

Gabriela Leal Peres Fernandes

**Avaliação das propriedades físico-mecânicas e
microbiológicas de um novo cimento de ionômero de vidro
modificado por resina contendo nanopartículas de
trimetafosfato de sódio e quitosana fosforilada: estudo *in vitro***

Araçatuba – SP
2023

Gabriela Leal Peres Fernandes

Avaliação das propriedades físico-mecânicas e microbiológicas de um novo cimento de ionômero de vidro modificado por resina contendo nanopartículas de trimetafosfato de sódio e quitosana fosforilada: 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

Coorientador: Prof^º. Titular. Alberto Carlos Botazzo Delbem

Araçatuba – SP
2023

Catálogo-na-Publicação (CIP)

Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

F363a	<p>Fernandes, Gabriela Leal Peres.</p> <p>Avaliação das propriedades físico-mecânicas e microbiológicas de um novo cimento de ionômero de vidro modificado por resina contendo nanopartículas de trimetafosfato de sódio e quitosana fosforilada: estudo in vitro / Gabriela Leal Peres Fernandes. - Araçatuba, 2023</p> <p>76 f. : il. ; tab.</p> <p>Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia de Araçatuba</p> <p>Orientadora: Profa. Marcelle Danelon</p> <p>Coorientador: Prof. Alberto Carlos Botazzo Delbem</p> <p>1. Cárie dentária 2. Esmalte dentário 3. Ortodontia 4. Microbiota 5. Fosfatos 6. Quitosana 7. Desmineralização do dente I. T.</p> <p>Black D27 CDD 617.645</p>
-------	---

Claudio Hideo Matsumoto – CRB-8/5550

Dados Curriculares

Gabriela Leal Peres Fernandes

Nascimento	06.01.1994 – Iturama – MG
Filiação	Amarildo Dos Santos Peres Mônica Aparecida Leal Peres
2015/2018	Curso de Graduação em Odontologia pela Universidade Brasil – Campus Fernandópolis – SP
2021/2023	Desenvolvimento de Projeto de Mestrado com auxílio da Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).
Associações	CROSP - Conselho Regional de Odontologia de São Paulo. SBPqO - Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica. IADR- International Association for Dental Research.

Dedicatória

Gabriela Leal Peres Fernandes

Dedico este trabalho, *ao meu esposo Samuel,*

Que me incentivou a seguir o mestrado, por ser minha inspiração profissional e pessoal, o qual me espelho para seguir com força e garra os meus sonhos. Você é meu incentivo em seguir a docência, em lutar arduamente pelos objetivos e tornar-se a cada dia uma profissional melhor. Você é meu apoio e força para continuar a caminhada da vida. E, mesmo sendo tão corrido os seus dias, e a maioria dos dias cansativos você sempre esteve presente em todas as fases com palavras de doçura e carinho. O seu amor, cuidado e companheirismo foram pilares para continuar firme construindo essa história. Obrigada por tornar essa caminhada mais suave ao seu lado. Essa vitória é nossa.

Agradecimentos Especiais

A Deus,

Que com sua infinita sabedoria e amor preparou perfeitamente cada detalhe dessa jornada, pelas pessoas maravilhosas que colocou em meu caminho e pela experiência incrível que a pesquisa me proporcionou. Ele esteve comigo nos momentos mais felizes e difíceis.

Aos meus amados pais Amarildo e Mônica,

Obrigada pelo sinônimo de amor e união. Que acreditaram em minha capacidade de conquistar um título de grande importância. Vocês são meu entusiasmo para seguir caminhando e acreditando que Deus nos ajudará por mais difícil que seja a batalha. É muito bom saber que posso contar com vocês em todos os momentos. Obrigada pelas orações.

Às minhas irmãs Jéssica, Natália e sobrinha Maria Vitória

A vocês eu agradeço por serem meu grande amparo e tê-las como melhores amigas. Vocês foram essenciais nessa trajetória, pois sempre confiaram que eu seria capaz de chegar ao final e comemorarmos juntas essa vitória. Obrigada pelo carinho e força que dispensaram a mim.

Aos meu sogros Leonor e Marcolino

Vocês foram verdadeiros amigos durante a minha jornada, abraçaram minhas escolhas e estiveram prontos para me ajudar. Obrigada pelas orações.

Aos meus avós Antônio, Jacira, Batista e Nirce

Obrigada pelas palavras de carinho e amor, cada um com seu jeitinho mas com a sabedoria em comum. Feliz por vocês estarem aqui, com saúde, comemorando essa vitória.

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 querida Orientadora,

Professora Dra. Marcelle Danelon,

Por ter o privilégio de acompanhar de perto o seu trabalho e profissionalismo. Pela oportunidade de aprender com uma pessoa tão admirável. Deus abençoe pela dedicação e amor. A senhora é hoje uma das pessoas que eu mais admiro no campo da Odontologia. Eu não tenho palavras para agradecer o quanto eu aprendi e amadureci convivendo com uma pessoa tão ímpar. Obrigada por me guiar nos primeiros passos da pós-graduação e me ensinar a ser mais criteriosa, a buscar cada dia mais o conhecimento, aprender a indagar e a amar ainda mais minha profissão. Você, Professora Marcelle, deixou uma marca no meu coração que podemos ir além do que enxergamos, pois a humildade, paciência e garra nos leva a brilhantes conquistas. Obrigada por tornar essa

caminhada mais linda, leve e divertida. Desejo tudo de mais lindo a senhora. Minha querida Prof.

Ao meu Coorientador,

Professor Alberto Carlos Botazzo Delbem

Pela colaboração durante o desenvolvimento do trabalho. A sua contribuição é muito importante para concretização de todas as pesquisas desenvolvidas neste programa de pós-graduação. Muito obrigada!

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 conclusão dessa empreitada. O meu muito obrigada pelo carinho de cada um.

“Se cheguei até aqui foi porque me apoiei no ombro

dos gigantes”

Isaac Newton

Aos amigos da pós-graduação,

Francienne, por ter estendido sua mão para me ajudar nas etapas da pesquisa, Obrigada pelo carinho e paciência. Saiba que estarei sempre torcendo pela seu sucesso e felicidade. **Leticia e Gabrielle**, obrigada pelo

companheirismo durante as viagens para desenvolver a pesquisa, foram momentos de muito aprendizado e na grande maioria engraçados e especiais. Torço muito por cada uma. Amigos de outra Faculdade: **Analú**, Deus te abençoe por todo carinho, humildade e competência que foram dispensados durante a execução de uma grande parte da pesquisa. Eu aprendi demais com você. Você é um exemplo de pessoa e profissional. Estarei sempre torcendo por você. **Antônio**, obrigada pela humildade e paciência durante a orientação do experimento. Que Deus te retribua grandemente por toda ajuda.

A Professora Bruna Días,

Do Universidade Federal de de São Carlos pelo apoio na confecção das nanopartículas do trimetafosfato de sódio.

Ao Professor Valtencir Zucolotto,

Do Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, SP, Brasil pelo apoio na confecção da quitosana fosforilada.

Ao Professor João Carlos Sílos 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 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 Professor Mark L. Cannon,

Da Northwestern University e Ann and Robert Lurie Children's Hospital, Chicago, IL, EUA. pelo intermédio com a empresa GC® para concessão dos cimentos de ionômero de vidro utilizados na pesquisa.

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 Glauco Issamu Miyahara, digníssimo Diretor e Prof. Titular Alberto Botazzo Delbem 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 Manuela Marquesini Vanin,

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

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

Pela concessão de recursos (Processo: 2021/05532-7 e 2021/14835-3) a mim e a aluna de Iniciação Científica Manuela Marquesini Vanin.

Epígrafe

“A grandeza de um ser humano não está no quanto ele sabe, mas no quanto ele tem consciência que não sabe. O destino não é freqüentemente inevitável, mas uma questão de escolha. Quem faz escolha, escreve sua própria história, constrói seus próprios caminhos.”

Augusto Cury

Resumo

Gabriela Leal Peres Fernandes

Fernandes, GLP. **Avaliação das propriedades físico-mecânicas e microbiológicas de um novo cimento de ionômero de vidro modificado por resina contendo nanopartículas de trimetafosfato de sódio e quitosana fosforilada: estudo *in vitro***. 2023 76f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba 2023.

Objetivo: Avaliar *in vitro* o efeito da adição de nanopartículas de trimetafosfato de sódio (TMPnano) e quitosana fosforilada (Qui-Ph) em cimento de ionômero de vidro modificado por resina (CIVMR), utilizado em cimentação de bráquetes ortodônticos, sobre as propriedades mecânicas, antimicrobianas e citotóxicas. **Material e Métodos:** Foram confeccionados corpos-de-prova (n=6/grupo): 1) CIVMR sem TMPnano/Qui-Ph (Controle-Fuji Ortho LC); 2) CIVMR-14%TMPnano; 3) CIVMR-0,25%Qui-Ph; 4) CIVMR-0,5%Qui-Ph; 5) CIVMR-14%TMPnano-0,25%Qui-Ph e 6) CIVMR-14%TMPnano-0,5%Qui-Ph. Determinou-se a Resistência à Tração e Compressão (RT e RC), Dureza de Superfície (DS) após 24 horas/7 dias, e 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 (16 horas). A atividade antimicrobiana/antibiofilme foi avaliada pelo teste de adesão, crescimento de biofilme e avaliação do metabolismo do biofilme (XTT), respectivamente. Já a análise da Citotoxicidade foi determinada pelo método da resazurina. Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), seguido pelo teste Student-Newman-Keuls ($p < 0,001$). **Resultados:** Após 24 horas, o grupo CIVMR-14%TMPnano apresentou o menor valor de RT ($p < 0,001$); já grupo CIVMR-14%TMPnano-0,25%Qui-Ph apresentou o maior valor após 7 dias ($p < 0,001$). Para RC, o grupo Controle (24 horas) apresentou o maior valor ($p < 0,001$); após 7 dias o maior valor foi observado para o grupo CIVMR-14%TMPnano-0,25%Qui-Ph ($p < 0,001$). CIVMR-14%TMPnano, CIVMR-14%TMPnano-0,25%Qui-Ph, CIVMR-14%TMPnano-0,5%Qui-Ph apresentaram maior e similar liberação de F ao longo de 15 dias ($p > 0,001$). No teste de dureza (KNH) os grupos CIVMR-0,25%Qui-Ph; CIVMR-0,5%Qui-Ph; CIVMR-14%TMPnano-0,5%Qui-Ph apresentaram resultados similares ($p < 0,001$). O grupo CIVMR-14%TMPnano-0,25%Qui-Ph apresentou o melhor efeito inibitório sobre o crescimento microbiano ($p < 0,001$), assim como a maior eficácia sobre a viabilidade celular quando comparado aos demais grupos ($p < 0,001$). Para análise da citotoxicidade, no tempo de 24 horas, todos os grupos foram citocompatíveis e apresentaram metabolismo celular semelhante ao grupo com 100% de atividade metabólica

(Controle). Após 72 horas de exposição aos cimentos, somente o grupo CIVMR-14%TMPnano-0,25%Qui-Ph foi citocompatível já os demais grupos apresentaram valores similares ($p > 0,001$), os quais reduziram a atividade metabólica celular. Conclusão: Diante dos resultados obtidos conclui-se que a incorporação de 14%TMPnano e 0,25%Qui-Ph ao CIVMR melhorou suas propriedades, podendo ser uma estratégia clínica em pacientes com alto risco à cárie e submetidos ao tratamento ortodôntico.

Palavras-chave: Cárie; Esmalte dentário; Ortodontia; Microbiota; Fosfatos; Quitosana; Desmineralização do dente.

Abstract

Gabriela Leal Peres Fernandes

Fernandes, GLP. **Evaluation of the physical-mechanical and microbiological properties of a new resin-modified glass-ionomer cement containing nanoparticles of sodium trimetaphosphate and phosphorylated chitosan: *in vitro* study.** 2023 76f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba 2023.

Aim: To evaluate *in vitro* the effect of addition of sodium trimetaphosphate nano-sized particles (TMPnano) and phosphorylated chitosan (Chi-Ph) to resin-modified glass ionomer cement (RMGIC) used for orthodontic bracket cementation on mechanical, antimicrobial and cytotoxic properties. **Material and Methods:** Specimens (n=6) were made: 1) RMGIC without TMPnano/Qui-Ph (Control-Fuji Ortho LC); 2) RMGIC-14%TMPnano; 3) RMGIC-0.25%Qui-Ph; 4) RMGIC-0.5%Qui-Ph; 5) RMGIC-14%TMPnano-0.25%Qui-Ph and 6) RMGIC-14%TMPnano-0.5%Qui-Ph. The tensile and compressive strength, surface hardness and degree of conversion of the monomers were determined: RT; RC-MPa, SH-KNH, 24 hours/7 days. For fluoride (F) release, specimens were immersed in demineralizing (6 hours) and remineralizing (16 hours) solution. The antimicrobial/antibiofilm activity was evaluated by the agar diffusion test and biofilm metabolism evaluation (MTT), respectively. Cytotoxicity analysis was determined by the resazurin method. The results were submitted to analysis of variance (ANOVA), followed by the student-Newman-Keuls test ($p < 0.001$). **Results:** After 24 hours, the RMGIC-14%TMPnano group showed the lower RT value ($p < 0.001$); on the other side, the RMGIC-14%TMPnano-0.25%Qui-Ph group showed the highest value after 7 days ($p < 0.001$). For RC, the Control group (24 hours) showed the highest value ($p < 0.001$); after 7 days the highest value was observed for the RMGIC-14%TMPnano-0.25%Qui-Ph group ($p < 0.001$). RMGIC-14%TMPnano, RMGIC-14%TMPnano-0.25%Qui-Ph, RMGIC-14%TMPnano-0.5%Qui-Ph showed higher and similar release of F ($p > 0.001$). In the hardness test (KNH) the groups RMGIC-0.25%Qui-Ph; RMGIC-0.5%Qui-Ph; RMGIC-14%TMPnano-0.5%Qui-Ph showed similar results ($p < 0.001$). The RMGIC-14%TMPnano-0.25%Qui-Ph group showed the better effect on microbial growth ($p < 0.001$), as well as the highest efficacy on cell viability when compared to the other groups ($p < 0.001$). For the analysis of cytotoxicity at 24 hours, all groups were self-compatible and similar to the group with 100% metabolic activity (Control). After 72 hours of exposure to the cements, only the RMGIC-14%TMPnano-0.25%Qui-Ph group showed cell viability

comparable to the control group. The other groups showed similar values ($p > 0.001$), which reduced cellular metabolic activity. **Conclusion:** According to the results obtained, it can be concluded that the incorporation of TMPnano-Qui-Ph to RMGIC has enhanced its properties and may be a clinical strategy in patients at high risk of caries and submitted to orthodontic treatment.

Keywords: Caries; Dental enamel; Orthodontics; Microbiota; Phosphates; Chitosan; Tooth demineralization.

Lista de Abreviaturas

LISTA DE ABREVIATURAS

TMPnano Trimetafosfato nanoparticulado

CIVMR Cimento de Ionômero de Vidro Modificado por Resina

Qui-Ph Quitosana Fosforilada

RT Resistência à Tração

RC Resistência à Compressão

KNH Unidade de Dureza Knoop

DS Dureza de Superfície

Mpa Megapascal

TMP Trimetafosfato microparticulado

DRX Difração de raios-X

μ L Microlitros

g Gramas

mL Mililitros

$^{\circ}$ C Graus Celsius

min Minutos

μ m Micrometros

FTIR Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier

RMN Ressonância Magnética Nuclear

rpm Rotações por minuto

mm Milímetros

DES Solução Desmineralizadora

RE Solução Remineralizadora

Ca Cálcio

P Fósforo

F Fluoreto

Al Alumínio

KCl Cloreto de Potássio

Mol/l Mol por Litro

TISAB Tampão de Ajuste de Força Iônica Total

mmol/L Milimol por Litro

$\mu\text{g F/mL}$ Micrograma de flúor por microlitro

TISAB II Tampão ajustador de força iônica total

$\mu\text{g F/cm}^2$ Micrograma de flúor por centímetro quadrado

mm/min Milímetros por minuto

Kn Kilo Newton

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

C Carbono

MEV Microscopia Eletrônica de Varredura

EDS Espectroscopia de Energia Dispersiva

Kv Kilo volts

DO Densidade óptica

Nm Nanômetro

h Hora

cm Centímetros

UFC/ml Unidades Formadoras de Colônias por mililitro

Mg/L miligrama por Litro

cm² centímetro quadrado

µg/mL Microgramas por microlitro

UL/ml Unidade Internacional por mililitro

SBF Soro Fetal Bovino

ANOVA Análise de Variação

mA Miliampere

MET Microscopia Eletrônica de Transmissão

METAR Microscopia Eletrônica de Transmissão de Alta Resolução

O Oxigênio

H Hidrogênio

GC Grau de Conversão

g/ml grama por mililitro

Sumário

SUMÁRIO

RESUMO

1 INTRODUÇÃO	26
2. MATERIAL E MÉTODOS	28
3. RESULTADOS	34
4. DISCUSSÃO E CONCLUSÃO	38
5. AGRADECIMENTOS	43
6. REFERÊNCIAS	44
7. ANEXOS	
7.1 ANEXO A: Síntese e Caracterização do TMPnano	65
7.2 ANEXO B: Síntese e Caracterização da Qui-Ph	66
7.3 ANEXO C: Preparo da mistura dos CIVMR's	67
7.4 ANEXO D: Liberação de Flúor dos CIVMR's	68
7.5 ANEXO E: Avaliação da Resistência à Compresssão	69
7.6 ANEXO F: Avaliação da Resistência à Tração	70
7.7 ANEXO G: Avaliação da Dureza de Superfície	71
7.8 ANEXO H: Determinação do Grau de Conversão dos Monômeros	72
7.9 ANEXO I: Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Energia Dispersiva de Raios-X (EDS)	73
8 ANEXO J: Teste de Adesão ao <i>Streptococcus mutans</i>	74
8.1 ANEXO L: Avaliação do biofilme pelo método do XTT	75
8.2 ANEXO M: Análise da citotoxicidade dos CIVMR's	76

Artigo

Avaliação das propriedades físico-mecânicas e microbiológicas de um novo cimento de ionômero de vidro modificado por resina contendo nanopartículas de trimetafosfato de sódio e quitosana fosforilada: estudo *in vitro*

Gabriela Leal Peres Fernandes^a, Alberto Carlos Botazzo Delbem^a, Manuela Marquesini Vanim^b, Larissa Moreira Spinola de Castro Raucci^b, Paulo Tambasco de Oliveira^c, Antônio Secco Martorano^c, Valtencir Zucolotto^d, Bruna Dias^d, Fernanda Lourenção Brighenti^e, Analú Barros de Oliveira^e, Marcelle Danelon^{a,b}.

^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 quitosana em uma formulação de cimento ortodôntico.

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.

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

Email:marcelledanelon@hotmail.com

Palavras-chave: Cárie; Esmalte dentário; Ortodontia; Microbiota; Fosfatos; Quitosana; Desmineralização dentária.

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

Caries Research Guidelines - Karger Publishers

Introdução

1. Introdução

A cárie é uma doença de etiologia multifatorial caracterizada pela dissolução química da superfície dentária decorrente de eventos metabólicos que ocorrem no biofilme, o qual recobre a superfície afetada [Machiulskiene et al., 2019]. Embora tenha reduzido substancialmente a prevalência e gravidade da cárie em todo o mundo nas últimas décadas [Whelton et al., 2019] continua sendo um desafio de saúde pública. Relatórios globais recentes mostram que a saúde bucal não melhorou nos últimos 25 anos, com 573 milhões de crianças estimadas com cárie dentária não tratada em dentes decíduos [Peres et al., 2019]. Considerando sua etiologia multifatorial, diversos fatores podem contribuir para o risco de desenvolver a doença, dentre eles destaca-se o uso de aparelhos ortodônticos [Perkowski et al., 2019].

A aparatologia ortodôntica fornece locais de retenção adicionais para estagnação do biofilme [Oliveira et al., 2021] podendo resultar, na queda do pH do biofilme em repouso e conseqüentemente a desmineralização do esmalte e formação de lesões de mancha branca [Cardoso et al., 2022], decorrentes de ácidos orgânicos produzidos por microrganismos presentes no biofilme ao redor dos bráquetes e bandas [Chen et al., 2021]. Estudos anteriores [Lucchese et al., 2018; Contaldo et al., 2021] mostraram que as alterações que ocorrem na microflora bacteriana de pacientes com aparelhos ortodônticos, caracterizam-se como uma relação sinérgica dessas bactérias e o aumento do risco de cárie. Ainda, outros estudos mostram que no período de um ano de tratamento ortodôntico há um aumento significativo no crescimento de microrganismos orais como *S. mutans* e *Lactobacillus spp* gerando mudanças microbiológicas e bioquímicas do biofilme [Papageorgiou et al., 2018; Jing et al., 2019; Mummolo et al., 2020; Santonocito et., 2022]. Alguns métodos podem auxiliar na prevenção das lesões de manchas brancas, como: escovação diária com dentifrícios fluoretados, bochechos fluoretados, baixa ingestão de carboidratos fermentáveis e tratamento com flúor tópico [Khoroushi et al., 2017]. No entanto, a maioria desses métodos dependem da adesão do paciente, nem sempre obtendo uma boa aceitação. Dessa forma, alcançar uma adequada concentração de flúor na boca, sem dependência da total colaboração do paciente, seria o ideal [Benson et al., 2019]. Nesse sentido, é interessante que se utilize um material que combine a capacidade de ligação a superfície do esmalte e de liberação de flúor (F) tornando o material ao mesmo tempo ideal para cimentação de bandas [Fricker, 2022].

O uso de cimento de ionômero de vidro modificado por resina (CIVMR) foi relatado em 1995 para colagem de peças ortodônticas [Silverman et al., 1995]. O CIVMR tem menor tempo

de presa e reduz a sensibilidade à umidade comparado ao cimento de ionômero de vidro convencional e contém reação ácido-base e componentes polimerizáveis [Zhao et al., 2019]. Esse tipo de material também é usado para cimentação de aparelhos ortodônticos e possui a capacidade de liberação de F associado a adequada resistência de união para colagem de peças ortodônticas [Fricker, 2022]. Estudos mostraram que a presença de F no CIVMR torna-o mais eficaz do que a resina composta na redução da desmineralização do esmalte ao redor dos bráquetes [Andrucioli et al., 2017; Fricker, 2022]; além disso, não promove alterações na superfície dentária após a descolagem e não gera desgaste iatrogênico no esmalte após condicionamento ácido, quando comparado a resina composta [Andrucioli et al., 2017]. Por outro lado, a duração da liberação de flúor é curta, iniciando-se no momento da colagem, seguido de uma rápida diminuição dentro de um mês [Uysal et al., 2011; Dziuk et al., 2021], tornado seu efeito limitado na prevenção da cárie. Dessa forma julga-se importante potencializar o efeito do F presente na composição CIVMR para o uso ortodôntico, com a associação de agentes ativos que participem efetivamente do processo des/remineralização (como fosfatos nanoparticulado), assim como alterem as propriedades do biofilme bacteriano [da Silva et al., 2019; Kheur et al., 2020].

O trimetafosfato de sódio (TMP) tem recebido destaque na literatura, uma vez que possui alta afinidade pela hidroxiapatita reduzindo a dissolução mineral e consequentemente atuando na dinâmica da cárie [Danelon et al., 2015; Emerenciano et al., 2018; da Silva et al., 2019]. Em sua forma nanoparticulada (TMPnano), esse efeito torna-se ainda maior devido a redução do tamanho das partículas à escala nanométrica o que poderia proporcionar uma melhor interação mecânica com a matriz polimérica do material minimizando o efeito nas propriedades físicas e mecânicas do CIVMR [Emerenciano et al., 2018; da Silva et al., 2019]. Somando-se a isto, o aumento da área de superfície pode torná-las mais reativas e potencializar seu efeito anticárie, como demonstrado pelo estudo de da Silva et al. [2019], gerando efeitos mínimos nas propriedades mecânicas. Além disso produtos naturais, como a quitosana, tem disso utilizada como agente quelante de sais por exemplo os fosfatos orgânicos, podendo favorecer a imobilização de íons de cálcio na molécula e formação de sítios de nucleação [Zhang et al., 2014]. Dessa forma, a quitosana fosforilada (Qui-Ph), têm sido amplamente estudadas na Odontologia [Beltrame et al., 2018; Abedian et al., 2019]. A fosforilação da molécula de quitosana, resulta em uma molécula bastante reativa, com propriedade altamente quelante e mucoadesiva, biocompatível, propriedade osteoindutora e efeito sobre microrganismos cariogênicos [Sahariah & Masson; 2017; Beltrame et al., 2018; Wang & Liu, 2018; Kheur et al., 2020]. Destaca-se que os grupos fosfatos dessa molécula podem se ligar a íons cálcio e formar sítios de remineralização, induzindo a formação de uma barreira de cálcio e fosfato [Xu et al., 2012] e assim, a deposição de uma camada semelhante a hidroxiapatita. Ainda, a Qui-Ph pode ser utilizada para formar complexos reativos

com outros agentes remineralizantes [Zhang et al., 2014; Beltrame et al., 2018]. Os resultados até então disponíveis na literatura suscitam maiores estudos acerca dos agentes ativos supracitados que, ainda, pouco se conhece sobre suas propriedades e mecanismo de ação dentro das formulações em que são empregadas e em associação.

Dessa forma, o presente estudo *in vitro* teve como objetivo avaliar o efeito da incorporação de nanopartículas de trimetafosfato de sódio (TMPnano) e quitosana fosforilada (Qui-Ph) em cimento de ionômero de vidro modificado por resina (CIVMR) utilizado em cimentação de bráquetes ortodônticos, sobre as propriedades físico-mecânicas, antimicrobianas e citotóxicas. A hipótese nula foi que a incorporação de trimetafosfato de sódio (TMPnano) e quitosana fosforilada (Qui-Ph) ao CIVMR não alteraria as propriedades dos materiais quando comparado ao CIVMR.

2. Material e Métodos

2.1 Síntese e Caracterização do Trimetafosfato de sódio nanoparticulado (TMPnano)

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

2.2 Síntese e Caracterização da Quitosana Fosforilada (Qui-Ph)

A reação de síntese foi baseada no estudo de Zhang et al. [2014]. Neste processo, 2,0 gramas de quitosana de baixo peso molecular foram dissolvidos em 25 mL de ácido metanosulfônico (CAS: 75-75-2, Sigma-Aldrich®) com o auxílio de agitação magnética, por 3 horas e overnight. O sistema foi colocado em banho de gelo e 420 µL de pentóxido de fósforo (CAS: 1314-56-3, Sigma-Aldrich®) em ácido metanosulfônico (0,25 g/mL) (CAS: 75-75-2, Sigma-Aldrich®) foram adicionados ao meio. Essa mistura foi agitada por três horas, sendo a

temperatura mantida entre 0 a 5 °C em atmosfera inerte. Após esse período, a solução foi mantida a -20 °C com posterior precipitação utilizando metanol (CAS: 67-56-1, Sigma-Aldrich®). Centrifugação a 10000 rpm (12857 g) por 10 min foi realizada para separação do produto obtido, o qual foi lavado com acetona por mais três ciclos. Para total remoção dos reagentes do meio, a Qui-Ph foi dissolvida em água, filtrada em membrana de 0,45 µm (Analítica®) e submetida à diálise, com posterior liofilização e maceração. A análise do produto obtido foi realizada utilizando-se espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR) e espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN).

2.3 Preparo da Mistura dos CIVMR

O CIVMR utilizado para o trabalho foi o GC Fuji Ortho LC (GC Corporation, Tokyo, Japan). Inicialmente o TMPnano, foi adicionado ao pó do CIVMR na concentração de 14% [da Silva et al., 2019]. Para a Qui-Ph foram utilizadas 2 concentrações (0,25% e 0,5%) [Kim et al., 2017; Mishra et al., 2017]. Para a adição do TMPnano/Qui-Ph ao pó do CIVMR considerou-se que cada 100 g do produto final da mistura (CIVMR/TMPnano/Qui-Ph) teria 14,0% do TMPnano e/ou 0,25%/0,5% de Qui-Ph (% m/m). 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). Assim, os grupos experimentais definidos foram: 1) CIVMR sem TMPnano/Qui-Ph (Controle-Fuji Ortho LC); 2) CIVMR-14%TMPnano; 3) CIVMR-0,25%Qui-Ph; 4) CIVMR-0,5%Qui-Ph; 5) CIVMR-14%TMPnano-0,25%Qui-Ph e 6) CIVMR-14%TMPnano-0,5%Qui-Ph.

2.4 Liberação de F dos CIVMR

2.4.1 Confeção dos corpos-de-prova

Corpos-de-prova (n=6) 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 [Silva et al., 2007]. Após a fotopolimerização, os excessos do material foram cuidadosamente removidos.

2.4.2 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 [Silva et al., 2007]. 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.

2.4.3 *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 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 µg F/cm².

2.5 Determinação das Propriedades Físico-Mecânicas dos CIVMR

2.5.1 *Avaliação da Resistência à Compressão (RC)*

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

2.5.2 *Avaliação da Resistência à Tração (RT)*

Doze corpos-de-prova foram confeccionados [ISO 9917-2:2017] (6 mm de diâmetro x 3 mm de altura) 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 (RTD), com célula de carga de 5 kN a uma velocidade de 0,5 mm/min, em posição horizontal, até que ocorresse a fratura. Para tanto, foi utilizada uma máquina de ensaio universal Instron (DL3000, Instron Co., Canton, MA, Estados Unidos da América). Os valores

de tensão diametral (kgf/cm^2) foram calculados usando a equação: $DTS=2F/3.14DT$, onde F é a carga, D é o diâmetro e T é a altura do espécime.

2.5.3 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) e fotopolimerizados por 40 segundos, nas superfícies superior e inferior [da Silva et al., 2007]. Após 24 horas, mantidos em recipiente plástico e em ambiente úmido ($37\text{ }^\circ\text{C}$), 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 $500\text{ }\mu\text{m}$ entre si [Silva et al., 2007]. A seguir, os corpos-de-prova foram armazenados em estufa a $37\text{ }^\circ\text{C}$ (em ambiente úmido) e após 7 dias foi repetido o teste da dureza, sendo realizadas 5 impressões a $250\text{ }\mu\text{m}$ das realizadas em 24 horas.

2.5.4 Determinação do Grau de Conversão dos Monômeros (%GC)

Os CIVMR ($n=3$) foram manipulados, inseridos entre duas lâminas de vidro, pressionados formando um filme de aproximadamente $0,12 \pm 0,02\text{ mm}$, e fotopolimerizados por 40 segundos de cada lado da amostra. Em seguida, foram armazenados durante 24 horas, ao abrigo da luz, em estufa a $37\text{ }^\circ\text{C}$. Após estes períodos, os filmes de CIVMRs foram triturados e misturados com brometo de potássio (KBr), na proporção de 1:35 (mg:mg). As misturas foram colocadas na prensa (PikeTechnologies, 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, NicoletInstrument Corporation, Madison, WI, Estados Unidos da América), na região espectral entre entre $1.400\text{ e }2.000\text{ cm}^{-1}$, 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 $\text{C}=\text{C}$ do monômero e COO^- do ácido carboxílico, localizadas aproximadamente em $1640\text{ e }1540\text{ cm}^{-1}$, respectivamente [da Silva et al., 2019]. O valor do grau de conversão foi determinado utilizando seguinte equação:

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

2.5.5 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 1000x [Kheur et al., 2020].

2.6 Determinação das Propriedades Antimicrobiana dos CIVMR

2.6.1 Teste de Adesão ao *Streptococcus mutans*

Após a reativação de espécies de *S. mutans* (UA159) [Huang et al., 2022], placas foram incubadas em estufa a 37 °C por 48 horas. A seguir, foi removida e adicionada as colônias de *S. mutans* reativadas em BHI caldo suplementado com 1% de sacarose para formação do inóculo. Em seguida procede-se com a homogeneização do inóculo durante 30 segundos em 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 + 4 alças de *S. mutans* de inóculo ajustado para uma densidade óptica (DO) de 0,6 a 550 nm (aproximadamente 10⁷ UFC/mL) com espectrofotômetro (Microplate Spectrofotometer EONC, Biotek, EUA). Em seguida, uma placa de 24 poços foi utilizada e cada poço preenchido com 700 µL para que as amostras ficassem imersas no inóculo. Estas placas foram incubadas a 37 °C por 24 h, posteriormente os corpos-de-prova foram retirados da placa e inseridos em tubo de polietileno contendo 3 mL de solução salina. A seguir os tubos foram levados ao ultrassom durante 10 minutos para permitir o desprendimento das células aderidas aos espécimes. Na sequência retirou uma alíquota de 200 µL da solução de soluna salina com o espécime e dispensou em uma placa de 96 poços. Uma alíquota de 180 µL de PBS foi dispensada nos poços subsequentes na mesma coluna da placa e a seguir procedeu-se com a diluição seriada para todos os grupos, onde retirou-se 20 µL de um

poço e transferiu para o subsequente na mesma coluna da placa, e a seguir foi realizado o plaqueamento retirando alíquota de 5 µL de cada poço, e esperado até a secagem das placas para que então fossem incubadas durante 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) correspondente às células aderidas ao CIVMR [Fúcio et al., 2016].

2.6.2 Avaliação do Biofilme pelo Método do XTT

O ensaio de biofilme foi baseado no estudo de [Hu et al., 2013]. *S. mutans* (ATCC 25175) foi cultivado em estufa de CO₂, em caldo BHI, durante a noite a 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 utilitária 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 vortéx por 15 segundos e em seguida inoculada em cada poço. As placas foram incubadas a 37 °C em um câmara anaeróbica por 24 h. Atividade celular metabólica do biofilme formado nos poços foi quantificada pelo XTT (2,3 (2-metoxi-4-nitro-5-sul- fofenil) -5-[(fenilamino)carbonil]-2H-hidróxido de tetrazólio) (CAS: 111072-3-2, Sigma-Aldrich®) ensaio de redução. 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.

2.7 Análise da Citotoxicidade dos CIVMR

2.7.1 Obtenção da Cultura de Células

Fibroblastos da linhagem 3T3-L1 (CL-173, American Type Culture Collection – ATCC) 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 a 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 CIVMR's com 2 mm de altura e 4 mm de largura (n=5) foram preparadas em matrizes de silicone de condensação, fotopolimerizadas por 40s e mantidas por 1 h a 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) com diâmetro de 0,4 µm foram acoplados aos poços e as amostras dos cimentos foram colocadas em seu interior para troca iônica no ambiente celular.

2.7.2 *Análise do Metabolismo Celular*

Ao final de 24 e 72 horas de exposição aos cimentos ionoméricos experimentais, a proliferação celular foi avaliada pelo método de redução de um corante redox (resazurina). O ensaio é baseado na capacidade das células vivas de converter a resazurina em um produto final colorimétrico (resorufina), onde aquelas não viáveis perdem a capacidade metabólica e, portanto, não geram um sinal observável [Chen et al., 2018] e 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 a 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, BioTek Instruments Inc., Winooski, VT, USA). As médias foram calculadas para os grupos e transformadas em porcentagens, o que representou o efeito inibitório da atividade mitocondrial das células pelos CIVMR. O controle negativo (DMEM) foi definido como tendo 100% de metabolismo celular. Os dados foram apresentados em valores de absorbância.

2.8 *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, liberação de F e Metabolismo Celular (Abs) foram submetidos a ANOVA (2-critérios). Já os dados de GC e microbiológicos (UFC/mL) foram analisados por ANOVA (1-critério). O teste utilizado para comparação entre os grupos, após as análises, foi o de Student-

Newman-Keuls. Todas as análises foram realizadas com o programa SigmaPlot versão 12.0 com limite de significância de 5%.

3. Resultados

3.1 Síntese e Caracterização do Trimetafosfato de sódio nanoparticulado (TMPnano)

A Figura 1 mostra os padrões de raios-x para o TMP microparticulado (TMP) e TMP nanoparticulado após moagem de 48 horas (TMPnano). A difração de raios-X (DRX) foi utilizada para identificar a estrutura cristalina e estimar o domínio de coerência cristalográfica do TMP e TMPnano. Os gráficos obtidos por difração de raios-x revelaram que o TMPnano apresentou picos mais amplos e mais largos demonstrando que houve síntese das nanopartículas sem afetar a estrutura cristalina do sal. Inicialmente, o tamanho médio da partícula do TMP micrométrico era de 547 nm e ao final o pó obtido foi de 22,7 nm mantendo a estrutura cristalina do sal. Os difratogramas de raios-x foram obtidos de amostras na forma de pó. Utilizou-se o equipamento Rigaku modelo DMax 2500PC, com fonte de radiação CuK ($= 1,54056 \text{ \AA}$), voltagem de 40 kV e corrente de 40 mA. As medidas foram feitas em varredura contínua no intervalo de $10^\circ \leq 2\theta \leq 80^\circ$, a uma velocidade de varredura de $2^\circ/\text{min}$. A identificação estrutural das amostras analisadas foi feita comparando os difratogramas obtidos com padrões tabelados disponíveis em bancos de dados “Joint Committee on Powder Diffraction Standards – Powder Diffraction File (JCPDS - PDF). Foi possível avaliar que o processamento de moagem reduziu o tamanho das partículas dos pós de TMP, sem afetar a estrutura cristalina do material. O tamanho em escala nanométrica foi caracterizado por Microscopia Eletrônica de Transmissão de Alta Resolução (METAR) com estimativa de tamanho médio para o TMP e TMPnano de 547 nm e 22,7 nm respectivamente (Figura 2).

3.2 Síntese e Caracterização da Quitosana Fosforilada (Qui-Ph)

A rota reacional utilizada para a fosforilação da quitosana, utilizando pentóxido de fósforo e ácido metanossulfônico revelou que durante a síntese o grupo amina ficou protegido pela interação iônica com o ácido, o que promove a fosforilação dos grupos hidroxilas presentes nos carbonos seis e três, sendo que hidroxila do carbono 6 (-CH₂-OH), por se tratar de uma hidroxila primária, é mais reativa que a hidroxila do carbono 3 (-CH-OH). Para análise da estrutura química da quitosana fosforilada obtida, foram preparados discos de KBr da Qui utilizada como matéria prima e da Qui-Ph obtida como produto. A varredura foi realizada de 400 a 4000 cm⁻¹, obtendo-se os espectros da Figura 3.

No espectro da Qui-Ph podem ser visualizados: aparecimento de ombro em 1240 cm⁻¹, referente ao estiramento da ligação P=O e banda em 1050 cm⁻¹ relacionada à deformação da

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

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

3.3 Propriedades mecânicas (RC, RT, DS e GC)

A RC foi maior em 7 dias quando comparada a 24 horas para os grupos CIVMR-14%TMPnano, CIVMR-0,5%Qui-Ph, CIVMR-14%TMPnano-0,25%Qui-Ph, CIVMR-14%TMPnano-0,5%Qui-Ph ($p < 0,001$), exceto para os grupos CIVMR e CIVMR-0,25%Qui-Ph. No tempo de 24 horas e 7 dias o melhor desempenho foi observado para o grupo CIVMR-14%TMPnano-0,25%Qui-Ph $p < 0,001$ (Tabela 1). Para os dados de RT, no tempo de 24 horas, todos os grupos apresentaram valores similares, exceto o CIVMR-14%TMPnano que apresentou o menor valor ($p < 0,01$). Após 7 dias os grupos CIVMR-0,25%Qui-Ph e CIVMR-14%TMPnano-0,5%Qui-Ph apresentaram valores similares ($p > 0,001$). Já o grupo CIVMR-14%TMPnano-0,25%Qui-Ph apresentou um aumento significativo após 7 dias, sendo superior em $\sim 27\%$ em relação ao CIVMR (Tabela 1).

Na análise da DS (KHN) dos cimentos ionoméricos experimentais, após as 24 horas, os grupos CIVMR-14%TMPnano e CIVMR-0,5%Qui-Ph apresentaram valores similares (*entre si*) de DS (KHN) ($p > 0,001$), assim como os grupos CIVMR-TMPnano-0,25%Qui-Ph e CIVMR-TMPnano-0,5%Qui-Ph ($p > 0,001$). Apenas o grupo CIVMR-0,25%Qui-Ph apresentou o maior valor, diferindo dos demais ($p < 0,001$). Após 7 dias os grupos CIVMR, CIVMR-14%TMPnano e CIVMR-0,25%Qui-Ph não apresentaram diferenças estatísticas em relação ao tempo de 24 horas ($p < 0,001$). Em contrapartida houve um aumento da DS para os grupos CIVMR-0,25%Qui-

Ph, CIVMR-0,5%Qui-Ph e CIVMR-14%TMPnano-0,5%Qui-Ph sendo ~23% superior que em relação ao grupo CIVMR (Tabela 1). Ainda, após 7 dias os grupos CIVMR-14%TMPnano e CIVMR-14%TMPnano-0,25%Qui-Ph (KHN) foram similares entre si ($p > 0,001$), sendo que o grupo CIVMR apresentou o menor valor ($p < 0,001$) (Tabela 1).

Os valores de porcentagem do grau de conversão (%GC) para os cimentos ionoméricos experimentais, após 24 horas, estão mostrados na Figura 6. A adição dos agentes ativos sozinhos (14%TMPnano, 0,25%Qui-Ph e 0,5%Qui-Ph) ou em associação (14%TMPnano-0,25%Qui-Ph e 14%TMPnano-0,5%Qui-Ph) ao CIVMR, não alterou a %GC em relação ao CIVMR apenas ($p=0,747$).

3.4 *Miscroscopia Eletrônica de Varredura e Energia Dispersiva de Raios-X*

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

3.5 *Liberação de flúor*

A Figura 7 apresenta o padrão de liberação de F ($\mu\text{gF}/\text{cm}^2$) e os valores médios ($\pm dp$) 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 grupos CIVMR-14%TMPnano > CIVMR-14%TMPnano-0,5%Qui-Ph > CIVMR-14%TMPnano-0,25%Qui-Ph e no 15º dia para o grupo CIVMR-14%TMPnano seguido pelo grupo CIVMR-14%TMPnano-0,5%Qui-Ph. No período total de 15 dias, todos os grupos apresentaram uma redução na liberação de F, sendo que, a partir do 12º dia, a liberação foi semelhante para todos os grupos. Em relação aos valores médios de liberação de F observa-se que CIVMR-14%TMPnano, CIVMR-14%TMPnano-0,25%Qui-Ph e CIVMR-14%TMPnano-0,5%Qui-Ph apresentaram a maior liberação ao longo de 15 dias, sendo semelhantes entre si ($p > 0,001$).

3.6 Propriedades Antimicrobiana

Na análise dos dados para efeito antimicrobiano, obtidos através do teste de adesão ao *S. mutans* sobre os cimentos ionoméricos experimentais (Log_{10} -UFC/mL), todos os grupos testados foram similares entre si ($p=0,881$) (Figura 8). Para análise do biofilme formado (log_{10} -UFC/mL) foi possível notar o maior efeito inibitório e maior atividade antibacteriana (contra *S. Mutans*) para o grupo CIVMR-14%TMPnano-0,25%Qui-Ph, seguido pelo grupo CIVMR-0,25%Qui-Ph ($p < 0,001$) (Figura 9). Já os grupos CIVMR, CIVMR-14%TMPnano e CIVMR-0,5%Qui-Ph apresentaram valores similares entre si e o menor efeito antimicrobiano/inibitório ($p > 0,001$).

A Figura 10 mostra os dados da redução do biofilme de *S. mutans* (pelo método XTT), na presença dos cimentos ionoméricos experimentais. A adição dos agentes ativos (TMPnano e Qui-Ph), aos cimentos ionoméricos promoveu uma redução na atividade metabólica do biofilme de *S. mutans* em relação ao Controle negativo e CIVMR ($p < 0,001$). Os grupos CIVMR-14%TMPnano e CIVMR-14%TMPnano-0,5%Qui-Ph foram similares ($p > 0,001$) entre si, reduzindo a atividade metabólica em $\sim 22\%$ quando comparados ao CIVMR ($p < 0,001$). Por outro lado, a adição de 14%TMPnano e 0,25%Qui-Ph ao CIVMR, promoveu uma redução de $\sim 50\%$ e $\sim 35\%$ quando comparado ao CIVMR e CIVMR-14%TMPnano-0,5%Chi-Ph ($p < 0,001$).

3.7 Análise da Citotoxicidade dos CIVMR's

Os resultados da resposta do metabolismo celular pelo método da resazurina, obtidos após exposição das células de Fibroblastos da linhagem 3T3-L1, aos cimentos ionoméricos experimentais (24 horas e 72 horas) são apresentados na Figura 11. Quando comparado ambos os tempos (24 horas e 72 horas) houve diferença no metabolismo celular para todos os grupos ($p < 0,001$). Para o tempo de 24 horas destaca-se que nenhum dos agentes ativos causou efeito tóxico sobre as células 3T3-L1; todos os grupos foram similares ao grupo de Controle (DMEM) ($p > 0,001$). Para o tempo de 72 horas, o menor efeito citotóxico foi verificado para o grupo CIVMR-14%TMPnano-0,25%Qui-Ph ($p < 0,001$), sendo os demais grupos semelhantes entre si ($p < 0,001$).

4. Discussão

A desmineralização do esmalte dentário durante o tratamento ortodôntico, tem-se mostrado elevada devido ao acúmulo de biofilme decorrente da dificuldade de higienização [Marinelli et al., 2021]. As peças ortodônticas fornecem locais de retenção adicionais para estagnação do biofilme que pode resultar na redução do pH e conseqüentemente, a desmineralização e progressão da cárie - lesões de mancha branca [Cardoso et al., 2022]. Dessa

forma a busca por materiais que apresentem efeito positivo no processo de remineralização, biofilme e boas propriedades mecânicas tem se tornado uma prática constante [Müller et al., 2021]. Diante deste contexto, os cimentos ionoméricos parecem ser uma boa opção para colagem de aparelhos ortodônticos devido às suas boas propriedades [Patel et al., 2021], principalmente em relação a liberação e recarga de F (a qual mostrou induzir a remineralização dos tecidos dentários duros) [Toledano et al., 2018], além de ser classificado como um material bioativo [Kumari et al., 2019]. Por outro lado, sabe-se de suas limitações, e com isso, a necessidade de otimizar suas propriedades. Assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar *in vitro* o efeito da incorporação de nanopartículas de trimetafosfato de sódio (TMPnano) e quitosana fosforilada (Qui-Ph) em cimento de ionômero de vidro modificado por resina (CIVMR) utilizado em cimentação de bráquetes ortodônticos, sobre as propriedades mecânicas, antimicrobianas e citotóxicas. A hipótese nula do estudo foi a de que a incorporação dos agentes ativos ao CIVMR não alteraria de forma positiva as propriedades dos materiais quando comparado ao CIVMR. No presente estudo, a quitosana fosforilada apresentou efeito sobre os microrganismos abrindo caminho para seu uso como agente preventivo e terapêutico no controle da cárie dentária [Toledano et al., 2018] já o trimetafosfato de sódio possui afinidade por cátions livres da mistura do CIVMR e pode ser capaz de modificar a reação-ácido base, promovendo uma fonte extra de íons fosfatos no processo de remineralização. Diante dos resultados obtidos, a hipótese nula foi rejeitada.

Os testes mecânicos (RC, RT e DS) permitem uma boa representação da integridade mecânica de materiais friáveis, como o CIVMR. Esta propriedade é extremamente importante particularmente no processo de mastigação. Dessa forma, o agente utilizado como cimento para peças ortodônticas deve ser capaz de resistir a essas forças, mantendo os componentes estáveis na cavidade oral, contribuindo para o sucesso do tratamento. No presente estudo a associação de TMPnano-0,25%Qui-Ph ao CIVMR melhorou a resistência a compressão, tração e dureza após 7 dias em comparação ao CIVMR (Tabela 1). Estes bons resultados podem ser explicados pela interação entre os grupos catiônicos formado por amina da quitosana e grupos carboxilato que são carregados negativamente na estrutura do CIVMR provocando a formação de uma rede de polímeros mais estável. Ainda, vale destacar que a quitosana atua como um agente aglutinante, contribuindo para que haja uma maior ligação entre os componentes químicos do CIVMR, reduzindo a tensão interfacial entre os constituintes do material e aumentando dessa forma a capacidade de resistir a forças externas (ex: mastigação) [Najeeb et al., 2016; Kim et al., 2017; Fakhri et al., 2020]. Por outro lado, a presença de íons fosfatos contribuem para a melhora da propriedade quelante do cálcio da molécula de quitosana. Além disso, a literatura destaca que a Qui-Ph pode induzir a deposição biomimética de uma camada semelhante à apatita sob condições

fisiológicas simuladas, devido a quelação de íons de cálcio e hidrólise parcial de fosfato funcionalizados [Vallittu et al., 2018], o que contribui também na remineralização do tecido cariado e redução da desmineralização dentária. É importante destacar a propriedade do TMP em complexar cátions durante a reação ácido-base, o que também pode ter contribuído na alteração das propriedades mecânicas do material. Ainda, a morfologia e composição química da superfície dos cimentos ionoméricos experimentais (Figura 5) evidenciam depósito globulares, semelhantes a minerais na associação de TMPnano e Qui-Ph, em maior extensão para o grupo CIVMR-TMPnano-0,25%Qui-Ph, e pela análise do EDS maior concentração de P foi observado (Figura 5e), assim os agentes ativos adicionados em conjunto levam a uma menor tensão interfacial melhorando a adesão entre os componentes, podendo também justificar os bons resultados mecânicos encontrados no presente estudo.

A redução do tamanho das partículas do TMP 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 [da Silva et al., 2018], contribuindo para a melhora das propriedades físicas e mecânicas. Por outro lado, sabendo-se que a Qui-Ph apresenta uma molécula com grande reatividade por fosfatos [Sahariah & Masson, 2017] assim como os grupos aniônicos do TMP (P-O-), provavelmente as características dos agentes ativos levam à um efeito satisfatório entre eles, estabelecendo também reações eletrostáticas com os componentes do CIVMR e TMPnano, uma vez que este devido ao tamanho de suas partículas possui um maior número de átomos disponíveis em sua superfície contribuindo para a maior interação e menor tensão entre os componentes, levando aos bons resultados encontrados em nosso estudo. É importante mencionar que o cimento de ionômero de vidro utilizado no presente estudo constitui-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 influir na polimerização do grupamento metacrilato, principalmente quando há muito grupamento carboxílico livre. Vale destacar que, as concentrações adequadas de ambos os componentes adicionados não afetaram a reação do ácido poliacrílico com as partículas de vidro do CIVMR mencionadas acima, tampouco as propriedades físico-mecânicas, e este fato também é verificado através dos dados do grau de conversão (GC) (Figura 6), onde mesmo com a adição dos agentes ativos sozinhos ou em combinação, não houve alteração na reação monomérica do mesmo, indicando que a melhora das propriedades mecânicas dos CIVMRs ao longo do tempo foi praticamente dependente da reação ácido-base e influenciada pela adição do TMPnano e Qui-Ph.

A liberação de F do CIVMR caracteriza-se por uma liberação rápida inicial, seguida por uma redução gradual. Estudos demonstraram que o F é liberado por até 18 meses em quantidade cada vez menor e parte dele está disponível para solubilização [Chiu et al., 2017; Nishanthine et al., 2022]. A liberação de F do CIVMR tem muitos efeitos na estrutura dentária como: aumento a resistência ácida à estrutura dentária e previne lesões secundárias de cárie pela inibição do crescimento bacteriano. No presente estudo, a adição de 14%TMPnano ao CIVMR contribuiu para a maior liberação de F nas primeiras 24 horas com valor significativamente maior que o grupo CIVMR (Figura 7). Essa maior liberação de F pode estar relacionada à afinidade do TMP por íons metálicos presentes no material [Danelon et al., 2017; da Silva et al., 2019]. Durante a aglutinação do pó e líquido, o Ca^{+2} e o Al^{+3} da mistura reagiriam com o TMP reduzindo a reação destes íons com o F, tornando-o mais disponível para ser liberado. Ainda, a redução das partículas em escala manométrica do TMP (Figura 1) propiciou uma maior reatividade de fosfatos presente na cadeia cíclica do TMP com os íons metálicos presentes no CIVMR [Fakhri et al., 2020] o que leva também, a maior disponibilidade de F como observado no estudo de da Silva et al. [2019], corroborando com estudos prévios que associaram o TMP na forma micro e nanoparticulada a outros veículos tais como: resina composta, vernizes, géis e dentifrícios [Tiveron et al; 2013; Manarelli et al; 2015; Akabane et al., 2018; Emerenciano et al., 2018]. Além disso, a liberação total ao longo de 15 dias foi maior e similar para os grupos CIVMR-14%TMPnano, CIVMR-14%TMPnano-0,25% e CIVMR-14%TMPnano-0,5%, o que pode ser explicado pelo efeito catalítico da Qui-Ph sobre a liberação de F. Nesse contexto, mesmo que o CIVMR apresente F em sua composição, a liberação não foi expressiva quanto aos grupos associando Qui-Ph com TMPnano. Diante deste achado, pode-se inferir que a grande interação dos grupos carboxílicos do ácido poliacrílico com os grupos amino de quitosana leva uma maior hidrólise da matriz de vidro e mais rápida liberação de íons metálicos para serem complexados na cadeia dos poliácidos, o que favoreceu a maior liberação do F como subproduto da reação. Dessa forma, em situações clínicas, levará à uma rápida difusão desse íon beneficiando a remineralização e prevenção de cárie.

Aparelhos ortodônticos induzem modificações na cavidade oral, como redução do pH, com aumento da susceptibilidade à formação de lesões de mancha branca causadas por ácidos orgânicos produzidos pelas bactérias presente no biofilme [Fricker, 2022]. Dessa forma, a busca por materiais que apresentem potencial na redução e/ou formação do biofilme, e consequentemente no metabolismo bacteriano tem sido constante. A incorporação de quitosana fosforilada a 0,25% ao pó do CIVMR produziu um efeito antimicrobiano sobre a formação de *S. mutans* (isolada e em associação com o TMPnano). Os prováveis mecanismos que podem explicar a atividade antibacteriana da Qui-Ph estão relacionados a interação de sua carga positiva

permitida pela protonação e dispersão dos grupos amino livres NH_2 e NH_3^{+3} em meio ácido e a carga negativa da célula microbiana. Essa interação age deslocando o Ca^{+2} dos sítios aniônicos da membrana microbiana resultando em danos celulares, uma vez que a ruptura leva a perda de importantes constituintes intracelulares. Ainda, quando a molécula de quitosana (Qui) sofre fosforilação (Qui-Ph) resulta em uma molécula bastante reativa, com propriedade altamente quelante, biocompatível o que pode resultar em maior disponibilidade de íons fosfatos permitindo além de uma atividade antimicrobiana e uma maior capacidade remineralizadora, fato este observado para o grupo contendo CIVMR-14%TMPnano-0,5%Qui-P [Beltrame et al., 2018]. Por outro lado, a adição de maior concentração de Qui-Ph (0,5%), não contribuiu para um melhor efeito antimicrobiano (Figura 9 e Figura 10). Sugere-se que a maior concentração de Qui-Ph dificulte a interação agente ativo/*S. mutans* e conseqüentemente, sua destruição celular, não levando a um efeito sinérgico em associação ao TMPnano. Embora, os CIVMRs sejam capazes de liberar compostos químicos de sua estrutura como íons (estrôncio, alumina e flúor) e monômeros (HEMA-2-hidroxietil metacrilato) a concentração de 0,5% influenciou nas ligações iônicas de cálcio e alumínio durante a aglutinação do pó ao líquido, contribuindo dessa forma para uma menor reatividade com os íons metálicos do material e desempenhando menor efeito antimicrobiano. No presente estudo, a contagem das unidades formadoras de colônias foi similar entre os grupos testados, podendo ser explicado pela capacidade dos cimentos em fornecer inicialmente adesão para microrganismos tais como espécies de *S. mutans*, porém essa colonização é superficial. No entanto, a presença de um substrato/meio que proporcione condições adequadas ao microrganismo para desenvolver suas funções, ao longo do tempo, pode evoluir para formação de biofilme. Dessa forma, na análise do crescimento do biofilme houve diferenças entre os grupos, onde o CIVMR-14%TMPnano-0,25%Qui-Ph apresentou a maior atividade antibiofilme. Provavelmente a incorporação 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*.

A biocompatibilidade de um material representa sua capacidade em responder ao hospedeiro biológico de forma satisfatória, sem prejuízo celular [Kashyap et al., 2022]. Até o momento, existem muitos modelos experimentais capazes de avaliar a biocompatibilidade dos materiais usados em Odontologia utilizando diferentes metodologias. Em nosso estudo a citotoxicidade dos CIVMR's foi avaliada pelas linhagens celulares de fibroblastos 3T3-L1 conforme mostrado na Figura 11. Após 72 horas, os grupos CIVMR, CIVMR-14%TMPnano, CIVMR-0,25%Qui-Ph, CIVMR-0,5%Qui-Ph, CIVMR-14%TMPnano-0,5%Qui-Ph reduziram a viabilidade celular/atividade mitocondrial em 30%, 21%, 45%, 69%, 41% respectivamente em comparação ao grupo não tratado (DMEM - 100 % de metabolismo). O menor efeito citotóxico

foi verificado para o grupo CIVMR-14%TMPnano-0,25%Qui-Ph, sendo que os demais grupos apresentaram citotoxicidade similar ao CIVMR. Especula-se que quando a Qui-Ph foi adicionada ao CIVMR contendo 14%TMPnano, seu grupo amino (NH₂) reagiu com grupos carboxílicos (COOH) a partir do ácido poliacrílico e redes poliméricas foram formadas, mudando assim, as propriedades mecânicas e biológicas do CIVMR. Além disso, muitos autores demonstraram que o complexo interpolímero formado, pode aumentar a bioatividade do material [Limapornvanich et al., 2009; Carvalho et al., 2020; Kashyap et al., 2022]. Sendo assim, os resultados deste estudo revelaram que a associação de 14%TMPnano e 0,25%Qui-Ph ao CIVMR foi eficaz e promoveu baixo efeito citotóxico para as células estudadas, podendo ser uma alternativa a outros agentes antimicrobianos, tais como a clorexidina. Além disso, estudos devem ser explorados para verificar se as alterações que ocorreram no material para o presente grupo supracitado podem estar relacionadas a formação de uma nova molécula, o que poderia a aumentar a bioatividade do material e levar à baixa citotoxicidade.

A partir dos resultados obtidos, sugerem-se novos estudos tais como: utilização de esmalte como substrato, avaliação da recarga de F, ensaios de solubilidade e adesividade, resistência ao cisalhamento para verificar possíveis falhas de adesão, análise por espectroscopia para fundamentar se as possíveis ligações formadas foram a grande influência na melhora das propriedades do material e verificar a possibilidade de formação de um nova molécula permitida pela interações do material a fim de obter melhor estimativa do comportamento desses novos materiais ionoméricos e suas características bioativas ao longo do tempo, assim como estudos clínicos. Diante dos resultados obtidos, conclui-se que a adição de 14%TMPnano e 0,25%Qui-Ph melhorou as propriedades do CIVMR podendo ser uma estratégia clínica promissora para pacientes com alto risco à cárie e submetidos ao tratamento ortodôntico.

5. Agradecimentos

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP-Processos: 2021/05532-7 e 2021/14835-3) pelo apoio financeiro.

6. Referências

Abedian Z, Jenabian N, Moghadamnia AA, Zabihi E, Tashakorian H, Rajabnia M, Sadighian F, Bijani A. Antibacterial activity of high-molecular-weight and low-molecular-weight chitosan upon oral pathogens. *J Conserv Dent*. 2019;22:169-174. doi: 10.4103/JCD.JCD_300_18.

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.

Andrucioli MC, Faria G, Nelson-Filho P, Romano FL, Matsumoto MA. Influence of resin-modified glass ionomer and topical fluoride on levels of *Streptococcus mutans* in saliva and biofilm adjacent to metallic brackets. *J Appl Oral Sci*. 2017;25:196-202. doi: 10.1590/1678-77572016-0231.

Beltrame APCA, Suchyta D, Abd Alraheem I, Mohammed A, Schoenfish M, Walter R, Almeida ICS, Souza LC, Miguez PA. Effect of Phosphorylated Chitosan on Dentin Erosion: An in vitro Study. *Caries Res*. 2018;52:378-386. <https://doi.org/10.1159/000486521>.

Benson PE, Alexander-Abt J, Cotter S, Dyer FMV, Fenesha F, Patel A, Campbell C, Crowley N, Millett DT. Resin-modified glass ionomer cement vs composite for orthodontic bonding: A multicenter, single-blind, randomized controlled trial. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 2019; 155:10-18. doi: 10.1016/j.ajodo.2018.09.005.

Cardoso AA, de Sousa ET, Steiner-Oliveira C, Nobre-Dos-Santos M. Debonding of orthodontic appliance changes salivary physicochemical properties and favors regression of active caries lesions: A 13-week follow-up study. *Int J Paediatr Dent*. 2022:607-616. <https://doi.org/10.1111/ipd.12939>.

Carvalho RG, Alvarez MMP, de Sá Oliveira T, Polassi MR, Vilhena FV, Alves FL, Nakaie CR, Nascimento FD, D'Alpino PHP, Tersariol ILDS. The interaction of sodium trimetaphosphate with collagen I induces conformational change and mineralization that prevents collagenase proteolytic attack. *Dent Mater*. 2020;36: e184-e193.

Chen M, Yi J, Zhao Z. Biocompatible orthodontic cement with antibacterial capability and protein repellency. *BMC Oral Health*. 2021; 20:21:412. <https://doi.org/10.1186/s12903-021-01779-7>.

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.

Chiu SY, Shinonaga Y, Abe Y, Harada K, Arita K. Influence of Porous Spherical-Shaped Hydroxyapatite on Mechanical Strength and Bioactive Function of Conventional Glass Ionomer Cement. *Materials (Basel)*. 2017;10:27. doi: 10.3390/ma10010027.

Contaldo M, Lucchese A, Lajolo C, Rupe C, Di Stasio D, Romano A, Petruzzi M, Serpico R. The Oral Microbiota Changes in Orthodontic Patients and Effects on Oral Health: An Overview. *J Clin Med*. 2021;10:780. doi: 10.3390/jcm10040780.

da Silva MER, Danelon M, Santos Souza JA, Silva DF, Pereira JA, Pedrini D, de Camargo ER, Botazzo Delbem AC, Duque C. Incorporation of chlorhexidine and nano-sized sodium trimetaphosphate into a glass-ionomer cement: Effect on mechanical and microbiological properties and inhibition of enamel demineralization. *J Dent*. 2019;84:81-88. 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;43:806-13. 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.

Dziuk Y, Chhatwani S, Möhlhenrich SC, Tulka S, Naumova EA, Danesh G. Fluoride release from two types of fluoride-containing orthodontic adhesives: Conventional versus resin-modified glass ionomer cements-An in vitro study. *PLoS One*. 2021;16:e0247716. doi: 10.1371/journal.pone.0247716.

Emerenciano NG, Botazzo Delbem AC, Pessan JP, Nunes GP, Souza Neto FN, de Camargo ER, Danelon M. In situ effect of fluoride toothpaste supplemented with nano-sized sodium trimetaphosphate on enamel demineralization prevention and biofilm composition. *Arch Oral Biol*. 2018;96:223-229. doi: 10.1016/j.archoralbio.2018.09.019.

Fakhri E, Eslami H, Maroufi P, Pakdel F, Taghizadeh S, Ganbarov K, Yousefi M, Tanomand A, Yousefi B, Mahmoudi S, Kafil HS. Chitosan biomaterials application in dentistry. *Int J Biol Macromol*. 2020;1162:956-974.https:// doi: 10.1016/j.ijbiomac.2020.06.211.

Fricker JP. Therapeutic properties of glass-ionomer cements: Their application to orthodontic treatment. *Aust Dent J.* 2022; 67:12-20. doi: 10.1111/adj.12888.

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

Hosida TY, Delbem ACB, Morais LA, Moraes JCS, Duque C, Souza JAS, Pedrini D. Ion release, antimicrobial and physio-mechanical properties of glass ionomer cement containing micro or nanosized hexametaphosphate, and their effect on enamel demineralization. *Clin Oral Investig.* 2019;23:2345-2354.

Hu J, Du X, Huang C, Fu D, Ouyang X, Wang Y. Antibacterial and physical properties of EGCG-containing glass ionomer cements. *J Dent.* 2013;41:927-934.[https:// doi: 10.1016/j.jdent.2013.07.014](https://doi.org/10.1016/j.jdent.2013.07.014).

Jing D, Hao J, Shen Y, Tang G, Lei L, Zhao Z. Effect of fixed orthodontic treatment on oral microbiota and salivary proteins. *Exp Ther Med.* 2019;4237-4243. doi: 10.3892/etm.2019.7401.

Kashyap PK, Chauhan S, Negi YS, Goel NK, Rattan S. Biocompatible carboxymethyl chitosan-modified glass ionomer cement with enhanced mechanical and anti-bacterial properties. *Int J Biol Macromol.* 2022;223(Pt A):1506-1520. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2022.11.028.

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. [https:// doi: 10.1007/s10266-019-00427-5](https://doi.org/10.1007/s10266-019-00427-5).

Khoroushi M, Kachuie M. Prevention and Treatment of White Spot Lesions in Orthodontic Patients. *Contemp Clin Dent.* 2017;8:11-19. [https:// doi: 10.4103/ccd.ccd_216_17](https://doi.org/10.4103/ccd.ccd_216_17).

Kim DA, Lee JH, Jun SK, Kim HW, Eltohamy M, Lee HH. Sol-gel-derived bioactive glass nanoparticle-incorporated glass ionomer cement with or without chitosan for enhanced mechanical and biomineralization properties. *Dent Mater* 2017;33:805-817. [https:// doi: 10.1016/j.dental.2017.04.017](https://doi.org/10.1016/j.dental.2017.04.017).

Kumari PD, Khijmatgar S, Chowdhury A, Lynch E, Chowdhury CR. Factors influencing fluoride release in atraumatic restorative treatment (ART) materials: A review. *J. Oral Boil. Craniofacial Res.* 2019;9:315-320. [https:// doi: 10.1016/j.jobcr.2019.06.015](https://doi.org/10.1016/j.jobcr.2019.06.015).

Limapornvanich A, Jitpukdeebodindra S, Hengtrakool C, Kedjarune-Leggat U. Bovine serum albumin release from novel chitosan-fluoro-aluminosilicate glass ionomer cement: stability and cytotoxicity studies. *J Dent*. 2009;37:686-689.

Lucchese A, Bondemark L, Marcolina M, Manuelli M. Changes in oral microbiota due to orthodontic appliances: a systematic review. *J Oral Microbiol*. 2018;10:1476645. doi: 10.1080/20002297.2018.1476645.

Machiulskiene V, Campus G, Carvalho JC, Dige I, Ekstrand KR, Jablonski-Momeni A, Maltz M, Manton DJ, Martignon S, Martinez-Mier EA, Pitts NB, Schulte AG, Splieth CH, Tenuta LMA, Ferreira Zandona A, Nyvad B. Terminology of Dental Caries and Dental Caries Management: Consensus Report of a Workshop Organized by ORCA and Cariology Research Group of IADR. *Caries Res* 2020;54:7-14. doi: 10.1159/000503309.

Manarelli MM, Delbem AC, Binhardi TD, Pessan JP. In situ remineralizing effect of fluoride varnishes containing sodium trimetaphosphate. *Clin Oral Investig*. 2015;19:2141-2146. doi: 10.1007/s00784-015-1492-6.

Marinelli G, Inchingolo AD, Inchingolo AM, Malcangi G, Limongelli L, Montenegro V, Coloccia G, Laudadio C, Patano A, Inchingolo F, Bordea IR, Scarano A, Greco Lucchina A, Lorusso F, Di Venere D, Laforgia A, Dipalma G. White spot lesions in orthodontics: prevention and treatment. A descriptive review. *J Biol Regul Homeost Agents*. 2021;35:227-240. doi: 10.23812/21-2suppl-24.

Mishra A, Pandey RK, Manickam N. Antibacterial effect and physical properties of chitosan and chlorhexidine-cetrimide-modified glass ionomer cements. *J Indian Soc Pedod Prev Dent*. 2017; 35:28-33. doi: 10.4103/0970-4388.199224.

Müller WEG, Ackermann M, Neufurth M, Tolba E, Wang S, Feng Q, Schröder HC, Wang X. A Novel Biomimetic Approach to Repair Enamel Cracks/Carious Damages and to Reseal Dentinal Tubules by Amorphous Polyphosphate. *Polymers (Basel)*. 2017;9:120. doi: 10.3390/polym9040120.

Mummolo S, Nota A, Albani F, Marchetti E, Gatto R, Marzo G, Quinzi V, Tecco S. Salivary levels of *Streptococcus mutans* and *Lactobacilli* and other salivary indices in patients wearing clear aligners versus fixed orthodontic appliances: An observational study. *PLoS One*. 2020;15:e0228798. doi: 10.1371/journal.pone.0228798.

Najeeb S, Khurshid Z, Zafar MS, Khan AS, Zohaib S, Martí JM, Sauro S, Matinlinna JP, Rehman IU. Modifications in Glass Ionomer Cements: Nano-Sized Fillers and Bioactive Nanoceramics. *Int J Mol Sci.* 2016;17:1134. doi: 10.3390/ijms17071134.

Nimapornvanich A, Jitpukdeebodindra S, Hengtrakool C, Kedjarune-Leggat U. Bovine serum albumin release from novel chitosan-fluoro-aluminosilicate glass ionomer cement: stability and cytotoxicity studies. *J Dent.* 2009;37:686-690. doi: 10.1016/j.jdent.2009.05.007.

Oliveira DC, Thomson JJ, Alhabeil JA, Toma JM, Plecha SC, Pacheco RR, Cuevas-Suárez CE, Piva E, Lund RG. In vitro *Streptococcus mutans* adhesion and biofilm formation on different esthetic orthodontic archwires. *Angle Orthod.* 2021;1;91:786-793. [https://doi: 10.2319/121220-998.1](https://doi.org/10.2319/121220-998.1).

Papageorgiou SN, Xavier GM, Cobourne MT, Eliades T. Effect of orthodontic treatment on the subgingival microbiota: A systematic review and meta-analysis. *Orthod Craniofac Res.* 2018;21:175-185. doi: 10.1111/ocr.12237.

Patel A, Dhupar JK, Jajoo SS, Shah P, Chaudhary S. Evaluation of Adhesive Bond Strength, and the Sustained Release of Fluoride by Chitosan-infused Resin-modified Glass Ionomer Cement: An In Vitro Study. *Int J Clin Pediatr Dent.* 2021;14:254-257. doi: 10.5005/jp-journals-10005-1943.

Peres MA, Macpherson LMD, Weyant RJ, et al. Oral diseases: a global public health challenge. *Lancet.* 2019;394(10194):249- 260. doi: 10.1016/S0140-6736(19)31146-8.

Perkowski K, Baltaza W, Conn DB, Marczyńska-Stolarek M, Chomicz L. Examination of oral biofilm microbiota in patients using fixed orthodontic appliances in order to prevent risk factors for health complications. *Ann Agric Environ Med.* 2019;17;26:231-235. doi: 10.26444/aaem/105797.

Sahariah P, Masson M. Antimicrobial Chitosan and Chitosan Derivatives: a Review of the Structure-Activity Relationship. *Biomacromolecules.* 2017;18:3846-3868. doi: 10.1021/acs.biomac.7b01058.

Santonocito S, Polizzi A. Oral Microbiota Changes during Orthodontic Treatment. *Front Biosci (Elite Ed).* 2022;14:19. doi: 10.31083/j.fbe1403019.

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.

Silverman E, Cohen M, Demke RS, Silverman M. A new light-cured glass ionomer cement that bonds brackets to teeth without etching in the presence of saliva. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 1995;108:231-236. doi: 10.1016/s0889-5406(95)70014-5.

Tiveron AR, Delbem AC, Gaban G, Sasaki KT, Pedrini D. Effect of resin composites with sodium trimetaphosphate with or without fluoride on hardness, ion release and enamel demineralization, *Am J Dent*. 2013;26:201-206.

Toledano M, Osorio R, Osorio E, Cabello I, Toledano-Osorio M, Aguilera FS. In vitro mechanical stimulation facilitates stress dissipation and sealing ability at the conventional glass ionomer cement-dentin interface. *J Dent*. 2018;73:61-69. doi: 10.1016/j.jdent.2018.04.006.

Uysal T, Amasyali M, Ozcan S, Koyuturk AE, Sagdic D. Effect of antibacterial monomer-containing adhesive on enamel demineralization around orthodontic brackets: an in-vivo study. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 2011;139:650-656. doi: 10.1016/j.ajodo.2009.06.038.

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.

Whelton HP, Spencer AJ, Do LG, Rugg-Gunn AJ. Fluoride Revolution and Dental Caries: Evolution of Policies for Global Use. *J Dent Res*. 2019;98:837-846. doi: 10.1177/0022034519843495.

Xu HH, Weir MD, Sun L, Moreau JL, Takagi S, Chow LC & Antonucci JM Strong nanocomposites with Ca, PO₄, and F release for caries inhibition *Journal of Dental Research*. 2010;89:19-28. doi: 10.1177/0022034509351969.

Zhang X, Li Y, Sun X, Kishen A, Deng X, Yang X et al. Biomimetic remineralization of demineralized enamel with nanocomplexes of phosphorylated chitosan and amorphous calcium phosphate. *J Mater Sci Mater Med*. 2014;25:2619-2628. doi: 10.1007/s10856-014-5285-2.

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 da tabela

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

Lista de figuras

Legenda de Figuras

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

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

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

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

Figura 5: Imagens obtidas através do MEV e análise da % atômica de elementos químicos nos Cimentos Ionoméricos Experimentais: (a) CIVMR; (b) CIVMR-14%TMPnano; (c) CIVMR-0,25%Qui-Ph; (d) CIVMR-0,5%Qui-Ph; (e) CIVMR-14%TMPnano-0,25%Qui-Ph; (f) CIVMR-14%TMPnano-0,5%Qui-Ph ($\times 1000$). Asterisco: Depósito globulares, semelhantes a minerais.

Figura 6: 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 7: 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 8: 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 9: 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 10: 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 11: Valores médios ($\pm dp$, $n=6$) do metabolismo celular após 24 horas e 72 horas de acordo com os cimentos ionoméricos experimentais. Letras minúsculas indicam diferenças

estatísticas entre os grupos e as maiúsculas entre os tempos (ANOVA 2-critérios, Student-Newman-Keuls, $p < 0,001$).

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

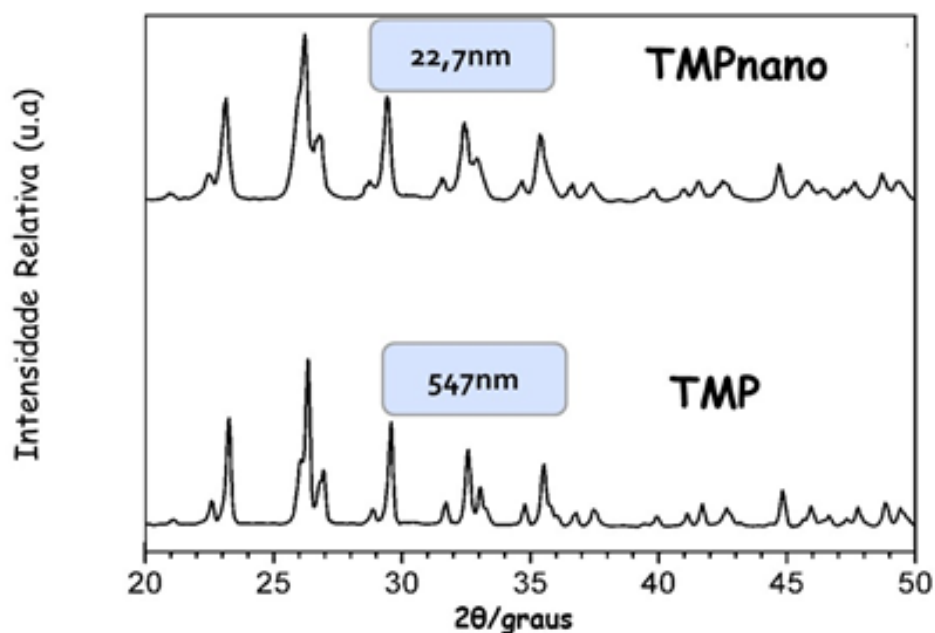


Figura 2: Imagens obtidas através da Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) para o TMP micrométrico (TMP) e TMP nanoparticulado (TMPnano) após moagem de 48 horas.

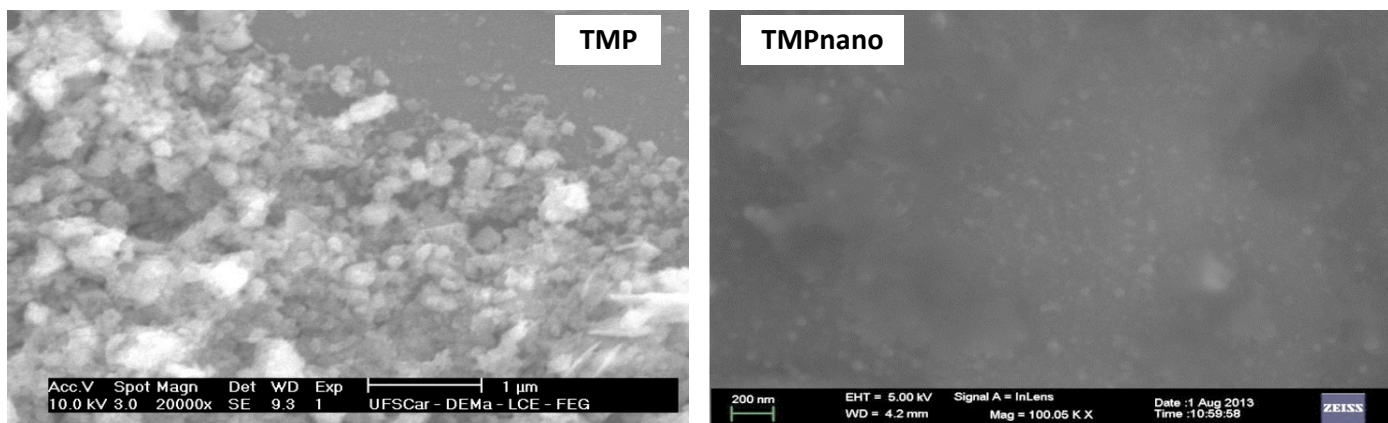


Figura 3: Espectros de infravermelho (FI-IR) da quitosana - precursor (em preto) e da quitosana fosforilada - produto (em vermelho).

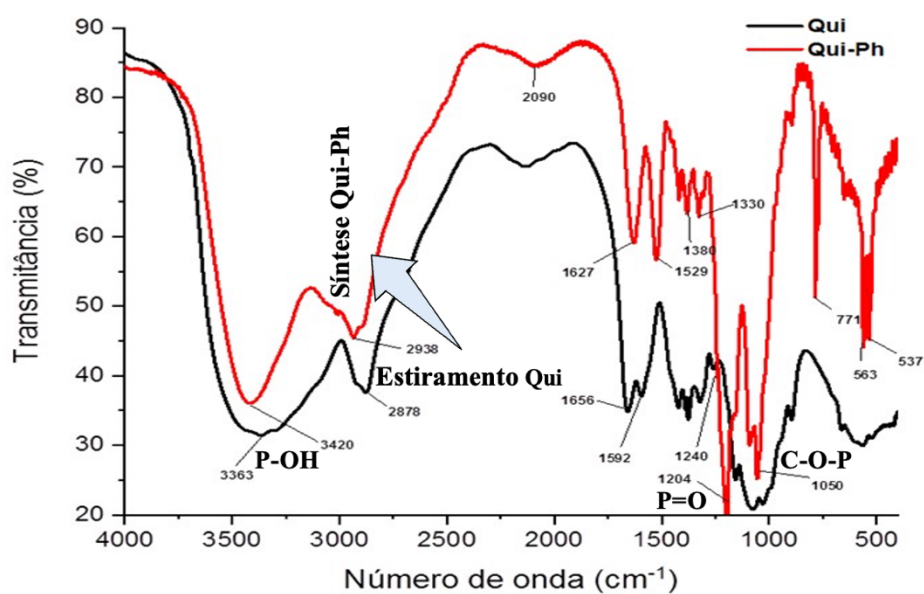


Figura 4: Espectro de RMN ^{31}P da quitosana fosforilada produzida.

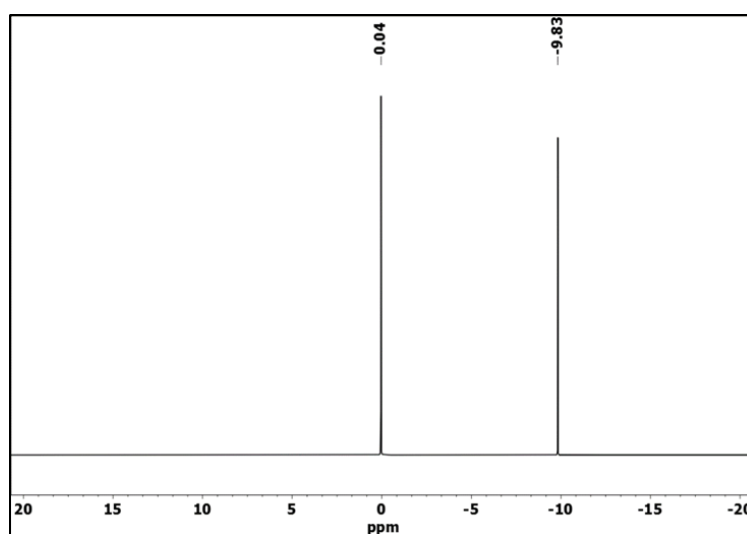


Tabela 1: Valores médios ($\pm dp$, $n=12$) dos dados de RT, RD e DS dos monômeros de acordo com os Cimentos Ionoméricos Experimentais e tempo (24 horas e 7 dias).

Cimentos Ionoméricos Experimentais	RCD	RCD	RTD	RTD	DS	DS
	MPa	MPa	MPa	MPa	KHN	KHN
Tempo	24 horas	7 dias	24 horas	7 dias	24 horas	7 dias
CIVMR	132,3 (6,8)a,A	130,8 (3,5)a,A	13,8 (1,7)a,A	20,5 (0,8)a,B	231,8 (2,3)a,A	237,9 (1,2)a,A
CIVMR-14%TMPnano	101,8 (1,5)b,A	112,2 (1,4)b,B	11,0 (1,0)b,A	14,5 (0,9)b,B	287,2 (2,2)b,A	294,8 (2,3)b,A
CIVMR-0,25%Chi-Ph	126,3 (4,0)c,A	128,3 (4,8)a,A	15,2 (1,9)a,A	15,5 (1,3)b,A	339,9 (3,3)c,A	346,9 (2,7)c,A
CIVMR-0,5%Chi-Ph	112,2 (2,9)d,A	132,5 (8,5)a,B	15,5 (2,0)a,A	17,9 (1,0)c,B	288,6 (2,0)b,A	352,3 (3,6)c,B
CIVMR-14%TMPnano-0,25%Qui-Ph	114,7 (3,2)d,A	154,2 (2,7)c,B	14,0 (1,6)a,A	26,0 (2,8)d,B	303,9 (2,5)d,A	294,7 (2,6)d,B
CIVMR-14%MPnano-0,5%Qui-Ph	104,7 (5,3)b,A	112,8 (2,0)b,B	15,0 (1,0)a,A	14,0 (1,7)b,A	309,0 (3,5)d,A	350,4 (2,4)c,B

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 5: Imagens obtidas através do MEV e análise da % atômica de elementos químicos nos Cimentos Ionoméricos Experimentais: (a) CIVMR; (b) CIVMR-14%TMPnano; (c) CIVMR-0,25%Qui-Ph; (d) CIVMR-0,5%Qui-Ph; (e) CIVMR-14%TMPnano-0,25%Qui-Ph; (f) CIVMR-14%TMPnano-0,5%Qui-Ph ($\times 1000$). Asterisco: Depósito globulares, semelhantes a minerais.

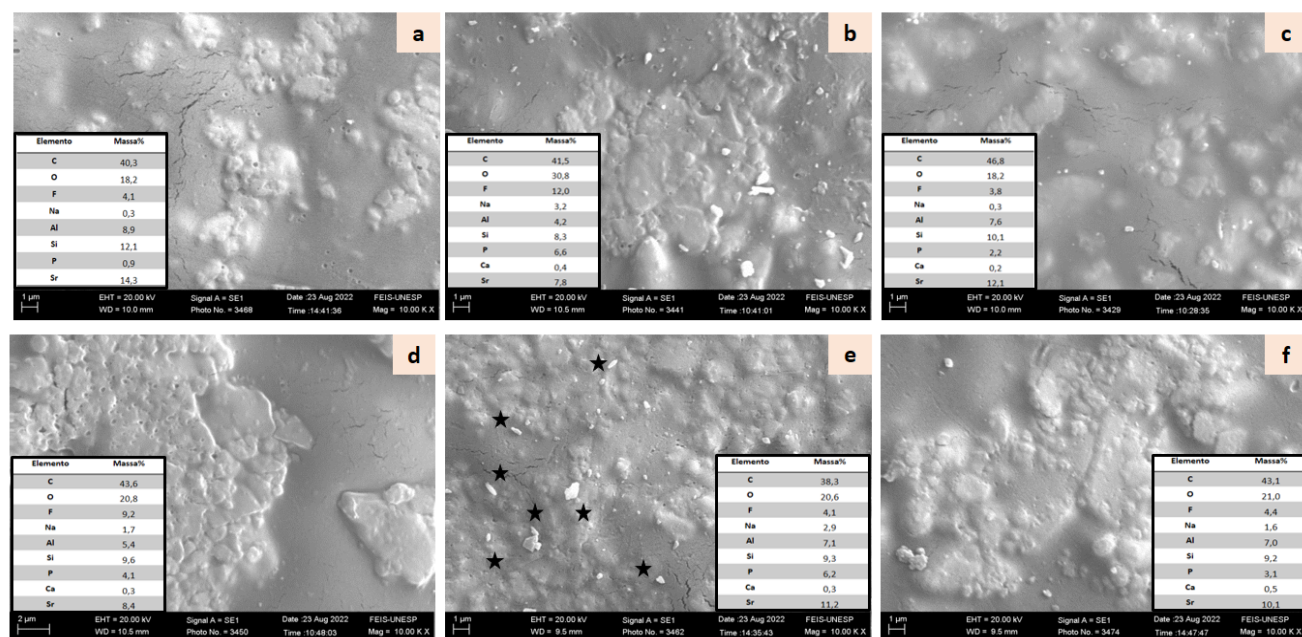


Figura 6: Porcentagem do Grau de Conversão dos Monômeros (%GC, após 24 horas) de acordo com os Cimentos Ionoméricos Experimentais. Letras minúsculas indicam diferenças estatísticas entre os grupos (ANOVA 1-critério, Student-Newman-Keuls, $p < 0,001$).

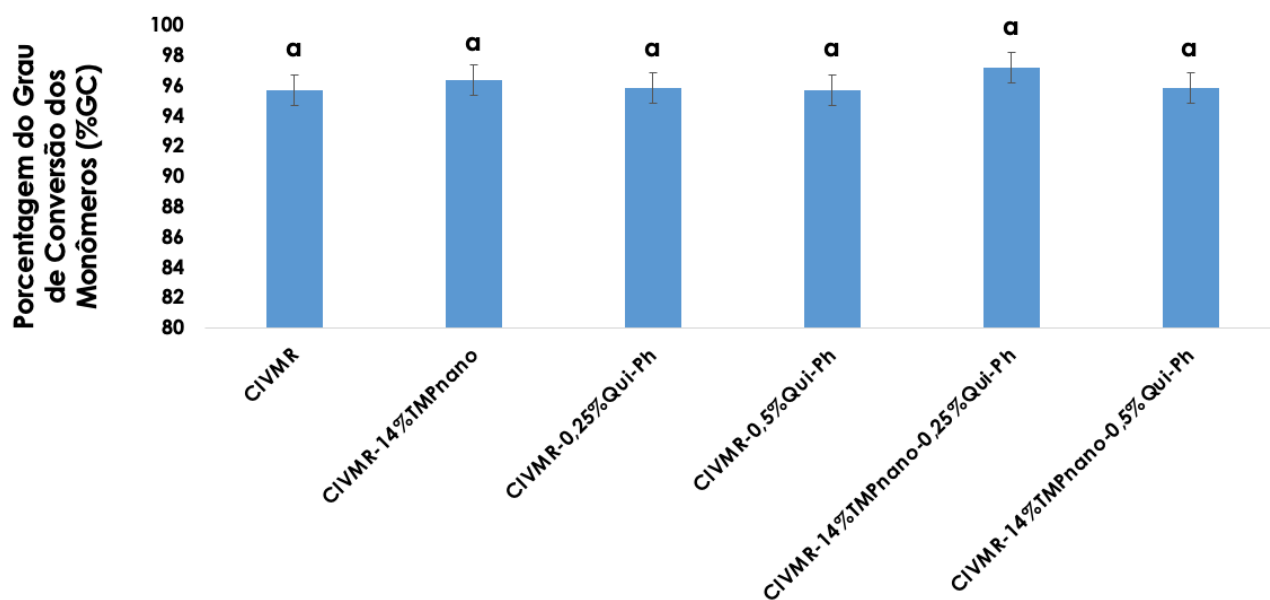


Figura 7: Valores médios de F liberados nas soluções DE e RE em função do tempo (15 dias), de acordo com os Cimentos Ionoméricos Experimentais. Letras minúsculas indicam diferenças estatísticas entre os grupos (ANOVA 2-critérios, Student-Newman-Keuls, $p < 0,001$).

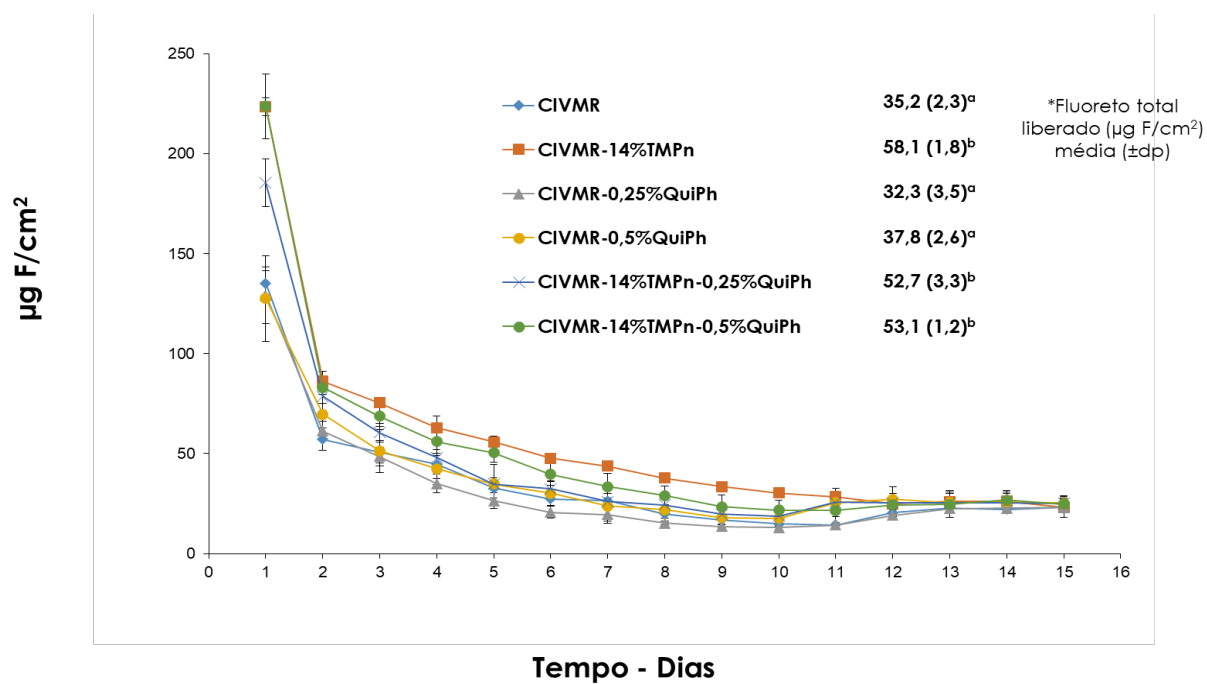


Figura 8: Valores médios (\pm dp, n=4) de adesão ao *S. mutans* (Log_{10} -UFC/mL) de acordo com os Cimentos Ionoméricos Experimentais. Letras minúsculas indicam diferenças estatísticas entre os grupos (ANOVA 1-critério, Student-Newman-Keuls, $p < 0,001$).

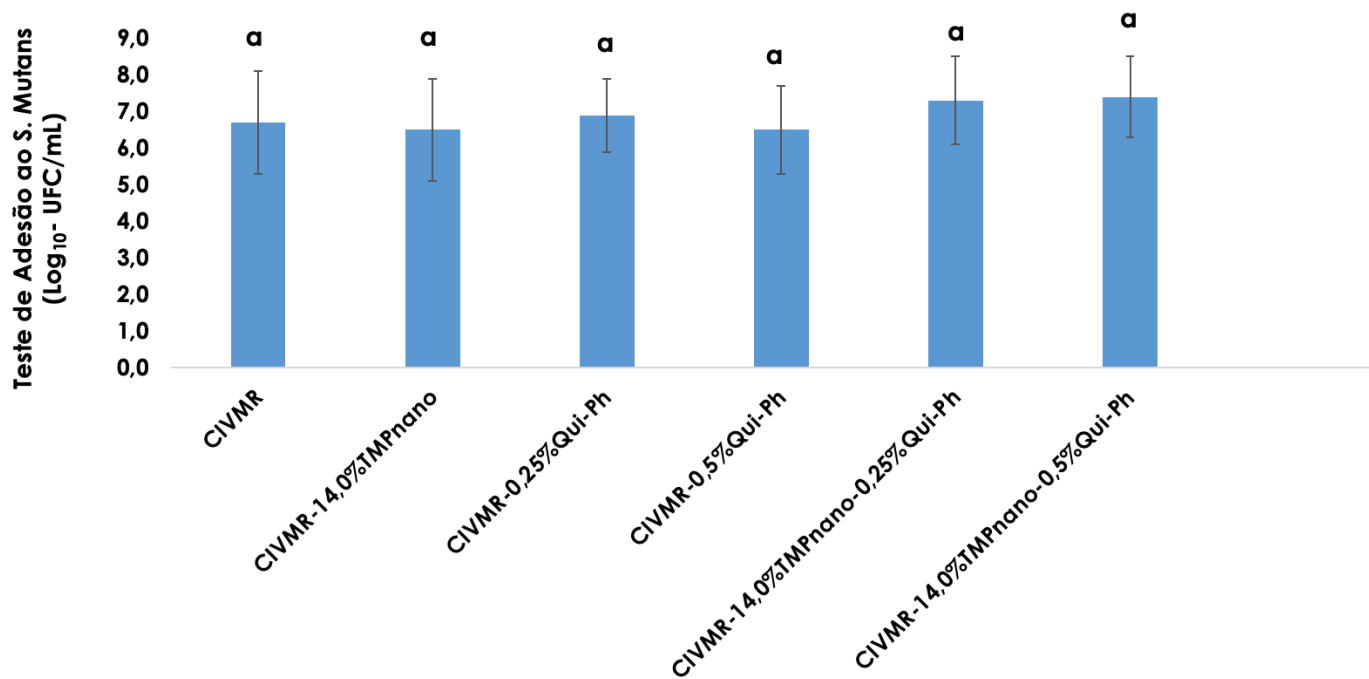


Figura 9: Valores médios (\pm dp, n=6) de crescimento de biofilme (*S. mutans*, Log₁₀-UFC/mL) de acordo com os cimentos ionoméricos experimentais. Letras minúsculas indicam diferenças estatísticas entre os grupos (ANOVA 1-critério, Student-Newman-Keuls, $p < 0,001$).

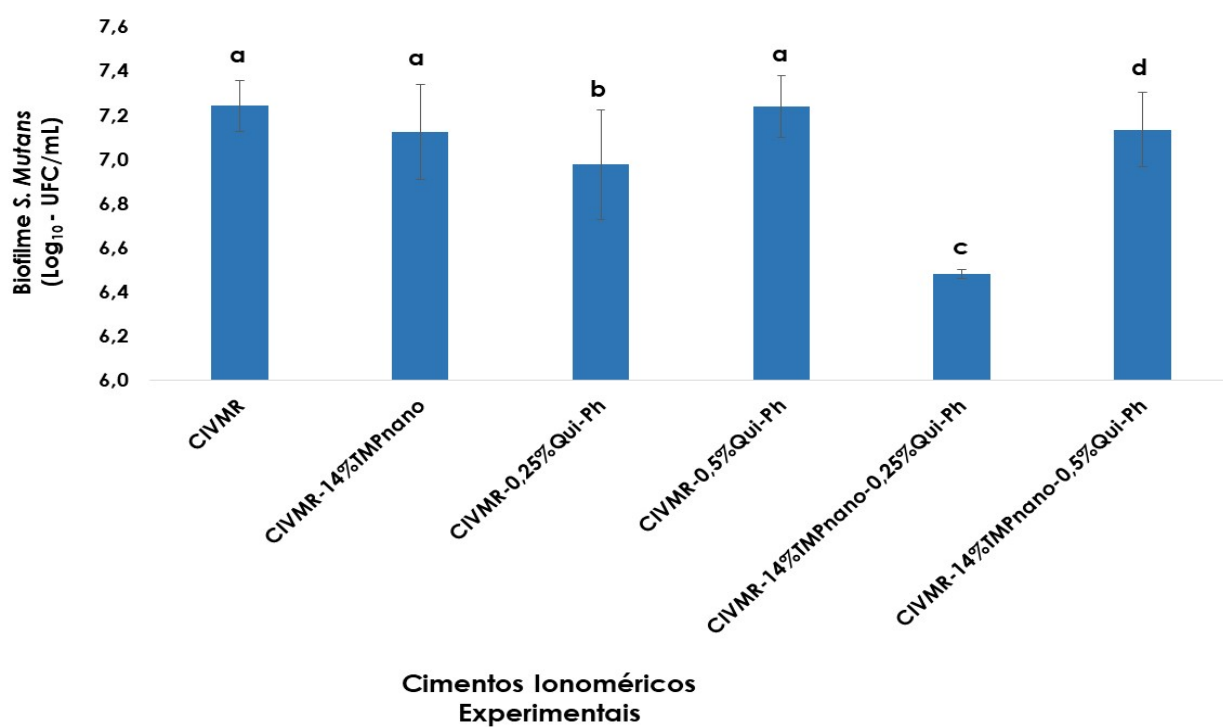


Figura 10: Valores médios (\pm dp, n=6) da viabilidade celular XTT (Biofilme *S. Mutans*, Log₁₀-UFC/mL) de acordo com os cimentos ionoméricos experimentais. Letras minúsculas indicam diferenças estatísticas entre os grupos (ANOVA 1-critério, Student-Newman-Keuls, $p < 0,001$).

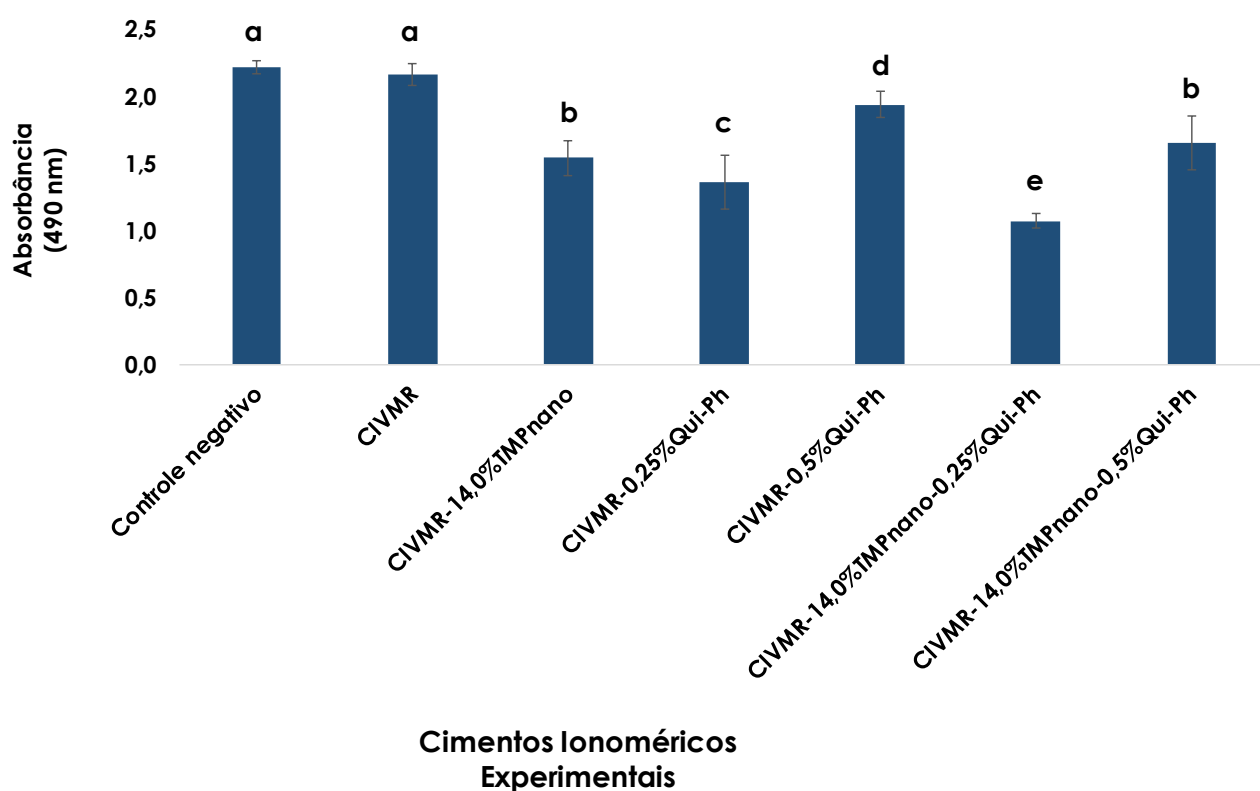
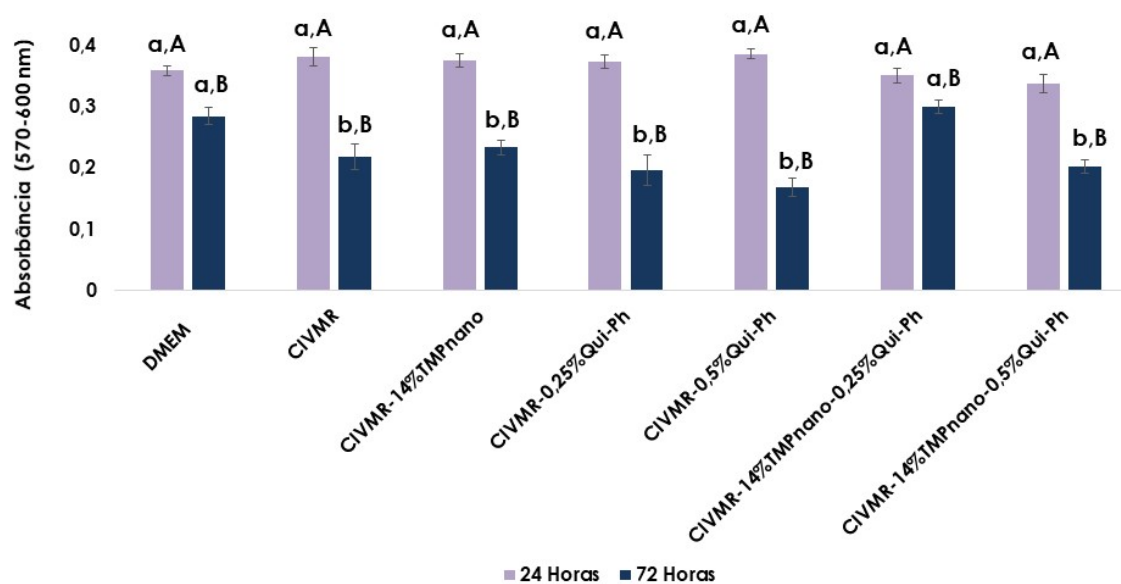


Figura 11: Valores médios (\pm dp, n=6) do metabolismo celular após 24 horas e 72 horas de acordo com os cimentos ionoméricos experimentais. Letras minúsculas indicam diferenças estatísticas entre os grupos e as maiúsculas entre os tempos (ANOVA 2-critérios, Student-Newman-Keuls, $p < 0,001$).



ANEXOS

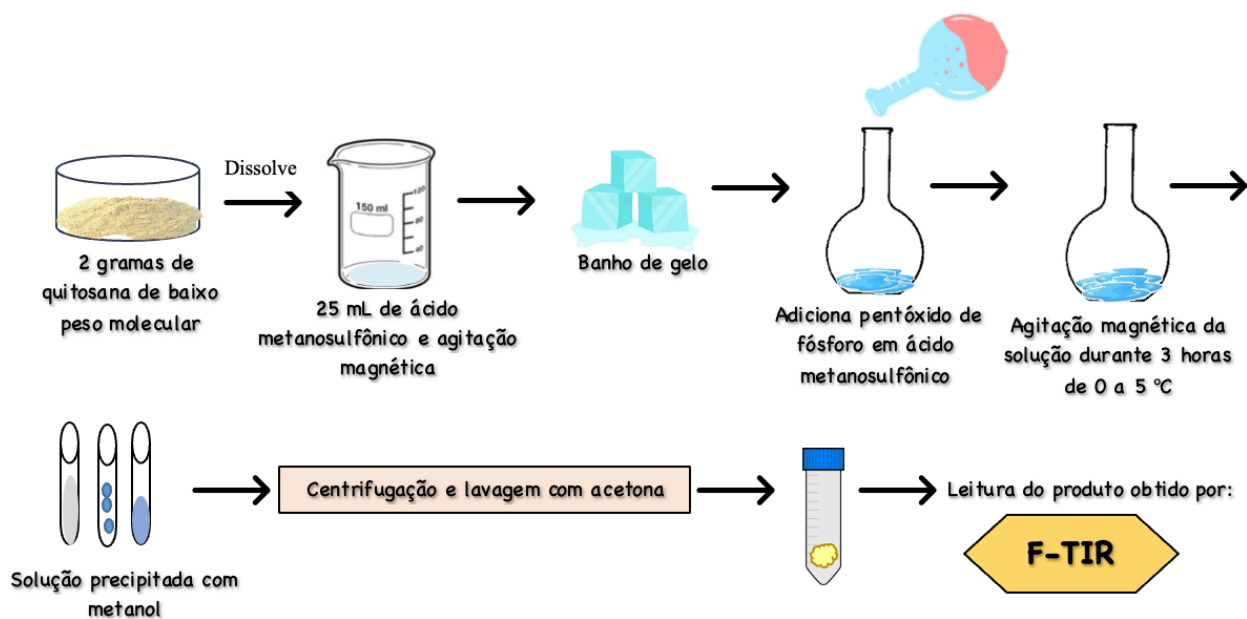
Gabriela Leal Peres Fernandes

7.1 ANEXO A

Síntese e Caracterização do TMPnano

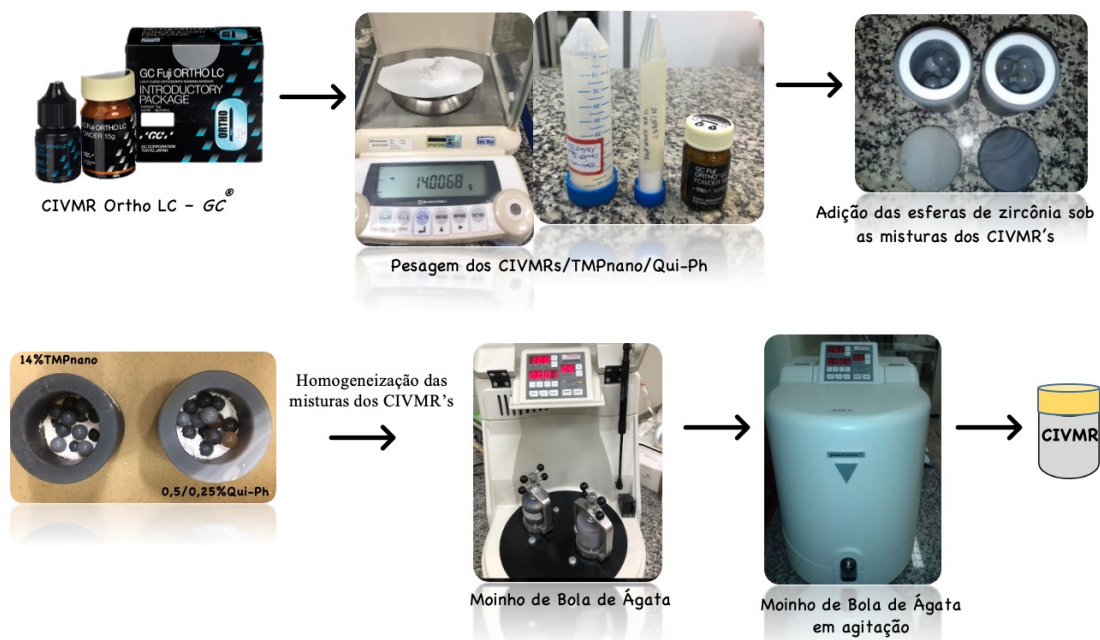


7.2 ANEXO B







Síntese e Caracterização da Qui-Ph

7.3 ANEXO C

Preparo da mistura dos CIVMR's

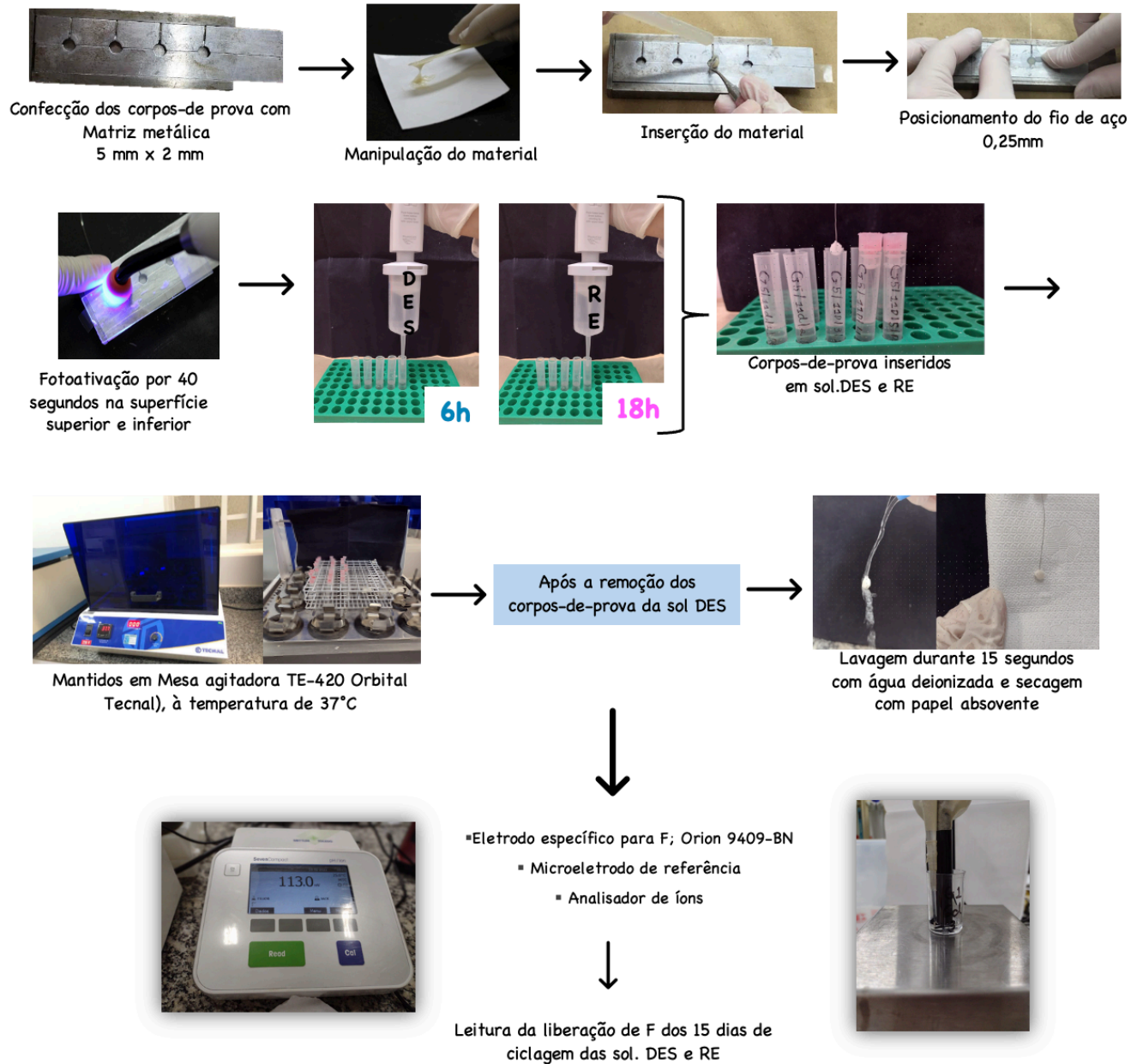


Grupos Experimentais :

- Grupo 1: CIVMR 
- Grupo 2: CIVMR + 14%TMPnano: CIVMR-14%TMPnano 
- Grupo 3: CIVMR + 0,25% Qui-Ph: CIVMR-0,25%Qui-Ph 
- Grupo 4: CIVMR + 0,5% Qui-Ph: CIVMR-0,5%Qui-Ph 
- Grupo 5: CIVMR + 14%TMPnano + 0,25% Qui-Ph: CIVMR-14%TMPnano-0,25%Qui-Ph 
- Grupo 6: CIVMR + 14%TMPnano + 0,25% Qui-Ph: CIVMR-14%TMPnano-0,25%Qui-Ph 

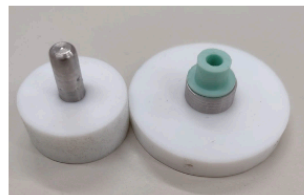
7.4 ANEXO D

Liberação de F dos CIVMR's



7.5 ANEXO E

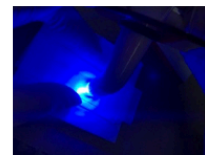
Avaliação da Resistência à Compressão



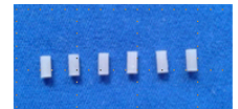
Confecção dos corpos-de-prova com Matriz de silicone 4mm x 6mm



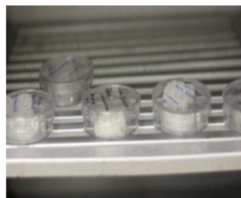
Manipulação do material



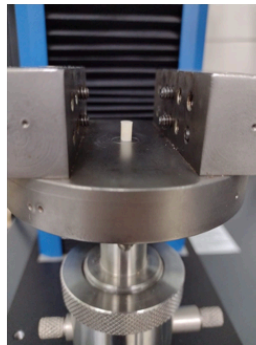
Inserção do material na matriz e fotopolimerização por 40s



Corpos-de-prova (n=12)



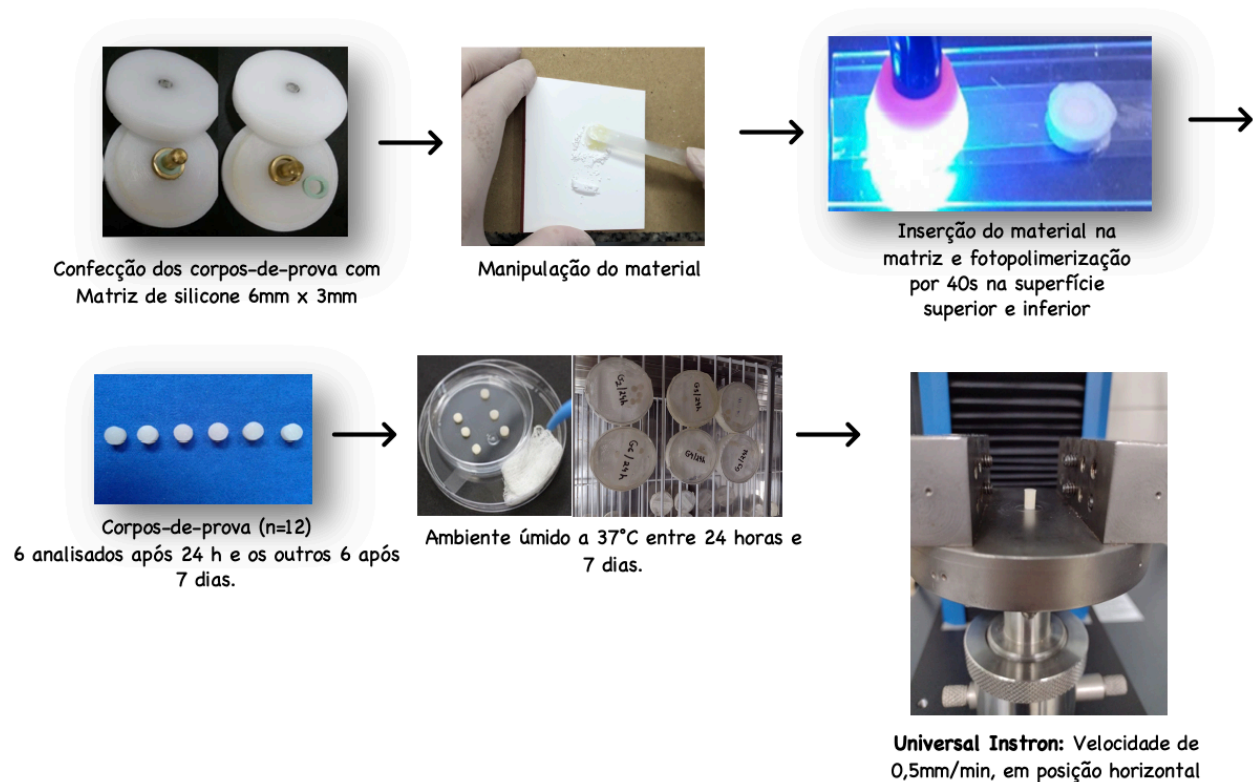
Ambiente úmido a 37°C entre 24 horas e 7 dias.



Universal Instron: Velocidade de 0,75mm/min, em posição vertical

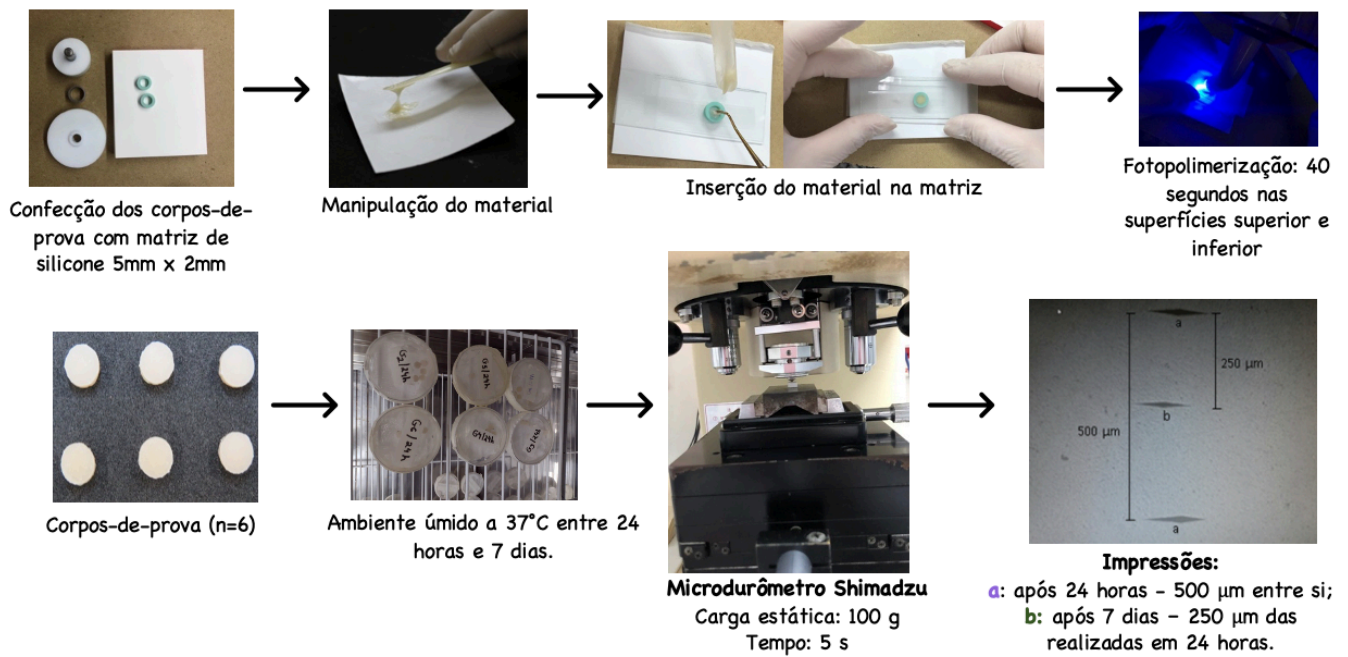
7.6 ANEXO F

Avaliação da Resistência à Tração



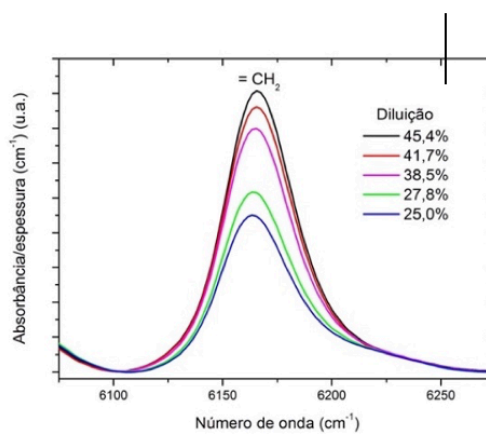
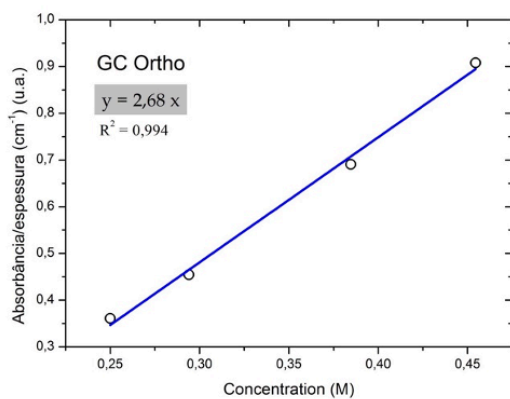
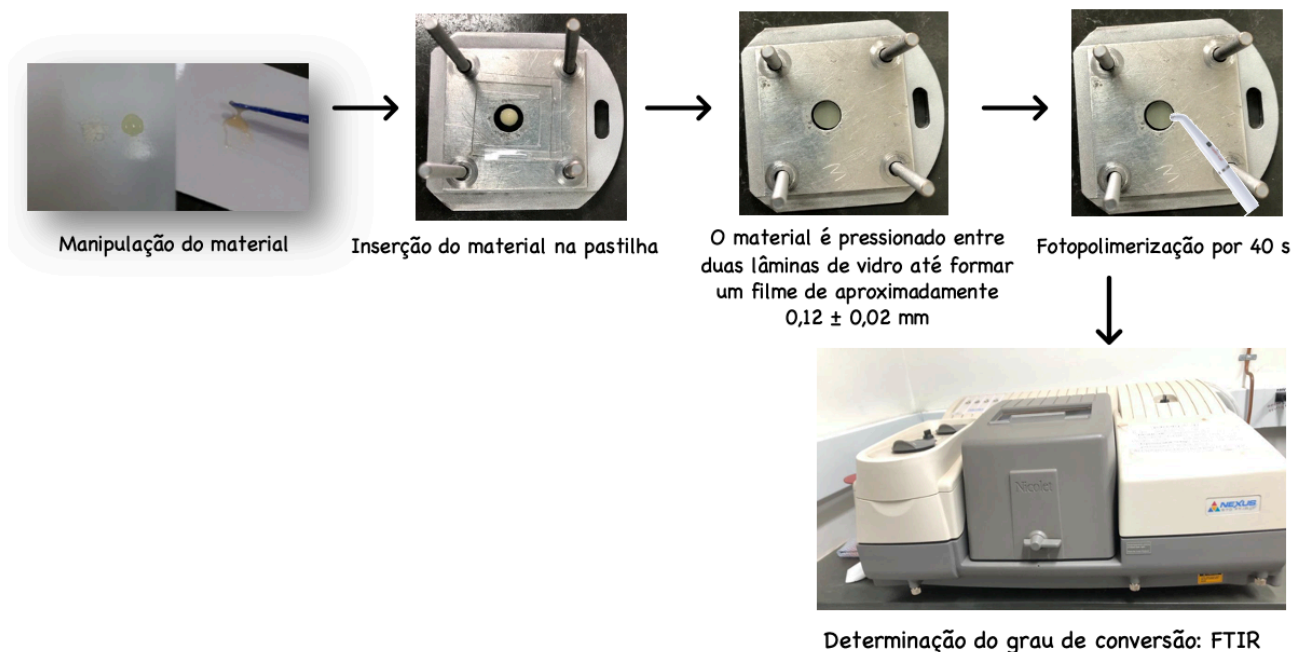
7.7 ANEXO G

Avaliação da Dureza de Superfície



7.8 ANEXO H

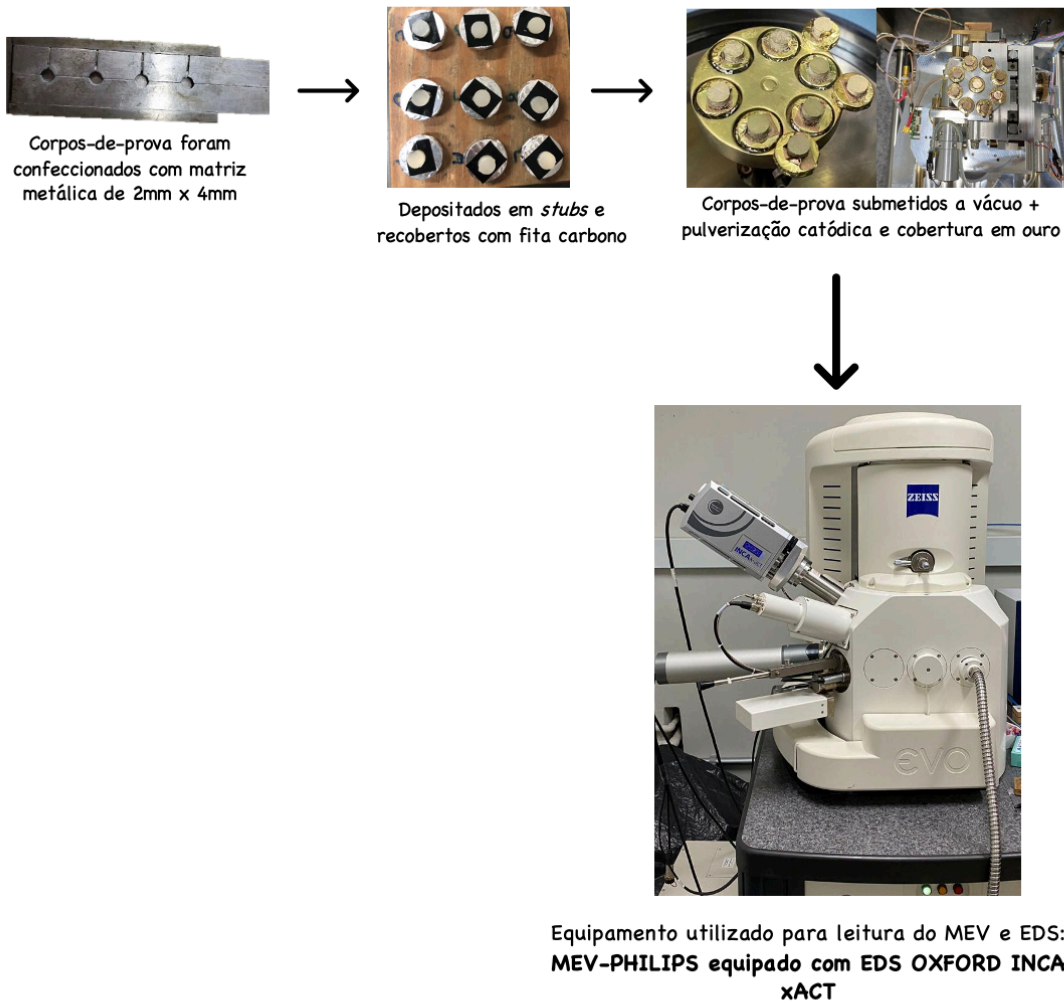
Determinação do Grau de Conversão dos Monômeros



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

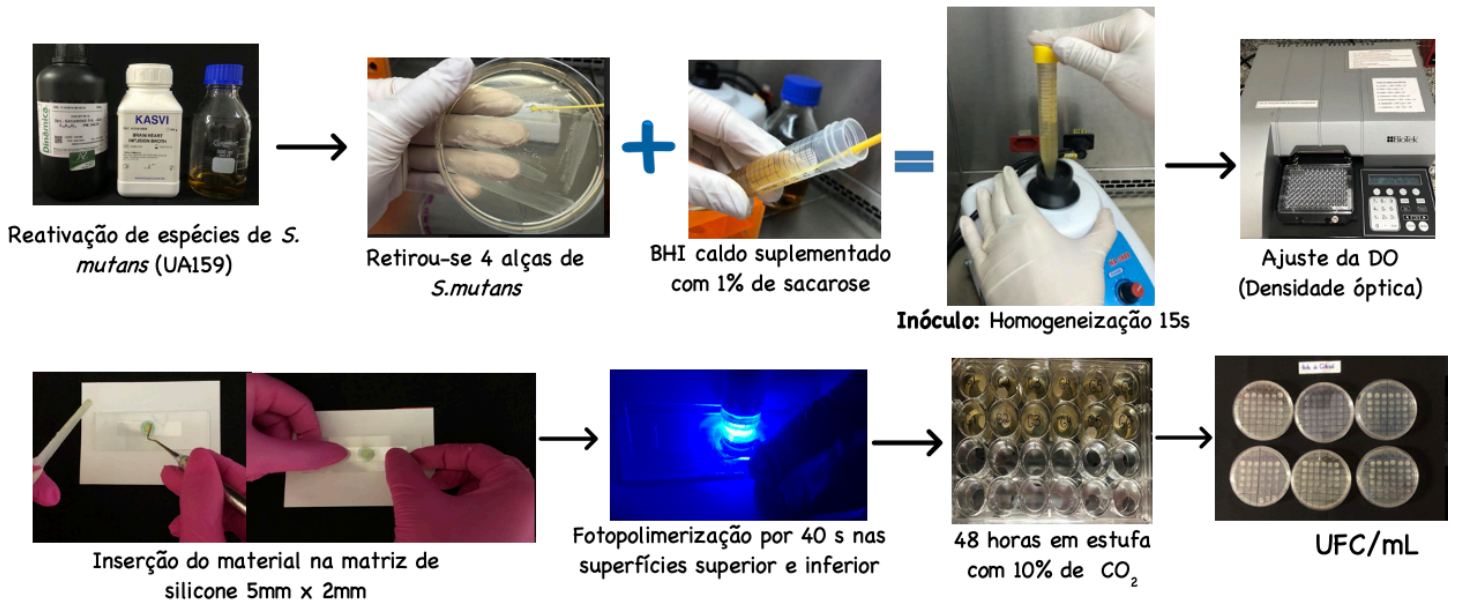
7.9 ANEXO I

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



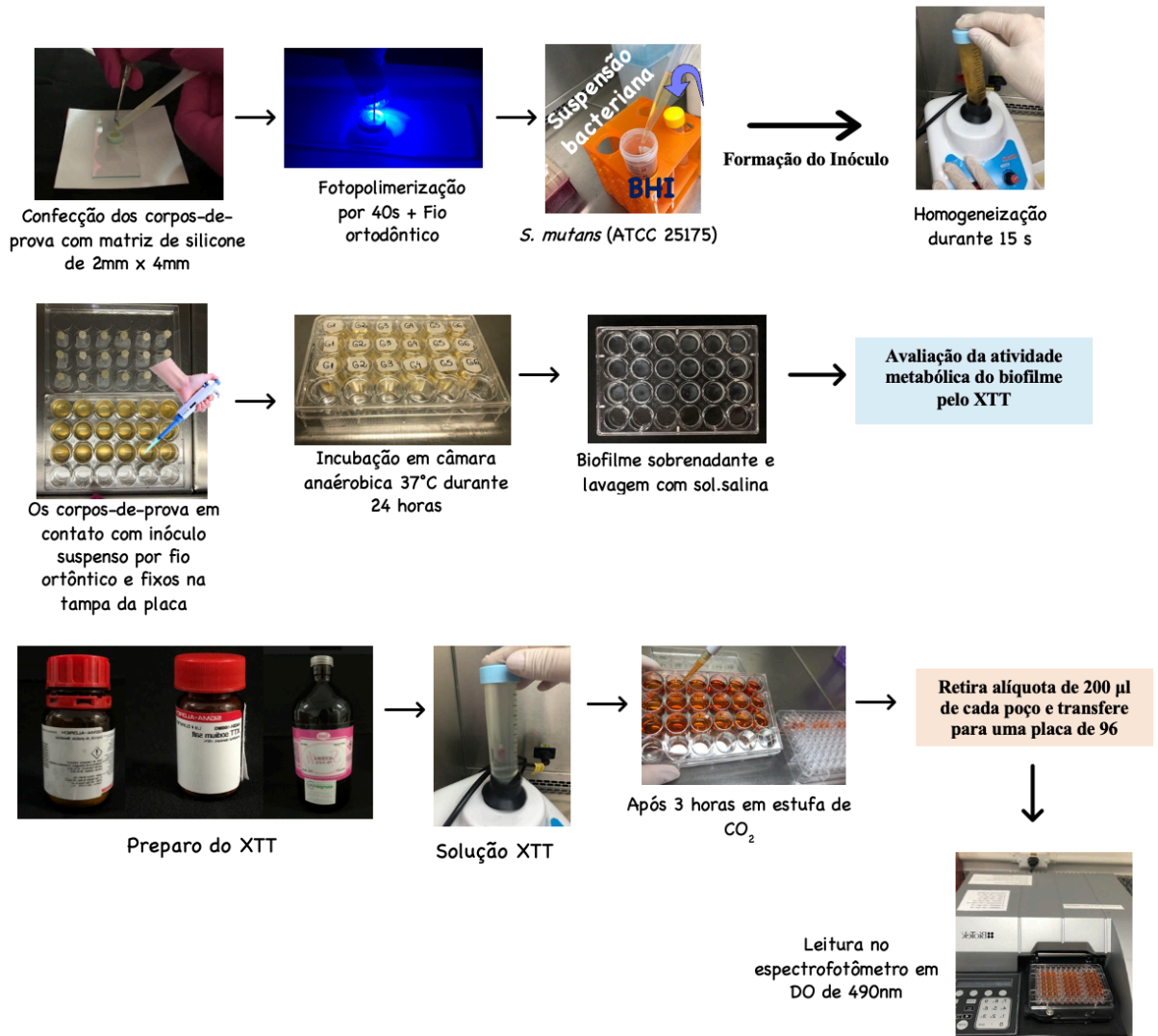
8 ANEXO J

Teste de Adesão ao *Streptococcus Mutans*



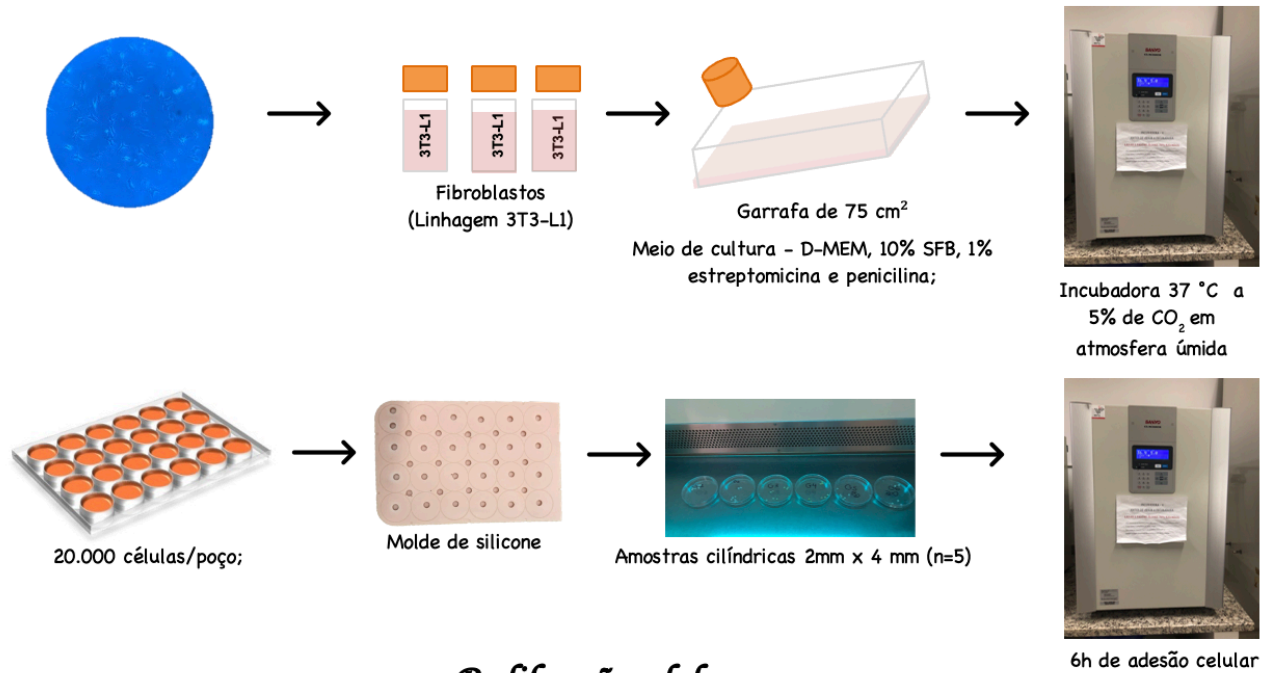
8.1 ANEXO L

Avaliação do Biofilme pelo método do XTT



8.2 ANEXO M

Análise da Citotoxicidade dos CIVMR's

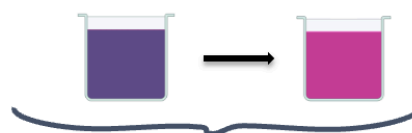


Proliferação celular



Após 24 e 72 horas de exposição ao cimentos

Redução da Resazurina



Resazurina diluída no meio de cultura



Leitura em espectrofotômetro (570-600nm)

Leitura em espectrofotômetro (570-600nm)