

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU

NAIARA ARAÚJO DE OLIVEIRA

**Antibacterial, biological, and physico-mechanical properties of a 1,3,5-
triacryloylhexahydro-1,3,5-triazine containing luting agent**

BAURU

2020

NAIARA ARAÚJO DE OLIVEIRA

Antibacterial, biological, and physico-mechanical properties of a 1,3,5-triacryloylhexahydro-1,3,5-triazine containing luting agent

Propriedades antibacterianas, biológicas e físico-mecânicas de um cimento resinoso contendo 1,3,5-triacriloyhexahidro-1,3,5-triazina

Tese constituída por artigos apresentada a Faculdade de Odontologia de Bauru - Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências no Programa de Ciências Odontológicas Aplicadas, na área de concentração Dentística.

Orientador: Prof^ª. Dr^ª. Ana Flávia Sanches Borges

Versão Corrigida

BAURU

2020

Oliveira, Naiara Araújo de

Antibacterial, biological, and physico-mechanical properties of a 1,3,5-triacryloylhexahydro-1,3,5-triazine containing luting agent / Naiara Araújo de Oliveira. -- Bauru, 2020.

61 p. : 3il. ; 31 cm.

Tese (doutorado) -- Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, 2020.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Ana Flávia Sanches Borges

Nota: A versão original desta dissertação/tese encontra-se disponível no Serviço de Biblioteca e Documentação da Faculdade de Odontologia de Bauru – FOB/USP.

Autorizo, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação por processos fotocopiadores e outros meios eletrônicos.

Assinatura:

Data: 22 de junho de 2020

Comitê de Ética da FOB-USP
Protocolo nº: 10241519.3.0000.5417
Data:04/05/2020

FOLHA DE APROVAÇÃO

Dedico este trabalho

... aos meus pais, Solange e João, pelo amor, dedicação, apoio e incentivo. Sei que sempre posso contar com vocês, meu alicerce e porto seguro. Esta conquista também é de vocês.

... ao meu irmão Danilo e a todos os meus familiares e amigos de Minas e os de Bauru por todos os momentos já vividos e que ainda iremos trilhar.

Agradeço...

... a **Deus** por minha vida e por mais esta conquista, por sempre me proteger e iluminar meu caminho.

Aos meus pais **Solange** e **João**, obrigada por estarem sempre ao meu lado, me apoiando e incentivando em todos os momentos. Obrigada pela confiança, carinho e amor dedicado. Sem vocês nada seria possível. Obrigada pelo ombro sempre amigo e por iluminarem meu caminho durante decisões, me aconselhando e apoiando. Sou eternamente grata por tudo. Amo vocês.

Ao meu irmão **Danilo**, minha prima e irmã **Vânia** ao **Robson** por todo incentivo e horas de conversas. À **Graciela** e ao **Bruno** obrigada pelo apoio e ajuda. Minhas tias **Rita**, **Nanci** (in memoriam), assim como minha mãe, exemplos de mulheres guerreiras, mães e professoras, sempre dedicadas e com todo entusiasmo, obrigada por todo apoio, incentivo e me ensinarem a arte de educar. Ao tio **Tico**, a vó **Júlia**, **Majú**, **Celso**, **Cleomar**, **Tia Lourdes** pela convivência e apoio. Aos meus queridos amigos **Cássia**, **Marcos**, **Flávia**, **Dona Marli**, **Cristina**, **Mamerto**, **Aline**, **Pâmela**, **Dani**, **Collis** e **Olivia**, muito obrigada por tudo! Muito obrigada a todos por toda torcida, por fazerem parte da minha vida e desculpe pelas ausências, as quais fazem-se necessárias, as vezes pela distância e outras pelas obrigações do dia a dia. E a todos os meus familiares que torceram por mim e sempre me apoiaram. Muito obrigada!

... à minha Orientadora, **Profa. Dra. Ana Flávia Sanches Borges**, por todas as oportunidades, aprendizado, por me incentivar, pela confiança e sabedoria transmitida. Obrigada pela oportunidade de participar da pesquisa clínica das facetas e do grupo da triazina. Obrigada pela amizade, confiança, pela convivência, carinho, incentivo e paciência. Lembrarei de você sempre com muito carinho e admiração. Obrigada por tudo!

ao **Prof. Dr. José Henrique Rubo** por todos os ensinamentos compartilhados, aprendizado, oportunidades, pela confiança e convivência. Obrigada por tudo!

A **Profa. Dra. Linda Wang** por toda atenção, compreensão, ensinamento, dedicação e por todo conhecimento compartilhado durante o mestrado e doutorado. Muito obrigada!

À equipe da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, (grupo da triazina) aos professores **Dr. Fabrício Mezzomo Collares, Dr. Vicente Castelo Branco Leitune**, à doutorando **Gabriela de Souza Balbinot** e ao graduando **Giovan Mateus Balbueno**, obrigada pela parceria, por permitir a realização deste trabalho, por todo aprendizado e acolhimento durante minha visita à faculdade.

Ao **Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais** (Centrinho) por permitir mais esta etapa em minha vida profissional e pelo apoio e compreensão dos meus colegas de trabalho: **Aparício, Esdra, Lilian e Nádia** e pelo incentivo da **Dra. Terumi**.

À **Idiane Bianca Lima Soares Rusu** e ao **Carlos Villavicencio** pela oportunidade, aprendizado, companheirismo e a equipe que formamos na condução da pesquisa clínica das facetas, foram momentos difíceis, as vezes desgastantes, porém de muito aprendizado e no final muitas risadas, além da satisfação dos pacientes. Obrigada pela companhia e por compartilharem comigo tanto conhecimento, aprendi muito com vocês.

À minha turma de doutorado 2017 **Angélica Feltrin, Fernanda Sandes, Giovana Zabeu, Lígia Bueno, Fabrícia e Natália Bastos** por toda parceria. A minha amiga e dupla de mestrado **Isabela Furlaneto Leão**, mesmo estando fazendo a etapa de doutorado no Rio Grande do Sul, obrigada por toda parceria.

Aos professores do Departamento de Dentística FOB-USP: **Profa. Dra. Linda Wang, Profa. Dra. Juliana Fraga Soares Bombonati, Profa. Dra. Ana Flávia Sanches Borges, Prof. Dr. Sérgio Kiyoshi Ishikiriyama, Profa. Dra. Diana Gabriela Soares, Profa. Dra. Maria Teresa Atta, Prof. Dr. Aquira Ishikiriyama, Prof. Dr. Adilson Yoshio Furuse, Prof. Dr. Paulo Francisconi, Prof. Dr. Rafael Mondelli e Prof. Dr. José Mondelli**, que, cada um da sua forma, contribuiu para meu engrandecimento como profissional e pessoal durante essa caminhada entre mestrado e doutorado. Ao **Prof. Dr. Estevam A. Bonfante da Prótese** e a **Profa. Dra. Flaviana Bombarda de Andrade da Endodontia**, muito obrigada por todos os ensinamentos. Meu muito obrigada!

Aos funcionários do Departamento de Dentística, Materiais Odontológicos e Endodontia FOB-USP: **Audria, Natália, Rita, Charlene, Nelson, Elísio, Alcides, Zuleica, Sueli e Edmauro**. À **Telma** e **Larissa** da Bioquímica, **Marcelo** do CIP, **Hebe** da clínica de pós-graduação, **Rivanildo** da prótese. A dona **Cleusa** (faxina), aos funcionários da esterilização, obrigada pela parceria destes anos de trabalhos juntos, com muita paciência, alegria e por todo auxílio!

Aos funcionários do Centro de Pesquisa Clínica **Sueli, Poliane** e **Anderson**, aos dentistas **Dr. Marcelo** e **Dra. Luciana** e aos guardas por todo apoio, auxílio no atendimento dos pacientes de pesquisa e por toda paciência. Aproveito para agradecer aos pacientes que estiveram conosco em todas as etapas da pesquisa, e aos pacientes que pude atender durante mestrado e doutorado, obrigada pela confiança e disponibilidade!

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho, o meu muito obrigada!

AGRADECIMENTOS INSTITUCIONAIS

À Faculdade de Odontologia de Bauru - Universidade de São Paulo (FOB-USP)

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) -
Código de Financiamento 001 que financiou parte deste estudo.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ) que financiou parte deste estudo.

Ao Prof. Dr. Vahan Agopyan, digníssimo reitor da Universidade de São Paulo.

Ao Prof. Dr. Carlos Ferreira dos Santos, diretor da FOB-USP e exemplo de dedicação e profissionalismo.

À Prof. Dra. Profa. Izabel Regina Fischer Rubira de Bullen, presidente da Comissão de Pós-graduação da FOB-USP.

***“Sem sonhos, a vida não tem brilho. Sem metas,
os sonhos não tem alicerces. Sem prioridades, os
sonhos não se tornam reais.”***

Augusto Cury

RESUMO

Propriedades antibacterianas, biológicas e físico-mecânicas de um cimento resinoso contendo 1,3,5-triacriloyhexahidro-1,3,5-triazina

Objetivos: O objetivo deste trabalho foi de formular e avaliar um cimento resinoso experimental com a adição de 1,3,5-triacryloylhexahidro-1,3,5-triazina (TAT).

Material e Métodos: O cimento resinoso experimental foi obtido pela mistura de 50% de Bisfenol A-Glicidil Metacrilato (BisGMA), 30% de Uretano Dimetacrilato (UDMA), 20% de Trietileno Glicol Dimetacrilato (TEGDMA) e iniciadores (% em peso). Vidro de silicato de bário foi utilizado como partícula de carga (45% em peso). A TAT foi utilizada como agente de carga em 15% de concentração, como monômero antibacteriano (C_{TAT}). Um grupo permaneceu sem a adição de triazine, sendo considerado o grupo controle ($C_{CONTROL}$). Os cimentos resinosos foram avaliados em relação ao grau de conversão, espessura de película, escoamento, resistência à flexão, dureza, citotoxicidade e atividade antibacteriana. O teste de micro cisalhamento (μ SBS) foi avaliado em diferentes substratos após 7 e 30 dias. Os dados foram analisados pelo teste de Student e ANOVA à um critério. Para o teste de μ SBS, foi utilizado ANOVA à três critérios seguido do teste de Tukey ($\alpha=0.05$).

Resultados: C_{TAT} apresentou os maiores valores no grau de conversão (imediate e após 7 dias). A espessura de película estava de acordo com as recomendações da ISO 4049 em ambos os grupos. Baixa citotoxicidade e menor dureza foi observada no grupo C_{TAT} comparando-o ao $C_{CONTROL}$. Não houve diferença estatística entre os grupos nos testes de escoamento, resistência flexural, análise planctônica e atividade antibacteriana. No grupo C_{TAT} foi observado uma menor formação de biofilme. Em relação ao teste μ SBS, os maiores valores foram obtidos para o substrato Y-TZP unido ao C_{TAT} .

Conclusão: O cimento resinoso experimental com triazina apresentou atividade antibacteriana, maior grau de conversão e reduzida citotoxicidade além de apresentar maior resistência de união ao substrato Y-TZP.

Palavras chaves: agente antibacteriano. Triazina. Agente de cimentação. Cárie. Cimentos dentais.

ABSTRACT

Antibacterial, biological, and physico-mechanical properties of a 1,3,5-triacryloylhexahydro-1,3,5-triazine containing luting agent

Objectives: The aim of this study was to formulate and evaluate an experimental luting agent with the addition of 1,3,5-triacryloylhexahydro-1,3,5-triazine (TAT).

Materials and Methods: Experimental luting agents were obtained by mixing 50wt% Bisphenol A-Glycidyl Methacrylate (BisGMA), 30wt% Urethane Dimethacrylate (UDMA), 20wt% Triethylene Glycol Dimethacrylate (TEGDMA) and initiators. Barium silicate glass was used as a filler (45wt%). The TAT was added to the filling agents at 15wt% concentration as an antibacterial monomer (C_{TAT}). One group remained without triazine as the control ($C_{CONTROL}$). The experimental luting agents were evaluated by their degree of conversion, film thickness, flow, flexural strength, softening solvent, cytotoxicity and antibacterial activity. The microshear bond strength test (μ SBS) was evaluated in different substrates after 7 and 30 days. Data were analysed by the Student's t-test one-way ANOVA and for μ SBS, three-way ANOVA with Tukey *post hoc* test ($\alpha=0.05$).

Results: C_{TAT} showed a higher degree of conversion (immediately and after 7 days). The film thickness was in accordance with ISO 4049 in both groups. Lower cytotoxicity and lower softening solvent were observed for C_{TAT} when compared to the control. No statistical difference was shown between the groups for flow, flexural strength, in planktonic analysis and in antibacterial activity analysis. Reduced biofilm formation was observed in the C_{TAT} group. C_{TAT} resulted in higher μ SBS values after 7 days of storage when applied on Y-TZP ceramics.

Conclusion: The experimental luting agent with TAT showed antibiofilm activity, increased degree of conversion and decreased the cytotoxicity. In addition, increased the bond strength in a Y-TZP substrate.

Keywords: Antibacterial agents. Triazine. Luting agent. Caries. Dental cements.

TABLE OF CONTENTS

1	INTRODUCTION	13
2	ARTICLES.....	17
2.1	ARTICLE 1	17
2.2	ARTICLE 2	31
3	FUNDAMENTED DISCUSSION	49
4	CONCLUSIONS.....	55
	REFERENCES	59

1 INTRODUCTION

1 INTRODUCTION

The longevity of indirect restorations is affected by mechanical stress, host, bacterial biodegradation (STEWART & FINER, 2019), recurrent caries, fractures, marginal defects, wear (GOLSTEIN, 2010) and failure in the adhesion between the tooth and indirect restorations (MANSO et al, 2011). Recurrent caries is the cause of failure for 1% to 10% of indirect restorations (IOANNIDIS & BINDL, 2016; MORIMOTO et al, 2016), which may be induced by the presence of cariogenic bacteria close to the rehabilitated area. Biofilm accumulation at the cement-tooth interface induces demineralisation in regions where hygiene is difficult to perform (LEHMNENSIEK et al, 2018) contributing to the formation of carious lesions in restored teeth.

The reduction in bacteria colonisation rate in high-risk areas may be achieved by the development of antibacterial dental materials (NEDELJKOVIC et al, 2015; GARCIA et al, 2020). Antibacterial compounds are added to dental materials (GARCIA et al, 2020; ALTMANN et al, 2015; ALTMANN et al, 2017; SCHIROKY et al, 2017; GARCIA et al, 2019) to impair the colonisation of bacteria that remain viable during the treatment. The strategy aims to avoid the colonisation of bacteria that may gain access to the cavity through gaps in the restorative procedures. Different antibacterial agents are studied in dentistry and quaternary ammonium compounds have been used due to their ability to reduce the viability of cariogenic bacteria (GARCIA et al, 2020; ALTMANN et al, 2015; ALTMANN et al, 2017; SCHIROKY et al, 2017; GARCIA et al, 2019; COCCO et al, 2015) and to copolymerise with the methacrylate resin matrix leading to a post-curing antibacterial effect and reliable material stability (SCHIROKY et al, 2017).

Copolymerisable methacrylate-based antibacterial agents, such as the 1,3,5-triacryloylhexahydro-1,3,5-triazine (TAT), were previously added to dental materials (ALTMANN et al, 2015; ALTMANN et al, 2017; SCHIROKY et al, 2017). The three aliphatic double bonds (C=C) (SCHIROKY et al, 2017) are responsible for its copolymerisation capacity and when TAT was added to different methacrylate-based materials, higher resistance to softening, increased bond strength and significantly reduced *Streptococcus mutans* growth were observed (ALTMANN et al, 2015; ALTMANN et al, 2017). Thus, the addition of TAT in a luting agent may reduce the colonisation of cariogenic bacteria near indirect restorations. The

aim of this study was to formulate and evaluate an experimental luting agent with the addition of 1,3,5-triacryloylhexahydro-1,3,5-triazine (TAT).

4 CONCLUSIONS

4 CONCLUSIONS

The experimental luting agent formulated in this study with the addition of 1,3,5-triacryloylhexahydro-1,3,5-triazine showed anti-biofilm activity, increased degree of conversion and decreased the cytotoxicity. The luting agent with TAT increased the bond strength for one Y-TZP type even over the time.

REFERENCES

REFERENCES

ABOUSHELIB, M.N. et al. Ultrastructural analysis and long-term evaluation of composite-zirconia bond strength. *The Journal of Adhesive Dentistry*, v. 20, n. 1, p.33-39, mar. 2018.

ALTMANN, A.S. et al. Effect of methacrylated-based antibacterial monomer on orthodontic adhesive system properties. *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics*, v. 147, n. supl.4, p. S82-87, abr. 2015.

ALTMANN, A.S. et al. In vitro antibacterial and remineralizing effect of adhesive containing triazine and niobium pentoxide phosphate inverted glass. *Clinical Oral Investigation*, v. 21, n. 1, p. 93-103, jan. 2017.

AL-ZAYDI, K.M. et al. Synthesis, characterization and evaluation of 1,3,5-triazine aminobenzoic acid derivates for their antimicrobial activity. *Chemistry Central Journal*, v. 11, n. 1, p. 39, maio, 2017.

CENTENARO, C.C. et al. Influence of addition of 2-[3-(2H-benzotriazol-2-YL) -4-hydroxyphenyl] ethyl methacrylate to an experimental adhesive system. *Acta Odontológica Latinoamerica*, v. 28, n. 1, p. 72-78, abr. 2015.

CHENG, L. et al. Dental primer and adhesive containing a new antibacterial quaternary ammonium monomer dimethylaminododecyl methacrylate. *Journal of Dentistry*, v. 41, n. 4, p. 345–355 abr. 2013.

COCCO, A.R. et al. A systematic review about antibacterial monomers used in dental adhesive systems: current status and further prospects. *Dental Materials*, v. 31, n. 11, p. 1345-1362, nov. 2015.

FERRACANE, J.L. & GREENER, E.H. The effect of resin formulation on the degree of conversion and mechanical properties of dental restorative resins. *Journal of Biomed Materials Research*, v. 20, n. 1, p. 121-131, jan. 1986.

GARCIA, I.M. et al. Quaternary ammonium compound as antimicrobial agent in resin-based sealants. *Clinical Oral Investigation*, v. 22, n. 4, p. 777-784, fev. 2020.

GARCIA, L.S.G et al. Anticaries effect of toothpaste with nano-sized sodium hexametaphosphate. *Clinical Oral Investigation*, v. 23, n. 9, p. 3535-3542, set. 2019.

GOLSTEIN, G.R. The longevity of direct and indirect posterior restorations is uncertain and may be affected by a number of dentist-, patient-, and material-related factors. *The Journal of Evidence-Based Dental Practice*, v. 10, n.1, p. 30-31, mar. 2010.

IOANNIDIS, A. & BINDL, A. Clinical prospective evaluation of zirconia-based three-unit posterior fixed dental prostheses: Up-to ten-year results. *Journal of Dentistry*, v. 47, p. 80–85, abr. 2016.

KATUGAMPALA, S. et al. Synthesis, characterization, and antimicrobial activity of novel sulfonated copper-triazine complexes. *Bioinorganic Chemistry and Application*, v. 29. 2018

LEHMENSIEK, M. et al. Restoration integrity, but not material or cementation strategy determined secondary caries lesions next to indirect restorations in vitro. *Dental Materials*, v. 34, n. 12, p. e317-323, dez. 2018.

LEWIS, S.N. et al. Pharmacophore modeling improves virtual screening for novel peroxisome proliferator-activated receptor-gamma ligands. *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, v. 29, n: 5, p. 421-439, maio. 2015.

MANSO, A.P. et al. Cements and adhesives for all-ceramic restorations. *Dental Clinics of North America*, v. 55, n. 2, p. 311-332, abr. 2011.

MICHELTSEN, V.B. et al. Quantitative analysis of TEGDMA and HEMA eluted into saliva from two dental composites by use of GC/MS and tailor-made internal standards. *Dental Materials*, v. 24, n. 6, p. 724-731, jun. 2008.

MONTEIRO, J.C. et al. Dental Sealant Empowered by 1,3,5-Tri Acryloyl Hexahydro1,3,5-Triazine and α -Tricalcium Phosphate for Anti-Caries Application. *Polymers (Basel)*, v. 12, n. 4, p.e895, abr. 2020.

MORIMOTO, S. et al. Survival rate of resin and ceramic inlays, onlays, and overlays: a systematic review and meta-analysis. *Journal of Dental Research*, v. 95, n. 9, p. 985–994, ago. 2016.

NEDELJKOVIC, I. et al. Is secondary caries with composites a material-based problem? *Dental Materials*, v. 31, n. 11, p. e247-277, nov. 2015.

NOVAIS, V.R. et al. Degree of conversion and bond strength of resin-cements to feldspathic ceramic using different curing modes. *Journal of Applied Oral Science*, v. 25, n. 1, p. 61-68, jan-fev. 2017.

PASSOS, S.P. et al. The effect of air-abrasion and heat treatment on the fracture behaviour of Y-TZP. *Dental Materials*, v. 31, n. 9, p.1011-1021, set. 2015.

PONGPRUEKSA, P. et al. Monomer elution in relation to degree of conversion for different types of composite. *Journal of Dentistry*, v. 43, n. 12, p. 1448-1455, dez. 2015.

QUIGLEY, N.P. et al. Clinical efficacy of methods for bonding to zirconia: A systematic review. *Journal of Prosthetic Dentistry*, fev. 2020.

SANTERRE, J.P. et al. Relation of dental composite formulations to their degradation and the release of hydrolyzed polymeric-resin-derived products. *Critical Reviews in Oral Biology Medicine*, v. 12, n. 2, p. 136–151, 2001.

SCHIROKY, P.R. et al. Triazine compound as copolymerized antibacterial agent in adhesive resins. *Brazilian Dental Journal*, v. 28, n. 2, p. 196-200, mar-abr. 2017.

STEWART, C.A. & FINER, Y. Biostable, antidegradative and antimicrobial restorative systems based on host-biomaterials and microbial interactions. *Dental Materials*, v. 35, n. 1, p. 36-52, jan. 2019.

WEIGL, P. et al. Screw-retained monolithic zirconia vs. cemented porcelain-fused-to-metal implant crowns: a prospective randomized clinical trial in Split-Mouth Design. *Clinical Oral Investigation*, v. 23, n. 3, p.1067-1075, mar. 2019.

ZHOU, C. et al. Synthesis and biological evaluation of novel 1,3,5-triazine derivatives as antimicrobial agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letter*, v. 18, n. 4, p. 1308-1311, fev. 2008.
