamente ao DNA de células com a membrana comprometida, o que impede sua amplificação por qPCR, e torna possível contabilizar apenas as células viáveis(43, 78, 82, 85). Outro método molecular sugerido para detecção precisa de células viáveis, utiliza o corante propídio monoazida (PMA), que se liga de maneira covalente apenas ao DNA de bactérias com a membrana comprometida, desta forma, o qPCR amplificaria apenas as células viáveis da amostra analisada(43, 78, 82-86). Este novo procedimento foi utilizado com sucesso em estudos de microbiologia(43, 78, 83, 85), endodontia(84) e, o presente estudo propõe utilizá-lo na odontologia adesiva para mensurar de forma mais o efeito de antimicrobianos.

### 2.5 BIOCOMPATIBILIDADE

Para que um biomaterial seja considerado seguro para uso em humanos, testes biológicos devem ser realizados em células de mamíferos com intuito de verificar sua resposta a um contato direto ou indireto com este material(87). Uma das formas mais utilizadas de mensurar a viabilidade celular é através do ensaio colorimétrico de MTT(10, 17, 18, 26-28, 70, 88-94). Através da atividade mitocondrial de células viáveis, o MTT, que é um tetrazole amarelo solúvel em água, é reduzido a formazana violeta insolúvel em água, por conseguinte, a absorbância é medida através de espectrofotômetro(17, 26-28, 87-91, 93). A viabilidade celular é calculada através da seguinte fórmula: Viabilidade do grupo teste (%) = 100 x (densidade óptica grupo teste / densidade óptica do grupo controle), sendo que o grupo controle é

representado pelo meio de cultivo correspondente a 100% de viabilidade celular(26-28, 87, 88, 93, 94).

Quando sistemas adesivos são avaliados, normalmente utiliza-se extrato com meio condicionado pelos monômeros resinosos e diluições seriadas desse extrato, que simulam sua eluição nos fluidos dentinários. Além disso, pode-se calcular a dose letal 50% (DL<sub>50</sub>) que representa a concentração necessária para inviabilizar 50% das células. As análises podem ser realizadas por contato direto das células com o meio condicionado, ou indireto, que utilizam uma barreira dentinária. Uma maneira simples, menos dispendiosa e rápida de estimar o efeito citotóxico dos adesivos é através da impregnação de discos de papel(89, 91, 92) com monômeros resinosos, que servem para condicionar o meio de cultivo, ou podem ser usados discos de adesivo(17, 18, 26-28, 90) para o condicionamento do meio ou aplicar os adesivos diretamente sobre a dentina, (88, 93) o que simularia de forma mais próxima uma condição clínica. Muitos trabalhos avaliam a biocompatibilidade apenas no primer(26, 90), adesivo(27, 90), ou em ambos(27, 28), tanto na sua forma curada(17, 18, 26-28, 88-93, 95) quanto não curada(69, 90, 92, 94, 95). E, em geral, utilizam células humanas, como os fibroblastos(96), odontoblastos(91) e células tronco da polpa dentária (97).

Dentre as substâncias que podem estar presentes nos sistemas adesivos, e que são capazes de induzir a morte celular, estão os monômeros como o HEMA, Bis-GMA, Bisfenol A diglicidil dimetacrilato etoxilado (Bis-EMA), UDMA, polietileno glicol dimetacrilato (PEG), polietileno glicol dimetacrilato com uretano dimetacrilato (PEG-UDMA), TEGDMA, 2-metacriloxiletil dodecil metil amônio brometo (MAE-DB), 2metacriloxiletil hexadecil metil amônio brometo (MAE-HB) e os monômeros de quaternário amônio metacrilato (QAM)(18, 26-28, 69, 88, 89, 91, 93, 95, 98); fotoiniciadores como a canforoquinona(89, 95) e outras substância como o glutaraldeído(88), riboflavina(88), ácido poliacrílico(18), iodo de cobre(18), quercetina(10), que podem ser potencialmente citotóxicas. Além destes, o pH do adesivo(89, 91) e o grau de conversão(90, 91) também têm relação direta com a capacidade de inviabilizar as células. O HEMA é um dos monômero mais citotóxico, muito provavelmente pelo seu baixo peso molecular, hidrofilia e capacidade de difundir-se facilmente em meio aquoso(91). A canforoquinona pode induzir a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) e, finalmente, morte celular(89). Além disso, formulações adesivas mais acídicas também são associadas à efeitos mais

citotóxicos, e o menor grau de conversão de monômeros em polímeros têm relação direta com a lixiviação dos componentes adesivos e toxicidade ao meio (91).

#### 3 PROPOSIÇÃO

Este capítulo foi dividido em seções.

### 3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a resistência de união, o efeito antibacteriano e a citotoxicidade de adesivo experimental contendo nanopartículas de prata associado ao pré tratamento da dentina, com suspensão de nanopartículas de hidroxiapatita.

## 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar uma estratégia adesiva que envolve a incorporação de 0,05% ou 0,1% de nanopartículas de prata (NAg) no primer e no adesivo de um agente de união, associado ao pré tratamento da dentina, após o condicionamento com ácido fosfórico, com nanopartículas de hidroxiapatita (NHA) à 0,05% ou 1%, segundo os seguintes critérios:

- 1) Ensaio de microtração imediata (24h) e após 1 ano de envelhecimento;
- 2) Efeito antimicrobiano por métodos de cultura e métodos moleculares;
- 3) Efeito citotóxico sobre células tronco da polpa dentária.

## 3.3 HIPÓTESES

A incorporação de nanopartículas de prata (NAg) no sistema adesivo e tratamento remineralizador com nanopartículas de hidroxiapatita (NHA):

## 3.3.1 Resistência de união

H0: Não afetará a resistência de união do adesivo à dentina.

H1: Aumentará a resistência de união do adesivo à dentina.

A incorporação de 0,05% ou 0,1% de nanopartículas de prata (NAg) no sistema adesivo:

# 3.3.2 Ação antibacteriana

- H0: Apresentará efeito antimicrobiano similar ao sistema adesivo sem aditivos.
- H1: Apresentará efeito antimicrobiano superior ao sistema adesivo sem aditivos.

# 3.3.3 Citotoxicidade

- H0: Apresentará efeito citotóxico semelhante ao controle.
- H1: Apresentará efeito citotóxico inferior ao do controle.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

Este capítulo foi dividido em seções.

# 4.1 COMPOSIÇÃO DO ADESIVO DE TRÊS PASSOS (SCOTCHBOND MULTI-PURPOSE)

O sistema Scotchbond Multi-Purpose (SBMP, 3M, Sumaré, SP, Brasil) foi utilizado com agente de união. É constituído por ácido, primer e adesivo em etapas separadas. Segundo o fabricante, o agente condicionante é o ácido fosfórico a 35%, o primer (pH~3,3) é composto de 2-hidroxietilmetacrilato (HEMA) e um copolímero do ácido polialcenóico e o adesivo é constituído por BisGlicidilmetacrilato (Bis-GMA) e 2-hidroxietilmetacrilato (HEMA) associados a um foto-iniciador.

## 4.2 SÍNTESE E FUNCIONALIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS

A síntese das nanopartículas de hidroxiapatita e de prata foram realizadas no Laboratório de Química Supramolecular e Nanotecnologia, Instituto de Química, Universidade de São Paulo – IQ/USP.

## 4.2.1 Síntese das nanopartículas de hidroxiapatita (NHA)

Para a síntese das nanopartículas de hidroxiapatita foram utilizados 50 mL de uma solução de Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>.4H<sub>2</sub>O (0,1mol L<sup>-1</sup>) desaerada e resfriada a 5 <sup>o</sup>C. Posteriormente, foram adicionados 50 mL de uma solução (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>.HPO<sub>4</sub> (0,06 mol L<sup>-1</sup>) contendo 390g de ácido deoxicólico (0,001 mol) previamente desaerada, ajustada para pH 9 com NH<sub>4</sub>OH e resfriada à 5<sup>o</sup>C. Em seguida, o pH da mistura foi ajustado

para 9 com algumas gotas de uma solução de NH<sub>4</sub>OH (0,1 mol L<sup>-1</sup>), e mantida sob agitação a 5<sup>o</sup>C, por 1 h. Finalmente, a mistura foi centrifugada por 10 min e lavada com 100 mL de água deionizada por 3 vezes, e ressuspendida em água deionizada até obter a concentração de 10 g L<sup>-1</sup> de NHA. Posteriormente foram produzidas suspensões em concentrações de 0,5% e 1% de NHA em água.

#### 4.2.2 Síntese e funcionalização das nanopartículas de prata (NAg)

As nanopartículas de prata foram obtidas a partir da redução do AgNO<sub>3</sub> em etanol. Logo, 10,7 mL de etanol associado a 5% de polivinilálcool (100.000 MM) foram aquecidos em refluxo, sob agitação por 5 min. Posteriormente, 0,5 mL de uma solução de AgNO<sub>3</sub> (0,171 g) foi adicionada e a mistura mantida em refluxo por 10 mim, em seguida resfriada à temperatura ambiente onde foi filtrada, e acondicionada em frasco protegido da luz e armazenada a 4 °C.

## 4.3 PREPARO DOS PRIMERS E BONDS COM ADIÇÃO DE NAg

Para preparar os *primers* e *bonds*, partiu-se de uma dispersão de NAg de concentração 10.000 ppm que foi incorporada aos componentes por diluição perfazendo as concentrações 0,05% (500 ppm) e 0,1% (1000 ppm) de NAg e o volume final ajustado com etanol, quando necessário. A mistura foi realizada sob agitação, a partir da mesma quantidade dos componentes e dos aditivos (dispersão de NAg e etanol), compensando o efeito de diluição dos componentes (adesivo e primer) entre as diferentes concentrações. O fator de diluição final em cada um dos componentes foi de 1,11.

## 4.4 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS

As caracterizações das nanopartículas foram realizadas no Laboratório de Química Supramolecular e Nanotecnologia, Instituto de Química, Universidade de São Paulo – IQ/USP.

## 4.4.1 Espalhamento de luz dinâmico (DLS)

Para analisar o tamanho das nanopartículas de hidroxiapatita, foi realizado o ensaio de Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS) em equipamento Malvem, Zetasizer NanoSizer90 (Figura 4.1), com resolução de dimensões de 0,3 nm a 5 µm. As nanopartículas, em concentrações de 0,1 a 1g/L, foram dispersas em água e depositadas em porta amostras para a realização de 3 leituras. Esta análise forneceu histogramas de distribuição do tamanho médio das nanopartículas.

Figura 4.1 – Equipamento de Espalhamento de Luz Dinâmico (Malvem, Zetasizer NanoSizer90) utilizado para indicação do tamanho médio das partículas



Fonte: O autor.

## 4.4.2 Fluorescência de raios X por reflexão total (TRXF)

Para análise da composição elementar das nanopartículas hidroxiapatita e prata, foi utilizado um espectrômetro de fluorescência de raios X por reflexão total (TRXF) da Bruker, modelo S2 Picofox (Figura 4.2), com tubo de raios X e alvo de molibdênio, operando a 50 kV, 600 uA, monocromador multicamadas e detector SDD refrigerado

por banho Peltier. As análises foram realizadas a partir de nanopartículas dispersas em água, depositadas em filmes finos em porta-amostra de quartzo ou acrílico. Foram utilizados elementos com concentrações conhecidas, Ti, V, Se, Ni, Ga e As, através de ICP-OES, para referenciar a quantificação da composição das nanopartículas.

Figura 4.2 – Espectrômetro de fluorescência de raios X por reflexão total (TRXF) da Bruker, modelo S2 Picofox, utilizado para detecção da composição das amostras



Fonte: O autor.

# 4.4.3 Difratometria de raio X (DRX)

Para análise da estrutura cristalina das NAg e NHA, os pós das amostras foram depositados em um difratômetro D2-phaser, Bruker (Figura 4.3), com utilização de radiação Kα de Cobre em 1,5418 Å, 30 mA, 40kV, 15 rpm, auxiliado por detector de energia dispersiva Lynxeye® de 192 canais. Foi realizado o ensaio em modo de varredura foi contínuo, de 10 a 90° 2θ, deslocamento de 0,02°, e tempo de integração de 1s por ponto.

Figura 4.3 – Difratômetro D2-phaser, Bruker, do Laboratório de Química Supramolecular e Nanotecnologia do Instituto de Química da USP



Fonte: O autor.

## 4.4.4 Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM)

A observação do tamanho e formato das NAg e NHA foi realizada através de microscópio eletrônico de transmissão (JEOL, modelo JEM 2100), operado com 200kV, em diferentes aumentos. As nanopartículas dispersas em água foram depositadas sobre grids de cobre e recobertos com filmes finos de carbono.

# 4.5 ASPECTOS ÉTICOS

O projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo (CEP-FOUSP) sob parecer 1.774.950 (Anexo A e B). Assim, serão selecionados os participantes da pesquisa na Clínica Odontológica da FOUSP para obter 61 dentes terceiros molares humanos, mediante a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Apêndice A).

# 4.6 RESISTÊNCIA DE UNIÃO À DENTINA

Sessenta e um terceiros molares humanos foram limpos e armazenados em solução de Cloramina T 0,5%, por um período de 07 dias. Após a desinfecção, os dentes foram lavados, incluídos em anel de PVC e mantidos em água destilada por 24h. Posteriormente, foi realizado um corte no terço oclusal da coroa com disco diamantado, em máquina de corte (Isomet 1000, Buheler, Lake Bluff, IL, EUA), com objetivo de remover a camada de esmalte e expor a dentina. Após a exposição da superfície dentinária, realizou-se um desgaste em politriz (EcoMet 3000, Buehler, Lake Bluff, IL, EUA) com lixas de SiC 600 (3M, Sumaré, SP, Brasil) por 1 minuto para padronização da camada de esfregaço (Figura 4.4).

Figura 4.4 – Corte oclusal para exposição da dentina superficial, observação do dente após remoção das cúspides, politriz, e padronização da camada de esfregaço



Fonte: O autor.

## 4.6.1 Grupos experimentais (n=5) e procedimento adesivo

G1. Sem pré tratamento e SBMP Controle (SBMP);

G2a. Pré tratamento com 0,5% NHA + SBMP (0.5 NHA);

G2b. Pré tratamento com 1% NHA + SBMP (1 NHA);
G3. Sem pré tratamento SBMP com NAg 0,05% (0.05 NAg);
G4a. Pré tratamento com 0,5% NHA + SBMP com 0,05% NAg (0.5 NHA + 0.05 NAg);
G4b. Pré tratamento com 1% NHA + SBMP com NAg 0,05% (1 NHA + 0.05 NAg);
G5. Sem pré tratamento SBMP com NAg 0,1% (0.1 NAg)
G6a. Pré tratamento com 0,5% NHA + SBMP com NAg 0,1% (0.5 NHA + 0.1 NAg);
G6b. Pré tratamento com 1% NHA + SBMP com NAg 0,1%. (1 NHA + 0.1 NAg).

Para realização de procedimento adesivo e restaurador, a dentina recebeu tratamento de acordo com o grupo experimental:

Para os grupos G1, G3 e G5, foram realizados os seguintes passos operatórios:

- Aplicação do ácido fosfórico a 35 % por 15 s;

- Lavagem por 30 s (jato de ar/água);
- Secagem com papel absorvente (deixar a superfície levemente úmida);
- Aplicação do primer por 30 s e leve jato de ar;
- Aplicação do adesivo;
- Fotoativação por 20 s;
- Inserção da resina composta (Z350 XT A2B) em incrementos;
- Fotoativação\* de cada incremento por 40 s.

Para os grupos G2a, G2b, G4a, G4b, G6a e G6b foram realizados os seguintes passos operatórios:

- Aplicação do ácido fosfórico a 35 % por 15 s;
- Lavagem por 30 s (jato de ar/água);
- Secagem com papel absorvente (deixar a superfície levemente úmida);

- Aplicação da suspensão 0,5% ou 1% de NHA (NHA) em água Milli-Q com microbrush por 30 s, deixar em repouso por 10 s;

- Aplicação de etanol 50% com microbrush por 10 s, deixar em repouso por 10 s;
- Aplicação do primer por 30 s e leve jato de ar;
- Aplicação do adesivo;
- Fotoativação por 20 s;
- Inserção da resina composta (Z350 XT A2B) em incrementos;
- Fotoativação\* de cada incremento por 40 s.
- \* Através do aparelho LED (Valo Cordless, Ultradent, South Jordan, Estados Unidos).

Após tratamento, os dentes foram armazenados em água destilada em estufa à 37°C por 24 h. Logo, foram cortados em sentido mésio-distal e vestíbulo-lingual (Isomet 1000, Buheler, Lake Bluff, IL, EUA), de maneira a produzir palitos com 0,7  $\pm$ 0,2 mm<sup>2</sup> de secção transversal, aferida com paquímetro digital (Digimess, São Paulo, SP, Brasil) (Figura 4.5).

Figura 4.5 – Corte para confecção de palitos de dente-adesivo-resina composta



Fonte: O autor.

## 4.6.2 Ensaio de Microtração

Após 24h de armazenagem em água destilada, os palitos foram fixados em JIGs com auxílio de cola a base de cianocrilato. E o teste de microtração foi realizado em máquina de ensaio universal (Instron, modelo 5565, Instron Corp, Canton MA, EUA) com velocidade de 0,5 mm/min (Figura 4.6).

Figura 4.6 – Ensaio de microtração. Palito (dente-adesivo-resina composta) fixado no Jig e posicionado na máquina de ensaio universal



Fonte: O autor.

Após 1 ano de armazenagem em água destilada, reposta semanalmente, foi simulado o envelhecimento dos palitos. O ensaio de microtração foi realizado como descrito em 4.6.2.

## 4.6.3 Análise dos padrões de fratura

Após os ensaios, as superfícies de fratura foram analisadas em lupa estereoscópica (SZ2-ILST, Olympus SZ61, Tóquio, Japão), sob aumento de 40x, para classificação dos padrões de fratura em: adesiva, coesiva em resina, coesiva em dentina ou mista.

#### 4.6.4 Estatística da resistência de união

Foi aplicado o teste de normalidade (Shapiro-wilk) e homocedasticidade (Levene), bem como Análise de variância (ANOVA) de três fatores (concentração NAg, concentração NHA e envelhecimento) e teste de Tukey (p<0,05).

## 4.7 CARACTERIZAÇÃO DA INTERFACE ADESIVA

#### 4.7.1 Microscopia Confocal Raman (MCR)

Após a realização do procedimento adesivo e restaurador (n=2), conforme descrito no item 4.6, foi realizado um corte no sentido longitudinal no dente restaurado. As metades dos dentes foram embutidas com resina epóxica em matriz de silicone, e o polimento foi realizado com lixas de carbeto de silício: #400, #600, #1200, #1500, #2000 e #4000.

Para análise da interface adesiva e da composição da mesma, foi utilizado um Microscópio Confocal Raman Witec, alpha 300R (

Figura 4.7), operado com laser Nd:YAG (I = 532 nm, P = 100 mW/cm2). Foram realizadas varreduras por ponto em uma área de 25x40  $\mu$ m e a plataforma apresentava deslocamento nos eixos X, Y e Z. Foram obtidas imagens ópticas e hiperespectrais, com auxílio de objetiva Nikon (100 x NA=0.8), com laser a 25mW/cm<sup>2</sup>, tempo de 0,02 s por ponto, e detector EMCCD. Assim, para aquisição das imagens Raman, seguiu-se como parâmetro bandas referenciadas na literatura, através da mensuração dos seus picos máximos.



Figura 4.7 – Microscópio confocal Raman

Fonte: O autor.

# 4.8 EFEITO ANTIMICROBIANO

Este capítulo foi dividido em seções.

# 4.8.1 Difusão em Ágar com template

Para o ensaio de difusão em ágar com template, os seguintes grupos experimentais (n=3) foram avaliados:

- SBMP primer (P0);
- SBMP *primer* com NAg 0,05% (P0.05)
- SBMP *primer* com NAg 0,1% (P0.1)
- SBMP bond (B0);
- SBMP bond com NAg 0,05% (B0.05)
- SBMP bond com NAg 0,1% (B0.1)
- SBMP primer+bond (P0+B0);
- SBMP primer com NAg 0,05% + SBMP bond com NAg 0,05% (P0.05+B0.05);
- SBMP primer com NAg 0,1% + SBMP bond com NAg 0,1% (P0.1+B0.1).

Este ensaio foi realizado no Laboratório de Extração, Núcleo de Pesquisas em Biodiversidade (NPBio), Universiddae Paulista (UNIP) em ambiente estéril sob a presença de Bico de Busen. Em todos os experimentos foram utilizadas cepas de *Streptococcus mutans* ATTCC 25175 na 4<sup>a</sup> passagem (P4).

O meio de cultivo empregado foi o *Brain Hearth Infusion* (BHI), utilizado de acordo com as instruções do fabricante. Após pesagem do pó e dissolução em água, o meio foi esterilizado em autoclave à 121 °C. Foram depositados 15 mL de meio em cada placa de Petri (12 cm) e, após geleificação, armazenado em geladeira. As células bacterianas foram estriadas em meio de cultivo por esgotamento, e mantidas em estufa bacteriológica por 48h à 37 °C.

Para preparar a suspensão bacteriana, colônias de bactérias foram removidas do meio de cultivo, com auxílio de alças, e depositadas em tubo de ensaio com 9 mL de soro fisiológico até se obter uma concentração de, no mínimo, 6 McFarland. A partir desta concentração, as suspensões bacterianas foram vortexadas por 1 min e diluídas seriadamente em soro fisiológico (9mL) até chegar a uma concentração de 0,5 McFarland ou 1,5 x 10<sup>8</sup> UFC/ml.

Sobre a placa de Petri com meio BHI, foi inoculada a suspensão de 0,5 Mc Farland, com auxílio de *swab* estéril, pela técnica de esgotamento. Logo, um *template* com 6mm de diâmetro foi colocado sobre o meio/cepas bacterianas, e 10 µL de *primer*, *bond* ou *primer+bond*, foram depositados no poço formado pelo *template*. Posteriormente, tais placas foram colocadas em estufa bacteriológica por 48h à 37 °C. Após este período, foi realizada a leitura do halo de inibição bacteriano, através de leituras no sentido horizontal e vertical, com auxílio de paquímetro digital ( Figura 4.8).



Figura 4.8 – Desenho esquemático de placa de ágar com os halos de inibição

Fonte: O autor.

# 4.8.2 Análise estatística do teste de difusão em ágar

Foi realizado o teste de normalidade (Shapiro-Wilk), ANOVA e teste de Tukey (p<0,05).

#### 4.8.3 Efeito dos biomateriais sobre biofilmes de S. mutans

Tabela 4.1 – Grupos experimentais para o teste de efeito antimicrobiano por contagem de unidades formadoras de colônias

Grupos (n=6)

SBMP - controle (P0+B0)

SBMP + NAg 0,05% (P0.05+B0.05)

SBMP + NAg 0,1% (P0.1+B0.1)

Fonte: O artor.

4.8.3.1 Preparo dos corpos de prova

Foram utilizados os grupos experimentais de acordo com a Figura 4.1 Uma matriz de teflon bipartida (8 mm x 2 mm) foi posicionada sobre uma placa de vidro, aplicados o *primer* e *bond*, fotopolimerizados por 20s, e inserido único incremento de resina composta Z350 XT A2B, e fotopolimerizada por 1 min (Valo Cordless, Ultradent, South Jordan, Estados Unidos). Após confecção dos corpos de prova (discos de *primer/bond/*resina composta), os mesmos foram colocados em água destilada, sob agitação magnética por 1h, para remoção dos monômeros não curados. Logo, foram secos, embalados e encaminhados ao Irradiador Multipropósito de <sup>60</sup>Co do Centro de Tecnologia das Radiações (CTR) do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN), para esterilização dos mesmos com dose de 25kGy.

#### 4.8.3.2 Formação do biofilme de Streptococcus mutans

Foi utilizada a cepa de *S.mutans* UA 159 para formação do biofilme sobre os discos *primer/bond/*resina composta por um período de 48 h. Essa cepa foi inicialmente descongelada e culivada em caldo TSB (*Tryptic Soy Broth*) suplementado com 1% de sacarose, em câmara com 5% de CO<sub>2</sub> a 37 °C por 24h. Uma alíquota de 2 mL da suspensão bacteriana foi transferida para um tubo com 40 mL de meio TSB + 1% de sacarose e cultivada nas condições anteriores por mais 24 h. Foi realizada a leitura de densidade óptica em espectrofotômetro com comprimento de onda de 660mm e a absorbância foi ajustada para 1. Então, 500 µl dessa supensão bacteriana foi transferida para um tubo com 4,5 mL de meio TSB + 1% de glicose e cultivada por 3h para atingir a fase *mid-log*, ou seja, a fase intermediária do crescimento exponencial (Bueno-Silva et al., 2013)(79). Nessa fase, foi realizada a leitura da absorbância (0,6), seguida da diluição seriada para a contagem das unidades formadoras de colônias (1 x 10<sup>7</sup> UFC). Esse inóculo bacteriano foi utilizado para iniciar a formação dos biofilmes sobre os discos *primer/bond/*resina composta. Foram realizados 2 experimentos em dias independentes, em triplicata para cada grupo.

Cada disco foi coberto com 100  $\mu$ L de saliva humana, clarificada e filtrada, por 1h a 37 °C antes da colocação do inóculo bacteriano (Bueno-Silva et al., 2013)(79). Em seguida, os discos foram posicionados em uma placa de 24 poços, com a face voltada para cima, e inoculado com 100  $\mu$ L da suspensão bacteriana (fase *mid-log*) e 900  $\mu$ l de TSB + 1% de sacarose, em câmara com 5% de CO<sub>2</sub> a 37 °C por 24h. Após esse período, foi realizada a remoção de todo o meio e acrescentado 1000  $\mu$ L de TSB + 1% de sacarose, que foi cultivado por mais 24h.

Após a formação do biofilme por 48h, os discos foram transferidos para uma nova placa de 24 poços, onde foi realizada uma lavagem com 1000 µL de tampão PBS (*phosphate buffered saline*) para remoção das células bacterianas não-aderidas. A seguir, os discos foram transferidos para tubos contendo 1000 µL de PBS e colocados em uma cuba ultrassônica por 10 min. Essas suspensões bacterianas foram agitadas em vortex por 1min e foram realizadas diluições seriadas para contagem de UFC em placas de ágar TSB. A contagem bacteriana foi realizada em triplicata para cada corpo de prova.

4.8.3.3 Análise estatística

Após contagem de UFC, foi realizado o teste de normalidade (Shapiro-Wilk), e ANOVA (p<0,05).

4.9 CITOTOXICIDADE

#### 4.9.1 Grupos experimentais

Para o ensaio de citotoxicidade, os grupos experimentais descritos na tabela 4.2 foram avaliados.

Grupos	Não polimerizados	Polimerizados		
Controle				
Meio de cultura sem eluentes dos adesivos (100% de viabilidade celular)	-	-		
	Primer (P0 N)	-		
SBMP	Bond (B0 N)	B0 P		
	Primer & Bond (P0+B0 N)	P0+B0 P		
	P + NAg 0.05% (P0.05 N)	-		
SBMP + NAg 0,05%	$B + NAg \ 0.05\% \ (B0.05 \ N)$	B0.05 P		
	$P\&B + NAg \ 0.05\% \ (P0.05+B0.05 \ N)$	P0.05+B0.05 P		
	P + NAg 0.1% (P0.1 N)	-		
SBMP + NAg 0,1%	B + NAg 0.1% (B0.1 N)	B0.1P		
	P&B + NAg 0.1% (P0.1+B0.1 N)	P0.1+B0.1P		

Tabela 4.2 - Grupos experimentais para os testes de citotoxicidade

Fonte: O autor.

# 4.9.2 Cultura de células

Foram utilizadas células tronco da polpa dentária (DPSCs) previamente isoladas e caracterizadas(99), que foram doadas pelo Banco de Células da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo (FOUSP), que se encontravam congeladas no Laboratório de Pesquisas Básicas do Departamento de Dentística da FOUSP. As células foram descongeladas em banho de água a 37 °C por 2 minutos e foram cultivadas em meio de cultura clonogênico composto por: α-MEM (GIBCO/Life Technologies, Grand Island, NY, EUA) suplementado com concentrações finais de 15% de soro fetal bovino (MSC-FBS, Gibco), 100 U/ml de solução de antibióticos (penicilina + estreptomicina; Pen Strep, Gibco), 2 mM de L-glutamina (Gibco) e 0,1 mM de solução de ácido ascórbico (Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO, EUA). As células foram incubadas a 37 °C numa atmosfera úmida contendo 95 % de ar e 5 % de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) e expandidas até no máximo 6 passagens (P6).

A monitorização do crescimento celular foi realizada diariamente em microscópio invertido de fase e o meio de cultivo trocado a cada 2 ou 3 dias, de acordo com o metabolismo celular. Os subcultivos foram feitos quando as células atingiram a subconfluência (aproximadamente 70 a 80 % do fundo da placa ocupado por células), de acordo com a Figura 4.9. As células foram destacadas com enzima proteolítica, solução de tripsina a 0,25% (LGC Biotecnologia, Cotia, SP, Brasil), transferidas para um tubo de ensaio e centrifugadas. As células foram ressuspensas e replaqueadas em novos frascos, criando novas passagens da cultura. Com o intuito de manter a menor passagem possível, foram realizados estoques congelados de alíquotas de células de primeira à sexta passagens (P1 a P6).

Todos os procedimentos de cultivo celular foram realizados em capela de fluxo laminar, seguindo os protocolos de esterilidade dos materiais e soluções Figura 4.9 – Imagem obtida de microscópio invertido de fase, onde observa-se as células tronco da polpa dentária em meio de cultivo



Fonte: O autor.

## 4.9.3 Condicionamento do meio de cultivo

A citotoxicidade dos adesivos foi analisada através do contato de meios de cultura condicionados por estes materiais com as células em cultura. Esses meios condicionados apresentavam em sua composição substâncias extraídas ou dissolvidas dos adesivos. Assim sendo, esse teste *in vitr*o analisou a resposta das células em cultura a substâncias liberadas pelos adesivos em meio líquido, como ocorre *in viv*o.

O teste de citotoxicidade foi realizado de acordo com Bianchi, 2013(91), mediante adaptações. Brevemente, para condicionar o meio de cultivo foram utilizados discos de papel filtro estéreis (5mm de diâmetro x 0,5mm de espessura) após aplicação de 5 µL de *primer*, 5 µL de adesivo. A fotoativação, quando aplicável, foi realizada com aparelho LED (Valo Cordless, Ultradent, South Jordan, EUA), por 20 s, e a ponta posicionada 2 mm acima do disco de papel(91). O condicionamento dos meios dos grupos não polimerizados foi realizado durante 1h antes de sua aplicação nas células, enquanto que para os grupos polimerizados o condicionamento foi realizado durante

24h após a polimerização e, a seguir foram aplicados nas células. O condicionamento dos meios se deu em incubadora em atmosfera úmida contando 5 % de CO<sub>2</sub> a 37 °C (Figura 4. 10). Os discos contendo os monômeros foram colocados em tubos tipo falcon com acréscimo de meio de cultivo fresco (1disco/mL de meio). Após o período de incubação, os meios condicionados foram diluídos em cinco concentrações [0% (controle positivo), 25%, 50%, 75% e 100%].

Figura 4. 10 – Tubos em câmara de CO<sub>2</sub> a 5%, para condicionamento do meio contendo discos de papel com os adesivos polimerizados ou não (de acordo com o grupo experimental) colocados em meio de cultivo



Fonte: O autor.

## 4.9.4 Avaliação da citotoxicidade

A viabilidade celular foi avaliada pelo teste de redução do MTT (3-(brometo de 4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolio). Este teste mensura a atividade mitocondrial celular(100).

As células foram semeadas em uma placa de 96 poços (10<sup>4</sup> células por poço) e incubadas por 24h a 37 °C em atmosfera contendo 5% de CO<sub>2</sub>, sob umidade. Após este período, os meios de cultura foram substituídos por meio não condicionado (controle) ou meio condicionado (demais grupos) nas suas diferentes concentrações. Vinte e quatro horas após o contato das células com os diferentes meios testados foi realizado o ensaio de redução de MTT. O MTT solúvel em água, foi reduzido a

formazana púrpura (insolúvel em água),(28) que foi solubilizada e sua concentração determinada pela densidade óptica, medida através da leitura em espectrofotômetro com comprimento de onda de 562 nm (Figura 4.11).

Os dados de densidade óptica serviram para a realização da análise estatística. Para a ilustração gráfica dos resultados, as densidades ópticas foram transformadas em porcentagens de viabilidade celular tendo a densidade óptica média do grupo controle positivo sido considerada como 100% de viabilidade.

Figura 4.11 – Fotografias ilustrando a realização do ensaio de MTT. À esquerda, a aplicação do meio de cultivo nos poços e à direita o posicionamento da placa no espectrofotômetro



Fonte: O autor.

## 4.9.5 Análise estatística

Após obtenção dos valores de densidade óptica, os dados foram submetidos aos testes de normalidade (Shapiro-Wilk) e, de acordo com a distribuição dos dados, aplicados os testes de ANOVA e Tukey ou Kruskal-Wallis e Student-Newman-Keuls (p<0,05).

## 5 RESULTADOS

Este capítulo foi dividido em seções.

# 5.1 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS

Este capítulo foi dividido em seções.

## 5.1.1 Espalhamento de luz dinâmico (DLS)

O resultado da distribuição de tamanho das nanopartículas de hidroxiapatita estão apresentados na Figura 5.1. As NHA apresentaram tamanho médio de 79,4 nm.



Figura 5.1 – Gráfico de distribuição de tamanho obtido por espalhamento de luz dinâmico (DLS) mostrando o tamanho médio das nanopartículas de hidroxiapatita funcionalizadas

Fonte: O autor.

#### 5.1.2 Fluorescência de raios X por reflexão total (TRXF)

A Figura 5.2 demonstra a composição elementar das NHA. Os elementos Cálcio (Ca = 206,7 mg/l) e Fósforo (P =110,2 mg/l) foram encontrados em maiores concentrações e a razão de Ca/P foi de 1,9. O elemento titânio (Ti) foi adicionado no momento da análise em concentração conhecida e utilizado como padrão de referência para determinação da concentração dos demais elementos. Os elementos silício (Si) e argônio (Ar) são provenientes do porta amostra e do ar; os elementos ferro (Fe), níquel (Ni) e zinco (Zn) foram detectados como traços de impureza na amostra.

#### Figura 5.2 – Fluorescência de raio-X por reflexão total (TRXF) das nanopartículas de hidroxiapatita

BRUKER

#### S2 PICOFOX - TRACE ELEMENT ANALYSIS

Listed at 13/06/2017 14:06:32

User: Administrator	Serial number: 422301114
Sample:	ID-No.:
Disc:	Quant. type: Liquid
Meas.date: 13/06/2017 11:56:45	Live time: 180 s
Count rate: 6416 cps	Dead time: 1.7 %
Voltage: 50 kV	Current: 596 µA
Excitation: Mo K radiation	
Spectrum: HAP_DEO_170613_99p2mg_	diluido 100x_Ti_100mg_L_180s
Method: Sergio (Profile bayes normal fit)	

Comment:

Element	Line	Conc./	Sigma/	RSD/	LLD/	Net area	Backgr.	Chi
		mg/l	mg/l	%	mg/l			
Si	K12	366.3	2.2	0.6	0.0	28459		3.86
P	K12	110.24	0.83	0.8	0.01	17599		1.50
Ar	K12	4.701	0.088	1.9	0.065	3287	229	10.18
Ca	K12	206.68	0.35	0.2	0.04	346808	511	2.52
Ti (IS)	K12	100.00	0.19	0.2	0.02	285486	493	4.02
Fe	K12	0.248	0.006	2.5	0.004	1767	81	1.60
Ni	K12	0.017	0.002	10.4	0.003	175	77	3.80
Zn	K12	0.052	0.002	4.1	0.002	698	65	2.26
Sr	K12	Not det.			0.009	1	5375	1.31



Fonte: O autor.

A Figura 5.3 apresenta a composição elementar das NAg. Os elementos titânio (Ti) e gálio (Ga) foram adicionados no momento da análise em concentrações conhecidas e utilizados como padrões de referência para determinação da concentração dos demais elementos. Os elementos silício (Si) e argônio (Ar), são provenientes do porta amostra e do ar. A prata se apresentou como elemento majoritário (Ag= 196 mg/l) e os elementos ferro (Fe), niquel (Ni), zinco (Zn), selênio

(Se), bromo (Br) e estrôncio (Sr) foram detectados como traços de impureza na amostra.

Element	Line	Conc./	Sigma/	RSD/	LLD/	Net area	Backgr.	Chi
		mg/l	mg/l	%	mg/l			
Si	K12	650,8	5,1	0,8	0,4	31676	46	2,45
CI	K12	5,51	0,16	2,9	0,11	1636	112	1,42
Ar	K12	2,779	0,098	3,5	0,098	1217	207	1,04
К	K12	1,310	0,057	4,4	0,070	925	276	1,88
Ca	K12	9,83	0,12	1,2	0,05	10332	301	1,03
Ti (IS)	K12	50,00	0,28	0,6	0,03	89433	238	1,52
V	K12	0,192	0,012	6,4	0,016	429	142	4,79
Fe	K12	0,509	0,012	2,4	0,005	2275	56	1,44
Ni	K12	0,045	0,004	8,7	0,006	294	162	5,57
Zn	K12	2,600	0,024	0,9	0,006	22053	273	1,57
Ga	K12	23,38	0,10	0,4	0,01	227619	271	7,33
Se	K12	0,023	0,002	7,5	0,002	291	78	3,17
Br	K12	0,009	0,001	15,3	0,002	119	102	1,81
Sr	K12	0,014	0,002	15,7	0,004	206	405	3,78
Ag	L1	196,9	1,4	0,7	0,2	40244	212	1,90

Figura 5.3 – Composição elementar por Fluorescência de raio-X por reflexão total (TRXF) das nanopartículas de prata



Fonte: O autor.

#### 5.1.3 Difratometria de raio X (DRX)

A Figura 5.4 exibe um difratograma de análise das nanopartículas de hidroxiapatita. A NHA exibe estrutura cristalina hexagonal evidenciada pelos picos 23,3, 25,9, 29,3 e 32,2, nos planos 211, 002, 2010 e 300, respectivamente(101). E apresenta semelhança àquela hidroxiapatita produzida pela técnica de sol-gel executada por Besinis, 2012(19).

Figura 5.4 - Resultado da difratometria de raio-X (DRX) das nanopartículas de hidroxiapatita



A Figura 5.5 mostra o difratograma daa nanopartículas de prata. A análise indica a presença de NAg cristalina na fase cúbica de face centrada (CFC) referenciada pelos planos 111 a 38,1°, 200 a 44,2°, e 220 a 64,4° (102).




Fonte: O autor.

## 5.1.4 Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM)

A Figura 5.6 apresenta a TEM das nanopartículas de hidroxiapatita. As NHA apresentaram estrutura prismática e comprimento inferior a 100 nm.

Figura 5.6 – Imagem de microscopia eletrônica de transmissão (TEM) das nanopartículas de hidroxiapatita



Fonte: O autor.

As Figura 5.7 e a Figura 5.8 exibem a TEM das nanopartículas de prata com aspecto esférico, elevada dispersão e ausência de aglomerados. A Figura 5.9 demonstra o histograma de distribuição das NAg com tamanho médio de aproximadamente 16 nm.

Figura 5. 7 – Imagem de microscopia eletrônica de transmissão (TEM) das nanopartículas de prata



Fonte: O autor.

Figura 5.8 – Imagem de microscopia eletrônica de transmissão (TEM) da nanopartículas de prata (NAg) em maior aumento



Fonte: O autor.

Figura 5.9 – Histograma obtido por microscopia eletrônica de transmissão (TEM) das nanopartículas de prata



Fonte: O autor.

# 5.2 RESISTÊNCIA DE UNIÃO À DENTINA

Este capítulo foi dividido em seções.

#### 5.2.1 Ensaio de microtração e padrões de fratura

A análise estatística da resistência de união está apresentada na Tabela 5.1 A Figura 5.10 apresenta os resultados de resistência de união imediata (24h) da confecção dos corpos de prova e armazenados por 1 ano em água destilada. A

Figura 5.11 exibe os padrões de fratura, e a Tabela 5.2 faz a compilação dos resultados de resistência de união e padrões de fratura.

A análise de variância de três fatores (1. Pre-tratamento com NHA (0%; 0,5% e 1%); 2. NAg (0%; 0,05% e 0,1%); 3. Tempo (24h e 1 ano)) demonstrou que não houve

diferença estatisticamente significante para nenhum dos fatores ou interações testados (Figura 5.1).

Nos grupos de 24h houve predominância de fraturas adesivas (75% para o controle e 90% para o grupo 0.1NAg). As fraturas mistas representaram entre 6% (0.1 NAg) e 19% (0.5 NHA) das falhas observadas. As fraturas coesivas em resina e coesivas em dentina ocorreram com menor frequencia.

Após 1 ano de armazenagem, também houve predominância de fraturas adesivas (59% para o grupo 0.5 NHA e 90% para o grupo 0.1 NAg), seguidas das fraturas mistas, exceto nos grupos 0.5 NHA e 1 NHA + 0.05 NAg, que tiveram 25% de fratura coesiva em resina e 10% de fratura coesiva em dentina, respectivamente.

Fator		Тіро	Níveis	Valo	res	
NHA		Fixo	3	0,0; 0,	5; 1,0	
NAg		Fixo	3	0,0; 0,5; 1,0		
Tempo		Fixo	2	1ano; 24h		
Análise de Variância						
Fonte	DF	Adj SS	Adj MS	Valor de F	Valor de p	
NHA	2	62,29	31,14	0,38	0,685	
NAg	2	444,15	222,08	2,72	0,073	
Tempo	1	133,68	133,68	1,64	0,205	
NHA x NAg	4	307,01	76,75	0,94	0,447	
NHA x Tempo	2	399,28	199,64	2,44	0,094	
NAg x Tempo	2	140,66	70,33	0,86	0,427	
NHA x NAg x Tempo	4	87,76	21,94	0,27	0,897	
Erro	72	5885,89	81,75			
Total	89	7460,72				

Tabela 5.1 – Análise de Variância da resistência de união

Fonte: O autor.



Figura 5.10 - Resistência de união imediata e após 1 ano de armazenagem

Grupos

Fonte: O autor.

Figura 5.11 – Tipos de fratura classificadas como: A) adesiva; M) mista; CR) coesiva em resina e CD) coesiva em dentina



Fonte: O autor.

Tabela 5.2 – Média ± desvio padrão (DP) da resistência de união e tipos de fratura (A: adesiva; M: mista; CR: coesiva em resina; CD: coesiva em dentina) mensurados em 24h e após 1 ano de armazenagem.

	24 h				1 ano					
Grupo	Média ± DP	Fratura (%)				Fratura (%)				
		А	М	CR	CD	Média ± DP	А	М	CR	CD
SBMP	51,90 (9,19)	75	13	11	2	52,37 (10,77)	68	18	14	0
0.5 NHA	59,13 (5,64)	78	19	2	2	54,74 (7,53)	59	7	25	9
1 NHA	58,63 (11,01)	84	10	4	1	54,36 (9,80)	68	10	9	14
0.05 NAg	54,76 (5,73)	80	15	3	2	62,42 (4,42)	81	15	4	0
0.5 NHA + 0.05 NAg	49,61 (7,21)	82	14	4	0	49,94 (11,29)	80	15	4	2
1 NHA + 0.05 NAg	51,00 (7,67)	84	14	0	2	56,89 (6,58)	80	2	8	10
0.1 NAg	45,15 (6,99)	90	6	4	0	48,23 (9,06)	90	6	4	0
0.5 NHA + 0.1 NAg	46,36 (3,93)	88	12	0	0	45,31 (7,60)	78	14	8	0
1 NHA + 0.1 NAg	48,75 (14,56)	85	15	0	0	50,96 (20,09)	87	5	5	3

Fonte: O autor.

## 5.3 CARACTERIZAÇÃO DA INTERFACE ADESIVA

Este capítulo foi dividido em seções.

## 5.3.1 Microscopia Confocal Raman (MCR)

A Tabela 5.3 apresenta as principais bandas de vibração analisadas na microscopia confocal Raman. Entre a Figura 5.12 e a Figura 5.26 são apresentadas imagens da interface adesiva, imagens microscópicas de *tags* resinosos, dentina, interface, bem como respectivos espectros Raman referentes a resina, dentina e interface.

Tabela 5.3 – Principais elementos espectrais observados a partir de bandas indexadas por Toledano, 2017(37).

Elementos	Picos
Hidroxiapatita (fosfato)	960 cm <sup>-1</sup>
Colágeno (amida I)	1655/1667 cm <sup>-1</sup>
Bis-GMA (grupamento C-O-C)	1113 cm <sup>-1</sup>

Figura 5.12 – Grupo SBMP (controle): A) Imagem ótica da interface adesiva. B) Contraste para evidenciar a presença de *tags* resinosos. C) Contraste para evidenciar a dentina. D) Associação das imagens B e C. E) Espectros: E1. Resina, E2. Dentina, E3. Interface



В С D А E3 E1 E2 CCD cts 740 7. 1600 2000 rel. 1/cm 1600 2000 rel. 1/cm 1600 2000 rel. 1/cm Fonte: O autor.

Figura 5.13 – Grupo NHa 0,5% + SBMP: A) Imagem ótica da interface adesiva. B) Contraste para evidenciar a presença de *tags* resinosos. C) Contraste para evidenciar a dentina. D) Associação das imagens B e C. E) Espectros: E1. Resina, E2. Dentina, E3. Interface

Figura 5.14 – Grupo NHA 1% + SBMP: A) Imagem ótica da interface adesiva. B) Contraste para evidenciar a presença de *tags* resinosos. C) Contraste para evidenciar a dentina. D) Associação das imagens B e C. E) Espectros: E1. Resina, E2. Dentina, E3. Interface



<u>%</u>

Figura 5.15 – Grupo SBMP com NAg 0,05% A) Imagem ótica da interface adesiva. B) Contraste para evidenciar a presença de *tags* resinosos. C) Contraste para evidenciar a dentina. D) Associação das imagens B e C. E) Espectros: E1. Resina, E2. Dentina, E3. Interface



Figura 5.16 – NHA 0,5% + SBMP com NAg 0,05% A) Imagem ótica da interface adesiva. B) Contraste para evidenciar a presença de *tags* resinosos. C) Contraste para evidenciar a dentina. D) Associação das imagens B e C. E) Espectros: E1. Resina, E2. Dentina, E3. Interface



igura 5.17 – SBMP com NAg 0,1%: A) Imagem ótica da interface adesiva. B) Contraste para evidenciar a presença de *tags* resinosos. C) Contraste para evidenciar a dentina. D) Associação das imagens B e C. E) Espectros: E1. Resina, E2. Dentina, E3. Interface







Figura 5.19 – NHA 1% + SBMP com NAg 0,1%: A) Imagem ótica da interface adesiva. B) Contraste para evidenciar a presença de *tags* resinosos. C) Contraste para evidenciar a dentina. D) Associação das imagens B e C. E) Espectros: E1. Resina, E2. Dentina, E3. Interface.







Figura 5.20 – Grupo SBMP: Interface adesiva evidenciando a hidroxiapatita (PO<sub>4</sub>-<sup>3</sup>), colágeno (amida I) e adesivo/resina (Bis-GMA)



Figura 5.21 – Grupo NHA 0,5%: Interface adesiva evidenciando a hidroxiapatita (PO<sub>4</sub>-3), colágeno (amida I) e adesivo/resina (Bis-GMA)

Fonte: O autor.



Figura 5.22 – Grupo NHA 1%: Interface adesiva evidenciando a hidroxiapatita (PO4-3), colágeno (amida I) e adesivo/resina (Bis-GMA)

Fonte: O autor.

97





Fonte: O autor.



Figura 5.24 – NHa 0,5% + SBMP com NAg 0,05%: Interface adesiva evidenciando a hidroxiapatita (PO4-3), colágeno (amida I), adesivo/resina (Bis-GMA) e nanopartículas de prata (NAg)

Fonte: O autor.








Fonte: O autor.

## 5.4 EFEITO ANTIBACTERIANO

Este capítulo foi dividido em seções.

## 5.4.1 Difusão em Ágar com template

As médias e desvios padrão dos diâmetros do halo de inibição estão descritos na Figura 5.27 e Tabela 5.4. Os grupos com *primer* ou *bond*, em diferentes concentrações, apresentaram médias estatisticamente similares entre si. Além disso, ao associar P0+B0 houve um discreto aumento no halo de inibição, com média estatisticamente similar a do P0.05 e B0.05. Porém, ao incorporar diferentes concentrações de nanopartículas de prata (NAg) nos grupos P0.05+B0.05 e P0.1+B0.1, foi observado maior efeito antimicrobiano, com valores estatisticamente similares entre si, e superiores aos demais grupos que utilizaram *primer* ou *bond* isoladamente (p < 0.01) ou *primer + bond* sem adição de nanopartículas (p < 0.05).



Figura 5.27 - Halo de inibição bacteriana de acordo com os grupos experimentais

Fonte: O autor.

Grupo	Média ± DP	Grupo	Média ± DP	Grupo	Média ± DP
P0	6 89 (0 45) a	B0	7 43 (1 01) a	P0+B0	8 75 (0 88) b
10	0,00 (0,40) a	DU	7,40 (1,01) u	10100	0,70 (0,00) 0
P0.05	7,88 (0,45) ab	B0.05	7,99 (0,79) ab	P0.05+B0.05	10,18 (0,46) c
P0.1	7,33 (0,23) a	B0.1	6,99 (0,58) a	P0.1+B0.1	9,97 (0,59) c
*Letras	iguais significam se	melhanç	a estatística entre o	s grupos.	

Tabela 5.4 – Atividade bactericida de acordo com halo de inibição (mm), Média ± desvio padrão (DP) segundo ANOVA e Tukey

Fonte: O autor.

## 5.4.2 Efeito dos biomateriais sobre biofilmes de S. mutans

A Figura 5.28 mostra a população bacteriana viável recuperada dos biofilmes de S. mutans sobre os corpos de prova, que foi determinada pela contagem de UFC. Embora a adição de NAg, em ambas as concentrações, tenha promovido um decréscimo de 2 vezes no total de bactérias quando comparada ao controle, não foi observada diferença significativa entre os grupos (p = 0,06).

Figura 5.28 – Influência da adição de NAg na população viável de *S. mutans* em biofilmes (médias ± DP das UFC/ml). A análise estatística foi realizada pelo teste ANOVA (p<0,05). Letras iguais indicam semelhança entre os grupos



Fonte: O autor.

## 5.5 CITOTOXICIDADE

A Figura 5.29 apresenta as médias e desvios padrão (DP) da porcentagem de viabilidade celular em resposta aos meios condicionados pelos adesivos não polimerizados aplicados nas 5 concentrações testadas. Houve diminuição da viabilidade celular com o aumento da concentração dos meios condicionados. Na Figura 5.30 estão apresentadas médias e os DP das porcentagens de viabilidade celular dos grupos polimerizados.

Figura 5.29 – Representação gráfica das porcentagens médias de viabilidade de DPSCs em função das diferentes concentrações de meios condicionados por *primer* e/ou *bond* não polimerizados. Barras indicam o desvio padrão



Fonte: O autor.

Todos os grupos quando aplicados em concentrações iguais ou superiores a 75% levaram a uma viabilidade celular inferior a 50%. Os grupos que associaram *primer* e *bond*, levaram à viabilidade celular menor que 50% já em concentração mais baixa (50%), exceto quando o *primer* e o *bond* continham NAg 0,1% (Figura 5.29). O grupo P0.1 N apresentou viabilidade significativamente maior que o grupo P0 N quando a concentração do meio condicionado foi de 25% (Tabela 5. 5, Tabela 5. 6,Tabela 5. 7,Tabela 5. 8).

Grupo	Não polimerizados			
	Diluição	Viabilidade celular		
P0	75%	26,29%		
B0	75%	38,92%		
P0+B0	50%	42,14%		
P0.05	75%	34,68%		
B0.05	75%	42,07%		
P0.05+B0.05	50%	41,79%		
P0.1	75%	35,71%		
B0.1	75%	40,22%		
P0.1+B0.1	75%	14,08%		

 Tabela 5. 5 – Dados das porcentagens de viabilidades inferiores a 50% em relação às concentrações dos meios condicionados dos grupos não polimerizados.

Fonte: O autor

Tabela 5. 6 – Comparações entre os dados de viabilidade de DPSCs submetidas ao contato com meios condicionados por *primer* não polimerizados. Comparação entre linhas (concentração dos meios) e colunas (grupos experimentais). Média e desvio padrão da densidade óptica (nm) resultante do teste de redução do MTT, segundo ANOVA e Tukey

0		Diluições		
Grupo	25%	50%	75%	100%
P0 N	0,5902 (0,1141) Aa	0,5172 (0,0991) Aa	0,2629 (0,0858) Ab	0,1375 (0,0456) Ab
P0.05 N	0,7249 (0,0679) ABa	0,6442 (0,0605) Aab	0,3468 (0,0388) Ac	0,1714 (0,0564) Ad
P0.1 N	0,7937 (0,0681) Ba	0,6304 (0,0861) Ab	0,3571 (0,1042) Ac	0,1351 (0,0265) Ad
*Lotros minúsculos iguais ( r	macma linha) cignificam comolhanga	ostatística. Latras majúsquilas iguai	ic (mocmo coluna) cignificom	

\*Letras minúsculas iguais (mesma linha) significam semelhança estatística. Letras maiúsculas iguais (mesma coluna) significam semelhança estatística.

### Fonte: O autor

Tabela 5. 7 – Comparações entre os dados de viabilidade de DPSCs submetidas ao contato com meios condicionados por *bond* não polimerizados. Comparação entre linhas (concentração dos meios) e colunas (grupos experimentais). Média e desvio padrão da densidade óptica (nm) resultante do teste de redução do MTT, segundo Kruskal-Wallis e Student-Newman-Keuls

Crumo	Diluições			
Grupo	25%	50%	75%	100%
B0 N	0,7051 (0,0899) Aa	0,6898(0,0833) Aab	0,3892 (0,0866) Abc	0,2434 (0,0616) Ac
B0.05 N	0,8881 (0,0943) Aa	0,6784 (0,0701) Aab	0,4207 (0,0945) Abc	0,2238 (0,0531) Ac
B0.1 N	0,8503 (0,0974) Aa	0,7058 (0,1229) Aab	0,4022 (0,1144) Ab	0,2253 (0,0656) Abc

\*Letras minúsculas iguais (mesma linha) significam semelhança estatística. Letras maiúsculas iguais (mesma coluna) significam semelhança estatística.

Fonte: O autor

Tabela 5.8 – Comparações entre os dados de viabilidade de DPSCs submetidas ao contato com meios condicionados por *primer* e *bond* não polimerizados. Comparação entre linhas (concentração dos meios) e colunas (grupos experimentais). Média e desvio padrão da densidade óptica (nm) resultante do teste de redução do MTT, segundo Kruskal-Wallis e Student-Newman-Keuls

Grupo		Diluições		
Grupo	25%	50%	75%	100%
P0+B0 N	0,6113 (0,1226) Aa	0,4215 (0,1017) Aa	0,1330 (0,0410) Ab	0,1069 (0,0375) Ab
P0.05+B0.05 N	0,6393 (0,1695) Aa	0,4179 (0,0968) Aa	0,1017 (0,0078) Ab	0,1100 (0,0296) Ab
P0.1+B0.1 N	0,7381 (0,1082) Aa	0,5006 (0,1213) Aab	0,1408 (0,0200) Ac	0,1458 (0,0463) Ac
*Letras minúsculas iguais ( me	sma linha) significam semelhança	estatística. Letras maiúsculas iguai	s (mesma coluna) significam	

semelhança estatística.

## Fonte: O autor

A Figura 5.30 apresenta as médias e desvios padrão (DP) da porcentagem de viabilidade celular em resposta aos meios condicionados pelos adesivos polimerizados aplicados nas 5 concentrações testadas. Houve diminuição da viabilidade celular com o aumento da concentração dos meios condicionados. Todos os grupos *bon*d apresentaram viabilidades superiores a 50% independentemente da concentração. Os grupos *primer+bond* apresentaram viabilidades celulares inferiores a 50% quando aplicados em concentrações maiores que 75% (Tabela 5.9,Tabela 5.10,

Tabela 5.11)

Figura 5.30 – Representação gráfica das porcentagens médias de viabilidade de DPSCs em função das diferentes concentrações de meios condicionados por *primer* e/ou *bond* polimerizados. Barras indicam desvio padrão



Fonte: O autor.

Grupo	Pol	imerizados
	Diluição	Viabilidade celular
P0		-
B0		*
P0+B0	75%	25,82%
P0.05		-
B0.05		*
P0.05+B0.05	75%	22,36%
P0.1		-
B0.1		*
P0.1+B0.1	75%	23,17%

Tabela 5.9 – Dados das porcentagens de viabilidades inferiores a 50% em relação às concentrações dos meios condicionados dos grupos polimerizados.

Fonte: O autor.

Tabela 5.10 – Comparações entre os dados de viabilidade de DPSCs submetidas ao contato com meios condicionados por *bond* polimerizados. Comparação entre linhas (concentração dos meios) e colunas (grupos experimentais). Média e desvio padrão da densidade óptica (nm) resultante do teste de redução do MTT, segundo ANOVA e Tukey

Grupo	Diluições			
Grupo	25%	50%	75%	100%
B0 P	0,9751 (0,0996) Aa	0,9322 (0,1145) Aa	0,8442 (0,1420) Aa	0,6170 (0,0683) Ab
B0.05 P	0,9220 (0,1130) Aa	0,8968 (0,1116) Aa	0,8765 (0,0820) Aa	0,6050 (0,0596) Ab
B0.1 P	0,8851 (0,0787) Aa	0,9386 (0,0977) Aa	0,8951 (0,1712) Aa	0,5835 (0,1132) Ab
*Letras minúsculas iguais ( n	nesma linha) significam semelhança	estatística. Letras maiúsculas igua	is (mesma coluna) significam	

semelhança estatística. Fonte: O autor.

Tabela 5.11 – Comparações entre os dados de viabilidade de DPSCs submetidas ao contato com meios condicionados por *primers+bond* polimerizados. Comparação entre linhas (concentração dos meios) e colunas (grupos experimentais). Média ± desvio padrão da densidade óptica (nm) resultante do teste de redução do MTT, segundo Kruskal-Wallis e Student-Newman-Keuls

Crumo		Diluições		
Grupo	25%	50%	75%	100%
P0+B0 P	0,8588 (0,1486) Aa	0,7111 (0,0869) Aa	0,2582 (0,0837) Ab	0,1573 (0,0922) Ab
P0.05+B0.05 P	0,7795 (0,1413) Aa	0,6548 (0,1408) Aa	0,2236 (0,0846) Ab	0,1120 (0,0168) Ab
P0.1+B0.1 P	0,8178 (0,1076) Aa	0,7746 (0,1563) Aa	0,2317 (0,0493) Ab	0,1528 (0,0571) Ab

\*Letras minúsculas iguais (mesma linha) significam semelhança estatística. Letras maiúsculas iguais (mesma coluna) significam semelhança estatística.

Fonte: O autor.

Figura 5.31 ilustra um desvio para a direita da viabilidade celular maior que 50% para os grupos de *primer* + *bon*d polimerizados em relação aos não polimerizados. Enquanto em considerações próximas a 50% as viabilidades dos grupos não polimerizados estão menores que 50%, para os grupos polimerizados essa viabilidade celular menor que 50% ocorre em resposta aos meios condicionados em concentrações maiores, próximas a 75%.

#### Figura 5.31 – Representação gráfica das porcentagens médias de viabilidade de DPSCs em função das diferentes concentrações de meios condicionados por *primer* e *bond* polimerizados e não polimerizados. Barras indicam desvio padrão





## 6 DISCUSSÃO

Foram produzidas nanopartículas de hidroxiapatita (NHA) prismáticas com tamanho médio de 79,4 nm, e razão Ca/P de 1,9, bem como, nanopartículas de prata (Nag) esféricas de aproximadamente 16 nm. Partículas nanométricas tem a elevada relação área de superfície - volume (14, 15, 24, 26-28, 34), o que as tornam mais reativas, capazes de estabelecer ligações químicas(14, 15), e aumenta seu potencial de ação biológico(14, 15, 24, 26-28), mesmo em baixas concentrações(24, 26-28, 34).

A utilização da NHA como pré-tratamento da dentina teve como objetivo prevenir a redução da resistência de união à dentina a longo prazo e a incorporação da NAg no primer e bond do sistema teve o propósito de adicionar um efeito antimicrobiano na interface de união. Todavia, o pré-tratamento da dentina com NHA e os adesivos com NAg utilizados em associação ou isoladamente não alteraram a resistência de união à dentina imediata ou após 1 ano de envelhecimento.

Estudos prévios apresentaram que a adição de maiores concentrações de nanopartículas de fosfato de cálcio amorfo esférico (10% a 40% de NACP) com NAg não alterou a resistência de união imediata(23, 24) ou após 6 meses(27). Do mesmo modo, o uso de NACP associado a 5% de DMADDM manteve os valores de resistência de união após 24h e 28 dias quando comparado ao controle(3). Porém, quando o NACP foi associado a 5% DMAHDM e um agente repelente de proteína denominado MPC a 5%(1) ou a 7,5%(2), houve uma tendência de redução na resistência de união à medida que a concentração de NACP aumentou de 20% para 40%(1, 8).

O estudo da resistência de união após um período de envelhecimento é importante, pois as mudanças significativas na camada híbrida de sistemas de condicionamento total são observados a partir de 6 meses a 3-5 anos de envelhecimento(103). Trabalhos que utilizaram diferentes concentrações de NAg(23, 24, 26-28, 34, 36), desde baixas concentrações de NAg (0,005% a 0,025%) avaliados em 24h e 6 meses(16) a maiores concentrações (0,1%) em um ano, não observaram alteração na resistência de união(23, 24, 26-28, 34, 36). Ao investigar a influência de diferentes antimicrobianos na resistência de união à dentina após 1 semana e 1 ano de armazenagem em saliva artificial, foi notado que não houve diferença significante

nos valores de adesão(55). Porém, a utilização de 7,5% de MPC, associado a 10% de DMAHDM, promoveu diminuição da resistência adesiva imediata(2).

No presente estudo foi observado que o coeficiente de variação (CV) esteve entre 8% (0.5 NHA + 0.1 NAg) e 39% (1 NHA +0.1 NAg). Foram observados elevados CV em ensaios de resistência de união com dentes humanos, devido as suas variações biológicas, químicas e micro-estruturais(24). A ISO 11405 aceita variações de até 50%, acima disso, o experimento deve ser inspecionado(104).

Independentemente do uso das NAg ou das NHA, o padrão de fratura do tipo adesiva foi predominante. A comparação do padrão de fratura da interface de união adesivo-dentina produzido de diferentes adesivos adicionados de agentes antimicrobianos também demonstrou que as maiores falhas foram adesivas e mistas, e que não houve mudança no padrão quando os espécimes foram envelhecidos por 1 ano(55). A análise da interface adesiva por MCR demostrou que todos os grupos testados exibiram camada híbrida menor que 5 µm, interfaces íntegras, presença de *tags* resinosos, e nos grupos com NAg, observou-se sua presença na interface e penetração nos túbulos dentinários.

As NAg têm sido amplamente estudadas(16, 23, 24, 26, 27, 34-36) em razão da atividade antibacteriana, antifúngica e antiviral(15, 31), mesmo quando utilizada em baixas concentrações, sem afetar as propriedades mecânicas(24, 26-28, 34, 36) ou a biocompatibilidade do material(27, 28). O efeito antimicrobiano é especialmente desejado diante da odontologia minimamente invasiva no qual é removido o mínimo possível de estrutura dental, o que pode contribuir para a presença de bactérias residuais após preparo cavitário(23, 24, 26, 28, 34, 47). Além disso, é comum a presença de fendas na interface entre dente e restauração, o que favorece a infiltração bacteriana(23, 26, 28, 34, 42, 47) e, finalmente, o surgimento de cáries secundárias, as quais estão presentes em interfaces previamente restauradas(26, 27, 42, 47).

No presente estudo foi utilizada uma nova técnica que consiste na síntese e estabilização das NAg com polivinil álcool associado com etanol, o que permite dispersão das nanopartículas e a copolimerização com os monômeros presentes nos sistemas adesivos, ampliando a ação antimicrobiana por longo período de tempo(16). Outros métodos de síntese e funcionalização das NAg são propostos, incluindo a associação de um sal de prata ao monômero TBAEMA, que possibilita a síntese das nanopartículas de prata *in situ*, funcionalizadas com o monômero metacrilato (23, 24, 26-28, 34, 36). Muitos estudos exploram o uso de monômeros antibacterianos, com

destaque para os QAM, que exibem mecanismo de ação por contato, e não são liberados do material ao longo do tempo, pois são incorporados à resina adesiva(23, 24, 26-28, 34, 36).

O mecanismo de ação da prata está relacionado à prata iônica (Ag<sup>+</sup>), que altera a parede celular bacteriana, carregada negativamente, e destrói a membrana celular dos microorganismo(15, 30, 32). Além disso, também foi mencionado que a prata é capaz de gerar espécies reativas de oxigênio (ROS)(14, 15, 30, 32, 33, 35), interferir no metabolismo(14, 15, 23, 24, 26-28, 30-36) e causar danos ao DNA bacteriano(14, 15, 23, 24, 26-28, 30-34, 36). No presente estudo, o efeito antibacteriano dos adesivos contendo NAg nas concentrações de 0,05% e 0,1% foi mensurado através de um ensaio de difusão em ágar (16, 24, 26, 35, 36, 55, 75) contra o biofilm de *S. mutans*, principal causador da cárie dentária(5, 34, 47, 69). A avaliação do efeito antibacteriano em biofilme torna-se ainda mais relevante pois, as bactérias quando formam biofilme são mil vezes mais resistentes a antimicrobianos que na forma planktônica(45).

O efeito antibacteriano do *primer* e *bond*, ambos com NAg, foram estudados isoladamente e em associação no estado não polimerizado, através do ensaio de difusão em ágar. De modo geral, quando esses monômeros foram utilizados isoladamente exibiram ação antibacteriana similar aos grupos sem adição de NAg. A utilização associada de 0,05% e 0,1% de NAg no *primer* e no *bond* promoveu efeito estatisticamente superior à do grupo controle, resultado semelhante ao observado em outros trabalhos que utilizaram as mesmas concentrações de NAg em um ou ambos componentes do sistema adesivo(24, 26, 27, 34). No modelo de biofilme, a adição de 0,05% ou 0,1% de NAg aos discos contendo *primer+bond* polimerizados promoveu um decréscimo de 2x no total de *S. mutans* em relação aos discos sem a adição das NAg, o que está de acordo com os resultados obtidos por estudos similares que incorporaram as mesmas concentrações de NAg no *bond*, e encontraram uma redução de 1,5x a 2x de UFC de *S.mutans*(34). Da mesma forma, um estudo prévio relatou que a adição de 0,1% de NAg no *bond* reduziu em 3x o número de UFC de *S. mutans* em relação ao controle negativo (27).

O ensaio colorimétrico de MTT, que passa de uma coloração amarelo para púrpura de acordo com a atividade mitocondrial das células(26, 87) foi utilizado para avaliar a citotoxicidade. Utilizou-se um teste de contato indireto de células tronco da polpa dentária (DPSCs) com *primer* e/ou *bond* (controle, 0,05% e 0,1% de NAg)

impregnados em discos de papel (16, 89, 91), utilizados para condicionar o meio de cultivo, e simular a eluição desses monômeros no fluido dentinário. Este é um método rápido, de baixo custo, e que fornece boa estimativa da biocompatibilidade de determinado material(91). Outro método para a avaliação da citotoxicidade propõe o contato indireto dos monômeros resinosos com as células pulpares, através de uma barreira dentinária(88). Embora este método seja mais próximo ao ocorrido na clínica, apresenta maior dificuldade de realização e maior custo. Foi avaliada a ação de *primer* e/ou *bond* isoladamente ou associados, tanto antes quanto após a polimerização para compreender o potencial citotóxico destes monômeros em diluições seriadas quando em contato com células tronco pulpares (DPSCs).

No presente estudo foi observado que a incorporação de 0,05% e 0,1% de NAg ao *primer* ou ao *bond* não interferiu na citotoxicidade do material (26-28), o que demonstra que a NAg apresenta citotoxicidade inferior a dos monômeros constituintes dos sistemas adesivos (24, 26-28, 32, 33). Foi também evidenciado alto potencial citotóxico de materiais não curados ou com reduzido grau de conversão(90, 91, 93), devido difusão dos monômeros não polimerizados em contato com as células pulpares (89, 91, 93), o que nos alerta para a correta fotoativação do adesivo, com intuito de obter máxima conversão de monômeros em polímeros. Além disso, a medida que se aumentou a concentração do meio condicionado por monômeros resinosos, houve uma redução da viabilidade celular. Houve efeito citotóxico a partir de 50% de meio condicionado para os grupos não polimerizados, e iniciou em 75% para os grupos polimerizados que associavam *primer* e *bond*.

Os sistemas adesivos apresentam reconhecida citotoxicidade pela presença de monômeros como o HEMA, Bis-GMA, TEGDMA, UDMA, Bis-EMA e QAMs(69, 89-94, 98); além de fotoiniciadores como a canforoquinona(89, 92, 95). Notou-se a grande contribuição do *primer* no potencial citotóxico, muito provavelmente pela associação de fatores: , o baixo pH (~3,3) do primer pode levar a um menor grau de conversão do adesivo (89-91, 93, 98), por isso formulações mais acídicas têm maior potencial citotóxico(91) e a presença do HEMA que é um monômero hidrofílico, de baixo peso molecular de fácil difusão em meio aquoso, tem reconhecido efeito toxico em relação a células pulpares (89-91). Na maioria dos trabalhos que avaliam a biocompatibilidade de sistemas adesivos, são utilizados fibroblastos da gengiva humana(26-28, 69). Contudo, clinicamente, o contato dessas células com os adesivos é mínimo e optou-

se no presente estudo pela utilização de células tronco da polpa dentária (DPSCs), pois apresentam-se mais adequadas à realidade clínica.

Por fim, a estratégia de síntese e funcionalização das nanopartículas de prata e de hidroxiapatita e a sua utilização em uma estratégia adesiva mostra-se promissora. Embora não tenha sido evidenciado diretamente um efeito protetivo produzido pelo pré-tratamento com nanopartículas de hidroxiapativa, outros estudos devem ser realizados com outras combinações de fosfato de cálcio, assim como em maiores concentrações. Os efeitos antibacterianos do sistema adesivo com NAg foram evidenciados, mas devem ser complementados por futuros estudos que avaliem sua ação antimicrobiana em biofilmes com múltiplas espécies presentes na cavidade oral e associados à avaliação da biocompatilidade com a presença de barreira dentinária.

# 7 CONCLUSÕES

Foram sintetizadas nanopartículas de prata (NAg) e de hidroxiapatita (NHA) e compatibilizadas para a utilização na estratégia adesiva *etch-and-rinse*. Os adesivos com adição de NAg são promissores quanto à obtenção de um material bioativo antibacteriano que não altera a resistência de união ou sua biocompatibilidade.

# **REFERÊNCIAS<sup>1</sup>**

1. Xie X, Wang L, Xing D, Zhang K, Weir MD, Liu H, et al. Novel dental adhesive with triple benefits of calcium phosphate recharge, protein-repellent and antibacterial functions. Dent Mater. 2017;May;33(5):553-63. doi:S0109-5641(16)30742-4.

2. Zhang N, Weir MD, Romberg E, Bai Y, Xu HH. Development of novel dental adhesive with double benefits of protein-repellent and antibacterial capabilities. Dent Mater. 2015;Jul;31(7):845-54. doi:S0109-5641(15)00133-5.

3. Chen C, Weir MD, Cheng L, Lin NJ, Lin-Gibson S, Chow LC, et al. Antibacterial activity and ion release of bonding agent containing amorphous calcium phosphate nanoparticles. Dent Mater. 2014;Aug;30(8):891-901. doi:10.1016/j.dental.2014.05.025.

4. Yu H-H, Zhang L, Yu F, Li F, Liu Z-Y, Chen J-H. Epigallocatechin-3-gallate and epigallocatechin-3-O-(3-O-methyl)-gallate enhance the bonding stability of an etchand-rinse adhesive to dentin. Materials. 2017; Fev;10(2):183. doi:10.3390/ma10020183

5. Geraldeli S, Soares EF, Alvarez AJ, Farivar T, Shields RC, Sinhoreti MAC, et al. A new arginine-based dental adhesive system: formulation, mechanical and anti-caries properties. J Dent. 2017;Aug;63:72-80. doi:S0300-5712(17)30134-3.

6. Su M, Yao S, Gu L, Huang Z, Mai S. Antibacterial effect and bond strength of a modified dental adhesive containing the peptide nisin. Peptides. 2018;Jan;99:189-94. doi:S0196-9781(17)30307-8.

7. Deng S, Chung KH, Chan D, Spiekerman C. Evaluation of bond strength and microleakage of a novel metal-titanate antibacterial agent. Oper Dent. 2016;May-Jun;41(3):E48-56. doi:10.2341/14-257-L.

8. Zhang N, Melo MA, Chen C, Liu J, Weir MD, Bai Y, et al. Development of a multifunctional adhesive system for prevention of root caries and secondary caries. Dent Mater. 2015;Sep;31(9):1119-31. doi:10.1016/j.dental.2015.06.010.

.

<sup>&</sup>lt;sup>1</sup> De acordo com Estilo Vancouver.

9. Melo MA, Orrego S, Weir MD, Xu HH, Arola DD. Designing multiagent dental materials for enhanced resistance to biofilm damage at the bonded interface. ACS Appl Mater Interfaces. 2016;May 11;8(18):11779-87. doi:10.1021/acsami.6b01923.

10. Yang H, Li K, Yan H, Liu S, Wang Y, Huang C. High-performance therapeutic quercetin-doped adhesive for adhesive-dentin interfaces. Sci Rep. 2017;Aug 15;7(1):8189. doi:10.1038/s41598-017-08633-3.

11. Wu T, Li B, Zhou X, Hu Y, Zhang H, Huang Y, et al. Evaluation of novel anticaries adhesive in a secondary caries animal model. Caries Res. 201852(1-2):14-21. doi: 10.1159/000481832.

12. Han Q, Li B, Zhou X, Ge Y, Wang S, Li M, et al. Anti-caries effects of dental adhesives containing quaternary ammonium methacrylates with different chain lengths. Materials (Basel). 2017;Jun 12;10(6):643. doi:10.3390/ma10060643.

13. Liu Y, Zhang L, Niu LN, Yu T, Xu HHK, Weir MD, et al. Antibacterial and remineralizing orthodontic adhesive containing quaternary ammonium resin monomer and amorphous calcium phosphate nanoparticles. J Dent. 2018;Mar 10. doi:10.1016/j.jdent.2018.03.004.

14. Riaz Ahmed KB, Nagy AM, Brown RP, Zhang Q, Malghan SG, Goering PL. Silver nanoparticles: Significance of physicochemical properties and assay interference on the interpretation of in vitro cytotoxicity studies. Toxicol In Vitro. 2017;Feb;38:179-92. doi:10.1016/j.tiv.2016.10.012.

15. Allaker RP. The use of nanoparticles to control oral biofilm formation. J Dent Res. 2010;Nov;89(11):1175-86. doi:10.1177/0022034510377794.

16. Dutra-Correa M, Leite A, de Cara S, Diniz IMA, Marques MM, Suffredini IB, et al. Antibacterial effects and cytotoxicity of an adhesive containing low concentration of silver nanoparticles. J Dent. 2018;Oct;77:66-71. doi:10.1016/j.jdent.2018.07.010.

17. Rubin Cocco A, de Oliveira da Rosa WL, Luque Peralta S, Timm Maske T, da Silva AF, Andrade Hartwig C, et al. New adhesive system based in metals cross-linking methacrylate. J Mech Behav Biomed Mater. 2018;Jan;77:519-26. doi:10.1016/j.jmbbm.2017.10.010.

18. ALGhanem A, Fernandes G, Visser M, Dziak R, Renne WG, Sabatini C. Biocompatibility and bond degradation of poly-acrylic acid coated copper iodideadhesives. Dent Mater. 2017;Sep;33(9):e336-e47. doi:10.1016/j.dental.2017.06.010. 19. Besinis A, van Noort R, Martin N. Infiltration of demineralized dentin with silica and hydroxyapatite nanoparticles. Dent Mater. 2012;Sep;28(9):1012-23. doi:10.1016/j.dental.2012.05.007.

20. Leitune VC, Collares FM, Trommer RM, Andrioli DG, Bergmann CP, Samuel SM. The addition of nanostructured hydroxyapatite to an experimental adhesive resin. J Dent. 2013;Apr;41(4):321-7.doi:10.1016/j.jdent.2013.01.001.

21. Sadat-Shojai M, Atai M, Nodehi A, Khanlar LN. Hydroxyapatite nanorods as novel fillers for improving the properties of dental adhesives: Synthesis and application. Dent Mater. 2010;May;26(5):471-82.doi:10.1016/j.dental.2010.01.005.

22. Wagner A, Belli R, Stotzel C, Hilpert A, Muller FA, Lohbauer U. Biomimeticallyand hydrothermally-grown HAp nanoparticles as reinforcing fillers for dental adhesives. J Adhes Dent. 2013;Oct;15(5):413-22.doi:10.3290/j.jad.a29534.

23. Melo MA, Cheng L, Weir MD, Hsia RC, Rodrigues LK, Xu HH. Novel dental adhesive containing antibacterial agents and calcium phosphate nanoparticles. J Biomed Mater Res B Appl Biomater. 2013;May;101(4):620-9. doi:10.1002/jbm.b.32864.

24. Melo MA, Cheng L, Zhang K, Weir MD, Rodrigues LK, Xu HH. Novel dental adhesives containing nanoparticles of silver and amorphous calcium phosphate. Dent Mater. 2013;Feb;29(2):199-210.doi:10.1016/j.dental.2012.10.005.

25. Zhang K, Cheng L, Wu EJ, Weir MD, Bai Y, Xu HH. Effect of water-ageing on dentine bond strength and anti-biofilm activity of bonding agent containing new monomer dimethylaminododecyl methacrylate. J Dent. 2013;Jun;41(6):504-13. doi:10.1016/j.jdent.2013.03.011.

26. Cheng L, Weir MD, Zhang K, Arola DD, Zhou X, Xu HH. Dental primer and adhesive containing a new antibacterial quaternary ammonium monomer dimethylaminododecyl methacrylate. J Dent. 2013;Apr;41(4):345-55. doi:10.1016/j.jdent.2013.01.004.

27. Zhang K, Li F, Imazato S, Cheng L, Liu H, Arola DD, et al. Dual antibacterial agents of nano-silver and 12-methacryloyloxydodecylpyridinium bromide in dental adhesive to inhibit caries. J Biomed Mater Res B Appl Biomater. 2013;Aug;101(6):929-38. doi:10.1002/jbm.b.32898.

28. Li F, Weir MD, Chen J, Xu HH. Comparison of quaternary ammonium-containing with nano-silver-containing adhesive in antibacterial properties and cytotoxicity. Dent Mater. 2013;Apr;29(4):450-61.doi:10.1016/j.dental.2013.01.012.

29. Cheng L, Zhang K, Weir MD, Liu H, Zhou X, Xu HH. Effects of antibacterial primers with quaternary ammonium and nano-silver on Streptococcus mutans impregnated in human dentin blocks. Dent Mater. 2013;Apr;29(4):462-72. doi:10.1016/j.dental.2013.01.011.

30. Padovani GC, Feitosa VP, Sauro S, Tay FR, Duran G, Paula AJ, et al. Advances in dental materials through nanotechnology: facts, perspectives and toxicological aspects. Trends in biotechnology. 201533(11):621-36. doi:10.1016/j.tibtech.2015.09.005.

31. Noronha VT, Paula AJ, Duran G, Galembeck A, Cogo-Muller K, Franz-Montan M, et al. Silver nanoparticles in dentistry. Dent Mater. 2017;Oct;33(10):1110-26. doi:10.1016/j.dental.2017.07.002.

32. Duran N, Duran M, de Jesus MB, Seabra AB, Favaro WJ, Nakazato G. Silver nanoparticles: A new view on mechanistic aspects on antimicrobial activity. Nanomedicine. 2016;Apr;12(3):789-99. doi:10.1016/j.nano.2015.11.016.

33. Le Ouay B, Stellacci F. Antibacterial activity of silver nanoparticles: a surface science insight. Nano Today. 201510(3):339-54. doi:10.1016/j.nantod.2015.04.002.

34. Zhang K, Melo MA, Cheng L, Weir MD, Bai Y, Xu HH. Effect of quaternary ammonium and silver nanoparticle-containing adhesives on dentin bond strength and dental plaque microcosm biofilms. Dent Mater. 2012;Aug;28(8):842-52. doi:10.1016/j.dental.2012.04.027.

35. Ahn SJ, Lee SJ, Kook JK, Lim BS. Experimental antimicrobial orthodontic adhesives using nanofillers and silver nanoparticles. Dent Mater. 2009;Feb;25(2):206-13. doi:10.1016/j.dental.2008.06.002.

36. Cheng L, Zhang K, Melo MA, Weir MD, Zhou X, Xu HH. Anti-biofilm dentin primer with quaternary ammonium and silver nanoparticles. J Dent Res. 2012;Jun;91(6):598-604. doi:10.1177/0022034512444128.

37. Toledano M, Osorio R, Osorio E, Medina-Castillo AL, Toledano-Osorio M, Aguilera FS. Ions-modified nanoparticles affect functional remineralization and

energy dissipation through the resin-dentin interface. J Mech Behav Biomed Mater. 2017;Apr;68:62-79.doi:10.1016/j.jmbbm.2017.01.026.

38. Ye Q, Spencer P, Yuca E, Tamerler C. Engineered peptide repairs defective adhesive-dentin interface. Macromol Mater Eng. 2017;May;302(5). doi:10.1002/mame.201600487.

39. Sauro S, Osorio R, Watson TF, Toledano M. Influence of phosphoproteins' biomimetic analogs on remineralization of mineral-depleted resin-dentin interfaces created with ion-releasing resin-based systems. Dent Mater. 2015;Jul;31(7):759-77. doi:10.1016/j.dental.2015.03.013.

40. Zhou H, Li F, Weir MD, Xu HH. Dental plaque microcosm response to bonding agents containing quaternary ammonium methacrylates with different chain lengths and charge densities. J Dent. 2013;Nov;41(11):1122-31. doi:10.1016/j.jdent.2013.08.003.

41. Zhang N, Melo MA, Bai Y, Xu HH. Novel protein-repellent dental adhesive containing 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine. J Dent. 2014;Oct;42(10):1284-91. doi:10.1016/j.jdent.2014.07.016.

42. Nedeljkovic I, Teughels W, De Munck J, Van Meerbeek B, Van Landuyt KL. Is secondary caries with composites a material-based problem? Dent Mater. 2015;Nov;31(11):e247-77.doi:10.1016/j.dental.2015.09.001.

43. Yasunaga A, Yoshida A, Morikawa K, Maki K, Nakamura S, Soh I, et al. Monitoring the prevalence of viable and dead cariogenic bacteria in oral specimens and in vitro biofilms by qPCR combined with propidium monoazide. BMC Microbiol. 2013;13:157.doi:10.1186/1471-2180-13-157.

44. Zhang N, Ma J, Melo MA, Weir MD, Bai Y, Xu HH. Protein-repellent and antibacterial dental composite to inhibit biofilms and caries. J Dent. 2015;Feb;43(2):225-34.doi:10.1016/j.jdent.2014.11.008.

45. Carvalho FG, Puppin-Rontani RM, Fucio SB, Negrini Tde C, Carlo HL, Garcia-Godoy F. Analysis by confocal laser scanning microscopy of the MDPB bactericidal effect on S. mutans biofilm CLSM analysis of MDPB bactericidal effect on biofilm. J Appl Oral Sci. 2012;Sep-Oct;20(5):568-75.doi:10.1590/S1678-77572012000500013

46. Zhang K, Wang S, Zhou X, Xu HH, Weir MD, Ge Y, et al. Effect of antibacterial dental adhesive on multispecies biofilms formation. J Dent Res. 2015;Apr;94(4):622-9.doi:10.1177/0022034515571416.

47. Wang S, Zhang K, Zhou X, Xu N, Xu H, Weir M, et al. Antibacterial Effect of Dental Adhesive Containing Dimethylaminododecyl Methacrylate on the Development of Streptococcus mutans Biofilm. International Journal of Molecular Sciences. 2014; Jul 15(7):1279-81.doi:10.3390/ijms150712791.

48. Wang L, Xie X, Weir MD, Fouad AF, Zhao L, Xu HH. Effect of bioactive dental adhesive on periodontal and endodontic pathogens. J Mater Sci Mater Med. 2016;Nov;27(11):168.doi:10.1007/s10856-016-5778-2.

49. Qiu W, Zheng X, Wei Y, Zhou X, Zhang K, Wang S, et al. D-alanine Metabolism is Essential for Growth and Biofilm Formation of Streptococcus mutans. Mol Oral Microbiol. 2015;Oct;31(5):435-44.doi:10.1111/omi.12146

50. de Alencar NA, Fidalgo TK, Cajazeira MR, Maia LC. Influence of the number of adhesive layers on adhesive interface properties under cariogenic challenge using streptococcus mutans. J Adhes Dent. 2014;Aug;16(4):339-46. doi:10.3290/j.jad.a32569.

51. Pupo YM, Farago PV, Nadal JM, Simao LC, Esmerino LA, Gomes OM, et al. Effect of a novel quaternary ammonium methacrylate polymer (QAMP) on adhesion and antibacterial properties of dental adhesives. Int J Mol Sci. 201415(5):8998-9015. doi:10.3390/ijms15058998.

52. Almahdy A, Koller G, Festy F, Bartsch JW, Watson TF, Banerjee A. An MMPinhibitor modified adhesive primer enhances bond durability to carious dentin. Dent Mater. 2015;May;31(5):594-602.doi:10.1016/j.dental.2015.03.003.

53. Anusavice KJ, Shen C, Rawls HR. Phillips materiais dentários. 12. ed. Rio de Janeiro; Elsevier Brasil; 2013. 592 p.

54. Sakaguchi RL, Powers JM. Craig materiais dentários restauradores. 13 ed. Rio de Janeiro; Elsevier; 2012. 416 p.

55. Andre CB, Gomes BP, Duque TM, Stipp RN, Chan DC, Ambrosano GM, et al. Dentine bond strength and antimicrobial activity evaluation of adhesive systems. J Dent. 2015;Apr;43(4):466-75. doi:10.1016/j.jdent.2015.01.004.

56. Tjaderhane L, Nascimento FD, Breschi L, Mazzoni A, Tersariol IL, Geraldeli S, et al. Strategies to prevent hydrolytic degradation of the hybrid layer-A review. Dent Mater. 2013;Oct;29(10):999-1011. doi:10.1016/j.dental.2013.07.016.

57. Matos AB, Trevelin LT, Silva B, Francisconi-Dos-Rios LF, Siriani LK, Cardoso MV. Bonding efficiency and durability: current possibilities. Braz Oral Res. 2017;Aug 28;31(suppl 1):e57.doi:10.1590/1807-3107.

58. Reddy AK, Kambalyal PB, Patil SR, Vankhre M, Khan MY, Kumar TR. Comparative evaluation and influence on shear bond strength of incorporating silver, zinc oxide, and titanium dioxide nanoparticles in orthodontic adhesive. J Orthod Sci. 2016;Oct-Dec;5(4):127-31.doi:10.4103/2278-0203.192115

59. Degrazia FW, Leitune VC, Garcia IM, Arthur RA, Samuel SM, Collares FM. Effect of silver nanoparticles on the physicochemical and antimicrobial properties of an orthodontic adhesive. J Appl Oral Sci. 2016;Jul-Aug;24(4):404-10. doi:10.1590/1678-775720160154.

60. Lee SM, Kim IR, Park BS, Lee DJ, Ko CC, Son WS, et al. Remineralization property of an orthodontic primer containing a bioactive glass with silver and zinc. Materials (Basel). 2017;Oct 31;10(11).doi:10.3390/ma10111253.

61. Yu F, Dong Y, Yu HH, Lin PT, Zhang L, Sun X, et al. Antibacterial activity and bonding ability of an orthodontic adhesive containing the antibacterial monomer 2-methacryloxylethyl hexadecyl methyl ammonium bromide. Sci Rep. 2017;Feb 7;7:41787.doi:10.1038/srep41787.

62. Monte Alto e Colaboradores R. Reabilitação estética anterior: o passo a passo da rotina clínica. Nova Odessa - SP; Napoleão; 2018. 592 p.

63. Van Meerbeek B, Yoshihara K, Yoshida Y, Mine A, De Munck J, Van Landuyt KL. State of the art of self-etch adhesives. Dent Mater. 2011;Jan;27(1):17-28. doi:10.1016/j.dental.2010.10.023.

64. Breschi L, Mazzoni A, Ruggeri A, Cadenaro M, Di Lenarda R, De Stefano Dorigo E. Dental adhesion review: aging and stability of the bonded interface. Dent Mater. 2008;Jan;24(1):90-101.doi:10.1016/j.dental.2007.02.009.

65. Chen C, Niu L-N, Xie H, Zhang Z-Y, Zhou L-Q, Jiao K, et al. Bonding of universal adhesives to dentine - Old wine in new bottles? J Dent. 2015;May;43(5):525-36. doi:10.1016/j.jdent.2015.03.004

66. Pal S, Tak YK, Song JM. Does the antibacterial activity of silver nanoparticles depend on the shape of the nanoparticle? A study of the Gram-negative bacterium Escherichia coli. Appl Environ Microbiol. 2007;Mar;73(6):1712-20. doi:10.1128/aem.02218-06.

67. Cheng YJ, Zeiger DN, Howarter JA, Zhang X, Lin NJ, Antonucci JM, et al. In situ formation of silver nanoparticles in photocrosslinking polymers. J Biomed Mater Res B Appl Biomater. 2011;Apr;97(1):124-31.doi:10.1002/jbm.b.31793.

68. Kim JS, Kuk E, Yu KN, Kim JH, Park SJ, Lee HJ, et al. Antimicrobial effects of silver nanoparticles. Nanomedicine. 2007;Mar;3(1):95-101. doi:10.1016/j.nano.2006.12.001.

69. Huang L, Xiao Y-h, Xing X-d, Li F, Ma S, Qi L-l, et al. Antibacterial activity and cytotoxicity of two novel cross-linking antibacterial monomers on oral pathogens. Archives of Oral Biology. 201156(4):367-73.doi:10.1016/j.archoralbio.2010.10.011.

70. Genari B, Leitune VCB, Jornada DS, Camassola M, Arthur RA, Pohlmann AR, et al. Antimicrobial effect and physicochemical properties of an adhesive system containing nanocapsules. Dent Mater. 2017;Jun;33(6):735-42. doi:10.1016/j.dental.2017.04.001.

71. Collares FM, Leitune VCB, Franken P, Parollo CF, Ogliari FA, Samuel SMW. Influence of addition of [2-(methacryloyloxy) ethyl] trimethylammonium chloride to an experimental adhesive. Brazilian oral research. 2017e31.

72. Schiroky PR, Leitune VCB, Garcia IM, Ogliari FA, Samuel SMW, Collares FM. Triazine compound as copolymerized antibacterial agent in adhesive resins. Braz Dent J. 2017;Mar-Apr;28(2):196-200.doi:10.1590/0103-6440201701346.

73. Altmann AS, Collares FM, Leitune VC, Arthur RA, Takimi AS, Samuel SM. In vitro antibacterial and remineralizing effect of adhesive containing triazine and niobium pentoxide phosphate inverted glass. Clin Oral Investig. 2017;Jan;21(1):93-103. doi:10.1007/s00784-016-1754-y.

74. Centenaro CC, Rostirolla FV, Leitune VC, Parolo CF, Ogliari FA, Samuel SM, et al. Influence of addition of 2-[3-(2H-benzotriazol-2-YL)- 4-hydroxyphenyl] ethyl

methacrylate to an experimental adhesive system. Acta Odontol Latinoam. 2015;Apr;28(1):72-8. doi:10.1590/S1852-48342015000100010.

75. André CB, Gomes BPFA, Duque TM, Rosalen PL, Chan DCN, Ambrosano GMB, et al. Antimicrobial activity, effects on Streptococcus mutans biofilm and interfacial bonding of adhesive systems with and without antibacterial agent. Int J Adh Adhes. 2017;72:123-9. doi:10.1016/j.ijadhadh.2016.10.011.

76. André CB, Gomes BPFA, Duque TM, Rosalen PL, Chan DCN, Ambrosano GMB, et al. Antimicrobial activity, effects on Streptococcus mutans biofilm and interfacial bonding of adhesive systems with and without antibacterial agent. Int J Adh Adhes. 2017;72:123-9. doi:10.1016/j.ijadhadh.2016.10.011.

77. Siqueira JF, Jr., Rocas IN. Exploiting molecular methods to explore endodontic infections: Part 1--current molecular technologies for microbiological diagnosis. J Endod. 2005;Jun;31(6):411-23.doi:10.1097/01.don.0000157989.44949.26.

78. Loozen G, Boon N, Pauwels M, Quirynen M, Teughels W. Live/dead real-time polymerase chain reaction to assess new therapies against dental plaque-related pathologies. Mol Oral Microbiol. 2011;Aug;26(4):253-61. doi:10.1111/j.2041-1014.2011.00615.x.

79. Bueno-Silva B, Koo H, Falsetta ML, Alencar SM, Ikegaki M, Rosalen PL. Effect of neovestitol-vestitol containing Brazilian red propolis on accumulation of biofilm in vitro and development of dental caries in vivo. Biofouling. 201329(10):1233-42. doi:10.1080/08927014.2013.834050.

80. Li F, Chai ZG, Sun MN, Wang F, Ma S, Zhang L, et al. Anti-biofilm effect of dental adhesive with cationic monomer. J Dent Res. 2009;Apr;88(4):372-6. doi:10.1177/0022034509334499.

81. Cury JA, Seils J, Koo H. Isolation and purification of total RNA from Streptococcus mutans in suspension cultures and biofilms. Braz Oral Res. 2008;Jul-Sep;22(3):216-22.doi:10.1590/S1806-83242008000300005.

82. Fittipaldi M, Nocker A, Codony F. Progress in understanding preferential detection of live cells using viability dyes in combination with DNA amplification. J Microbiol Methods. 2012;Nov;91(2):276-89. doi:10.1016/j.mimet.2012.08.007.

83. Alvarez G, Gonzalez M, Isabal S, Blanc V, Leon R. Method to quantify live and dead cells in multi-species oral biofilm by real-time PCR with propidium monoazide. AMB Express.2013;Jan;3(1):1-8.doi:10.1186/2191-0855-3-1.

84. Pinheiro ET, Neves VD, Reis CC, Longo PL, Mayer MP. Evaluation of the Propidium Monoazide-quantitative Polymerase Chain Reaction Method for the Detection of Viable Enterococcus faecalis. J Endod. 2016;Jul;42(7):1089-92. doi:10.1016/j.joen.2016.04.003.

85. Nocker A, Cheung C-Y, Camper AK. Comparison of propidium monoazide with ethidium monoazide for differentiation of live vs. dead bacteria by selective removal of DNA from dead cells. J Microbiol Methods.2006;Fev;67(2):310-20. doi:10.1016/j.mimet.2006.04.015

86. Brundin M, Figdor D, Sundqvist G, Sjogren U. Preservation of Fusobacterium nucleatum and Peptostreptococcus anaerobius DNA after loss of cell viability. Int Endod J. 2015;Jan;48(1):37-45. doi:10.1111/iej.12273.

87. ISO-10993-5. Biological evaluation of medical devices Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity. Geneva, Switzerland: International Oraganization for Standardization; 2009.

88. Hass V, Luque-Martinez IV, Gutierrez MF, Moreira CG, Gotti VB, Feitosa VP, et al. Collagen cross-linkers on dentin bonding: Stability of the adhesive interfaces, degree of conversion of the adhesive, cytotoxicity and in situ MMP inhibition. Dent Mater. 2016;Jun;32(6):732-41. doi:10.1016/j.dental.2016.03.008.

89. Elias ST, Santos AF, Garcia FC, Pereira PN, Hilgert LA, Fonseca-Bazzo YM, et al. Cytotoxicity of universal, self-etching and etch-and-rinse adhesive systems according to the polymerization time. Braz Dent J. 2015;Mar-Apr;26(2):160-8. doi:10.1590/0103-6440201300294.

90. Barbosa MO, de Carvalho RV, Demarco FF, Ogliari FA, Zanchi CH, Piva E, et al. Experimental self-etching HEMA-free adhesive systems: cytotoxicity and degree of conversion. J Mater Sci Mater Med. 2015;Jan;26(1):5370. doi:10.1007/s10856-014-5370-6.

91. Bianchi L, Ribeiro AP, Carrilho MR, Pashley DH, de Souza Costa CA, Hebling J. Cytotoxicity of adhesive systems of different hydrophilicities on cultured odontoblastlike cells. J Biomed Mater Res B Appl Biomater. 2013;Nov;101(8):1498-507. doi:10.1002/jbm.b.32971. 92. Kierklo A, Pawinska M, Tokajuk G, Poplawska B, Bielawska A. Cytotoxicity evaluation of three light-cured dentin adhesive materials on human gingival fibroblasts, ex vivo. Adv Med Sci. 201257(2):385-90. doi:10.2478/v10039-012-0038-2.

93. Chai Z, Li F, Fang M, Wang Y, Ma S, Xiao Y, et al. The bonding property and cytotoxicity of a dental adhesive incorporating a new antibacterial monomer. J Oral Rehabil. 2011;Nov;38(11):849-56. doi:10.1111/j.1365-2842.2011.02212.x.

94. Ratanasathien S, Wataha JC, Hanks CT, Dennison JB. Cytotoxic interactive effects of dentin bonding components on mouse fibroblasts. J Dent Res. 1995;Sep;74(9):1602-6. doi:10.1177/00220345950740091601.

95. Koulaouzidou EA, Helvatjoglu-Antoniades M, Palaghias G, Karanika-Kouma A, Antoniades D. Cytotoxicity evaluation of an antibacterial dentin adhesive system on established cell lines. J Biomed Mater Res B Appl Biomater. 2008;Jan;84(1):271-6. doi:10.1002/jbm.b.30870.

96. Huang L, Xiao Y-h, Xing X-d, Li F, Ma S, Qi L-I, et al. Antibacterial activity and cytotoxicity of two novel cross-linking antibacterial monomers on oral pathogens. Arch Oral Biol. 2011;Apr;56(4):367-73. doi:10.1016/j.archoralbio.2010.10.011.

97. Priyadarshini BM, Mitali K, Lu TB, Handral HK, Dubey N, Fawzy AS. PLGA nanoparticles as chlorhexidine-delivery carrier to resin-dentin adhesive interface. Dent Mater. 2017;Jul;33(7):830-46. doi:10.1016/j.dental.2017.04.015.

98. Li F, Wang P, Weir MD, Fouad AF, Xu HH. Evaluation of antibacterial and remineralizing nanocomposite and adhesive in rat tooth cavity model. Acta Biomater. 2014;Jun;10(6):2804-13. doi:10.1016/j.actbio.2014.02.033.

99. Diniz IMA, Carreira ACO, Sipert CR, Uehara CM, Moreira MSN, Freire L, et al. Photobiomodulation of mesenchymal stem cells encapsulated in an injectable rhBMP4-loaded hydrogel directs hard tissue bioengineering. J Cell Physiol. 2018;Jun;233(6):4907-18. doi:10.1002/jcp.26309.

100. Candeiro GT, Moura-Netto C, D'Almeida-Couto RS, Azambuja-Junior N, Marques MM, Cai S, et al. Cytotoxicity, genotoxicity and antibacterial effectiveness of a bioceramic endodontic sealer. Int Endod J. 2015;Aug 17. doi:10.1111/iej.12523.

101. Zhang Y, Dong R, Park Y, Bohner M, Zhang X, Ting K, et al. Controlled release of NELL-1 protein from chitosan/hydroxyapatite-modified TCP particles. Int J Pharm. 2016;Sep 10;Jan; 511(1):79-89. doi: 10.1016/j.ijpharm.2016.06.050.

102. Poletti Papi MA, Caetano FR, Bergamini MF, Marcolino-Junior LH. Facile synthesis of a silver nanoparticles/polypyrrole nanocomposite for non-enzymatic glucose determination. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl. 2017;Jun 1;75:88-94. doi:10.1016/j.msec.2017.02.026.

103. Pashley DH, Tay FR, Breschi L, Tjaderhane L, Carvalho RM, Carrilho M, et al. State of the art etch-and-rinse adhesives. Dent Mater. 2011;Jan;27(1):1-16. doi:10.1016/j.dental.2010.10.016.

104. ISO-11405. Testing of adhesion to tooth structure. International Organization for Standardization; 2015. p. 1 - 12.

### APÊNDICE A – Termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE)

## UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO FACULDADE DE ODONTOLOGIA DEPARTAMENTO DE BIOMATERIAIS E BIOLOGIA ORAL

## TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

Você está sendo convidado (a) participar da pesquisa intitulada "Avaliação da resistência de união, efeito antimicrobiano e citotoxicidade de adesivo experimental contendo nanopartículas de prata e hidroxiapatita", que tem como objetivo avaliar a ação antibacteriana, mineralizadora e citotóxica de adesivo odontológico experimental.

Sua participação não é obrigatória, e sua recusa não lhe trará nenhum prejuízo para continuidade do seu tratamento. Além disso, mesmo como participante da pesquisa, você pode deixar de participar da pesquisa, caso seja do seu interesse, a qualquer momento.

Sua colaboração, caso seja de sua concordância, será através da doação de um dente (terceiro molar incluso), com indicação cirúrgica de exodontia. A doação do dente não trará ao participante da pesquisa qualquer risco direto, visto já haver a recomendação de extração deste pela Clínica que você está em tratamento.

A doação do dente não trará qualquer benefício direto ao participante da pesquisa, mas, este estudo estará colaborando para o avanço do conhecimento quanto à ação antibacteriana, mineralizadora e citotóxica de adesivo odontológico experimental.

As informações obtidas através desta pesquisa serão confidenciais e apenas de interesse científico, sendo assegurado o absoluto sigilo sobre a sua participação. Os resultados não serão divulgados de forma a possibilitar sua identificação, pois o pesquisador protegerá sua privacidade.

O participante da pesquisa não terá nenhuma despesa por participar da pesquisa. Além disso, é garantida qualquer indenização, caso você tenha algum dano decorrente da pesquisa. Caso necessite esclarecer dúvidas sobre a pesquisa, você poderá contatar com os pesquisadores: Prof. Dr. Igor Studart Medeiros, contatos: (11)30917840/ e-mail: <u>igorsm@usp.br</u>); ou Msc. Juliana Dias Aguiar, contatos: (11)30917840/e-mail: julianadaguiar@hotmail.com.

Em caso de dúvidas quanto à ética na pesquisa, entrar em contato com: Comitê de Ética em Pesquisa (Seres Humanos) Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo Av. Prof. Lineu Prestes, 2227 – 05508-000 – São Paulo – SP Fone: (11) 3091.7960 – E-mail: cepfo@usp.br. Horário de Funcionamento: segunda a sexta-feira das 8 às 17h (exceto feriados e recesso universitário). O Comitê é um colegiado interdisciplinar e independente, de relevância pública, de caráter consultivo, deliberativo e educativo, criado para defender os interesses dos participantes da pesquisa em sua integridade e dignidade para contribuir no desenvolvimento da pesquisa dentro de padrões éticos. (Resolução CNS nº 466 de 2012).

Este documento foi elaborado em duas vias, sendo uma do pesquisador responsável e a outra do participante da pesquisa.

# Após ter sido esclarecido, eu concordo em participar desta pesquisa.

São Paulo, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 20\_\_\_.

Assinatura do participante da pesquisa

Assinatura do pesquisador responsável

### ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa versão 1







#### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação da resistência de união, efeito antimicrobiano e citotoxicidade de adesivo experimental contendo nanoparticulas de prata e de hidroxiapatita Pesquisador: Igor Studart Medeiros Area Temática: Versão: 1 CAAE: 60367216.3.0000.0075 Instituição Proponente: Universidade de Sao Paulo Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.774.950

#### Apresentação do Projeto:

Cárles secundárias representam a grande causa para a troca de restaurações. O objetivo do trabalho será a incorporação de nanoparticulas de prata (NAg) e hidroxiapatita (NHa) em sistema adesivo, tendo em vista associar seu efeito antibacteriano e remineralizador para inibição de cárles secundárias. As nanoparticulas serão sintetizadas, caracterizadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV), espectroscopia por dispersão de raio x (EDX), difratometria de raio x, espalhamento de luz dinámica (DLS), microscopia eletrônica de transmissão (TEM) e microscopia de força atômica (AFM). As nanoparticulas serão incorporadas no primer do agente de união Scotchbond Multi-Purpose (SBMP). Serão utilizados cento e oito molares inclusos, dos quais 84 dentes serão empregados aos procedimentos restauradores dos grupos (n=7): SBMP (controle), SBMP + NAg 500

ppm, SBMP + NHa 1%, SBMP + NAg 500 ppm + NHa 1%. As propriedades mecánicas serão mensuradas por microtração: imediata (24h), após ciciagem térmica e após 6 meses de armazenamento. A interface adesiva será analisada (n=2) por microscopia eletrónica de varredura (MEV), microscopia eletrónica de transmissão (TEM) e microscopia confocal raman. O efeito antimicrobiano será avaliado por métodos de cultura: ensalo

live/dead, produção de ácido láctico e unidades formadoras de colônias (CFU), e por método

Endereç	o: Av Prof Lineu Preste	s 2227		
Bairro:	Cidade Universitária	CEP:	05.508-900	
UF: 8P	Município:	SAO PAULO		
Telefone	(11)3091-7980	Fax: (11)3091-7814	E-mail:	cepfo@usp.br

Página 01 de 03



# FACULDADE DE ODONTOLOGIA DA UNIVERSIDADE DE SÃO



Continuação do Parecer: 1.774.950

molecular que associa a reação em cadela da polimerase em tempo real (q-PCR) ao propidio monoazida (PMA). A citotoxicidade do SBMP será mensurada pelo contato com fibroblastos da gengiva humana.

#### Objetivo da Pesquisa:

Desenvolver um adesivo experimental com propriedades antimicroblanas e mineralizadoras, através da incorporação de nanoparticulas de prata (NAg) e hidroxiapatita (NHa) no Primer de um sistema adesivo de três passos.

Availar o efeito da incorporação de NAg/NHa na resistência de união à dentina, atividade antimicrobiana e citotoxicidade.

#### Availação dos Riscos e Beneficios:

Riscos: Os riscos estão vinculados ao procedimento cirúrgico para retirada do terceiro moiar que apresenta indicação para este procedimento independentemente desta pesquisa.

Beneficios: Não haverá beneficios diretos aos pacientes, no entanto, esta pesquisa poderá fornecer importantes dados sobre o efeito antimicrobiano e remineralizador das nanoparticulas de prata e de hidroxiapatita em adesivos odontológicos, contribuindo sobremaneira para a compreensão destes fenômenos na interface adesiva.

#### Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa está desenhada de forma apropriada.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foram apresentados de forma correta todos os termos obrigatorios:

- Informações básicas
- Folha de rosto
- Cronograma
- Autorização para uso da clínica odontológica
- Projeto
- TCLE
- -

#### Recomendações:

Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados ao CEP-FOUSP relatórios parciais anuais referentes ao andamento da pesquisa e relatório final, utilizando-se da opção "Enviar

Endereça	x Av Prof Lineu Preste	is 2227		
Bairro:	Cidade Universitária	CEP:	05.508-900	
UF: SP	Município:	SAO PAULO		
Telefone	(11)3091-7980	Fax: (11)3091-7814	E-mail:	cepfo@usp.br

136

Pégine 02 de 03


# FACULDADE DE ODONTOLOGIA DA UNIVERSIDADE DE SÃO



Continuação do Parecer: 1.774.950

Notificação" (descrita no Manual "Submeter Notificação", disponível na Central de Suporte - canto superior direito do site www.saude.gov.br/plataformabrasil).

Qualquer alteração no projeto original deve ser apresentada "emenda" a este CEP, de forma objetiva e com justificativas para nova apreciação.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações: Não há pendências.

Considerações Finais a critério do CEP:

#### Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_P ROJETO 790985.pdf	26/09/2016 13:40:46		Acelto
Outros	autorizacaocilnica.pdf	26/09/2016 13:40:23	Igor Studart Medeiros	Acelto
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLEfinal.pdf	21/09/2016 13:29:39	lgor Studart Medelros	Acelto
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	ProjJulianaCEP.pdf	21/09/2016 13:29:25	Igor Studart Medelros	Acelto
Folha de Rosto	FLASS.pdf	09/09/2016 14:14:25	Igor Studart Medelros	Acelto

Situação do Parecer: Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

## SAO PAULO, 14 de Outubro de 2016

Assinado por: Maria Gabriela Haye Blazevic (Coordenador)

Endereço:	Av Prof Lineu Preste	15 2227		
Bairro: Cid	iade Universitária	CEP:	05.508-900	
UF: 8P	Município:	SAO PAULO		
Telefone:	(11)3091-7960	Fax: (11)3091-7814	E-mail:	cepfo@usp.br

Página 03 de 03

# ANEXO B - Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa versão 2



## PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DA EMENDA

Titulo da Pesquisa: Avaliação da resistência de união, efeito antimicrobiano e citotoxicidade de adesivo experimental contendo nanoparticulas de prata e de hidroxiapatita

Pesquisador: Igor Studart Medeiros

Área Temática: Versão: 2

CAAE: 60367216.3.0000.0075

Instituição Proponente: Facuidade de Odontologia da Universidade de São Paulo Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

#### DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.584.994

#### Apresentação do Projeto:

O objetivo do trabalho será a incorporação de nanopartículas de prata (NAg) e hidroxiapatita (NHa) em sistema adesivo, tendo em vista associar seu efeito antibacteriano e remineralizador para inibição de cáries secundárias. As nanoparticulas serão sintetizadas, caracterizadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV), espectroscopia por dispersão de raio x (EDX), difratometria de raio x, espalhamento de luz dinâmica (DLS), microscopia eletrónica de transmissão (TEM) e microscopia de forca atómica (AFM). As nanoparticulas serão incorporadas no primer do agente de união Scotchbond Multi-Purpose (SBMP). Serão utilizados cento e oito molares inclusos, dos quais 84 dentes serão empregados aos procedimentos restauradores dos grupos (n=7): SBMP (controle), SBMP + NAg 500 ppm, SBMP + NHa 1%, SBMP + NAg 500 ppm + NHa 1%. As propriedades mecânicas serão mensuradas por microtração: imediata (24h), após ciclagem térmica e após 6 meses de armazenamento. A interface adesiva serà analisada (n=2) por microscopia eletrónica de varredura (MEV), microscopia eletrónica de transmissão (TEM) e microscopia confocal raman. O efeito antimicroblano será avallado por métodos de cultura: ensalo live/dead, produção de ácido láctico e unidades

formadoras de colônias (CFU), e por

Endereço: Baimo: Ci	Av Prof Lineu Preste dade Universitária	s 2227 CEP:	05 508-900	
UF: SP	Município:	SAO PAULO	00.000-000	
Telefone:	(11)3091-7960	Fax: (11)3091-7814	E-mail:	cepfo@usp.br



# USP - FACULDADE DE ODONTOLOGIA DA UNIVERSIDADE DE SÃO



Continuação do Parecer: 2.584.994

método molecular que associa a reação em cadeia da polimerase em tempo real (q-PCR) ao propidio monoazida (PMA). A citotoxicidade do SBMP

será mensurada pelo contato com fibroblastos da gengiva humana.

### Objetivo da Pesquisa:

Desenvolver um adesivo experimental com propriedades antimicrobianas e mineralizadoras, através da incorporação de nanoparticulas de prata (NAg) e hidroxiapatita (NHa) no Primer de um sistema adesivo de três passos.

Objetivo Secundário:

Availar o efeito da incorporação de NAg/NHa na resistência de união à dentina, atividade antimicrobiana e citotoxicidade.

## Availação dos Riscos e Beneficios:

Os riscos estão vinculados ao procedimento cirúrgico para retirada do terceiro moiar que apresenta Indicação para este procedimento independentemente desta pesquisa. Beneficios:

Não haverá beneficios diretos aos pacientes, no entanto, esta pesquisa poderá fornecer importantes dados sobre o efeito antimicrobiano e remineralizador das nanoparticulas de prata e de hidroxiapatita em adesivos odontológicos, contribuindo sobremaneira para a compreensão destes fenômenos na interface adesiva.

#### Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O desenho da pesquisa está correto.

#### Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os termos de apresentação estão corretos:

-Folha de Rosto.

-TCLE.

Autorização para o uso da Clínica para a pesquisa.

Projeto e informações básicas.

### Recomendações:

Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados ao CEP-FOUSP relatórios parciais anuais referentes ao andamento da pesquisa e relatório final, utilizando-se da opção "Enviar Notificação" (descrita no Manual "Submeter Notificação", disponível na Central de Suporte - canto superior direito do site www.saude.gov.br/plataformabrasil).

Qualquer alteração no projeto original deve ser apresentada "emenda" a este CEP, de forma

Endereço	. Av Prof Lineu Preste	s 2227		
Bairro: (	Cidade Universitária	CEP:	05.508-900	
UF: SP	Município:	SAO PAULO		
Telefone:	(11)3091-7960	Fax: (11)3091-7814	E-mail:	cepfo@usp.br

Página 02 de 03



# USP - FACULDADE DE ODONTOLOGIA DA UNIVERSIDADE DE SÃO



Continuação do Paracer: 2.584.994

objetiva e com justificativas para nova apreclação.

# Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Emenda aprovada: "Após exame de qualificação de doutorado, foram realizadas sugestões para a melhoria do projeto. Além disso, testes piloto apontaram a necessidade de ajustar os métodos inicialmente propostos".

### Considerações Finais a critério do CEP:

## Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_108064	28/02/2018		Acelto
do Projeto	3 E1.par	10:40:49		
Projeto Detalhado /	Projetodoutoradojullanadagular.pdf	27/02/2018	Juliana Dias Agular	Acelto
Brochura		18:13:54		
Investigador				
Outros	autorizacaoclínica.pdf	26/09/2016	Igor Studart Medelros	Acelto
		13:40:23	-	
TCLE / Termos de	TCLEfinal.pdf	21/09/2016	Igor Studart Medeiros	Acelto
Assentimento /		13:29:39	-	
Justificativa de				
Auséncia				
Folha de Rosto	FLASS.pdf	09/09/2016	Igor Studart Medelros	Acelto
	-	14:14:25		

Situação do Parecer: Aprovado Necessita Apreciação da CONEP: Não

SAO PAULO, 06 de Abril de 2018

Assinado por: Maria Gabriela Haye Blazevic (Coordenador)

Endereço: Av Prof Lineu Prestes 2227				
Bairro:	Cidade Universitária	CEP:	05,508-900	
UP: SP	Município:	SAO PAULO		
Telefone	(11)3091-7960	Fax: (11)3091-7814	E-mail:	cepforgusp.br