



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA**

MARILIA ESTEVES VACARI

**EFEITO ANTIMICROBIANO DE SELANTE DE
SUPERFÍCIE CONTENDO AMÔNIA QUATERNÁRIA EM
AMOSTRAS DE RESINA COMPOSTA SUBMETIDAS A
CICLOS DE ESCOVAÇÃO**

**PIRACICABA – SP
2017**

MARILIA ESTEVES VACARI

**EFEITO ANTIMICROBIANO DE SELANTE DE
SUPERFÍCIE CONTENDO AMÔNIA QUATERNÁRIA EM
AMOSTRAS DE RESINA COMPOSTA SUBMETIDAS A
CICLOS DE ESCOVAÇÃO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas, como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Cirurgião Dentista.

Orientador: Prof. Dr. Flávio Henrique Baggio Aguiar

Coorientadora: Mari Miura Sugii

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DO TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO APRESENTADO PELA ALUNA MARILIA ESTEVES VACARI E ORIENTADA PELO PROF. DR. FLÁVIO HENRIQUE BAGGIO AGUIAR.

PIRACICABA – SP

2017

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): Não se aplica.

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Piracicaba
Marilene Girello - CRB 8/6159

V131e Vacari, Marília Esteves, 1995-
Efeito antimicrobiano de selante de superfície contendo amônia quaternária em amostras de resina composta submetidas a ciclos de escovação / Marília Esteves Vacari. – Piracicaba, SP : [s.n.], 2017.

Orientador: Flávio Henrique Baggio Aguiar.

Coorientador: Mari Miura Sugii.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Anti-infecciosos. 2. Escovação dentária. 3. Resinas compostas. I. Aguiar, Flávio Henrique Baggio, 1977-. II. Sugii, Mari Miura, 1990-. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. IV. Título.

Informações adicionais, complementares

Título em outro idioma: Evaluation of antimicrobial effect of a surface sealant containing quaternary ammonium salt applied on composite resin submitted to brushing cycles

Palavras-chave em inglês:

Anti-infective agents

Toothbrushing

Composite resins

Titulação: Cirurgião-Dentista

Data de entrega do trabalho definitivo: 02-10-2017

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, Celso Aparecido Vacari e Maria Auxiliadora Esteves Vacari, que estiveram sempre presentes em todas as etapas de minha vida, me apoiando e dando o suporte necessário para atravessar os percalços existentes nessa caminhada que hoje culminam nessa grande vitória.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pela minha vida, pela minha família e por todas as bênçãos e oportunidades a mim destinadas. Agradeço por sempre me guiar, por me guardar e iluminar em cada passo trilhado na minha vida.

Aos meus pais, Maria Auxiliadora Esteves Vacari e Celso Aparecido Vacari, pelo amor, carinho e educação que me deram. Agradeço pelo incentivo dado nos momentos mais difíceis, nas horas de desânimo e cansaço. Obrigada por acreditarem em mim, nos meus sonhos, pelo apoio incondicional em todas as escolhas da minha vida e por toda confiança.

À minha irmã, Mariana Esteves Vacari, por todo companheirismo, amizade, lealdade, compreensão e ajuda durante este percurso.

Agradeço às minhas amigas de república, que são as melhores amigas que alguém poderia ter: Ana Carolina Vergueiro Miranda, Loreta Rossato, Maitê Tikami, Mariana Valério Pallone, Marielle Sato Kawano, Tainá Queiroz dos Santos e Thaís Escobar Fava, por todos esses anos de convivência, pela experiência compartilhada, por cada gesto e palavra que tanto me motivou e alegrou nas horas difíceis, por todo companheirismo, apoio e amizade que fizeram com que esses 5 anos se tornassem mais leves e divertidos.

Agradeço ao Prof. Dr. Flávio Henrique Baggio Aguiar e às alunas de pós-graduação Mari Miura Sugii e Renata Pereira pela disponibilidade, atenção, paciência e por todo conhecimento compartilhado durante a realização deste projeto que tanto agregou-me conhecimento.

À Faculdade de Odontologia de Piracicaba, da Universidade Estadual de Campinas, ao seu corpo docente, direção, administração e a todos os meus pacientes que em mim confiaram, pela oportunidade de realizar esse curso de excelência.

Ao Pibic/CNPq pela concessão da bolsa de iniciação científica que me deu a oportunidade de desenvolver o projeto que resultou neste trabalho.

“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis. ”

José de Alencar

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar o selante de superfície, Biscover, acrescido de organo-silanos contendo grupamentos químicos funcionais com efeito antimicrobiano (sais de amônio quaternário - ORMOSIL-SiQAI). A resistência mecânica do selante foi avaliada por meio de 2.500 ciclos de escovação e o potencial antimicrobiano antes e após escovação foi avaliado pelo teste de formação do halo de inibição de crescimento, e de ensaio de formação de biofilme. Foram estudados os grupos: G1 (Resina Z350 XT + 2 camadas de Biscover); G2 (Resina Z350 XT + 2 camadas de ORMOSIL- SiQAI); G3 (Resina Z350 XT + 2 camadas de Biscover contendo ORMOSIL-SiQAI) e G4 (Resina Z350 XT). A avaliação qualitativa da integridade das superfícies foi realizada por microscópio eletrônico de varredura. Após a escovação, cada grupo foi subdividido entre escovados (EG) (n=10) e não escovados (G) (n=10) e o halo de inibição mensurado. Observou-se que o ORMOSIL-SiQAI apresentou atividade antimicrobiana através da formação do halo de inibição ao redor dos discos de resina, tanto na forma pura (G2) como inserido no selante de superfície (G3), porém este potencial é perdido após a escovação. Através do ensaio de formação de biofilme, notou-se diferença estatística entre as amostras contendo ORMOSIL-SiQAI (G2 e G3) e as amostras dos grupos controle (G1 e G4). Conclui-se também que não há diferença no potencial do ORMOSIL-SiQAI inserido em selante ou em sua forma pura, contudo, os ciclos de escovação levaram à diminuição significativa da atividade antimicrobiana do composto, indicando que este necessita de reaplicações à longo prazo.

Palavras-Chave: Anti-infecciosos. Escovação dentária. Resina composta.

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the surface sealant, Biscover, added of organo-silanes containing functional chemical groups with antimicrobial effect (quaternary ammonium salts - ORMOSIL-SiQAI). The sealant mechanical strength was evaluated by means of 2,500 brushing cycles and antimicrobial potential before and after brushing was evaluated through zone of inhibition assay and biofilm formation test. The following groups were studied: G1 (Z350 XT composite + 2 layers of Biscover); G2 (Z350 XT composite + 2 layers of ORMOSIL- SiQAI); G3 (Z350 XT composite + 2 layers of Biscover containing ORMOSIL-SiQAI) and G4 (Z350 XT composite). The qualitative evaluation of surfaces integrity was performed by scanning electron microscope. After brushing, each group was subdivided between brushed (EG) (n = 10) and non-brushed (G) (n = 10) and inhibition zone was measured. It was observed that ORMOSIL-SiQAI showed antimicrobial activity through formation of inhibition zone around the composite discs, both in pure form (G2) and inserted into surface sealant (G3), but this potential is lost after brushing. Through biofilm formation test, statistical difference was observed between samples containing ORMOSIL-SiQAI (G2 and G3) and control groups samples (G1 and G4). It can be concluded that there was no difference in the potential of ORMOSIL-SiQAI inserted into sealant or in its pure form, however, brushing cycles resulted in a significant decrease of the compound antimicrobial activity, indicating that it needs to be long-term reapplied.

Key words: Anti-infective agents. Tooth brushing. Composite resin.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 Distância da margem do corpo- de- prova à margem do halo de inibição (linha branca). 17
- Figura 2 Esquema de diluições para plaqueamento em BHI ágar. As diluições se iniciam a partir do soro em que as amostras são vortexeadas e sonicadas. Alíquotas de 100 µL são transferidas para *ependorfs* contendo 900 µL de solução de soro estéril. Foram feitas diluições de 10, 100, 1000 e 10000 vezes. 19
- Figura 3 Imagem representativa de MEV do Grupo 1 (Biscover) previamente à escovação mecânica (1) e após os ciclos de escovação (2). Aumento de 1000 vezes. 22
- Figura 4 Imagem representativa de MEV do Grupo 2 (Ormosil SiQAI) previamente à escovação mecânica (1) e após os ciclos de escovação (2). Aumento de 1000 vezes. 22
- Figura 5 Imagem representativa de MEV do Grupo 3 (Biscover + Ormosil SiQAI) previamente à escovação mecânica (1) e após os ciclos de escovação (2). Aumento de 1000 vezes. 22
- Figura 6 Imagem representativa de MEV Grupo 4 (Resina Z350XT) previamente à escovação mecânica (1) e após os ciclos de escovação (2). Aumento de 1000 vezes. 23

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Diâmetros dos halos de inibição do crescimento bacteriano mensurados antes e após a escovação.	20
Tabela 2	Médias (desvio padrão) de unidades formadoras de colônia por mililitro (UFC/mL).	21

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BHI - Brain Heart Infusion

MEV – Microscópio Eletrônico de Varredura

QAMS - Quaternary Ammonium Salt

UFC/mL – Unidades formadoras de colônia por mililitro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO DE LITERATURA	14
3 PROPOSIÇÃO	17
4 MATERIAIS E MÉTODOS	18
4.1 Síntese de ORMOSIL-SiQAI	18
4.2 Confeção dos Corpos-de-Prova	18
4.3 Formação de Halo de Inibição do Crescimento Bacteriano	19
4.4 Teste de Resistência Mecânica à Ciclos de Escovação	20
4.5 Análise Qualitativa em Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV)	20
4.6 Ensaio de formação de biofilme 24 h de <i>Streptococcus mutans</i>	20
4.7 Seleção das placas para contagem de unidades formadoras de colônia por mililitro (CFU/ml)	22
4.8 Análise Estatística	22
5 RESULTADOS	23
5.1 Teste de Formação de Halo de Inibição	23
5.2 Teste de Formação de Biofilme 24h	23
5.3 Análise em microscópio eletrônico de varredura (MEV)	24
6 DISCUSSÃO	26
7 CONCLUSÃO	28
REFERÊNCIAS	29

1 INTRODUÇÃO

A resina composta é um material de fundamental importância na odontologia devido as suas características favoráveis de semelhança com o elemento dental tais como: cor, translucidez, textura, brilho e fluorescência. É utilizada como material de eleição em restaurações diretas com o objetivo de devolver estética e função aos elementos dentais.

Mesmo sendo um material amplamente utilizado, a resina composta ainda apresenta algumas limitações como a contração de polimerização e falha de adesão à estrutura dental (Lopes et al., 2008). Uma vez o selamento comprometido, há a formação de um nicho de retenção de biofilme e abre-se um acesso para passagem de bactérias e fluidos entre as paredes da cavidade e da restauração. Esse processo denominado de microinfiltração marginal pode trazer como consequências, sensibilidade pós-operatória, manchamento marginal, cárie secundária e injúrias pulpares, originando o fracasso das restaurações (Nedeljkovic et al., 2015).

Uma das formas de se descontinuar esta sequência de eventos que levam à substituição da restauração é na interface dente restauração. Os selantes de superfície após o acabamento e polimento das restaurações promovem maior longevidade às restaurações de resina composta, graças à penetração deste material nas porosidades existentes nas superfícies do material e na interface dente/restauração (Dickinson et al., 1990). Os selantes de superfície são compósitos resinosos de baixa viscosidade, idealizados para penetrar e preencher microfendas na interface dente restauração minimizando a infiltração marginal das restaurações (Reid et al., 1991; Munro et al., 1996; Ramos et al., 2000; Ramos et al., 2002).

Sabe-se também que atualmente, pode-se recorrer à adição de compostos com efeito antimicrobiano, como ocorre com compósitos contendo amônias quaternárias. Metacrilatos funcionalizados e outros organosilanos modificados por grupamentos de amônia quaternária (QAMS) são alguns exemplos de substâncias que têm demonstrado potencial antimicrobiano quando inseridos em materiais de uso odontológico (Han et al., 2017). Em um estudo de Gong et al. (2012) foi demonstrado que as resinas contendo tais compostos além de apresentarem atividade antimicrobiana, ainda tiveram suas propriedades mecânicas melhoradas. Para estes materiais com propriedades antimicrobianas é importante que não haja perda, ou que a perda do princípio ativo sob as condições adversas do meio bucal seja mínima.

2 REVISÃO DE LITERATURA

A década de 90 foi marcada por expressivos ganhos nos níveis de saúde bucal. Confirmação disso pode ser dada por estudos de Peterson e Bratthall (1996) e Downer (1998), que mostra que houveram reduções expressivas nos índices de prevalência, incidência e progressão de lesões cárias. Sabe-se que a doença cárie tem etiopatogenia passível de prevenção e, quando diagnosticada precocemente, permite a utilização de recursos que possibilitam a paralisação do processo, evitando-se assim o tratamento restaurador convencional e possibilitando uma abordagem mais conservadora (Kramer et al., 2003)

Contudo, mesmo com tais ganhos a nível de saúde bucal, a maior parte do tempo gasto pelo cirurgião dentista no exercício clínico, é na atividade de troca de restaurações fracassadas (Deligeorgi et al., 2001; Frost, 2002). Um dos motivos principais que culminam nessa troca é o tratamento das lesões de cárie secundária. Um dos fatores desencadeantes da cárie secundária é a microinfiltração marginal, em que ocorre a penetração de bactérias, fluidos, moléculas e íons entre as paredes das cavidades e do material restaurador (Nedeljkovic et al., 2015).

Para Köhler e Hager (1993), van Dijken et al. (1993) e Heintze (1999), o insucesso precoce do tratamento restaurador convencional ocorre devido à falta de capacidade antimicrobiana significativa dos materiais restauradores disponíveis até o momento.

Todavia, graças à conscientização crescente da importância da prevenção e do desenvolvimento de novos materiais odontológicos, pesquisadores vem direcionando suas investigações para a utilização determinados materiais, como os selantes de superfície, que funcionam de maneira em que é possível descontinuar o processo que determina o fracasso, muitas vezes precoce, de um tratamento restaurador (Kramer et al., 1997).

Os primeiros estudos clínicos, abordando os selantes de superfície e sua atividade sobre os microrganismos presentes em cáries oclusais foram realizados por Handelman et al., em 1972. Nesse estudo foi descrito uma redução de 98% no número de bactérias viáveis quando as lesões eram seladas, por um mês, com um composto do tipo BIS-GMA.

Going e colaboradores, em 1978, verificaram o tipo e a viabilidade de microrganismos remanescentes em lesões cárias após cinco anos da utilização de

selantes oclusais. Este tratamento promoveu a regressão de 89% de um estado ativo de cárie para inativo e a quantidade de bactérias nas áreas seladas foi aproximadamente 100 vezes menor do que em áreas que não receberam o selante. Por meio desse estudo foi concluído que o selamento de áreas específicas previne e/ou retarda a progressão de lesões cariosas e que a permanência de um número limitado de microrganismos parece ser incapaz de continuar a destruição do tecido dentinário.

Já em 1985, Handelman et al. pesquisaram o efeito da aplicação de selantes oclusais e sua perda completa ou parcial no avanço das lesões de cárie. O estudo destacou a importância da retenção do selante, pois dessa maneira, além de não ocorrer o aumento das lesões sob os selantes intactos, foi verificada pouca progressão sob selantes defeituosos que eram reaplicados em exames periódicos, quando constatada qualquer alteração. De acordo com os autores, esses dados mostram a eficiência do selamento de lesões de cárie, desde que o paciente esteja integrado em um programa de visitas periódicas ao dentista, em que é verificado a integridade do selante e a progressão da lesão cariada.

Podemos ainda agregar certas propriedades, como atividade antimicrobiana nesses materiais. Assim, é possível torná-los ainda mais eficazes do que quando usados em sua forma pura. Tratam-se de metacrilatos funcionalizados e outros organosilanos modificados por grupamentos de amônia quaternária (QAMS), substâncias que vem demonstrando potencial antibacteriano quando inseridos em materiais de uso odontológico (Ge et al., 2015). Estes são incorporados em materiais e compósitos com a finalidade de inibição do acúmulo de placa e cáries secundárias desde a década de 1970, quando o QAMS foi incorporado pela primeira vez em enxaguatórios bucais para inibir os biofilmes orais (Rosa e Sturzenberger, 1976; Bonesvoll e Gjermo, 1978).

Os sais de amônia quaternária (QAMS) também são amplamente utilizados no tratamento de água, na indústria de alimentos, têxtil e revestimento superficial pois apresenta baixa toxicidade e amplo espectro de atividade antimicrobiana (Kourai et al., 2006).

O mecanismo antibacteriano das QAMS ocorre devido à sua capacidade de causar lise de bactérias através da ligação das membranas bacterianas (Namba et al., 2009; Beyth et al., 2006 e Xu et al., 2012). Quando as células de bactérias carregadas negativamente entram em contato com a carga positiva de amina

quaternária, a homeostase é perturbada e a bactéria pode romper sob sua própria pressão osmótica (Namba et al., 2009; Beyth et al., 2006 e Xu et al., 2012).

Existem vários estudos dentro dessa linha de pesquisa, que investiga as amônias quaternárias e buscam encontrar um composto repleto de benefícios, incluindo um bom efeito antibacteriano, baixa citotoxicidade e que não comprometa as propriedades mecânicas do material a ser inserido, além do baixo custo e facilidade de aplicação (Costin e Xu, 2013).

Imazato et al., em 2014, propuseram-se a estudar materiais adesivos bioativos, que pudessem contribuir para um melhor prognóstico dos tratamentos restauradores. A aplicação de compostos de amônia quaternária (QAMs) e o carregamento de partículas bioativas de tamanho nanométrico foram consideradas vantajosas, podendo fornecer benefícios clínicos, com relação ao grupo que não recebeu aplicação.

Em 2016, Zhang et al., analisaram metacrilatos de amônia quaternária (QAMs) com diferentes comprimentos de cadeia. Esses foram sintetizados e incorporados em um nanocompósito de cálcio amorfo. O objetivo foi criar um material com capacidades antibacterianas e de remineralização dental. Foi verificado que ao aumentar o comprimento de cadeia, houve uma redução na atividade metabólica e na produção de biofilme, e provocou uma diminuição na contagem de colônias, tudo isso sem haver comprometimento das propriedades mecânicas do material. Os nanocompositos que exibem forte atividade antimicrobiana e efeitos de remineralização e propriedades mecânicas são materiais promissores para restaurações.

3 PROPOSIÇÃO

Este estudo teve como objetivos: 1) Avaliar o efeito antimicrobiano de um selante de superfície acrescido de organo silanos 1 contendo grupamentos químicos funcionais com efeito antimicrobiano - sais de amônio quaternário - analisando o halo de inibição de crescimento de *Streptococcus mutans* UA 159; 2) Avaliar a resistência deste selante de superfície à 2500 ciclos de escovação através de um segundo teste de halo de inibição de crescimento de *S. mutans* e por microscopia eletrônica de varredura (MEV).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Síntese de ORMOSIL-SiQAI

Foram reagidos (3-Iodopropil)Trimetoxissilano (IPTMS) e N,N-Dimetildodecilamina (DMDA) em 25 ml de N,N-Dimetilformamida (DMF) em um balão reacional de 50 ml, protegido da luz. Em seguida, para evitar a perda de solvente, um condensador de bolas ligado a uma torneira com fluxo de água constante foi encaixado no balão reacional. A temperatura da reação foi ajustada para 110°C. A reação prosseguiu por 24 horas sob refluxo.

Após as 24 horas de reação, Tetraetilortossilicato (TEOS), 3-(Trimetóxisilil)propil metacrilato (TMSPM) e 700 µl de ácido clorídrico 0,3M (quantidade estequiométrica para hidrólise ácida dos reagentes) foram acrescentados. Durante esta reação, o balão prosseguiu fechado hermeticamente por 1 hora.

O produto foi transferido para uma placa de Teflon e levado para estufa a 80°C, por 48 horas para evaporação do solvente, após o término da reação.

4.2 Confeção dos Corpos-de-Prova

Foram avaliados (n=10):

- Grupo 1 (G1 – Resina Z350 XT + 2 camadas de selante de superfície Biscover)
- Grupo 2 (G2 - Resina Z350 XT + 2 camadas de ORMOSIL-SiQAI)
- Grupo 3 (G3 - Resina Z350 XT + 2 camadas do selante de superfície Biscover contendo ORMOSIL-SiQAI)
- Grupo 4 (G4 - Resina Z350 XT)

Com auxílio de matrizes de Teflon de 5 mm de diâmetro e 2 mm de espessura, os corpos-de-prova foram confeccionados. Uma tira de poliéster foi posicionada sob a matriz de teflon e um único incremento de resina composta Z350 (3M, Espe) foi inserido. Sobre a matriz preenchida foi colocada mais uma tira de poliéster e uma lâmina de vidro, que foi pressionada para possibilitar o escoamento do excesso de material e nivelamento da superfície do corpo-de-prova. A fotoativação foi realizada somente sobre a tira de poliéster, com o aparelho fotoativador Valo (Ultradent) no modo Standard, com irradiância de 100 mW/cm², durante 20 segundos.

Para os grupos G1 e G3 os corpos-de-prova foram recobertos por duas camadas de selante de superfície com o auxílio de aplicadores descartáveis tipo Microbrush, sendo o intervalo de 15 minutos entre cada aplicação.

Já para o grupo G2 os corpos-de-prova foram recobertos, também com auxílio de aplicadores tipo Microbrush, por duas camadas de ORMOSIL–SiQAI, sendo o intervalo de 50 minutos entre cada aplicação.

4.3 Formação de Halo de Inibição do Crescimento Bacteriano

Em meio de cultura Brain Heart Infusion (BHI), a 37°C e em atmosfera de 5% de CO₂, cepas de *S. mutans* UA159 foram cultivadas. Após crescimento, uma alíquota de 20 µL foi espalhada na superfície do ágar BHI em placas de Petri de 150 mm de diâmetro. Após secagem do inóculo espalhado, os corpos-de-prova foram devidamente posicionados no centro da placa.

As placas foram incubadas a 37° C em microaerofilia com 5% de pressão parcial de CO₂. Os halos de inibição formados foram medidos com auxílio de um paquímetro digital após 18 horas. Os valores considerados na Tabela 1 foram obtidos através da média aritmética de medições de quatro pontos marcados no halo de inibição (Figura 1).

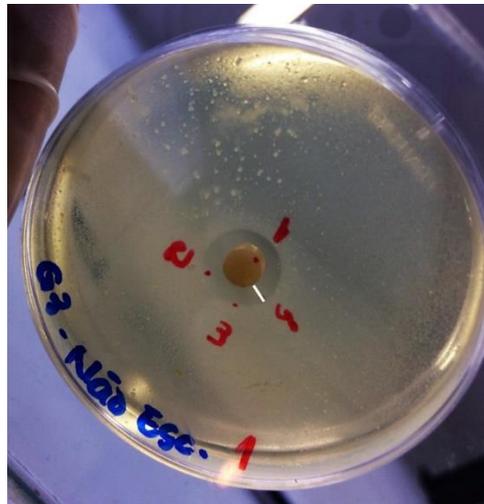


Figura 1 - A distância da margem do corpo-de-prova à margem do halo de inibição (linha branca) foi medida em quatro pontos diferentes e a média dessas encontra-se na tabela 1.

4.4 Teste de Resistência Mecânica à Ciclos de Escovação

As películas de selante de superfície foram submetidas à escovação mecânica simulada em máquina de escovação (Equilabor, Piracicaba, SP, Brasil). Cada amostra foi escovada individualmente, imersa em solução de dentifrício (Colgate Máxima Proteção de Cáries, São Paulo, SP, Brasil) e água destilada na proporção de 1:3 dentifrício/água (em massa) utilizando escova dental com cerdas de náilon macias (Oral B Soft 40, São Paulo, SP, Brasil). Foram realizados 2.500 ciclos de escovação com carga axial constante de 200g. Após a ciclagem, os espécimes foram lavados em água corrente, por 30 segundos. Após a escovação simulada, o halo de inibição foi novamente verificado para estas amostras.

4.5 Análise Qualitativa em Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV)

A avaliação qualitativa da integridade das superfícies foi realizada em Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV). Foram analisadas 3 amostras selecionadas aleatoriamente, representativas de cada grupo, sendo 12 lidas previamente ao teste de escovação e 12 após. As amostras foram montadas em “stubs” metálicos e recobertas com ouro após banho ultrassônico de 30 minutos (trocando-se a água a cada 10 minutos) e secagem por 24 h em estufa a 37° C. Esses conjuntos foram avaliados em Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV) operando a 15 kV (JSM 5600LV – Jeol Inc., Peabody, MA, EUA), com aumento de 1000 vezes.

Esta análise permitiu avaliar a microestrutura das amostras e criar parâmetros reais de degradação química e mecânica do selante de superfície contendo ou não ORMOSIL-QAMS.

4.6 Ensaio de formação de biofilme 24 h de *Streptococcus mutans*

Preparo da Solução Starter: Em um tubo tipo Falcon (50 mL) contendo meio BHI enriquecido de glicose 20%, colônias de uma placa de *Streptococcus mutans* UA159 foram cultivadas por 18 horas em estufa de CO₂ (SANYO Electric Biomedical Co., Ltd., Osaka, Japan) a 37° C.

Preparo do Inóculo: Após as 18 h, uma nova solução de BHI e glicose foi preparada e a ela foi adicionada uma alíquota de 0,5 mL da solução Starter. A leitura inicial deste inóculo no espectrofotômetro (Unico 1100 RS Spectrophotometer, Suite E Daiton, NJ, USA) foi de ~ 0,200, em comprimento de onda de 660 nm. O inóculo

retornou à estufa de CO₂ a 37° C e uma nova leitura foi efetuada de hora em hora, até que a leitura chegasse a uma absorbância de ~ 0,700.

Preparo do Meio de Cultura: Foram preparados dois meios de cultura, um contendo meio BHI; o inóculo de *Streptococcus mutans* e sacarose 20% e outro contendo apenas BHI estéril (controle negativo). Uma placa de 24 poços foi preenchida com o meio contendo inóculo e outra com o meio estéril. Os corpos-de-prova foram colocados nos respectivos poços e as placas foram mantidas em estufa de CO₂, a 37° C por 24 h.

Plaqueamento: Após as 24 h, cada corpo-de-prova passou por 5 imersões em solução de soro estéril para remoção de biofilme fracamente aderido. Em seguida, foram colocados em um tubo tipo Falcon contendo 5 mL de solução de soro estéril, foram vortexeados e sonicados (9.9 s cada pulso com amplitude de 5%) (Vibra Cell, Sonics & Material, Newtown, CT, EUA), por 1 minuto.

Do soro vortexeado e sonificado de cada amostra, uma alíquota de 100 µL foi transferida para um *ependorf* contendo 900 µL de soro estéril (diluição 1:10). Este processo foi repetido até que a diluição chegasse a 1:10000. De cada diluição, uma alíquota de 10 µl foi despejada em uma placa de Petri contendo BHI Ágar. Com uma alça de vidro previamente flambada e resfriada, a alíquota dispensada foi espalhada sobre toda a superfície do Ágar. O procedimento foi repetido para todas as diluições. As placas de Petri foram incubadas em estufa de 5% de CO₂, a 37° C, por 48 horas.

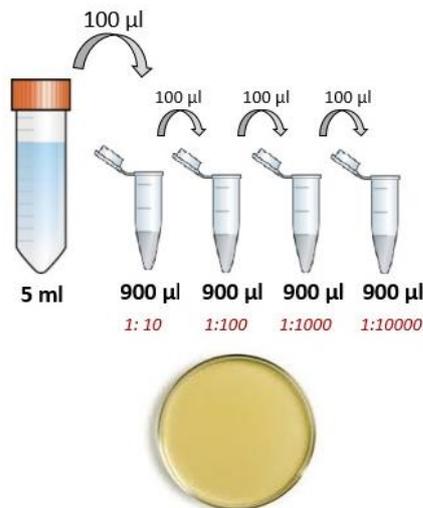


Figura 2 - Esquema de diluições para plaqueamento em BHI ágar. As diluições se iniciam a partir do soro em que as amostras são vortexeadas e sonicadas. Alíquotas de 100 µL são transferidas para *ependorfs* contendo 900 µL de solução de soro estéril. Foram feitas diluições de 10, 100, 1000 e 10000 vezes.

4.7 Seleção das placas para contagem de unidades formadoras de colônia por mililitro (UFC/ml)

Após o período de incubação, as placas foram retiradas da estufa e foram selecionadas para contagem de UFC/ml apenas as placas que continham no mínimo 20 colônias e no máximo 300. A contagem foi feita à olho nu, sem auxílio de equipamentos sendo as colônias contadas marcadas no fundo da placa com um marcador permanente.

4.8 Análise Estatística

Os dados do ensaio de formação de biofilme foram tabulados e submetidos à análise estatística de Shapiro-Wilk para verificação da normalidade seguido de Kruskal-Wallis e pós-teste Dunn ($\alpha=0,05$).

5 RESULTADOS

5.1 Teste de Formação de Halo de Inibição

A partir do resultado do teste do halo de inibição de crescimento bacteriano foi possível inferir que as amostras contendo ORMOSIL – SiQAI, seja ele em sua forma pura (G2) ou inserido dentro do selante de superfície Biscover (G3), apresentaram atividade antimicrobiana, quando comparado aos grupos controle (G1 e G4). Houve perda do potencial antimicrobiano uma vez que as amostras escovadas (EG) apresentaram menor halo de inibição ao redor dos corpos-de-prova do que as amostras não escovadas (G).

Tabela 1 - Diâmetros dos halos de inibição do crescimento bacteriano mensurados antes e após a escovação.

GRUPO	MÉDIA ARITMÉTICA
<i>G1</i>	<i>0,00 mm</i>
<i>EG1</i>	<i>0,00 mm</i>
<i>G2</i>	<i>2,36 mm</i>
<i>EG2</i>	<i>0,00 mm</i>
<i>G3</i>	<i>1,87 mm</i>
<i>EG3</i>	<i>0,00 mm</i>
<i>G4</i>	<i>0,00 mm</i>
<i>EG4</i>	<i>0,00 mm</i>

5.2 Teste de Formação de Biofilme 24h

Considerando os grupos não escovados, aqueles contendo composto ORMOSIL-SiQAI, G2 e G3, demonstraram capacidade de inibição da formação de biofilme de *S.mutans*, diferindo estatisticamente dos grupos G1 e G4. Porém, após escovação mecânica simulada, somente G2 ainda apresentou potencial antimicrobiano, diferindo estatisticamente dos demais.

Os grupos G2 e G3 apresentaram perda do potencial antimicrobiano após escovação mecânica simulada, observada pelo aumento estatisticamente significativo de UFC/mL para amostras escovadas. Os resultados do teste de formação de biofilme estão apresentados na tabela 2.

Tabela 2 - Médias (desvio padrão) de logaritmo de unidades formadoras de colônia por mililitro (UFC/mL).

SELANTE DE SUPERFÍCIE	ESCOVAÇÃO	
	Sim	Não
G1 (Biscover)	7.50 (0,21) aA	7.03 (0,21) aA
G2 (Ormosil SiQAI)	4.72 (0,47) bB	6.25 (0,43) bA
G3 (Biscover + Ormosil SiQAI)	4.21 (0,53) bB	6.70 (0,41) abA
G4 (Resina Z350XT)	7.33 (0,12) aA	7.04 (0,13) aA

Médias seguidas de letras distintas (maiúsculas na horizontal e minúsculas na vertical) diferem entre si ($p \leq 0,05$).

5.3 Análise em microscópio eletrônico de varredura (MEV).

A análise em microscópio eletrônico de varredura mostrou que para todos os grupos estudados a escovação simulada removeu grande parte da película superficial. As figuras 2, 3, 4 e 5 representam a integridade das superfícies de cada grupo antes e após a escovação mecânica.

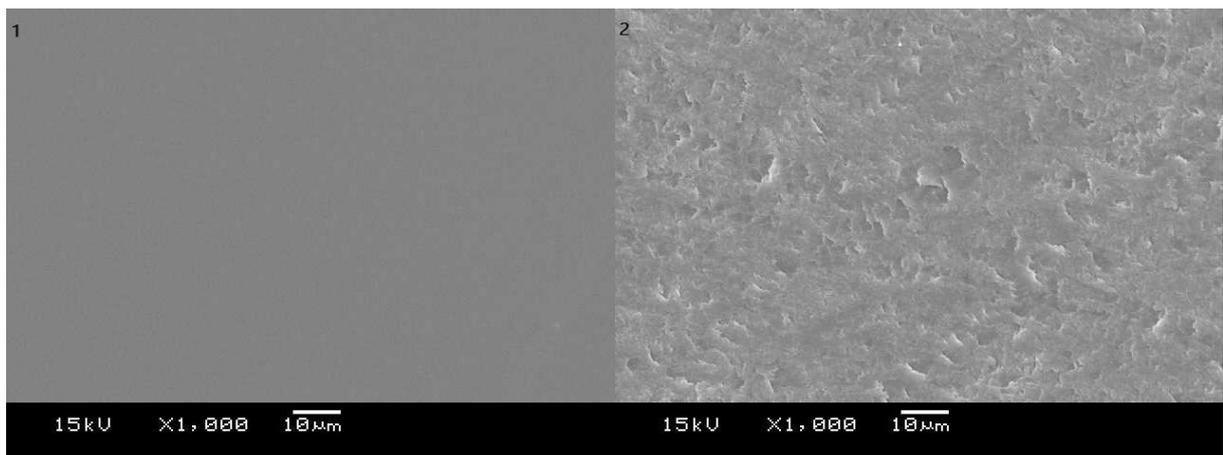


Figura 3 - Imagem representativa de MEV do Grupo 1 (Biscover) previamente à escovação mecânica (1) e após os ciclos de escovação (2). Aumento de 1000 vezes.

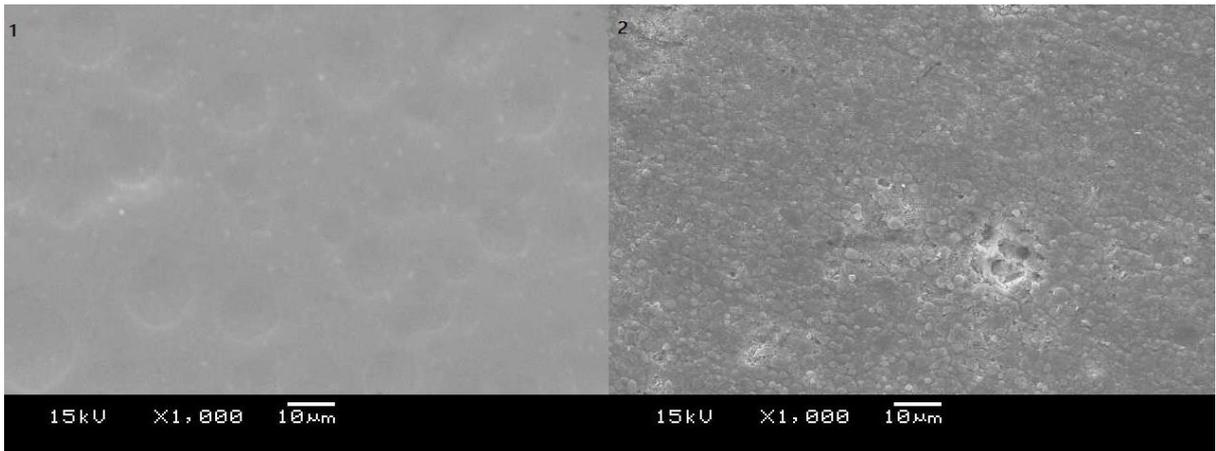


Figura 4 - Imagem representativa de MEV do Grupo 2 (Ormosil SiQAI) previamente à escovação mecânica (1) e após os ciclos de escovação (2). Aumento de 1000 vezes.

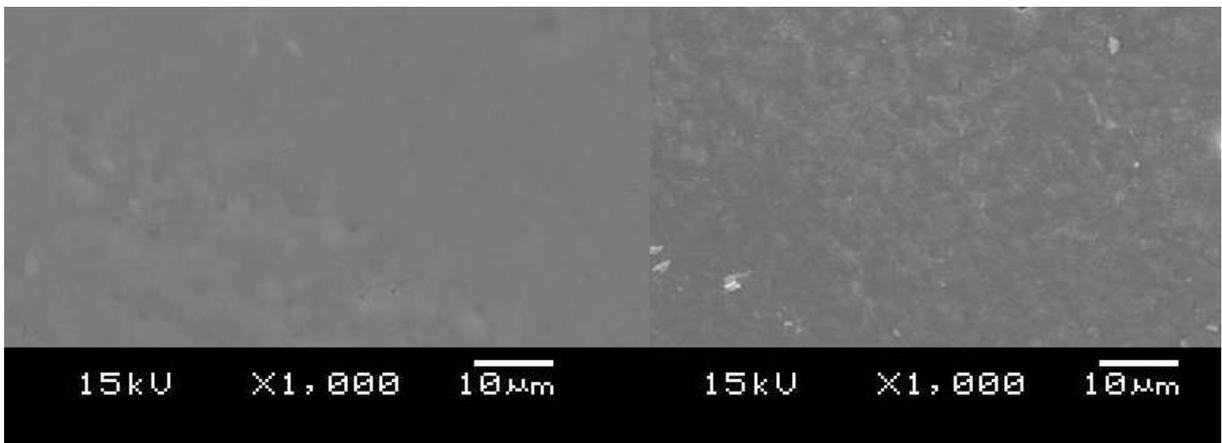


Figura 5 - Imagem representativa de MEV do Grupo 3 (Biscover + Ormosil SiQAI) previamente à escovação mecânica (1) e após os ciclos de escovação (2). Aumento de 1000 vezes.

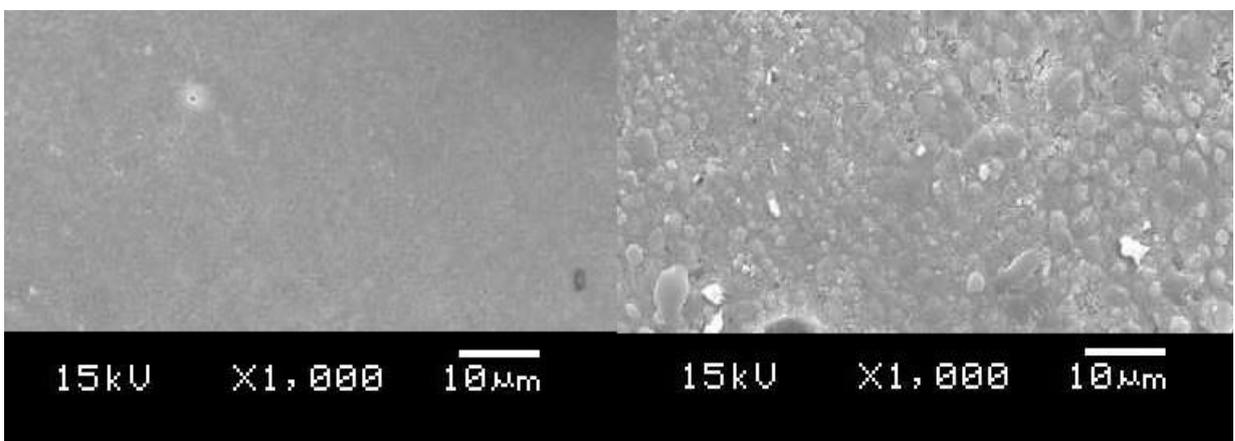


Figura 6 - Imagem representativa de MEV Grupo 4 (Resina Z350XT) previamente à escovação mecânica (1) e após os ciclos de escovação (2). Aumento de 1000 vezes.

6 DISCUSSÃO

Como possuem inúmeras vantagens como cor, translucidez, textura, brilho e fluorescência, as resinas compostas são materiais restauradores muito utilizados na odontologia, principalmente em procedimentos restauradores estéticos (Lin et al.; 2013). Entretanto, com relação ao aspecto funcional, o comprometimento do selamento marginal das restaurações de resina composta proporciona a passagem de bactérias e substâncias entre as paredes da cavidade e da restauração. Esse mecanismo denominado microinfiltração marginal, traz como consequências a sensibilidade pós-operatória, cárie secundária, manchamento marginal e injúrias pulpares, originando o fracasso precoce das restaurações (Mjör e Toffenetti, 2000; Mjör et al., 2001).

A aplicação de selantes de superfície sobre a restauração sela as porosidades existentes na superfície do material restaurador e na interface dente/restauração e ainda atua como um brilho químico, sendo capaz de reduzir a rugosidade da superfície (Lowe, 2004). Outra alternativa para evitar a colonização e proliferação bacteriana seriam materiais com propriedades antimicrobianas. Metacrilatos funcionalizados e outros organosilanos modificados por grupamentos de amônia quaternária (QAMS), têm demonstrado potencial antimicrobiano quando inseridos em materiais de uso odontológico. As mudanças na composição do material visam modificar as superfícies tornando-as mais difíceis para adesão e colonização por microrganismos (Kregiel, 2014).

As amostras seladas com ORMOSIL – SiQAI, seja ele em sua forma pura (ORMOSIL –SiQAI/G2) ou inserido dentro do selante de superfície estudado (Biscover/G3), demonstraram atividade antimicrobiana quando comparado aos grupos controle (Biscover/G1 e Resina Z350XT/G4). Entretanto, após a escovação mecânica houve perda do potencial antimicrobiano uma vez que as amostras escovadas (EG) apresentaram menor halo de inibição ao redor dos corpos-de-prova do que as amostras não escovadas (G). Além disso, houve um aumento estatisticamente significativo de UFC/mL nas amostras escovadas. O efeito antimicrobiano das amônias quaternárias tem sido atribuído a interações iônicas e lipofílicas entre a molécula e a membrana bacteriana. Os grupos de amônia quaternária carregam uma carga positiva, que pode interagir com a carga negativa da membrana celular grampositiva, causando a sua ruptura (Muñoz-Bonilla e Fernández-García, 2012). Além disso, tem sido relatado que cadeias carbônicas longas podem

formar vacâncias na parede celular por onde podem penetrar, causando lise e morte celular (Palermo et al., 2011).

A escovação simulada foi responsável pela perda de potencial antimicrobiano das amostras estudadas, devido à abrasão proporcionada pelas cerdas da escova dental juntamente com o agente abrasivo do dentifrício utilizado (carbonato de cálcio). A avaliação qualitativa da integridade das superfícies seladas, antes e após a escovação, realizada em microscópio eletrônico de varredura (MEV) confirmou o resultado obtido, uma vez que foi possível observar a degradação da camada homogênea de selante que recobria integralmente as amostras de resina estudadas, sendo possível observar, após a escovação, a exposição das partículas constituintes da resina composta.

Lopes et al., em 2012 concluíram que embora os selantes de superfície tenham sido criados para minimizar algumas limitações dos materiais à base de resina, eles parecem ser ineficazes na proteção da superfície de resina nanoparticulada contra escovação dentária.

Um estudo de 2014 também confirmou que a eficácia da aplicação dos selantes de superfície sobre a área restaurada com resina composta é comprometida pela abrasão advinda da escovação, uma vez que não proporcionou a otimização da integridade superficial após o teste de escovação (Nahsan et al., 2014).

Além disso, estudos *in vitro* possuem a limitação de não reproduzirem o ambiente oral, com a presença de saliva, da oclusão e de outros fatores como variações de pH e temperatura que podem afetar as propriedades dos materiais dentários e os resultados obtidos com respeito à perda do potencial antimicrobiano (Voltarelli et al., 2010).

Assim com base no potencial antimicrobiano observado para o composto de amônia quaternária e sua gradual perda promovida pelo desgaste da escovação, sugere-se que a reaplicação do selante de superfície poderia promover manutenção deste efeito ao longo prazo. Outros estudos considerando ciclagem térmica e alterações de pH devem ser conduzidos para verificação da influência destes fatores sobre a resistência da camada de selante, seja este acrescido de ORMOSIL-SiQAI ou não. Além disso, materiais mais resistentes à abrasão mecânica devem ser buscados.

7 CONCLUSÃO

O composto ORMOSIL-SiQAI apresenta potencial antimicrobiano, sendo capaz de inibir formação de biofilme de *S.mutans* tanto em sua forma pura como inserido em selante de superfície Biscover. Este potencial é perdido através de ciclos de escovação mecânica, o que indica que o composto necessita de reaplicações para que seu efeito permaneça à longo prazo.

REFERÊNCIAS

Beyth N, Yudovin-Farber I, Bahir R, Domb AJ, Weiss EI. Antibacterial activity of dental composites containing quaternary ammonium polyethylenimine nanoparticles against *Streptococcus mutans*. *Biomaterials*. 2006 Jul;27(21):3995-4002. doi: 10.1016/j.biomaterials.2006.03.003.

Bonesvoll P, Gjermo P. A comparison between chlorhexidine and some quaternary ammonium compounds with regard to retention, salivary concentration and plaque-inhibiting effect in the human mouth after mouth rinses. *Arch Oral Biol*. 1978;23(4):289-94. doi: 10.1016/0003-9969(78)90021-3.

Costin S, Xu X. Antimicrobial polymeric Dental Materials. In: Munoz-Bonilla A, Cerrada M, Fernández-García M, editors. *Polymeric Materials with Antimicrobial Activity: From Synthesis to Applications*. Volume Chapter 10. RSC Publishing; Cambridge, UK: 2013. p. 279-309.

Delfino CS, Andrade LEH, Souza FB, Oliveira OB. Inibições de lesões de cárie secundária ao redor dos materiais restauradores - Avaliação in vitro. *RGO*. 2006 Jan-Mar; 54(1):17-20.

Delfino CS, Duarte S Jr. Effect of the composite surface sealant application moment on marginal sealing of compactable composite resin restoration. *J Mater Sci Mater Med*. 2007 Dec;18(12):2257-61. doi: 10.1007/s10856-007-3112-8.

Deligeorgi V, Mjör IA, Wilson NH. An overview of reasons for the placement and replacement of restorations. *Prim Dent Care*. 2001 Jan;8(1):5-11. Review. doi: 10.1308/135576101771799335.

Dickinson GL, Mazer RB, Leinfelder KF. Two year clinical study on effect of surface sealant. *J. Dent. Res*. 1990;69:308.

Downer MC. The changing pattern of dental disease over 50 years. *Br Dent J*. 1998 Jul 11;185(1):36-41. doi: 10.1038/sj.bdj.4809721.

Ferreira KB, Cardoso LM, Aranha MFB, Daher MCV, Francischone CE. Efeito de dois selantes de superfície na microinfiltração marginal de restaurações de resina composta: estudo in vitro. *Salusvita*. 2007;26(2):213-27.

Frost PM. An audit on the placement and replacement of restorations in a general dental practice. *Prim Dent Care*. 2002 Jan;9(1):31-6. doi: 10.1308/135576102322547548

Ge Y, Wang S, Zhou X, Wang H, Xu HH, Cheng L. The Use of Quaternary Ammonium to Combat Dental Caries. *Materials (Basel)*. 2015 Jun;8(6):3532-49. doi:10.3390/ma8063532

Going RE, Loesche WJ, Grainger DA, Syed SA. The viability of microorganisms in carious lesions five years after covering with a fissure sealant. *J Am Dent Assoc*. 1978 Sep;97(3):455-62. doi: 10.14219/jada.archive.1978.0327

Gong SQ, Niu LN, Kemp LK, Yiu CK, Ryou H, Qi YP, et al. Quaternary ammonium silane-functionalized, methacrylate resin composition with antimicrobial activities and self-repair potential. *Acta Biomater*. 2012 Sep;8(9):3270-82. doi: 10.1016/j.actbio.2012.05.031.

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 Jun 12;10(6). pii: E643. doi: 10.3390/ma10060643.

Handelman SL, Buonocore MG, Heseck DJ. A preliminary report on the effect of fissure sealant on bacteria in dental caries. *J Prosthet Dent*. 1972 Apr;27(4):390-2. doi: 10.1016/0022-3913(72)90287-9

Handelman SL, Leverett DH, Iker HP. Longitudinal radiographic evaluation of the progress of caries under sealants. *J Pedod*. 1985 Winter;9(2):119-26.

Heintze SD. A new material concept for inhibiting the formation of secondary caries. *Am J Dent*. 1999 Nov;12(Spec N.):S4-7.

Imazato S, Ma S, Chen JH, Xu HH. Therapeutic polymers for dental adhesives: loading resins with bio-active components. *Dent Mater*. 2014 Jan;30(1):97-104. doi: 10.1016/j.dental.2013.06.003.

Köhler B, Hager B. Influence of salivary levels of mutans streptococci on colonization of crown margins: a longitudinal study. *J Prosthet Dent*. 1993 May;69(5):524-8. doi: 10.1016/0022-3913(93)90164-J.

Kourai H, Yabuhara T, Shirai A, Maeda T, Nagamune H. Syntheses and antimicrobial activities of a series of new bis-quaternary ammonium compounds. *Eur J Med Chem*. 2006 Apr;41(4):437-44. doi: 10.1016/j.ejmech.2005.10.021.

Kramer PF, Cardoso L, Reis ASP, Silveira D, Tovo MF. Efeito da aplicação de selantes de fossas e fissuras na progressão de lesões cariosas oclusais em molares decíduos: observações radiográficas. *JBP*. 2003;6(34):504-14.

Kramer PF, Feldens CA, Romano AR. Promoção de saúde bucal em odontopediatria: diagnóstico, prevenção e tratamento da cárie oclusal. São Paulo: Artes Médicas; 1997.

Kramer PF, Zelante F, Simionato MR. The immediate and long-term effects of invasive and noninvasive pit and fissure sealing techniques on the microflora in occlusal fissures of human teeth. *Pediatr Dent*. 1993 Mar-Apr;15(2):108-12.

Kregiel D. Advances in biofilm control for food and beverage industry using organo-silane technology: a review. *Food Contr*. 2014;40:32–40. doi:10.1016/j.foodcont.2013.11.014.

Lin J, Sun M, Zheng Z, Shinya A, Han J, Lin H, et al. Effects of rotating fatigue on the mechanical properties of microhybrid and nanofiller-containing composites. *Dent Mater J*. 2013;32(3):476-83. doi: 10.4012/dmj.2012-225

Lopes LG, Franco EB, Pereira JC, Mondelli RF. Effect of light-curing units and activation mode on polymerization shrinkage and shrinkage stress of composite resins. *J Appl Oral Sci.* 2008 Jan-Feb;16(1):35-42.doi: 10.1590/S1678-77572008000100008.

Lopes MB, Saquy PC, Moura SK, Wang L, Graciano FM, Correr Sobrinho L, et al. Effect of different surface penetrating sealants on the roughness of a nanofiller composite resin. *Braz Dent J.* 2012;23(6):692-7. doi: 10.1590/S0103-64402012000600011

Lowe RA. Using BisCover surface sealant/polish on direct and indirect composite and bisacrylic provisional restorations. *Compend Contin Educ Dent.* 2004 May;25(5):400-1.

Mjör IA, Sveen OB, Heyeraas KJ. Pulp-dentin biology in restorative dentistry. Part 1: normal structure and physiology. *Quintessence Int.* 2001 Jun;32(6):427-46.Review.

Mjör IA, Toffenetti F. Secondary caries: a literature review with case reports. *Quintessence Int.* 2000 Mar;31(3):165-79. Review.

Munoz-Bonilla A, Fernandez-Garcia M. Polymeric materials with antimicrobial activity. *Prog. Polym. Sci.* 2012;37:281–339.doi:10.1016/j.progpolymsci.2011.08.005.

Munro GA, Hilton TJ, Hermech CB. In vitro microleakage of etched and rebonded Class V composite resin restorations. *Oper Dent.*, 1996; 21(5); 203-8.

Nahsan FPS, Da Silva LM, Baseggio W, Francisconi PAS, Franco EB, Mondelli RFL. Effect of sealants in the composite surface roughness after tooth brushing. *Biosci. J.* 2014; 30 (6): 1959-66.

Namba N, Yoshida Y, Nagaoka N, Takashima S, Matsuura-Yoshimoto K, Maeda H, et al. Antibacterial effect of bactericide immobilized in resin matrix. *Dent Mater.* 2009 Apr;25(4):424-30. doi: 10.1016/j.dental.2008.08.012.

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 Nov;31(11):e247-77. doi: 10.1016/j.dental.2015.09.001.

Owens BM, Johnson WW. Effect of new generation surface sealants on the marginal permeability of Class V resin composite restorations. *Oper Dent*. 2006 Jul Aug;31(4):481-8. doi: 10.2341/05-77

Palermo EF, Lee DK, Ramamoorthy A, Kuroda K. Role of cationic group structure in membrane binding and disruption by amphiphilic copolymers. *J Phys Chem B*. 2011 Jan 20;115(2):366-75. doi: 10.1021/jp1083357.

Peterson HG, Bratthall D. The caries decline: a review of reviews. *Eur J Oral Sur* 1996; 104(4):436-43. doi:10.1111/j.1600-0722.1996.tb00110.x

Ramos RP, Chinelatti MA, Chimello DT, Dibb RG. Assessing microleakage in resin composite restorations rebonded with a surface sealant and three low-viscosity resin systems. *Quintessence Int*. 2002 Jun;33(6):450-6.

Ramos RP, Chimello DT, Chinelatti MA, Dibb RG, Mondelli J. Effect of three surface sealants on marginal sealing of Class V composite resin restorations. *Oper Dent*. 2000 Sep-Oct;25(5):448-53.

Reid JS, Saunders WP, Chen YY. The effect of bonding agent and fissure sealant on microleakage of composite resin restorations. *Quintessence Int*. 1991 Apr; 22(4):295-8.

Rosa M, Sturzenberger OP. Clinical reduction of gingivitis through the use of a mouthwash containing two quaternary ammonium compounds. *J Periodontol*. 1976 Sep;47(9):535-7. doi: 10.1902/jop.1976.47.9.535.

Sugii MM, Ferreira FAS, Müller KC, Lima DANL, Groppo FC, Imasato H, et al. Physical, chemical and antimicrobial evaluation of a composite material containing quaternary ammonium salt for braces cementation. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2017 Apr 1;73:340-346. doi: 10.1016/j.msec.2016.12.084.

van Dijken J, Persson S, Sjöström S. Presence of *Streptococcus mutans* and lactobacilli in saliva and on enamel, glass ionomer cement, and composite resin surfaces. *Scand J Dent Res*. 1991 Feb;99(1):13-9. doi:10.1111/j.1600-0722.1991.tb01017.x

Voltarelli FR, Santos-Daroz CB, Alves MC, Cavalcanti AN, Marchi GM. Effect of chemical degradation followed by toothbrushing on the surface roughness of restorative composites. *J Appl Oral Sci.* 2010 Dec;18(6):585-90. doi: 10.1590/S1678-77572010000600009.

Xu X, Wang Y, Liao S, Wen ZT, Fan Y. Synthesis and characterization of antibacterial dental monomers and composites. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2012 May;100(4):1151-62. doi: 10.1002/jbm.b.32683.

Zhang K, Cheng L, Weir MD, Bai YX, Xu HH. Effects of quaternary ammonium chain length on the antibacterial and remineralizing effects of a calcium phosphate nanocomposite. *Int J Oral Sci.* 2016 Mar 30;8(1):45-53. doi: 10.1038/ijos.2015.33.