

Thayse Yumi Hosida

**Propriedades antimicrobianas, físico-mecânicas e
de liberação de fluoreto do cimento de ionômero
de vidro associado ao hexametáfosfato de sódio
microparticulado e nanoparticulado**

Araçatuba

2015

Thayse Yumi Hosida

Propriedades antimicrobianas, físico-mecânicas e de liberação de fluoreto do cimento de ionômero de vidro associado ao hexametáfosfato de sódio microparticulado e nanoparticulado

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

Orientadora: Prof^a. Adj. Denise Pedrini

Coorientador: Prof. Adj. Alberto Carlos Botazzo Delbem

Coorientadora: Prof^a. Ass. Dra. Cristiane Duque

Araçatuba
2015

Dados Curriculares

THAYSE YUMI HOSIDA

Nascimento	16.11.1990 – Maringá / PR
Filiação	Luiz Mitsuyochi Hosida Veronica Yutiko Sakai Hosida
2008/2012	Curso de Graduação em Odontologia pela Universidade Estadual de Maringá - UEM
2010-2011	Desenvolvimento de Projeto de Iniciação Científica, com auxílio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq.
2011/2011	Curso de Aperfeiçoamento em Endodontia pelo Odons Instituto Odontológico do Paraná.
2011/2012	Desenvolvimento de Projeto de Iniciação Científica, com auxílio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq.
2012/2013	Desenvolvimento de Projeto de Iniciação Científica, com auxílio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq.
2013/2015	Desenvolvimento de Projeto de Mestrado com auxílio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq.
Associações	CROPR - Conselho Regional de Odontologia do Paraná. SBPqO - Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica.

Dedicatória

Dedico este trabalho,

Aos meus queridos pais Luiz e Veronica,

Meus mais sinceros agradecimentos, por tudo que são e representam na minha vida. Muito obrigada pelo amor, paciência, compreensão e sabedoria em todos os momentos. Vocês são os principais responsáveis para realização de todos os meus sonhos. Agradeço o incentivo, a constante preocupação com meu bem estar, pela dedicação excessiva e por muitas vezes abdicarem dos seus sonhos para realização dos meus. Vocês são meu porto seguro, minha maior fonte de amor, alegria, cumplicidade, amizade e esperança. Não existem palavras que expressem os meus sentimentos por vocês.

Ao meu querido irmão, Vitor,

Você sempre caminhou ao meu lado e nunca mediu esforços para me ajudar.

Agradeço a cumplicidade, o companheirismo, amizade, paciência e o apoio em todos os momentos da minha vida. Obrigada por me confortar nos momentos difíceis, pela preocupação, pelo incentivo constante e por todos os momentos que compartilhamos até hoje. Agradeço também por fazer dos meus sonhos os seus, por celebrar cada conquista minha como se fosse sua. *Amo incondicionalmente você!*

Aos meus queridos avós,

Agradeço o amor, carinho, apoio e incentivo durante toda minha caminhada. Vocês sempre estiveram presentes nos momentos mais importantes e bonitos da minha vida. Amo muito vocês!

Agradecimentos Especiais

A Deus,

Presente em todos os momentos da minha vida, protegendo-me e guiando meus passos nesse longo caminho. Ele me proporcionou sabedoria, dedicação, persistência, calma, estímulo e paciência para chegar até aqui. Agradeço as pessoas especiais que o Senhor colocou no meu caminho durante essa etapa da minha vida. Muito obrigada pela companhia.

À minha querida orientadora, Prof^a. Adj. Denise Pedrini,

Meus sinceros agradecimentos pela orientação e paciência durante esses dois anos de mestrado. Agradeço a confiança depositada, o incentivo nos momentos difíceis e a maneira com que conduziu a minha orientação, tornando o nosso ambiente trabalho e a convivência os mais calmos possíveis. A senhora é um exemplo de pessoa bondosa, generosa e íntegra. Obrigada por compartilhar seu conhecimento e pelas oportunidades proporcionadas para o meu crescimento profissional. Fica aqui registrado o meu agradecimento.

Ao meu coorientador Prof. Adj. Alberto Carlos Botazzo Delbem

Serei eternamente grata por toda colaboração e empenho dispensada para que este trabalho pudesse ser realizado. Admiro-o pela competência, inteligência, humildade e acessibilidade. Obrigada pela convivência, paciência e dedicação. O senhor é um exemplo de pessoa e profissional.

À minha coorientadora Prof^a. Ass. Dra. Cristiane Duque

Agradeço a colaboração para o desenvolvimento deste trabalho. Obrigada pelo conhecimento compartilhado, ajuda, convivência e paciência. Exemplo de docente dedicada e competente.

“A primeira fase do saber é amar os nossos professores.” Erasmo.

Agradecimentos

Aos meus queridos primos, *Marlon e Renato* e meus tios *Catarina e Valdemar*. Não tenho palavras para agradecer todo o carinho que vocês têm por mim. Saibam que fico muito feliz pelo apoio em todos os momentos. Deixo registrado aqui o meu muito obrigado!

Aos professores da Disciplina de Odontopediatria, *Prof. Dr. Célio Percinato, Prof. Dr. Alberto Carlos Botazzo Delbem, Prof. Dr. Robson Frederico Cunha, Prof. Dr. Juliana Pelim Pennan, Prof^{te} Dra. Rosângela dos Santos Nery, Prof^{te} Dra. Sandra M. H. C. Ávila de Aguiar, Prof^{te} Dra^{te} Cristiane Duque* pela agradável convivência e pelos conhecimentos compartilhados durante o curso de mestrado.

Ao *Prof. Robson*, por todos os momentos de ensinamento com os quais me proporcionou. O esmero pelo que faz e a competência demonstrada são inspiradores.

Às minhas grandes amigas *Beatriz, Luciana, Camila e Andrielli* por compartilhar comigo todos os momentos importantes da minha vida. Durante todos esses anos de amizade em nenhum instante pensaram em me abandonar, sempre me confortaram com suas palavras, me fazendo sorrir mesmo nos momentos difíceis.

Às minhas amigas *Christine e Liliane* por todo apoio, respeito, carinho, cuidado, compreensão, e dedicação. Obrigada por me acolherem e fazerem dos meus dias em Araçatuba mais alegres. Vocês foram a minha segunda família durante esses dois anos. Muito obrigada.

Às minhas amigas *Carla, Márcjully e Jaqueline*, por terem me ajudado quando precisei. Agradeço também pela amizade, sinceridade, apoio, incentivo e pelos os momentos e experiências compartilhadas. Os dias com vocês sempre são mais alegres.

Ao meu amigo *Kevin*, por todo apoio, amizade e muita paciência durante esses dois anos. Agradeço o companheirismo, a sinceridade, a ajuda, o ombro amigo nos momentos difíceis e por ter me escutado sempre que precisei desabafar. Compartilhamos tantos momentos e esses levarei para sempre comigo. Torço muito para que você consiga atingir todos seus objetivos nessa nova etapa da sua vida.

À minha amiga *Mariana Nagata*, posso dizer que em você tenho uma amizade verdadeira e sincera. Durante esses dois anos você foi uma amiga ímpar na minha vida, esteve ao meu lado sempre que precisei, nunca mediu esforços para me ajudar, uma companheira para todas as horas. Você é um exemplo de humildade, bondade e de uma generosidade gigantesca. Agradeço a Deus por tê-la colocado em meu caminho. Conte sempre comigo. Fica aqui minha eterna gratidão!

Às alunas e alunos do *Mestrado, Doutorado, Pós-Doutorado*: Daniela Oliveira, Jackeline, Maria Daniela, Michele, Nathália, Paula, Kelly, Tatiana, Remberto, Carolina, Douglas, Juliana, Karina, Lais, Giovanna, Gabriely, Gabriela, Larissa, Renan, Sâmia, Carla, Priscila, do Programa de pós-graduação em Ciência Odontológica de Araçatuba – UNESP, pelos momentos de convívio agradáveis.

Estendo o agradecimento de maneira especial aos meus queridos colegas *Danielle Camara, Marcelle Danelon, Valéria e José Antônio*, pelo apoio, amizade e por gentilmente me ajudarem no desenvolvimento desta pesquisa. Os ensinamentos, a paciência e as experiências compartilhadas foram fundamentais. Serei eternamente grata.

Aos alunos de iniciação científica *Leonardo Morais e Tiago Binhardi*, pelo companheirismo e grande ajuda na realização da fase laboratorial deste trabalho.

Ao professor da Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP, *Mário Alexandre Coelho Sinhoreti*, por ceder gentilmente a máquina Instron, a qual foi fundamental para realizar os ensaios de compressão e tração diametral.

Ao técnico da Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP, *Marco Blanco Canfiani*, por gentilmente me ensinar a realizar os ensaios de compressão e tração diametral. Agradeço a receptividade e o convívio agradável.

Ao professor da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Campus de Ilha Solteira, *João Carlos Silos Moraes*, por ceder gentilmente o aparelho FTIR, o qual foi fundamental para realização do teste de grau de conversão de monômeros. Agradeço a dedicação, receptividade, o convívio agradável e os ensinamentos.

Ao aluno de Mestrado da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Campus de Ilha Solteira, *Sebastião Cândido das Dores*. Sua ajuda e disponibilidade foram fundamentais para a realização do ensaio de conversão de monômeros.

Ao professor *Erasma Rodrigues de Camargo* e ao aluno de Doutorado da Universidade Federal de São Carlos, *Francisco Nunes de Souza Neto*. Obrigada pela

síntese e caracterização das nanopartículas de hexametáfosfato de sódio. Sua ajuda foi fundamental para a realização deste trabalho.

Às professoras *Debora Barros Barbosa* e *Adelisa Rodolfo Ferreira Tiveron*, pela gentileza de aceitar prontamente o convite para participar como membro titular da banca da minha defesa de dissertação.

À *Faculdade de Odontologia de Araçatuba*, nas pessoas dos professores Dr^a Ana Maria Pires Soubhia, digníssima Diretora e Dr. Wilson Roberto Poi, digníssimo Vice-Diretor.

Ao *Curso de Pós-Graduação em Ciência Odontológica da Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP*, na pessoa do coordenador Prof. Dr. Alberto Carlos Botazzo Delbem.

Aos funcionários do *Departamento de Odontologia Infantil e Social da Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP*, Mario, Luiz e Ricardo, pela ajuda durante esta caminhada.

Aos funcionários da *Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP*, Ana Cláudia, Luzia, Ivone, Cláudio, Maria Cláudia, Luiz, Denise e Izamar pela atenção e disponibilidade com que nos recebem.

À *Valéria, Cristiane e Lilian da Seção de Pós-Graduação* da Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP, pelo profissionalismo e atenção sempre carinhosa.

Ao *Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq*, pela concessão de recursos que possibilitou a realização deste Curso de Mestrado.

“Foi o tempo que dedicaste à tua rosa que fez tua rosa tão importante.”

Antoine de Saint-Exupéry

A todos aqueles que, de alguma forma contribuíram para a elaboração e conclusão deste trabalho,

Minha eterna gratidão...

Epígrafe

Sonhe.

Sonhe com aquilo que você quiser.

Seja o que você quer ser.

*Porque você possui apenas uma vida e nela só se tem
uma chance de fazer aquilo que quer.*

Tenha felicidade bastante para fazê-la doce.

Dificuldades para fazê-la forte.

Tristeza para fazê-la humana.

E esperança suficiente para fazê-la feliz.

Clarice Lispector

Resumo

Hosida, TY. Propriedades antimicrobianas, físico-mecânicas e de liberação de fluoreto do cimento de ionômero de vidro associado ao hexametáfosfato de sódio microparticulado e nanoparticulado [dissertação]. Araçatuba: Universidade Estadual Paulista; 2015.

Resumo

O objetivo do presente estudo foi avaliar as propriedades antimicrobianas, físico-mecânicas e de liberação de fluoreto do cimento de ionômero de vidro (CIV) associado ao hexametáfosfato de sódio (HMP) microparticulado e nanoparticulado. Inicialmente, foram obtidas soluções de HMP nas concentrações 1, 3, 6, 9 e 12 % e a atividade antibacteriana foi avaliada contra *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus acidophilus* e *Actinomyces israeli* por meio do teste de difusão em ágar. A mesma metodologia foi empregada para determinar a atividade antimicrobiana do CIV associado ao HMP nas concentrações de 6, 9 e 12 % microparticulado ou nanoparticulado. Foi determinada a liberação de fluoreto (F) e HMP em soluções de desmineralização e remineralização. Além disso, as resistências à tração diametral e compressão, dureza de superfície e grau de conversão de monômeros foram analisados. Testes paramétricos e não paramétricos foram realizados, após a verificação da homocedasticidade dos dados ($p < 0,05$). As soluções de 6, 9 e 12 % de HMP apresentaram melhor atividade antimicrobiana contra as bactérias testadas, sendo essas concentrações incorporadas ao CIV. Todas as concentrações de HMP associado ao CIV tiveram atividade antimicrobiana para todas as bactérias. Observou-se uma relação dose-resposta entre concentração de HMP no CIV e a atividade antimicrobiana. Com relação à liberação de F e HMP, os maiores valores ocorreram no primeiro dia em todos os grupos e as maiores médias de liberação ocorreram nos grupos contendo 9 e 12 % de HMP nanoparticulado. Entretanto, a

incorporação do HMP ao CIV reduziu as propriedades físico-mecânicas quando comparado ao CIV mostrando uma relação dose-resposta. Concluiu-se que a incorporação de HMP no CIV melhora a atividade antimicrobiana e aumenta a liberação de F, porém reduz suas propriedades físico-mecânicas. A redução das partículas de HMP levou a melhores resultados antimicrobianos e de liberação de fluoreto.

Palavras-chave: Cimentos de ionômeros de vidro, Fosfatos, Nanopartículas, Polimerização, Força compressiva, Antibacterianos.

Abstract

Hosida, TY. Antimicrobial, physico-mechanical and fluoride release properties of glass ionomer cement associated with the microparticle and nanoparticle sodium hexametaphosphate [dissertação]. Araçatuba: Universidade Estadual Paulista; 2015.

Abstract

The aim of this study was to evaluate antimicrobial, physico-mechanical and fluoride release properties of the glass ionomer cement (GIC) associated with HMP microparticle and nanoparticle. Initially, solutions of HMP were obtained at concentrations of 1, 3, 6, 9 and 12 %, and the antibacterial activity was evaluated against *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus acidophilus* and *Actinomyces israeli* by agar diffusion test. The same methodology was used to determine the antimicrobial activity of GIC associated with HMP at concentrations of 6, 9 and 12 % microparticle or nanoparticle. The release of F and HMP were determined in demineralization and remineralization solutions. Furthermore, the resistance to diametral tensile and compression, surface hardness and the degree of conversion of monomers were measured. Parametric and non-parametric tests were performed, after checking homocedasticity data ($p < 0.05$). The solutions of 6, 9 and 12 % of HMP showed better antimicrobial activity against all bacteria tested, and these concentrations incorporated into the CIV. All concentrations of HMP incorporated into the GIC had antimicrobial activity for all bacteria. There was a dose-response relationship between concentration of HMP in the GIC and antimicrobial activity. Regarding the release of F and HMP, higher values occurred on the first day in all groups and the highest levels of release occurred in groups containing 9 and 12 % of HMP nanoparticle. However the incorporation of HMP in the GIC reduced values of physical and mechanical tests when compared to the GIC, showing a dose-response relationship. It was concluded that the

incorporation of HMP in GIC improves antimicrobial activity and increase the release of fluoride, but reduces its physical and mechanical properties. The reduction of particulate HMP led to better antimicrobial and fluoride release results.

Keywords: Glass ionomer cements, Phosphates, Nanoparticles, Polymerization, Compressive strength, Anti-bacterial agents.

Lista de Abreviaturas

LISTA DE ABREVIATURAS

HMP	Hexametafosfato de sódio
CIV	Cimento de ionômero de vidro
%	Porcentagem
F	Fluoreto
P	Nível de significância
BHI	Brain Heart Infusion
°C	Grau Celsius
µL	Microlitro
mL	Mililitro
nm	Nanômetro
M	Microparticulado
N	Nanoparticulado
µm	Micrometro
DRX	Difração de raios-X
LC	Light-Cured
G	Grama
mm	Milímetro
mW/cm ²	Miliwatts por centímetro quadrado
DES	Desmineralização
RE	Remineralização
Ca	Cálcio
P	Fósforo
mmol/L	Milimolaridade

mol/L	Molaridade
KCl	Cloreto de potássio
pH	Potencial hidrogeniônico
µg F/mL	Micrograma de fluoreto por mililitro
TISAB	Tampão ajustador de força iônica total
µg/cm ²	Micrograma por centímetro quadrado
HCl	Ácido clorídrico
µg P/mL	Micrograma de fósforo por mililitro
µg	Micrograma
mm/min	Milímetro por minute
kgf/cm ²	Quilograma-força por centímetro quadrado
Fr	Força
D	Diâmetro
T	Altura
MPa	Megapascal
n	Número de repetições
Mg	Miligrama
FTIR	Espectroscopia no infravermelho transformada de Fourier
cm ⁻¹	Por centímetro
µg F/cm ²	Micrograma de fluoreto por centímetro quadrado
µg HMP/cm ²	Micrograma de hexametáfosfato de sódio por centímetro quadrado
KHN	Dureza Knoop
KBr	Brometo de potássio
LTDA	Limitada

DP	Desvio padrão
UNESP	Universidade Estadual Paulista
SP	São Paulo
A/Abs	Absorbância
R	Correlação
π	Pi
<	Menor
TD	Tração diametral
GC	Grau de conversão
Na	Sódio
Mg	Magnésio
CHX	Clorexidina
MO	Missouri
UFSCar	Universidade Federal de São Carlos
MA	Massachusetts
ATCC	American Type Culture Collection
IAL	Instituto Adolfo Lutz
Co	Company
St	Saint
Inc.	Incorporation
H	Hora
Fig	Figura
K	Potássio
Al	Alumínio
Fe	Ferro

COO ⁻	Grupamento carboxílico
CH ₂ =C-(CH ₃)	Grupamento metacrilato
Tel	Telefone
CEP	Código de endereçamento postal
+	Mais
VT	Vermont
WI	Wisconsin
c-d-p	Corpo-de-prova
C = C	Dupla ligação de carbono

Lista de Figuras

LISTA DE FIGURAS

Fig 1.	Médias e desvio-padrão (barras) dos diâmetros dos halos de inibição de acordo com a bactéria e as diferentes concentrações de HMP. Letras distintas mostram diferença estatística entre as concentrações de HMP para cada bactéria.	40
Fig 2.	Médias e desvio-padrão (barras) dos diâmetros dos halos de inibição de acordo com a bactéria e os CIVs. Letras distintas mostram diferenças estatísticas entre os CIVs para cada bactéria.	40
Fig 3.	Valores médios de fluoreto liberado nas soluções DES e RE em função do tempo (15 dias). Barras verticais mostram o desvio padrão da média. *Valores médios (DP) de fluoreto total liberado nas soluções DES e RE durante 15 dias. Letras distintas mostram diferença estatística entre os grupos.	41
Fig 4.	Valores médios de HMP liberado nas soluções DES e RE em função do tempo (15 dias). Barras verticais mostram o desvio padrão da média. *Valores médios (DP) de HMP total liberado nas soluções DES e RE durante 15 dias. Letras distintas mostram diferença estatística entre os grupos.	42
Fig 5.	Valores médios da resistência à tração diametral de acordo com os grupos. Letras distintas mostram diferença estatística entre os grupos e o tempo. Barras verticais mostram o desvio padrão da média.	43
Fig 6.	Valores médios da resistência à compressão de acordo com os grupos. Letras distintas mostram diferença estatística entre os grupos e o tempo. Barras verticais mostram o desvio padrão da média.	43
Fig 7.	Valores médios da dureza de superfície de acordo com os grupos. Letras distintas mostram diferença estatística entre os grupos e o tempo. Barras verticais mostram o desvio padrão da média.	44
Fig 8.	Valores médios do grau de conversão dos monômeros de acordo com os grupos. Letras distintas mostram diferença estatística entre os grupos e o tempo. Barras verticais mostram o desvio padrão da média.	45

Sumário

SUMÁRIO

RESUMO	32
INTRODUÇÃO	33
MATERIAL E MÉTODO	34
RESULTADOS	39
DISCUSSÃO	45
CONCLUSÃO	47
REFERÊNCIAS	48
ANEXOS	53

Propriedades antimicrobianas, físico-mecânicas e de liberação de fluoreto do cimento de ionômero de vidro associado ao hexametáfosfato de sódio microparticulado e nanoparticulado.*

Hosida TY¹, Delbem ACB¹, Moraes JCS², Duque C¹, Pedrini D³.

¹UNESP – Univ Estadual Paulista – Araçatuba – SP

Departamento de Odontologia Infantil e Social

Rua José Bonifácio 1193 Araçatuba, SP - CEP 16015-050 – Brasil

²UNESP – Univ Estadual Paulista – Ilha Solteira – SP

Departamento de Física e Química

Avenida Brasil 56 Ilha Solteira, SP - CEP 15385-000 – Brasil

³UNESP – Univ Estadual Paulista – Araçatuba – SP

Departamento de Cirurgia e Clínica Integrada

Rua José Bonifácio 1193 Araçatuba, SP - CEP 16015-050 – Brasil

Título curto: Cimento de ionômero de vidro associado ao hexametáfosfato de sódio.

Correspondência

Denise Pedrini

UNESP – Univ Estadual Paulista

Departamento de Cirurgia e Clínica Integrada

Rua José Bonifácio 1193, Araçatuba, SP, Brasil

CEP 16015-050

Tel. +55 18 3636 3201

Fax +55 18 3636 3332

Email: pedrini@foa.unesp.br

*** De acordo com as instruções aos autores do periódico Clinical Oral Investigations (http://www.springer.com/medicine/dentistry/journal/784?print_view=true&detailsPage=pltc_i_1060698).**

Propriedades antimicrobianas, físico-mecânicas e de liberação de fluoreto do cimento de ionômero de vidro associado ao hexametáfosfato de sódio microparticulado e nanoparticulado.

Resumo

Objetivos Avaliar as propriedades antimicrobianas, físico-mecânicas e de liberação de fluoreto do cimento de ionômero de vidro (CIV) associado ao hexametáfosfato de sódio (HMP) microparticulado e nanoparticulado.

Materiais e métodos Foram obtidas soluções de HMP nas concentrações 1, 3, 6, 9 e 12 % e a atividade antimicrobiana foi avaliada contra *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus acidophilus* e *Actinomyces israeli* por meio do teste de difusão em ágar. A mesma metodologia foi empregada para determinar a atividade antimicrobiana do CIV associado ao HMP nas concentrações de 6, 9 e 12 % microparticulado ou nanoparticulado. Foi determinada a liberação de fluoreto (F) e HMP em soluções de desmineralização e remineralização. Os ensaios de tração diametral, compressão, dureza de superfície e grau de conversão de monômeros foram analisados.

Resultados As soluções de 6, 9 e 12 % de HMP apresentaram melhor atividade antimicrobiana, sendo essas concentrações incorporadas ao CIV. Todas as concentrações incorporadas ao CIV tiveram atividade antimicrobiana perante as bactérias testadas. Observou-se uma relação dose-resposta entre concentração de HMP no CIV e a atividade antimicrobiana. As maiores médias de liberação de F e HMP ocorreram nos grupos contendo 9 e 12 % de HMP nanoparticulado. A incorporação do HMP ao CIV reduziu as propriedades físico-mecânicas quando comparado ao CIV.

Conclusões A incorporação de HMP ao CIV melhora a atividade antimicrobiana e aumenta a liberação de fluoreto, porém reduz suas propriedades físico-mecânicas.

Relevância clínica O CIV com HMP estaria indicado em pacientes com alto risco à cárie, pois demonstra potencial antimicrobiano e liberação de fluoreto, porém indicado para regiões de baixo esforço mastigatório ou restaurações provisórias, devido as propriedades mecânicas reduzidas.

Palavras-chave: Cimentos de ionômeros de vidro, Fosfatos, Nanopartículas, Polimerização, Força compressiva, Antibacterianos.

Introdução

A cárie dentária é o principal motivo da perda dentária. Com o avanço da Odontologia estão sendo estudados técnicas e materiais que possibilitem a mínima remoção do tecido cariado, com objetivo de conservar o remanescente dentário e minimizar danos pulpare [1–4]. Porém, mesmo após a remoção da camada amolecida e infectada e adequado selamento, bactérias viáveis têm sido encontradas na dentina remanescente afetada, após diferentes períodos de avaliação, independente do material aplicado na dentina cariada residual [1, 5-7].

A ação inibitória dos cimentos de ionômero de vidro (CIVs) sobre o crescimento de microrganismos cariogênicos tem aplicação conhecida nos procedimentos de remoção incompleta de cárie [5, 8], devido à liberação de fluoreto para o meio bucal. Entretanto, essa liberação ocorre principalmente nas primeiras 24 horas decaindo acentuadamente e tendendo a uma estabilização com o passar do tempo [9-12]. Em longo prazo, seria interessante potencializar a propriedade anticárie dos CIVs, adicionando agentes que favoreçam o processo de remineralização e aumentem a liberação de fluoreto, como os fosfatos inorgânicos [13]. Os fosfatos têm uma grande afinidade pela hidroxiapatita, impedindo o desprendimento de íons e reduzindo a área de superfície disponível para dissolução [14], o que produz um efeito anticárie no esmalte [15-17]. Dentre os sais de fosfato, o HMP é um fosfato muito utilizado na indústria como um agente antimicrobiano [18]. Quando associado aos dentifrícios com reduzida concentração de F melhorou a atividade anticárie [19].

A adição de substâncias antimicrobianas como antibióticos e a clorexidina ao CIV, aumentam a capacidade do material em eliminar a infecção residual na dentina, minimizando o risco de recidiva de cárie dentária e de danos à polpa [20, 21]. Como o HMP apresenta atividade antimicrobiana e quando associado ao fluoreto aumenta o efeito anticárie [19], sua adição ao CIV poderia melhorar seu desempenho quando aplicado sobre a dentina infectada. Além disso, a redução do tamanho das partículas de HMP em escala nanométrica poderia potencializar os efeitos antimicrobianos e anticárie. As propriedades das nanopartículas têm sido estudadas devido a sua elevada proporção entre área superficial e o volume do material, além da porcentagem mais alta de átomos em sua superfície quando comparadas a partículas maiores, o que pode torná-las mais reativas [22].

Contudo, a adição de fosfato poderia alterar as propriedades físico-mecânicas do CIV. Estudo mostrou que a incorporação de nanopartículas de clorexidina-hexametafosfato ao CIV produziu pequena alteração na resistência à tração diametral, porém não significativa [23]. Assim, a utilização de

nanopartículas de HMP poderia melhorar as propriedades antimicrobianas e anticárie do CIV sem prejuízo das propriedades físico-mecânicas. Portanto, o objetivo do presente estudo foi avaliar as propriedades antimicrobianas, físico-mecânicas e de liberação de fluoreto do CIV associado ao HMP microparticulado e nanoparticulado. A hipótese nula do estudo foi que a incorporação do HMP ao CIV não alterasse seu efeito antimicrobiano, suas propriedades físico-mecânicas e de liberação de fluoreto.

Material e Método

Avaliação da atividade antimicrobiana do HMP

Teste de difusão em ágar com discos

Inicialmente, foram obtidas soluções de HMP nas concentrações de 1, 3, 6, 9 e 12 % (Anexo A), definidas com base nos resultados obtidos por da Camara et al. [19] e Danelon et al. [24], para determinar a melhor concentração de HMP com atividade antimicrobiana para ser incorporada aos CIVs. Realizou-se ensaios de difusão em ágar [25] com as espécies *Streptococcus mutans* (ATCC 25175), *Lactobacillus acidophilus* (IAL#523) e *Actinomyces israeli* (ATCC 12102). Essas foram reativadas, a partir das suas culturas originais, em placas de BHI-ágar (Brain Heart Infusion) e incubadas a 37 °C por 48 horas. Em seguida, 5 colônias de cada espécie foram inseridas em caldo BHI individualmente e incubadas a 37 °C por 18-24 horas (Anexo A). Uma alíquota de 300 µL de cada suspensão bacteriana (densidade óptica de 0,6 e absorbância de 550 nm) foi homogeneizada com 15 mL de BHI-ágar a 45 °C (Anexo A). Após a geificação do meio de cultura, discos de papéis esterilizados foram colocados sobre a superfície do meio ágar. Uma alíquota de 5 µL de cada solução de HMP foi colocada sobre os discos de papéis (Anexo A). Para cada experimento também foi utilizada, como controle positivo, solução de digluconato de clorexidina (CHX) a 0,2 %. As placas foram mantidas por 2 horas na temperatura ambiente para permitir a difusão das soluções e em seguida incubadas a 37 °C por 24 horas. Duas medidas de cada halo de inibição foram mensuradas com o auxílio de paquímetro digital (Anexo A) e as médias calculadas.

Avaliação da atividade antimicrobiana dos CIVs contendo ou não HMP

Preparo do HMP microparticulado (M) e nanoparticulado (N)

Para padronizar o tamanho das partículas do HMP microparticulado em até 53 µm de diâmetro foi utilizado o agitador eletromagnético e peneira granulométrica (Bertel Indústria Metalúrgica LTDA, Caieiras, SP, Brasil) (Anexo B).

Para a redução do tamanho das partículas de HMP (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, Estados Unidos da América) à escala nanométrica utilizou-se a técnica da moagem realizada no Instituto de Química da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar). Primeiramente, o HMP foi pesado e armazenado em frascos de polietileno. Bolas de zircônia foram adicionadas ao HMP em associação com solvente (isopropanol) até recobrir as mesmas. Os frascos foram vedados com fita veda rosca e levados ao moinho de bolas, sendo submetidos à moagem por 48 horas. Em seguida, o pó foi submetido à filtração em peneiras granulométricas para a sua separação das bolas de zircônia. O frasco contendo o HMP foi lavado com isopropanol e o material filtrado foi vedado com papel alumínio e submetido à secagem em estufa à temperatura de 85°C para evaporação do solvente. O HMP foi submetido à trituração até atingir partículas com diâmetro médio de 38 nm, 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 HMP sem moagem e HMP moído por 48 horas (Anexo B).

Preparo do CIV

O CIV utilizado neste estudo foi o Fuji II LC (GC Corporation, Tokyo, Japão). O HMP microparticulado ou nanoparticulado foi adicionado ao pó do CIV em concentrações de 6, 9 e 12 %, separadamente, definidas com base nos resultados obtidos no teste de difusão em ágar nos discos. Para a adição do HMP ao pó do CIV, foi considerado para cada 100 g do produto final da mistura (CIV + HMP) a incorporação de 6, 9 e 12 g do HMP (Anexo C). A mistura foi homogeneizada em moinho de bolas (Planetary Micro Mill PULVERISETTE 7 classic line, Fritsch GmbH, Idar-Oberstein, Alemanha) por 5 minutos (Anexo C). Para manipulação do material foi mantida a proporção pó-líquido do CIV recomendada pelo fabricante (3,2 g de pó para 1,0 g de líquido).

Teste de difusão em ágar com CIVs

A mesma metodologia realizada para o teste de difusão em ágar com discos foi realizada para o teste de difusão em ágar com CIVs. No entanto, foram confeccionados poços equidistantes no ágar com auxílio de cilindros com 4 mm de diâmetro esterilizados. O CIV e os CIVs com HMP nas concentrações descritas no item anterior foram manipulados e inseridos nos poços, preenchendo-os até a borda e fotopolimerizados (Blue Star 2, Microdont, Socorro, SP, Brasil), por período de 20 segundos em cada superfície, com intensidade de 1070 mW/cm² (Anexo D).

Liberção de F e HMP dos CIVs

Confecção dos corpos-de-prova

Seis corpos-de-prova de cada material (5 mm de diâmetro e 2 mm de espessura) (Anexo E), foram confeccionados em matrizes metálicas definindo 7 grupos experimentais: CIV (controle), CIV com 6, 9 e 12 % de HMP microparticulado, CIV com 6, 9 e 12 % de HMP nanoparticulado. A fotopolimerização foi realizada, por período de 20 segundos, nas superfícies superior e inferior [26].

Ciclagem de pH para liberação de F e HMP dos CIVs

Seis corpos-de-prova de cada material foram colocados em tubos de ensaio de polipropileno com tampa, suspensos por um fio de aço inoxidável (Anexo E). Cada tubo continha 2 mL das soluções de desmineralização (DES) ou remineralização (RE) [26]. 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, Piracicaba, SP, Brasil), à temperatura de 37 °C (Anexo E). Estes procedimentos foram repetidos durante 15 dias (Anexo E). 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 e HMP liberado.

Análise de F e HMP nas soluções DES e RE

Para a dosagem de fluoreto das soluções DES e RE foi utilizado o eletrodo específico (9409 BN, Orion Research, Inc., Beverly, MA, Estados Unidos da América) e microeletrodo de referência, previamente calibrados com soluções padrão de 0,0625 a 16 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) (Anexo F). Esses valores foram convertidos para µg F/cm². O HMP liberado pelos materiais foi dosado após hidrólise em meio ácido seguido da determinação do fósforo (P) liberado. Para isto, alíquotas de 0,2 mL das soluções DES ou RE foram acrescidas de 0,2 mL de ácido clorídrico (HCl) a 1,0 mol/L e aquecidas em banho fervente, a 100 °C, por

1 hora. Após a hidrólise, a concentração de P nas soluções foi determinada pelo método colorimétrico [27], em placas de 96 poços (Placa para cultura de células de fundo chato - Modelo 92096 - TPP, Suíça). Alíquotas de 0,02 mL das soluções DES ou RE foram utilizadas para as leituras em leitor de microplacas (PowerWave 340, Biotek, Winooski, VT, Estados Unidos da América), no comprimento de onda de 660 nm (Anexo G). A concentração de P determinada nas soluções DES e RE após hidrólise ácida foi subtraída da quantidade de fósforo existente nas soluções DES ($57,5 \pm 7,6 \mu\text{g P/mL}$) e RE ($26,9 \pm 2,7 \mu\text{g P/mL}$) e o valor final considerado como a proveniente de HMP presente nas soluções. Esses valores foram convertidos para $\mu\text{g HMP/cm}^2$. As concentrações de F e HMP das soluções DES e RE foram determinadas separadamente. Posteriormente, os resultados das soluções DES e RE foram somados (DES + RE), completando um período de 24 horas e um ciclo da metodologia utilizada (ciclagem de pH), nos 15 dias analisados.

Determinação das propriedades físico-mecânicas dos CIVs

Avaliação da resistência à tração diametral

Seis corpos-de-prova foram confeccionados por meio de matrizes com 6 mm de diâmetro x 3 mm de altura (Anexo H). Após os períodos de 1 e 7 dias de armazenamento em estufa a 37 °C, em ambiente úmido, os espécimes foram submetidos ao ensaio de resistência à tração diametral (TD), a uma velocidade de 1 mm/min, em posição horizontal, com carga de 500 N, até que ocorresse a fratura. Para tanto, foi utilizada uma máquina de ensaio universal Instron (DL3000, Instron Co., Canton, MA, Estados Unidos da América) (Anexo H). Os valores de tração diametral (kgf/cm^2) foram calculados usando a equação: $TD = 2Fr/\pi DT$, onde Fr é a força, D é o diâmetro e T é a altura do espécime e convertidos em MPa.

Avaliação da resistência à compressão

Seis corpos-de-prova foram confeccionados utilizando matrizes com 2 mm de diâmetro x 4 mm de altura (Anexo I). Após os períodos de armazenamento (como descrito anteriormente), os espécimes foram submetidos ao ensaio de resistência à compressão em máquina de ensaio universal Instron (DL3000, Instron Co.), a uma velocidade de 1 mm/min, em posição vertical, com carga de 500 N, até que ocorra a fratura (Anexo I). Os valores obtidos nos testes de compressão foram calculados (kgf/cm^2) dividindo a força pela área e convertidos em MPa.

Avaliação da dureza de superfície

Seis corpos-de-prova dos CIVs (5 mm de diâmetro e 2 mm de espessura), mantidos 1 dia em recipiente plástico e em ambiente úmido (37 °C), foram submetidos ao teste de dureza de superfície (Anexo J). O teste foi determinado utilizando microdurômetro (Micromet 5114 hardness tester, Buehler, Lake Bluff, IL, Estados Unidos da América), sob carga estática (Knoop) de 100 g e tempo de 10 segundos. Foram realizadas 5 impressões na superfície de topo do material distantes 500 µm entre si [26]. A seguir, os corpos-de-prova foram armazenados em estufa a 37 °C (100 % de umidade) e após 7 dias foi repetido o teste da dureza (Anexo J).

Determinação do grau de conversão (GC) dos monômeros dos CIVs

Os CIVs (n=4) foram manipulados, inseridos entre duas lâminas de vidro, pressionados formando um filme de aproximadamente $0,12 \pm 0,02$ mm, e fotopolimerizados por 20 segundos em cada lado da amostra. Em seguida, foram armazenados durante 1 e 7 dias em estufa a 37 °C. Após estes períodos, os filmes de CIVs foram triturados e misturados com brometo de potássio (KBr), na proporção de 1:70 (mg:mg). As misturas foram colocadas na prensa (Pike Technologies, Madison, WI, Estados Unidos da América) para confecção das pastilhas, as quais foram analisadas imediatamente usando a técnica de espectroscopia no infravermelho transformada de Fourier (FTIR). Os espectros de absorção no infravermelho foram obtidos pelo método de transmissão em espectrofotômetro (Nexus 670, Nicolet Instrument Corporation, Madison, WI, Estados Unidos da América), na região espectral entre 500 e 2.000 cm^{-1} , utilizando 128 varreduras e 4 cm^{-1} de resolução. Para obtenção dos espectros de absorção do monômero, filmes da parte líquida do CIV foram depositados sobre pastilhas de KBr. Para tanto, foram preparados 10 amostras e o valor médio da razão $\text{Abs}(\text{C}=\text{C})/\text{Abs}(\text{COO}^-)$ obtido foi de $(10,09 \pm 0,93)$. A determinação do grau de conversão na polimerização dos CIVs foi baseada na medida da diminuição da intensidade da banda de absorção associada ao metacrilato quando o monômero é convertido em polímero (Anexo K). Para o material estudado e as condições de preparação das amostras, foram utilizadas as bandas de absorção associadas a vibrações de estiramento das ligações $\text{C}=\text{C}$ do monômero e COO^- do ácido carboxílico, localizadas aproximadamente em 1640 e 1540 cm^{-1} , respectivamente. O valor do grau de conversão foi determinado utilizando a seguinte equação:

$$GC (\%) = \left(1 - \frac{[\text{Abs}(\text{C}=\text{C})/\text{Abs}(\text{COO}^-)]_{\text{polímero}}}{[\text{Abs}(\text{C}=\text{C})/\text{Abs}(\text{COO}^-)]_{\text{monômero}}} \right) \times 100.$$

Análise estatística

Os dados dos halos de inibição (teste de difusão em ágar) mostraram-se heterogêneos e foram submetidos à análise de Kruskal-Wallis seguida pelo teste de Mann-Whitney. Para as variáveis concentração de F ($\mu\text{g F/cm}^2$) e HMP ($\mu\text{g HMP/cm}^2$) nas soluções DES e RE e valores obtidos dos testes físico-mecânicos (tração diametral – MPa, compressão – MPa, dureza dos materiais – KHN e grau de conversão – %) foram considerados como fatores de variação os materiais e o tempo. Os dados de liberação (F e HMP) mostraram distribuição heterogênea e foram submetidos à análise de variância (2-critérios) seguida pelo teste de Student-Newman-Keuls. Os resultados de tração diametral e dureza apresentaram distribuição normal (Teste de Shapiro-Wilk) e homocedasticidade (Teste de Cochran) após transformação logarítmica e, juntamente com os dados de compressão e grau de conversão, foram submetidos à análise de variância (2-critérios) seguida pelo teste de Student-Newman-Keuls. Todas as análises foram realizadas com o programa SigmaPlot versão 12.0 com limite de significância de 5%.

Resultados

A ação antimicrobiana do HMP em solução aumentou de modo crescente com a concentração da solução, com exceção de 1 % que não apresentou atividade para nenhuma das bactérias testadas (Fig. 1). As concentrações de 3 e 6 % também não foram eficazes para *Actinomyces israeli*. A solução de HMP 12 % nanoparticulado apresentou os melhores resultados para todas as bactérias, quando comparada com as demais soluções. O controle positivo, a clorexidina, apresentou os maiores halos de inibição.

Para os CIVs, houve atividade antimicrobiana para todas as concentrações e bactérias. Observou-se uma relação dose-resposta entre concentração de HMP no CIV e a atividade antimicrobiana mostrando diferença estatística entre as concentrações e tamanho de partículas, exceto para a de HMP 6 % microparticulado e HMP 6 % nanoparticulado contra as bactérias *Streptococcus mutans* e *Actinomyces israeli*. O CIV com HMP 12 % nanoparticulado apresentou melhor desempenho que os demais grupos (Fig. 2).

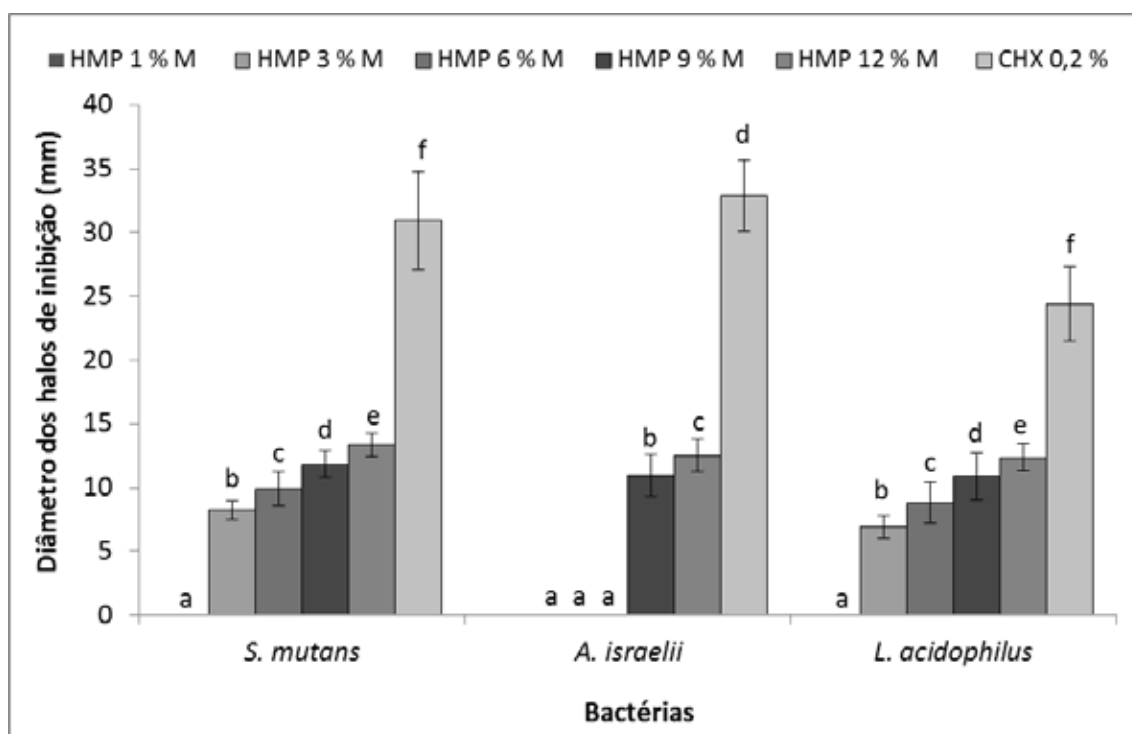


Fig. 1. Médias e desvio-padrão (barras) dos diâmetros dos halos de inibição de acordo com a bactéria e as diferentes concentrações de HMP. Letras distintas mostram diferença estatística entre as concentrações de HMP para cada bactéria.

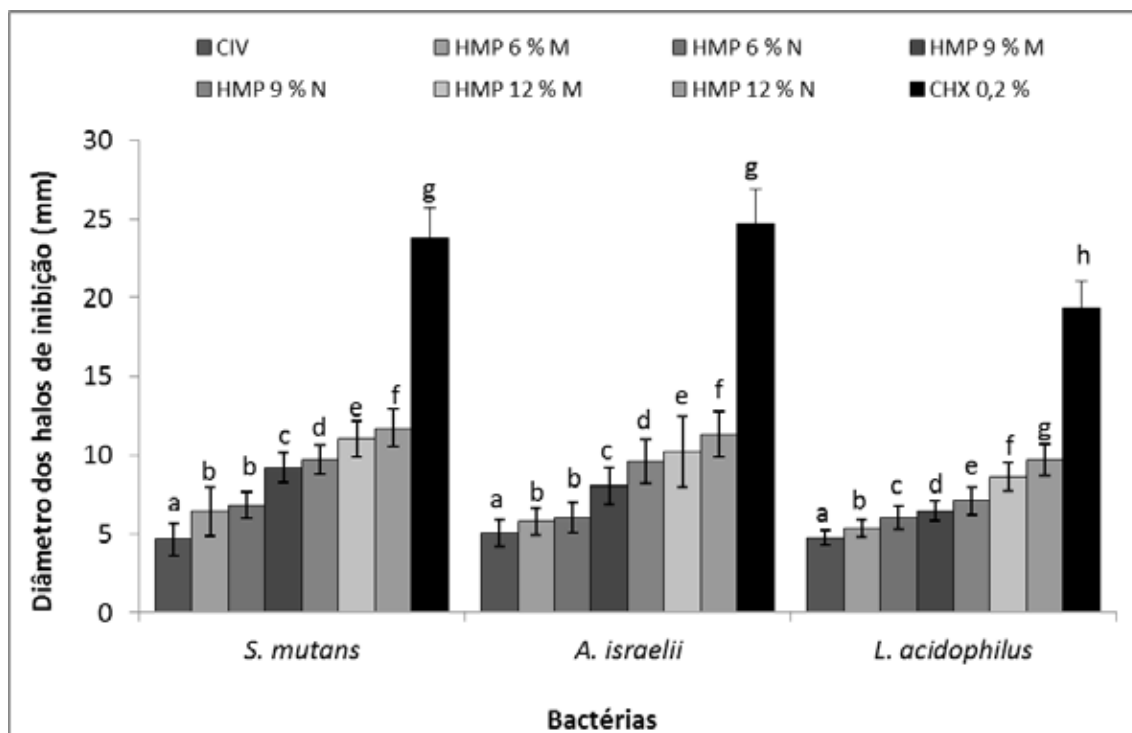


Fig. 2. Médias e desvio-padrão (barras) dos diâmetros dos halos de inibição de acordo com a bactéria e os CIVs. Letras distintas mostram diferenças estatísticas entre os CIVs para cada bactéria.

Com relação à liberação de F, os maiores valores ocorreram no primeiro dia em todos os grupos ($p < 0,05$) (Fig. 3). A média do fluoreto total liberado durante os 15 dias foi maior no grupo do HMP 12 % nanoparticulado ($p < 0,05$) seguido do HMP 9 % nanoparticulado ($p < 0,05$). A partir do terceiro dia todos os grupos apresentaram liberação constante (Fig. 3).

A análise da liberação de HMP total nas soluções de ciclagem pelos materiais mostrou que os grupos contendo HMP nanoparticulado apresentaram maiores valores ($p < 0,05$) quando comparados com os microparticulados (Fig. 4). As maiores médias de liberação do HMP ($p < 0,05$) ocorreram nos grupos contendo 9 e 12 % de HMP nanoparticulado sendo semelhantes entre si ($p > 0,05$). Todos os grupos apresentaram maior liberação de HMP no primeiro dia. A partir do segundo dia todos os grupos apresentaram liberação similar e constante.

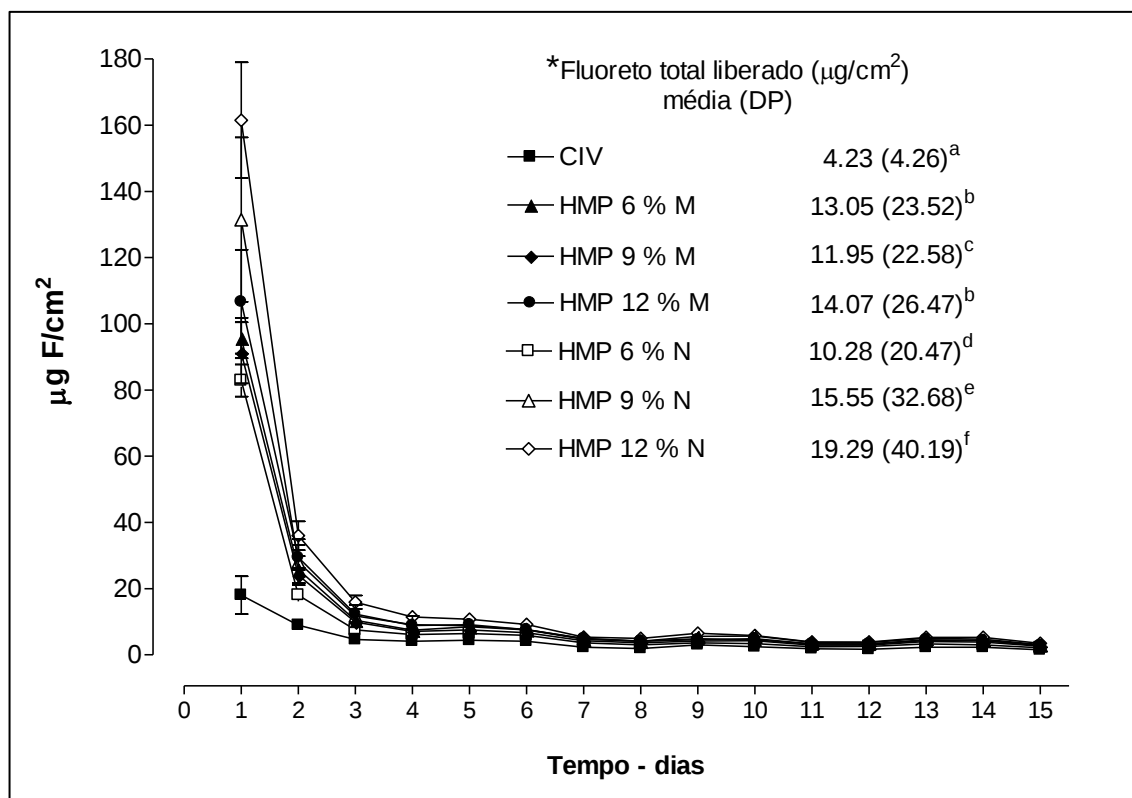


Fig. 3. Valores médios de fluoreto liberado nas soluções DES e RE em função do tempo (15 dias). Barras verticais mostram o desvio padrão da média. *Valores médios (DP) de fluoreto total liberado nas soluções DES e RE durante 15 dias. Letras distintas mostram diferença estatística entre os grupos.

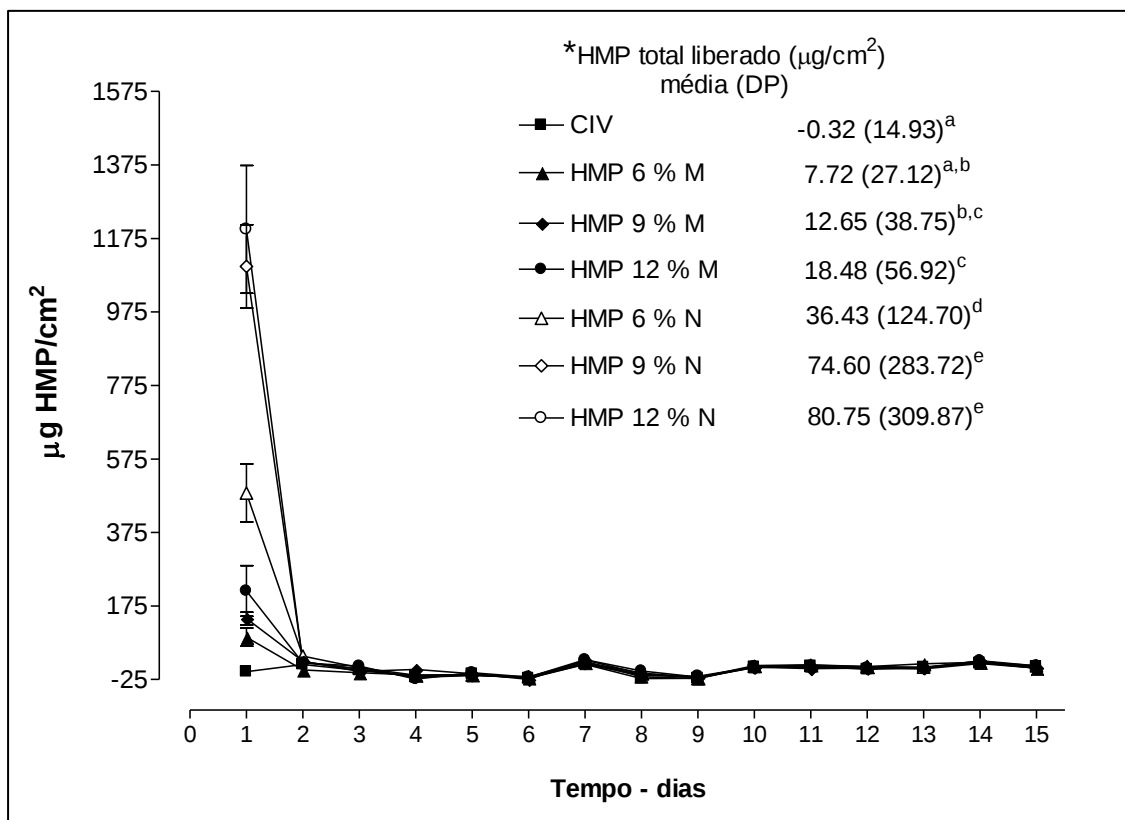


Fig. 4. Valores médios de HMP liberado nas soluções DES e RE em função do tempo (15 dias). Barras verticais mostram o desvio padrão da média. *Valores médios (DP) de HMP total liberado nas soluções DES e RE durante 15 dias. Letras distintas mostram diferença estatística entre os grupos.

Os ensaios mecânicos mostraram que a adição de HMP no material diminuiu a resistência à tração diametral ($p < 0,05$) quando comparado ao CIV (Fig. 5). A resistência foi maior no sétimo dia quando comparado ao primeiro dia ($p < 0,05$), com exceção das misturas contendo HMP nanoparticulado que não apresentaram diferença estatística. Houve uma correlação entre compressão e tração ($r = 0,851$, $p < 0,001$).

A adição de HMP no CIV leva a uma diminuição na resistência à compressão (Fig. 6) quando comparado ao CIV ($p < 0,05$). Relação dose-resposta foi observada apenas no tempo de 1 dia. Maior resistência à compressão foi verificada no sétimo dia quando comparada ao primeiro dia para todos os grupos estudados ($p < 0,05$). O HMP microparticulado levou a menores alterações na resistência à compressão quando comparado ao HMP nanoparticulado ($p < 0,05$).

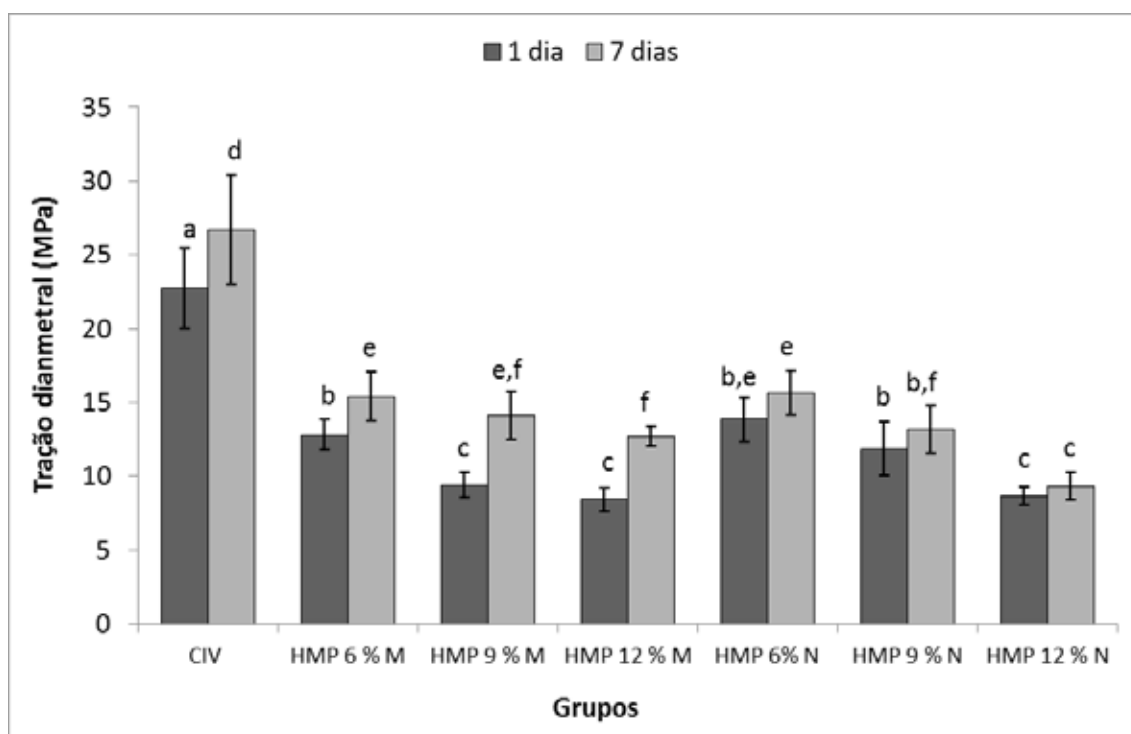


Fig. 5. Valores médios da resistência à tração diametral de acordo com os grupos. Letras distintas mostram diferença estatística entre os grupos e o tempo. Barras verticais mostram o desvio padrão da média.

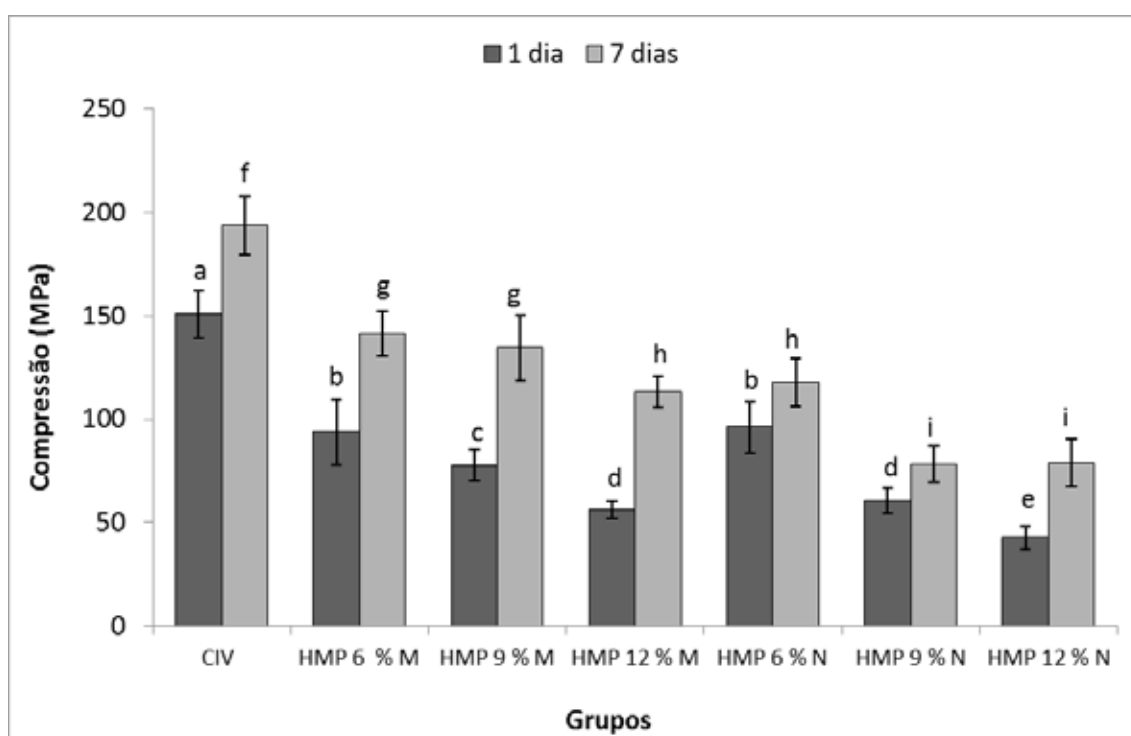


Fig. 6. Valores médios da resistência à compressão de acordo com os grupos. Letras distintas mostram diferença estatística entre os grupos e o tempo. Barras verticais mostram o desvio padrão da média.

A incorporação do HMP ao CIV reduziu os valores de dureza de superfície (Fig. 7) quando comparado ao CIV ($p < 0,05$). O aumento na porcentagem de HMP diminuiu a dureza de superfície ($p < 0,05$), exceto no primeiro dia para os grupos de HMP microparticulados. A dureza após 7 dias aumentou para todos os grupos ($p < 0,05$), com exceção do grupo de HMP 12 % nanoparticulado. Quanto ao tamanho das partículas, os grupos de HMP 6 e 9 % nanoparticulados apresentaram maior dureza quando comparado aos microparticulados, independente do tempo ($p < 0,05$). Houve uma correlação entre tração e dureza de superfície ($r = 0,770$, $p < 0,001$) e entre compressão e dureza ($r = 0,670$, $p < 0,001$).

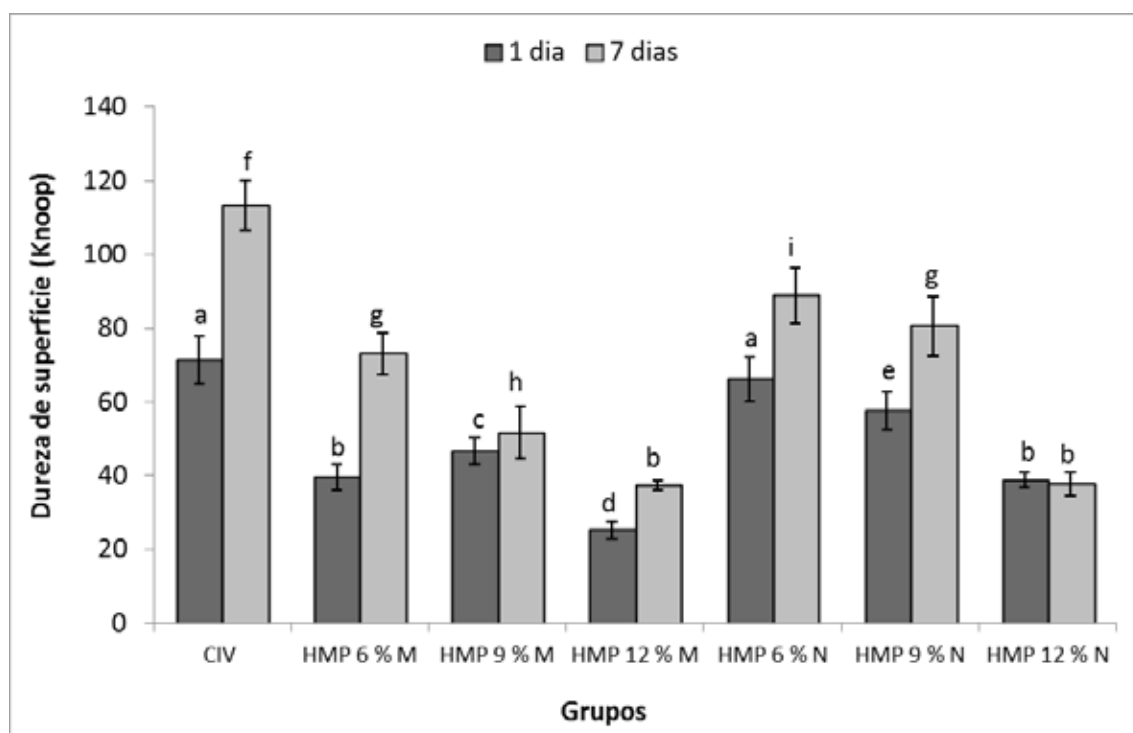


Fig. 7. Valores médios da dureza de superfície de acordo com os grupos. Letras distintas mostram diferença estatística entre os grupos e o tempo. Barras verticais mostram o desvio padrão da média.

A adição do HMP nas concentrações de 9 e 12 % reduziu o grau de conversão quando comparado ao CIV ($p < 0,05$), exceto no tempo de 1 dia e concentração de 12 % M (Fig. 8). Não houve diferença significativa entre o HMP microparticulado e nanoparticulado nos diferentes tempos de análise, considerando cada concentração. Houve uma correlação entre o grau de conversão e a compressão ($r = 0,392$, $p = 0,003$), a tração ($r = 0,490$, $p < 0,001$) e a dureza ($r = 0,414$, $p = 0,001$).

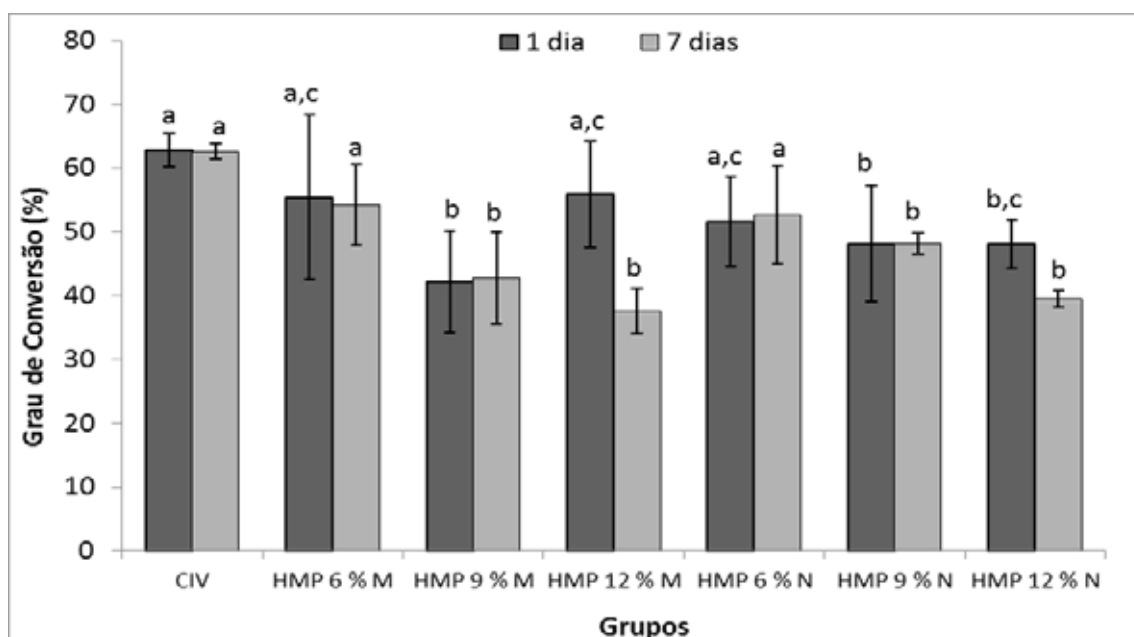


Fig. 8. Valores médios do grau de conversão dos monômeros de acordo com os grupos. Letras distintas mostram diferença estatística entre os grupos e o tempo. Barras verticais mostram o desvio padrão da média.

Discussão

A adição de novos compostos aos cimentos de ionômero de vidro visa à melhora nas suas propriedades antimicrobianas, anticárie e físico-mecânicas. No presente estudo, a incorporação de HMP micro ou nanoparticulado ao CIV aumentou sua atividade antimicrobiana e a liberação de fluoreto, porém diminuiu suas propriedades físico-mecânicas. Diante dos resultados obtidos a hipótese nula foi rejeitada.

A utilização do CIV na técnica de remoção parcial da cárie exige uma ação antimicrobiana do material com a finalidade de inviabilizar as bactérias presentes na dentina residual evitando a possibilidade de danos pulpares. No presente estudo, o HMP mostrou uma ação inibitória contra a maioria das bactérias cariogênicas estudadas (*Streptococcus mutans*, *Lactobacillus acidophilus* e *Actinomyces israeli*) nas concentrações de 6, 9 e 12 % (Fig. 1), sendo essas associadas ao CIV. A ação antimicrobiana apresentou uma relação dose-resposta, ou seja, quanto maior a concentração de HMP na solução, maior a atividade antimicrobiana. Ao ser incorporado ao CIV, o efeito antimicrobiano do HMP também foi dependente da concentração no material (Fig. 2). Provavelmente, a capacidade de liberar HMP apresentada pelos CIVs (Fig. 4) seja um dos fatores desse efeito, mas não o principal. Apesar da redução do tamanho das partículas aumentar em aproximadamente 400% a liberação de HMP, a atividade antimicrobiana foi entre 6 a 12% maior. Como HMP forma complexos com íons metálicos (Mg^{2+} , Ca^{2+} , K^+ , Al^+ , Fe^{3+}) [28, 29,30],

existe uma maior probabilidade de ligações deste fosfato com os íons Mg^{2+} presentes nas camadas superficiais das bactérias. O íon Mg^{2+} é importante para a manutenção da barreira de permeabilidade e para o transporte de glicose, e a formação de complexo com HMP aumentaria a morte bacteriana [31]. Assim, a maior reatividade das nanopartículas, em decorrência do maior número de átomos em sua superfície [22], teria maior reatividade com os íons Mg^{2+} que poderia explicar a melhor ação antimicrobiana dos CIVs com HMP nanoparticulado.

A adição de HMP ao CIV aumentou em média 230 % a liberação de fluoreto (Fig. 3) o que pode ter também contribuído com o efeito antimicrobiano [32, 33]. Como o HMP tem forte afinidade com íons metálicos [28-30], durante a aglutinação do pó e líquido, o cálcio e o alumínio reagiriam com o HMP reduzindo a reação destes íons com o fluoreto [34]. Assim, o fluoreto estaria mais disponível para ser liberado podendo aumentar o efeito na remineralização da dentina cariada residual [32, 33] e na presença do HMP este efeito pode ser melhorado [20]. Entretanto, propriedades mecânicas diminuídas também estão associadas com aumento na liberação de F [35].

Apesar de o HMP ter levado a uma melhora na atividade antimicrobiana e na liberação de fluoreto, essa incorporação resultou em uma diminuição nas propriedades mecânicas, mesmo após sete dias. Os CIVs aumentam suas propriedades mecânicas com o passar do tempo, e isto é atribuído à reação ácido-base tardia que ocorre com o material [36]. A maioria dos valores disponíveis na literatura para tração (15,7 – 35,9 MPa) [37-40], compressão (137,7 – 228,2 MPa) [38-41] e dureza (64,7 – 89,4 KHN) [42, 43] foram analisados após 1 dia de armazenamento. Os valores obtidos no presente estudo (Figs. 5, 6 e 7) para o CIV apresentam-se dentro da variação para este material. Com a adição do HMP houve uma redução de 52% (tração), 52% (compressão) e 36% (dureza), após 1 dia e de 50%, 43% e 46%, após 7 dias. Alterações nas composições do pó e na relação pó-líquido podem ser responsáveis pelo aumento do tempo de endurecimento e decréscimo na resistência à compressão e tração diametral [44].

A capacidade de formar complexos aos cátions durante a reação ácido-base também pode ter influenciado as propriedades mecânicas do material já que após 7 dias não houve uma melhora em relação ao CIV. A relação dose-resposta da concentração de HMP e a forte correlação [45] entre as análises de compressão, tração e dureza apontam o efeito do HMP sobre a reação ácido-base como a causa mais provável nas alterações das propriedades mecânicas. Como o ionômero de vidro estudado apresenta monômeros em sua composição, a reação de polimerização destes pode influenciar as propriedades mecânicas do material [46]. Porém, a conversão dos monômeros não se alterou entre os

tempos de análise, com exceção do primeiro dia para 12% microparticulado (Fig. 8), indicando que a melhora das propriedades mecânicas dos CIVs ao longo do tempo foi praticamente dependente da reação ácido-base e influenciada pela adição de HMP. Apesar de haver correlação entre o grau de conversão dos monômeros e as análises de compressão, tração e dureza, esta foi moderada. Isto pode indicar que o HMP influenciou o grau de conversão e este efeito ocorreu durante o processo de fotopolimerização. Consequentemente, pode ter contribuído com uma baixa propriedade mecânica dos CIVs no primeiro dia, principalmente nas concentrações maiores de HMP. É importante saber que o ionômero utilizado no presente estudo é constituído por ácidos poliacrílicos com caráter bifuncional, isto é, possuem grupamentos carboxílicos (COO^-) em uma das extremidades e grupamentos metacrilatos [$\text{CH}_2=\text{C}-(\text{CH}_3)$] na outra. A hipótese seria que a redução da reação do grupo carboxílico às partículas de carga (silicato de alumínio) pode influir na polimerização do grupamento metacrilato, principalmente quando há muito grupamento carboxílico livre.

Os resultados mostram que a adição do HMP ao CIV aumenta a atividade antimicrobiana e a liberação de fluoreto, na qual pode ser altamente efetivo para prevenir o desenvolvimento e a progressão de lesões cariosas após sua parcial remoção, porém reduz suas propriedades físico-mecânicas. São necessários estudos adequando a concentração de HMP e componentes dos CIVs com a finalidade de minimizar as alterações físico-mecânicas do material. Também testar a solubilidade e a adesividade, pois a presença do HMP pode disponibilizar uma maior quantidade de grupamento carboxílico livre para se ligar aos tecidos dentais o que poderia aumentar a adesão do material, mas aumentar sua solubilidade. Somando-se a isto verificar se a maior liberação de fluoreto associado a grande disponibilidade de HMP reduz a desmineralização e aumenta a remineralização das estruturas dentárias.

De acordo com as condições testadas, pode-se concluir que a incorporação de HMP no CIV melhora a atividade antimicrobiana e aumenta a liberação de fluoreto, porém reduz suas propriedades físico-mecânicas. A redução das partículas de HMP levou a melhores resultados antimicrobianos e de liberação de fluoreto.

Referências

1. Bjørndal L, Larsen T (2000) Changes in the cultivable flora in deep carious lesions following a stepwise excavation procedure. *Caries Res* 34:502–508
2. Maltz M, Oliveira EF, Fontanella V, Carminatti G (2007) Deep caries lesions after incomplete dentine caries removal: 40-month follow-up study. *Caries Res* 41:493–496
3. Massara ML, Alves JB, Brandao PR (2002) Atraumatic restorative treatment: clinical, ultrastructural and chemical analysis. *Caries Res* 36:430–436
4. Oliveira EF, Carminatti G, Fontanella V, Maltz M (2006) The monitoring of deep caries lesions after incomplete dentine caries removal: results after 14-18 months. *Clin Oral Invest* 10:134–139
5. Duque C, Negrini TC, Sacomo NT, Spolidorio DMP, Costa CAS, Hebling J (2009) Clinical and microbiological performance of resin-modified glass-ionomer liners after incomplete dentine caries removal. *Clin Oral Invest* 13:465–471
6. Pinto AS, Araujo FB, Franzon R, Figueiredo MC, Henz S, Garcia-Godoy F (2006) Clinical and microbiological effect of calcium hydroxide protection in indirect pulp capping in primary teeth. *Am J Dent* 19:382–387
7. Weerheijm KL, Kreulen CM, de Soet JJ, Groen HJ, van Amerongen WE (1999) Bacterial counts in carious dentine under restorations: 2-year in vivo effects. *Caries Res* 33:130–134
8. Gruythuysen R, van Strijp G, Wu MK (2010) Long-term survival of indirect pulp treatment performed in primary and permanent teeth with clinically diagnosed deep carious lesions. *J Endod* 36:1490–1493
9. Carvalho AS, Cury JA (1999) Fluoride release from some dental materials in different solutions. *Oper Dent* 24:14–19
10. Preston AJ, Mair LH, Agalamanyi EA, Higham SM (1999) Fluoride release from aesthetic dental materials. *J Oral Rehabil* 26:123–129
11. Karantakis P, Helvatjoglou-Antoniades M, Theodoridou-Pahini S, Papadogiannis Y (2000) Fluoride release from three glass ionomers, a compomer, and a composite resin in water, artificial saliva, and lactic acid. *Oper Dent* 25:20–25
12. Silva KG, Pedrini D, Delbem ACB, Cannon M (2007) Microhardness and fluoride release of restorative materials in different storage media. *Braz Dent J* 18:309–313

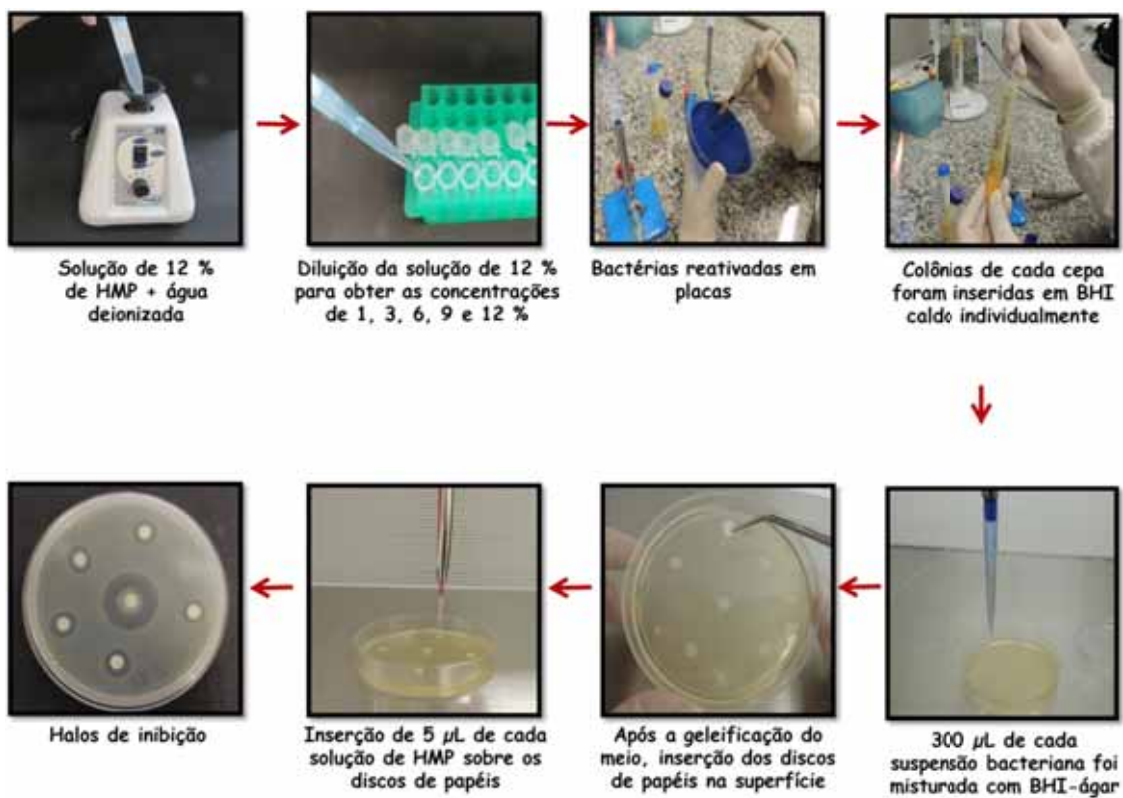
13. Tiveron ARF, Delbem ACB, Gaban G, Sassaki KT, Pedrini D (2013) Effect of resin composites with sodium trimetaphosphate with or without fluoride on hardness, ion release and enamel demineralization. *Am J Dent* 26:201–206
14. Barbour ME, Shellis RP, Parker DM, Allen GC, Addy M (2008) Inhibition of hydroxyapatite dissolution by whole casein: the effects of pH, protein concentration, calcium, and ionic strength. *Eur J Oral* 116:473–478
15. Städtler P, Müller-Bruckschwaiger K, Schäfer F, Huntington E (1996) The effect of sodium trimetaphosphate on caries: a 3-year clinical toothpaste trial. *Caries Res* 30:418–422
16. Takeshita EM, Castro LP, Sassaki KT, Delbem AC (2009) *In vitro* evaluation of dentifrice with low fluoride content supplemented with trimetaphosphate. *Caries Res* 43:50–56
17. Takeshita EM, Exterkate RAM, Delbem ACB, ten Cate JM (2011) Evaluation of different fluoride concentrations supplemented with trimetaphosphate on enamel De- and Remineralization in vitro. *Caries Res* 45:494–497
18. Vaara M (1992) Agents that increase the permeability of the outer membrane. *Microbiol Rev* 56:395–411
19. da Camara DM, Miyasaki ML, Danelon M, Sassaki KT, Delbem AC (2014) Effect of low-fluoride toothpastes combined with hexametaphosphate on in vitro enamel demineralization. *J Dent* 42:2562–62
20. de Castilho AR, Duque C, Negrini TC, Sacono NT, de Paula AB, de Souza Costa CA, Spolidório DM, Puppim-Rontani RM (2013) In vitro and in vivo investigation of the biological and mechanical behaviour of resin-modified glass-ionomer cement containing chlorhexidine. *J Dent* 41:155–163. doi: 10.1016/j.jdent.2012.10.014
21. Ferreira JM, Pinheiro SL, Sampaio FC, Menezes VA (2013) Use of glass ionomer cement containing antibiotics to seal off infected dentin: a randomized clinical trial. *Braz Dent J* 24:68–73
22. Xu HH, Weir MD, Sun L, Moreau JL, Takagi S, Chow LC, Antonucci JM (2010) Strong nanocomposites with Ca, PO₄, and F release for caries inhibition. *J Dent Res* 89:19–28
23. Hook ER, Owen OJ, Bellis CA, Holder JA, O’Sullivan DJ, Barbour ME (2014) Development of a novel antimicrobial-releasing glass ionomer cement functionalized with chlorhexidine hexametaphosphate nanoparticle. *J Nanobiotechnology* 12:3. doi: 10.1186/1477-3155-12-3

24. Danelon M, Camara DM, Miyasaki ML, Scarpa JB, Delbem ACB, Sasaki KT (2012) Effect of fluoride gels supplemented with hexametaphosphate in inhibiting demineralization. *J Dent Res* 91 (Sp Iss B): 162761
25. Duque C, Negrini TC, Hebling J, Spolidorio DM (2005) Inhibitory activity of glass-ionomer cements on cariogenic bacteria. *Oper Dent* 30:636–6340
26. Silva KG, Pedrini D, Delbem ACB, Cannon M (2007) Effect of pH variations in a cycling model on the properties of restorative materials. *Oper Dent* 32:328–335
27. Fiske CH, Subbarow Y (1925) The colorimetric determination of phosphorus. *J Biol Chem* 66:375–400
28. Kura G, Ohashi S, Kura S (1974) Complex formation of cyclic phosphate anions with bivalent cations. *J Inorg Nucl Chem* 36:1605–1609
29. Choi IK, Wen WW, Smith RW (1993) Technical note the effect of a long chain phosphate on the adsorption of collectors on kaolinite. *Miner Eng* 6:1191–1197
30. Changgen L, Yongxin L (1983) Selective flotation of scheelite from calcium minerals with sodium oleate as a collector and phosphates as modifiers. II. The mechanism of the interaction between phosphate modifiers and minerals. *Int J of Miner Process* 10:219–235
31. Shibata H, Morioka T (1982) Antibacterial action of condensed phosphates on the bacterium *Streptococcus mutans* and experimental caries in the hamster. *Arch Oral Biol* 27:809–816
32. Donly KJ, Gomez C (1994) In vitro demineralization-remineralization of enamel caries at restoration margins utilizing fluoride-releasing composite resin. *Quint Int* 25:355–358
33. Forss H, Jokinen J, Spets-Happonen S, Seppa L, Luoma H (1991) Fluoride and mutans streptococci in plaque grown on glass-ionomer and composite. *Caries Res* 25:454–458
34. Crisp S, Pringuer MA, Wardlerworth D, Wilson AD (1974) Reactions in glass ionomer cements: II. An infrared spectroscopic study. *J Dent Res* 53:1414–1419
35. Khouw-Liu VH, Anstice HM, Pearson GJ (1999) An *in vitro* investigation of a poly (vinyl phosphonic acid) based cement with four conventional glass-ionomer cements. Part 1: Flexural strength and fluoride release. *J Dent* 27:351–357
36. De Gee AJ (1999) Physical properties of glass-ionomer cements: setting shrinkage and wear. In: Davidson CL, Mjor IA (ed) *Advances in glass-ionomer cements*. Quintessence, Illinois, pp51–65

37. Valarelli EP (1997) Effect of time on the diametral tensile strength of resin-modified restorative glass-ionomer cements. *J Dent. Res* 76 (Sp Iss):423. Abstract n. 3274
38. Xie D, Chung ID, Wu W, Mays J (2004) Synthesis and evaluation of HEMA-free glass-ionomer cements for dental applications. *Dent Mater* 20:470–478
39. Kerby RE, Knobloch L, Thakur A (1997) Strength properties of visible-light-cured resin-modified glass-ionomer cements. *Oper Dent* 22:79–83
40. Xie D, Zhao J, Park JG (2007) A novel light-cured glass-ionomer system for improved dental restoratives. *J Mater Sci Mater Med* 18:1907–1916
41. Musa A, Pearson GJ, Gelbier M (1996) In vitro investigation of fluoride ion release from four resin-modified glass polyalkenoate cements. *Biomaterials* 17:1019–1023
42. Mobarak E, Elsayad I, Ibrahim M, El-Badrawy W (2009) Effect of LED light-curing on the relative hardness of tooth-colored restorative materials. *Oper Dent* 34:65–71. doi: 10.2341/08-38
43. Cefaly DF, de Mello LL, Wang L, Lauris JR, D'Alpino PH (2009) Effect of light curing unit on resin-modified glass-ionomer cements: a microhardness assessment. *J Appl Oral Sci* 17:150–154
44. Al Zraikat H, Palamara JE, Messer HH, Burrow MF, Reynolds EC (2011) The incorporation of casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate into a glass ionomer cement. *Dent Mater* 27:235–243
45. Dancey CP, Reidy J (2011) *Statistics without maths for psychology*. 5th edn. Pearson, London. 620p.
46. Soh MS, Yap AU, Siow KS (2003) The effectiveness of cure of LED and halogen curing lights at varying cavity depths. *Oper Dent* 28:707–715

ANEXO A

Teste de difusão em ágar com discos



ANEXO B

Preparo do hexametafosfato de sódio microparticulado

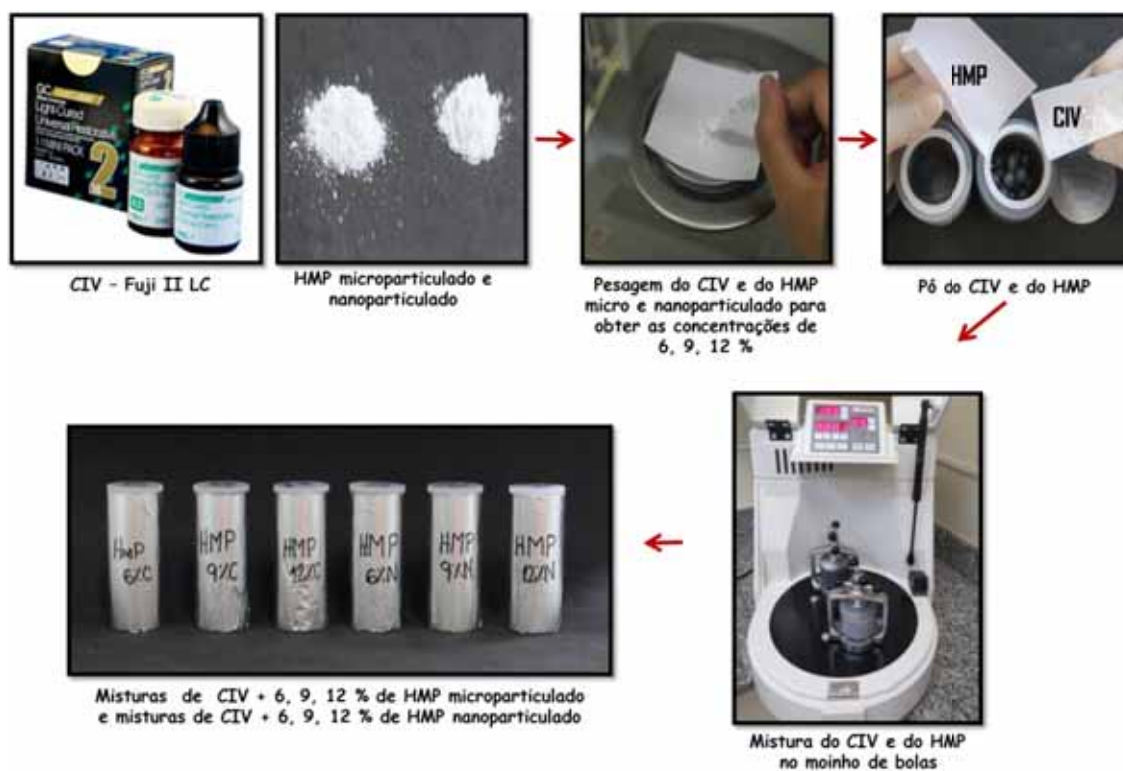


Preparo do hexametafosfato de sódio nanoparticulado



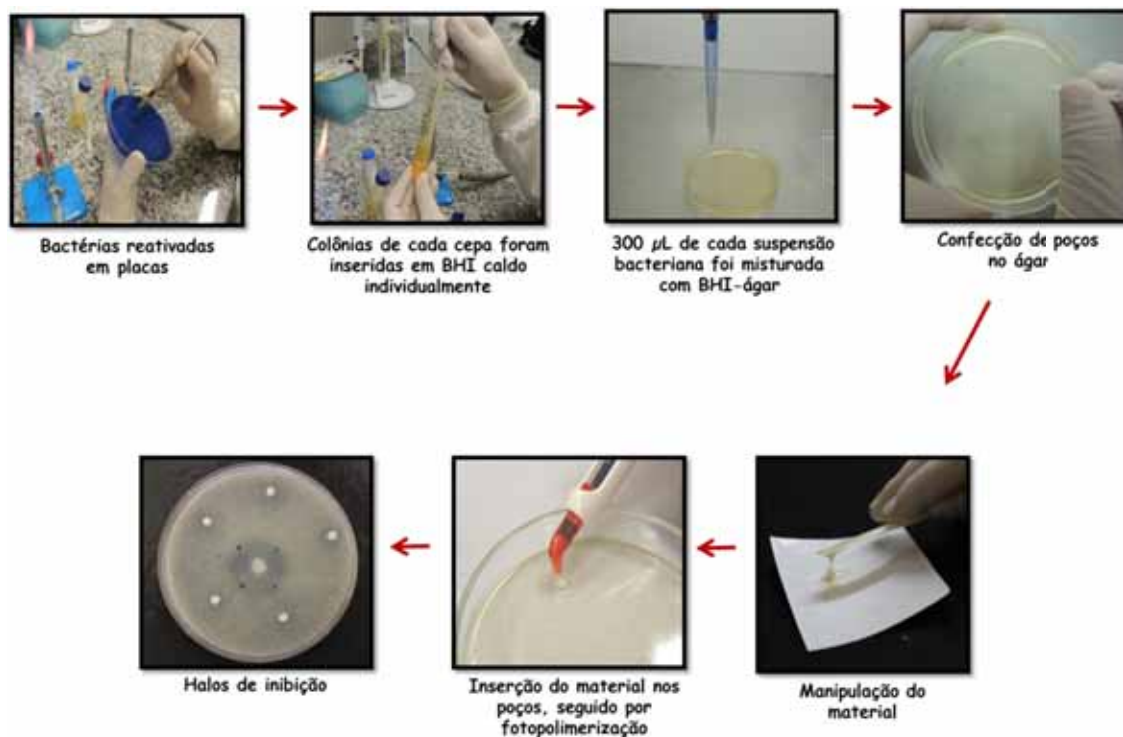
ANEXO C

Preparo do cimento de ionômero de vidro



ANEXO D

Teste de difusão em ágar com CIVs



ANEXO E

Liberação de F e HMP dos materiais



CICLAGEM DOS MATERIAIS PARA DOSAR AS CONCENTRAÇÕES DE F E HMP DAS SOLUÇÕES DES E RE



ANEXO F

Análise da liberação de F dos materiais

Dosagem de fluoreto das soluções DES e RE



Eletrodo específico
combinado para íon fluoreto



Soluções padrão para calibração
do eletrodo



Para as dosagens foram pipetadas
0,5 mL das soluções de DES ou RE
+ 0,5 mL de TISAB II



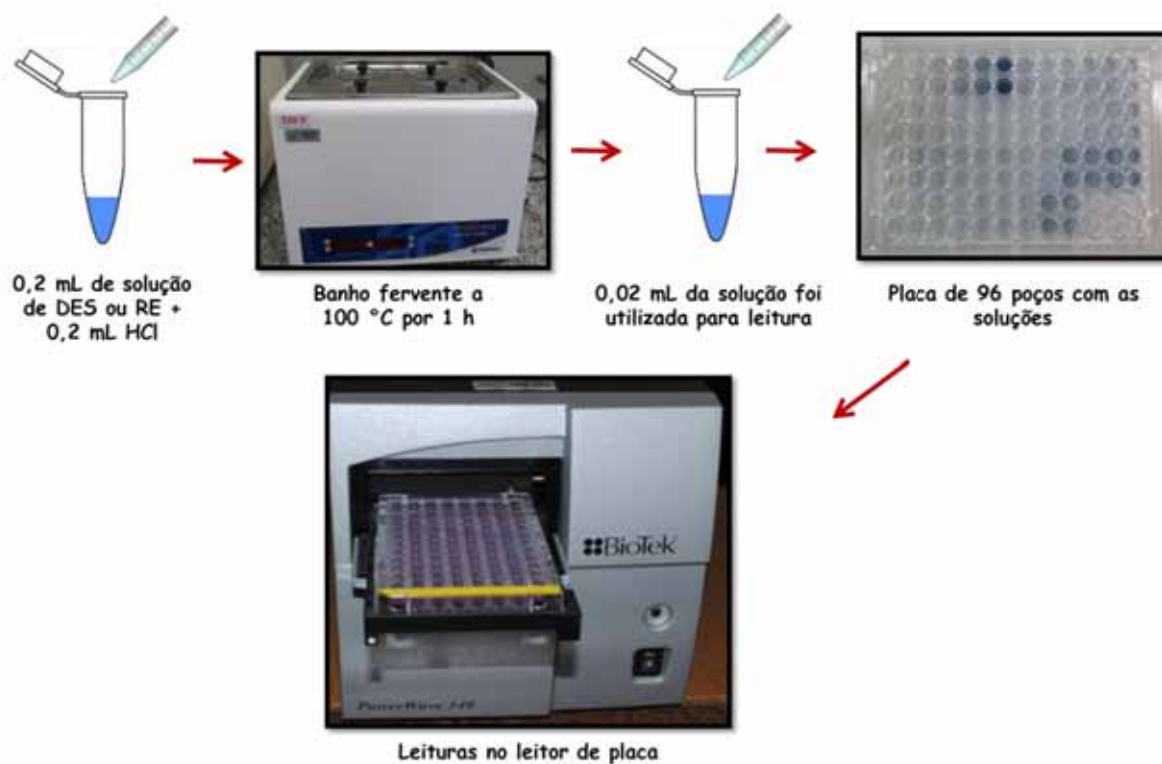
Leituras realizadas sob agitação
constante



ANEXO G

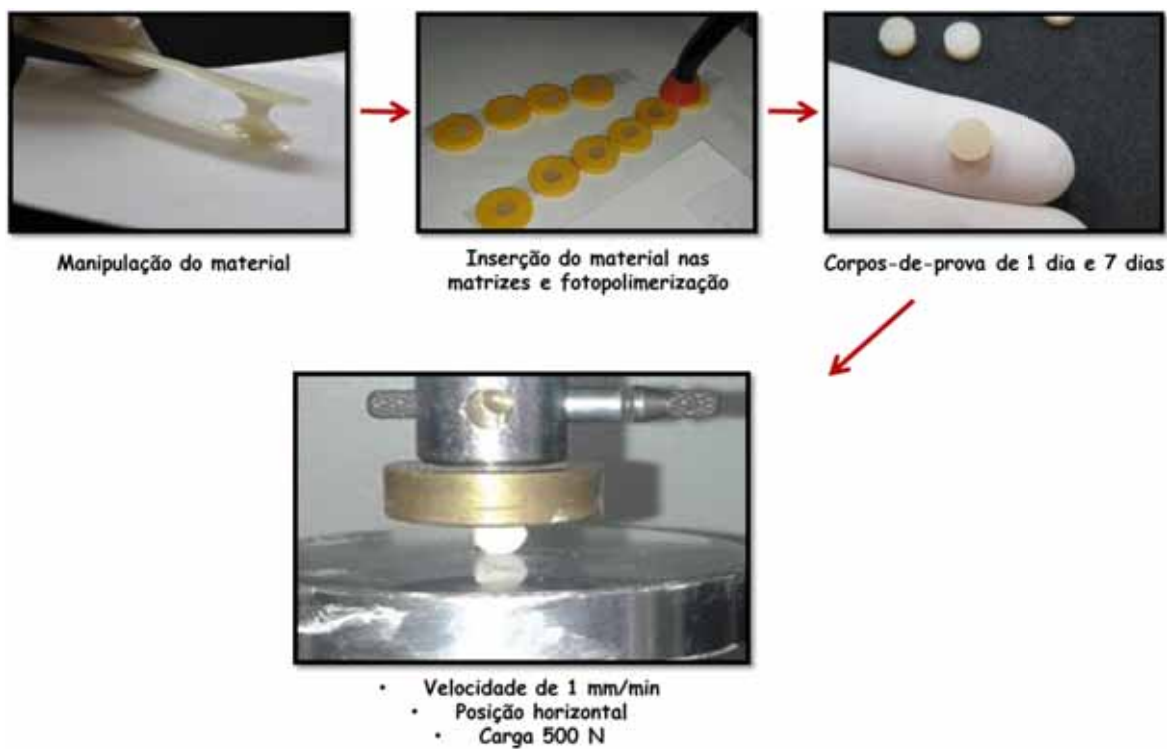
Análise da liberação de HMP dos materiais

Dosagem de HMP das soluções DES e RE



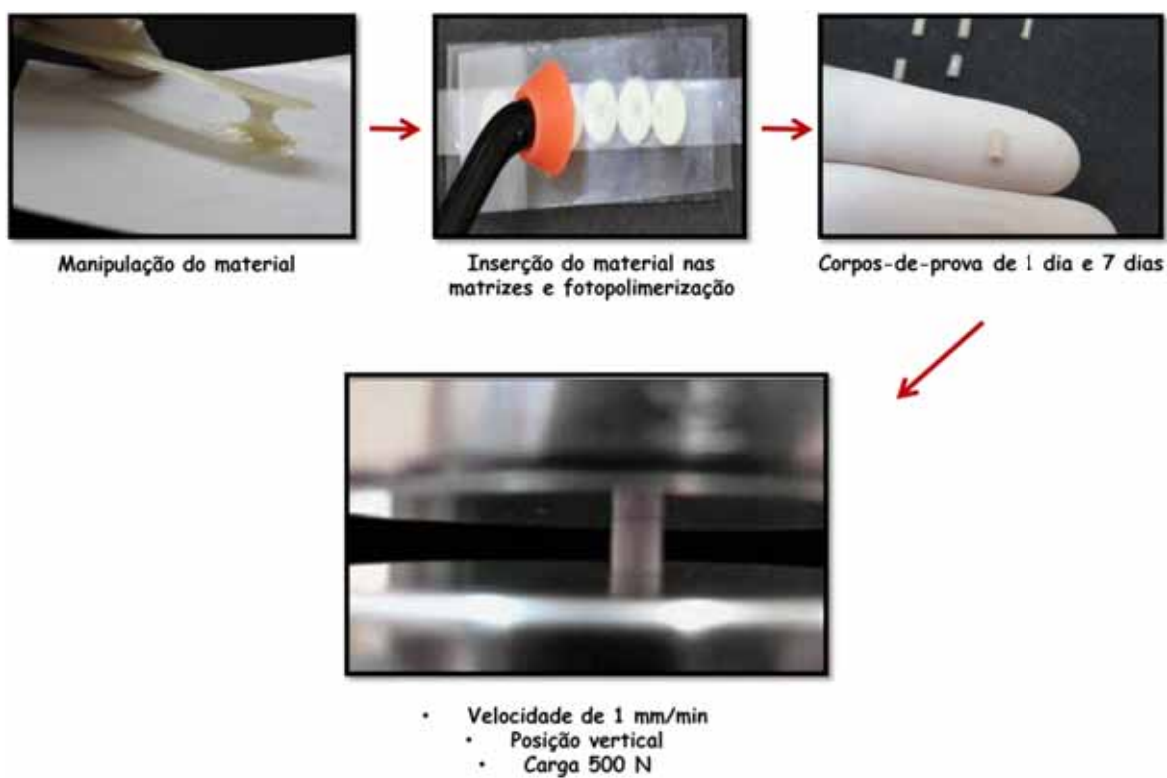
ANEXO H

Teste de tração diametral



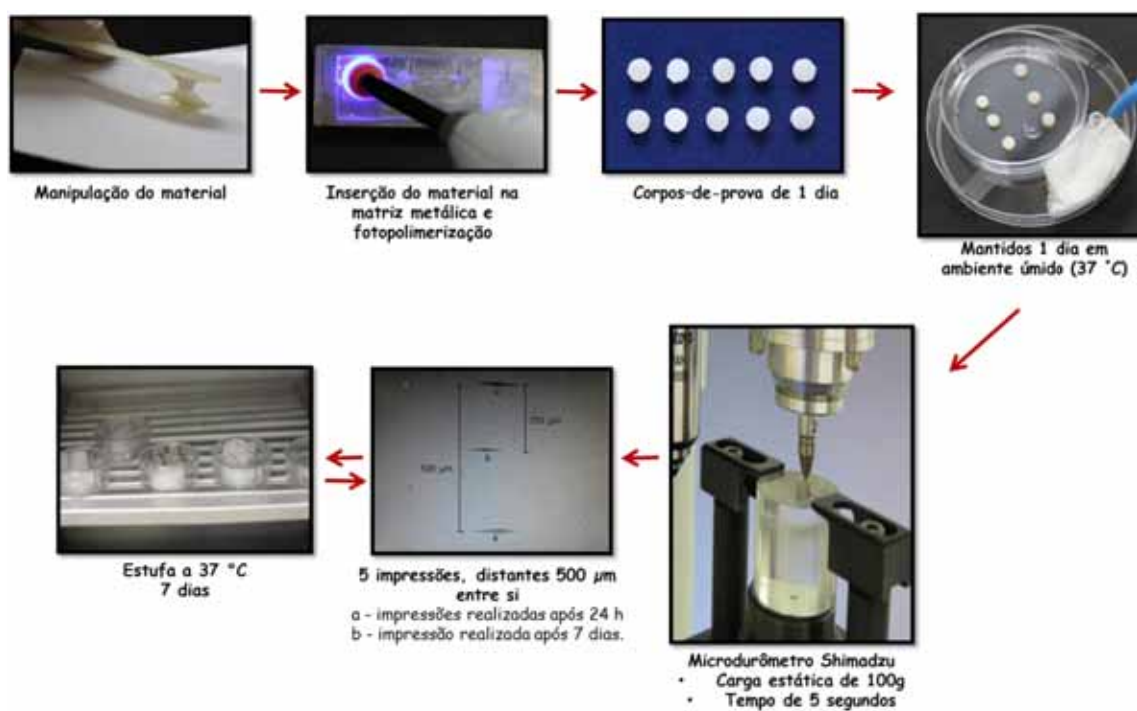
ANEXO I

Teste de compressão



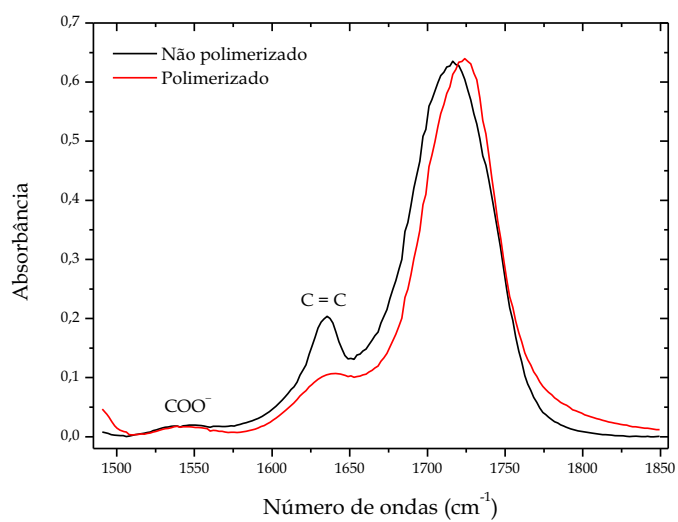
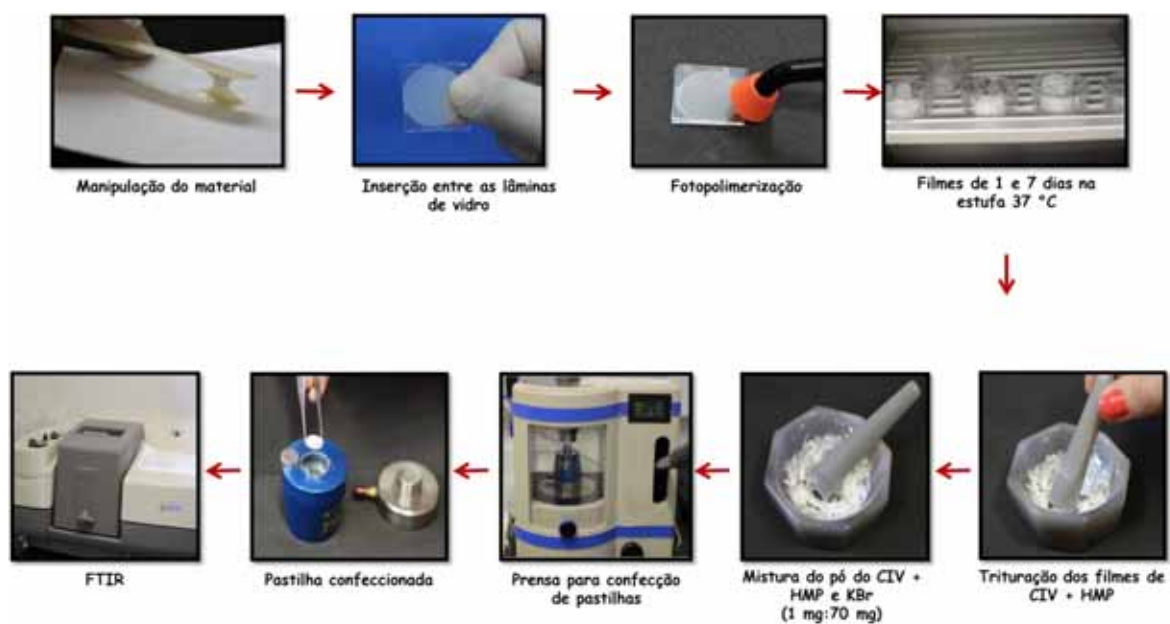
ANEXO J

Teste de dureza de superfície dos materiais



ANEXO K

Determinação do grau de conversão dos monômeros dos CIVs



Região espectral mostrando as duas bandas de absorções utilizadas para estudar o grau de conversão.