

Gabrielle Cristina Piatì

Síntese, caracterização, efeito antimicrobiano/antibiofilme e propriedades físico-mecânicas de um cimento de ionômero de vidro modificado por quitosana fosforilada e nanopartículas de trimetafosfato de sódio

Araçatuba-SP

2024

Gabrielle Cristina Piatí

Síntese, caracterização, efeito antimicrobiano/antibiofilme e propriedades físico-mecânicas de um cimento de ionômero de vidro modificado por quitosana fosforilada e nanopartículas de trimetafosfato de sódio

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Araçatuba, para obtenção de título de Mestre em Ciências - Área de Concentração: Saúde Bucal da Criança.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Marcelle Danelon

Araçatuba – SP
2024

Catálogo-na-Publicação (CIP)

Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

Piati, Gabrielle Cristina.

P582s Síntese, caracterização, efeito antimicrobiano/antibiofilme e propriedades físico-mecânicas de um cimento de ionômero de vidro modificado por quitosana fosforilada e nanopartículas de trimetafosfato de sódio / Gabrielle Cristina Piati. - Araçatuba, 2024

61 f. : il. ; tab.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia de Araçatuba
Orientadora: Profa. Marcelle Danelon

1. Cimentos de ionômeros de vidro 2. Nanopartículas
3. Fosfatos 4. Quitosana 5. Testes mecânicos 6. Biofilmes
I. T.

Black D27

CDD 617.645

Claudio Hideo Matsumoto – CRB-8/5550

DADOS CURRICULARES

GABRIELLE CRISTINA PIATI

Nascimento	06.09.1999 – Sertãozinho – SP
Filiação	Alessandro Piatì Daniela Cristina Israel Piatì
2018/2022	Curso de Graduação em Odontologia pela Universidade de Ribeirão Preto-SP UNAERP.
2022/2024	Desenvolvimento de Projeto de Mestrado Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Araçatuba.
Associações	CROSP - Conselho Regional de Odontologia de São Paulo. SBPqO - Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica.

Dedicatória

Dedico esse trabalho à Deus, por todo o sustento e força, e aos meus pais Alessandro e Daniela e ao meu irmão Pedro, por apoio e compreensão durante esses anos e concretização do meu sonho.

E tudo o que fizerdes, seja em palavra, seja em ação, fazei-o em nome do Senhor Jesus, dando por ele graças a Deus Pai.

(Colossenses 3:17)

Agradecimentos Especiais

A Deus

Primordialmente a **Deus** por me confiar a Odontologia como profissão, e ter me sustentado em cada momento com a Palavra que conforta e por sua infinita bondade durante todo o percurso.

A minha família e namorado

Aos **meus pais Alessandro Piatì e Daniela Cristina Israel Piatì**, por ter sido a minha base em todas as circunstâncias, por serem meus maiores incentivadores e colo que acolhe.

Ao **meu irmão Pedro Israel Piatì**, por ter sido meu primeiro paciente, por sempre confiar em mim e ser a alegria que contagia.

Ao **meu namorado Lucas José Meloni**, pela paciência e compreensão, por ter sido o amor que promove nesses anos.

A minha Orientadora, Professora Dra. Marcelle Danelon,

Meu agradecimento a todos os ensinamentos ao longo desses anos, pela orientação criteriosa e carinhosa. Deus abençoe sua trajetória, a senhora é luz onde estiver.

Aos docentes das Disciplinas da Pós-graduação

Obrigada pelos ensinamentos, e por toda dedicação para a transmissão do conhecimento além dos teóricos, agradeço a cada professor que tive o privilégio de conhecer.

Aos amigos da Pós-graduação,

Francienne e Gabriel, pela ajuda nas etapas da pesquisa realizadas no campus de Araçatuba, obrigada pelo carinho e paciência. **Gabriela e Letícia**, obrigada pelas experiências vividas, as viagens que pudemos compartilhar de uma forma leve e enriquecedora. Amigos de outra Faculdade: **Analú**, muito obrigada pelo auxílio nos experimentos de biofilme no campus de Araraquara, obrigada pelo carinho e

atenção. **Antônio**, obrigada pela disponibilidade em auxiliar durante os experimentos de citotoxicidade.

Ao Professor João Carlos Sílos Moraes,

Meu muito obrigada pela paciência e ensinamento em nos auxiliar na realização do teste de grau de conversão dos monômeros, cedendo gentilmente o aparelho FTIR no laboratório de Física e Química da Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira – UNESP.

A Professora Fernanda Lourenção Brighenti,

Muito obrigada pelo auxílio na realização das análises antimicrobianas na Faculdade de Odontologia de Araraquara – FOAr/UNESP, no Laboratório de pesquisa bioquímica e microbiológica.

A Professora Larissa Moreira Spínola de Castro Raucí,

Muito obrigada pelo apoio na realização dos experimentos de citotoxicidade no Laboratório Cultura de Células e Biologia Molecular, da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – FORP/USP.

A Seção de Pós-Graduação,

Cristiane e Valéria, muito obrigada por toda atenção e paciência.

A Faculdade de Odontologia de Araçatuba,

Na pessoa dos professores: Prof. Tit. Alberto Carlos Botazzo Delbem, digníssimo Diretor e Prof. Dr. Luciano Tavares Angelo Cintra digníssimo Vice-Diretor.

Ao Curso de Pós-Graduação em Ciências da Faculdade de Odontologia de Araçatuba-UNESP,

Na pessoa do Coordenador Prof. Associado Juliano Pelim Pessan.

Ao Team Danelon,

Obrigada meninas por sempre estarem dispostas a ajudar, na parte científica e também na amizade, vocês fazem toda diferença no *Team Danelon*.

A aluna de Iniciação Científica Danielly B. Gonçalves Silva

Pela ajuda durante o desenvolvimento do Projeto de Pesquisa.

*Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
(FAPESP).*

Pela concessão de recurso (Processo: 2020/15025-2) para o desenvolvimento do nosso projeto, em parceria com a aluna de iniciação científica Danielly B. Gonçalves Silva.

Epígrafe

Não sei se a vida é curta ou longa para nós, mas sei que nada do que vivemos tem sentido, se não tocarmos o coração das pessoas. Muitas vezes basta ser: colo que acolhe, braço que envolve, palavra que conforta, silêncio que respeita, alegria que contagia, lágrima que corre, olhar que acaricia, desejo que sacia, amor que promove. E isso não é coisa de outro mundo, é o que dá sentido à vida. É o que faz com que ela não seja nem curta, nem longa demais, mas que seja intensa, verdadeira, pura enquanto durar. Feliz aquele que transfere o que sabe e aprende o que ensina.

(Cora Coralina)

Resumo

Piati, GC. Síntese, caracterização, efeito antimicrobiano/antibiofilme e propriedades físico-mecânicas de um cimento de ionômero de vidro modificado por quitosana

fosforilada e nanopartículas de trimetafosfato de sódio. 2024 61f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2024.

Resumo

Objetivo: Avaliar *in vitro* o efeito da incorporação de nanopartículas de trimetafosfato de sódio (TMPnano) e quitosana fosforilada (QuiPh) em cimento de ionômero de vidro modificado por resina (CIVMR) restaurador sobre as propriedades físico-mecânicas, antimicrobianas e citotóxicas. **Materiais e Métodos:** Corpos-de-prova foram confeccionados (n=6): 1) CIVMR sem TMPnano e QuiPh (CIVMR, Fuji II LC); 2) CIVMR-14%TMPnano; 3) CIVMR-0,25%QuiPh; 4) CIVMR-0,5%QuiPh; 5) CIVMR-14%TMPnano-0,25%QuiPh e 6) CIVMR-14%TMPnano-0,5%QuiPh. Determinou-se a Resistência à Tração (RT) e Compressão Diametral (RCD), Dureza de Superfície (DS) (24 horas e 7 dias), Rugosidade de Superfície (RS) e Porcentagem do Grau de Conversão dos Monômeros (%GC), após 24 horas. Para a liberação de flúor (F) os corpos de prova foram submetidos em solução desmineralizadora (6 horas) e remineralizadora (16 horas) durante 15 dias. Para análise da atividade Antimicrobiana e Antibiofilme foi utilizado a cepa de *S. mutans* (UA159) por meio do teste de adesão e crescimento de biofilme; já para o Metabolismo do Biofilme o método do XTT. A análise de Citotoxicidade foi avaliada pelas células odontoblastóides da linhagem MDPC-23, realizada através do método da resazurina. Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), seguido pelo teste Student-Newman-Keuls ($p < 0,001$). **Resultados:** Para os dados de RT e RCD, após 24 horas, todos os grupos foram similares entre si ($p > 0,001$); após 7 dias, a associação de 14%TMPnano e 0,25%QuiPh contribuiu na melhora da RT e RCD em ~ 24% quando comparado ao CIVMR ($p < 0,001$). Para a análise de DS, os grupos CIVMR, CIVMR-0,5%QuiPh foram similares entre si, após 24 horas, demonstrando os menores valores ($p > 0,001$); o grupo CIVMR-0,25%QuiPh apresentou o maior valor, diferindo dos demais ($p < 0,001$). Os valores de RS (μm) demonstra que não houve diferença estatística entre os grupos CIVMR, CIVMR-0,25%QuiPh, CIVMR-0,5%QuiPh, CIVMR-14%TMPnano-0,25%QuiPh e CIVMR-14%TMPnano-0,5%QuiPh ($p > 0,001$); o grupo CIVMR-14%TMPnano apresentou o maior valor de RS ($p < 0,001$). A %GC foi similar para todos os grupos ($p > 0,001$). Houve liberação gradativa de F para todos os grupos durante o período de 15 dias. O grupo CIVMR liberou menor quantidade de F quando comparado aos demais grupos ($p < 0,001$); na análise cumulativa, após 15 dias, o grupo CIVMR-14%TMPnano-0,25%QuiPh apresentou o maior valor ($p > 0,001$), já os grupos CIVMR-14%TMPnano, CIVMR-0,25%QuiPh, CIVMR-0,5%QuiPh e CIVMR-14%TMPnano-0,5%QuiPh foram similares entre si ($p > 0,001$). O melhor efeito inibitório e maior eficácia sobre a viabilidade celular, contra *S. mutans*, foi observado para o grupo CIVMR-14%TMPnano-0,25%QuiPh ($p < 0,001$). Para análise da citotoxicidade, no tempo de 24 horas, os grupos CIVMR-0,25%QuiPh e CIVMR-14%TMPnano-0,25%QuiPh apresentaram o menor e similar efeito citotóxico ($p > 0,001$); para os tempos de 48 horas e 72 horas, apenas o grupo CIVMR-14%TMPnano-0,25%QuiPh apresentou citocompatibilidade similar ao grupo com 100% de atividade metabólica (DMEM). **Conclusão:** Diante dos resultados conclui-se

que a adição de ambos os agentes ativos TMPnano (14%) e QuiPh (0,25%), favoreceu a melhora das propriedades físico-mecânicas, antimicrobiana/antibiofilme e citotóxicas, podendo ser um material restaurador promissor para a aplicação clínica em paciente com atividade à cárie dentária.

Palavras-chave: Cimento de ionômero de vidro, nanopartículas, fosfatos, quitosana, testes mecânicos, biofilme.

Abstract

Piati, GC. Synthesis, characterization, antimicrobial/antibiofilm effect and physical-mechanical properties of a glass ionomer cement modified by phosphorylated chitosan

and sodium trimetaphosphate nanoparticles. 2024 61f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2024.

Abstract

Objective: To evaluate *in vitro* the effect of incorporating sodium trimetaphosphate nanoparticles (TMPnano) and phosphorylated chitosan (QuiPh) into restorative resin-modified glass ionomer cement (RMGIC) on its physical-mechanical, antimicrobial and cytotoxic properties. **Material and Methods:** Test specimens were made (n=6): 1) CIVMR without TMPnano and QuiPh (RMGIC, Fuji II LC); 2) RMGIC-14%TMPnano; 3) RMGIC -0.25%QuiPh; 4) RMGIC -0.5%QuiPh; 5) RMGIC-14%TMPnano-0.25%QuiPh and 6) RMGIC-14%TMPnano-0.5%QuiPh. Tensile Strength (TR) and Diametral Compression Strength (DCR), Surface Hardness (SD) (24 hours and 7 days), Surface Roughness (SR) and Percentage of Monomer Degree of Conversion (%GC) were determined after 24 hours. For fluoride release (F), the specimens were submitted to a demineralizing (6 hours) and remineralizing (16 hours) solution for 15 days. For analysis of Antimicrobial and Antibiofilm activity, the *S. mutans* strain (UA159) was used by means of the adhesion and biofilm growth test; for Biofilm Metabolism, the XTT method was used. Cytotoxicity analysis was carried out on MDPC-23 odontoblastoid cells using the resazurin method. The results were submitted to analysis of variance (ANOVA), followed by the Student-Newman-Keuls test ($p < 0.001$). **Results:** For the RT and RCD data, after 24 hours, all the groups were similar to each other ($p > 0.001$); after 7 days, the combination of 14%TMPnano and 0.25%QuiPh contributed to improving RT and RCD by ~24% when compared to RMGIC ($p < 0.001$). For the DS analysis, the RMGIC, RMGIC-0.5%QuiPh groups were similar to each other after 24 hours, showing the lowest values ($p > 0.001$); the RMGIC-0.25%QuiPh group showed the highest value, differing from the others ($p < 0.001$). The RS values (μm) show that there was no statistical difference between the RMGIC, RMGIC-0.25%QuiPh, RMGIC-0.5%QuiPh, RMGIC-14%TMPnano-0.25%QuiPh and RMGIC-14%TMPnano-0.5%QuiPh groups ($p > 0.001$); the RMGIC-14%TMPnano group had the highest RS value ($p < 0.001$). The %GC was similar for all groups ($p > 0.001$). There was a gradual release of F for all groups over the 15-day period. The RMGIC group released the least amount of F when compared to the other groups ($p < 0.001$); in the cumulative analysis, after 15 days, the RMGIC-14%TMPnano-0.25%QuiPh group showed the highest value ($p > 0.001$), while the CIVMR-14%TMPnano, RMGIC-0.25%QuiPh, RMGIC-0.5%QuiPh and RMGIC-14%TMPnano-0.5%QuiPh groups were similar to each other ($p > 0.001$). The best inhibitory effect and greatest efficacy on cell viability against *S. mutans* was observed for the RMGIC-14%TMPnano-0.25%QuiPh group ($p < 0.001$). For the cytotoxicity analysis, at 24 hours, the RMGIC-0.25%QuiPh and RMGIC-14%TMPnano-0.25%QuiPh groups showed the lowest and similar cytotoxic effect ($p > 0.001$); at 48 hours and 72 hours, only the RMGIC-14%TMPnano-0.25%QuiPh group showed similar cytocompatibility to the group with 100% metabolic activity (DMEM). **Conclusion:** In view of the results, it can be concluded that the addition of both active agents TMPnano (14%) and QuiPh (0.25%) improved the physical-

mechanical, antimicrobial/antibiofilm and cytotoxic properties and could be a promising restorative material for clinical application in patients with active dental caries.

Keywords: Glass ionomer cement, nanoparticles, phosphates, chitosan, mechanical tests, biofilm.

Lista de Abreviaturas

LISTA DE ABREVIATURAS

TMPnano Trimetafosfato nanoparticulado

TMP Trimetafosfato microparticulado

CIVMR Cimento de Ionômero de Vidro Modificado por Resina

CIVMRs Cimentos de Ionômero de Vidro Modificados por Resina

Qui-Ph Quitosana Fosforilada

RT Resistência à Tração

RCD Resistência à Compressão Diametral

KHN Unidade de Dureza Knoop

DS Dureza de Superfície

MPa Megapascal

DRX Difração de raios-X

μL Microlitros

g Gramas

mL Mililitros

°C Graus Celsius

min Minutos

μm Micrometros

FTIR Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier

RMN Ressonância Magnética Nuclear

rpm Rotações por minuto

mm Milímetros

DES Solução Desmineralizadora

RE Solução Remineralizadora

P Fósforo

Al Alumínio

KCl Cloreto de Potássio

Mol/l Mol por Litro

TISAB Tampão de Ajuste de Força Iônica Total

mmol/L Milimol por Litro

g F/mL Micrograma de flúor por microlitro

TISAB II Tampão ajustador de força iônica total

µgF/cm² Micrograma de flúor por centímetro quadrado

mm/min Milímetros por minuto

kN Kilo Newton

Kgf/cm² Kilograma força por centímetro quadrado

KBr Brometo de potássio

C Carbono

MEV Microscopia Eletrônica de Varredura

EDS Espectroscopia de Energia Dispersiva

Kv Kilo volts

DO Densidade óptica

Nm Nanômetro

h Hora

cm Centímetros

UFC/mL Unidades Formadoras de Colônias por mililitro

Ca Cálcio

Mg/L miligrama por litro

cm² centímetro quadrado

µg/mL Microgramas por microlitro

UL/mL Unidade Internacional por mililitro

SBF Soro Fetal Bovino

ANOVA Análise de Variação

mA Miliampere

MET Microscopia Eletrônica de Transmissão

METAR Microscopia Eletrônica de Transmissão de Alta Resolução

O Oxigênio

H Hidrogênio

%GC Porcentagem do Grau de Conversão

g/mL grama por mililitro

Sumário

Sumário	
1. Introdução	25
2. Material e Métodos	26
3. Resultados.....	32
4. Discussão.....	35
5. Agradecimentos.....	38
6. Referências	38
Legenda de Tabela.....	43
Legenda de Figuras.....	43
ANEXO A: Esquema da estrutura molecular da quitosana e quitosana fosforilada	51
ANEXO B: Esquema da estrutura molecular do trimetafosfato de sódio microparticulado	51
ANEXO C: Síntese e caracterização da quitosana fosforilada	52
ANEXO D: Síntese e caracterização do trimetafosfato de sódio nanoparticulado	53
ANEXO E: Preparo da mistura dos CIVMR.....	53
ANEXO F: Grupos experimentais	54
ANEXO G: Avaliação da Resistência à Tração Diametral (RTD).....	55
ANEXO H: Avaliação da Resistência à Compressão (RC).....	54

ANEXO I: Avaliação da Dureza de Superfície (DS)	55
ANEXO J: Avaliação da Rugosidade Superficial (RS)	55
ANEXO K: Determinação da Porcentagem do Grau de Conversão (GC) dos Monômeros dos CIVMR.....	57
ANEXO L: Análise da Morfologia e Composição Química Através da Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Energia Dispersiva de Raios-x (EDS)	57
ANEXO M: Análise da liberação de F dos CIVMR.....	58
ANEXO N: Teste de Adesão ao <i>Streptococcus mutans</i>	60
ANEXO O: Ensaio de Biofilme	61
ANEXO P: Análise da Citotoxicidade dos CIVMRs	62

Artigo

Síntese, caracterização, efeito antimicrobiano/antibiofilme e propriedades físico-mecânicas de um cimento de ionômero de vidro modificado por quitosana fosforilada e nanopartículas de trimetafosfato de sódio

Gabrielle Cristina Piat^a, Danielly Beatriz Gonçalves Silva^b, Larissa Moreira Spinola de Castro Raucci^b, Paulo Tambasco de Oliveira^c, Antônio Secco Martorano^c, Valtencir Zucolotto^d, Bruna Dias^d, Fernanda Lourenção Brighenti^e, Analú Barros de Oliveira^e, Marcelle Danelon^a.

^aSão Paulo State University (UNESP), School of Dentistry, Araçatuba
Department of Preventive and Restorative Dentistry
Rua José Bonifácio 1193 Araçatuba, SP - Cep 16015-050 – Brazil.

^bSchool of Dentistry, University of Ribeirão Preto - UNAERP, Ribeirão Preto, SP – Cep 14096-900 – Brazil.

^cSchool of Dentistry of Ribeirão Preto - University of São Paulo, SP, Brazil.

^dPhysics Institute of São Carlos, São Paulo University, São Carlos, SP, Brazil.

^eDepartment of Morphology, Genetics, Orthodontics and Pediatric Dentistry, São Paulo State University (Unesp), School of Dentistry, R. Humaitá, 1680 - Centro, Araraquara, São Paulo 14801-903, Brazil.

Título curto: Efeito da incorporação de nanopartículas de fosfatos e quitosana fosforilada em uma formulação de cimento restaurador.

Corresponding author:

Marcelle Danelon

^aSão Paulo State University (UNESP), School of Dentistry, Araçatuba
Department of Preventive and Restorative Dentistry
Rua José Bonifácio 1193 Araçatuba, SP - Cep 16015-050 – Brazil.

Email:marcelle.danelon@unesp.br

Palavras-chave: Cimento de ionômero de vidro, nanopartículas, fosfatos, quitosana, testes mecânicos, biofilme.

*De acordo com as instruções aos autores do periódico Caries Research

1. Introdução

A cárie dentária é uma doença crônica de prevalência mundial. Sua alta prevalência pode ser visualizada principalmente em países com baixo Índice de Desenvolvimento Humano, demonstrando o forte impacto socioeconômico frente à doença e ao acesso aos programas de prevenção e tratamento [Mathur et al., 2018; Peres et al., 2019; Amarasena et al., 2023]. Para o restabelecimento da saúde bucal frente a lesões de cárie, medidas podem ser adotadas a depender do estágio da lesão. Para a fase de prevenção, a literatura destaca os produtos fluoretados de uso individual como dentifrícios fluoretados com no mínimo de 1000 ppm, ou de uso coletivo com a fluoretação das águas, além disso selante de fósulas e fissuras [Urquhart et al., 2019]. Em lesão de mancha branca (estágio inicial da doença), a remineralização do esmalte torna-se possível com aplicação de produtos com alta concentração de flúor (F), como os vernizes e géis associados a boas medidas de higiene e dieta [Braga et al., 2019]. Entretanto, em situações onde ocorre a progressão e consequentemente cavitação das estruturas dentárias, procedimentos restauradores são indicados [Giacaman et al., 2018; Liang et al., 2018; Duggal et al., 2022].

O cimento de ionômero de vidro convencional (CIV) e o modificado por resina (CIVMR), são materiais amplamente utilizados em Odontopediatria para os procedimentos restauradores, assim como: base em restaurações com resina composta, selantes de fissuras e agentes cimentantes [Leal et al., 2019; Zhao et al., 2019]. O CIV apresenta capacidade anticariogênia, através da liberação de íons F, coeficiente de expansão térmica semelhante às estruturas dentais, adesão aos tecidos mineralizados, estabilidade em meio aquoso, biocompatibilidade, capacidade de liberação e reincorporação de F ao longo do tempo [da Silva et al., 2019; Karimi et al., 2019; Nicholson et al., 2020; Amin et al., 2021]; porém, apresenta algumas propriedades insatisfatórias quando comparado a resinas compostas, como: maior índice de manchamento extrínseco, maior opacidade, menores propriedades físico-mecânicas, não sendo muitas vezes utilizado em restaurações permanentes, ou em áreas de estresse constante e maior rugosidade superficial [Kakkad et al., 2022]. Essas características podem causar alterações dimensionais, acúmulo de biofilme microbiano, e por consequente a recidiva de cárie [Heboyan et al., 2023]. Com isso, novos estudos estão sendo conduzidos para melhorar as propriedades físico-mecânicas, microbiológicas e citotóxicas desses materiais [da Silva et al., 2019; Zhao et al., 2019].

Seguindo o conceito de modificações dos materiais, estudos com nanopartículas [He et al., 2019], têm sido realizados, demonstrando que a redução da partícula pode contribuir para melhorar as propriedades mecânicas, antimicrobianas e reduzir a formação de biofilme [Balhaddad et al., 2019]. Danelon et al [2015 e 2017] demonstraram *in situ* e *in vitro* que a incorporação de nanopartículas de trimetossfato de sódio (TMPnano), um fosfato inorgânico, em dentifrícios, remineralizou significativamente lesões cariosas e reduziu a desmineralização do esmalte quando comparado ao dentifrício convencional 1100 ppm F. Ainda, segundo da Silva et al. [2019] a associação de TMPnano

e clorexidina em CIVMR, potencializou o efeito antimicrobiana/antibiofilme e capacidade de prevenir a desmineralização do esmalte, do CIVMR sem alterações drásticas nas propriedades físico-mecânicas.

Uma outra alternativa para otimizar materiais restauradores é o uso de agentes naturais [Sahariah & Masson, 2017]. A quitosana (Qui), tem sido utilizada como agente quelante de íons, por exemplo os fosfatos orgânicos, podendo favorecer a imobilização de íons de cálcio na molécula e formação de sítios de nucleação. Ainda, apresenta ação bactericida e bacteriostática por meio do acúmulo de sua carga positiva na parede celular bacteriana, tornando-a uma base ideal para a liberação sustentada do fármaco [Sahariah & Masson, 2017]. A reação de fosforilação das moléculas de quitosana (QuiPh) (através da fosforilação do carbono 6) resultam em moléculas reativas, com propriedades altamente quelante, biocompatível, osteoindutora, reparadoras e regeneradoras de tecidos [Wang & Liu, 2014; Beltrame et al., 2018; Sultankulov et al., 2019]. Ainda, os grupos de aminas livres são protonados, em meio ácido, fornecendo propriedades bioadesivas por meio da interação das cargas positivas com as cargas negativas das superfícies [Wang et al., 2017].

Diante do exposto, o objetivo do presente estudo foi avaliar *in vitro* o efeito da incorporação de nanopartículas de trimetafosfato de sódio (TMPnano) e quitosana fosforilada (QuiPh) em cimento de ionômero de vidro modificado por resina (CIVMR) restaurador sobre as propriedades físico-mecânicas, antimicrobianas e citotóxicas. A hipótese nula do estudo foi a de que a incorporação de TMPnano e QuiPh ao CIVMR não promoveria melhorias nas propriedades físico-mecânicas, microbiológicas e citotóxicas quando comparado ao CIVMR apenas.

2. Material e Métodos

2.1. Síntese e Caracterização da Quitosana Fosforilada (QuiPh)

A reação de síntese foi baseada no estudo de Zhang et al. [2014]. Neste processo, dois gramas de quitosana (Qui) (ANEXO A) de baixo peso molecular foram dissolvidos em 25 mL de ácido metanosulfônico (CAS: 75-75-2, Sigma-Aldrich®) com o auxílio de agitação magnética. O sistema foi colocado em banho de gelo e 420 µL de pentóxido de fósforo (CAS: 1314-56-3, Sigma-Aldrich®) em ácido metanosulfônico (0,25 g/mL) (CAS: 75-75-2, Sigma-Aldrich®) foram adicionados ao meio. Essa mistura foi agitada por três horas, sendo a temperatura mantida entre 0 a 5 °C em atmosfera inerte. Após esse período, a solução foi mantida a -20°C com posterior precipitação utilizando metanol (CAS: 67-56-1, Sigma-Aldrich®). Centrifugação a 12857 g, por 10 min, foi realizada para separação do produto obtido, que foi lavado com acetona por mais três ciclos. Para total remoção dos reagentes do meio, a QuiPh foi dissolvida em água, filtrada em membrana de 0,45 µm (Analítica®) e submetida à diálise, com posterior liofilização e maceração. A análise do produto obtido foi realizada utilizando-se espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTI-R) e espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN).

2.2 Síntese e Caracterização do Trimetafosfato de Sódio Nanoparticulado (TMPnano)

A síntese e caracterização do trimetafosfato de sódio nanoparticulado (TMPnano) (ANEXO B) foi realizada baseado nos estudos de Danelon et al. [2015 e 2017]. Inicialmente o TMP microparticulado (TMP) foi primeiramente pesado na quantidade necessária para o estudo, e a seguir, armazenado em frascos de polietileno. Bolas de zircônia foram adicionadas ao TMP em associação com isopropanol até recobrir as bolas. Os frascos foram vedados com veda rosca. Em seguida foram levados ao moinho de bolas sendo submetidos à moagem por 48 horas. Após, o mesmo foi submetido à filtração em peneiras granulométricas para a sua separação das bolas de zircônia. O frasco de polietileno contendo o TMPnano foi lavado com isopropanol e o material filtrado vedado com papel alumínio e submetido à secagem em estufa a temperatura de 85°C para evaporação do solvente (Isopropanol). Após a secagem do TMPnano, o mesmo foi submetido à trituração, em almofariz de ágata, pesado e armazenado em frasco de polietileno. A difração de raios-X (DRX) foi utilizada para a identificação da estrutura cristalina e para estimativa do tamanho médio de TMP e TMPnano moído por 48 horas.

2.3 Preparo da Mistura dos CIVMR

O CIVMR utilizado para os experimentos laboratoriais foi o Fuji II LC (GC Corporation, Tokyo, Japan). Inicialmente o TMPnano, foi adicionado ao pó do CIVMR em concentração de 14% [da Silva et al., 2019]. Para a QuiPh foram utilizadas 2 concentrações (0,25% e 0,5%) [Kim et al., 2017; Mishra et al., 2017]. Para a adição do TMPnano/Qui-Ph ao pó do CIVMR foi considerado que cada 100g do produto final da mistura (CIVMR/TMPnano/QuiPh) teria 14% do TMPnano e/ou 0,25%/0,5% de QuiPh. Cada mistura foi homogeneizada em moinho de bolas de ágata (Planetary Micro Mill PULVERISETTE 7 classic line, Fritsch GmbH, Idar-Oberstein, Germany) com frequência de 100 rpm em 5 ciclos de repetição (normal/reverso) com duração de 1 minuto cada [Hosida et al., 2019]. Para a manipulação do material foi mantida a proporção pó-líquido do CIVMR recomendada pelo fabricante (3,2 g pó para 1,0 g de líquido).

2.4. Determinação das Propriedades Físico-Mecânicas dos CIVMR

2.4.1. Avaliação da Resistência à Tração Diametral (RTD)

Doze corpos-de-prova foram confeccionados [ISO 9917-2:2017] (6 mm de diâmetro x 3 mm de espessura) em matrizes de silicone de condensação (Speedex) e fotopolimerizados (Fotopolimerizador Rádi-Cal - SDI, intensidade da luz: 1200mW/cm² (pico) e fotopolimerizados por 40 segundos, nas superfícies superior e inferior [da Silva et al., 2019]. Após os períodos de armazenamento (como descrito anteriormente) foram submetidos ao ensaio de resistência à tração diametral (RTD), com célula de carga de 5 kN a uma velocidade de 0,5 mm/min, em posição horizontal, até que ocorresse a fratura. Para tanto, foi utilizada uma máquina de ensaio universal Instron (DL3000, Instron Co., Canton, MA, Estados Unidos da América). Os valores de tensão diametral (kgf/cm²) foram

calculados usando a equação: $RTD=2F/3.14DT$, onde F é a carga, D é o diâmetro e T é a altura do espécime.

2.4.2. Avaliação da Resistência à Compressão (RC)

Doze corpos-de-prova foram confeccionados [ISO 9917-2:2017] (4 mm de diâmetro x 6 mm de altura) em matrizes de silicone de condensação (Speedex, Vigodent S.A. Indústria e Comércio, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) e fotopolimerizados (Fotopolimerizador Radii-Cal - SDI, intensidade da luz: 1200mW/cm^2 (pico)) por 40 segundos, nas superfícies superior e inferior. Seis corpos-de-prova foram armazenados por 24 horas e outros seis por 7 dias, em estufa a 37 °C, em ambiente úmido. Em seguida, foram submetidos ao ensaio de resistência à compressão em máquina de ensaio universal Instron (DL3000, Instron Co.), com célula de carga de 5 kN a uma velocidade de 0,75mm/min, em posição vertical, até que ocorresse a fratura. A resistência à compressão foi medida em megapascal (MPa).

2.4.3. Avaliação da Rugosidade Superficial (RS)

A RS das amostras para cada grupo experimental (6 mm de diâmetro x 3 mm de altura; n = 6) foi analisada com um instrumento de medição de rugosidade (Surfcorder SE1700; Kosaka Corp, Tóquio, Japão) equipado com uma agulha de diamante de 2 µm de raio. Para registrar as medidas de rugosidade, a agulha foi movida a uma velocidade constante de 1,25 mm/s sob uma carga de 0,7 mN. O valor de corte foi estabelecido em 0,25 mm para maximizar a filtração da ondulação superficial. Três traços foram registrados para cada amostra em três locais diferentes - paralela, perpendicular e oblíqua para escanear toda a área da amostra. A rugosidade da superfície foi caracterizada pela rugosidade média (Ra), que é o valor médio aritmético de todas as distâncias absolutas do perfil de rugosidade a partir da linha central, dentro do comprimento de medição [Cibim et al., 2017].

2.4.4. Avaliação da Dureza de Superfície (DS)

Foram confeccionados 6 corpos-de-prova com o auxílio de uma matriz de silicone de condensação (6 mm de diâmetro e 3 mm de espessura) e fotopolimerizados (Fotopolimerizador Radii-Cal - SDI, intensidade da luz: 1200mW/cm^2 (pico)) por 40 segundos, nas superfícies superior e inferior [Menezes-Silva et al., 2020]. Após 24 horas, mantidos em recipiente plástico e em ambiente úmido (37 °C), foram submetidos ao teste de dureza de superfície. O teste foi realizado com o auxílio de um microdurômetro (Shimadzu Micro Hardness Tester HMV-2.000 (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan), sob carga estática (Knoop) de 100 g por um tempo de 5 segundos. Foram realizadas 5 impressões na superfície do material distantes 500 µm entre si [Menezes-Silva et al., 2020]. A seguir, os corpos-de-prova foram armazenados em estufa a 37 °C (em ambiente úmido) e após 7 dias foi repetido o teste da dureza, sendo realizadas 5 impressões a 250 µm das realizadas em 24 horas.

2.4.5. Determinação da Porcentagem do Grau de Conversão (GC) dos Monômeros dos CIVMR

Corpos-de-prova dos CIVMR (n=6) foram confeccionados utilizando matrizes plásticas com 13 mm de diâmetro x 0,3 mm de espessura posicionada entre duas lâminas de vidro. Esse conjunto contendo o CIVMR foi acoplado em um suporte para ser analisado no espectrofotômetro infravermelho Nicolet 670 FTIR - Fourier Transform Infrared. De cada amostra, espectros FTIR foram obtidos na região espectral de 4000-400 cm⁻¹, com resolução de 4 cm⁻¹. Espectros das amostras de CIV antes e após a polimerização foram obtidos para avaliar o grau de conversão. As ligações éster (C=O) foram utilizadas como padrão interno de normalização. O valor da porcentagem do grau de conversão foi determinado utilizando seguinte equação:

$$\left(1 - \frac{[ABs(C=C)/ABs(COO-)]_{polimero}}{[ABs(C=C)/ABs(COO-)]_{monomero}} \times 100\right)$$

2.4.6. Análise da Morfologia e Composição Química Através da Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Energia Dispersiva de Raios-x (EDS)

Três corpos-de-prova (n=3) com 4 mm de diâmetro x 2 mm espessura foram depositados sobre stubs recobertos com fita de carbono e foram submetidas a vácuo e pulverização catódica para uma fina cobertura com ouro. A composição química foi estimada por meio de espectros de EDS e pela construção de mapas elementares a imagens de MEV. O instrumento utilizado foi o MEV-PHILIPS (XL-30 FEG, Philips, Amsterdã, Holanda), equipado com EDS. As amostras foram selecionadas aleatoriamente em várias etapas para exame de superfície com o MEV e EDS de cada material. Os corpos-de-prova foram secos lentamente em ar ambiente. Em seguida, foi examinado com o MEV a uma tensão de aceleração de 15 kV em ampliações de 2000x [Kheir et al., 2020].

2.5 Análise da liberação de F dos CIVMR

2.5.1 Confeção dos corpos-de-prova

Seis corpos-de-prova de cada CIVMR experimental [Silva et al., 2007] (5 mm de diâmetro e 2 mm de espessura), foram confeccionados em matrizes metálicas definindo 6 grupos experimentais: 1) CIVMR sem TMPnano e QuiPh (CIVMR, Fuji II LC); 2) CIVMR-14%TMPnano; 3) CIVMR-0,25%QuiPh) 4) CIVMR-0,5%QuiPh; 5) CIVMR-14%TMPnano-0,25%QuiPh e 6) CIVMR-14%TMPnano-0,5%QuiPh). A fotopolimerização (Fotopolimerizador Radii-Cal - SDI, intensidade da luz: 1200mW/cm² (pico)) foi realizada por período de 40 segundos, nas superfícies superior e inferior [Silva et al., 2007].

2.5.2. Ciclagem de pH para liberação de F dos CIVMR

Os corpos-de-prova foram colocados em tubos de ensaio de polipropileno com tampa, suspensos por um fio de aço inoxidável. Cada tubo continha 2 mL das soluções DES ou RE [Silva et al., 2007]. Inicialmente, os corpos-de-prova foram armazenados 6 horas em solução DES (Ca e P 2,0 mmol/L em

tampão acetato 0,075 mol/L, em pH 4,7). Em seguida, as amostras foram transferidas para novos tubos contendo solução RE (Ca 1,5 mmol/L, P 0,9 mmol/L, KCl 0,15 mol/L em tampão cacodilato 0,02 mol/L, em pH 7,0) permanecendo por 18 horas. Os tubos foram deixados sob agitação constante (mesa agitadora TE-420 Orbital - Tecnal), à temperatura de 37 °C. Estes procedimentos foram repetidos durante 15 dias. Os corpos-de-prova foram lavados com água deionizada e secos com papel absorvente antes de serem imersos em nova solução. As soluções foram recolhidas diariamente, identificadas e armazenadas em tubos de ensaio de polipropileno a 4 °C para leitura do F liberado. Para a dosagem de F nas soluções DES e RE, foi utilizado o eletrodo específico combinado para íon F (9609 BN, Orion Research, Inc., Beverly, MA, USA) e microeletrodo de referência previamente calibrado com soluções padrão de 0,250 a 64,0 µg F/mL, acoplados a um analisador de íons Orion 720 A (Orion Research). Para as dosagens foram pipetadas 0,5 mL das soluções DES e RE e acrescido 0,5 mL de TISAB II (tampão ajustador de força iônica total). As leituras foram realizadas sob agitação constante em agitador magnético (TE-081, Tecnal, Piracicaba, SP, Brasil). Os valores obtidos em mV foram convertidos em µg F/cm² [Silva et al., 2007; da Silva et al 2019].

2.6 Determinação das propriedades antimicrobianas dos CIVMR

2.6.1 Teste de Adesão ao *Streptococcus mutans*

Foi utilizada a cepa de referência de *Streptococcus mutans* ATCC UA159. A cepa foi obtida na Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) e foi mantida em caldo BHI a -80 °C. A reativação da cepa foi realizada de acordo com as condições de crescimento descritas na Tabela 1. Um inóculo do micro-organismo estudado foi preparado, ajustando-se a leitura da densidade óptica em 630 nm para 0,08 - 0,10 (~1x10⁸ células/mL). Após a reativação de espécies de *S. mutans* (UA159) [Hu et al., 2013], placas foram incubadas em estufa a 37 °C por 48 horas. Para o preparo do inóculo de *S. mutans* (UA159) cada disco de material iomérico (n = 6) foi exposto sob condições estáticas a 25 µL de inóculo ajustado para uma densidade óptica (DO) de 0,6 a 550 nm (aproximadamente 8 x 10¹¹ CFU/mL). Após 2 horas em temperatura ambiente, as células não aderentes foram removidas lavando duas vezes com solução de NaCl a 0,9% (solução salina). Cada disco foi então inserido em 3 mL de solução salina contendo três esferas de vidro e passaram pelo vórtex durante 1 min. A suspensão foi diluída em séries decimais de 10⁻¹ a 10⁻⁴ em soro fisiológico e inoculada em triplicado em ágar BHI. Estas placas foram incubadas a 37 °C por 48 horas em ambiente suplementado com 5% de CO₂. As colônias foram contadas e o número de bactérias viáveis foi determinado - CFU/mL correspondente às células aderidas aos CIVMR após 2 horas de exposição à *S. mutans* [Fúcio et al., 2016]. Todos os corpos de prova foram preparados no dia do experimento. Os corpos de prova foram colocados no fundo da placa (contato direto).

2.6.2 Ensaio de Biofilme

Uma nova proposta de ensaio de biofilme foi apresentada baseada nas metodologias propostas por Cassanho et al. [2005] com modificações. Avaliou-se a viabilidade celular nos biofilmes formados sobre a superfície dos CIVMR e a influência dos componentes liberados dos CIVMR na formação de

biofilme no fundo do poço das placas de poliestireno. *S. mutans* (UA159) foram cultivados em BHI caldo a 37 °C por 18 a 24 horas. A suspensão bacteriana obtida foi medida em espectrofotômetro (PowerWave 340, Biotek) e ajustada a uma densidade óptica de 0,3 a 600 nm (aproximadamente 3×10^8 UFC/mL). Cinco espécimes cilíndricas (3 mm x 2 mm x 1 mm) foram confeccionadas em matrizes metálicas para cada grupo testado, em experimentos independentes. Após 1 hora em ambiente de estufa a 100% de umidade, os espécimes foram lavados com água destilada e desinfetados em câmara de fluxo laminar sob luz UV por 15 min. Os espécimes de CIVMR foram inseridos em poços individuais de placas de 24 poços (Coming Inc., Corning, NY, USA) e mantidos em suspensão dentro do meio caldo BHI. Para isso, no momento da manipulação dos CIVMR, um fio ortodôntico foi inserido no meio de corpo de prova e após fotopolimerização (Fotopolimerizador Rádi-Cal - SDI, intensidade da luz: 1200mW/cm²(pico), este fio foi fixado por cera de utilidade na tampa da placa de poliestireno e mantido durante o período dos ensaios de biofilme. Uma solução de 1mL de BHI caldo suplementado com 1% de sacarose e 5uL de suspensão bacteriana foi inoculada em cada poço. No fundo dos poços foram avaliados os biofilmes formados a distância dos corpos de prova, porém sob a ação dos componentes liberados pelos CIVMR. Após incubação das placas por 24h à 37 °C em condições de anaerobiose, os espécimes de CIVMR, de cada grupo experimental, foram removidos, lavados com 1mL de solução salina para remoção das bactérias não aderidas e inseridos individualmente em microtubos contendo 1mL de solução salina. Em seguida, os espécimes foram sonicados por 30s a 30W (Misonix Ultrasonic, USA) e agitados por 1 min em vórtex. As soluções foram diluídas seriadamente e inoculadas em placas de BHI ágar. Após 48 horas, o número de Unidades Formadoras de Colônias (UFC/mL) foi determinado. Os poços contendo o biofilme formado foram lavados delicadamente com solução salina, em seguida corados com solução de XTT (2,3-Bis-(2-Methoxy-4-Nitro-5-Sulphophenyl) - Sigma-Aldrich) por 3 horas; a seguir, 200 µL da suspensão solubilizada foi observada em espectrofotômetro em nova placa de 96 poços, considerando a densidade óptica de 492nm.

2.8 Análise da Citotoxicidade

2.8.1 Obtenção da Cultura de Células

Células odontoblastóides da linhagem MDPC23 foram cultivados em garrafas de 75 cm² (Corning Inc., Corning, NY, USA), contendo meio de cultura DMEM (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA, USA), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB, Invitrogen) e solução de estreptomicina/penicilina a 100 µg/mL e 100 UI/mL, respectivamente (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). As células foram mantidas à 37 °C em atmosfera umidificada, contendo 5% de CO₂ e 95% de ar atmosférico. Após subconfluência, as células foram plaqueadas diretamente na superfície de poliestireno em placas de 24 poços na densidade de 20.000 células/poço. Para cada grupo avaliado, amostras cilíndricas dos CIVMRs com 2 mm de espessura e 4 mm de diâmetro (n=5) foram preparadas em matrizes de silicone (previamente esterilizadas), fotopolimerizadas (Fotopolimerizador Rádi-Cal - SDI, intensidade da luz: 1200mW/cm²(pico)) por 40s e mantidas por 1 hora à 37 °C em atmosfera umidificada, contendo 5% de CO₂ e 95% de ar atmosférico. Após 6 h de adesão, insertos

(ThinCert® Cell Culture Inserts, Greiner Bio-One, Kremsmünster, KI, AT) foram acoplados aos poços e as amostras dos cimentos foram colocadas em seu interior para troca iônica no ambiente celular.

2.8.2 Análise do Metabolismo Celular

Ao final de 24, 48 e 72 horas de exposição aos cimentos ionoméricos experimentais, o metabolismo celular foi avaliado pelo método de redução de um corante redox (resazurina). Para isso, utilizou-se o reagente CellTiter-Blue (Promega, Madison, WI, USA) seguindo as recomendações do fabricante. Brevemente, 20 µL do reagente foram diluídos em 100 µL de meio de cultura suplementado e os 120 µL foram despejados em cada poço, seguido por incubação de 4 horas à 37 °C. Após, o sobrenadante formado foi retirado dos poços e transferido para placa de 96 poços para medida colorimétrica em espectrofotômetro (570-600nm, Epoch 2, BioTek Instruments Inc., Winooski, VT, USA). As médias foram calculadas para os grupos e transformadas em porcentagens, o que representou o efeito inibitório da atividade mitocondrial das células pelos CIVMR. O controle negativo (DMEM) foi definido como tendo 100% de metabolismo celular. Os dados foram apresentados em valores de absorbância.

2.9 Análise dos dados

Para análise estatística, foram considerados como variáveis os valores dos testes físico-mecânicos, microbiológicos e citotóxicos e como fatores de variação os grupos experimentais e o tempo. Todos os dados apresentaram distribuição normal (Shapiro–Wilk) e homogênea (Bartlett). Os dados de RC, RTD, DS, RS, liberação de F e Metabolismo Celular (Abs) foram submetidos a ANOVA (2-critérios). Já os dados da %GC e microbiológicos (UFC/mL) foram analisados por ANOVA (1-critério). O teste utilizado para comparação entre os grupos, após as análises, foi o de Student Newman-Keuls. Todas as análises foram realizadas com o programa SigmaPlot versão 12.0 com limite de significância de 5%.

3. Resultados

3.1 Síntese e Caracterização do Trimetafosfato de Sódio Nanoparticulado (TMPnano)

A difração de raios-x foi utilizada para a identificação das estruturas cristalinas e estimativa do domínio de coerência cristalográfica do TMP microparticulado (TMP) e do TMP nanoparticulado (TMPnano). Na Figura 1 pode-se observar os padrões de raios-x para o TMP microparticulado (TMP) e TMP nanoparticulado (TMPnano) após processo de moagem de 48 horas. As imagens demonstram que não houve alteração na estrutura cristalina do sal após 48 horas de moagem, evidenciando picos mais amplos e mais largos no DRX, com tamanho das partículas de 547 nm para o TMP e de 22,7 nm para o TMPnano. A identificação estrutural das amostras analisadas foi realizada comparando os difratogramas obtidos com padrões tabelados disponíveis em bancos de dados “Joint Committee on Powder Diffraction Standards – Powder Diffraction File (JCPDS - PDF). O tamanho em escala

nanométrica foi caracterizado por Microscopia Eletrônica de Transmissão de Alta Resolução (METAR) (Figura 2).

3.2 Síntese e Caracterização da Quitosana Fosforilada (QuiPh)

A rota reacional utilizada para a fosforilação da quitosana, utilizando pentóxido de fósforo e ácido metanossulfônico revelou que durante a síntese o grupo amina ficou protegido pela interação iônica com o ácido, o que promove a fosforilação dos grupos hidroxilas presentes nos carbonos seis e três, sendo que hidroxila do carbono 6 ($-\text{CH}_2-\text{OH}$), por se tratar de uma hidroxila primária, é mais reativa que a hidroxila do carbono 3 ($-\text{CH}-\text{OH}$). Para análise da estrutura química da QuiPh obtida, foram preparados discos de KBr da Qui utilizada como matéria prima e da QuiPh obtida como produto. A varredura foi realizada de 400 a 4000 cm^{-1} , obtendo-se os espectros da (Figura 3).

No espectro da QuiPh podem ser visualizados: aparecimento de ombro em 1240 cm^{-1} , referente ao estiramento da ligação $\text{P}=\text{O}$ e banda em 1050 cm^{-1} relacionada à deformação da ligação $\text{C}-\text{O}-\text{P}$. Bandas fracas em 563 e 537 cm^{-1} no espectro também foram observadas. A deformação da ligação $\text{O}-\text{H}$ do grupo fosfato também pode apresentar banda próxima de 1336 cm^{-1} , como identificado no espectro. Além disso, foi possível identificar sinais em 1627 e 1529 cm^{-1} na QuiPh que podem ser atribuídos à deformação simétrica e assimétrica do grupo amina. Já as bandas largas na região de 3200 a 3450 cm^{-1} podem ser provenientes de diferentes tipos de vibração de grupos aminas e hidroxilas como a presente na quitosana (precursor) ou também podem ter a contribuição da presença de grupamentos $\text{P}-\text{OH}$. O estiramento da ligação CH do carbono alifático pode ser observado em 2878 cm^{-1} na Chi usada para a síntese e 2938 cm^{-1} na QuiPh.

Já a análise de RMN 31P (Figura 4) contatou a presença de sinal em duas regiões: -9,83 e 0,04. Mono alquil fosfatos não cíclicos costumam apresentar sinal na faixa de -5 a 5 ppm, o que comprova a fosforilação do carbono 6. O sinal de valor negativo pode estar relacionado à presença de pirofosfatos, que podem ocorrer devido à condensação de fosfatos da cadeia de quitosana com o ácido fosfórico presente no meio reacional. Utilizando a condição de síntese descrita ($n = 4$), foi obtido rendimento médio de 75,65%, demonstrando que a síntese realizada resultou na formação da quitosana fosforilada.

3.3 Propriedades Físico-mecânicas (RC, RTD, DS, RS e %GC)

A Tabela 1 mostra dos dados de RC, RTD, DS e RS. Para o teste de RC, após 24h, todos os grupos apresentaram valores similares entre si ($p > 0,001$), exceto para o CIVMR, o qual apresentou o menor valor ($p < 0,001$). Transcorridos 7 dias, o grupo CIVMR-14%TMPnano-0,25%QuiPh demonstrou o melhor resultado, sendo ~24% superior ao CIVMR (Tabela 1). Frente aos dados de RTD, após 24 horas, os grupos não apresentaram diferença estatística ($p > 0,001$); após 7 dias, os grupos CIVMR, CIVMR-14%TMPnano, CIVMR-0,5%QuiPh e CIVMR-14%TMPnano-0,5%QuiPh foram similares entre si ($p > 0,001$); ainda, a associação de 14%TMPnano e 0,25%QuiPh (CIVMR-14%TMPnano-0,25%QuiPh) contribuiu na melhora da RTD em ~25% quando comparado ao CIVMR (Tabela 1). Para a análise de DS, os grupos CIVMR, CIVMR-0,5%QuiPh foram similares entre si, após

24 horas, demonstrando os menores valores ($p > 0,001$); já o grupo CIVMR-0,25%QuiPh apresentou o maior valor, diferindo dos demais ($p < 0,001$). Após 7 dias os menores valores para DS foram observados para os grupos CIVMR e CIVMR-0,5%QuiPh e os outros grupos foram similares entre si. Os valores de RS (μm) dos grupos experimentais são apresentados na Tabela 1, demonstrando que não houve diferença estatística entre os grupos CIVMR, CIVMR-0,25%QuiPh, CIVMR-0,5%QuiPh, CIVMR-14%TMPnano-0,25%QuiPh e CIVMR-14%TMPnano-0,5%QuiPh ($p > 0,001$); o grupo CIVMR-14%TMPnano apresentou o maior valor de RS ($p < 0,001$). A análise da % GC após 24h, demonstrou que a adição dos compostos ao CIVMR isoladamente ou em associação, não afetou significativamente as propriedades físico-mecânicas após 24 horas, quando comparadas ao grupo controle (CIVMR) ($p < 0,001$) (Figura 5).

3.4 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Energia Dispersiva de Raios-x (EDS)

A Figura 6 revela a micrografia da superfície dos cimentos ionoméricos experimentais. Foi possível notar que os grupos CIVMR (a), CIVMR-14%TMPnano (b), CIVMR-0,5%Qui-Ph (c) apresentaram superfícies lisas e regulares. Depósitos globulares, semelhantes a minerais, foram observados nos grupos CIVMR-0,25%QuiPh, CIVMR-14%TMPnano-0,25%QuiPh e CIVMR-14%TMPnano-0,5%QuiPh, em maior extensão para os grupos CIVMR-14%TMPnano-0,25%QuiPh e CIVMR-14%TMPnano-0,5%QuiPh. A análise pela EDS confirmou a presença, em todos os grupos experimentais, de elementos tipicamente encontrados no CIVMR, incluindo alumínio, flúor, zinco, fósforo, silício, estrôncio, magnésio e cálcio, mesmo com a adição dos agentes ativos. Na associação de 14%TMPnano e 0,25%QuiPh maior concentração de P foi observada (Figura 6e).

3.5 Liberação de Flúor

O padrão de liberação de flúor ($\mu\text{gF}/\text{cm}^2$) foi quantificado durante 15 dias, com o intuito de avaliar o efeito cumulativo dos cimentos de ionômero de vidro (Figura 7). Nas primeiras 24h a maior disponibilidade de liberação de F foi apresentada pelos grupos CIVMR-14%TMPnano-0,25%QuiPh > CIVMR-14%TMPnano-0,5%QuiPh, com diminuição ao longo do tempo. O grupo de controle (CIVMR) liberou menor quantidade de F quando comparado com os demais grupos ($p < 0,001$); já os grupos CIVMR-14%TMPnano, CIVMR-14%TMPnano-0,25%QuiPh e CIVMR-14%TMPnano-0,5%QuiPh apresentaram a maior liberação ao longo de 15 dias, sendo semelhantes entre si ($p > 0,001$).

3.6 Análise das Propriedades Antimicrobianas

Na análise dos dados para efeito antimicrobiano (Figura 8), obtidos através do teste de adesão ao *S. mutans* (Log_{10} -UFC/mL) sobre os cimentos ionoméricos experimentais, o menor valor de adesão foi observado para o grupo CIVMR-14%TMPnano-0,25%QuiPh ($p < 0,001$); os demais grupos apresentaram valores similares entre si ($p > 0,001$).

Para análise do biofilme formado (log_{10} -UFC/mL) foi possível notar o maior efeito inibitório e maior atividade antibacteriana (contra *S. mutans*) para o grupo CIVMR-14%TMPnano-0,25%QuiPh,

seguido dos grupos CIVMR-0,5%QuiPh e CIVMR-14%TMPnano-0,5%QuiPh, os quais foram similares entre si ($p > 0,001$); já os grupos CIVMR, CIVMR-14%TMPnano e CIVMR-0,25%QuiPh apresentaram o menor e similar efeito antimicrobiano/inibitório ($p > 0,001$) (Figura 9).

A Figura 10 exibe os dados de atividade metabólica do biofilme de *S. mutans* (pelo método XTT), na presença dos cimentos ionoméricos experimentais. A adição dos agentes ativos (TMPnano e Chi-Ph), aos cimentos ionoméricos promoveu uma redução na atividade metabólica do biofilme de *S. Mutans* em relação ao Controle negativo e CIVMR ($p < 0,001$). Os grupos CIVMR-14%TMPnano-0,25%QuiPh e CIVMR-14%TMPnano-0,5%QuiPh reduziram a atividade metabólica em $\sim 96\%$ e $\sim 89\%$ quando comparados ao CIVMR ($p < 0,001$). Por outro lado, a adição de 14%TMPnano (CIVMR-14%TMPnano), 0,25%QuiPh (CIVMR-0,25%QuiPh) e 0,5%QuiPh (CIVMR-0,5%QuiPh) ao CIVMR, promoveu uma redução de $\sim 74\%$, $\sim 66\%$ e $\sim 70\%$ quando comparado ao CIVMR ($p < 0,001$).

3.7 Análise da Citotoxicidade

Os resultados da resposta do metabolismo celular pelo método da resazurina, obtidos após exposição das células odontoblastóides da linhagem MDPC-23, aos cimentos ionoméricos experimentais (24, 48 e 72 horas), são apresentados na Figura 11. No tempo de 24 horas, os grupos CIVMR-0,25%QuiPh e CIVMR-14%TMPnano-0,25%QuiPh apresentaram o menor e similar efeito citotóxico ($p > 0,001$); já para os tempos de 48 e 72 horas a redução da citotoxicidade para o grupo CIVMR-14%TMPnano-0,25%QuiPh foi superior em $\sim 20\%$ quando comparado ao CIVMR ($p < 0,001$). Apenas o grupo CIVMR-14%TMPnano-0,25%QuiPh apresentou citocompatibilidade similar ao grupo com 100% de atividade metabólica (DMEM), após 72 horas.

4. Discussão

Materiais restauradores vêm sendo estudados com o objetivo de melhorar seu potencial biomineralizador e interferir na formação de biofilme, pensando no restabelecimento de dentes que perderam suas estruturas devido à extensão da lesão cariosa [Liang et al., 2018]. Além disso, técnicas e materiais que permitam a ausência ou remoção mínima do esmalte e/ou dentina afetada, a fim de conservar o remanescente dentário e evitar danos pulpare, têm sido enaltecidas na Odontologia, com abordagens minimamente invasivas [Liang et al., 2018].

Dentre esses materiais o CIVMR é amplamente utilizado em Odontologia, por apresentar biocompatibilidade, liberação e recarga de íons flúor, ligação química com as estruturas dentárias, coeficiente de expansão semelhante ao do esmalte e dentista, e estética do material aceitável. Porém, apresenta baixa resistência à compressão, resistência ao desgaste, sensibilidade a água, dificuldade de manuseio os tornando inadequados para o uso em áreas de alta carga de tensão como material restaurador [Vallittu et al., 2018]. Diante disso, há a necessidade do desenvolvimento de materiais que superem as restrições físico-mecânicas, antimicrobianas e citotóxicas dos CIVMRs. Com isso, o objetivo do presente estudo avaliar *in vitro* o efeito da incorporação de nanopartículas de trimetafosfato de sódio

(TMPnano) e quitosana fosforilada (QuiPh) em cimento de ionômero de vidro modificado por resina restaurador (CIVMR) sobre as propriedades físico-mecânicas, antimicrobianas e citotóxicas. A hipótese nula do presente estudo foi a de que a incorporação de TMPnano e QuiPh ao CIVMR não promoveria melhorias nas propriedades físico-mecânicas, microbiológicas e citotóxicas quando comparado ao CIVMR apenas. Diante dos resultados obtidos, a hipótese nula foi rejeitada.

A escolha dos testes de resistência foi baseada nas recomendações da ISO 9917-2:2017, para cimentos à base de resina. Os testes *in vitro* sobre as propriedades mecânicas (RC, RT e DS) replicam situações reais de forças de carregamento, como a força de mastigação, demonstrando a integridade dos materiais. Modificações na matriz polimérica do CIVMR podem interferir ou não nas propriedades intrínsecas do material restaurador, alterando a reação entre as partículas de vidro e o ácido poliacrílico, e consequentemente as suas propriedades físico-mecânicas [da Silva et al., 2019]. No presente estudo a associação de 14%TMPnano e 0,25%QuiPh (CIVMR-14%TMPnano-0,25%QuiPh) contribuiu significativamente para a melhora da RC, RTD e DS após 7 dias em comparação ao CIVMR (Tabela 1). Essa melhora pode ser justificada pela formação de uma matriz polimérica mais estável, formada pela interação das aminas da quitosana e os grupos carboxilato, somado a isso, a QuiPh atua como um agente aglutinante, contribuindo para que haja uma maior ligação entre os componentes químicos do CIVMR, o que poderá, dessa forma, aumentar a capacidade de resistir a forças externas (ex: mastigação) [Ibrahim et al., 2015; Najeeb et al., 2016; Kim et al., 2017].

Por outro lado, a presença de íons fosfatos contribuem para a melhora da propriedade quelante do cálcio da molécula de quitosana. Além disso, a literatura destaca que a QuiPh pode induzir a deposição biomimética de uma camada semelhante à apatita sob condições fisiológicas simuladas, devido a quelação de íons de cálcio e hidrólise parcial de fosfato funcionalizados [Vallittu et al., 2018], o que contribui também na remineralização do tecido cariado e redução da desmineralização dentária. É importante destacar a propriedade do TMP em complexar cátions durante a reação ácido-base, o que também pode ter contribuído na alteração das propriedades mecânicas do material. Vale destacar que, as concentrações adequadas de ambos os componentes adicionados não afetaram a reação do ácido poliacrílico com as partículas de vidro do CIVMR mencionadas acima, tampouco as propriedades físico-mecânicas, e este fato também é verificado através dos dados da %GC (Figura 5), onde mesmo com a adição dos agentes ativos sozinhos ou em combinação, não houve alteração na reação monomérica do mesmo, indicando que a melhora das propriedades mecânicas dos CIVMRs ao longo do tempo foi praticamente dependente da reação ácido-base e influenciada pela adição do TMPnano e QuiPh. Ainda, a morfologia e composição química da superfície dos cimentos ionoméricos experimentais (Figura 6) evidenciam, depósitos globulares semelhantes a minerais na associação de TMPnano e QuiPh (CIVMR-14%TMPnano-0,25%QuiPh e CIVMR-14%TMPnano-0,5%QuiPh) e pela análise do EDS maior concentração de P foi observada.

A liberação de F dos CIVMR (Figura 7) caracteriza-se por uma liberação rápida inicial, seguida por uma redução gradual. Estudos demonstraram que o F é liberado por até 18 meses em quantidade

cada vez menor e parte dele está disponível para reagir com as estruturas dentárias [Chiu et al., 2017; Nishanthine et al., 2022]. A liberação de F é necessária para prevenção de lesões secundárias de cárie e auxílio no processo de remineralização [Chiu et al., 2017; Nishanthine et al., 2022]. No presente estudo, a adição dos agentes ativos aos cimentos ionoméricos contribuiu para a maior liberação de F nas primeiras 24 horas com valor significativamente maior que o grupo CIVMR (Figura 7). Essa maior liberação de F pode estar relacionada à afinidade do TMP por íons metálicos presentes no material [Danelon et al., 2017; da Silva et al., 2019]. Durante a aglutinação do pó e líquido, o Ca^{+2} e o Al^{+3} da mistura reagiriam com o TMP reduzindo a reação destes íons com o F, tornando-o mais disponível para ser liberado. Ainda, a redução das partículas em escala manométrica do TMP (Figura 1) propiciou uma maior reatividade de fosfatos presente na cadeia cíclica do TMP com os íons metálicos presentes no CIVMR [Fakhri et al., 2020] o que leva também, a maior disponibilidade de F como observado no estudo de da Silva et al. [2019]. Além disso, a liberação total ao longo de 15 dias foi maior para o CIVMR-14%TMPnano-0,25%QuiPh, o que pode ser explicado pelo efeito catalítico da QuiPh sobre a liberação de F. Nesse contexto, mesmo que o CIVMR apresente F em sua composição, a liberação não foi expressiva quanto aos grupos associando QuiPh com TMPnano. Diante deste achado, pode-se inferir que a grande interação dos grupos carboxílicos do ácido poliacrílico com os grupos amino de quitosana leva uma maior hidrólise da matriz de vidro e mais rápida liberação de íons metálicos para serem complexados na cadeia dos poliácidos, o que favoreceu a maior liberação do F como subproduto da reação. Dessa forma, em situações clínicas, levará à uma rápida difusão desse íon beneficiando a remineralização e prevenção de cárie.

A presença de biofilme microbiano na cavidade oral modifica o pH, aumentando a susceptibilidade às lesões cariosas, dessa forma, a redução da formação de biofilme é uma proposta para melhoria dos materiais restauradores. Nosso estudo demonstrou que a incorporação de 0,25%QuiPh ao pó do CIVMR em associação com 14%TMPnano produziu um efeito antimicrobiano significativo sobre a formação de *S. mutans* (Figura 8 e Figura 9). O efeito da QuiPh sobre *S. mutans* pode ser justificado pela interação dos grupos aminos com carga positiva (NH_2 e NH_3^{+3}), bastante reativos presentes na QuiPh, com os grupos aniônicos (carga negativa) da parede celular bacteriana, causando alteração na permeabilidade celular e consequentemente levando ao extravasando de componentes importantes para a sobrevivência bacteriana [Beltrame et al., 2018; Ismiyati & Alhasyimi, 2022].

Os resultados da análise do biofilme formado (Figura 9) demonstraram que o grupo CIVMR-14%TMPnano-0,25%QuiPh foi capaz de produzir o maior efeito inibitório e a maior atividade antimicrobiana contra *S. mutans*, seguido dos grupos CIVMR-0,5%QuiPh e CIVMR-14%TMPnano-0,5%QuiPh. Já os grupos CIVMR, CIVMR-14%TMPnano e CIVMR-0,25%QuiPh apresentaram valores similares entre si e o menor efeito antimicrobiano/inibitório (Figura 9). Esses achados também são encontrados em nossos resultados de viabilidade metabólica dos CIVMR's (Figura 10). A adição dos compostos ativos demonstrou redução da viabilidade celular quando comparados ao controle negativo e CIVMR, sendo que, a adição de 14%TMPnano e 0,25%QuiPh ao CIVMR, promoveu uma

redução significativa em relação aos demais grupos, seguido pelo CIVMR-14%TMPnano-0,5%QuiPh>CIVMR-14%TMPnano>CIVMR-0,5%QuiPh>CIVMR-0,25%QuiPh. Esses resultados são ainda explicados pela interferência da QuiPh na síntese de RNAm bacteriano, afetando negativamente a produção de enzimas essenciais e proteínas [Magalhães et al., 2021].

A biocompatibilidade de um material representa sua capacidade em não provocar injúrias ao hospedeiro biológico [Kashyap et al., 2022]. Até o momento, existem muitos modelos experimentais capazes de avaliar a biocompatibilidade dos materiais usados em Odontologia utilizando diferentes metodologias. Em nosso estudo a citotoxicidade dos CIVMR's foi avaliada pelas células odontoblastóides da linhagem MDPC-23 conforme mostrado na Figura 11. Para o tempo de 24 horas, os grupos CIVMR-0,25%QuiPh e CIVMR-14%TMPnano-0,25%QuiPh apresentaram o menor e similar efeito citotóxico ($p > 0,001$); para os tempos de 48 horas e 72 horas, apenas o grupo CIVMR-14%TMPnano-0,25%QuiPh apresentou citocompatibilidade similar ao grupo com 100% de atividade metabólica (DMEM). Especula-se que quando a QuiPh foi adicionada ao CIVMR contendo 14%TMPnano, seu grupo amino (NH_2) reagiu com grupos carboxílicos (COOH) a partir do ácido poliacrílico e redes poliméricas foram formadas, mudando assim, as propriedades mecânicas e biológicas do CIVMR. Além disso, muitos autores demonstraram que o complexo interpolímero formado, pode aumentar a bioatividade do material [Carvalho et al., 2020; Kashyap et al., 2022]. Sendo assim, os resultados deste estudo revelaram que a associação de 14%TMPnano à 0,25%QuiPh ao CIVMR foi eficaz e promoveu baixo efeito citotóxico para as células estudadas, podendo ser uma alternativa a outros agentes antimicrobianos, tais como a clorexidina. Além disso, estudos devem ser explorados para verificar se as alterações que ocorreram no material para o presente grupo supracitado podem estar relacionadas a formação de uma nova molécula, o que poderia aumentar a bioatividade do material e levar à baixa citotoxicidade.

Diante dos resultados conclui-se que a adição de ambos os agentes ativos TMPnano (14%) e QuiPh (0,25%), favoreceu a melhora das propriedades físico-mecânicas, antimicrobiana/antibiofilme e citotóxicas, podendo ser um material restaurador promissor para a aplicação clínica em paciente com atividade à cárie dentária.

5. Agradecimentos

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP-Processo: 2020/15025-2) pelo apoio financeiro.

6. Referências

Amarasena N, Luzzi L, Brennan. Effect of Different Frequencies of Dental Visits on Dental Caries and Periodontal Disease: A Scoping Review. *Int J Environ Res Public Health* 2023;20:6858.

- Amin F, Rahman S, Khurshid, Z, Zafar MS, Sefat F, Kumar N. Effect of Nanostructures on the Properties of Glass Ionomer Dental Restoratives/Cements: a comprehensive narrative review. *Materials* 2021;14:6260.
- Balhaddad AA, Kansara AA, Hidan D, Weir MD, Xu, Hockin HK, Melo MAS. Toward dental caries: exploring nanoparticle-based platforms and calcium phosphate compounds for dental restorative materials. *Bioact Mater* 2019;4:43-55.
- Beltrame APCA, Suchyta D, Abd Alraheem I, Mohammed A, Schoenfish M, Walter R, Almeida ICS, Souza LC, Miguez PA. Effect of Phosphorylated Chitosan on Dentin Erosion: An in vitro Study. *Caries Res* 2018;52:378-386.
- Braga AS, Girotti LD, de Melo Simas LL, Pires JG, Pelá VT, Buzalaf MAR, Magalhães AC. Effect of commercial herbal toothpastes and mouth rinses on the prevention of enamel demineralization using a microcosm biofilm model. *Biofouling* 2019;35:796-804.
- Carvalho RG, Alvarez MMP, de Sá Oliveira T, Polassi MR, Vilhena FV, Alves FL, Nakaie CR, Nascimento FD, D'Alpino PHP, Tersariol ILDS. The interaction of sodium trimetaphosphate with collagen I induces conformational change and mineralization that prevents collagenase proteolytic attack. *Dent Mater* 2020;36: e184-e193.
- Cassanho ACA, Fernandes AM., Oliveira LD, Carvalho CAT, Jorge AOC, Koga-Ito CY. In vitro activity of zinc oxide-eugenol and glass ionomer cements on *Candida albicans*. *Braz Oral Res* 2005;9:134-138.
- Chen YZ, Lü XY, Liu GD. Effects of different radio-opacifying agents on physicochemical and biological properties of a novel root-end filling material. *PLoS One* 2018;13:e0191123.
- Chiu SY, Shinonaga Y, Abe Y, Harada K, Arita K. Influence of Porous Spherical-Shaped Hydroxyapatite on Mechanical Strength and Bioactive Function of Conventional Glass Ionomer Cement. *Materials (Basel)* 2017;10:27.
- Cibim DD, Saito MT, Giovani PA, Borges AFS, Pecorari VGA, Gomes OP, Lisboa-Filho PN, Nociti-Junior FH, Puppini-Rontani RM, Kantovitz KR. Novel Nanotechnology of TiO₂ Improves Physical-Chemical and Biological Properties of Glass Ionomer Cement. *Int J Biomater* 2017;2017:7123919.
- da Silva MER, Danelon M, Santos Souza JA, Silva DF, Pereira JA, Pedrini D, de Camargo ER, Botazzo Delbem AC, Duque C. Incorporation of chlorhexidine and nano-sized sodium trimetaphosphate into a glass-ionomer cement: Effect on mechanical and microbiological properties and inhibition of enamel demineralization. *J Dent* 2019;84:81-88.
- Danelon M, Pessan JP, Neto FN, de Camargo ER, Delbem AC. Effect of toothpaste with nano-sized trimetaphosphate on dental caries: In situ study. *J Dent* 2015;43:806-813.
- Danelon M, Pessan JP, Souza-Neto FN, de Camargo ER, Delbem AC. Effect of fluoride toothpaste with nano-sized trimetaphosphate on enamel demineralization: An in vitro study. *Arch Oral Biol* 2017;78:82-87.

- Duggal M, Gizani S, Albadri S, Krämer N, Stratigaki E, Tong HJ, Seremidi K, Kloukos D, BaniHani A, Santamaría RM, Hu S, Maden M, Amend S, Boutsiouki C, Bekes K, Lygidakis N, Frankenberger R, Monteiro J, Anttonen V, Leith R, Sobczak M, Rajasekharan S, Parekh S. Best clinical practice guidance for treating deep carious lesions in primary teeth: an EAPD policy document. *Eur Arch Paediatr Dent* 2022;23:659-666.
- Fakhri E, Eslami H, Maroufi P, Pakdel F, Taghizadeh S, Ganbarov K, Yousefi M, Tanomand A, Yousefi B, Mahmoudi S, Kafil HS. Chitosan biomaterials application in dentistry. *Int J Biol Macromol* 2020;162:956-974.
- Fúcio SB, Paula AB, Sardi JC, Duque C, Correr-Sobrinho L, Puppim-Rontani RM. Streptococcus Mutans Biofilm Influences on the Antimicrobial Properties of Glass Ionomer Cements. *Braz Dent J* 2016;27:681-687.
- Giacaman RA, Muñoz-Sandoval C, Neuhaus KW, Fontana M, Chalas R. Evidence-based strategies for the minimally invasive treatment of carious lesions: Review of the literature. *Adv Clin Exp Med* 2018;27:1009-1016.
- He L, Hao Y, Zhen L, Liu H, Shao M, Xu X, Liang K, Gao Y, Yuan H, Li J, Li J, Cheng L, van Loveren C. Biomineralization of dentin. *J Struct Biol* 2019;207:115-122.
- Hosida TY, Delbem ACB, Morais LA, Moraes JCS, Duque C, Souza JAS, Pedrini D. Ion release, antimicrobial and physio-mechanical properties of glass ionomer cement containing micro or nanosized hexametaphosphate, and their effect on enamel demineralization. *Clin Oral Investig* 2019;23:2345-2354.
- Hu J, Du X, Huang C, Fu D, Ouyang X, Wang Y. Antibacterial and physical properties of EGCG-containing glass ionomer cements. *J Dent*. 2013;41:927-934
- Ibrahim MA, Neo J, Esguerra RJ, Fawzy AS. Characterization of antibacterial and adhesion properties of chitosan-modified glass ionomer cement. *J Biomater Appl* 2015;30:409-419.
- International Organization for Standardization. ISO 9917-2:2017–Dentistry - Water based cements. Part 2: Resin-modified cements. Geneva: ISO; 2017.
- Ismiyati T, Alhasyimi AA. Effect of Chitosan and Acrylic Acid Addition to Acrylic Resin on Porosity and Streptococcus mutans Growth in Denture Base. *Eur J Dent* 2023;17:693-698.
- Kakkad N, Yadav NS, Hazari P, Narwani S, Somkuwar K, Basha S, Verma V, Arora S, Aldowah O, Heboyan A, Karobari MI. Comparative Evaluation of Tensile Bond Strength of Poly Ether Ether Ketone (PEEK) and Zirconia Copings Using Resin Cement with or without Adhesive: An In Vitro Study. *Materials (Basel)* 2022;15:4167.
- Karimi M, Hesarakhi S, Alizadeh M, Kazemzadeh A. Effect of synthetic amorphous calcium phosphate nanoparticles on the physicochemical and biological properties of resin-modified glass ionomer cements. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* 2019;98:227-240.

- Kashyap PK, Chauhan S, Negi YS, Goel NK, Rattan S. Biocompatible carboxymethyl chitosan-modified glass ionomer cement with enhanced mechanical and anti-bacterial properties. *Int J Biol Macromol* 2022;223(Pt A):1506-1520.
- Kheur M, Kantharia N, Lakha T, Kheur S, Al-Haj Husain N, Özcan M. Evaluation of mechanical and adhesion properties of glass ionomer cement incorporating nano-sized hydroxyapatite particles. *Odontology* 2020;108:66-73.
- Kim DA, Lee JH, Jun SK, Kim HW, Eltohamy M, Lee HH. Sol-gel-derived bioactive glass nanoparticle-incorporated glass ionomer cement with or without chitosan for enhanced mechanical and biomineralization properties. *Dent Mater* 2017;33:805-817.
- Leal SC, Barros BV, Cabral RN, Ferrari JCL, de Menezes Abreu DM, Ribeiro APD. Dental caries lesions in primary teeth without obvious cavitation: Treatment decision-making process. *Int J Paediatr Dent* 2019;29:422-428.
- Liang Y, Deng Z, Dai X, Tian J, Zhao W. Micro-invasive interventions for managing non-cavitated proximal caries of different depths: a systematic review and meta-analysis. *Clin Oral Investig* 2018;22:2675-2684.
- Magalhães TC, Barbosa LL, Lopes AG, Costa, Santos RL, Munchow EA, Carlo HL, Carvalho FG. Antibacterial Effect of Chitosan Against *Streptococcus mutans*: An Alternative for Mouthrinse on Dental Caries Control and Prevention? *Braz J Dentist* 2021;78:e1897.
- Mathur VP, Dhillon JK. Dental Caries: A Disease Which Needs Attention. *Indian J Pediatr* 2018;85:202-206.
- Menezes-Silva R, Oliveira BMB, Magalhães APR, Bueno LS, Borges AFS, Baesso ML, Navarro MFL, Nicholson JW, Sidhu SK, Pascotto RC. Correlation between mechanical properties and stabilization time of chemical bonds in glass-ionomer cements. *Braz Oral Res* 2020;5:34:e053.
- Mishra A, Pandey RK, Manickam N. Antibacterial effect and physical properties of chitosan and chlorhexidine-cetrimide-modified glass ionomer cements. *J Indian Soc Pedod Prev Dent* 2017;35:28-33.
- Menezes-Silva R, Oliveira BMB, Magalhães APR, Bueno LS, Borges AFS, Baesso ML, Navarro MFL, Nicholson JW, Sidhu SK, Pascotto RC. Correlation between mechanical properties and stabilization time of chemical bonds in glass-ionomer cements. *Braz Oral Res* 2020;34:e053.
- Moshaverinia et al 2016; Menezes-Silva et al 2020
- Moshaverinia M, Borzabadi-Farahani A, Sameni A, Moshaverinia A, Ansari S. Effects of incorporation of nano-fluorapatite particles on microhardness, fluoride releasing properties, and biocompatibility of a conventional glass ionomer cement (GIC). *Dent Mater J* 2016;35:817-821.
- Najeeb S, Khurshid Z, Zafar MS, Khan AS, Zohaib S, Martí JM, Sauro S, Matinlinna JP, Rehman IU. Modifications in Glass Ionomer Cements: Nano-Sized Fillers and Bioactive Nanoceramics. *Int J Mol Sci* 2016;17:1134.
- Nicholson, JW, Sidhu, SK, Czarnecka, B. Enhancing the mechanical properties of glass-ionomer dental cements: a review. *Materials* 2020;13:2510.

- Nishanthine C, Miglani R, R I, Poorni S, Srinivasan MR, Robaian A, Albar NHM, Alhaidary SFR, Binalrimal S, Almalki A, Vinothkumar TS, Dewan H, Radwan W, Mirza MB, Bhandi S, Patil S. Evaluation of Fluoride Release in Chitosan-Modified Glass Ionomer Cements. *Int Dent J* 2022;72:785-791.
- Peres MA, Macpherson LMD, Weyant RJ, Daly B, Venturelli R, Mathur MR, Listl S, Celeste RK, Guarnizo-Herreño CC, Kearns C, Benzian H, Allison P, Watt RG. Oral diseases: a global public health challenge. *Lancet* 2019;20:394(10194):249-260.
- Sahariah P, Masson M. Antimicrobial Chitosan and Chitosan Derivatives: a Review of the Structure-Activity Relationship. *Biomacromolecules* 2017;18:3846-3868.
- Silva KG, Pedrini D, Delbem AC, Cannon M. Effect of pH variations in a cycling model on the properties of restorative materials. *Oper Dent* 2007;32:328-335.
- Sultankulov B, Berillo D, Sultankulova K, Tokay T, Saparov A. Progress in the Development of Chitosan-Based Biomaterials for Tissue Engineering and Regenerative Medicine. *Biomolecules* 2019;9:1-16.
- Tiveron AR, Delbem AC, Gaban G, Sasaki KT, Pedrini D. Effect of resin composites with sodium trimetaphosphate with or without fluoride on hardness, ion release and enamel demineralization. *Am J Dent* 2013;26:201-206.
- Urquhart O, Tampi MP, Pilcher L, Slayton RL, Araujo MWB, Fontana M, Guzmán-Armstrong S, Nascimento MM, Nový BB, Tinanoff N, Weyant RJ, Wolff MS, Young DA, Zero DT, Brignardello-Petersen R, Banfield L, Parikh A, Joshi G, Carrasco-Labra A. Nonrestorative Treatments for Caries: Systematic Review and Network Meta-analysis. *J Dent Res* 2019;98:14-26.
- Vallittu PK, Boccaccini AR, Hupa L, Watts DC. Bioactive dental materials-Do they exist and what does bioactivity mean? *Dent Mater* 2018;34:693-694.
- Wang H, Zuohui X, Jie Y et al. Oriented and Ordered Biomimetic Remineralization of the Surface of Demineralized Dental Enamel Using HAP@ACP Nanoparticles Guided by Glycine. *Scientific Reports* 2017;7:1-13.
- Wang K, Liu Q. Chemical structure analyses of phosphorylated chitosan. *Carbohydr Res* 2014;11:48-56.
- Zhang X, Li Y, Sun X, Kishen A, Deng X, Yang X et al. Biomimetic remineralization of demineralized enamel with nanocomplexes of phosphorylated chitosan and amorphous calcium phosphate. *J Mater Sci Mater Med* 2014;25:2619-2628.
- Zhang Y, Fang J, Yang J, Gao X, Dong L, Zheng X, Sun L, Xia B, Zhao N, Ma Z. Streptococcus mutans-associated bacteria in dental plaque of severe early childhood caries. *J Oral Microbiol* 2022;14:1-10.
- Zhao IS, Chu S, Yu OY, Mei ML, Chu CH, Lo ECM. Effect of silver diamine fluoride and potassium iodide on shear bond strength of glass ionomer cements to caries-affected dentine. *Int Dent J* 2019;69:341-347.

Legenda de Tabela

Tabela 1: Valores médios ($\pm dp$, $n=12$) dos dados de RC, RTD, DS e RS de acordo com os cimentos ionoméricos experimentais e tempo (24 horas e 7 dias).

Legenda de Figuras

Figura 1: Gráficos dos padrões de raios-x para o TMP micrométrico e TMP nanoparticulado após moagem de 48 horas.

Figura 2: Imagens obtidas através da Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) para o TMP micrométrico (TMP) e TMP nanoparticulado (TMPnano) após moagem de 48 horas.

Figura 3: Espectros de infravermelho (FI-IR) da quitosana - precursor (em preto) e da quitosana fosforilada - produto (em vermelho).

Figura 4: Espectro de RMN ^{31}P da quitosana fosforilada produzida.

Figura 5: Porcentagem do Grau de Conversão dos Monômeros (% GC, após 24 horas) ($\pm dp$, $n=3$), de acordo com os Cimentos Ionoméricos Experimentais. Letras minúsculas indicam diferenças estatísticas entre os grupos (ANOVA 1-critério, Kruskal-Wallis, $p < 0,001$).

Figura 6: Imagens obtidas através do MEV e análise da % atômica de elementos químicos nos Cimentos Ionoméricos Experimentais: (a) CIVMR; (b) CIVMR-14%TMPnano; (c) CIVMR-0,25%QuiPh; (d) CIVMR-0,5%QuiPh; (e) CIVMR-14%TMPnano-0,25%QuiPh; (f) CIVMR-14%TMPnano-0,5%QuiPh ($\times 2000$). Asterisco: Depósito globulares, semelhantes a minerais.

Figura 7: Valores médios de F liberados nas soluções DE e RE em função do tempo (15 dias) ($\pm dp$, $n=6$), de acordo com os Cimentos Ionoméricos Experimentais. Letras minúsculas indicam diferenças estatísticas entre os grupos (ANOVA 2-critérios, Student-Newman-Keuls, $p < 0,001$).

Figura 8: Valores médios ($\pm dp$, $n=4$) de adesão ao *S. mutans* (Log_{10} -UFC/mL) de acordo com os cimentos ionoméricos experimentais. (ANOVA 1-critério, Student-Newman-Keuls, $p < 0,001$).

Figura 9: Valores médios ($\pm dp$, $n=6$) de crescimento de biofilme *S. mutans* (Log_{10} -UFC/mL) de acordo com os cimentos ionoméricos experimentais. (ANOVA 1-critério, Student-Newman-Keuls, $p < 0,001$).

Figura 10: Valores médios ($\pm dp$, $n=6$) da viabilidade celular (Biofilme *S. mutans*, Log_{10} -UFC/mL) de acordo com os cimentos ionoméricos experimentais. (ANOVA 1-critério, Student-Newman-Keuls, $p < 0,001$).

Figura 11: Valores médios ($\pm dp$, $n=6$) do metabolismo celular após 24 horas, 48 horas e 72 horas de acordo com os cimentos ionoméricos experimentais. Letras minúsculas indicam diferenças estatísticas entre os grupos e as maiúsculas entre os tempos (ANOVA 2-critérios, Student-Newman-Keuls, $p < 0,001$).

Figura 1: Gráficos dos padrões de raios-x para o TMP micrométrico e TMP nanoparticulado após moagem de 48 horas.

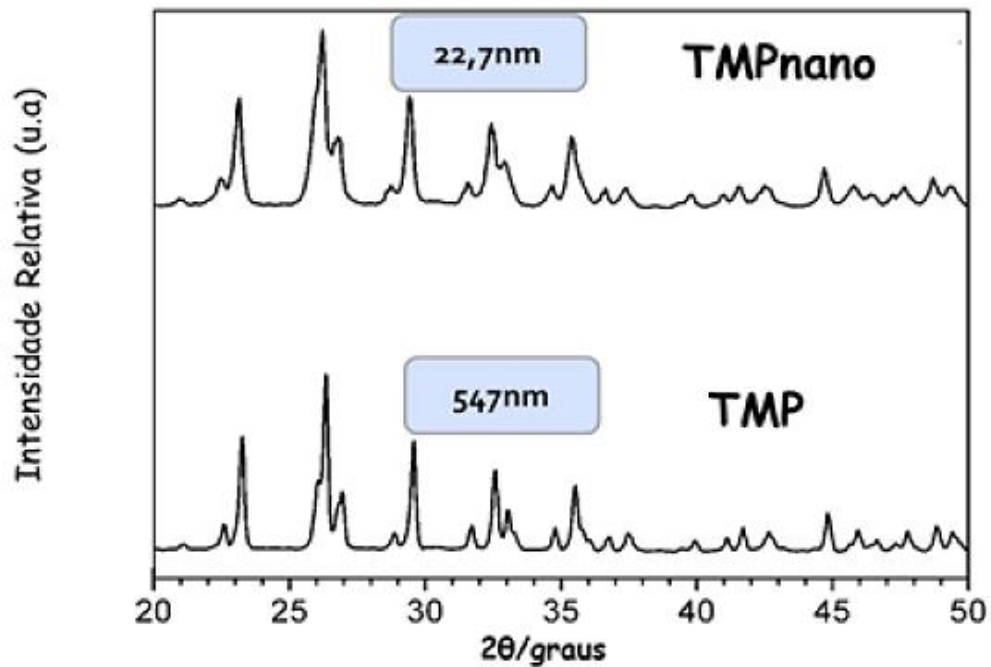


Figura 2: Imagens obtidas através da Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) para o TMP micrométrico (TMP) e TMP nanoparticulado (TMPnano) após moagem de 48 horas.

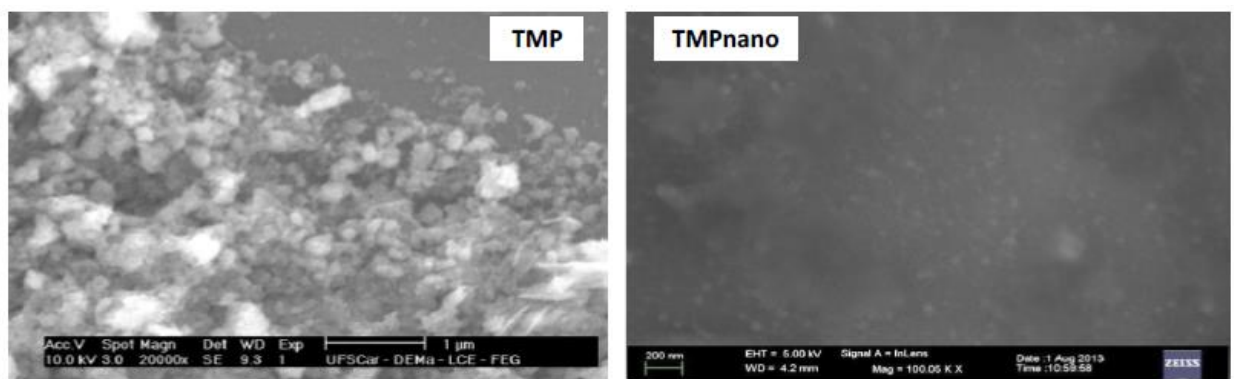


Figura 3: Espectros de infravermelho (FI-IR) da quitosana - precursor (em preto) e da quitosana fosforilada - produto (em vermelho).

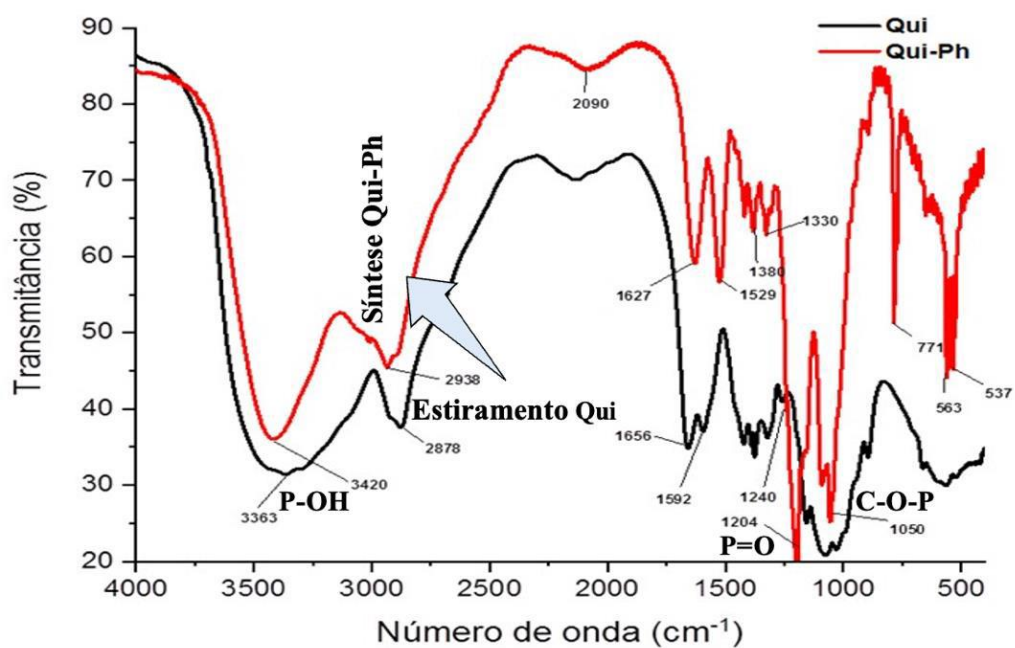


Figura 4: Espectro de RMN ^{31}P da quitosana fosforilada produzida.

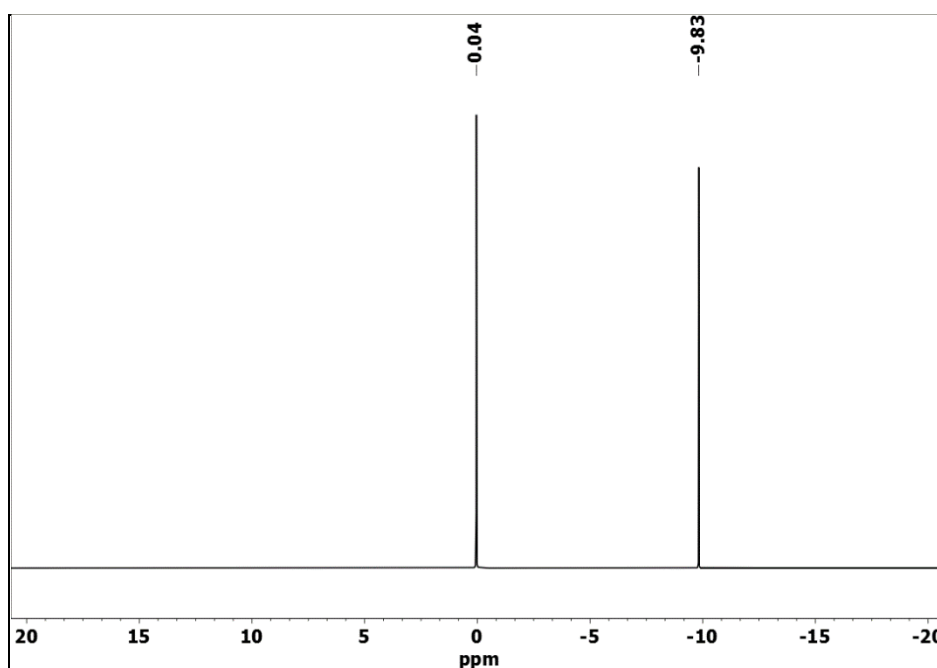


Tabela 1. Valores médios ($\pm dp$, $n=12$) dos dados de RC, RTD, DS e RS de acordo com os cimentos ionoméricos experimentais e tempo (24 horas e 7 dias).

Cimentos Ionoméricos Experimentais	RC		RTD		DS		RS
	MPa	MPa	MPa	MPa	KHN	KHN	
Tempo	24 horas	7 dias	24 horas	7 dias	24 horas	7 dias	24h
CIVMR	208,0 (1,3)A,a	142,7 (2,2)B,a	13,9 (1,5) a	14,8 (1,6) a	266,5 (1,8)A,a	362,5 (2,2)B,a	0,3 (0,03) a
CIVMR-14%TMPnano	136,1 (1,2)A,b	144,5 (1,3)A,a	14,5 (1,2) a	16,7 (1,9) a	317,3 (2,2)A,b	481,6 (1,0)B,b	0,5 (0,24)b
CIVMR-0,25%QuiPh	142,0 (1,5)A,b	151,7 (1,3)A,a	13,7 (1,7) a	18,0 (1,3) b	381,7 (1,5)A,c	462,3 (1,8)B,b	0,3 (0,28)a
CIVMR-0,5%QuiPh	145,3 (2,2)A,b	156,1 (1,2)B,a	15,6 (2,8) a	17,2 (1,5) a	339,0 (2,1)A,b	374,1 (1,7)B,a	0,2 (0,04)a
CIVMR-14%TMPnano-0,25%QuiPh	135,1 (2,4)A,b	176,8 (2,6)B,b	13,3 (1,6) a	18,3 (1,6) c	328,8 (1,9)A,b	454,4 (2,7)B,b	0,2 (0,07)a
CIVMR-14%TMPnano-0,5%QuiPh	137,5 (1,8)A,b	141,0 (1,9)A,a	14,3 (1,8) a	14,0 (1,3) a	285,9 (1,5)A,a	457,1 (1,3)B,b	0,3 (0,20)a

Letras minúsculas indicam diferenças estatísticas entre os grupos de acordo com cada tempo e letras maiúsculas diferenças entre os períodos (ANOVA, 2 critérios, Student-Newman-Keuls, $p < 0,001$).

**RC: Resistência a compressão diametral; RTD: Resistência à tração diametral; DS: Dureza de superfície; RS: Rugosidade superficial.

Figura 5: Porcentagem do Grau de Conversão dos Monômeros (% GC, após 24 horas) ($\pm dp$, $n=3$), de acordo com os Cimentos Ionoméricos Experimentais. Letras minúsculas indicam diferenças estatísticas entre os grupos (ANOVA 1-critério, Kruskal-Wallis, $p < 0,001$).

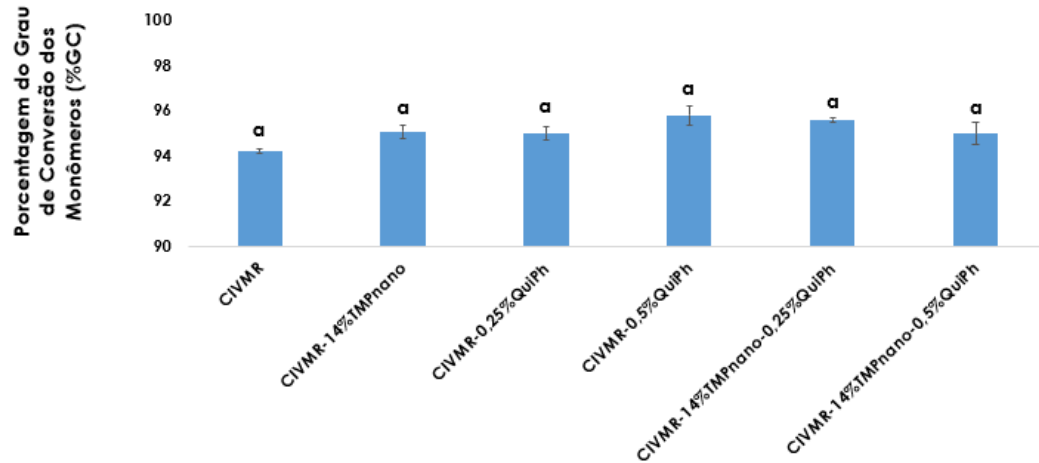


Figura 6: Imagens obtidas através do MEV e análise da % atômica de elementos químicos nos Cimentos Ionoméricos Experimentais: (a) CIVMR; (b) CIVMR-14%TMPnano; (c) CIVMR-0,25%QuiPh; (d) CIVMR-0,5%QuiPh; (e) CIVMR-14%TMPnano-0,25%QuiPh; (f) CIVMR-14%TMPnano-0,5%QuiPh ($\times 2000$). Asterisco: Depósito globulares, semelhantes a minerais.

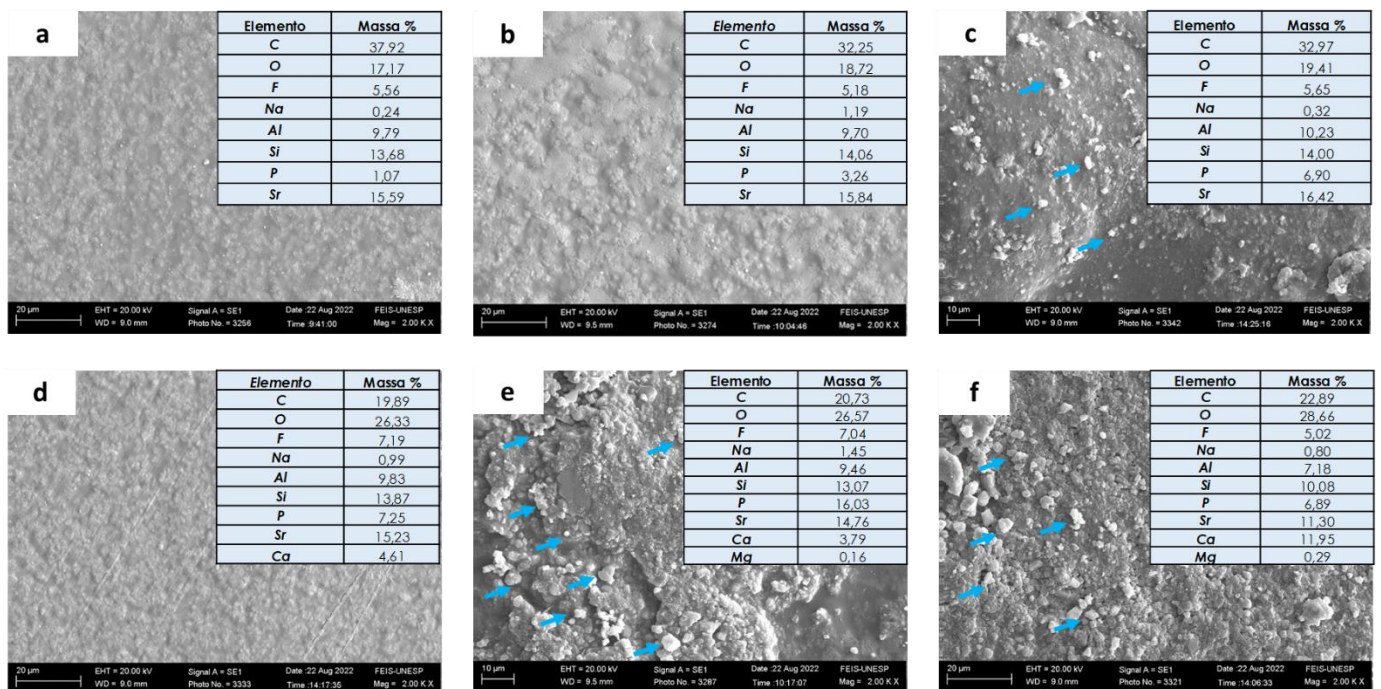


Figura 7: Valores médios de F liberados nas soluções DE e RE em função do tempo (15 dias) ($\pm dp$, $n=6$), de acordo com os Cimentos Ionoméricos Experimentais. Letras minúsculas indicam diferenças estatísticas entre os grupos (ANOVA 2-críterios, Student-Newman-Keuls, $p < 0,001$).

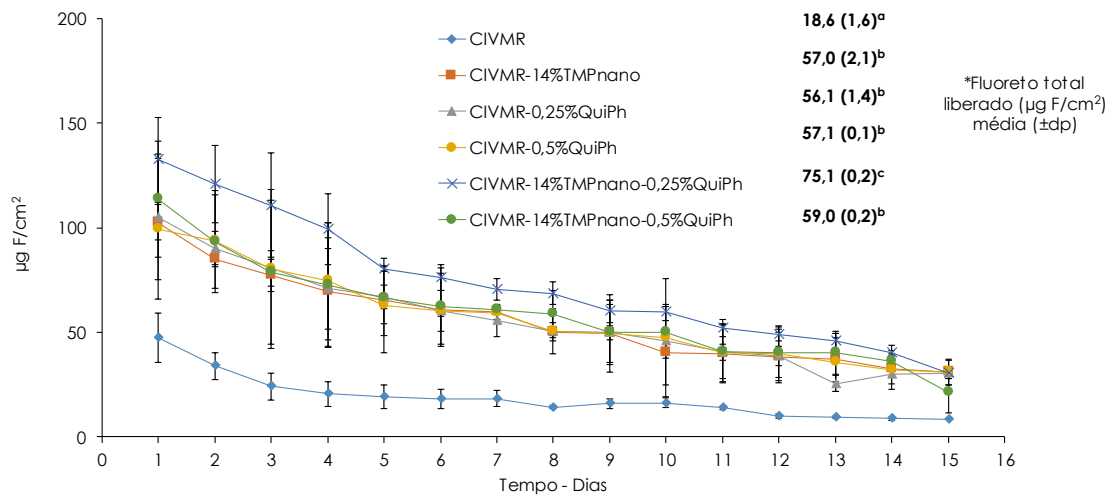


Figura 8. Valores médios ($\pm dp$, $n=4$) de adesão ao *S. mutans* (Log_{10} -UFC/mL) de acordo com os cimentos ionoméricos experimentais. (ANOVA 1-critério, Student-Newman-Keuls, $p < 0,001$).

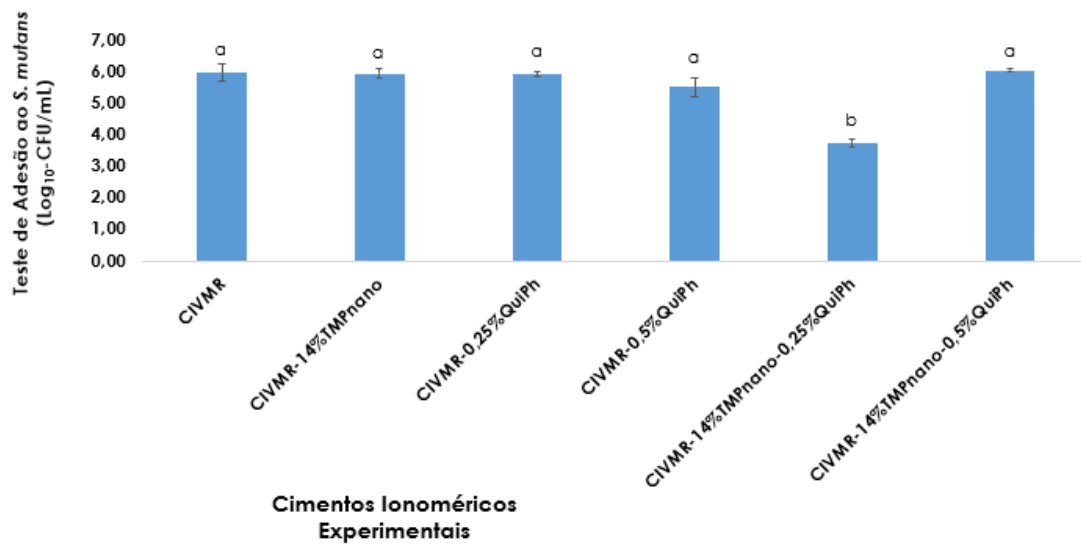


Figura 9. Valores médios ($\pm dp$, $n=6$) de crescimento de biofilme *S. mutans* (Log_{10} -UFC/mL) de acordo com os cimentos ionoméricos experimentais. (ANOVA 1-critério, Student-Newman-Keuls, $p < 0,001$).

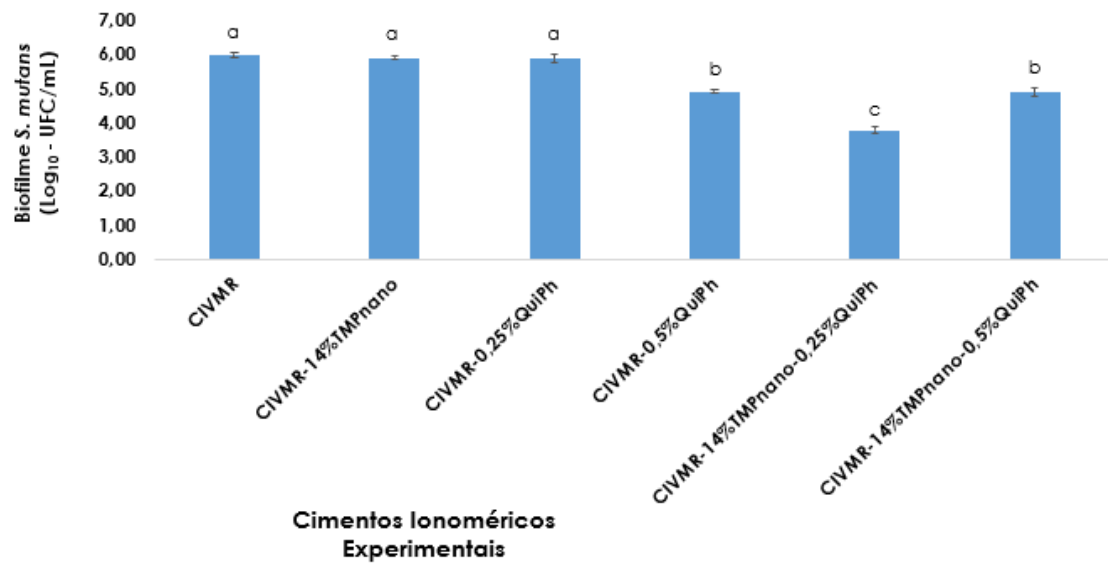


Figura 10. Valores médios ($\pm dp$, $n=6$) da atividade metabólica (Biofilme *S. mutans*, Log₁₀-UFC/mL) de acordo com os cimentos ionoméricos experimentais. (ANOVA 1-critério, Student-Newman-Keuls, $p < 0,001$).

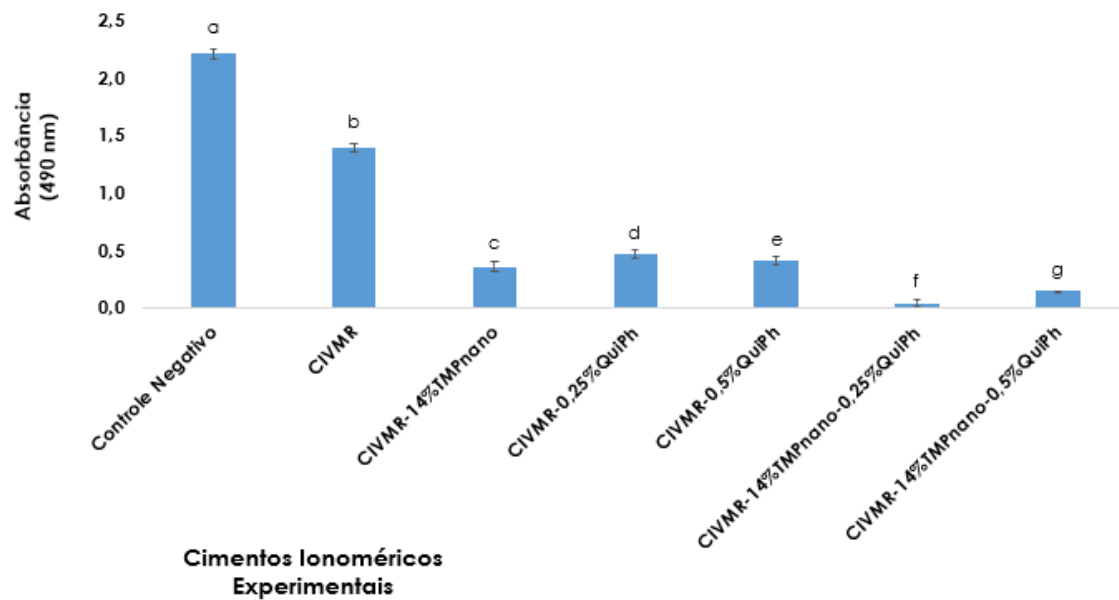
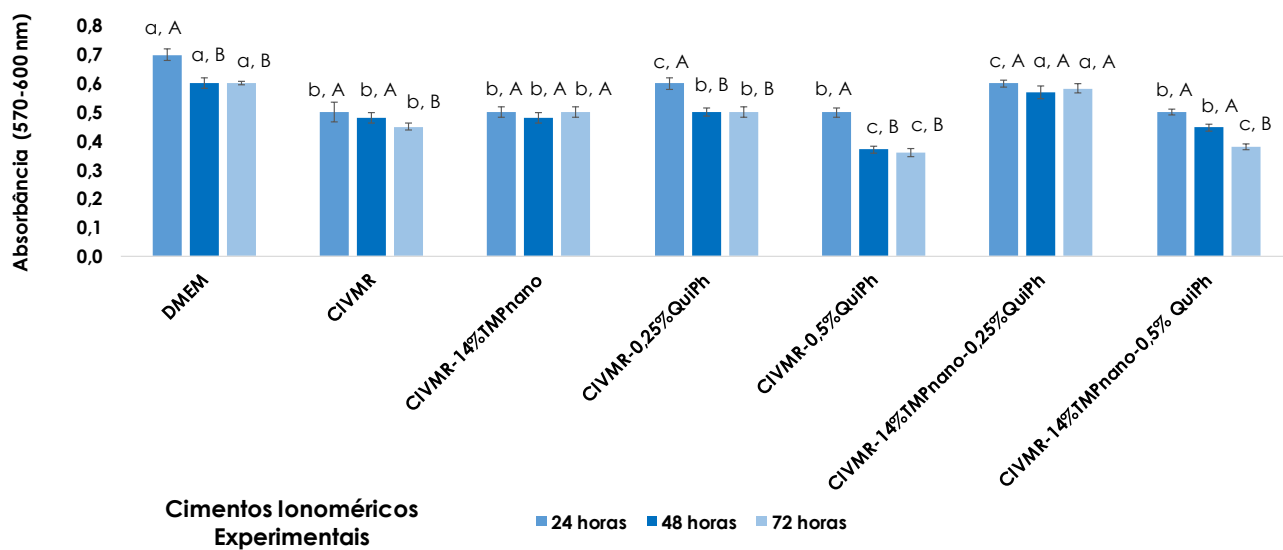


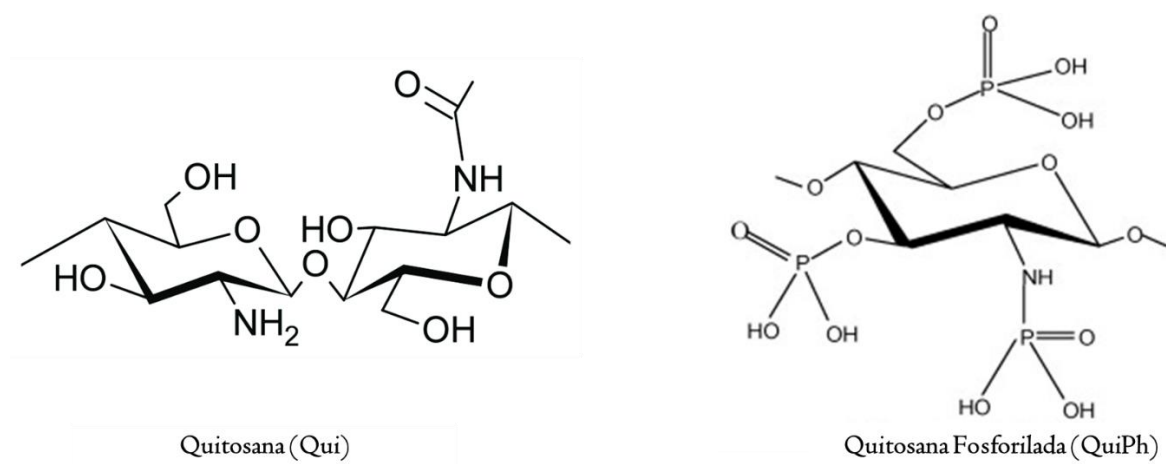
Figura 11. Valores médios ($\pm dp$, $n=6$) do metabolismo celular após 24 horas, 48 horas e 72 horas de acordo com os cimentos ionoméricos experimentais. Letras minúsculas indicam diferenças estatísticas entre os grupos e as maiúsculas entre os tempos (ANOVA 2-critérios, Student-Newman-Keuls, $p < 0,001$).



ANEXOS

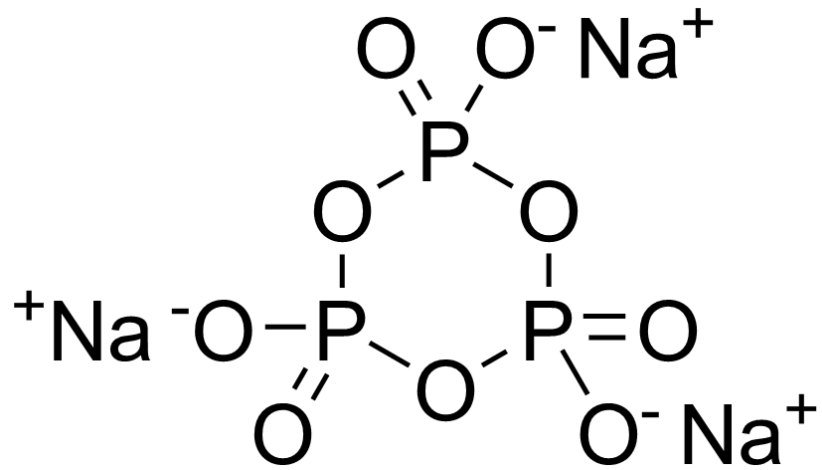
ANEXO A

Esquema da estrutura molecular da quitosana e quitosana fosforilada



ANEXO B

Esquema da estrutura molecular do trimetafosfato de sódio microparticulado



Anexo C

Síntese e caracterização da Quitosana Fosforilada



[ZHANG et al., 2014]

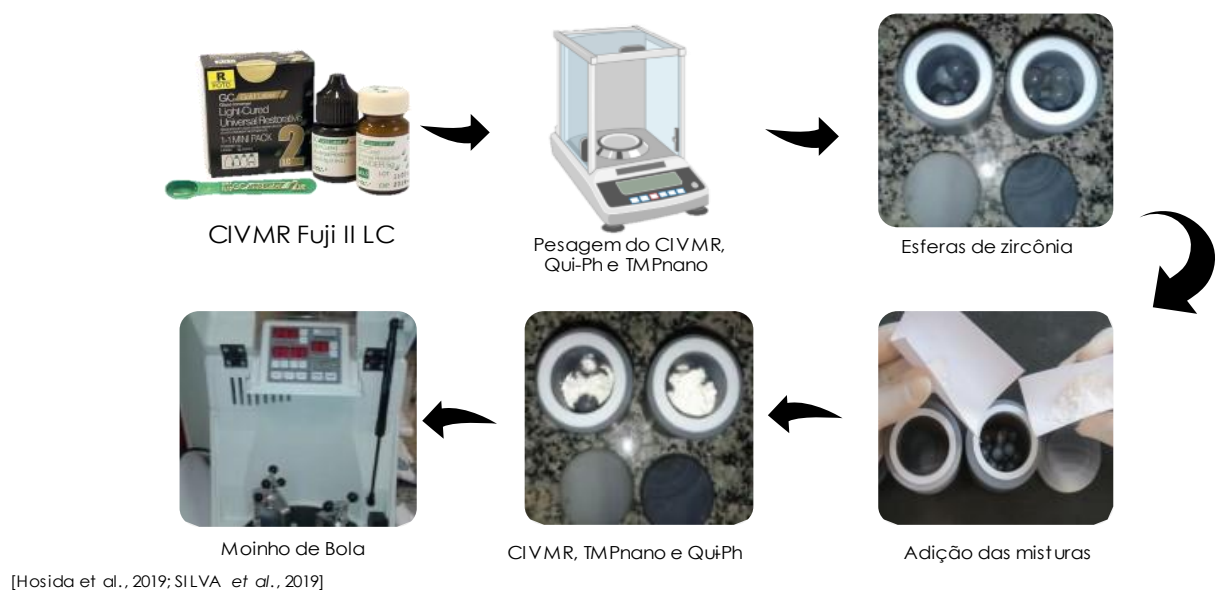
Anexo D

Síntese e caracterização do Trimetafosfato de Sódio Nanoparticulado



Anexo E

Preparo da Mistura dos CIVMR



Anexo F

Grupos experimentais



1. CIVM R Fuji II LC



2. CIVM R 14% TM Pnano



3. CIVM R 0,25% QuiPh



4. CIVM R 0,5% QuiPh



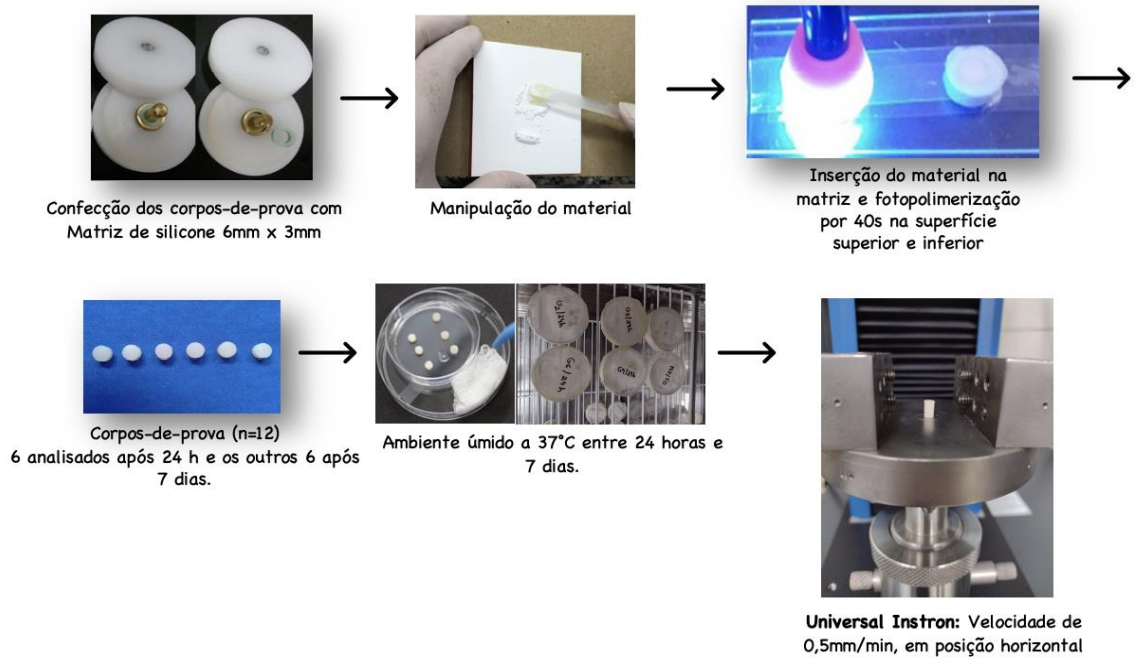
5. CIVM R 14% TM Pnano
0,25% QuiPh



6. CIVM R 14% TM Pnano
0,5% QuiPh

ANEXO G

Avaliação da Resistência à Tração Diametral (RTD)



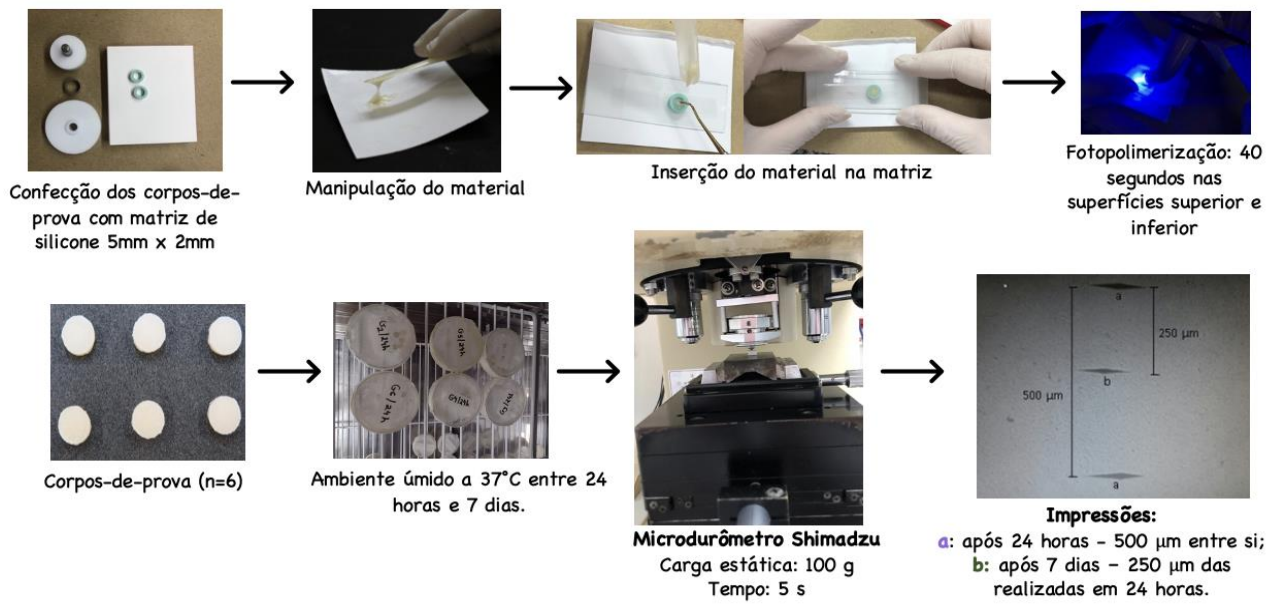
ANEXO H

Avaliação da Resistência à Compressão (RC)



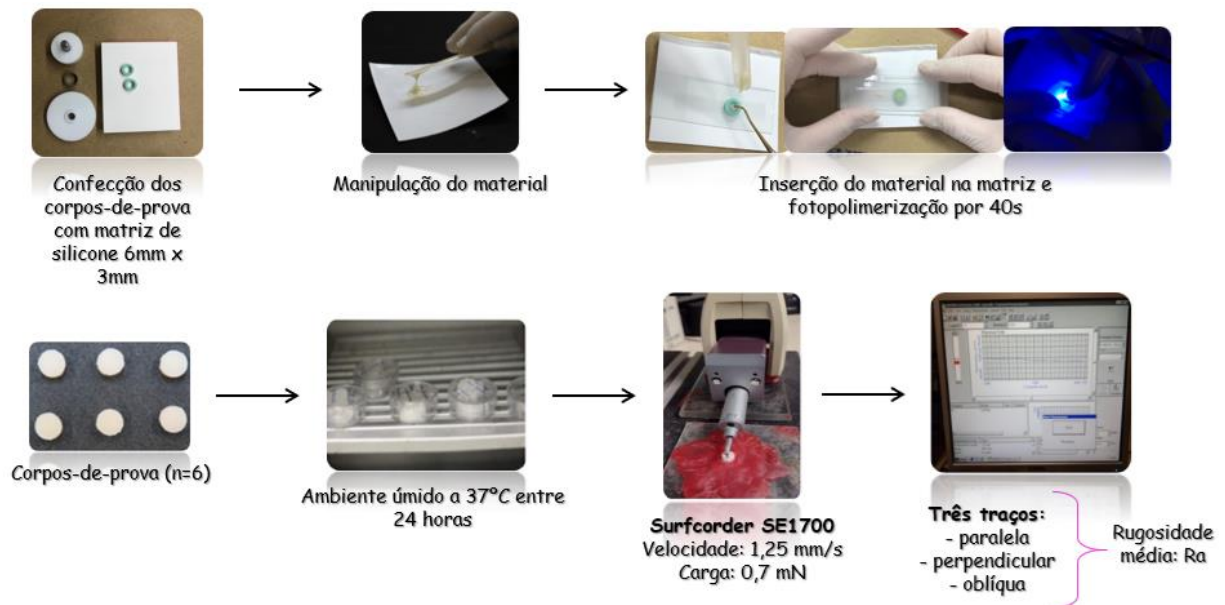
ANEXO I

Análise da Dureza de Superfície (DS)



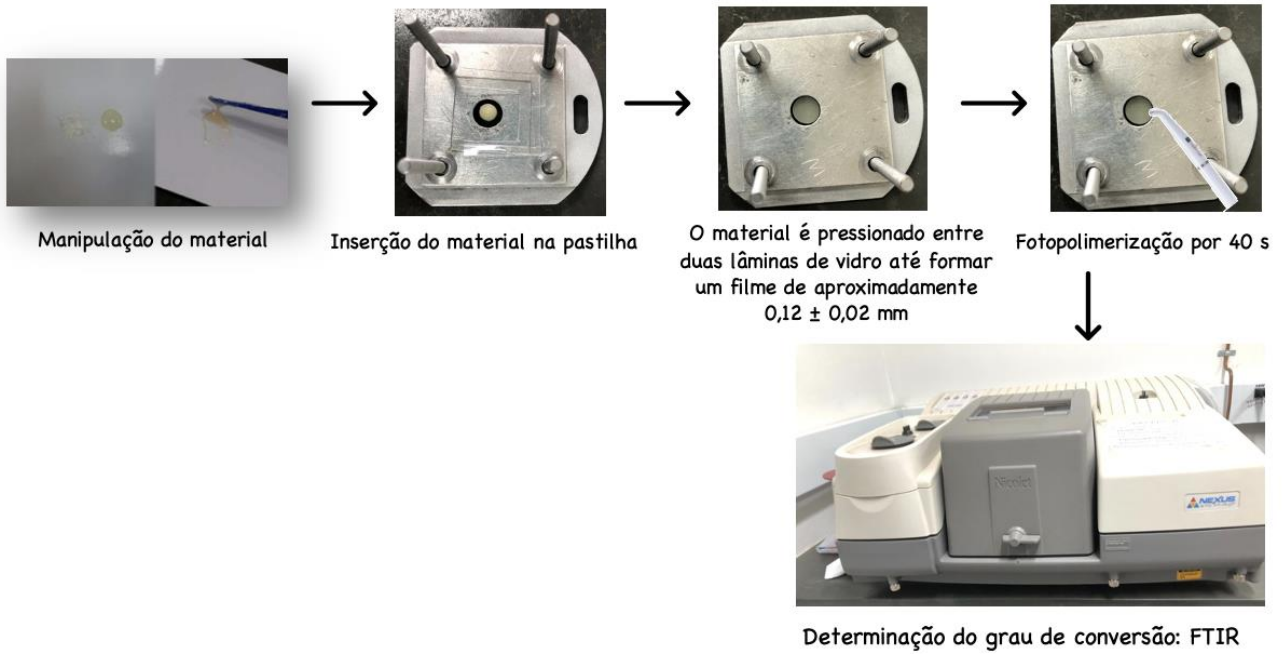
ANEXO J

Avaliação da Rugosidade Superficial (RS)

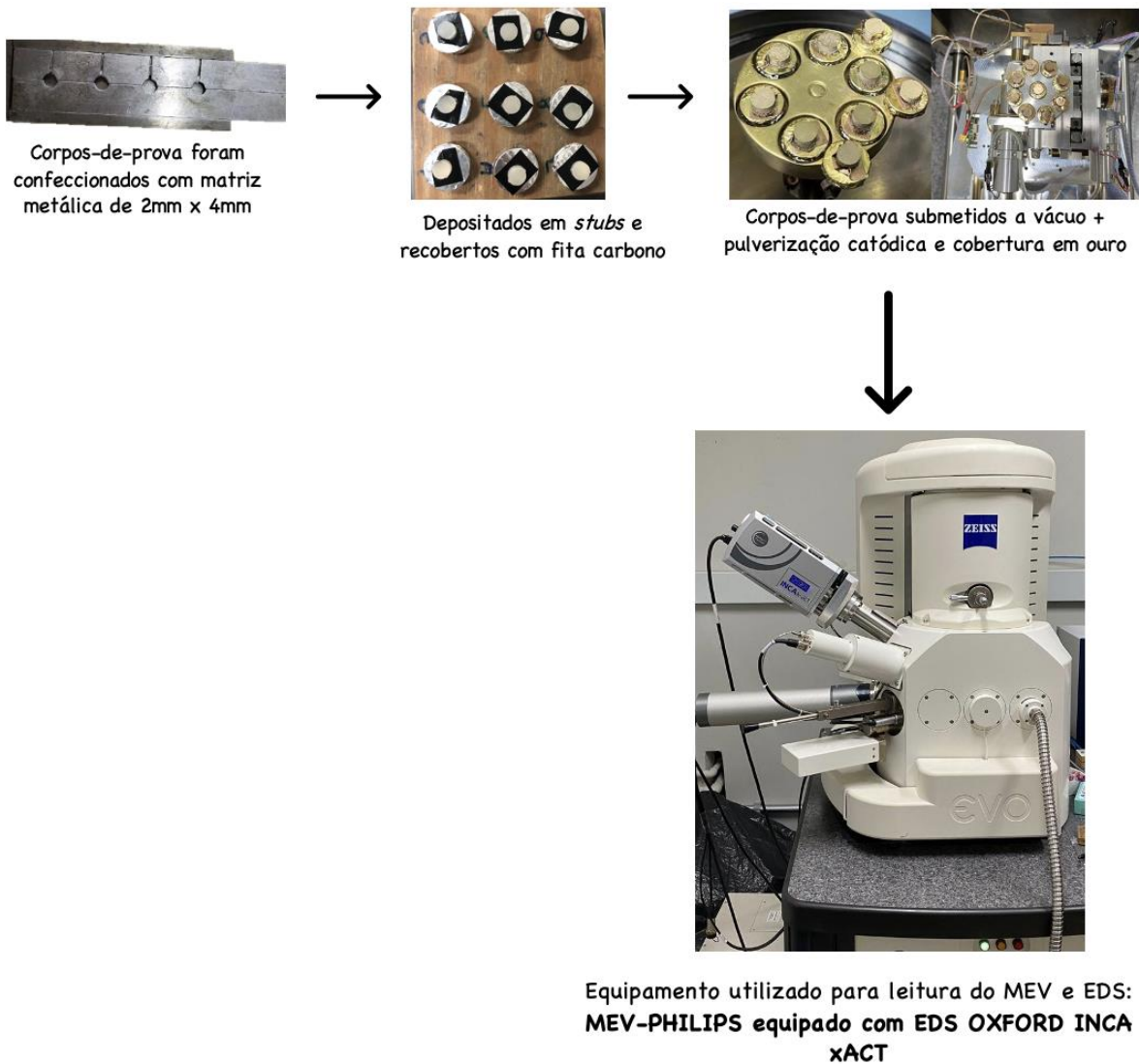


ANEXO K

Determinação da Porcentagem do Grau de Conversão (GC) dos Monômeros dos CIVMR

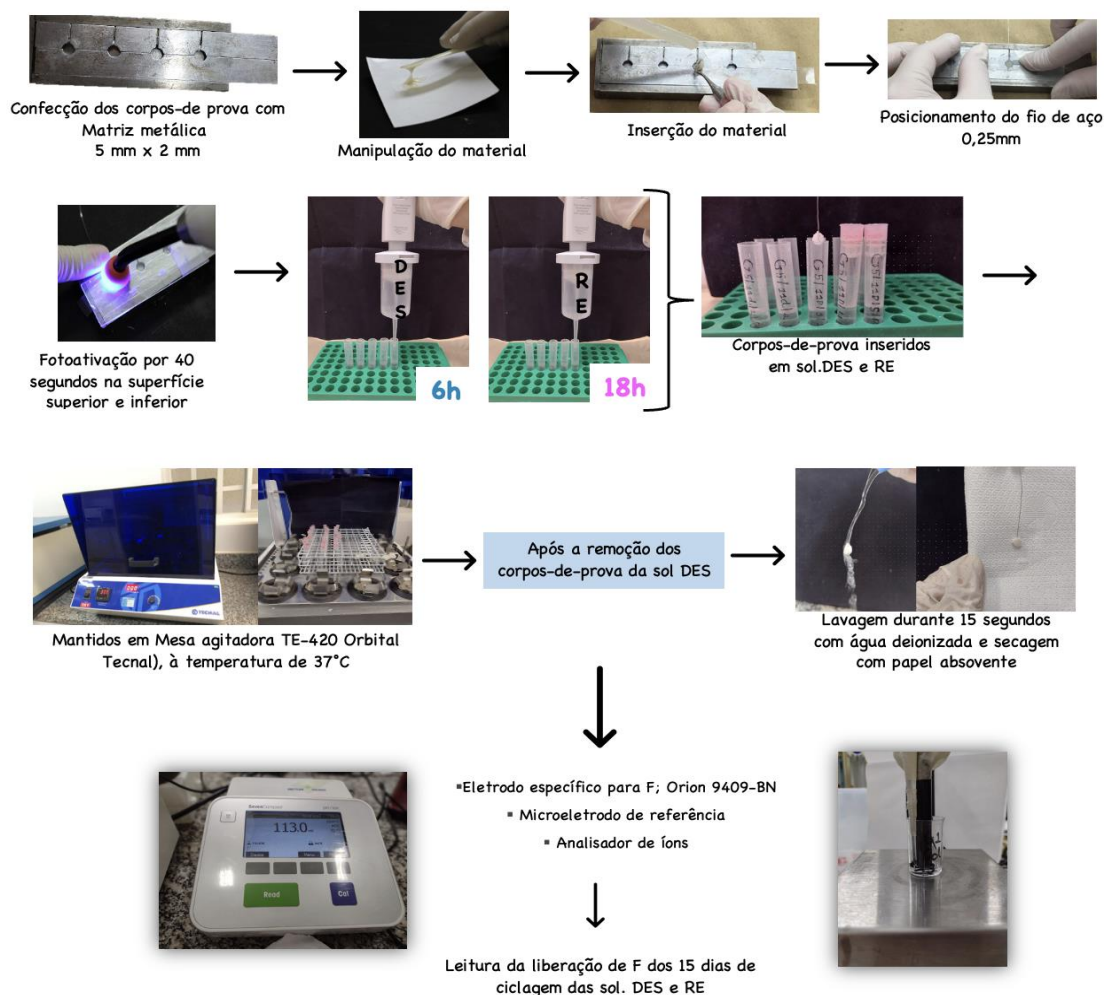


ANEXOL

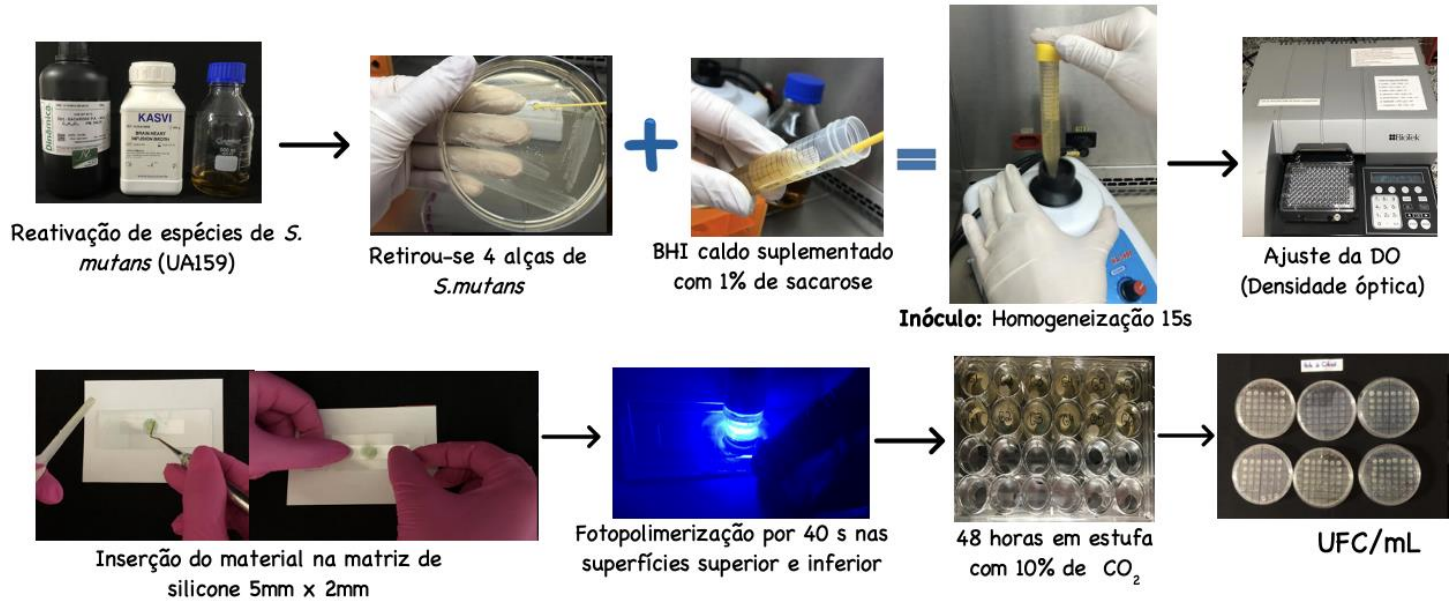
Análise da Morfologia e Composição Química Através da Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Energia Dispersiva de Raios-x (EDS)

ANEXOM

Análise da liberação de F dos CIVMR

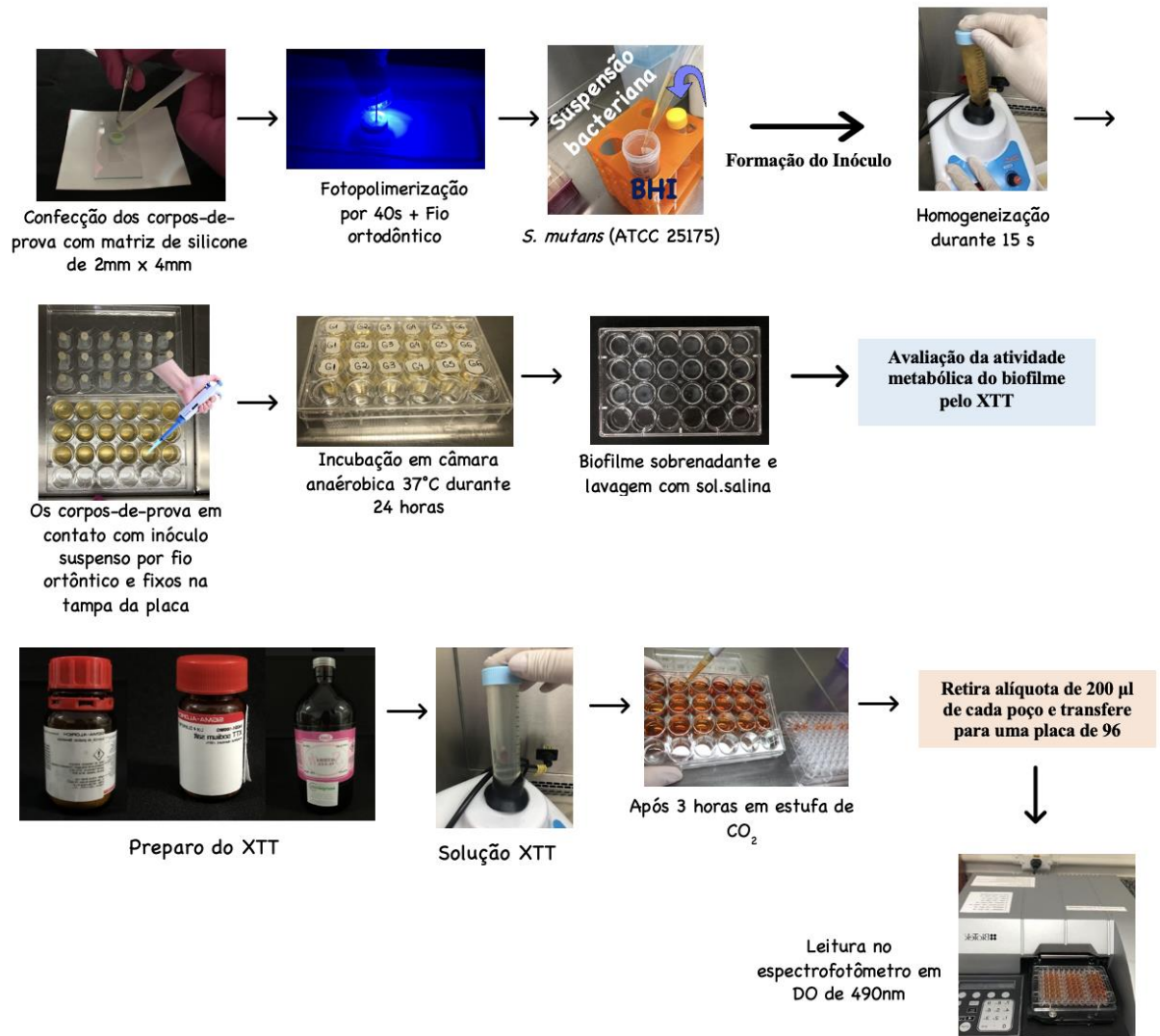


ANEXO N

Teste de Adesão ao *Streptococcus mutans*

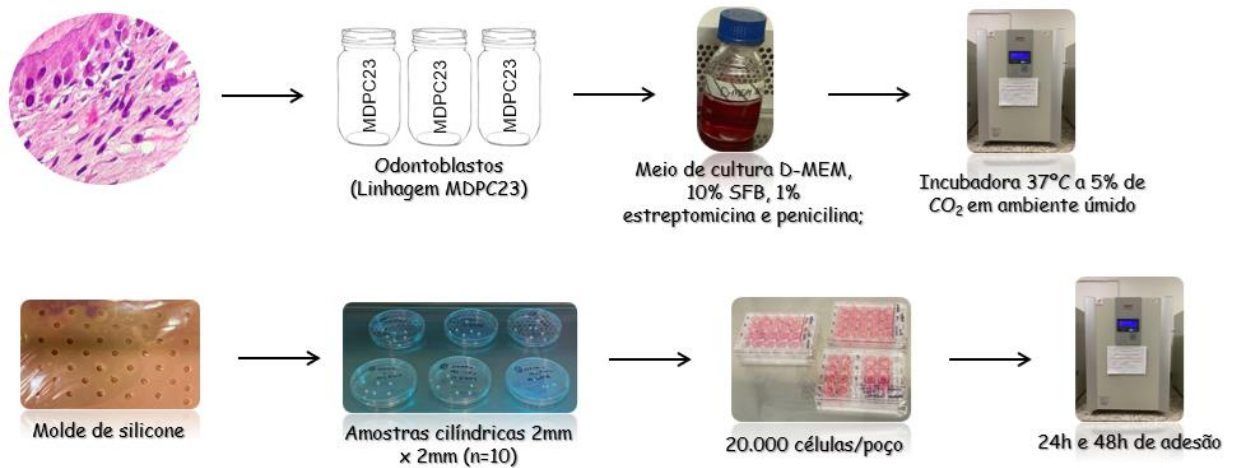
ANEXO O

Ensaio de Biofilme



ANEXO P

Análise da Citotoxicidade dos CIVMRs



Proliferação Celular



Após 24, 48 e 72 horas de exposição aos cimentos

Redução da Resazurina



Resazurina diluída no meio de cultura



Leitura em espectrofotômetro (570-600nm)