



AVALIAÇÃO DE POTENCIAIS ANTIBACTERIANO E REMINERALIZANTE E PROPRIEDADES FÍSICAS DE INFILTRANTE RESINOSO EXPERIMENTAL ASSOCIADO A MONÔMERO QUATERNÁRIO DE AMÔNIO E NANOPARTÍCULAS DE FOSFATO DE CÁLCIO AMORFO

Palavras-Chave: Lesão de mancha branca. Bioatividade. Agentes antibacterianos.

Autoras:

Layla Karine Oliveira Silva, FOP - UNICAMP

Ms. Ana Ferreira Souza (coorientadora), FOP - UNICAMP

Prof.^a. Dr.^a. Giselle Maria Marchi (orientadora), FOP - UNICAMP

INTRODUÇÃO:

O infiltrante resinoso disponível comercialmente no mercado atual possui algumas limitações, como incapacidade de selar todas as porosidades das lesões iniciais de cárie e ainda permitir o acúmulo de biofilme em sua superfície, por se tratar de um material resinoso (NEDELJKOVIC et al., 2016; YIM et al., 2014). Na tentativa de avaliar a otimização do infiltrante disponível comercialmente, este estudo teve como objetivo avaliar a incorporação de dois componentes ao infiltrante.

O primeiro deles foi o metacrilato de dimetilaminohexadecil (DMAHDM), que é um monômero antibacteriano, que vem se mostrando altamente eficiente contra as bactérias relacionadas à cárie (YU et al., 2020a). O segundo componente incorporado ao infiltrante foram as nanopartículas de fosfato de cálcio amorfo (NACP) que possuem uma alta capacidade remineralizadora, atuando na neutralização de ácidos e liberação de íons cálcio e fosfato no ambiente circundante evitando, assim, a formação de cárie secundária adjacente à restauração (MELO et al., 2016).

Diante dos benefícios relatados para o DMAHDM e o NACP, é válido investigar se a associação destes agentes poderia promover efeitos terapêuticos ao infiltrante resinoso. As hipóteses nulas testadas foram: 1) A incorporação de DMAHDM e/ou NACP não interfere nas propriedades físicas do infiltrante experimental; 2) A incorporação de DMAHDM e/ou NACP não interfere no potencial antimicrobiano do infiltrante experimental.

METODOLOGIA:

1 Formulação dos infiltrantes experimentais

Os infiltrantes foram manipulados em laboratório com iluminação de cor amarela e temperatura controlada a 25°C. Os infiltrantes experimentais tiveram como base monomérica a mistura de 75% em peso de TEGDMA e 25% em peso de BisEMA, além de 0,5% em peso de canforquinona e 1% de etil 4-dimetilaminobenzoato (EDAB). Esta composição monomérica foi dividida em um grupo experimental (E) puro (G1), E + 3 % DMAHDM (G2), E + 1,5 % NACP (G3) e E + 3 % DMAHDM + 1,5 % NACP (G4). Foi utilizado o infiltrante experimental de controle (G1), e este mesmo experimental acrescido de 3 % de DMAHDM e/ou 1,5 % de NACP. Os componentes dos grupos foram pesados em balança analítica, manipulados e misturados em agitador magnético até sua completa homogeneização. Os infiltrantes foram armazenados em frascos de polietileno preto e mantidos sob refrigeração.

2 Grau de conversão

O grau de conversão foi analisado através de Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier associado a Reflectância Total Atenuada (FTIR-ATR; MIRacle, Pike Technologies, Inc. Madison,

WI, EUA). O material não polimerizado foi dispensado (n=6; 110 µl) com pipeta de precisão (Microraman M25, Gilson Medical Eletronics S.A., França) diretamente sobre o cristal do dispositivo de ATR, acoplado ao FTIR, e foi obtido o primeiro espectro (32 varreduras, resolução de 4⁻¹cm). Em seguida foi realizada a fotoativação por 40s (1000mW/cm² de irradiância; Valo, Ultradent) e imediatamente após esta, foi obtido o novo espectro, do material polimerizado. O grau de conversão foi calculado a partir da razão das bandas de absorção em 1610 cm⁻¹ e 1637 cm⁻¹, a partir da fórmula: DC = (1 - área do pico final / área do pico inicial) × 100%).

3 Sorção e Solubilidade

Em uma matriz de silicone de adição (Express XT – 3M ESPE), foram adicionados os materiais para a confecção dos discos (5 mm x 1 mm, n=08) e fotopolimerizados sob fonte de luz de LED durante 40 segundos (1000mW/cm² de irradiância; Valo, Ultradent), confeccionando-se 12 amostras para cada grupo. Em seguida, os discos foram depositados em *eppendorfs* destampados, armazenados em frasco plástico transparente devidamente vedado contendo sílica gel e mantidos em estufa a 37°C. Foram seguidas as especificações ISO 4049/2009, exceto em relação à dimensão das amostras, para realização dos testes de sorção (SO) e solubilidade (SOL). Para calcular os valores de SO e SOL, foram utilizadas as fórmulas:

$$SO = \frac{(M2 - M3)}{V} \quad SOL = \frac{(M1 - M3)}{V}$$

4 Ensaio de cristal violeta

Foram confeccionados corpos de prova (n=06 por grupo) em forma de disco (5mm de diâmetro x 2 mm de espessura), da mesma maneira descrita anteriormente. Os corpos de prova foram polidos em lixa de carboneto de silício de granulação #1200 e #2000 para padronizar a rugosidade superficial.

Foi utilizada uma cepa de *Streptococcus mutans* (UA159) para promover a formação do biofilme bacteriano sobre os corpos de prova de cada grupo. Os corpos de prova foram posicionados em aparatos e colocados nos poços de placas de poliestireno para microculturas. Cada poço continha 300 µl de suspensão bacteriana a 10⁸ UFC/mL (ajustado a 0,1; 660 nm), 150 µl de solução de sacarose a 20%, e 2.550 µl de meio ágar Brain Heart Infusion (BHI). Foi utilizado o período de incubação de 48h para formação e desenvolvimento do biofilme (YU et al., 2020b) (figura 05b), com troca do meio após 24h.

Passadas as 48 h, o biofilme foi lavado com solução salina tamponada de fosfato (PBS) e os aparatos foram colocados em uma placa de 24 poços contendo 1 mL de álcool metílico 100% por 15 minutos, para fixação (YU et al., 2020b). Em seguida, os discos foram novamente lavados com PBS e transferidos para outra placa de 24 poços, contendo 1 mL de solução de cristal violeta a 0,1% por cinco minutos. Os biofilmes foram lavados com PBS para remover o corante residual. Então, os discos foram transferidos para uma nova placa de 24 poços e adicionados a cada poço 2 mL de solução de etanol a 95% e a placa agitada horizontalmente a 80 rpm durante 45 minutos à temperatura ambiente (YU et al., 2020b). A solução de etanol (100 µL) de cada poço foi diluída com solução de etanol a 95% para 200 µL e transferida para uma placa de 96 poços. Um leitor de microplacas (ASYS-UVM 340) foi utilizado para medir a absorbância da solução em DO 595 nm (YU et al., 2020b).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após obtenção dos resultados, foi realizada análise exploratória e foram aplicados os testes estatísticos apropriados. Para normalidade, foi aplicado o teste Shapiro-wilk (p>0,05). Para grau de conversão e sorção, os dados atenderam aos pressupostos de normalidade e homoscedasticidade (Levenes's p>0,05), então foram aplicados os testes ANOVA post-hoc de Tukey. Para Solubilidade e Quantificação da Biomassa do biofilme, os dados apresentaram normalidade de distribuição (Shapiro-

wilk $p > 0,05$), mas não homoscedasticidade (Levene's $p < 0,05$), portanto, foi aplicado o teste Anova de Welch com post-hoc de Games-Howell. Valores de média e desvio-padrão estão expressos na Tabela 01.

Tabela 01. Média e desvio padrão (dp) de Grau de conversão (%), Sorção ($\mu\text{g}/\text{mm}^3$), Solubilidade ($\mu\text{g}/\text{mm}^3$) e Acúmulo de Biomassa, por grupo.

Variável	Infiltrante				p valor
	G1	G2	G3	G4	
Grau de conversão (%)	59,94 (0,62) B	62,46 (2,38) A	57,43 (1,90) CD	56,59 (1,45) D	<0,001
Sorção ($\mu\text{g}/\text{mm}^3$)	77.3 (4.45) D	112 (4.09) B	95.6 (3.82) C	120 (3.83) A	<0,001
Solubilidade ($\mu\text{g}/\text{mm}^3$)	3.49 (1.77) D	38.4 (5.19) B	18 (2.46) C	64.4 (14.8) A	<0,001
Acúmulo de biomassa (absorbância)	0.591 (0.242) A	0.253 (0.0237) AD	0.469 (0.0440) AB	0.309 (0.0105) AC	0,002

Letras diferentes indicam diferença estatística entre as colunas.

Este estudo avaliou a incorporação de um composto antibacteriano, o monômero quaternário de amônio dimetilaminoxadecil (DMAHDM) e um remineralizante, o fosfato de cálcio amorfo (NACP), a um infiltrante resinoso experimental, na busca pelo desenvolvimento de um infiltrante otimizado com atividade antimicrobiana e remineralizante. As hipóteses nulas testadas foram rejeitadas, pois 1) a incorporação de DMAHDM e NACP influenciaram nas propriedades físicas testadas e 2) a incorporação de DMAHDM influenciou no potencial antibacteriano do material.

A avaliação do grau de conversão de um componente é fundamental para determinar a eficiência da polimerização do material e avaliar as propriedades físicas, mecânicas e clínicas do produto final. O grau de conversão é definido como a porcentagem de monômeros que se transformaram em polímeros durante o processo de polimerização. Para grau de conversão, foi observado que o grupo G2, contendo DMAHDM, apresentou os maiores valores, porém, não diferindo estatisticamente do grupo controle. Por outro lado, o grupo G3, contendo NACP, apresentou média inferior, sem diferença estatística do grupo controle, e o grupo G4, contendo os dois agentes terapêuticos associados, apresentou a menor média entre os grupos, não diferindo apenas do G3.

O grau de conversão afeta diretamente as propriedades mecânicas do infiltrante, como resistência à tração, dureza, tenacidade e módulo de elasticidade (LEPRINCE et al., 2013). Um alto grau de conversão está associado a uma maior ligação entre as cadeias poliméricas, resultando em um material mais resistente e durável (LEPRINCE et al., 2013). Também está associado às propriedades físicas do componente, onde a dureza está relacionada à capacidade do material em resistir às forças da mastigação e abrasão no meio bucal. Um alto grau de conversão resulta em um material mais duro, o que melhora a resistência à deformação e ao desgaste (FERRACANE, 2006).

Com base nos resultados, o G3 (NACP a 1,5%) teve o menor grau de conversão, o que significa que após a fotopolimerização, mais monômero TEGDMA não curado foi liberado no extrato (Dai et al., 2022). Esse menor valor de grau de conversão pode ter contribuído para o aumento nos valores de sorção e solubilidade. Pois sua rede polimérica pode ter sido prejudicada, favorecendo a infiltração de água entre as cadeias, lixiviação de monômeros não reagidos e o maior contato com as partículas bioativas, permitindo a liberação iônica (FERRACANE, 2006).

Para Sorção e Solubilidade, foi observado aumento significativo em todos os grupos contendo os agentes terapêuticos. G2 e G3, que contém DMAHDM e NACP isoladamente, respectivamente, apresentaram médias significativamente superiores ao infiltrante experimental puro, G1. G4 apresentou maiores médias, indicando que sorção e solubilidade são ainda maiores quando há associação dos compostos.

A adição dos agentes terapêuticos também resultou em aumento significativo nos valores de solubilidade, principalmente quando associadas concomitantemente ao EP. A solubilidade está relacionada à lixiviação de componentes do volume do material, também pode estar relacionada à dissolução de partículas em meio aquoso, além do desprendimento das partículas da matriz por conta da não silanização (FERRACANE, 2006). Essa degradação está relacionada a processos de oxidação e hidrólise, que ocorrem na presença de água (FERRACANE, 2006). É observada tendência de elevação da hidrofiliabilidade de materiais de matriz resinosa conforme o aumento na taxa de partículas bioativas incorporadas (Jardim et al., 2020; Yang et al., 2013).

Os valores de sorção estão relacionados a quanto o infiltrante é hidrofílico. No presente estudo, a elevação dos valores pode ser explicada pela adição dos componentes ao EP. O DMAHDM se encaixa na categoria de QAS, que são monômeros de sal de amônio quaternário (VIDAL et al., 2018). Uma vez que o DMAHDM é uma molécula polar e hidrofílica e a polaridade do compósito parece ditar a absorção de água, pode ser racional que, quanto mais moléculas de DMAHDM, mais hidrofílico é o compósito, logo, essa hidrofiliabilidade associada à heterogenicidade do compósito contendo QAS pode aumentar a sorção de água (VIDAL et al., 2018). Outro fator relacionado pode ser a menor qualidade da rede polimérica formada na presença das partículas não-silanizadas, como foi o caso do NACP (FONSECA et al., 2017). Esses resultados podem implicar em prejuízo na resistência do material resultante (FONSECA et al., 2017), o que pode repercutir em comprometimento do desempenho clínico, por conta do meio no qual o material restaurador será inserido, a cavidade oral.

O EP apresentou o menor valor de sorção de água e solubilidade e diferiu dos demais grupos. Uma variedade de processos químicos e físicos está diretamente relacionada à sorção e à solubilidade. Estes processos podem produzir efeitos deletérios, como alterações volumétricas, físicas e químicas na estrutura e função dos polímeros (FERRACANE, 2006; VIDAL et al., 2018). A alta absorção de água incha a rede de polímeros e faz com que os monômeros não reagidos sejam lixiviados. Os achados concordaram que a incorporação de QAS aumentou a sorção e a solubilidade (VIDAL et al., 2018).

A biomassa do biofilme foi avaliada pelo método de coloração dos biofilmes com cristal violeta. O cristal violeta é um corante básico, que se liga a moléculas de superfície carregadas negativamente e polissacarídeos na matriz extracelular (WANG et al., 2016). Neste ensaio, o cristal violeta é utilizado como indicador do crescimento bacteriano (WANG et al., 2016). A intensidade da cor associada às bactérias é medida pela espectrofotometria (MATARACI; DOSLER, 2012). Maiores médias de absorvância indicam maior quantidade de biomassa, ou seja, menor atividade antibacteriana, enquanto a redução da intensidade da cor está associada à atividade bactericida (MATARACI; DOSLER, 2012).

Observamos que o grupo G2 apresentou a menor média, indicando que a aderência do biofilme às amostras foi menor que nos demais grupos, demonstrando maior potencial antimicrobiano. G2 diferiu estatisticamente de G3 e G4, contudo, não apresentou diferença estatística de G1, o que se deve ao alto desvio-padrão deste grupo. O grupo G3, contendo apenas NACP, apresentou média superior aos grupos G2 e G4, que contém DMAHDM, o que indica uma maior concentração de número de células bacterianas vivas.

Sendo G1 (EP) o maior valor, indica que ele possui a menor eficiência antibacteriana e G2 (DMAHDM) o menor resultado, indica que seu potencial antibacteriano é eficiente, logo, o G4 (DMAHDM + NACP) sendo um dos valores intermediários, indica que pode ser que a adição do NACP (remineralizante) possa ter diminuído ligeiramente a capacidade antibacteriana do componente, visto que foi feita uma diluição maior dos componentes do infiltrante.

Os dados mostram que o DMAHDM diminuiu substancialmente a biomassa do biofilme. Segundo o estudo de Wang et al., que utilizou 3% de DMAHDM, assim como o grupo G2, a biomassa de biofilmes

em compósitos com DMAHDM foi muito menor do que em compósito sem DMAHDM. Estes resultados também se encontram claros nos estudos de Wu et al. e Zhou et al., em ambos foram feitos ensaios de coloração vivo/morto. No estudo de Wu et al. os resultados mostraram que nos compostos contendo 0.75%, 1.5%, 2.25% e 3% de DMAHDM respectivamente, o número de bactérias mortas crescia conforme a porcentagem de DMAHDM aumentava, enquanto no grupo controle, onde possuía apenas 20% de NACP o biofilme se encontrava principalmente vivo (WU et al., 2015).

No estudo de Zhou et al. foi mostrado que os grupos contendo 3% de DMAHDM e 3% de DMAHDM + 30% NACP possuíam bactérias mortas substanciais para todas as espécies testadas, enquanto o grupo contendo apenas 30% NACP e o grupo controle estavam cobertos por bactérias vivas (ZHOU et al., 2020).

CONCLUSÕES:

A partir dos resultados obtidos, pode-se concluir que a incorporação do DMAHDM a 3% ao infiltrante experimental resultou em aprimoramento do grau de conversão e potencial antibacteriano contra *S. mutans*, enquanto a incorporação de NACP a 1,5%, isolado ou associado ao DMAHDM, resultou em prejuízo às propriedades físicas e antimicrobiana do infiltrante.

BIBLIOGRAFIA

- DAI, Z. et al. Novel nanostructured resin infiltrant containing calcium phosphate nanoparticles to prevent enamel white spot lesions. **Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials**, v. 126, 1 fev. 2022.
- FERRACANE, J. L. Hygroscopic and hydrolytic effects in dental polymer networks. **Dental Materials**, v. 22, n. 3, p. 211–222, mar. 2006.
- FONSECA, A. S. Q. S. et al. Effect of monomer type on the C[dbnd]C degree of conversion, water sorption and solubility, and color stability of model dental composites. **Dental Materials**, v. 33, n. 4, p. 394–401, 1 abr. 2017.
- LEPRINCE, J. G. et al. **Progress in dimethacrylate-based dental composite technology and curing efficiency**. Dental Materials. **Anais...** fev. 2013.
- MATARACI, E.; DOSLER, S. In vitro activities of antibiotics and antimicrobial cationic peptides alone and in combination against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* biofilms. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 56, n. 12, p. 6366–6371, dez. 2012.
- MELO, M. A. et al. Designing Multiagent Dental Materials for Enhanced Resistance to Biofilm Damage at the Bonded Interface. **ACS Applied Materials and Interfaces**, v. 8, n. 18, p. 11779–11787, 11 maio 2016.
- NEDELJKOVIC, I. et al. Lack of Buffering by Composites Promotes Shift to More Cariogenic Bacteria. **Journal of Dental Research**, v. 95, n. 8, p. 875–881, 1 jul. 2016.
- VIDAL, M. L. et al. Physical and chemical properties of model composites containing quaternary ammonium methacrylates. **Dental Materials**, v. 34, n. 1, p. 143–151, 1 jan. 2018.
- WANG, L. et al. Novel bioactive nanocomposite for Class-V restorations to inhibit periodontitis-related pathogens. **Dental Materials**, v. 32, n. 12, p. e351–e361, 1 dez. 2016.
- WU, J. et al. Effect of dimethylaminohexadecyl methacrylate mass fraction on fracture toughness and antibacterial properties of CaP nanocomposite. **Journal of Dentistry**, v. 43, n. 12, p. 1539–1546, 1 dez. 2015.
- YIM, H. K. et al. Modification of surface pretreatment of white spot lesions to improve the safety and efficacy of resin infiltration. **Korean Journal of Orthodontics**, v. 44, n. 4, p. 195–202, 2014.
- YU, J. et al. Anti-caries effect of resin infiltrant modified by quaternary ammonium monomers. **Journal of Dentistry**, v. 97, 1 jun. 2020a.
- ZHOU, W. et al. In vitro evaluation of composite containing DMAHDM and calcium phosphate nanoparticles on recurrent caries inhibition at bovine enamel-restoration margins. **Dental Materials**, v. 36, n. 10, p. 1343–1355, 1 out. 2020.