

LETÍCIA MARANHÃO PENHA ARAUJO

**Avaliação da microdureza, alteração de cor e do efeito antimicrobiano
(PMA-qPCR) de um adesivo modificado por nanopartículas de prata**

São Paulo

2023

LETÍCIA MARANHÃO PENHA ARAUJO

**Avaliação da microdureza, alteração de cor e do efeito antimicrobiano
(PMA-qPCR) de um adesivo modificado por nanopartículas de prata**

Versão Corrigida

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, pelo Programa de Pós-Graduação em Odontologia para obter o título de Mestre em Ciências

Área de concentração: Biomateriais.

Orientador: Prof. Dr. Igor Studart Medeiros

São Paulo

2023

FICHA CATALOGRÁFICA

Catálogo da Publicação
Serviço de Documentação Odontológica
Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

Araujo, Letícia Maranhão Penha.

Avaliação da microdureza, alteração de cor e do efeito antimicrobiano (PMA-qPCR) de um adesivo modificado por nanopartículas de prata / Letícia Maranhão Penha Araujo; orientador Igor Studart Medeiros. -- São Paulo, 2023.

61 p. : fig., tab., graf. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) -- Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas. -- Área de concentração: Biomateriais. Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

Versão Corrigida.

1. Agentes antimicrobianos. 2. Nanopartículas metálicas. 3. PCR em tempo real. 4. Teste de dureza. 5. Cor. I. Medeiros, Igor Studart. II. Título.

Fábio Jastwebski – Bibliotecário - CRB8/5280

Araujo LMP. Avaliação da microdureza, alteração de cor e do efeito antimicrobiano (PMA-qPCR) de um adesivo modificado por nanopartículas de prata. Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Aprovado em: 16 /06/2023

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a). Ericka Tavares Pinheiro

Instituição: Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo - FOUSP

Julgamento: Aprovada

Prof(a). Dr(a). André Guaraci de Vito de Moraes

Instituição: Oregon Health and Science University – OHSU

Julgamento: Aprovada

Prof(a). Dr(a). Ricardo Sgura

Instituição: Universidade Nove de Julho – UNINOVE

Julgamento: Aprovada

Dedico este trabalho à minha mãe, minha grande incentivadora
e exemplo de força de vontade, otimismo e fé.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à **Deus** pelo dom da vida, por ser meu refúgio e fortaleza, por ter me conduzido por caminhos que me fizeram chegar até aqui.

Gostaria de agradecer meu orientador, **Prof. Dr. Igor Studart Medeiros**, por abrir as portas da FOU SP para mim, por confiar em mim e me dar a oportunidade de desenvolver esta pesquisa ao seu lado. Agradeço enormemente por todo incentivo desde nosso contato inicial, facilitando e servindo como ponte para meu ingresso na vida acadêmica.

Agradeço à **Profa. Dra. Ericka Tavares Pinheiro** por demonstrar que responsabilidade, profissionalismo e dedicação podem andar juntos com gentileza e paciência. Sem dúvidas os dias exaustivos nos laboratórios foram mais tragáveis com sua presença e compreensão. Agradeço também por todos os desafios impostos e por me transmitir confiança e acreditar em meu potencial.

Agradeço aos professores do Departamento de Biomateriais e Biologia Oral, **Prof. Dr. Fernando Neves, Prof. Dr. Carlos Francci, Prof. Dr. Paulo César, Prof. Dr. Victor Arana-Chavez, Profa. Dra. Josete Meira, Prof. Dr. Roberto Braga**, por todos os ensinamentos compartilhados ao longo desses anos.

Às minhas amigas da Endodontia FOU SP, agradeço imensamente. **Larissa Dantas, Ana Carolina, Júlia Régis e Alana Aguiar**, sem vocês nada disso seria construído. Agradeço por terem cruzado meu caminho, por tornarem a rotina laboratorial mais leve e fornecerem um auxílio imprescindível para a conclusão desta pesquisa. Carrego vocês sempre em meu coração.

Agradeço à todos os funcionários da FOU SP e ICB-USP, sobretudo à **Rosa Nogueira, Elidamar Bastos, Silvana Coppola, Elisângela Chinen, Antônio Lascala** por todo auxílio sempre que necessário.

Agradeço ao **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)** pela concessão da bolsa de mestrado.

Agradeço em especial alguns amigos, **Leonardo Fróes, Daniella Martins, Ana Carla Pires, Julliana Andrade, Marcella Soares, Juliana Cristina Peixoto, Matheus Linares, Tadeu Badaró, Ruan Pinto, Yago Bueno, Louise Duarte**, por toda parceria e momentos compartilhados, tornando essa jornada um pouco mais fácil!

Agradeço aos meus pais, **Maria da Graça Maranhão e Alexandre Araujo** por toda educação que me proporcionaram, acompanhada de incentivo e apoio. Sempre estiveram ao meu lado fornecendo proteção, cuidado, empatia, amor e palavras de afeto que renovavam minha força para persistir na caminhada e suportar a distância e saudade. Sou muito grata também a toda **minha família**, por acompanharem de perto minha trajetória e se orgulharem de mim. Obrigada por todas as orações.

A vida é o dever que nós trouxemos para fazer em casa.
Quando se vê, já são seis horas!
Quando se vê, já é sexta-feira!
Quando se vê, já é natal...
Quando se vê, já terminou o ano...
Quando se vê perdemos o amor da nossa vida.
Quando se vê passaram 50 anos!
Agora é tarde demais para ser reprovado...
Se me fosse dado um dia, outra oportunidade, eu nem olhava o relógio.
Seguiria sempre em frente e iria jogando pelo caminho a casca dourada e inútil das
horas...
Seguraria o amor que está a minha frente e diria que eu o amo...
E tem mais: não deixe de fazer algo de que gosta devido à falta de tempo.
Não deixe de ter pessoas ao seu lado por puro medo de ser feliz.
A única falta que terá será a desse tempo que, infelizmente, nunca mais voltará.

O tempo – Mário Quintana

RESUMO

Araujo LMP. Avaliação da microdureza, alteração de cor e do efeito antimicrobiano (PMA-qPCR) de um adesivo modificado por nanopartículas de prata [dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2023. Versão Corrigida.

O objetivo do presente estudo foi avaliar a microdureza, a alteração de cor e o efeito antimicrobiano em um sistema de biofilme microcosmo, *in vitro*, por PMA-qPCR, de um sistema adesivo modificado por nanopartículas de prata (NAg). Um adesivo convencional de três passos (Scotchbond Multi-Purpose, 3M, Sumaré, SP, Brasil) com adição de 0,05% ou 0,1% de NAg no *bond* foi utilizado. Foram avaliados 3 grupos experimentais: B0 (SBMP), B0,05 (SBMP + 0,05% NAg) e B0,1 (SBMP + 0,1% NAg). Após 40 horas de formação do biofilme, as alíquotas foram submetidas à avaliação pela técnica molecular qPCR (com ou sem uso de PMA) para bactérias totais e pela técnica de contagem de unidades formadoras de colônias (UFC). Ensaio de microdureza Knoop (KHN) e avaliação de cor pelo sistema CIELAB (ΔE_{ab}) também foram realizados. Os dados obtidos foram submetidos aos testes de normalidade (Shapiro-Wilk) e, posteriormente, aos testes ANOVA, Tukey ou Mann-Whitney ($p < 0,05$). Em relação à contagem de UFC, nenhuma redução bacteriana foi observada nos grupos B0,05 e B0,1 quando comparados ao grupo controle B0. Para o qPCR (com ou sem PMA), os grupos não apresentaram diferenças estatisticamente significantes. Quando comparamos a quantificação de DNA em cada grupo experimental utilizando as duas técnicas (com PMA ou sem PMA), foi possível perceber que para o grupo B0,1, a técnica com uso de PMA apresentou menor quantidade de DNA. No ensaio de microdureza, o B0,1 apresentou a menor média seguido do B0,05, sendo significativamente diferentes do grupo B0 (controle). Para a avaliação da alteração de cor, foi demonstrada que o grupo B0,1 apresentou maior alteração na cor se comparado ao B0,05. Concluiu-se que nos adesivos com NAg houve alteração significativa da cor com o aumento da concentração de NAg e redução significativa da dureza para o grupo com maior concentração de NAg. O efeito antibacteriano não foi evidenciado.

Palavras-chave: Agentes antimicrobianos. Nanopartículas metálicas. PCR em tempo real. Testes de dureza. Cor.

ABSTRACT

Araujo LMP. Evaluation of the microhardness, color change and antimicrobial effect (PMA-qPCR) of a silver nanoparticle modified adhesive [dissertation]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2023. Versão Corrigida.

The aim of this study was to evaluate the microhardness, color change and antimicrobial effect in a microcosm biofilm system, *in vitro*, using PMA-qPCR of an adhesive system modified by silver nanoparticles (AgNPs). 0.05% or 0.1% of AgNPs were incorporated into a conventional three steps adhesive (bond, Scotchbond Multi-Purpose, 3M, Sumaré, SP, Brasil). Three experimental groups were evaluated: B0 (SBMP), B0.05 (SBMP + 0.05% AgNP) and B0.1 (SBMP + 0.1% AgNP). After forty hours of biofilm formation, the specimens were submitted to evaluation by qPCR molecular technique (with or without PMA), for total bacteria and the colony forming units (CFU) count. Complementary assessments of Knoop hardness test (KHN) and color evaluation by CIELAB(ΔE_{ab}) system were also performed. Data obtained were submitted to normality tests (Shapiro-Wilk) and after, to ANOVA, Tukey and Mann-Whitney test ($p < 0.05$). Regarding the CFU count, no bacterial reduction was observed in groups B0.05 and B0.1 when compared to the control group B0. For qPCR, (with or without PMA) the groups did not show any statistically significant differences. When we compared the DNA quantification in each experimental group using both strategies (with PMA x without PMA) it was possible to notice that for the B0,01 group the technique using PMA presented a smaller amount of DNA, when compared to the group without PMA ($p = 0,04$) In terms of Knoop hardness test, B0,1 group had the lowest mean, followed by B0,05 group, being statistically different from B0 group (control). For color change assay, a statistically significant difference was demonstrated between modified groups (B0.05 and B0.1) with the B0.1 group showing the greater change in color. Is possible to conclude that in adhesives with AgNP there was a significant change in color and a significant reduction in hardness as the concentration of AgNP increased. The antibacterial effect was not evidenced.

Keywords: Anti-bacterial agentes. Metal nanoparticles. Real-time polymerase chain reaction. Hardness Tests. Color.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 4.3 - A: Discos de resina composta com 1mm de espessura; B: Aplicação do *bond* sobre o disco de resina; C: Lamínula nº5 adaptada sobre o adesivo para posterior fotopolimerização..... 15
- Figura 4.5.1 -Contagem bacteriana de UFC utilizando aplicativo Colony Counter 43
- Figura 4.5.2 - Termociclador Step One Plus thermocycler (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) 43
- Gráfico 6.1 - Valores de UFC em biofilmes do grupo controle (B0) e dos grupos tratados com NAg nas concentrações 0,05% (B0,05) e 0,1 (B0,1). A linha horizontal que cruza cada retângulo representa a mediana, em log, dos valores encontrados..... 43
- Figura 6.2 - Valores da quantificação bacteriana (cópias de DNA/mL) por grupo das amostras associadas ou não ao PMA. As linhas horizontais que cruzam cada retângulo representam a mediana, em log, dos valores encontrados 43

LISTA DE TABELAS

- Tabela 4.5.2 - Sequência dos primers para a detecção de bactérias totais 14
- Tabela 6.1 - Estatística descritiva da contagem bacteriana por UFC com os valores das medianas, mínimos, máximos, médias e desvios-padrão 43
- Tabela 5.2 - Valores de UFC em biofilmes do grupo controle (B0) e dos grupos tratados com NAg nas concentrações 0,05% (B0,05) e 0,1 (B0,1). A linha horizontal que cruza cada retângulo representa a mediana, em log, dos valores encontrados 43
- Figura 6.2 - Valores da média do número de cópias de DNA/mL de amostras associadas ou não ao PMA de acordo com os grupos experimentais. Letras minúsculas representam o resultado da comparação entre todas as condições experimentais. Letras maiúsculas representam a comparação entre a técnica de qPCR com ou sem uso de PMA para cada grupo experimental (colunas). Letras iguais representam valores estatisticamente semelhantes 43
- Tabela 6.3 - Média, desvios-padrão e interação entre os grupos experimentais (n=6) a partir do ensaio de microdureza knoop. Médias que não compartilham letras semelhantes (agrupamento) são consideradas significativamente diferentes 43
- Tabela 6.4 - Média, desvios-padrão e medianas de diferença de cor (ΔE_{ab}) dos grupos experimentais. Medianas que não compartilham letras semelhantes são consideradas significativamente diferentes (Mann-Whitney). ($p < 0,05$) 43

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ΔE_{ab}	Diferença de cor pelo Sistema CIELab
ANOVA	Análise de variância
ACP	Fosfato de cálcio amorfo
ATP	Adenosina trifosfato
Bis-GMA	Metacrilato de bisfenol-glicida
CIE	Commission internationale de l'éclairage
CIELab	Comissão Internacional de Iluminação (Delta 1976)
CTR	Centro de tecnologia das radiações
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EGCG	Epigallocatequim
HA	Hidroxiapatita
HEMA	Metacrilato de hidroxietila
IPEN	Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares
KHN	Knoop hardness number
PMA	Propídio monoazida
QAM	Metacrilato quaternário de amônio
qPCR	Reação em cadeia da polimerase quantitativa
ROS	Espécies reativas de oxigênio
SBMP	Scotchbond multi-purpose
TBAEMA	Tert-butilamino etil metacrilato
UFC	Unidades formadoras de colônias
VBNC	Bactérias viáveis mas não cultiváveis

LISTA DE SÍMBOLOS

NAg nanopartícula de prata

AgNO₃ nitrato de prata

Ti titânio

L* coordenada L*

a* coordenada a*

b* coordenada b*

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	25
2	REVISÃO DE LITERATURA	27
2.1	ADESIVOS COM NANOPARTÍCULAS DE PRATA.....	28
3	OBJETIVOS	31
3.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	31
3.2	HIPÓTESES.....	31
4	MATERIAL E MÉTODOS	33
4.1	SÍNTESE E FUNCIONALIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS.....	33
4.2	PREPARO DOS <i>BONDS</i> COM ADIÇÃO DE <i>NAg</i>	33
4.3	CONFECÇÃO DOS CORPOS DE PROVA.....	34
4.4	FORMAÇÃO DE BIOFILME.....	35
4.4.1	Saliva processada.....	35
4.4.2	Preparo do Biofilme.....	36
4.4.3	Dispersão.....	36
4.5.	ENSAIOS.....	37
4.5.1	Unidades formadoras de colônias (UFC).....	37
4.5.2	Reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR) associada ou não ao propídio monoazida (PMA).....	38
4.5.3	Microdureza Knoop.....	40
4.5.4	Avaliação de cor.....	40
5	ANÁLISE ESTATÍSTICA	41
6	RESULTADOS	43
6.1	UNIDADES FORMADORAS DE COLÔNIAS.....	43
6.2	PMA-qPCR.....	44
6.3	MICRODUREZA KNOOP.....	46
6.4	AVALIAÇÃO DE COR PELO SISTEMA CIELab.....	47
7	DISCUSSÃO	49
8	CONCLUSÕES	53
	REFERÊNCIAS	55

1 INTRODUÇÃO

Estima-se que 50 a 70% dos procedimentos restauradores ocorrem para substituição de restaurações deficientes, principalmente devido à presença de cáries adjacentes às restaurações(1-4). Esta é uma doença sacarose-dependente que ocorre em interfaces de dentes restaurados e boa parte dos microrganismos envolvidos no seu surgimento são do gênero *Streptococci*, também envolvidos na cárie primária(5), como *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sobrinus*(6, 7).

Diversos fatores podem favorecer o surgimento de cáries adjacentes à restauração, dentre os quais: microfendas originadas da contração de polimerização do material restaurador, selamento cavitário insatisfatório, degradação hidrolítica e enzimática da interface adesiva e acúmulo de biofilme sobre a estrutura dental e a restauração(1, 3, 5, 8), sobretudo quando é realizada com resina composta. Neste sentido, lançar mão de mecanismos que possam inibi-las torna-se primordial para promover maior longevidade das restaurações diretas em resina composta.

Muitas pesquisas têm sido desenvolvidas para propor a formulação e síntese de compostos bioativos e antimicrobianos nos materiais odontológicos(9-11) e verificar a influência da incorporação destes compostos nas propriedades mecânicas, ópticas e antimicrobianas dos materiais(10, 11).

Dentre os diversos compostos, a adição de nanopartículas de prata (NAg) aos materiais restauradores e adesivos tem se destacado em razão da atividade antimicrobiana, antifúngica e antiviral(12), apresentando resultados promissores mesmo quando utilizadas em baixas concentrações(13). Por outro lado, a adição de NAg em materiais podem alterar as propriedades ópticas, deixando o material mais opaco e escurecido(14), assim como podem influenciar na dureza(15)

A avaliação do efeito antibacteriano é feita, comumente, por métodos de cultura(16) ou moleculares(17). Os métodos de cultura bacteriana têm a desvantagem de subestimar o número de bactérias remanescentes principalmente por não serem capazes de detectar bactérias não cultiváveis e baixa sensibilidade (VBNC)(6, 18).

Como contraponto, dentre os métodos moleculares, o mais utilizado é o qPCR que é capaz de quantificar a população de células numa amostra, porém, tem como desvantagem a inabilidade de distinguir as bactérias vivas das mortas, o que superestima a contagem destes microrganismos(19). Com intuito de contornar tal limitação deste procedimento molecular, foi proposta uma técnica que utiliza o corante propídio monoazida (PMA), que se liga quimicamente ao DNA de células com a membrana comprometida, o que impede sua amplificação por qPCR, e torna possível contar apenas as células viáveis(6, 20). A técnica de PMA-qPCR já é comumente utilizada em estudos de microbiologia geral(6, 18) e endodontia(19). A adaptação da técnica PMA-qPCR para a odontologia adesiva é um destacado avanço à literatura, e permitirá uma mensuração mais precisa do efeito de antimicrobianos de adesivos com adição de NAg.

Neste sentido, o propósito do presente trabalho é o de avaliar a influência da adição de NAg em um adesivo odontológico na microdureza, alteração de cor (ΔE_{ab}) e efeito antimicrobiano avaliado por contagem bacteriana (UFC) e por PMA-qPCR.

2 REVISÃO DA LITERATURA

Para reduzir a ocorrência de troca precoce de restaurações em razão de lesões cariosas, o desenvolvimento de materiais com princípios bioativos é de extrema importância(21). Neste sentido, para minimizar o risco de infiltração de bactérias na interface dente-restauração(1, 8), torna-se interessante que sistemas adesivos possuam atividade antimicrobiana para inibir cáries adjacentes às restaurações e, com isso, propiciem maior longevidade aos procedimentos restauradores(2, 13, 22).

Aos adesivos já foram incorporados compostos como nanopartículas de prata (13, 23, 24), titânio(11), iodeto de cobre(25), hidroxiapatita(26-28), fosfato de cálcio amorfo (ACP)(13, 16, 29), além de metacrilatos com quaternário de amônio (QAM)(2), arginina(1), extrato de planta de quercetina(30), peptídeo de nisina(8), epigallocatequim (EGCG)(21) e outros(4, 13, 29). Muitos dos compostos antimicrobianos e remineralizadores são propostos na forma de nanopartículas, pois possuem maior atividade biológica(9, 10), mesmo quando utilizadas em baixas concentrações(13, 16, 29). Partículas nanométricas têm maior relação área de superfície disponível (por unidade de volume) para interação que lhes confere grande reatividade(31).

As nanopartículas de prata (NAg) tem apresentado destaque devido à atividade antimicrobiana associada à alta efetividade, baixa toxicidade e, virtualmente, a baixa resistência dos microrganismos(17, 24, 32). Para investigar o efeito antibacteriano dos adesivos modificados por antimicrobianos, a maioria dos estudos realiza métodos de cultura(16) ou métodos moleculares, como o qPCR (reação em cadeia da polimerase quantitativa)(17). Os métodos de cultura permitem apenas a quantificação de células viáveis que são capazes de formar colônias em meio com nutrientes, sem detectar células mortas, VBNC e aquelas que requerem condições especiais de crescimento, o que, muitas vezes, subestima a contagem bacteriana. Por outro lado, o qPCR detecta o DNA de todas as células na amostra, incluindo células vivas e mortas, superestimando a contagem bacteriana(18).

Tendo em vista superar essas limitações, foi proposta uma nova técnica que permite distinguir o DNA de células bacterianas vivas e mortas e suprimir a amplificação do DNA oriundo de células mortas e comprometidas, através da utilização do corante propídio monoazida (PMA) associado à técnica de qPCR denominada PMA-qPCR(33). O PMA é um corante capaz de penetrar na membrana de células comprometidas e se ligar ao DNA, impedindo a amplificação destas pelo qPCR(6, 18, 33). Permite, portanto, preencher as deficiências dos métodos de cultura e do uso convencional dos métodos moleculares(6, 18).

2.1 ADESIVOS COM NANOPARTÍCULAS DE PRATA

Vários antimicrobianos foram incorporados nos sistemas adesivos com destaque na literatura para as NAg(12, 34, 35). Nos sistemas adesivos com adição de NAg, o efeito antimicrobiano procura inviabilizar as bactérias que eventualmente invadem a interface dente-restauração através das fendas marginais(3). As NAg têm sobretudo ação antimicrobiana, antifúngica e antiviral, além de ações anti-inflamatórias e anti-tumorais(12). Seu tamanho nanométrico permite que tenham grande área de superfície em relação ao volume ocupado e potencial de ação em pequenas concentrações.

Um dos métodos de síntese das NAg funcionaliza as nanopartículas com polivinil álcool associado ao etanol. Esse método permite que as NAg não formem aglomerados e sejam incorporadas à matriz polimérica propiciando ação prolongada, pois as nanopartículas não são liberadas ao meio(24).

O mecanismo de ação antibacteriana da nanopartícula de prata ainda não foi completamente elucidado(12, 36). Várias teorias apontam para a ação da prata iônica, relacionada à atração eletrostática existente entre a membrana celular bacteriana de peptidoglicanos, carregada negativamente, e os íons de prata, carregados positivamente. Essa interação promove o aumento da permeabilidade celular, dano à membrana e, conseqüentemente, inviabilidade da bactéria(12, 36). Ao penetrar na membrana, os íons de prata podem gerar espécies reativas de oxigênio (ROS)(10,

37), além de ligar-se às bases do DNA bacteriano citoplasmático(10, 35), o que promove sua condensação, e inviabiliza a replicação(12). Outro mecanismo proposto é a desnaturação de ribossomos pela prata iônica, o que inibe a síntese proteica(12). Foi relatado também que íons de prata inibem enzimas respiratórias e, conseqüentemente, a produção de adenosina trifosfato (ATP) utilizada nas necessidades energéticas bacterianas(36).

Até o presente momento, os estudos apontam que nanopartículas de prata exibem baixa toxicidade a células humanas(3, 36) e em relação às propriedades ópticas e mecânicas. Alguns aspectos negativos em relação à polimerização que influenciam diretamente no fator grau de conversão são levadas em consideração, como uma possível interferência que as NAg provocam ao “competirem” com os radicais livres inerentes ao processo, assim como também podem interferir na transmissão de luz dentro do material base utilizado(14, 38).

Mesmo que partículas inorgânicas sejam facilmente adicionadas a materiais poliméricos(32), é necessário que haja uma boa dispersão das nanopartículas nos compósitos, de forma que não influencie negativamente nas propriedades físicas e mecânicas do material(15), tendo em vista que boas propriedades mecânicas sugerem que o processo de cura do material não foi dificultado pela modificação(14).

3 OBJETIVOS

O objetivo geral deste estudo foi avaliar o efeito da incorporação de duas concentrações de nanopartículas de prata (NAg): 0,05% e 0,1% em um sistema adesivo, e avaliar a sua influência na microdureza, alteração de cor e no efeito antibacteriano.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Realizar uma comparação dos valores de microdureza e da alteração de cor (ΔE_{ab}) entre os grupos experimentais e o grupo controle. Assim como avaliar o efeito antimicrobiano de acordo com as duas concentrações utilizadas, através da técnica de contagem bacteriana (UFC) e pela técnica molecular PMA-qPCR.

3.2 HIPÓTESES

O adesivo com a incorporação de nanopartículas de prata (NAg):

H0: Apresentará efeito antibacteriano similar ao sistema adesivo controle, sem alteração da microdureza e da cor.

H1: Apresentará efeito antibacteriano superior ao sistema adesivo sem NAg sem alteração da microdureza e cor.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 SÍNTESE E FUNCIONALIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS

A síntese das nanopartículas de prata foi realizada no Laboratório de Química Supramolecular e Nanotecnologia, Instituto de Química, Universidade de São Paulo – IQ/USP.

As nanopartículas de prata foram obtidas a partir da redução do nitrato de prata (AgNO_3) em etanol. Logo, 10,7 mL de etanol associado a 5% de polivinilálcool (100.000 MM) foi inicialmente aquecido em refluxo, sob agitação por 5 min. Posteriormente, 0,5 mL de uma solução de AgNO_3 (0,171 g) adicionada e a mistura mantida em refluxo por 10 min, em seguida resfriada à temperatura ambiente, posteriormente filtrada e acondicionada em frasco protegido da luz e armazenada a 4°C(24).

4.2 PREPARO DOS *BONDS* COM ADIÇÃO DE NAg

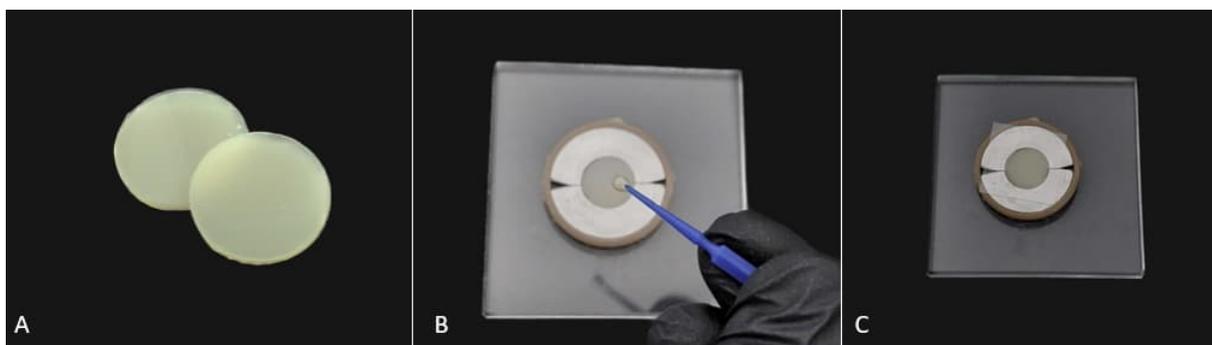
A partir de uma dispersão de NAg de concentração 10.000 ppm que foi incorporada ao *bond* por diluição perfazendo as concentrações 0,05% (500 ppm) e 0,1% (1000 ppm) de NAg e o volume final ajustado com etanol, quando necessário. A mistura foi realizada sob agitação, a partir da mesma quantidade dos componentes e dos aditivos (dispersão de NAg e etanol), compensando o efeito de diluição dos componentes do adesivo entre as diferentes concentrações. O fator de diluição final em cada um dos componentes foi de 1,11.

4.3 CONFECÇÃO DOS CORPOS DE PROVA

Foram utilizados os grupos experimentais denominados B0 (SBMP); B0,05 (SBMP + NAg 0,05%) e B0,1 (SBMP + NAg 0,1%). Uma matriz metálica bipartida de orifício central com diâmetro de 8 mm e altura de 1 mm foi posicionada sobre uma placa de vidro polida, e então, incrementos de resina composta (Filtek™Z250 XT, 3M ESPE, St. Paul, MN, USA) na cor A2 foram adaptados e fotopolimerizados durante 1 min (Valo Cordless, Ultradent, South Jordan, Estados Unidos) até o total preenchimento do orifício da matriz metálica.

Com o auxílio de um microaplicador, foi depositado o *bond* na face polida dos discos de resina, com o objetivo de simular um procedimento restaurador clínico. Em seguida, uma lamínula nº5 foi colocada sobre o disco para promover o espalhamento uniforme do *bond* por toda superfície, depois, fotopolimerizado por 20s com o mesmo aparelho fotopolimerizador utilizado anteriormente (Figura 4.1). Após confecção, os corpos de prova (discos de *bond*/resina composta) foram submetidos a uma lavagem num agitador magnético contendo etanol, visando a remoção dos monômeros livres. Em seguida, foram secos, embalados em papel próprio para esterilização e encaminhados ao Irradiador Multipropósito de ⁶⁰Co do Centro de Tecnologia das Radiações (CTR) do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN), para esterilização com dose de 25 kGy.

Figura 4.1 - A: Discos de resina composta com 1mm de espessura; B: Aplicação do *bond* sobre o disco de resina; C: Lamínula nº5 adaptada sobre o adesivo para posterior fotopolimerização



Fonte: O autor.

4.4 FORMAÇÃO DO BIOFILME

Os protocolos descritos a seguir foram realizados de acordo com Guggenheim, 2001(39).

Foi utilizado um modelo de biofilme *in vitro*(39), que possui espécies de bactérias frequentemente encontradas em placas supragengivais, sendo elas: *Streptococcus mutans* UA159, *Streptococcus oralis* OMZ 607, *Actinomyces oris* OMZ 745, *Veillonella dispar* OMZ 493, *Fusobacterium nucleatum* OMZ 598.

As cepas foram cultivadas por incubação anaeróbica a 37°C em placas de ágar Columbia suplementado com 5% de sangue de carneiro desfibrinado. Antes do início dos experimentos com biofilme, todas as cepas foram transferidas para o meio universal fluido modificado (mFUM; Gmür e Guggenheim, 1983) e incubadas anaerobicamente a 37°C por dois ciclos de pré-culturas (16 e 24 horas, respectivamente). Para o cultivo de *V. díspar*, foi utilizado mFUM contendo 0,10% de lactato de sódio. Após verificação microscópica da pureza, todas as cepas foram ajustadas a uma $DO_{550} = 1,0 \pm 0,05$ ($\sim 10^7$ células/mL) e misturadas em volumes iguais (1 mL) para a produção do inóculo.

4.4.1 Saliva Processada

A saliva não estimulada foi obtida durante 1 hora por dia de voluntários do Laboratório Multiusuário de Microbiologia Molecular e Celular (com seu consentimento informado) pelo menos 1,5 horas após comer, beber ou escovar os dentes. Amostras de saliva, coletadas em tubos estéreis de polipropileno de 50 mL, foram congeladas a -20°C até um total de 500 mL de saliva ser adquirido. O volume total foi centrifugado (30 min, 4°C, 27.000 x g), e o sobrenadante pasteurizado (60°C, 30 min) e centrifugado novamente em frascos estéreis. O sobrenadante resultante foi armazenado em tubos de polipropileno estéreis de 50 mL e armazenado a -20°C até

o momento de sua utilização. A avaliação da eficácia da pasteurização foi realizada por plaqueamento de amostras de saliva em ágar sangue por 72 horas a 37°C.

4.4.2 Preparo do Biofilme

Em placas de cultura de 24 poços foram colocados os discos de resina composta/*bond* sempre com a superfície do *bond* voltada para cima. Os discos foram cobertos com 800 µL de saliva pasteurizada e incubados em temperatura ambiente por 4h, sob agitação suave a 95rpm, com o objetivo de formar uma película adquirida.

Posteriormente os discos foram removidos e transferidos para outra placa, contendo 1200 µL de saliva e 480 µL de mFUM, com, 0,3% (p/v) de glicose [concentração final de glicose, 0,15% (p/v)]. A seguir, os poços receberam 200 µL de um caldo constituído das espécies bacterianas orais agrupadas. As placas de cultura de células foram incubadas anaerobicamente a 37°C durante 40 h, tendo em vista que para biofilmes de 40 horas, o meio foi renovado após 16 horas.

Foram realizados 2 experimentos independentes e os ensaios feitos em quadruplicata.

4.4.3 Dispersão

Com o objetivo de deslocar o biofilme dos discos, estes foram transferidos para outro tubo contendo 1 mL de solução de NaCl a 0.9% e posteriormente vortexados por 3 minutos. Depois foram sonificados por 10 segundos e, logo após, vortexados novamente por 30 segundos. Assim, foi adquirida uma solução para uso nos ensaios subsequentes.

4.5 ENSAIOS

4.5.1 Unidades Formadoras de Colônias (UFC)

Diluições seriadas (10^{-1} até 10^{-6}) foram preparadas com cloreto de sódio (0.9%) e alíquotas (50 μ L) foram semeadas em espiral em placas de ágar sangue, suplementado com 5% de sangue de carneiro desfibrilado. As placas então foram incubadas anaerobicamente a 37°C por 5 dias, e as unidades formadoras de colônias foram duas vezes contadas, visualmente(40) e utilizando um aplicativo, o Colony Counter (Figura 4.2).

Figura 4.5.1 – Contagem bacteriana de UFC utilizando Colony Counter



Fonte: O autor.

4.5.2 Reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR) associada ou não ao propídio monoazida (PMA)

Da solução bacteriana oriunda do biofilme formado em cada disco, de todos os grupos, foram realizadas duas estratégias de qPCR: uma associada ao uso do PMA e outra sem a utilização deste corante.

Esse método chamado PMA-qPCR tem a vantagem de permitir a quantificação seletiva de bactérias viáveis em biofilmes(18). A reação de PMA-qPCR foi realizada de acordo com o método proposto por Loozen, 2011(33).

Suspensões bacterianas que foram adquiridas a partir dos discos anteriormente inoculados foram centrifugadas a 9.000 g durante 3 min e suspensas em soluções de PMA na concentração de 100 μ M antes da extração do DNA. As amostras foram incubadas por 10 min a 4 °C, no escuro, e submetidas à irradiação por lâmpada halógena de 650W (GE Lighting, General Electric Co., Cleveland, EUA) durante 10 min, colocada 20 cm acima das amostras. Dessa forma, o PMA irá se ligar ao DNA das células bacterianas com membranas rompidas e impedir sua amplificação por qPCR. Após tratamento com o PMA, as amostras foram submetidas à extração de DNA, seguido de PCR quantitativo (qPCR).

A extração dos ácidos nucleicos totais foi realizada com o Kit comercial MasterPure™ Complete DNA and RNA Purification Kit (Epicentre Technologies, Madison, USA) de acordo com a recomendação do fabricante. Esse kit realiza a lise das células e a precipitação dos ácidos nucleicos totais com os reagentes do Kit: *Tissue and Cell Lysis Solution* com Proteinase K e MPC Protein Precipitation Reagent (Epicentre Technologies).

As reações de q-PCR foram utilizadas para a quantificação de bactérias totais em um volume total de 20 μ l contendo: 2 μ l de DNA, 10 μ l Power SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) e 100 nM de cada *primer*. As sequências dos *primers* estão descritas na Tabela 1. O ciclo de amplificação foi de:

95°C por 10 min e 40 ciclos de 95°C por 15 s e 60°C por 1 min, utilizando termociclador Step One Plus thermocycler (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) (Figura 4.3).

Figura 4.5.2: Termociclador Step One Plus thermocycler (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)



Fonte: O autor.

A curva padrão foi realizada com diluições seriadas de 10^8 a 10 cópias de DNA, obtidas por clonagem de *S. mutans*. Todos os procedimentos foram feitos em triplicatas para a curva, para as amostras e para os controles negativos. Os valores de Ct (*cycle threshold*), valores quantitativos e correlações com a curva padrão foram gerados automaticamente através do software *StepOne Plus* versão 2.2.2 (Applied Biosystem).

Tabela 4.5.2 - Sequências dos primers para a detecção de bactérias totais

Taxa		Sequência (5'– 3')	Sequência (3'– 5')	Referência
16S universal	rRNA	CCA TGA AGT CGG AAT CGC TAG	GCT TGA CGG GCG GTG T	(41,42)

4.5.3 Microdureza Knoop

O ensaio de microdureza Knoop (KHN) foi realizado na superfície do *bond* em todos os grupos experimentais. Utilizou-se a ponta Knoop acoplada ao microdurômetro (HMV-2/2 T, Shimadzu Corporation, Tóquio, Japão) com uma carga equivalente a 25 gf durante 15s. Para cada espécime (n=8) foram realizadas 5 indentações, com uma distância mínima de 300 µm entre cada medida.

4.5.4 Avaliação de cor

Para todos os corpos de prova (n=8) a avaliação da cor foi realizada utilizando um espectrofotômetro odontológico (VITA Easyshade Compact, Vident, Brea, CA, USA), sempre posicionado na superfície do *bond*. Os dados obtidos a partir da reflectância com fundo branco foram avaliados de acordo com o sistema CIELAB (ΔE_{ab}).

Este sistema foi estabelecido pela Comissão Internacional sobre iluminação (Commission Internationale de l'Eclairage - CIE) em 1978 e leva em consideração as coordenadas L^* , a^* e b^* , sendo o L^* representando o brilho (*lightness*), a^* e b^* representando coordenadas cromáticas (do vermelho ao verde e do amarelo ao azul, respectivamente). A diferença de cor, ou seja, o ΔE foi obtido pela seguinte fórmula: $\Delta E_{ab} = [(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2]^{1/2}$ (41).

Anteriormente ao início das leituras, o aparelho foi calibrado de acordo com as orientações do fabricante. As leituras dos grupos B0,05 e B0,1 foram comparadas às leituras realizadas no grupo B0, que serviu como parâmetro inicial.

5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

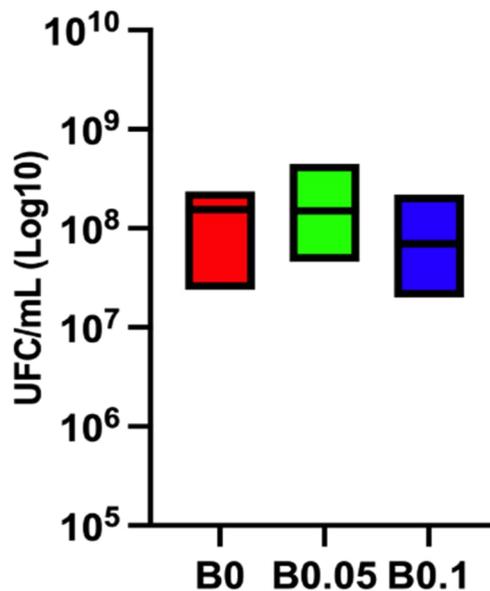
Todos os dados obtidos foram submetidos aos testes de normalidade (Shapiro-Wilk) e, de acordo com a distribuição dos dados, aplicados os testes de ANOVA e Tukey ou Kruskal-Wallis e Mann-Whitney ($p < 0,05$).

6 RESULTADOS

6.1 UNIDADES FORMADORAS DE COLÔNIAS (UFC)

A Figura 6.1 apresenta os valores médios de UFC em biofilmes tratados com NAg nas concentrações 0,05% e 0,1%. Após o teste Shapiro-Wilk os dados foram considerados estatisticamente normais, então posteriormente foi realizado a análise de variância que determinou não existir diferença estatisticamente significativa entre os grupos avaliados ($p > 0,05$). Nenhuma redução bacteriana foi observada nos grupos B0,05 e B0,1 quando comparados ao grupo controle B0.

Figura 6.1- Valores de UFC/ml em biofilmes do grupo controle (B0) e dos grupos tratados com NAg nas concentrações 0,05% (B0,05) e 0,1% (B0,1). A linha horizontal que cruza cada retângulo representa a mediana, em log, dos valores encontrados.



Fonte: O autor.

Tabela 6.1 - Estatística descritiva da contagem bacteriana por UFC (\log_{10} Bactérias/ml) com os valores das medianas, mínimos e máximos, médias e desvios padrão.

	B0	B0,05	B0,1
Mediana	8,2	8,2	7,8
Mín - Máx	7,4 - 8,4	7,7 - 8,7	7,3 - 8,3
Média	8,1	8,2	7,9
DP	0,3	0,4	0,4

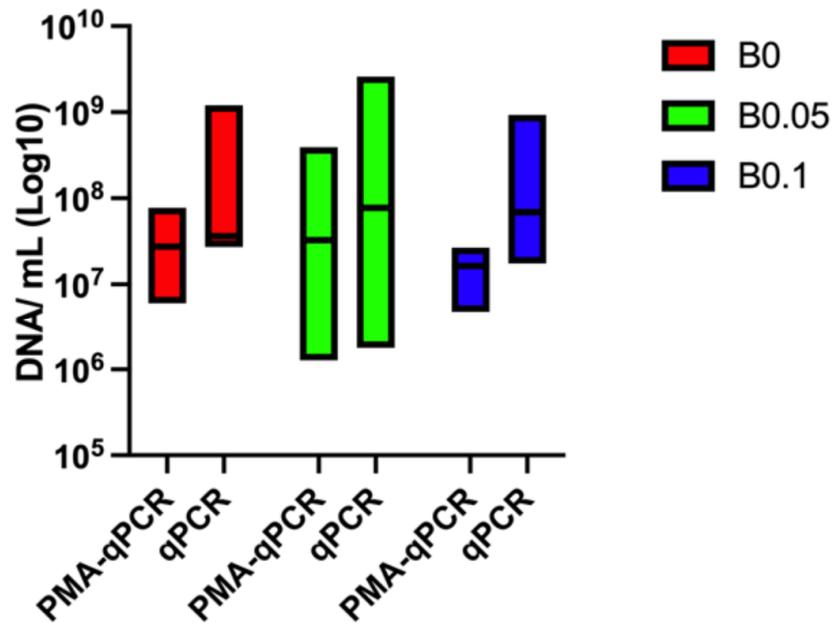
Fonte: O autor.

6.2 PMA-qPCR

Inicialmente os dados foram considerados normais após o teste Shapiro-Wilk e depois foram submetidos à análise de variância, então, o efeito antibacteriano avaliado com uso de PMA e sem uso de PMA comparando os grupos B0, B0,05 e B0,01 não apontou diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$) (Figura 6.2).

A análise estatística pareada que avaliou a quantificação de DNA por qPCR em cada grupo (com ou sem uso de PMA), identificou uma diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo B0,01 ($p = 0,04$), com os maiores valores de quantificação bacteriana para o grupo que não utilizou o corante PMA (Tabela 6.2).

Figura 6.2- Valores da quantificação bacteriana (cópias de DNA/mL) por grupo das amostras associadas ou não ao PMA. As linhas horizontais que cruzam cada retângulo representam a mediana, em log, dos valores encontrados



Fonte: O autor.

Tabela 6.2 - Valores da média e desvio padrão do número de cópias de DNA/mL de amostras associadas ou não ao PMA de acordo com os grupos experimentais. Letras minúsculas representam o resultado da comparação entre todas as condições experimentais. Letras maiúsculas representam a comparação entre a técnica de qPCR com ou sem uso de PMA para cada grupo experimental (colunas). Letras iguais representam valores estatisticamente semelhantes

	B0	B0,05	B0,1
	média DP	média DP	média DP
PMA-qPCR	7,4aA 0,3	7,4aB 0,7	7,2aC 0,3
qPCR	7,9aA 0,6	7,9aB 1,1	8,0aD 0,7

Fonte: O autor

6.3 MICRODUREZA KNOOP

A Tabela 5 apresenta as médias e desvios padrão do ensaio de microdureza knoop na superfície do *bond* para todos os grupos. Os dados foram normais e a análise de variância apontou diferenças estatisticamente significantes ($p < 0,05$). O teste de contraste de Tukey indicou que o grupo B0,1 apresentou KHN estatisticamente inferior à do grupo B0. Os valores de KHN dos grupos B0 e B0,05 e dos grupos B0,05 e B0,1 foram estatisticamente semelhantes (Tabela 6.3).

Tabela 6.3 - Média, desvios-padrão de microdureza knoop (KHN) dos grupos experimentais (n=6). Médias que não compartilham letras iguais (agrupamento) são consideradas significativamente diferentes

Grupo	Média	DP	Agrupamento
B0	17,6	1,0	A
B0,05	16,6	2,3	AB
B0,1	14,0	2,1	B

Fonte: O autor.

6.4 AVALIAÇÃO DE COR PELOS SISTEMAS CIELab

Os dados obtidos após avaliação de cor foram considerados não normais e homocedásticos. Dessa forma, os dados foram submetidos ao teste de Mann-Whitney, que apontou de diferença estatisticamente significativa entre os grupos com o grupo B0,1 que apresentou maior alteração de cor (Tabela 6.4).

Tabela 6.4 – Média, desvios-padrão e medianas de diferença de cor (ΔE_{ab}) dos grupos experimentais. Medianas que não compartilham letras iguais são consideradas significativamente diferentes (Mann-Whitney, $p < 0,05$).

Grupo	Média	DP	Mediana
B0,05	21,2	10,4	26,5A
B0,1	38,2	4,2	39,6B

Fonte: O autor.

7 DISCUSSÃO

O presente estudo avaliou o efeito antimicrobiano, microdureza e alteração de cor de um adesivo modificado por nanopartículas de prata (NAg) em duas concentrações, 0,05% e 0,1% comumente encontradas em estudos anteriores (4, 12, 17). Com o intuito de avaliar a eficácia antibacteriana, foram realizados ensaios de cultura bacteriana combinados com contagem bacteriana por UFC e ensaios de qPCR associados ou não com o corante propídio monoazida (PMA).

A hipótese de que o adesivo com incorporação de NAg apresentaria efeito antibacteriano superior ao do controle foi rejeitada. De acordo com a contagem bacteriana por unidades formadoras de colônias (UFC) para bactérias totais, a NAg, nas concentrações utilizadas, não foi capaz de inibir ou reduzir a colonização bacteriana.

Em um estudo prévio, foram testadas concentrações menores (50, 100, 150, 200 e 250 ppm) de NAg incorporados ao primer de um sistema adesivo convencional de três passos e indicou que o primer contendo 250 ppm de NAg (0,025%) apresentou a maior atividade antibacteriana(24).

Algumas diferenças entre o presente estudo e o realizado por Dutra-Correa et al(24) podem justificar o desacordo entre os resultados. O estudo citado utilizou ensaios de avaliação dos efeitos antibacterianos com uma bactéria planctônica Gram-positiva (*S. mutans* ATCC 25,175TM). Em contrapartida, em nosso estudo foi reproduzido um biofilme de 40 horas de inoculação composto por 5 bactérias, 3 espécies Gram-positivas (*Streptococcus mutans* UA159, *Streptococcus oralis* OMZ 607, *Actinomyces oris* OMZ 745), e duas bactérias Gram-negativas (*Veillonella dispar* OMZ 493 e *Fusobacterium nucleatum* OMZ 598), comumente encontradas em um biofilme supragengival, proporcionando então um biofilme heterogêneo e de maior complexidade.

Moradian et al, em 2019, descreveram diferenças no efeito antibacteriano das NAg em relação a bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Segundo os autores, bactérias Gram-negativas são mais suscetíveis à penetração pelas nanopartículas, por possuírem uma parede celular mais fina comparada à parede celular de espécies Gram-positivas. Dessa forma, os autores chamam atenção para diferenças no efeito

antibacteriano das NAg em bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, sugerindo que a absorção das NAg influencia em sua eficácia antibacteriana(42). Estes aspectos suportam os resultados encontrados no presente trabalho, no qual foi utilizado um biofilme majoritariamente composto por espécies Gram-positivas.

Outro aspecto que pode ter influenciado os resultados do presente trabalho foi o tempo de formação do biofilme. Yin et al em 2020, afirmaram que o biofilme formado rapidamente no meio bucal pode proteger as bactérias dos íons de prata e de nanopartículas, dificultando então o transporte desses materiais e proporcionando uma ação somente nas camadas iniciais das bactérias aderidas(43).

De acordo com os resultados encontrados no presente estudo, nota-se uma diferença entre o método tradicional (qPCR) e o método associado (PMA-qPCR), sobretudo no grupo utilizando o bond modificado por 0,1% de NAg. Destaca-se que a diferença entre a quantificação ocorreu no grupo experimental em que era esperada maior redução bacteriana em decorrência da maior concentração de NAg. Este resultado reforça o efeito de inibição do PMA na amplificação do DNA de bactérias comprometidas.

O corante propídio monoazida (PMA) ao penetrar em células com membranas comprometidas o PMA se conecta com o DNA e ao passo que a união PMA-DNA é fotoativada, o grupo monoazida é convertido em um radical altamente reativo com necessidade de formar ligações, se conectando permanentemente com o DNA. Dessa forma, o tratamento com PMA impede o uso do DNA de células comprometidas na reação do qPCR, permitindo que este método diferencie células vivas de células mortas(18, 19).

A hipótese de que a cor não seria alterada pela adição das NAg foi rejeitada. Os dados obtidos indicaram um aumento significativo do ΔE_{ab} com o aumento da fração de NAg adicionada ao adesivo.

No presente estudo, o grupo B0,1 apresentou maior alteração na cor em relação ao B0,05, sugerindo então uma possível relação entre o aumento da concentração de NAg com o escurecimento do material. Em ŁSokołowski et al, 2014 a cor dos compósitos modificados por NAg, mudou de amarelo claro para um tom marrom escuro, semelhante ao encontrado no presente trabalho. Essa alteração de cor é uma possível desvantagem dos materiais modificados por NAg, sobretudo quando o fator estético é levado em consideração(14).

O ensaio de microdureza Knoop foi realizado com o objetivo de determinar o efeito da adição das duas concentrações de NAg nas propriedades mecânicas do adesivo modificado e os resultados indicaram uma redução da microdureza Knoop para o grupo que apresenta maior concentração de NAg (B0,1). A hipótese de que a adição de NAg ao adesivo não alteraria sua microdureza foi parcialmente rejeitada.

Em 2013 Liu et al relataram que 0,005% de nanocristais de prata foram adicionados a uma resina composta e essa modificação proporcionou um efeito antibacteriano positivo, assim como um aumento das propriedades mecânicas. Entretanto, quando ultrapassada essa concentração, a cor e as propriedades mecânicas do compósito foram afetadas negativamente(15), o que corrobora com os resultados do presente estudo.

Em um estudo anterior (44), concentrações de 1%, 3% e 5% de NAg (em peso) foram adicionadas fisicamente ao pó de um cimento de ionômero de vidro (CIV). Após a manipulação do material, os resultados indicaram que a microdureza dos grupos experimentais não foi alterada quando comparada a grupo controle. As diferenças entre os resultados do presente e estudo e do estudo de El-Wassefy e colaboradores (44) provavelmente se devem à diferença entre o material em que foi incorporado (CIV e adesivo) assim como ao mecanismo de adição ao pó do CIV (mistura física), que não proporciona uma adesão entre as duas partes.

O presente trabalho utilizou um método de síntese de Dutra-Correa et al(24) que funcionalizou as NAg (com tamanho médio de 18 a 23 nm) com polivinilálcool associado ao etanol. Esse método permite a redução de formação de aglomerados de NAg e a incorporação e ligação destas nanopartículas à rede polimérica, coibindo a sua liberação do meio e propiciando ação antimicrobiana prolongada.

Estudos apontam uma possível interferência das NAg no processo de polimerização do material e sugerem que as nanopartículas podem competir com os radicais livres na iniciação e propagação do processo de polimerização, assim como também podem apresentar efeito de espalhamento ou alteração na transmissão da luz dentro do material base utilizado(14, 38)

Kattan et al.(45) e Melo et al(46) apresentaram estudos em que resinas compostas com adição de NAg nas concentrações de 0,5% e 1% forneceram efeitos antibacterianos sem influenciar as propriedades mecânicas do material. Estes resultados são contrários aos apontados por Topcu et al(47) que relataram que as partículas de prata podem diminuir a penetração da luz e, conseqüentemente, reduzir a profundidade de polimerização.

A partir dos achados do presente estudo e da literatura consultada, pode-se inferir que a influência da adição de NAg nas propriedades antimicrobianas, mecânicas, como a dureza, e ópticas parece ter relação com muitos aspectos como: distribuição e tamanho médio das NAg, método de síntese, funcionalização e sua interação das NAg com a matriz do adesivo, concentração de NAg, entre outros.

Embora a literatura apresente muitos estudos sobre a adição de NAg associada ou não a outros compostos bioativos, ainda existem muitas lacunas nesta área do conhecimento e os resultados mais favoráveis requerem validações que comprovem a sua eficácia na clínica.

8 CONCLUSÕES

Com as limitações do presente estudo, pode-se concluir que nos adesivos com NAg:

- Houve alteração significativa da cor com o aumento da concentração de NAg.
- Houve redução significativa da dureza para o grupo com maior concentração de NAg.
- O efeito antibacteriano não foi evidenciado.
- O uso do PMA permitiu a identificação de diferenças no qPCR quando se avaliou o grupo com maior concentração de NAg.

REFERÊNCIAS¹

1. Geraldeli S, Soares EF, Alvarez AJ, Farivar T, Shields RC, Sinhoreti MAC, et al. A new arginine-based dental adhesive system: formulation, mechanical and anti-caries properties. *J Dent.* 2017;63:72-80. doi: 10.1016/j.jdent.2017.05.024
2. Han Q, Li B, Zhou X, Ge Y, Wang S, Li M, et al. Anti-Caries Effects of Dental Adhesives Containing Quaternary Ammonium Methacrylates with Different Chain Lengths. *Materials (Basel).* 2017;10(6). doi: 10.3390/ma10060643
3. Cheng L, Weir MD, Zhang K, Arola DD, Zhou X, Xu HH. Dental primer and adhesive containing a new antibacterial quaternary ammonium monomer dimethylaminododecyl methacrylate. *J Dent.* 2013;41(4):345-55. doi: 10.1016/j.jdent.2013.01.004
4. Melo MA, Cheng L, Zhang K, Weir MD, Rodrigues LK, Xu HH. Novel dental adhesives containing nanoparticles of silver and amorphous calcium phosphate. *Dent Mater.* 2013;29(2):199-210. doi: 10.1016/j.dental.2012.10.005
5. Nedeljkovic I, Teughels W, De Munck J, Van Meerbeek B, Van Landuyt KL. Is secondary caries with composites a material-based problem? *Dent Mater.* 2015;31(11):e247-77. doi: 10.1016/j.dental.2015.09.001
6. Yasunaga A, Yoshida A, Morikawa K, Maki K, Nakamura S, Soh I, et al. Monitoring the prevalence of viable and dead cariogenic bacteria in oral specimens and in vitro biofilms by qPCR combined with propidium monoazide. *BMC Microbiol.* 2013;13:157. doi: 10.1186/1471-2180-13-157
7. Saravia ME, da Silva LAB, da Silva RAB, Cudmani NM, Tineo S, Hillen NE, et al. Morphological identification of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* in SB-20M culture medium has efficiency comparable to proteomic identification by the MALDI-TOF mass spectrometry technique. *Arch Oral Biol.* 2020;110:104595. doi: 10.1016/j.jdent.2013.01.004
8. Su M, Yao S, Gu L, Huang Z, Mai S. Antibacterial effect and bond strength of a modified dental adhesive containing the peptide nisin. *Peptides.* 2018;99:189-94. doi: 10.1016/j.peptides.2017.10.003

¹ De acordo com Estio Vancouver.

9. Allaker RP. The use of nanoparticles to control oral biofilm formation. *J Dent Res.* 2010;89(11):1175-86. doi: 10.1177/0022034510377794.
10. Riaz Ahmed KB, Nagy AM, Brown RP, Zhang Q, Malghan SG, Goering PL. Silver nanoparticles: Significance of physicochemical properties and assay interference on the interpretation of in vitro cytotoxicity studies. *Toxicol In Vitro.* 2017;38:179-92. doi: 10.1016/j.tiv.2016.10.012.
11. Deng S, Chung KH, Chan D, Spiekerman C. Evaluation of Bond Strength and Microleakage of a Novel Metal-titanate Antibacterial Agent. *Oper Dent.* 2016;41(3):E48-56. doi: 10.2341/14-257-L
12. Noronha VT, Paula AJ, Durán G, Galembeck A, Cogo-Müller K, Franz-Montan M, et al. Silver nanoparticles in dentistry. *Dent Mater.* 2017;33(10):1110-26. doi: 10.1016/j.dental.2017.07.002
13. Melo MA, Orrego S, Weir MD, Xu HH, Arola DD. Designing Multiagent Dental Materials for Enhanced Resistance to Biofilm Damage at the Bonded Interface. *ACS Appl Mater Interfaces.* 2016;8(18):11779-87. doi: 10.1021/acsami.6b01923
14. ŁSokołowski J, Szyrkowska MI, Kleczewska J, Kowalski Z, Sobczak-Kupiec A, Pawlaczyk A, et al. Evaluation of resin composites modified with nanogold and nanosilver. *Acta Bioeng Biomech.* 2014;16(1):51-61. doi: 10.1016/j.peptides.2017.10.003
15. Liu F, Wang R, Shi Y, Jiang X, Sun B, Zhu M. Novel Ag nanocrystals based dental resin composites with enhanced mechanical and antibacterial properties. 2013;23(6):573-8. doi:10.1016/j.pnsc.2013.11.011
16. Zhang N, Melo MA, Chen C, Liu J, Weir MD, Bai Y, et al. Development of a multifunctional adhesive system for prevention of root caries and secondary caries. *Dent Mater.* 2015;31(9):1119-31. doi: 10.1016/j.dental.2015.06.010
17. Li F, Weir MD, Chen J, Xu HH. Comparison of quaternary ammonium-containing with nano-silver-containing adhesive in antibacterial properties and cytotoxicity. *Dent Mater.* 2013;29(4):450-61. doi: 10.1016/j.dental.2013.01.012
18. Alvarez G, Gonzalez M, Isabal S, Blanc V, Leon R. Method to quantify live and dead cells in multi-species oral biofilm by real-time PCR with propidium monoazide. *AMB Express.* 2013;3(1):1. doi: 10.1186/2191-0855-3-1

19. Pinheiro ET, Neves VD, Reis CC, Longo PL, Mayer MP. Evaluation of the Propidium Monoazide-quantitative Polymerase Chain Reaction Method for the Detection of Viable *Enterococcus faecalis*. *J Endod*. 2016;42(7):1089-92. doi: 10.1016/j.joen.2016.04.003

20. Fittipaldi M, Nocker A, Codony F. Progress in understanding preferential detection of live cells using viability dyes in combination with DNA amplification. *J Microbiol Methods*. 2012;91(2):276-89. doi: 10.1016/j.mimet.2012.08.007

21. Yu HH, Zhang L, Yu F, Li F, Liu ZY, Chen JH. Epigallocatechin-3-gallate and Epigallocatechin-3-O-(3-O-methyl)-gallate Enhance the Bonding Stability of an Etch-and-Rinse Adhesive to Dentin. *Materials (Basel)*. 2017;10(2). doi: 10.3390/ma10020183

22. Li Y, Hu X, Ruan J, Arola DD, Ji C, Weir MD, et al. Bonding durability, antibacterial activity and biofilm pH of novel adhesive containing antibacterial monomer and nanoparticles of amorphous calcium phosphate. *J Dent*. 2019;81:91-101. doi: 10.1016/j.jdent.2018.12.013

23. Rubin Cocco A, de Oliveira da Rosa WL, Luque Peralta S, Timm Maske T, da Silva AF, Andrade Hartwig C, et al. New adhesive system based in metals cross-linking methacrylate. *J Mech Behav Biomed Mater*. 2018;77:519-26. doi:10.1080/08927014.2020.1748603

24. Dutra-Correa M, Leite A, de Cara S, Diniz IMA, Marques MM, Suffredini IB, et al. Antibacterial effects and cytotoxicity of an adhesive containing low concentration of silver nanoparticles. *J Dent*. 2018;77:66-71. doi: 10.1016/j.jdent.2018.07.010

25. A AL, Fernandes G, Visser M, Dziak R, Renné WG, Sabatini C. Biocompatibility and bond degradation of poly-acrylic acid coated copper iodide-adhesives. *Dent Mater*. 2017;33(9):e336-e47. doi: 10.1016/j.dental.2017.06.010

26. Besinis A, van Noort R, Martin N. Infiltration of demineralized dentin with silica and hydroxyapatite nanoparticles. *Dent Mater*. 2012;28(9):1012-23. doi: 10.1016/j.dental.2012.05.007

27. Sadat-Shojai M, Atai M, Nodehi A, Khanlar LN. Hydroxyapatite nanorods as novel fillers for improving the properties of dental adhesives: Synthesis and application. *Dent Mater*. 2010;26(5):471-82. doi: 10.1016/j.dental.2010.01.005.

28. Leitune VC, Collares FM, Trommer RM, Andrioli DG, Bergmann CP, Samuel SM. The addition of nanostructured hydroxyapatite to an experimental adhesive resin. *J Dent*. 2013;41(4):321-7. doi: 10.1016/j.jdent.2013.01.001

29. Chen C, Weir MD, Cheng L, Lin NJ, Lin-Gibson S, Chow LC, et al. Antibacterial activity and ion release of bonding agent containing amorphous calcium phosphate nanoparticles. *Dent Mater*. 2014;30(8):891-901. doi: 10.1016/j.dental.2014.05.025

30. Yang H, Li K, Yan H, Liu S, Wang Y, Huang C. High-performance therapeutic quercetin-doped adhesive for adhesive-dentin interfaces. *Sci Rep*. 2017;7(1):8189. doi: 10.3390/ma10020183

31. Perez-Diaz MA, Boegli L, James G, Velasquillo C, Sanchez-Sanchez R, Martinez-Martinez RE, et al. Silver nanoparticles with antimicrobial activities against *Streptococcus mutans* and their cytotoxic effect. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2015;55:360-6. doi: 10.1016/j.msec.2015.05.036

32. Zhang K, Li F, Imazato S, Cheng L, Liu H, Arola DD, et al. Dual antibacterial agents of nano-silver and 12-methacryloyloxydodecylpyridinium bromide in dental adhesive to inhibit caries. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2013;101(6):929-38. doi: 10.1002/jbm.b.32898

33. Loozen G, Boon N, Pauwels M, Quirynen M, Teughels W. Live/dead real-time polymerase chain reaction to assess new therapies against dental plaque-related pathologies. *Mol Oral Microbiol*. 2011;26(4):253-61. doi: 10.1111/j.2041-1014.2011.00615

34. Degrazia FW, Leitune VC, Garcia IM, Arthur RA, Samuel SM, Collares FM. Effect of silver nanoparticles on the physicochemical and antimicrobial properties of an orthodontic adhesive. *J Appl Oral Sci*. 2016;24(4):404-10. doi: 10.1590/1678-775720160154

35. Lee SM, Kim IR, Park BS, Lee DJ, Ko CC, Son WS, et al. Remineralization Property of an Orthodontic Primer Containing a Bioactive Glass with Silver and Zinc. *Materials (Basel)*. 2017;10(11). doi: 10.3390/ma10111253

36. Durán N, Durán M, de Jesus MB, Seabra AB, Fávaro WJ, Nakazato G. Silver nanoparticles: A new view on mechanistic aspects on antimicrobial activity. *Nanomedicine*. 2016;12(3):789-99. doi: 10.1016/j.nano.2015.11.016

37. Padovani GC, Feitosa VP, Sauro S, Tay FR, Durán G, Paula AJ, et al. Advances in Dental Materials through Nanotechnology: Facts, Perspectives and Toxicological Aspects. *Trends Biotechnol.* 2015;33(11):621-36. doi: 10.1016/j.tibtech.2015.09.005
38. Fan C, Chu L, Rawls HR, Norling BK, Cardenas HL, Whang K. Development of an antimicrobial resin--a pilot study. *Dent Mater.* 2011;27(4):322-8. doi: 10.1016/j.dental.2010.11.008
39. Guggenheim B, Giertsen E, Schüpbach P, Shapiro S. Validation of an in vitro biofilm model of supragingival plaque. *J Dent Res.* 2001;80(1):363-70. doi: 10.1177/00220345010800011201
40. Pinheiro ET, Karygianni L, Attin T, Thurnheer T. Antibacterial Effect of High-Purity Nisin Alone and in Combination with D-Amino Acids or Chlorhexidine in an Endodontic-Like Biofilm Model. *Antibiotics (Basel).* 2021;10(2). doi: 10.3390/antibiotics10020149
41. Gómez-Polo C, Portillo Muñoz M, Lorenzo Luengo MC, Vicente P, Galindo P, Martín Casado AM. Comparison of the CIELab and CIEDE2000 color difference formulas. *J Prosthet Dent.* 2016;115(1):65-70. doi: 10.1016/j.prosdent.2015.07.001
42. Moradian M, Abbasfard D, Jowkar Z. The effect of nanohydroxyapatite and silver nanoparticles on the microhardness and surface roughness of composite resin. *Gen Dent.* 2019;67(6):68-71. doi: 10.1016/j.dental.2017.06.010
43. Yin IX, Zhang J, Zhao IS, Mei ML, Li Q, Chu CH. The Antibacterial Mechanism of Silver Nanoparticles and Its Application in Dentistry. *Int J Nanomedicine.* 2020;15:2555-62. doi: 10.2147/IJN.S246764
44. El-Wassefy NA, El-Mahdy RH, El-Kholany NR. The impact of silver nanoparticles integration on biofilm formation and mechanical properties of glass ionomer cement. *J Esthet Restor Dent.* 2018;30(2):146-52. doi: 10.1111/jerd.12353
45. Kattan H, Chatzistavrou X, Boynton J, Dennison J, Yaman P, Papagerakis P. Physical Properties of an Ag-Doped Bioactive Flowable Composite Resin. *Materials (Basel).* 2015;8(8):4668-78. doi:10.3390/ma8084668

46. Melo MA, Guedes SF, Xu HH, Rodrigues LK. Nanotechnology-based restorative materials for dental caries management. *Trends Biotechnol.* 2013;31(8):459-67. doi: 10.1016/j.tibtech.2013.05.010

47. Topcu FT, Erdemir U, Sahinkesen G, Yildiz E, Uslan I, Acikel C. Evaluation of microhardness, surface roughness, and wear behavior of different types of resin composites polymerized with two different light sources. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2010;92(2):470-8. doi: 10.1002/jbm.b.31540