

Letícia Gonçalves Oliveira Menezes

**Avaliação das propriedades bioativas, microbiológicas e
físico-mecânicas de cimentos de ionômero de vidro
modificados com trimetafosfato de sódio e nanopartículas
de óxido de zinco: estudo *in vitro***

Araçatuba – SP
2024

Letícia Gonçalves Oliveira Menezes

Avaliação das propriedades bioativas, microbiológicas e físico-mecânicas de cimentos de ionômero de vidro modificados com trimetafosfato de sódio e nanopartículas de óxido de zinco: estudo *in vitro*

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

Menezes, Letícia Gonçalves Oliveira.

M543a Avaliação das propriedades bioativas, microbiológicas e físico-mecânicas de cimentos de ionômero de vidro modificados com trimetafosfato de sódio e nanopartículas de óxido de zinco: estudo in vitro / Letícia Gonçalves Oliveira Menezes. - Araçatuba, 2024
76 f. : il. ; tab.

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

1. Cimento de ionômero de vidro 2. Fosfatos 3. Nanopartículas 4. Óxido de zinco 5. Dureza 6. Propriedades de superfície 7. Biofilmes I. T.

Black D27
CDD 617.645

Claudio Hideo Matsumoto – CRB-8/5550

Dados Curriculares

Letícia Gonçalves Oliveira Menezes

Nascimento	22.11.1997 – Piumhi – MG
Filiação	José Elias de Oliveira Ana Rosa Gonçalves Oliveira
2017/2021	Curso de Graduação em Odontologia pela Universidade de Ribeirão Preto – SP
2022/2024	Desenvolvimento de Projeto de Mestrado com auxílio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).
Associações	CROSP - Conselho Regional de Odontologia de São Paulo. SBPqO - Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica.

Dedicatória

Letícia Gonçalves Oliveira Menezes

Dedico este trabalho,

Ao meu marido Leonardo,

Que sempre está ao meu lado me incentivando, me encorajando, demonstrando muito amor e carinho. Meu apoio e força para toda e qualquer situação da vida. Obrigada por existir. Te amo imensamente.

Ao meu filho Isaque,

Que esteve comigo nessa caminhada, em algumas viagens para execução dos experimentos e após o seu nascimento, ao meu lado para a condução desse trabalho. Obrigada pela companhia em todo o tempo. Amo você.

Agradecimentos Especiais

Leticia Gonçalves Oliveira Menezes

A Deus,

Que por sua graça imerecida cuidou de cada detalhe dessa trajetória, agradeço pelas pessoas maravilhosos que colocou na minha vida, pelas viagens e pela experiência desafiadora e maravilhosa que a pesquisa me concedeu.

Aos meus pais José e Ana,

Obrigada pelo amor e apoio. Vocês foram essenciais nesse trajeto, pois sempre confiaram que eu seria capaz de chegar ao final. É muito bom saber que posso contar com vocês em todos os momentos.

Aos meu sogros Leví e Roseli,

Vocês foram abrigo durante a minha jornada, apoiaram minhas escolhas e estiveram prontos para me ajudar. Obrigada pelas orações.

A toda família e amigos,

Obrigada pela força, pelo apoio e pelos momentos de descontração. Deus os abençoe e retribua pelas palavras de carinho e confiança.

A minha Orientadora,

Professora Dra. Marcelle Danelon,

Por ter me aceitado como orientada e por todos os ensinamentos, dedicação, paciência e compreensão. Por ter me ensinado a acreditar

que tudo é possível. Por estar ao meu lado desde o início da graduação até aqui, me ajudando a crescer como profissional e pessoa, a ser mais criteriosa e dedicada. Deus abençoe pela dedicação e amor. Desejo que todos os seus planos e projetos se realizem e sempre estarei torcendo.

Aos docentes das Disciplinas da Pós-graduação

Obrigada por transmitir a experiência e o conhecimento que transcendem a Faculdade. Cada um dos professores que tive a oportunidade de conhecer e aprender tiveram uma papel importante na minha vida como discente.

Aos amigos da Pós-graduação,

Francienne, pela ajuda nas etapas da pesquisa, obrigada pelo carinho e paciência. **Gabriela e Gabrielle**, obrigada pelo convívio durante as viagens para desenvolvimento da pesquisa, foram momentos de muito aprendizado e risadas, com certeza vocês fizeram essa jornada mais leve.

Laura e Evelyn, muito obrigada pela amizade construída durante esse tempo mesmo estando a quilômetros de distância vocês se fizeram presentes. Amigos de outra Faculdade: **Analú**, grata por todo carinho e competência que foram dispensados durante a execução de uma grande parte da pesquisa. Você é um exemplo de pessoa e profissional. Estarei sempre torcendo por você. **Antônio**, obrigada pelo carinho e paciência durante a orientação do experimento.

A Professora Andréa Simone Stucchi de Camargo A. Bernardes e Drº Leandro Piaggi Ravaró,

Do Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, SP, Brasil pelo apoio na síntese e caracterização das nanopartículas de óxido de zinco.

Ao Professor João Carlos Síllos Moraes,

Por ceder gentilmente o aparelho FTIR para realização do teste de grau de conversão de monômeros, no laboratório de Física e Química da Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira – UNESP. Agradeço a dedicação, paciência e os ensinamentos.

A Professora Fernanda Lourenção Brighenti,

Da Faculdade de Odontologia de Araraquara – FOAr/UNESP, por ter apoiado a realização das análises antimicrobianas no Laboratório de pesquisa bioquímica e microbiológica.

A Professora Larissa Moreira Spínola de Castro Raucí,

Da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – FORP/USP, por ter apoiado a realização dos experimentos de citotoxicidade no Laboratório Cultura de Células e Biologia Molecular.

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. Titular Alberto Carlos Botazzo Delbem, digníssimo Diretor e Prof. Associado 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.

A Empresa GC® Corporation

Pela disponibilidade dos cimentos de ionômero de vidro para realização da pesquisa.

Ao Team Danelon,

Obrigada meninas por sempre estarem dispostas a ajudar, vocês fazem toda diferença no Team Danelon.

A aluna de Iniciação Científica Beatriz Aíub,

Pelo envolvimento no projeto e ajuda durante a execução dos experimentos.

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

Pela concessão de recursos (Processos: 2021/10742-0 e 2022/08068-2) para a aluna de Iniciação Científica Beatriz Aiub e a mim.

Epígrafe

*“Tu és o meu Deus; graças te darei! Ó meu
Deus, eu te exaltarei! Deem graças ao
Senhor, porque ele é bom; o seu amor dura
para sempre.”*

Salmo 118: 28-29

Resumo

Leticia Gonçalves Oliveira Menezes

Menezes, LGO. **Avaliação das propriedades bioativas, microbiológicas e físico-mecânicas de cimentos de ionômero de vidro modificados com trimetafosfato de sódio e nanopartículas de óxido de zinco: estudo *in vitro***. 2024 76f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba 2024.

Objetivo: Avaliar o efeito da incorporação de nanopartículas de óxido de zinco (ZnONPs) e micropartículas de trimetafosfato de sódio (TMP) em cimento de ionômero de vidro modificado por resina (CIVMR), sobre as propriedades físico-mecânicas, microbiológicas e citotóxicas. **Material e métodos:** Foram confeccionados corpos-de-prova (n=6): 1) CIVMR sem ZnONPs/TMP (CIVMR, Fuji II LC); 2) CIVMR-1,0%ZnONPs; 3) CIVMR-2,0%ZnONPs; 4) CIVMR-14,0%TMP; 5) CIVMR-1,0%ZnONPs-14,0%TMP e 6) CIVMR-2,0%ZnONPs-14,0%TMP. Determinou-se a Resistência à Tração e Compressão (RT e RC), Dureza de Superfície (DS) após 24 horas/7 dias, Rugosidade de Superfície (RS) e Porcentagem do Grau de Conversão dos Monômeros (%GC) após 24 horas. Para a liberação de fluoreto (F), corpos de prova foram imersos em solução desmineralizadora (6 horas) e remineralizadora (18 horas) por 15 dias. A atividade antimicrobiana/antibiofilme foi avaliada pelo teste de adesão, crescimento de biofilme e avaliação do metabolismo do biofilme (XTT) (*S. mutans*, UA159) respectivamente. Já a análise da Citotoxicidade foi determinada pelo método da resazurina sobre a linhagem de Odontoblastos MDPC23. Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), seguido pelo teste Student-Newman-Keuls ($p < 0,001$). **Resultados:** A RC para o grupo CIVMR-2,0%ZnONPs foi superior em 22,5% quando comparado ao CIVMR no período de 24 horas ($p < 0,001$); no período de 7 dias o grupo CIVMR-2,0%ZnONPS-14,0%TMP foi superior ao CIVMR em 23,4% ($p < 0,001$). Após 7 dias, para os dados de RT, todos os grupos apresentaram valores similares entre si ($P > 0,001$), exceto o grupo CIVMR-2,0%ZnONPs-14,0%TMP o qual foi superior em 37% e 55,4% em relação ao CIVMR e CIVMR-14,0%TMP, respectivamente ($p < 0,001$). Na análise da DS (KHN), após as 24 horas, observou-se que o grupo CIVMR-2,0%ZnONPs-14,0%TMP apresentou o maior valor quando comparado aos demais grupos ($p < 0,001$). Os dados de RS mostram similaridade para todos os grupos assim como para %GC ($p > 0,001$). A maior liberação de F, após 15 dias, foi verificada para o grupo CIVMR-2,0%ZnONPs-14,0%TMP ($p < 0,001$). O maior efeito na redução da viabilidade bacteriana foi observado para o grupo CIVMR-2,0%ZnONPs-14,0%TMP ($p < 0,001$). Para análise da citotoxicidade, no tempo de 24 horas, o grupo CIVMR-1,0%ZnONPs-14,0%TMP foi o que

apresentou a melhor citocompatibilidade, apresentando superioridade em relação ao CIVMR em 33,3% ($p < 0,001$). Nos tempos de 48 e 72 horas de exposição aos cimentos, os grupos CIVMR-1,0%ZnONPs, CIVMR-2,0%ZnONPs, CIVMR-1,0%ZnONPs-14,0%TMP e CIVMR-2,0%ZnONPs-14,0%TMP apresentaram a menor citotoxicidade e similar ao DMEM ($p < 0,001$). **Conclusão:** Diante dos resultados obtidos conclui-se que a incorporação de 2,0%ZnONPs e 14,0%TMP ao CIVMR melhorou suas propriedades físico-mecânicas, microbiológicas e reduziu seu potencial citotóxico, podendo tornar-se um biomaterial promissor para procedimentos restauradores, promovendo a biomineralização dos tecidos dentários duros e com efeito anticariogênico.

Palavras-chave: Cimento de ionômero de vidro; Fosfato; Nanopartículas; Óxido de zinco; Dureza; Propriedades de superfície; Biofilme.

Abstract

Leticia Gonçalves Oliveira Menezes

Menezes, LGO. **Evaluation of the bioactive, microbiological and physical-mechanical properties of glass ionomer cements modified with sodium trimetaphosphate and zinc oxide nanoparticles: *in vitro* study.** 2024 76f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba 2024.

Objective: To evaluate the effect of incorporating zinc oxide nanoparticles (ZnONPs) and sodium trimetaphosphate microparticles (TMP) into resin-modified glass ionomer cement (RMGIC) on its physicommechanical, microbiological and cytotoxic properties. **Material and methods:** Test specimens (n=6) were made: 1) RMGIC without ZnONPs/TMP (RMGIC, Fuji II LC); 2) RMGIC-1.0%ZnONPs; 3) RMGIC-2.0%ZnONPs; 4) RMGIC-14.0%TMP; 5) RMGIC-1.0%ZnONPs-14.0%TMP and 6) RMGIC-2.0%ZnONPs-14.0%TMP. The tensile and compressive strengths (TS and CS), surface hardness (SH) after 24 hours/7 days, surface roughness (SR) and percentage degree of monomer conversion (%DC) after 24 hours were determined. For the release of fluoride (F), specimens were immersed in a demineralizing (6 hours) and remineralizing (18 hours) solution for 15 days. Antimicrobial/antibiofilm activity was assessed by the adhesion test, biofilm growth and biofilm metabolism assessment (XTT) (*S. mutans*, UA159) respectively. Cytotoxicity analysis was determined using the resazurin method on the MDPC23 odontoblast strain. The results were submitted to analysis of variance (ANOVA), followed by the Student-Newman-Keuls test ($p < 0.001$). **Results:** The CR for the RMGIC-2.0%ZnONPs group was 22.5% higher when compared to RMGIC in the 24-hour period ($p < 0.001$); in the 7-day period, the RMGIC-2.0%ZnONPs-14.0%TMP group was 23.4% higher than RMGIC ($p < 0.001$). After 7 days, for the RT data, all the groups showed similar values ($P > 0.001$), except for the RMGIC-2.0%ZnONPs-14.0%TMP group, which was 37% and 55.4% higher than RMGIC and RMGIC-14.0%TMP, respectively ($p < 0.001$). Analysis of the SH (KHN) after 24 hours showed that the RMGIC-2.0%ZnONPs-14.0%TMP group had the highest value compared to the other groups ($p < 0.001$). The RS data showed similarity for all groups, as well as for %DC ($p > 0.001$). The greatest release of F after 15 days was seen in the RMGIC-2.0%ZnONPs-14.0%TMP group ($p < 0.001$). The greatest effect on reducing bacterial viability was observed for the RMGIC-2.0%ZnONPs-14.0%TMP group ($p < 0.001$). For cytotoxicity analysis, at 24 hours, the RMGIC-1.0%ZnONPs-14.0%TMP group showed the better cytocompatibility, 33.3%

higher than the RMGIC group ($p < 0.001$). At 48 and 72 hours of exposure to the cements, the RMGIC-1.0%ZnONPs, RMGIC-2.0%ZnONPs, RMGIC-1.0%ZnONPs-14.0%TMP and RMGIC-2.0%ZnONPs-14.0%TMP groups showed the lowest cytotoxicity and were similar to DMEM ($p < 0.001$). **Conclusion:** In view of the results obtained, it can be concluded that the incorporation of 2.0%ZnONPs and 14.0%TMP into RMGIC improved its physical-mechanical and microbiological properties and reduced its cytotoxic potential, which could make it a promising biomaterial for restorative procedures, promoting the biomineralization of hard dental tissues and having an anticariogenic effect.

Keywords: Glass ionomer cement; Phosphate; Zinc oxide nanoparticles; Hardness; Surface properties; Biofilm.

Lista de Abreviaturas

LISTA DE ABREVIATURAS

TMP Trimetafosfato de sódio

CIVMR Cimento de Ionômero de Vidro Modificado por Resina

HEMA Hidroxietilmetacrilato

ZnONPs Nanopartículas de óxido de zinco

RT Resistência à Tração

RC Resistência à Compressão

KNH Unidade de Dureza Knoop

DS Dureza de Superfície

RS Rugosidade Superficial

Ra Rugosidade média

CIV Cimento de Ionômero de Vidro

OMI Odontologia Minimamente Invasiva

NPs Nanopartículas

M Mol

nm Nanômetros

mm Milímetros

Mpa Megapascal

DRX Difração de Raios-X

mg Miligrama

μL Microlitros

g Gramas

mL Mililitros

°C Graus Celsius

min Minutos

µm Micrometros

FTIR Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier

rpm Rotações por minuto

mm Milímetros

DES Solução Desmineralizadora

RE Solução Remineralizadora

Ca Cálcio

P Fósforo

Na Sódio

F Fluoreto

Al Alumínio

O Oxigênio

C Carbono

KBr Brometo de Potássio

KCl Cloreto de Potássio

CaHPO₄⁰ Fosfato de Cálcio

HF⁰ Ácido Fluorídrico

NaOH Hidróxido de Sódio

ZnCl₂ Cloreto de Zinco

Mol/l Mol por Litro

pH Potencial Hidrogeniônico

mmol/L Milimol por Litro

µg F/mL Micrograma de flúor por microlitro

TISAB II Tampão ajustador de força iônica total

µg F/cm² Micrograma de flúor por centímetro quadrado

mm/min Milímetros por minuto

mm/s Milímetros por segundo

kN Kilo Newton

mN Miriâmetro

kgf/cm² Kilo grama força por centímetro quadrado

DTS Valor de Tensão Diametral

CIVMRs Cimentos de Ionômero de Vidro Modificado por Resina

KBr Brometo de potássio

MEV Microscopia Eletrônica de Varredura

EDS Espectroscopia de Energia Dispersiva

kV Kilo volts

h Hora

cm Centímetros

UFC/mL Unidades Formadoras de Colônias por mililitro

mg/L miligrama por Litro

cm² centímetro quadrado

µg/mL Microgramas por microlitro

UI/mL Unidade Internacional por mililitro

SBF Soro Fetal Bovino

ANOVA Análise de Variação

mA Miliampere

CO₂ Dióxido de Carbono

%GC Porcentagem do Grau de Conversão

g/mL Grama por mililitro

DO Densidade Óptica

DMEM Modified Eagle Medium

PBS phosphate buffered saline

Sumário

SUMÁRIO

RESUMO

1. Introdução	29
2. Material e métodos.....	31
3. Resultados	38
4. Discussão	40
5. Agradecimentos	45
6. Referências.....	45
7.1 ANEXO A.....	65
Síntese e Caracterização das ZnONPs	65
7.2 ANEXO B.....	66
Preparo da mistura dos CIVMRs	66
7.3 ANEXO C.....	67
Liberação de F dos CIVMRs	67
7.4 ANEXO D.....	68
Avaliação da Resistência à Compressão.....	68
7.5 ANEXO E	69
Avaliação da Resistência à Tração	69
7.6 ANEXO F	70
Avaliação da Dureza de Superfície.....	70
7.7 ANEXO G.....	71
Avaliação da Rugosidade Superficial	71
7.8 ANEXO H.....	72
Determinação da Porcentagem do Grau de Conversão dos Monômeros.....	72
7.9 ANEXO I.....	73
Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Energia Dispersiva de Raios-x (EDS)....	73
7.10 ANEXO J.....	74
Teste de Adesão ao <i>Streptococcus mutans</i>	74
7.11 ANEXO K.....	75
Avaliação do Biofilme pelo método do XTT	75
7.12 ANEXO L	76
Análise da Citotoxicidade dos CIVMR's	76

Artigo

Avaliação das propriedades bioativas, microbiológicas e físico-mecânicas de cimentos de ionômero de vidro modificados com trimetafosfato de sódio e nanopartículas de óxido de zinco: estudo *in vitro*

Letícia Gonçalves Oliveira Menezes^a, Beatriz Aiub Trajano Silveira^b, Larissa Moreira Spinola de Castro Raucci^b, Paulo Tambasco de Oliveira^c, Antônio Secco Martorano^c, Andrea Simone Stucchi de Camargo A. Bernardes^d, Leandro Piaggi Ravaro^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 fosfatos e nanopartículas de óxido de zinco 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:marcelledanelon@hotmail.com

Palavras-chave: Cimento de ionômero de vidro; Fosfato; Nanopartículas; Óxido de zinco; Dureza; Rugosidade de superfície; Biofilme.

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

Introdução

1. Introdução

A cárie é uma doença crônica multifatorial, endógena, decorrente da quebra da homeostasia na cavidade oral, isto é, alguns elementos - hospedeiro, substrato, microrganismos e tempo - quando associados cooperam para o desequilíbrio anteriormente predominante nesse ambiente [Pitts *et al.*, 2019; Colombo *et al.*, 2019]. A prevenção tem sido cada vez mais incorporada à Odontologia, adotando dessa forma, os princípios minimamente invasivos, que prezam pela conservação da originalidade das estruturas da cavidade bucal.

Nos últimos anos, baseado em uma Odontologia minimamente invasiva (OMI), a busca de técnicas e materiais bioativos que permitam a ausência ou remoção mínima do esmalte e/ou dentina afetada, a fim de conservar o remanescente dentário e evitar danos pulpares, tem sido crescente [Torres *et al.*, 2021]. Estudos demonstram que alguns materiais denominados bioativos apresentam, de fato, a capacidade de melhorar algumas propriedades do dente, como: capacidade de fornecer uma interface adesiva mais confiável, exercer atividade antimicrobiana contra bactérias cariogênicas, como *Streptococcus mutans*, e de promover a remineralização dentária, retardando e possivelmente prevenindo a ocorrência de lesão secundária de cárie [Conti *et al.*, 2023; Pinto *et al.*, 2023]. Dentre eles destaca-se o cimento de ionômero de vidro (CIV), o qual apresenta capacidade de liberar íons, como F e Ca, com potencial na biomineralização [Vallittu *et al.*, 2018]. A dissolução de partículas de alumínio - silicato de cálcio, a partir do CIV, promove interação com a hidroxiapatita da dentina e o processo pode ser considerado como bioativo uma vez que, são capazes de estabilizar polímeros de fosfato de cálcio e com isso provocar uma deposição de apatita intrafibrilar de maneira ordenada dentro das fibrilas de colágeno [Chein *et al.*, 2023].

Com o objetivo de melhorar as propriedades físico-mecânicas e diminuir a sensibilidade à umidade, surgiram os CIV modificados por resina (CIVMR). Estes contêm monômeros orgânicos polimerizáveis, geralmente hidroxietilmetacrilato (HEMA), o que proporciona uma reação adicional de polimerização através da luz. As propriedades físico-mecânicas desses cimentos são superiores às dos CIV e ainda exibem as vantagens de um tempo de trabalho controlado, facilidade de manipulação e um rápido endurecimento com melhor retenção na cavidade dentária, minimizando os problemas de sensibilidade ao acabamento imediato e de desidratação, comuns aos cimentos convencionais [Zhao *et al.*, 2019; Ghilotti *et al.*, 2023]. Por outro lado, a adição do HEMA ao CIVMR pode levar algumas desvantagens tais como: absorção de água, em resultado da natureza hidrófila deste componente e consequentemente, instabilidade

dimensional em meio aquoso, contração de polimerização e também uma biocompatibilidade reduzida associada ao monômero, que podem causar irritação pulpar [Agha *et al.*, 2021]. Diante do exposto, estratégias então sendo propostas para melhorar a bioatividade, propriedades antimicrobianas, citotóxicas e mecânicas do CIVMR [de Oliveira Roma *et al.*, 2023; Diniz *et al.*, 2023].

Uma alternativa para potencializar a ação anticárie dos CIVMRs é a adição de polifosfatos, como o Trimetafosfato de sódio (TMP) [Danelon *et al.*, 2015; Takeshita *et al.*, 2016; Danelon *et al.*, 2017; Akabane *et al.*, 2018]. Diversos estudos demonstram que quando o TMP se adsorve ao esmalte, essa interação pode alterar a permeabilidade seletiva e a difusão de íons para seu interior; dessa forma o TMP possivelmente retém íons carregados positivamente de CaF^+ e Ca^{2+} , substituindo o Na^+ da estrutura cíclica e promovendo a redução da difusão ácida [Danelon *et al.*, 2015; Takeshita *et al.*, 2016; Akabane *et al.*, 2018], bem como durante os processos desmineralização levando à formação e ao fluxo de espécies neutras (CaHPO_4^0 e HF^0) no esmalte. da Silva *et al.* [2019], avaliaram o efeito da incorporação de nanopartículas de TMP (TMPnano) em CIVMR sobre as propriedades físico-mecânicas, liberação de íons e desmineralização do esmalte. Os autores concluíram que a adição de 14%TMPnano ao CIVMR aumentou a liberação de F, P e Ca no esmalte, reduziu a desmineralização, e manteve as propriedades físico-mecânicas dentro dos parâmetros para este material, mostrando ser uma estratégia promissora.

Além dos fosfatos, nos últimos anos, a nanotecnologia tem trazido um grande impacto, com muitas aplicações em diversas áreas, incluindo a Odontologia. Estudos têm demonstrado que é possível aumentar a eficácia do CIVMR através da incorporação de nanopartículas [da Silva *et al.*, 2019; Hosida *et al.*, 2019; Jowkar *et al.*, 2020; Pourhajibagher *et al.*, 2019; Santos *et al.*, 2019], propiciando a melhora no desempenho de materiais odontológicos. Julga-se que esta melhora esteja relacionada a algumas propriedades termodinâmicas e cinéticas presentes apenas nas nanopartículas como tamanho - em escala nanométrica, grande área superficial - e alta reatividade química [Oberdörster *et al.*, 2005]. Nesse contexto destacam-se as nanopartículas de óxido de zinco (ZnONPs), as quais apresentam atividade bactericida catalítica intrínseca, efeito antimicrobiano, estabilidade química e biocompatibilidade [Pourhajibagher *et al.*, 2019; Jowkar *et al.*, 2020]. Segundo Huang *et al.* [2008], acredita-se que as ZnONPs sejam efetivas no controle de vários microrganismos por apresentarem a capacidade de alterar os componentes da membrana celular bacteriana levando a perda de componentes intracelulares, e conseqüentemente, à morte; além disso, dentre as vantagens desse agente ativo soma-se o fato do mesmo não ser tóxico, seguro e biocompatível.

Dessa forma, o presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito da incorporação de nanopartículas de óxido de zinco (ZnONPs) e micropartículas de trimetafosfato de sódio (TMP)

em cimento de ionômero de vidro modificado por resina (CIVMR), sobre as propriedades físico-mecânicas, microbiológicas e citotóxicas. A hipótese nula do estudo foi a de que a incorporação de nanopartículas de ZnONPs e micropartículas de TMP ao CIVMR não promoveria melhora nas propriedades físico-mecânicas, microbiológicas e citotóxicas quando comparado ao CIVMR apenas.

2. Material e métodos

2.1 Síntese e Caracterização das nanopartículas de óxido de zinco (ZnONPs)

Para a síntese das ZnONPs foi utilizado o método sol-gel de reação soloquímica de dois estágios [Wu *et al.*, 2006; Vaezi & Sadrnezhad, 2007]. Por esse método, foi obtido NPs com tamanho médio em torno de 20 nm. Para a síntese, foi utilizado o cloreto de zinco (ZnCl_2) CAS 7647-14-5 e hidróxido de sódio (NaOH) 98% (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA, CAS 1310-73-2). Duas soluções de cada um dos reagentes foram preparadas separadamente. Na primeira solução 8g de NaOH foi dissolvida em 200 mL de água Milli-Q para obtenção de uma solução com concentração 1M. Em seguida, esta solução foi aquecida, sob agitação constante, até atingir a temperatura de 90°C. A segunda solução (precursora) foi obtida pela dissolução de 13,6g de ZnCl_2 em 200 mL de água Milli-Q resultando uma solução com concentração de 0,5M. A solução precursora (contendo íons $\text{Zn}^{+2}_{(\text{aq})}$) foi adicionada lentamente (taxa de 16 mL/min.) a solução contendo NaOH 1M à 90 °C. Foi realizado este procedimento sob temperatura e agitação constantes. A adição lenta da solução (2) de ZnCl_2 na solução aquosa alcalina (1) resultou na precipitação imediata de ZnONPs com mudança de cor transparente para branca. Após adição completa, a solução permaneceu sob agitação por mais duas horas na temperatura de 90 °C. A amostra resultante foi lavada com água Milli-Q e seca em estufa à temperatura 80°C durante 12 hs. A estrutura cristalina das amostras de ZnONPS foram obtidas por medidas de difração de raios-X (DRX), utilizando-se um difratômetro Rigaku acoplado a uma fonte Cu K α de 40 kV e 20 mA. A faixa de varredura foi feita entre 20 e 80 ° (2 θ), com etapa de 0,02 ° e velocidade de 1 grau por min. Morfologia e agregação superficial das NPs foram analisadas por medidas de microscopia eletrônica de varredura (MEV)) e a cristalinidade pela Espectroscopia por energia dispersiva (EDS).

2.2 Preparo da mistura dos CIVMR

O CIVMR utilizado para o estudo foi o Fuji II LC (GC Corporation, Tokyo, Japan). Inicialmente as ZnONPs foram adicionadas ao pó do CIVMR nas concentrações de 1,0% e 2,0% (% m/m) [Garcia *et al.*, 2017]. Para o TMP microparticulado (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA, CAS: 7785-84-4) foi utilizada a concentração de 14% (% m/m) [da Silva *et al.*, 2019]. Para

a adição de ZnONPs/TMP ao pó do CIVMR foi considerado que cada 100 g do produto final da mistura (CIVMR/ZnONPs/TMP) teria 1,0 ou 2,0 gramas de ZnONPs e/ou 14,0 gramas de TMP. 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).

2.3 Liberação de F dos CIVMR

2.3.1 Confeção dos corpos-de-prova

Corpos-de-prova (n=6) [Silva *et al.*, 2007] foram confeccionados com o auxílio de uma matriz metálica bipartida (5 mm de diâmetro e 2 mm de espessura). A extremidade de um fio de aço inoxidável de 0,25 mm de diâmetro foi posicionada no interior da matriz, previamente à inserção dos materiais, para facilitar a manipulação dos corpos-de-prova. A fotopolimerização (Radii-cal SDI- LED) foi realizada por 40 segundos, nas superfícies superior e inferior do material. Após a fotopolimerização, os excessos do material foram cuidadosamente removidos.

2.3.2 Ciclagem de pH para liberação de F do CIVMR

Corpos-de-prova (n=6) de cada material foram colocados em tubos de ensaio de polipropileno com tampa contendo 2 mL de solução desmineralizadora (DES) (Ca e P 2,0 mmol/L em tampão acetato 0,075 mol/L, em pH 4,7) e armazenados por 6 horas. Em seguida, foram transferidos para novos tubos contendo solução remineralizadora (RE) (Ca 1,5 mmol/L, P 0,9 mmol/L, KCl 0,15 mol/L em tampão Tris 0,02 mol/L, em pH 7,0) permanecendo por 18 horas. Estes procedimentos foram repetidos durante 15 dias. Os tubos foram mantidos sob agitação constante com frequência de 120 rpm em mesa agitadora (TE-420 Orbital - Tecnal, Piracicaba, SP, Brasil), à temperatura de 37 °C. Antes de serem imersos em nova solução (DES ou RE) os corpos-de-prova foram lavados com água deionizada e secos com papel absorvente. As soluções foram recolhidas diariamente, identificadas e armazenadas em tubos de ensaio de polipropileno a 4 °C para leitura do F liberado [Silva *et al.*, 2007; da Silva *et al.*, 2019].

2.3.3 Análise de F nas soluções DES e RE

Para a análise de F das soluções DES e RE foi utilizado eletrodo específico para íon fluoreto (9409-BN, Orion Research, Inc., Beverly, MA, Estados Unidos da América) e microeletrodo de referência, previamente calibrados com soluções padrão de 0,250 a 64 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 ou 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). Esses valores foram convertidos para $\mu\text{g F/cm}^2$ [Tiveron et al., 2013].

2.4 Determinação das Propriedades Físico-Mecânicas dos CIVMR

2.4.1 Avaliação da Resistência à Compressão (RC)

Doze corpos-de-prova foram confeccionados (4 mm de diâmetro x 6 mm de altura) (ISO 9917 – 2:2017) em matrizes de silicone de condensação (Speedex, Vigodent S.A. Indústria e Comércio, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) e fotopolimerizados 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).

2.4.2 Avaliação da Resistência à Tração (RT)

Doze corpos-de-prova foram confeccionados (6 mm de diâmetro x 3 mm de altura) (ISO 9917 – 2:2017) em matrizes de silicone de condensação (Speedex) 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 (RT), 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/cm^2) foram calculados usando a equação: $\text{DTS}=2\text{F}/3.14\text{DT}$, onde F é a carga, D é o diâmetro e T é a altura do espécime.

2.4.3 Avaliação da Dureza de Superfície (DS)

Foram confeccionados 6 corpos-de-prova com o auxílio de uma matriz de silicóna de condensação (6 mm de diâmetro e 3 mm de espessura) [Moshaverinia *et al.*, 2016; Menezes-Silva *et al.*, 2020] e fotopolimerizados por 40 segundos, nas superfícies superior e inferior [Silva *et al.*, 2007]. 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 [Silva *et al.*, 2007]. 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.

2.4.4 Teste de Rugosidade Superficial (RS)

A rugosidade superficial das amostras para cada grupo experimental (6 mm de diâmetro e 3 mm de espessura; n = 6) [Cibim *et al.*, 2017] 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. Após a confecção das amostras, as mesmas foram armazenadas por 24 horas em estufa a 37 °C (100% umidade). 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 RS 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.

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

Os CIVMR experimentais e comercial (n=3) foram manipulados, inseridos entre duas lâminas de vidro, pressionados formando um filme de aproximadamente 0,12 ± 0,02 mm, e fotopolimerizados por 40 segundos de cada lado da amostra. Em seguida, foram armazenados durante 24 horas, ao abrigo da luz, em estufa a 37 °C. Após estes períodos, os filmes de cada material foram triturados e misturados com brometo de potássio (KBr), na proporção de 1:35 (mg:mg). As misturas foram colocadas na prensa (Pike Technologies, Madison, WI, Estados Unidos da América), sob uma carga de 3 toneladas, 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 1.400 e 2.000 cm⁻¹, utilizando 128 varreduras e 4 cm⁻¹ de resolução. A determinação do grau de conversão na polimerização dos CIVMRs foi baseada na medida da diminuição da intensidade da banda de absorção associada ao metacrilato quando o monômero é convertido em polímero. Para o material estudado e as condições de preparo das amostras, foram utilizadas as bandas de absorção associadas a vibrações de estiramento das ligações C = C do monômero e COO⁻ do ácido carboxílico, localizadas aproximadamente em 1640 e 1540 cm⁻¹, respectivamente. O valor da porcentagem do grau de conversão dos monômeros foi determinada utilizando seguinte equação:

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

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 espessura de 2 mm x 4 mm 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 local 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 Determinação das Propriedades Antimicrobiana dos CIVMR

2.5.1 Teste de Adesão ao *Streptococcus mutans*

Após a reativação de cepas de *S. mutans* (UA159) [Huang *et al.*, 2022], as placas foram incubadas em estufa a 37 °C por 48 horas. Em seguida, as colônias reativadas de *S. mutans* foram removidas e adicionadas a um caldo BHI suplementado com 1% de sacarose para a formação do inóculo. A homogeneização do inóculo foi realizada durante 30 segundos em um Vórtex (Maxi Mix™, Barnstead International, Dubuque, Iowa, EUA). Cada disco de material ionomérico (n = 4) foi exposto sob condições estáticas a 10 mL de BHI, acrescido de 4 alças de *S. mutans* do inóculo ajustado para uma densidade óptica (DO) de 0,6 a 550 nm (aproximadamente 107 UFC/mL), utilizando um espectrofotômetro (Microplate Spectrophotometer EONC, Biotek, EUA). Em seguida, uma placa de 24 poços foi utilizada, sendo cada poço preenchido com 700 µL para que as amostras ficassem imersas no inóculo. Essas placas foram incubadas a 37 °C por 24 horas. Posteriormente, os corpos de prova foram retirados da placa e inseridos em tubos de polietileno contendo 3 mL de solução salina.

Em seguida, os tubos foram submetidos ao ultrassom por 10 minutos para permitir o desprendimento das células aderidas aos espécimes. Na sequência retirou-se uma alíquota de 200 µL da solução salina contendo o espécime e dispensada em uma placa de 96 poços. Uma alíquota de 180 µL de PBS foi dispensada nos poços subsequentes na mesma coluna da placa. Procedeu-se com a diluição seriada para todos os grupos, retirando 20 µL de um poço e transferindo para o subsequente na mesma coluna da placa. Foi realizado o plaqueamento retirando uma alíquota de 5 µL de cada poço, aguardando a secagem das placas para então incubá-las por 48 horas em ambiente suplementado com 10% de CO₂. Após esse período, as colônias foram contadas, e o

número de bactérias viáveis foi determinado em unidades formadoras de colônia (UFC/mL), correspondendo às células aderidas aos CIVMR [Fúcio et al., 2016].

2.5.2 Avaliação do Biofilme pelo Método do XTT

O ensaio de biofilme foi baseado no estudo de Hu *et al.* [2013]. *S. mutans* (UA159) foi cultivado anaerobicamente em caldo BHI durante a noite à 37 °C. A suspensão bacteriana obtida foi ajustada para uma densidade óptica de 0,3 a 600 nm (aproximadamente 3×10^8 UFC/mL) com um espectrofotômetro (Microplate Spectrofotometer EONC, Biotek, EUA), para uso posterior. Para cada material testado, seis espécimes em forma de disco (2 mm × 4 mm) foram preparadas usando matrizes de silicone de condensação (Speedex, Vigodent S.A. Indústria e Comércio, Rio de Janeiro, RJ, Brasil). Os corpos-de-prova foram mantidos por 20 minutos em estufa a 37 °C com 100% de umidade, lavados com água destilada e esterilizados sob luz ultravioleta por 20 minutos. A seguir foram inseridos nos poços de uma placa de 24 poços (Corning, NY, EUA) e mantidos em suspensão por um fio ortodôntico permanecendo fixado com cera utilidade na tampa da placa de poliestireno durante o período experimental. Em seguida foi retirado, 39,6 mL de BHI suplementado com 1% de sacarose e 0,4 mL de suspensão bacteriana formando uma solução a qual foi colocada no vórtex por 15 segundos e em seguida inoculada em cada poço. As placas foram incubadas a 37 °C em uma câmara anaeróbica por 24 h. Atividade celular metabólica do biofilme formado nos poços foi quantificada pelo XTT (2,3 (2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-5-[(fenilamino)carbonil]-2H-hidróxido de tetrazólio) (CAS: 111072-3-2, Sigma-Aldrich). Para isso, os poços contendo o biofilme formado foram lavados suavemente com solução salina e 1 mL de solução compreendendo 150 mg/L de XTT e 10 mg/L de fenazina adicionou-se metossulfato (CAS: 299-11-6, Sigma-Aldrich). As placas foram incubadas no escuro a 37 °C por 3 h e, em seguida, 200 µL da suspensão solubilizada foram transferidos para microplacas de 96 poços e a absorbância lida em 490 nm. Todos os ensaios foram realizados em triplicata em três diferentes ocasiões. Os resultados foram expressos em valores de absorbância.

2.6 Análise da Citotoxicidade dos CIVMR

2.6.1 Obtenção da Cultura de Células

Odontoblastos 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 altura e 4 mm de largura (n=5) foram preparadas em matrizes de silicone (previamente esterilizadas), fotopolimerizadas por 40s e mantidas por 1 h 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, sendo recobertas com o meio de cultura DMEM (*contato direto).

2.6.2 Análise do Metabolismo Celular

Ao final de 24, 48 e 72 horas de exposição aos cimentos ionoméricos experimentais, a proliferação celular foi avaliada pelo método de redução de um corante resazurina. O ensaio é baseado na capacidade das células vivas de converter a resazurina em um produto final colorimétrico (resorufina), no qual aquelas não viáveis perdem a capacidade metabólica e, portanto, não geram um sinal observável [Chen *et al.*, 2018]. 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 decorrido período, o sobrenadante formado foi retirado dos poços e transferido para placa de 96 poços para medida colorimétrica em espectrofotômetro (570-600nm, Epoch 2, BioTekInstruments 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.

2.7 Análise Estatística

Para análise estatística, foram considerados como variáveis os valores dos testes físico-mecânicos, microbiológicos e citotóxico, e como fator de variação o tipo de CIVMR e o tempo. Todos os dados apresentaram distribuição normal (Shapiro–Wilk) e homogênea (Bartlett). Os dados de RC, RT, DS, RS, liberação de F e Metabolismo Celular (Abs) foram submetidos a ANOVA (2-critérios). Já os dados de %GC e microbiológicos (CFU/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 das Nanopartículas de Óxido de Zinco (ZnONPs)

A análise composicional (Espectroscopia de Energia Dispersiva de Raios X (EDS) (Figura 1) revelou que as amostras apresentaram alta porcentagem de átomos de zinco, sem contaminação com outros elementos. Além disso, o processo de moagem reduziu o tamanho das partículas do pó das ZnONPs sem afetar sua estrutura cristalina. O tamanho em escala nanométrica foi caracterizado por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) com estimativa de tamanho médio de aproximadamente 20nm para as ZnONPs (Figura 1).

3.2 Propriedades Mecânicas (RC, RT, DS, RS, MEV e %GC)

Após 24 horas, a RC (Tabela 1) para o grupo CIVMR-2,0%ZnONPs foi superior em ~22,5% quando comparado ao CIVMR (Controle) ($p < 0,001$). Além disso, os grupos CIVMR-1,0%ZnONPs-14,0%TMP e CIVMR-2,0%ZnONPs-14,0%TMP, apresentaram os menores valores e similares entre si ($p > 0,001$) quando comparado aos demais grupos. Na análise comparativa individual de cada grupo, entre os dois tempos avaliados (24 horas e 7 dias), foi possível observar que somente o grupo CIVMR-14,0%TMP apresentou valores similares em ambos os tempos ($p > 0,001$). Todos os demais grupos diferiram após 7 dias, na análise entre os tempos, e melhoraram sua RC ($p < 0,001$). Para os dados de RT, na análise comparativa individual de cada grupo em relação aos tempos, foi possível observar que todos os grupos apresentaram valores similares de RT (MPa), quando avaliados no tempo de 24 horas ($p > 0,001$). Após 7 dias, somente o grupo CIVMR-2,0%ZnONPs-14,0%TMP apresentou um resultado distinto aos demais grupos, dessa forma, se destacando com um valor de RT maior em ~37% quando comparado ao grupo CIVMR (Controle). A comparação entre os tempos evidenciou uma melhora significativa na RT para o grupo CIVMR-2,0%ZnONPs-14,0%TMP ($p < 0,001$).

Na análise da DS (KHN) dos cimentos ionoméricos experimentais, após as 24 horas, observou-se que o grupo CIVMR-2,0%ZnONPs-14,0%TMP apresentou o maior valor quando comparado aos demais grupos ($p < 0,001$), o qual foi superior em 46% quando comparado ao CIVMR. Os grupos CIVMR e CIVMR-1,0%ZnONPs-14%TMP foram similares entre si. Após 7 dias, os menores valores foram encontrados para os grupos CIVMR, CIVMR-2,0%ZnONPs e CIVMR-1,0%ZnONPs-14,0TMP. Todos os 6 grupos obtiveram variação de DS entre os tempos (Tabela 1). Para os dados de RS, todos os grupos foram similares entre si, independente da adição apenas de ZnONPs/TMP ou em associação ($p > 0,001$) (Tabela 1).

A Figura 2 evidencia a micrografia da superfície dos cimentos ionoméricos experimentais. Foi possível notar superfícies rugosas para todos os grupos. Depósito globulares,

semelhantes a minerais, foram observados em maior intensidade para os grupos CIVMR-2,0%ZnONPs>CIVMR-2,0%ZnONPs-14,0%TMP>CIVMR-14,0%TMP>CIVMR-1,0%ZnONPs-14,0%TMP. 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 e cálcio, mesmo com a adição dos agentes ativos.

A Figura 3 revela os valores de porcentagem do grau de conversão (%GC) para os cimentos ionoméricos experimentais, após 24 horas. A adição dos agentes ativos sozinhos (1,0%ZnONPs, 2,0%ZnONPs e 14%TMP) ou em associação (1,0%ZnONPs-14,0%TMP e 2,0%ZnONPs-14,0%TMP) ao CIVMR, não alterou a %GC em relação ao CIVMR apenas ($p < 0,001$).

3.3 Liberação de Flúor

A Figura 4 apresenta o padrão de liberação de F ($\mu\text{gF}/\text{cm}^2$) e os valores médios ($\pm\text{dp}$) de liberação cumulativa ao longo de 15 dias, pelos cimentos ionoméricos experimentais. Após 24 horas, todos os grupos apresentaram uma rápida e alta liberação de F. Foi observado no primeiro dia os maiores valores para os CIVMR-2,0%ZnONPs-14,0%TMP e CIVMR-14,0%TMP, no 15º dia para os grupos CIVMR-1,0%ZnONPs-14,0%TMP e CIVMR-2,0%ZnONPs-14,0%TMP. No período de 15 dias, todos os grupos apresentaram uma redução na liberação de F. Em relação aos valores médios de liberação de F observa-se que todos os grupos apresentaram liberação ao longo de 15 dias, diferenciando estatisticamente entre si ($p > 0,001$).

3.4 Propriedades Antimicrobiana e Citotoxicidade dos CIVMR

Na análise dos dados para efeito antimicrobiano, obtidos através do teste de adesão ao *S. mutans* sobre os cimentos ionoméricos experimentais ($\text{Log}_{10}\text{-UFC}/\text{mL}$), todos os grupos testados foram similares entre si ($p=0,881$) (Figura 5). Para análise do biofilme formado ($\text{log}_{10}\text{-UFC}/\text{mL}$) foi possível notar o maior efeito inibitório e maior atividade antibacteriana (contra *S. mutans*) para o grupo CIVMR-2,0%ZnONPs-14,0%TMP, seguido pelo grupo CIVMR-14,0%TMP ($p < 0,001$) (Figura 6). Já os grupos CIVMR-1,0%ZnONPs e CIVMR-2,0%ZnONPs apresentaram valores similares entre si ($p > 0,001$).

A Figura 7 mostra os dados da redução do biofilme de *S. mutans* (pelo método XTT), na presença dos cimentos ionoméricos experimentais. A adição dos agentes ativos (TMP; TMP-ZnONPs), aos cimentos ionoméricos, promoveu uma redução na atividade metabólica do biofilme de *S. mutans* em relação ao Controle negativo (DEMEM), CIVMR e CIVMR associado à 1,0% e 2,0% de ZnONPs ($p < 0,001$). Os grupos CIVMR-14,0%TMP e CIVMR-1,0%ZnONPs-14,0%TMP foram similares entre si ($p > 0,001$), reduzindo a atividade metabólica em $\sim 50\%$

quando comparados ao CIVMR ($p < 0,001$). Por outro lado, a adição de 2,0%ZnONPs e 14,0%TMP ao CIVMR, promoveu uma redução de $\sim 78\%$ quando comparado ao CIVMR ($p < 0,001$).

Os resultados da resposta do metabolismo celular pelo método da resazurina, obtidos após exposição das células de Odontoblastos da linhagem MDPC23, aos cimentos ionoméricos experimentais (24, 48 e 72 horas) são apresentados na Figura 8. Para o tempo de 24 horas, o grupo CIVMR-1,0%ZnONPs-14,0%TMP foi o que apresentou a melhor citocompatibilidade, apresentando superioridade em relação ao CIVMR em 33,3% ($p < 0,001$). Quando comparado ambos os tempos (48 horas e 72 horas) houve diferença no metabolismo celular apenas para os grupos CIVMR-1,0%ZnONPs e CIVMR-2,0%ZnONPs ($p < 0,001$). Nos tempos de 48 e 72 horas de exposição aos cimentos, os grupos CIVMR-1,0%ZnONPs, CIVMR-2,0%ZnONPs, CIVMR-1,0%ZnONPs-14,0%TMP e CIVMR-2,0%ZnONPs-14,0%TMP apresentaram a menor citotoxicidade e similar ao DMEM ($p < 0,001$).

4. Discussão

No contexto atual, a busca por materiais que possuam propriedades físico-mecânicas e antimicrobianas melhoradas e que também conservem a estrutura dental - minimizando a remoção excessiva de esmalte e dentina, vem crescendo. Diante deste contexto, a nanotecnologia, juntamente com o uso de materiais bioativos, tem mostrado avanços nas propriedades dos materiais dentários. Uma área da nanotecnologia que tem sido amplamente explorada é a de nanopartículas em compósitos. A razão para a utilização de nanopartículas é devido à sua maior bioeficácia com a melhora na estética, tornando os materiais mais translúcidos e nas propriedades de desgaste, por apresentarem uma maior área de superfície em relação ao volume [Abou Neel *et al.*, 2015; Ali, 2023]. Vários nanomateriais têm sido utilizados em Odontologia para ultrapassar as falhas do tratamento convencional e para tratar doenças dentárias. As nanopartículas de prata, sílica e zinco têm sido utilizadas em adesivos e resinas compostas para prevenir a formação de biofilme nas margens da restauração e melhorar as propriedades mecânicas e químicas destes biomateriais [Bapat *et al.*, 2020; Yin *et al.*, 2020]. O objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito da incorporação de micropartículas de Trimetafosfato de Sódio (TMP) e nanopartículas de Óxido de Zinco (ZnONPs) em Cimento de Ionômero de Vidro modificado por Resina (CIVMR) sobre as propriedades físico-mecânicas e microbiológicas. A hipótese nula do estudo foi a de que a incorporação dos agentes ativos ao CIVMR não promoveria melhoras 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 ABNT, 2011 e ISO 9917-2:2017, para cimentos a base de resina. Os resultados de Resistência à Tração (RT-MPa) (Tabela 1) mostram que após a adição dos agentes ativos a formulação do CIVMR, após 24 horas, não houve alteração desta propriedade do material, uma vez que os resultados foram similares ao grupo controle (CIVRM). Após 7 dias, somente o grupo CIVMR-2,0%ZnONPs-14,0%TMP evidenciou maiores valores de RT. Ambos agentes ativos (2,0%ZnONPS e 14,0%TMP) quando acrescentados separadamente ao CIVMR, representando (CIVMR-2,0%ZnONPs e CIVMR-14,0%TMP), não contribuíram para a melhora da propriedade de RT. Em um estudo realizado por da Silva et al. [2019], em que os autores analisaram a incorporação de clorexidina nas concentrações de 1,25%, 2,5%, 7% e 14,0%TMPnano ao CIVMR, concluíram que a incorporação de 14,0%TMPnano ao CIVMR não obteve melhoria no valor de RT quando comparado ao CIVMR sem aditivos bioativos, ratificando os resultados que encontramos.

Para o teste de RC (Tabela 1), a partir de 24 horas, observou-se que o grupo CIVMR-2,0%ZnONPs apresentou o maior valor quando comparado aos demais grupos ($p < 0,001$). Após 7 dias, o maior valor foi verificado para o grupo CIVMR-2,0%ZnONPs-14,0%TMP, enquanto o mais baixo para o grupo CIVMR-14,0%TMP – que simultaneamente, foi o único grupo a não apresentar variação de RC entre os tempos. A RC do grupo que incorpora 1,0% e 2,0% de ZnONPs é significativamente mais elevada do que o grupo de controle não modificado (CIVMR), podendo concluir que a incorporação de ZnONPs na matriz de resina pode aprimorar a sua propriedade mecânica em baixas porcentagens. A maior RC com baixo conteúdo de NPs ($< 2,0\%$) deve-se à sua dispersão relativamente boa, preservando sua biocompatibilidade e suas propriedades físicas e mecânicas, enquanto que a maior porcentagem de NPs levaria à formação de feixes e aglomerados que conduziriam a defeitos e falhas, o que por sua vez, deterioram as propriedades mecânicas do compósito [Pushpalatha *et al.*, 2022]. Juntamente a isso, a quantidade de Zn e F no pó do CIVMR induzem uma maior flexão e compressão à força, além de promoverem a conectividade dessa rede aprimorada pelas inúmeras ligações cruzadas devido a uniformidade do material, o que contribui para maior formação da fase sílica-gel que corresponde a presa final melhorando as propriedades mecânicas [Malekhoseini *et al.*, 2021].

A interferência dos compostos adicionados ao cimento na ocupação dos poros do material, provavelmente sucede devido à manipulação e inserção do material, pois esses são os principais fatores que proporcionam a inclusão de bolhas de ar em seu interior, alterando negativamente a RS do material [Saadat *et al.*, 2021; Soygun *et al.*, 2021]. Em nosso estudo, podemos sugerir que a quantidade de aglomerados deve ter sido menor, formando certamente uma menor quantidade de bolhas internas para todos os grupos experimentais, favorecendo assim a homogeneidade do material, o que contribuiu para a similaridade na RS (Tabela 1).

A DS é uma das propriedades clínicas mais importantes dos materiais dentários e pode comprometer o sucesso clínico de uma restauração [Sharafeddin *et al.*, 2021]. No período de 24 horas (Tabela 1), observou-se que o grupo CIVMR-2,0%ZnONPs-14,0%TMP apresentou o maior valor quando comparado aos demais grupos ($p < 0,001$). Após 7 dias, os menores valores foram encontrados para o grupo CIVMR, CIVMR-1,0%ZnONPs e CIVMR-1,0%ZnONPs-14,0TMP. Com a adição de 2,0% de ZnONPs ao CIVMR e ao CIVMR-14,0%TMP houve uma melhora significativa da DS, mostrando os melhores resultados. Esse resultado pode ser explicado devido a maior quantidade de nanopartículas disponíveis para interagir com a matriz do material, formando ligações mais fortes, além de sua singularidade que surge especificamente de proporções mais altas entre superfície e volume e de uma porcentagem aumentada de átomos nos limites das partículas [Premanathan *et al.*, 2011].

A contração de polimerização que ocorre após a inserção do material, em cavidades acometidas pela cárie ou hipomineralização molar-incisivo (HMI), pode levar a lacunas marginais, e consequentemente à formação de lesão de cárie secundária, contribuindo para o fracasso da restauração. Destaca-se também que a contração dos materiais dentários à base de resina está diretamente associada ao grau percentual de conversão das duplas ligações carbono-carbono em ligações simples após a polimerização. Embora seja favorável aumentar o grau de conversão (polimerização) dos materiais dentários para melhorar as suas propriedades mecânicas e biológicas, um elevado grau de conversão é menos desejável devido à possibilidade de aumentar a contração de polimerização, exotermia e fragilidade do material [Agha *et al.*, 2020]. A redução do tamanho das partículas do ZnO à escala nanométrica favoreceu a interação com Ca^{2+} e Al^{+3} do CIVMR proporcionando uma melhor interação mecânica com a matriz polimérica do material. Os grupos aniônicos do TMP (P-O-) apresentam uma grande reatividade por fosfatos, estabelecendo também reações eletrostáticas com os componentes do CIVMR contribuindo para a maior interação e menor tensão entre os componentes, sendo provável que as características dos agentes ativos favoreceram um efeito sinérgico entre eles. Vale ressaltar que o cimento de ionômero de vidro utilizado no presente estudo compõe-se por ácidos poliacrílicos apresentando caráter bifuncional, possuindo grupamentos carboxílicos (COO^-) em uma das extremidades e grupamentos metacrilatos [$\text{CH}_2=\text{C}-(\text{CH}_3)$] na outra. Assim a hipótese seria que a redução da reação do grupo carboxílico às partículas de carga (silicato de alumínio) pode influenciar na polimerização do grupamento metacrilato, principalmente quando há muitos grupamentos carboxílicos livres. As concentrações de 14,0%TMP e de 1,0% - 2,0%ZnONPs acrescentadas, não afetaram a reação do ácido poliacrílico com as partículas de vidro do CIVMR, muito menos as propriedades físico-mecânicas, e este fato também é verificado através dos dados do grau de conversão (GC) (Figura 6), o qual mesmo com a adição dos agentes ativos sozinhos

ou com associações, não promoveu alteração na reação monomérica do cimento, 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 TMP e ZnONPs.

A liberação de F do CIVMR (Figura 4) qualifica-se por uma liberação rápida inicial, seguida por uma diminuição gradual. A adição de 14,0%TMP ao CIVMR favoreceu a maior liberação de F nas primeiras 24 horas com valor maior que o grupo CIVMR. 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]. No decorrer da 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. No entanto, as ZnONPs são vulneráveis a reações oxidativas com diferentes materiais orgânicos, proporcionaram assim uma maior reatividade do oxigênio com os íons metálicos presentes no CIVMR o que leva também, a maior disponibilidade de F e Zn [Rahman *et al.*, 2022]. A partir do 11º dia a liberação foi maior e similar para os grupos CIVMR-1%ZnONPs-14,0%TMP e CIVMR-2,0%ZnONPs-14,0%TMP, o que pode ser explicado pelo efeito catalítico da ZnONPs sobre a liberação de F [Czyżowska *et al.*, 2020]. Diante disso, mesmo que o CIVMR apresente F em sua composição, a liberação não foi expressiva quanto aos grupos associando ZnONPs com TMP.

A procura por materiais que apresentem potencial na redução e/ou formação do biofilme, e consequentemente no metabolismo bacteriano tem sido constante [Benoit *et al.*, 2019]. No presente estudo, a contagem das unidades formadoras de colônias (Figura 5) foi similar entre os grupos experimentais, podendo ser explicado pela capacidade dos cimentos em fornecerem inicialmente adesão para microrganismos tais como espécies de *S. mutans*, porém essa colonização é superficial. Convém lembrar que a presença de um substrato/meio que proporcione condições adequadas ao microrganismo para desenvolver suas funções, no decorrer do tempo, pode evoluir para formação de biofilme.

Na análise do crescimento do biofilme e viabilidade bacteriana (Figura 6 e Figura 7) a incorporação de 2,0% de ZnONPs e 14,0% de TMP ao pó do CIVMR produziu um efeito antimicrobiano sobre a formação de *S. mutans* assim como maior redução na viabilidade bacteriana (Figura 7). Possivelmente a agregação dos agentes ativos promoveu uma maior interação entre os componentes químicos do CIVMR e maior liberação dos íons presentes no material contribuindo para melhor ação sobre o crescimento de *S. mutans*. Em nosso estudo a incorporação de 2,0% de ZnONPs e 14,0% de TMP ao pó do CIVMR produziu um efeito antimicrobiano sobre a formação de *S. mutans* (Figura 7). Isso ocorre pelo fato das ZnONPs atuarem por contato direto com o microrganismo, contribuindo para a desorganização da parede bacteriana, tornando-a mais permeável e consequentemente, facilitando a entrada das

nanopartículas no citoplasma bacteriano [Benoit *et al.*, 2019; Almutairi *et al.*, 2020; Czyżowska *et al.*, 2022. Hasanin *et al.*, 2023]. Isso contribui para a formação fotocatalítica de espécies reativas de oxigênio, que geram estresse oxidativo e danificam irreversivelmente as células bacterianas [Valtsifer *et al.*, 2023]. Ainda, a produção de Zn^{2+} pelas nanopartículas contribui para a inibição do transporte ativo e o metabolismo de açúcares, bem como interrompe os sistemas enzimáticos do biofilme dentário (levando ao deslocamento de íons de magnésio, essenciais para a atividade do biofilme). Os Zn^{2+} também podem reduzir a produção de ácidos pelo biofilme de *S. mutans*, assim como, apresentam a capacidade de inibir a atividade da enzima glicosiltransferase, impedindo dessa forma a desmineralização dentária. De acordo com o estudo de Malekhoseini *et al.* [2021], a adição de NPs de ZnO ao CIVMR causou um aumento significativo na sua propriedade antibacteriana contra *S. mutans*, semelhante aos nossos achados.

A biocompatibilidade é vital para todas as estratégias de tratamento e refere-se à capacidade do material funcionar no ambiente oral sem causar danos locais ou sistêmicos, o que significa essencialmente que a interação entre o material e o hospedeiro deve ser harmoniosa [Woźniak-Budych *et al.*, 2023]. Em nosso estudo a citotoxicidade dos CIVMR's foi avaliada pelas linhagens de Odontoblastos MDPC23, conforme mostrado na Figura 8. Segundo a norma ISO 10993-5:2009, os materiais podem ser considerados como tendo potencial citotóxico se a viabilidade celular relativa obtida for inferior a 70% em comparação com o controle em branco (DMEM). Assim sendo, após 72 horas, os grupos CIVMR-1,0%ZnONPs, CIVMR-14%TMP-1,0%ZnONPs e CIVMR-14%TMP-2,0%ZnONPs foram os que apresentaram maiores valores de DO (Figura 8) e similar ao DMEM, representando maior grau de viabilidade celular/atividade mitocondrial quando comparado ao CIVMR. Especula-se que quando o TMP foi adicionado ao CIVMR, seu grupo fosfato (PO_4^{3-}) reagiu com grupos carboxílicos (COOH) a partir do ácido poliacrílico e redes poliméricas foram formadas, mudando assim, as propriedades biológicas do CIVMR. Desse modo, os resultados do presente estudo mostram que a adição de TMP e ZnONPs ao CIVMR levou a baixo efeito citotóxico para as células estudadas.

Frente ao exposto, recomenda-se estudos adicionais como: utilização de esmalte e dentina como substrato e consequentemente, a ação dos novos cimentos na remineralização, avaliação da recarga de F, resistência ao cisalhamento com o intuito de verificar possíveis defeitos de adesão e biofilme misto, para assim obter melhor estimativa do comportamento desses novos materiais ionoméricos e suas características bioativas no decorrer do tempo, assim como estudos clínicos. Diante dos resultados obtidos conclui-se que a incorporação de 2,0%ZnONPs e 14,0%TMP ao CIVMR melhorou suas propriedades físico-mecânicas, microbiológicas e reduziu seu potencial citotóxico, podendo tornar-se um biomaterial promissor para procedimentos restauradores, promovendo a biomineralização dos tecidos dentários duros e com efeito anticariogênico.

5. Agradecimentos

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP-Processos: 2021/10742-0 e 2022/08068-2) pelo apoio financeiro.

6. Referências

Abou Neel EA, Bozec L, Perez RA, Kim HW, Knowles JC. Nanotechnology in dentistry: prevention, diagnosis, and therapy. *Int J Nanomedicine* 2015;10:6371-6394. doi:10.2147/IJN.S86033.

Agha A, Parker S, Patel M. Polymerization shrinkage kinetics and degree of conversion of commercial and experimental resin modified glass ionomer luting cements (RMGICs). *Dent Mater*. 2020;36:893-904. doi:10.1016/j.dental.2020.04.010.

Agha A, Parker S, Parkinson EK, Patel M. Characteristics of experimental resin-modified glass-ionomer cements, containing alternate monomers to HEMA. *Dent Mater* 2021;37:1542-1552. doi:10.1016/j.dental.2021.08.003

Akabane S, Delbem AC, Pessan J, Garcia L, Emerenciano N, Gonçalves DF, Danelon M. In situ effect of the combination of fluoridated toothpaste and fluoridated gel containing sodium trimetaphosphate on enamel demineralization. *J Dent* 2018;68:59-65. doi:10.1016/j.jdent.2017.10.013.

Ali M. What function of nanoparticles is the primary factor for their hyper-toxicity? *Adv Colloid Interface Sci* 2023;314:102881. doi:10.1016/j.cis.2023.102881.

Almutairi B, Albahser G, Almeer R, Alyami NM, Almukhlafi H, Yaseen KN, Alkahtani S, Alarifi S. Investigation of Cytotoxicity Apoptotic and Inflammatory Responses of Biosynthesized Zinc Oxide Nanoparticles from *Ocimum sanctum* Linn in Human Skin Keratinocyte (Hacat) and Human Lung Epithelial (A549) Cells. *Oxid Med Cell Longev* 2020;12;2020:18354-75. doi: 10.1155/2020/1835475.

Bapat RA, Chaubal TV, Dharmadhikari S, et al. Recent advances of gold nanoparticles as biomaterial in dentistry. *Int J Pharm* 2020;586:1195-96. doi:10.1016/j.ijpharm.2020.119596

Benoit DSW, Sims KR Jr, Fraser D. Nanoparticles for Oral Biofilm Treatments. *ACS Nano* 2019;13:4869-4875. doi:10.1021/acsnano.9b02816.

Chen L, Zeng Z, Li W. Poly(acrylic acid)-Assisted Intrafibrillar Mineralization of Type I Collagen: A Review. *Macromol Rapid Commun* 2023;44:e2200827. doi:10.1002/marc.202200827.

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. doi:10.1371/journal.pone.0191123.

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. doi:10.1155/2017/7123919.

Colombo S, Gallus S, Beretta M, Lugo A, Scaglioni S, Colombo P, Paglia M, Gatto R, Marzo G, Caruso S, Paglia L. Prevalence and determinants of early childhood caries in Italy. *Eur J Paediatr Dent* 2019;20:267-273. doi:10.23804/ejpd.2019.20.04.02.

Conti G, Veneri F, Amadori F, Garzoni A, Majorana A, Bardellini E. Evaluation of Antibacterial Activity of a Bioactive Restorative Material Versus a Glass-Ionomer Cement on *Streptococcus Mutans*: In-Vitro Study. *Dent J (Basel)* 2023;11:149. doi:10.3390/dj11060149.

Czyżowska A, Barbasz A. A review: zinc oxide nanoparticles - friends or enemies? *Int J Environ Health Res* 2022;32:885-901. doi:10.1080/09603123.2020.1805415.

da Silva MER, Danelon M, Santos Souza JA, et al. 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. doi:10.1016/j.jdent.2019.04.001.

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. doi:10.1016/j.jdent.2015.04.010.

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. doi: 10.1016/j.archoralbio.2017.02.014.

de Oliveira Roma FRV, de Oliveira TJL, Bauer J, Firoozmand LM. Resin-modified glass ionomer enriched with BIOGLASS: Ion-release, bioactivity and antibacterial effect. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2023;111:903-911. doi:10.1002/jbm.b.35200.

Diniz AC, Bauer J, Veloso SDAR, Abreu-Pereira, CA, Carvalho CN, Leitão TJ, Firoozmand LM, Maia-Filho EM. Effect of Bioactive Filler Addition on the Mechanical and Biological Properties of Resin-Modified Glass Ionomer. *Materials (Basel)* 2023;16:1765. doi:10.3390/ma16051765.

Fúcio SB, Paula AB, Sardi JC, Duque C, Correr-Sobrinho L, Puppini-Rontani RM. Streptococcus Mutans Biofilm Influences on the Antimicrobial Properties of Glass Ionomer Cements. *Braz Dent J* 2016;27:681-687. <https://doi.org/10.1590/0103-6440201600655>.

Silva KG, Pedrini D, Delbem ACB, Cannon M. Effect of pH variations in a cycling model on the properties of restorative materials. *Oper Dent* 2007;32:328-335. doi: 10.2341/06-89.

Garcia PPNS, Cardia MFB, Francisconi RS, Dovigo LN, Spolidório DMP, de Souza Rastelli AN, Botta AC. Antibacterial activity of glass ionomer cement modified by zinc oxide nanoparticles. *Microsc Res Tech* 2017;80:456-461. doi:10.1002/jemt.22814.

Ghilotti J, Fernández I, Sanz JL, Melo M, Llena C. Remineralization Potential of Three Restorative Glass Ionomer Cements: An In Vitro Study. *J Clin Med* 2023;12:2434. doi:10.3390/jcm12062434.

Hasanin MS, El Saied H, Morsy FA, Hassan Abdel Latif Rokbaa H. Green nanocoating-based polysaccharides decorated with ZnONPs doped Egyptian kaolinite for antimicrobial coating paper. *Sci Rep* 2023;13:11461. doi:10.1038/s41598-023-38467-1.

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. doi: 10.1007/s00784-018-2674-9.

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. doi: 10.1016/j.jdent.2013.07.014.

Huang Z, Zheng X, Yan D, Yin G, Liao X, Kang Y, Yao Y, Huang D, Hao B. Toxicological effect of ZnO nanoparticles based on bacteria. *Langmuir* 2008;24:4140-4144. doi:10.1021/la7035949.

Huang B, Stewart CA, McCulloch CA, Santerre JP, Cvitkovitch DG, Finer Y. Streptococcus mutans Proteases Degrade Dentinal Collagen. *Dent J (Basel)* 2022;10:223. doi:10.3390/dj10120223.

International Organization for Standardization. ISO 7489. Dental glass polyalkenoate cements. Geneva; 1986.

International Organization for Standardization ISO 10993-5:2009. Biological evaluation of medical devices. Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity. London; 2009.

International Organization for Standardization. ISO 9917-2:2017-Dentistry - Water based cements. Part 2: Resin-modified cements. Geneva: ISO;2017.

Jowkar Z, Fattah Z, Ghanbarian S, Shafiei F. The Effects of Silver, Zinc Oxide, and Titanium Dioxide Nanoparticles Used as Dentin Pretreatments on the Microshear Bond Strength of a Conventional Glass Ionomer Cement to Dentin. *Int J Nanomedicine* 2020;15:4755-4762. doi:10.2147/IJN.S262664.

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. doi: 10.1007/s10266-019-00427-5.

Malekhoseini Z, Rezvani MB, Niakan M, Atai M, Bassir MM, Alizade HS, Siabani S. Effect of zinc oxide nanoparticles on physical and antimicrobial properties of resin-modified glass ionomer cement. *Dent Res J (Isfahan)*. 2021 25;18:73. doi:10.4103/1735-3327.326646.

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 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.

Oberdörster G, Oberdörster E, Oberdörster J. Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environ Health Perspect* 2005;113:823-839. doi:10.1289/ehp.7339.

Pinto NS, Jorge GR, Vasconcelos J, Probst LF, De-Carli AD, Freire A. Clinical efficacy of bioactive restorative materials in controlling secondary caries: a systematic review and network meta-analysis. *BMC Oral Health* 2023;23: 394. doi:10.1186/s12903-023-03110-y.

Pitts N, Baez R, Diaz-Guallory C, et al. Early Childhood Caries: IAPD Bangkok Declaration. *Int J Paediatr Dent* 2019;29:384-386.

Pourhajibagher M, Salehi Vaziri A, Takzaree N, Ghorbanzadeh R. Physico-mechanical and antimicrobial properties of an orthodontic adhesive containing cationic curcumin doped zinc oxide nanoparticles subjected to photodynamic therapy. *Photodiagnosis Photodyn Ther* 2019;25:239-246. doi:10.1016/j.pdpdt.2019.01.002.

Premanathan M, Karthikeyan K, Jeyasubramanian K, Manivannan G. Selective toxicity of ZnO nanoparticles toward Gram-positive bacteria and cancer cells by apoptosis through lipid peroxidation. *Nanomedicine* 2011;7:184-192. doi:10.1016/j.nano.2010.10.001.

Pushpalatha C, Suresh J, Gayathri VS, et al. Zinc Oxide Nanoparticles: A Review on Its Applications in Dentistry. *Front Bioeng Biotechnol* 2022;10:917990. doi:10.3389/fbioe.2022.917990.

Rahman HS, Othman HH, Abdullah R, Edin HYAS, Al-Haj NA. Beneficial and toxicological aspects of zinc oxide nanoparticles in animals. *Vet Med Sci* 2022;8:1769-1779. doi:10.1002/vms3.814.

Saadat M, Moradian M, Mirshekari B. Evaluation of the Surface Hardness and Roughness of a Resin-Modified Glass Ionomer Cement Containing Bacterial Cellulose Nanocrystals. *Int J Dent* 2021;8231473. doi: 10.1155/2021/8231473.

Santos SS, Delbem ACB, Moraes JCS, Souza JAS, Oliveira LQC, Pedrini D. Resin-modified glass ionomer containing calcium glycerophosphate: physico-mechanical properties and enamel demineralization. *J Appl Oral Sci* 2019;21;27:e20180188. doi:10.1590/1678-7757-2018-0188.

Sharafeddin, F., Jowkar, Z., & Bahrani, S. (2021). Comparison between the effect of adding microhydroxyapatite and chitosan on surface roughness and Microhardness of resin modified and conventional glass ionomer cements. *Journal of clinical and experimental dentistry*; 2021;13(8), e737–e744. <https://doi.org/10.4317/jced.55996>.

Silva KG, Pedrini D, Delbem ACB, Cannon M. Effect of pH variations in a cycling model on the properties of restorative materials. *Oper Dent* 2007;32:328-335. doi: 10.2341/06-89.

Soygun K, Soygun A, Dogan MC. The effects of chitosan addition to glass ionomer cement on microhardness and surface roughness. *J Appl Biomater Funct Mater* 202;19:2280800021989706. doi: 10.1177/2280800021989706.

Takeshita EM, Danelon M, Castro LP, Cunha RF, Delbem AC. Remineralizing Potential of a Low Fluoride Toothpaste with Sodium Trimetaphosphate: An in situ Study. *Caries Res* 2016;50:571-578.

Tiveron AR., Delbem AC, Gaban G, Sassaki KT, Pedrini D. Effect of resin composites with sodium trimetaphosphate with or without fluoride on hardness, ion release and enamel demineralization. *American journal of dentistry*, 2013;26(4):201–206.

Torres PJ, Phan HT, Bojorquez AK, Garcia-Godoy F, Pinzon LM. Minimally Invasive Techniques Used for Caries Management in Dentistry. A Review. *J Clin Pediatr Dent* 2021;45:224-232. doi:10.17796/1053-4625-45.4.2.

Vaezi MR, Sadrnezhad SK. Nanopowder synthesis of zinc oxide via sol-chemical processing. *Materials and Design* 2007;28:515-519.

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. doi: 10.1016/j.dental.2018.03.001.

Valtsifer VA, Sivtseva AV, Kondrashova NB, et al. Influence of Synthesis Conditions on the Properties of Zinc Oxide Obtained in the Presence of Nonionic Structure-Forming Compounds. *Nanomaterials (Basel)* 2023;13:2537. doi:10.3390/nano13182537.

Woźniak-Budych MJ, Staszak M, Staszak K. A critical review of dental biomaterials with an emphasis on biocompatibility. *Dent Med Probl* 2023;60:709-739. doi:10.17219/dmp/172732.

Wu C, Qiao X, Chen J; Wang H; Tan F; Li S. A novel chemical route to prepare ZnO nanoparticles. *Mater Lett* 2006;60:1828-1832. doi:10.1016/j.matlet.2005.12.046.

Yin IX, Zhang J, Zhao IS, Mei ML, Li Q, Chu CH. The Antibacterial Mechanism of Silver Nanoparticles and Its Application in Dentistry. *Int J Nanomedicine* 2020;15:2555-2562. doi:10.2147/IJN.S246764.

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. doi: 10.1111/idj.12478.

Lista de Tabelas

Legenda de Tabela

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

Lista de figuras

Legenda de Figuras

Figura 1: Imagens de Espectroscopia de Energia Dispersiva de Raios X (EDS), Microscopia Eletrônica de Varredura e Difratomogramas de Raios X das ZnONPs. Aumento: 20.000 x.

Figura 2: Imagens obtidas através do MEV e análise da % atômica de elementos químicos nos Cimentos Ionoméricos Experimentais: (a) CIVMR; (b) CIVMR-1,0%ZnONPs; (c) CIVMR-2,0%ZnONPs; (d) CIVMR-14,0%TMP; (e) CIVMR-1,0%ZnONPs-14,0%TMP; (f) CIVMR-2,0%ZnONPs-14,0%TMP ($\times 2000$). Letras minúsculas indicam diferenças estatísticas entre os grupos (ANOVA 2-critérios, Student-Newman-Keuls, $p < 0,001$). Asterisco: Depósito globulares, semelhantes a minerais.

Figura 3: Porcentagem do Grau de Conversão dos Monômeros (%GC, após 24 horas) de acordo com os Cimentos Ionoméricos Experimentais. Letras minúsculas indicam diferenças estatísticas entre os grupos (ANOVA 1-critério, Student-Newman-Keuls, $p < 0,001$).

Figura 4: Valores médios de F liberados nas soluções DE e RE em função do tempo (15 dias), 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 5: Valores médios ($\pm dp$, $n=4$) de adesão ao *S. Mutans* (Log_{10} -UFC/mL) de acordo com os Cimentos Ionoméricos Experimentais. Letras minúsculas indicam diferenças estatísticas entre os grupos (ANOVA 1-critério, Student-Newman-Keuls, $p < 0,001$).

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

Figura 7: Valores médios ($\pm dp$, $n=6$) da viabilidade celular pelo XTT (Biofilme *S. Mutans*, Log_{10} -UFC/mL) de acordo com os cimentos ionoméricos experimentais. Letras minúsculas indicam diferenças estatísticas entre os grupos (ANOVA 1-critério, Student-Newman-Keuls, $p < 0,001$).

Figura 8: Valores médios ($\pm dp$, $n=6$) do metabolismo celular após 24, 48 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: Imagens de Espectroscopia de Energia Dispersiva de Raios X (EDS), Microscopia Eletrônica de Varredura e Difratomogramas de Raios X das ZnONPs. Aumento: 20.000 x.

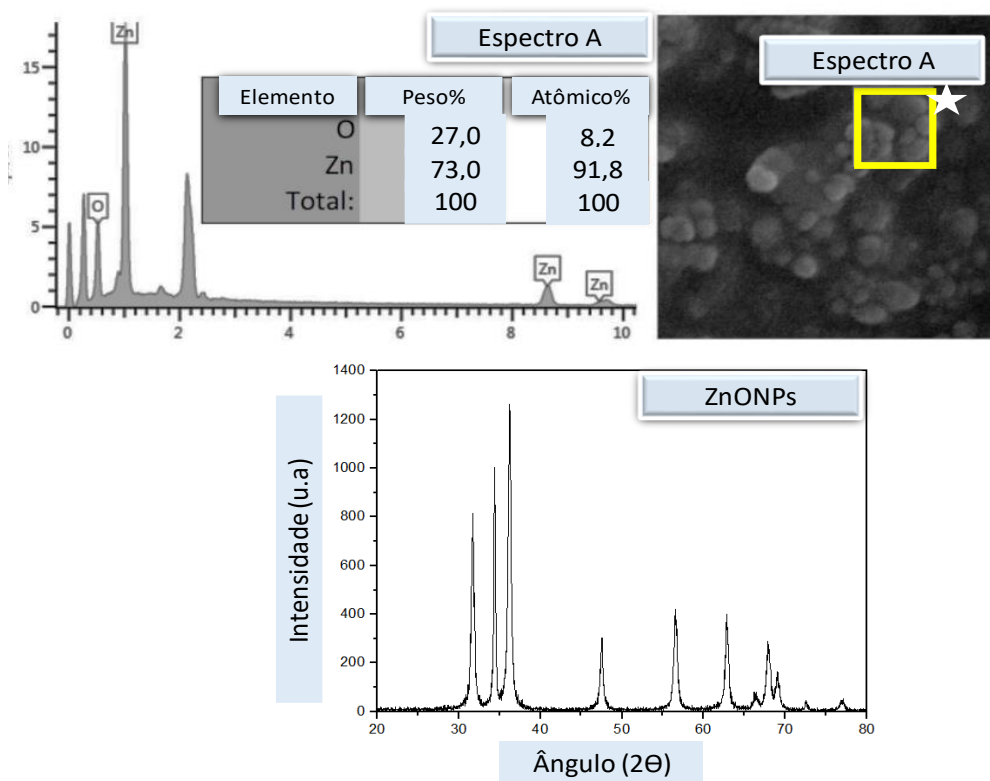


Tabela 1: Valores médios ($\pm dp$, $n=12$) dos dados de RC, RC, DS e RS de acordo com os Cimentos Ionoméricos Experimentais e tempo (24 horas e 7 dias).

Cimentos Ionoméricos Experimentais	RC	RC	RT	RT	DS	DS	RS
	MPa	MPa	MPa	MPa	KHN	KHN	Ra
Tempo	24 horas	7 dias	24 horas	7 dias	24 horas	7 dias	24 horas
CIVMR	105,8 (1,1)a,A	133,8 (1,1)a,B	20,6 (1,0)a,A	22,1 (0,8)a,A	55,2 (3,0)a,A	69,8 (4,1)a,B	0,4 (0,05)a
CIVMR-1,0%ZnONPs	109,3 (0,9)a,A	125,5 (0,8)b,B	20,4 (1,1)a,A	18,4 (1,1)a,A	74,0 (3,7)b,A	87,4 (3,7)a,B	0,4 (0,04)a
CIVMR-2,0%ZnONPs	129,6 (1,3)b,A	147,7 (0,8)c,B	18,8 (1,1)a,A	24,5 (1,0)a,A	43,2 (2,4)c,A	66,4 (4,6)b,B	0,5 (0,04)a
CIVMR-14,0%TMP	102,0 (0,5)a,A	102,6 (0,6)d,A	19,2 (1,4)a,A	19,5 (1,2)a,A	63,7 (2,3)d,A	74,8 (4,9)c,B	0,5 (0,08)a
CIVMR-1,0%ZnONPs-14,0%TMP	87,4 (1,1)c,A	114,5 (0,7)e,B	18,6 (0,6)a,A	21,9 (0,8)a,A	56,7 (3,4)a,A	65,1 (2,0)a,B	0,5 (0,05)a
CIVMR-2,0%ZnONPs-14,0%TMP	94,2 (0,2)c,A	165,1 (1,1)f,B	18,9 (1,2)a,A	30,3 (1,5)b,B	80,6 (5,3)e,A	107,5 (4,4)d,B	0,4 (0,03)a

Letras minúsculas indicam diferenças estatísticas entre os cimentos ionoméricos experimentais de acordo com cada tempo. Letras maiúsculas diferenças entre os períodos (ANOVA, 2 critérios, Student-Newman-Keuls, $p < 0,001$). **RC: Resistência à compressão; RT: Resistência à tração; DS: Dureza de superfície.

Figura 2: Imagens obtidas através do MEV e análise da % atômica de elementos químicos nos Cimentos Ionoméricos Experimentais: (a) CIVMR; (b) CIVMR-1,0%ZnONPs; (c) CIVMR-2,0%ZnONPs; (d) CIVMR-14,0%TMP; (e) CIVMR-1,0%ZnONPs-14,0%TMP; (f) CIVMR-2,0%ZnONPs-14,0%TMP ($\times 2000$). Asterisco: Depósito globulares, semelhantes a minerais.

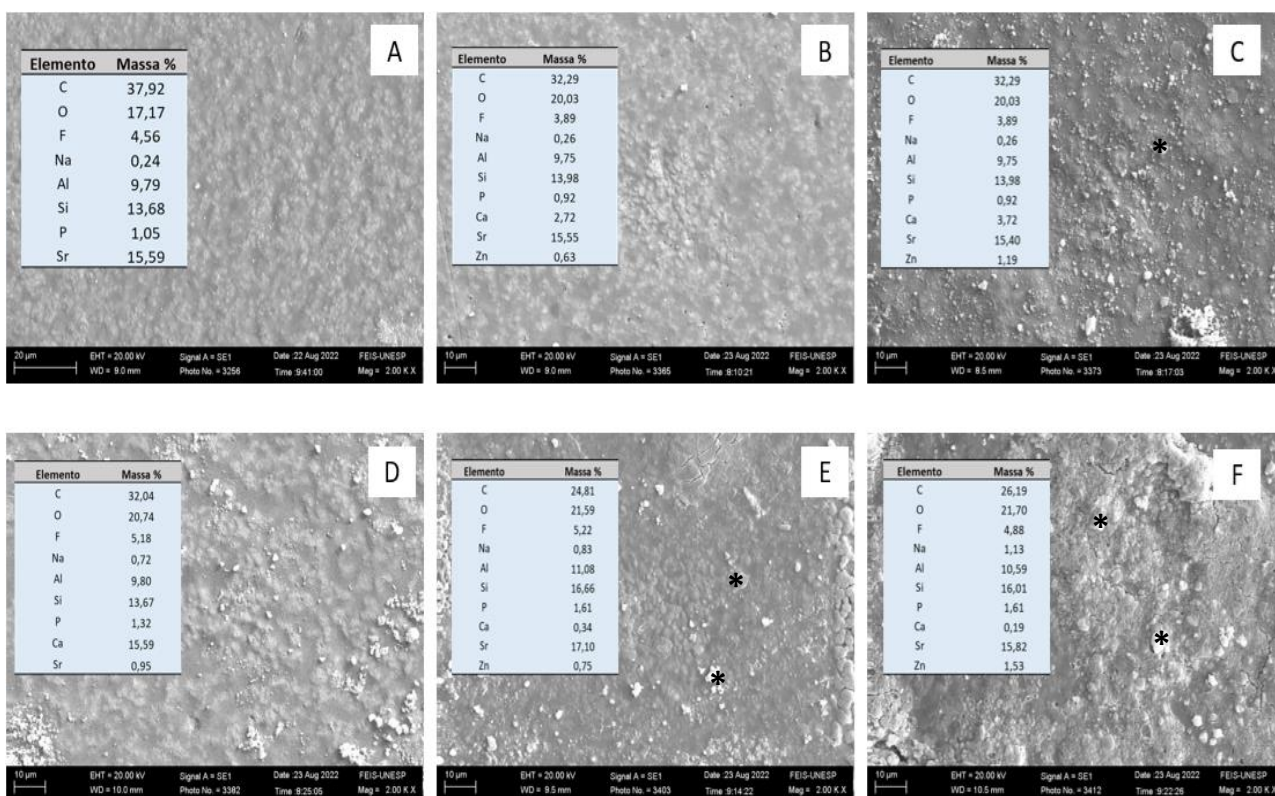


Figura 3: Porcentagem do Grau de Conversão dos Monômeros (%GC, após 24 horas) de acordo com os Cimentos Ionoméricos Experimentais. Letras minúsculas indicam diferenças estatísticas entre os grupos (ANOVA 1-critério, Student-Newman-Keuls, $p < 0,001$).

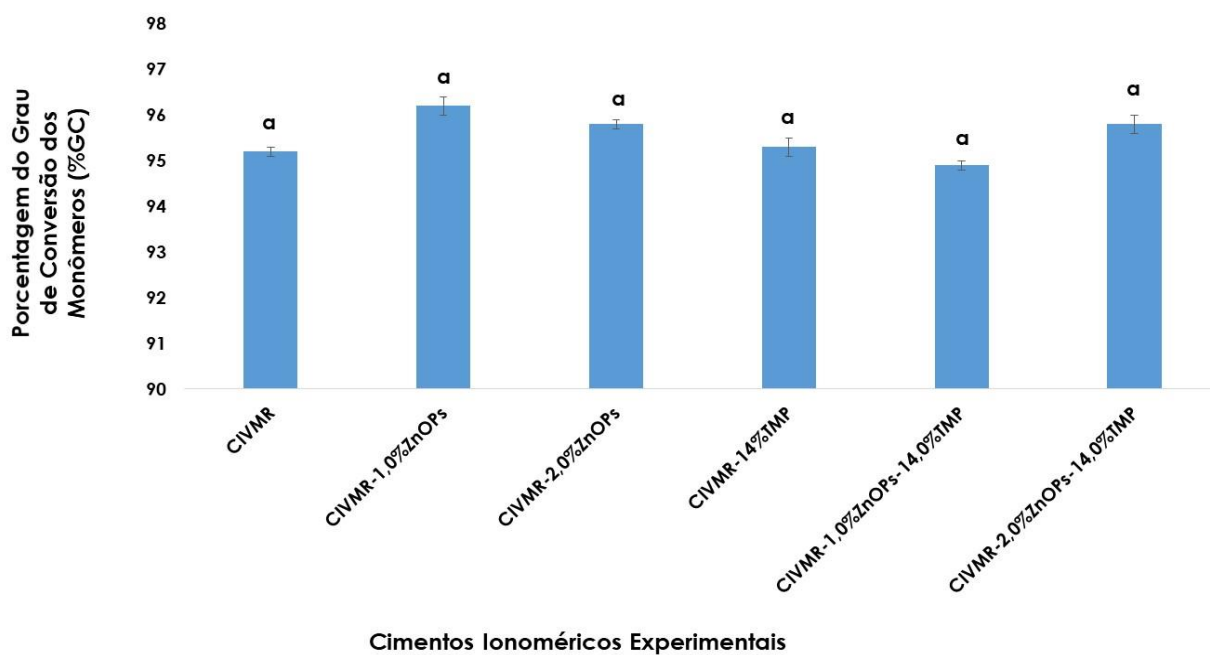


Figura 4: Valores médios de F liberados nas soluções DE e RE em função do tempo (15 dias), de acordo com os Cimentos Ionoméricos Experimentais. Letras minúsculas indicam diferenças estatísticas entre os grupos (ANOVA 2-critérios, Student-Newman-Keuls, $p < 0,001$).

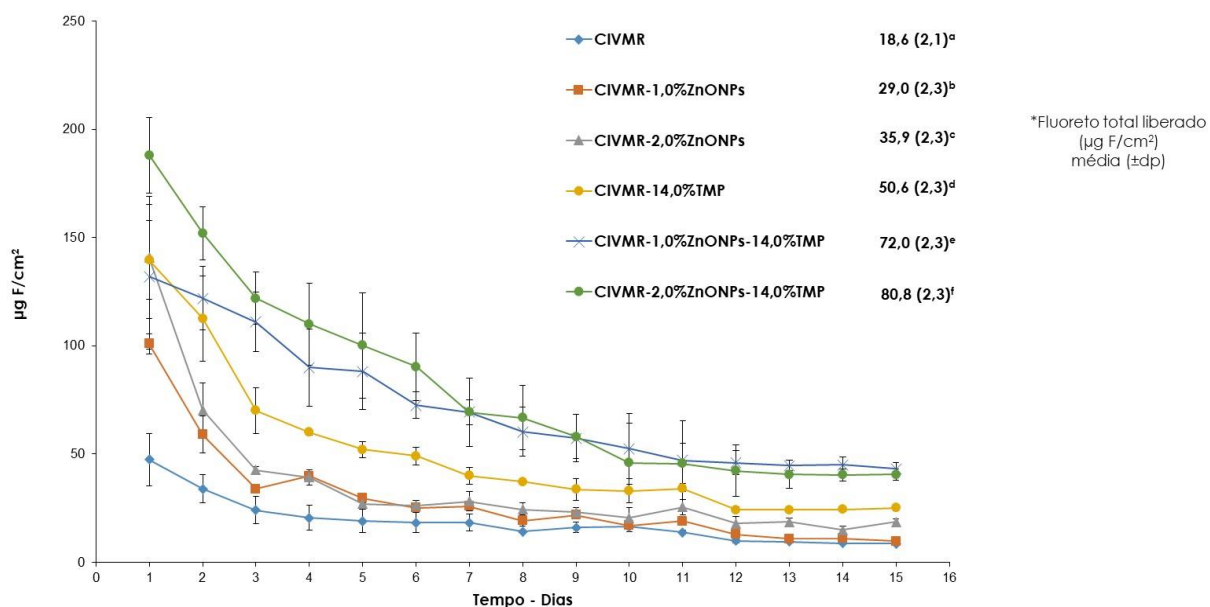


Figura 5: Valores médios ($\pm$ dp, n=4) de adesão ao *S. Mutans* (Log_{10} -UFC/mL) de acordo com os Cimentos Ionoméricos Experimentais. Letras minúsculas indicam diferenças estatísticas entre os grupos (ANOVA 1-critério, Student-Newman-Keuls, $p < 0,001$).

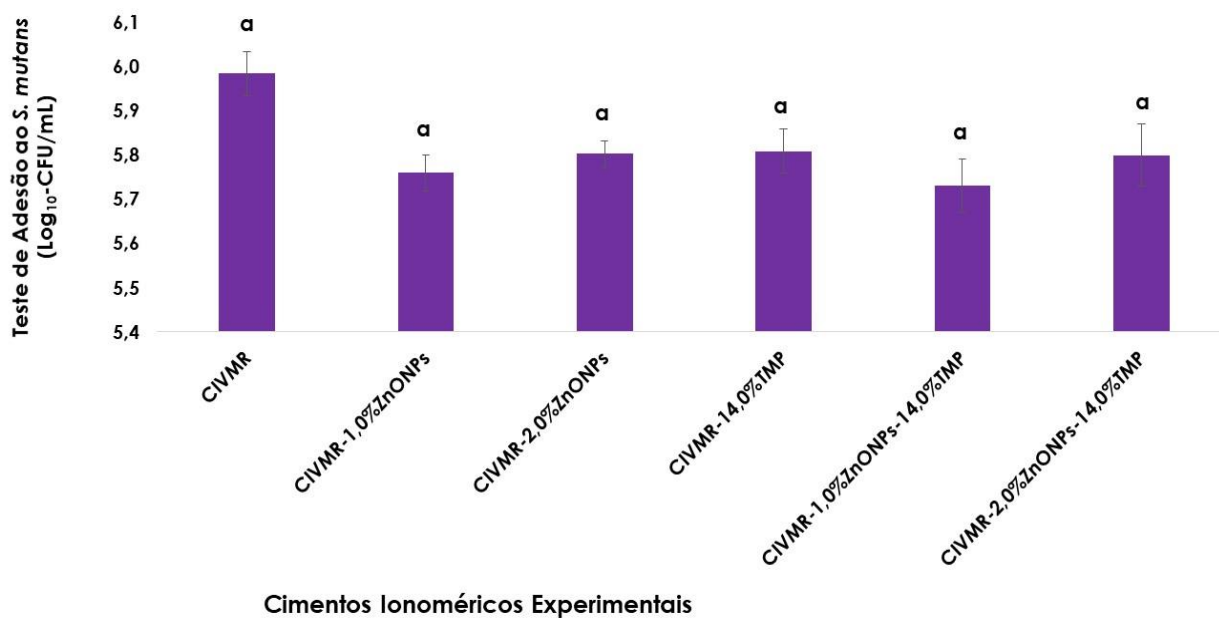


Figura 6: Valores médios ($\pm$ dp, n=6) de crescimento de biofilme (*S. Mutans*, Log₁₀-UFC/mL) de acordo com os cimentos ionoméricos experimentais. Letras minúsculas indicam diferenças estatísticas entre os grupos (ANOVA 1-critério, Student-Newman-Keuls, $p < 0,001$).

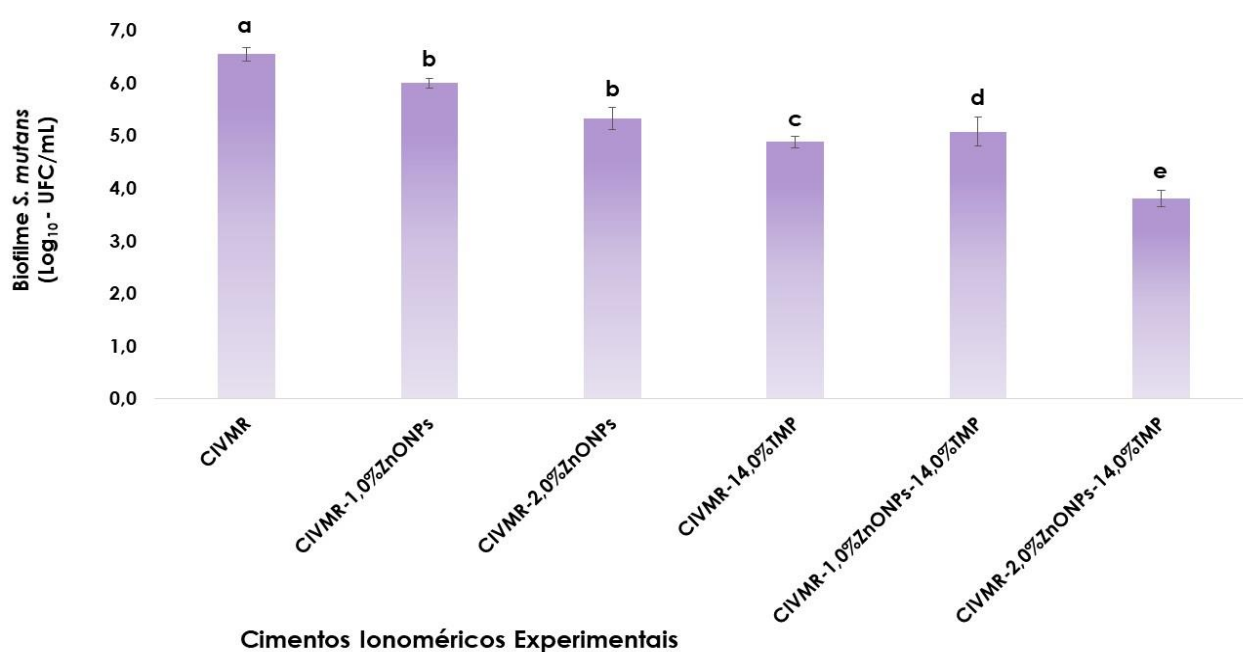


Figura 7: Valores médios ($\pm$ dp, n=6) da viabilidade celular pelo XTT (Biofilme *S. Mutans*, Log₁₀-UFC/mL) de acordo com os cimentos ionoméricos experimentais. Letras minúsculas indicam diferenças estatísticas entre os grupos (ANOVA 1-critério, Student-Newman-Keuls, $p < 0,001$).

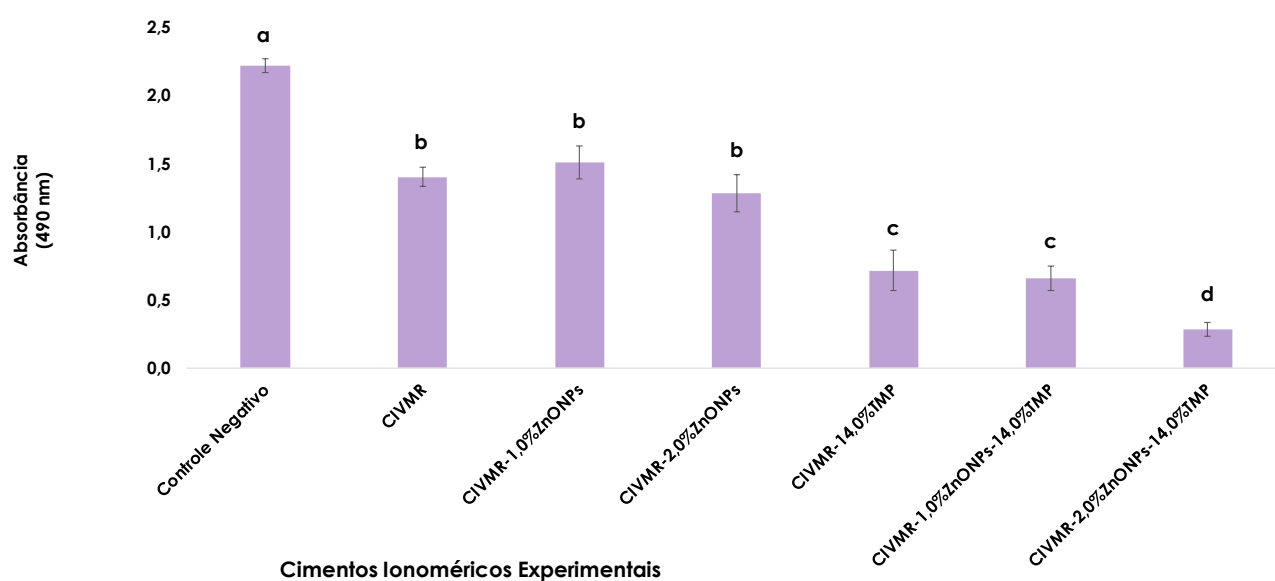
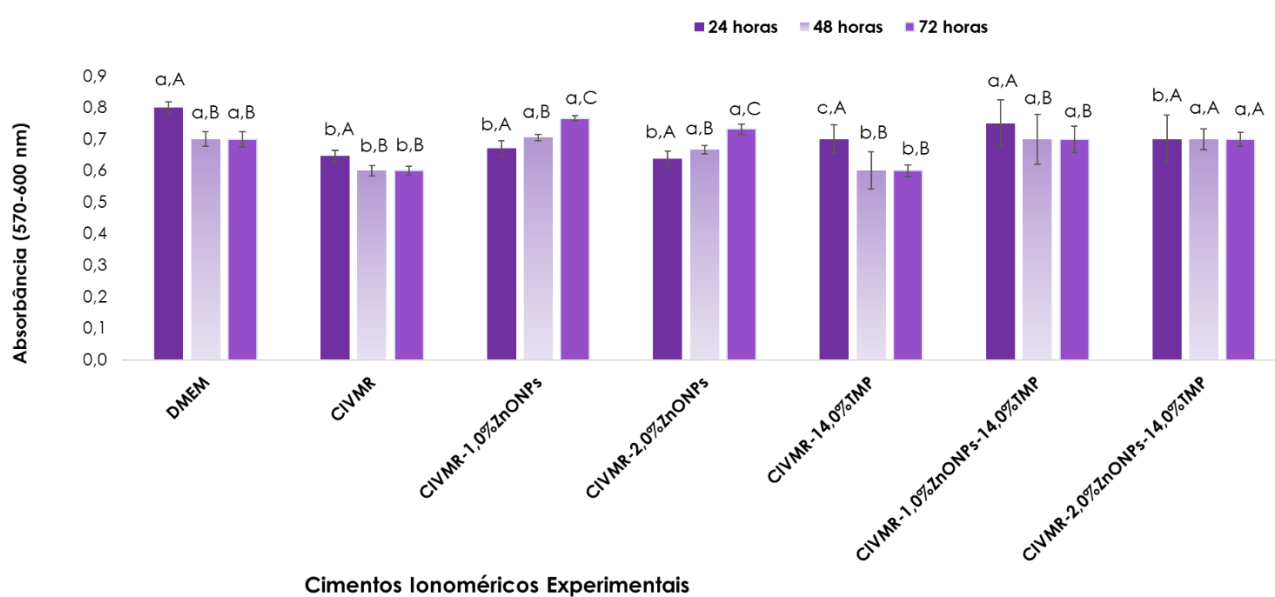


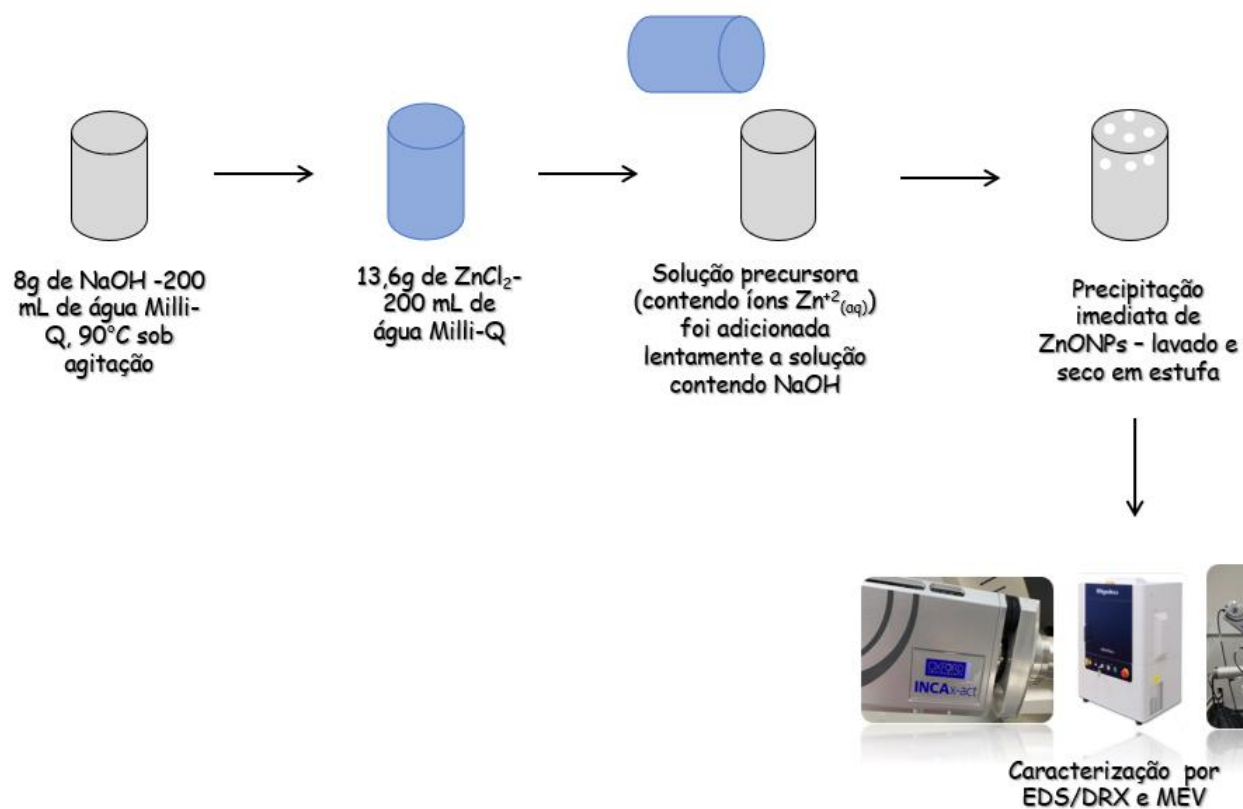
Figura 8: Valores médios ($\pm$ dp, n=6) do metabolismo celular após 24, 48 e 72 horas de acordo com os cimentos ionoméricos experimentais. Letras minúsculas indicam diferenças estatísticas entre os grupos e as maiúsculas entre os tempos (ANOVA 2-critérios, Student-Newman-Keuls, $p < 0,001$).



ANEXOS

7.1 ANEXO A

Síntese e Caracterização das ZnONPs



7.2 ANEXO B

Preparo da mistura dos CIVMRs

*Grupos Experimentais:*

Grupo 1: CIVMR sem ZnONPs/TMP (CIVMR, Fuji II LC)



Grupo 2: CIVMR-1,0%ZnONPs



Grupo 3: CIVMR-2,0%ZnONPs



Grupo 4: CIVMR-14,0%TMP



Grupo 5: CIVMR-1,0%ZnONPs-14,0%TMP

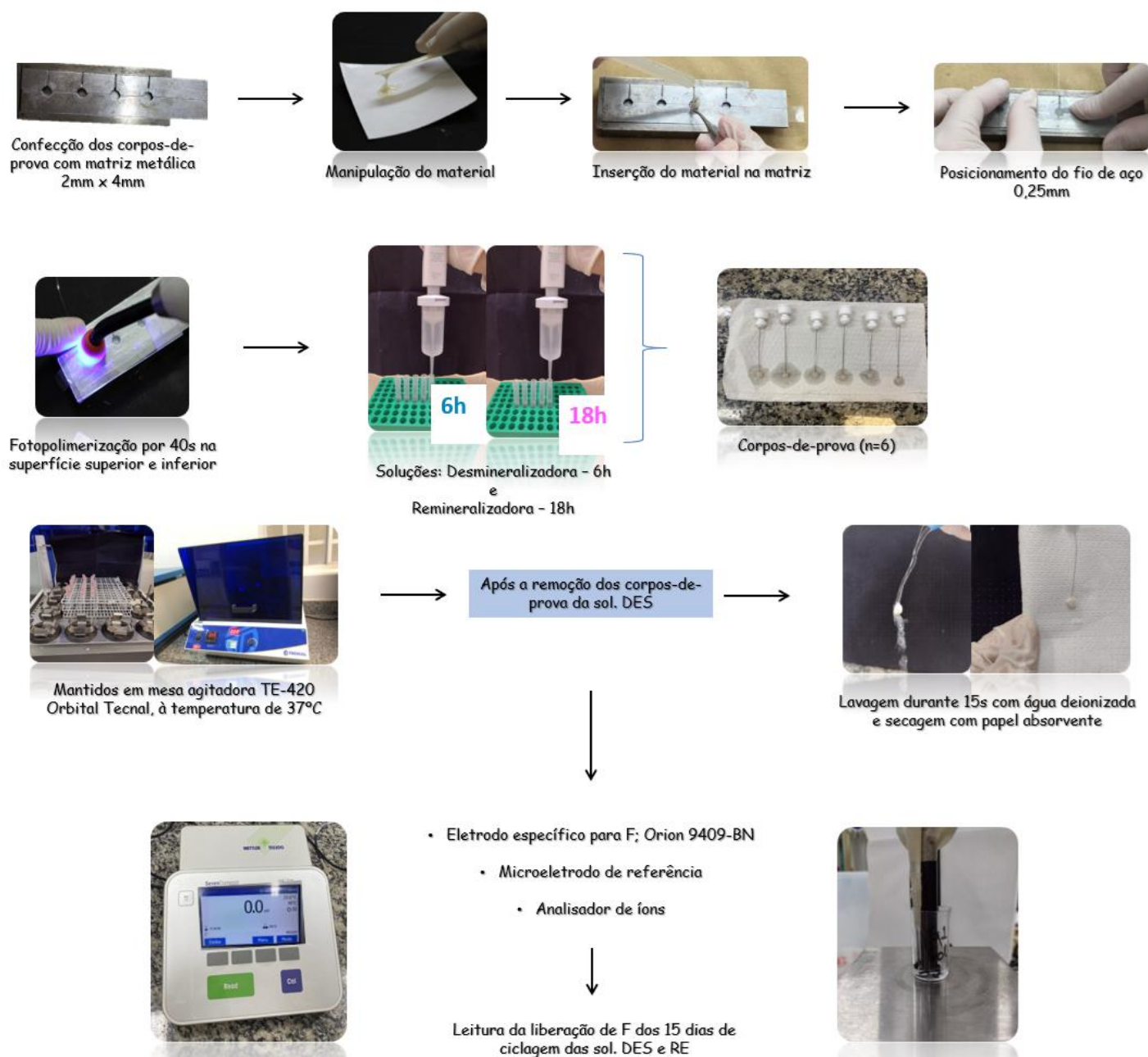


Grupo 6: CIVMR-2,0%ZnONPs-14,0%TMP



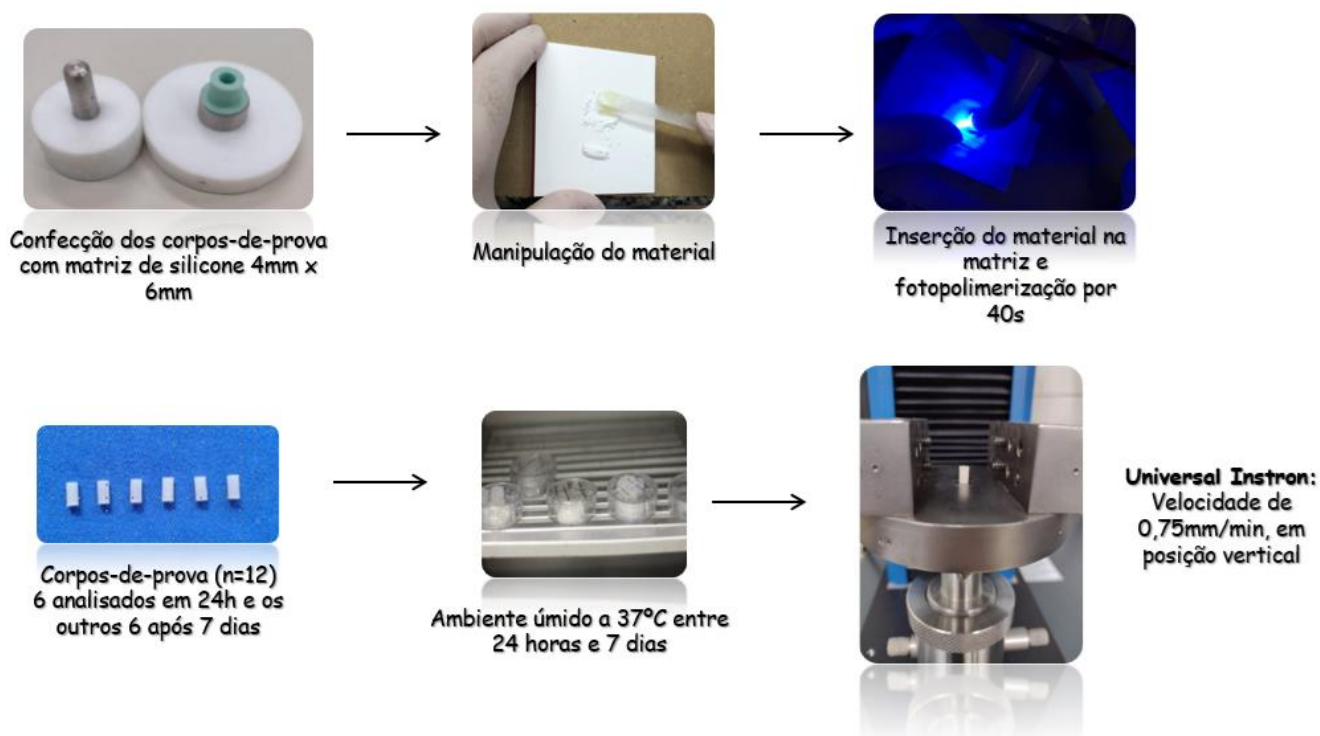
7.3 ANEXO C

Liberação de F dos CIVMRs



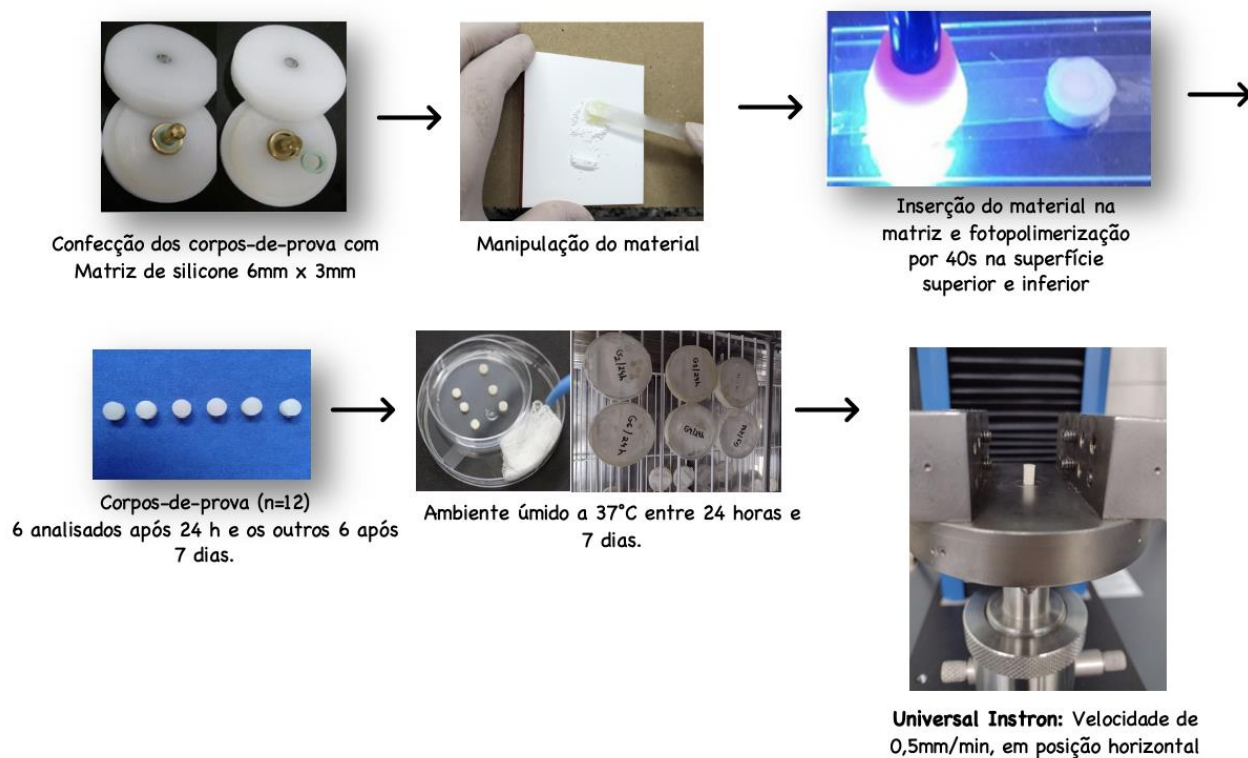
7.4 ANEXO D

Avaliação da Resistência à Compressão



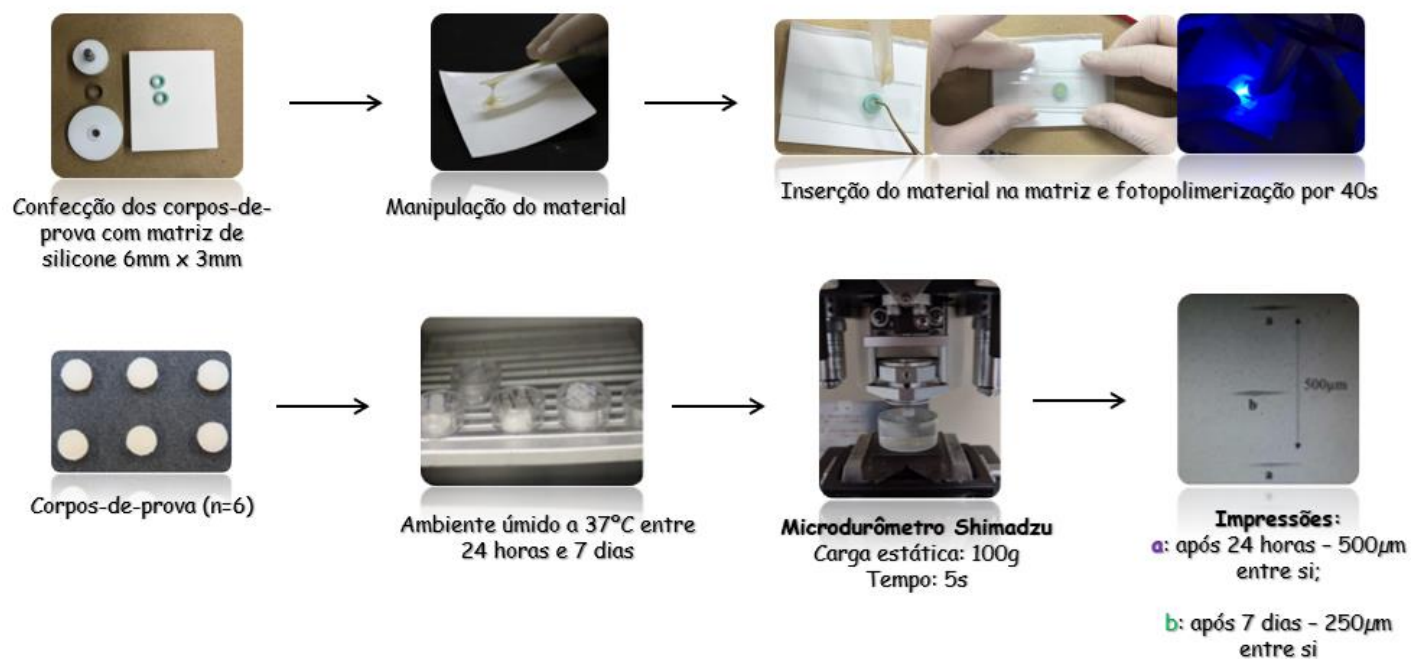
7.5 ANEXO E

Avaliação da Resistência à Tração



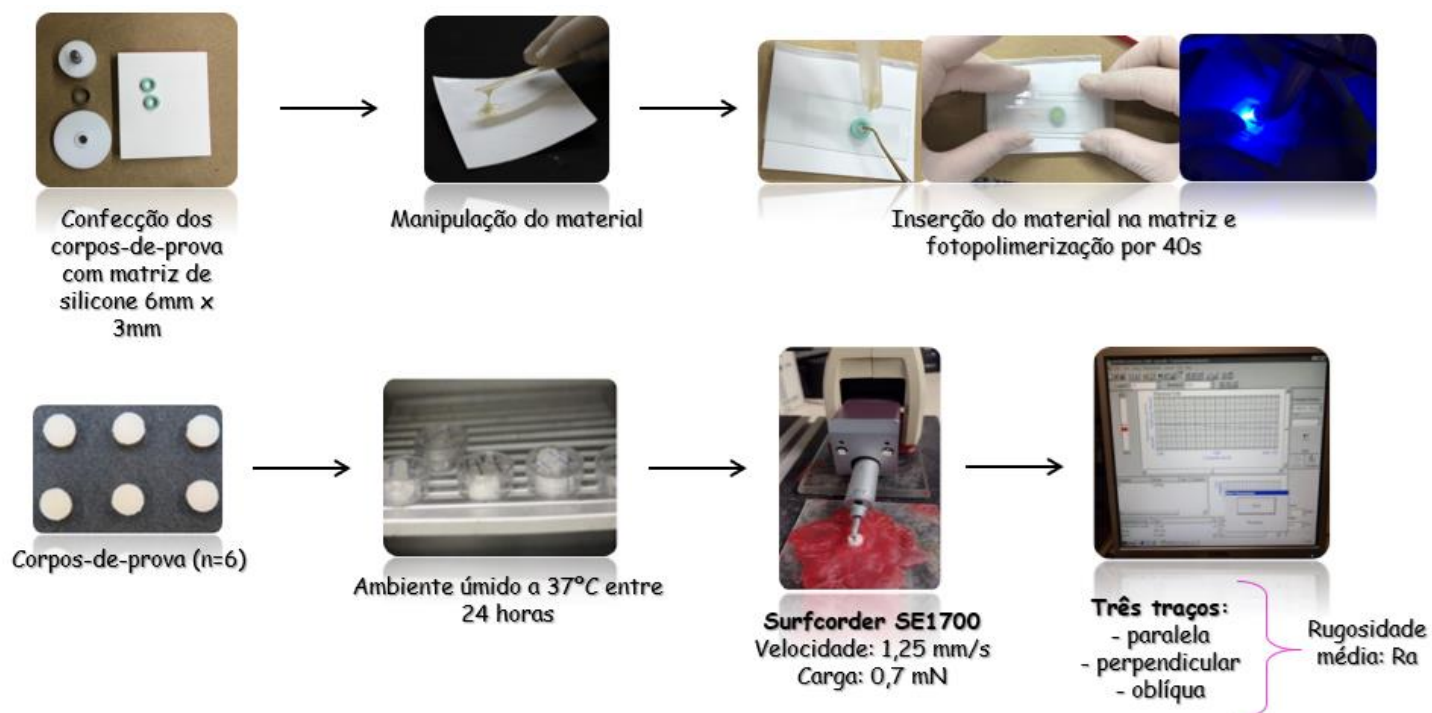
7.6 ANEXO F

Avaliação da Dureza de Superfície



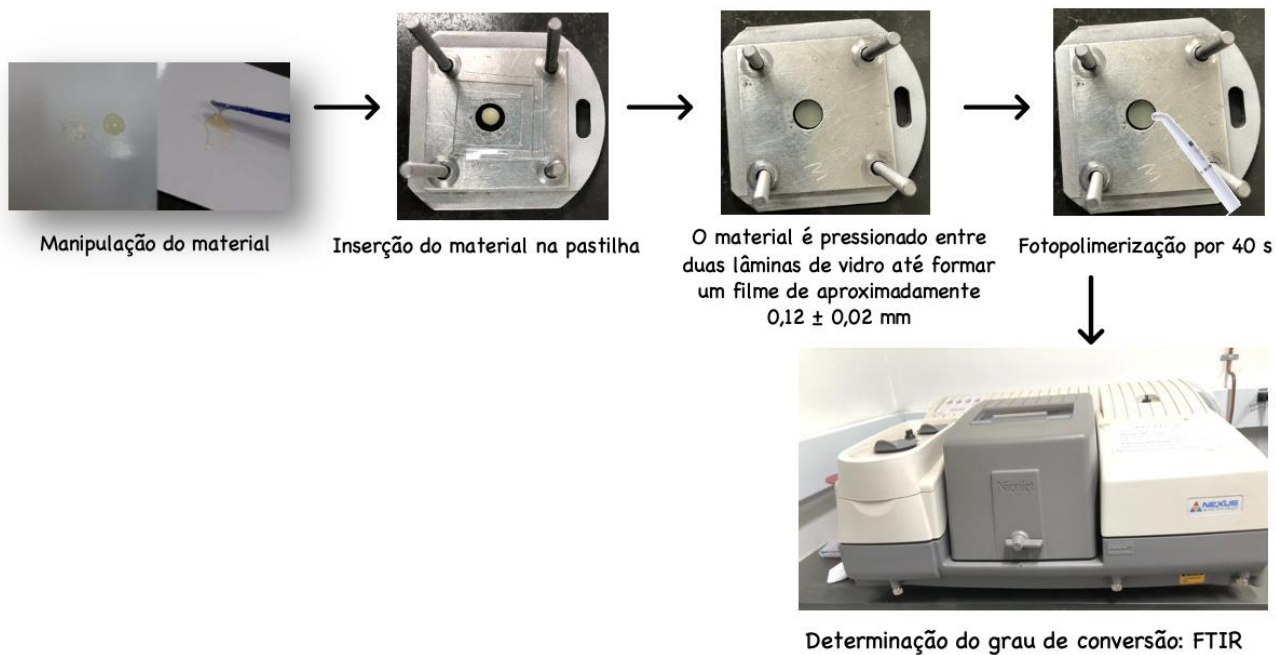
7.7 ANEXO G

Avaliação da Rugosidade Superficial



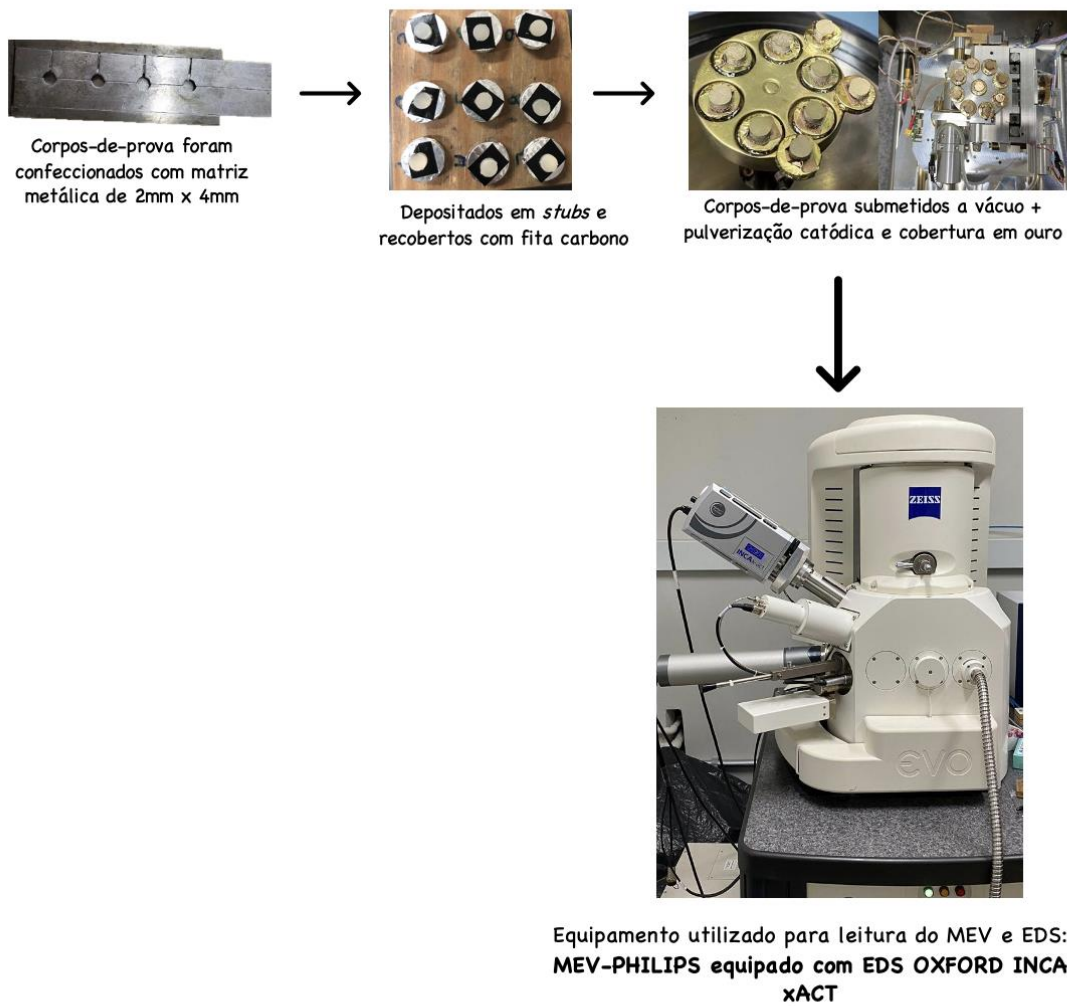
7.8 ANEXO H

Determinação da Porcentagem do Grau de Conversão dos Monômeros

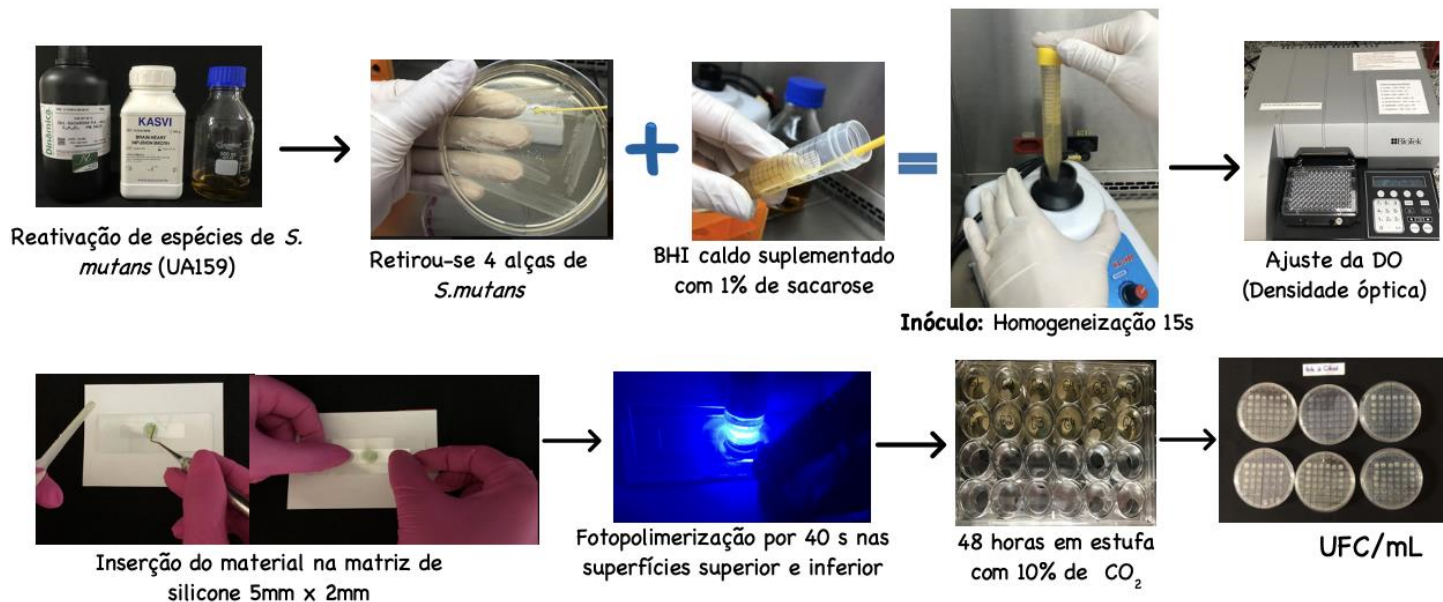


7.9 ANEXO I

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

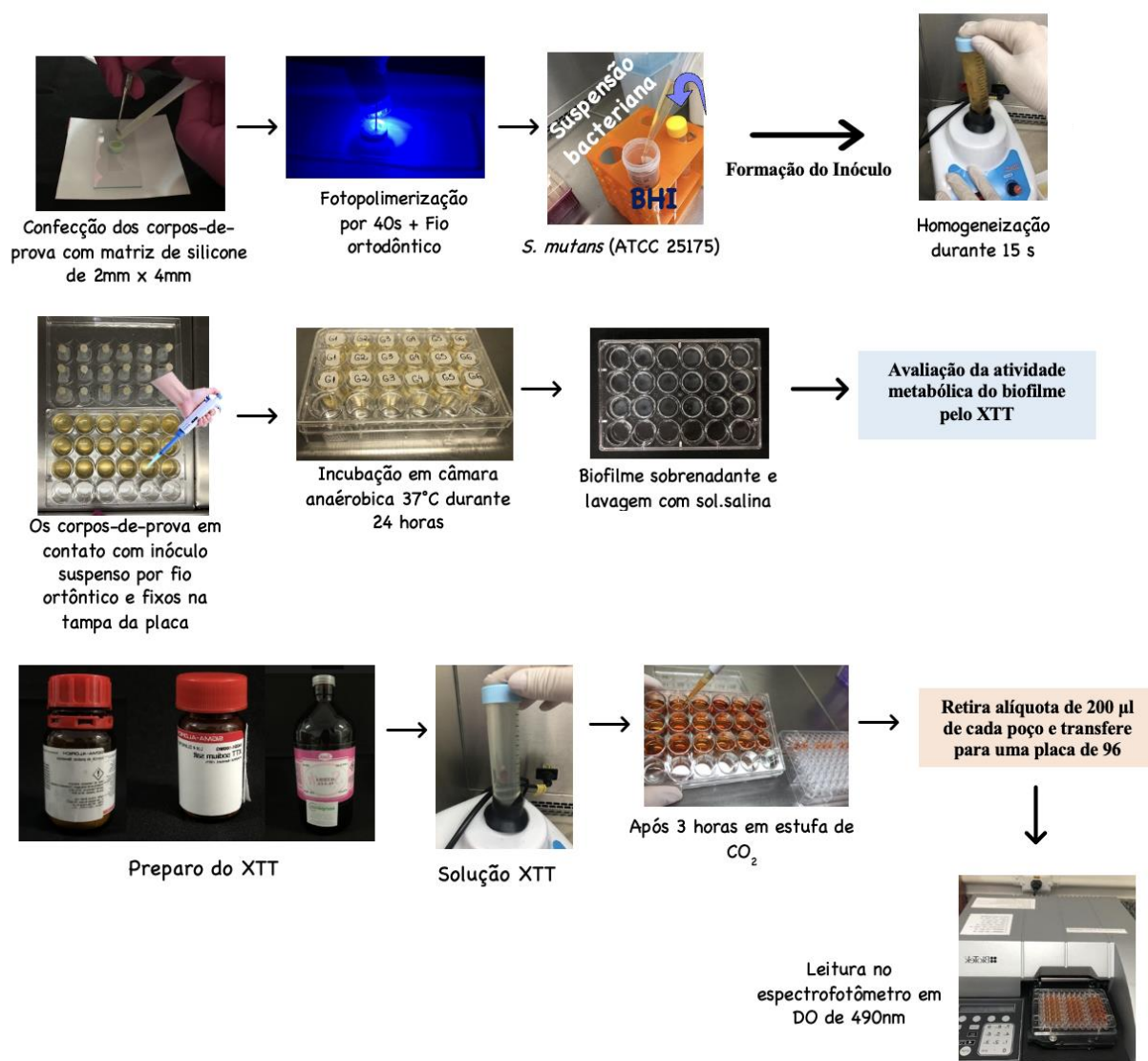


7.10 ANEXO J

Teste de Adesão ao *Streptococcus mutans*

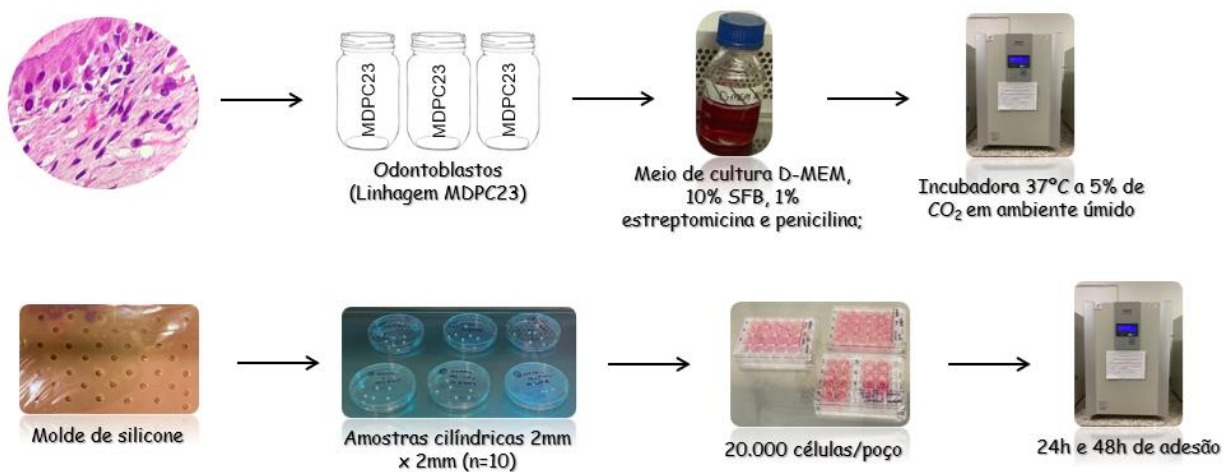
7.11 ANEXO K

Avaliação do Biofilme pelo método do XTT



7.12 ANEXO L

Análise da Citotoxicidade dos CIVMR's

*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)